



HAL
open science

Rôle de l'intégrine bêta 8 dans le maintien de l'état souche et la radiorésistance des cellules souches de glioblastomes : vers une nouvelle thérapie ciblée

Laure Malric

► To cite this version:

Laure Malric. Rôle de l'intégrine bêta 8 dans le maintien de l'état souche et la radiorésistance des cellules souches de glioblastomes : vers une nouvelle thérapie ciblée. Médecine humaine et pathologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2018. Français. NNT : 2018TOU30109 . tel-02407561

HAL Id: tel-02407561

<https://theses.hal.science/tel-02407561>

Submitted on 12 Dec 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.

Université Fédérale



Toulouse Midi-Pyrénées

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par:

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par:

Laure MALRIC

le vendredi 27 avril 2018

Titre :

Rôle de l'intégrine bêta 8 dans le maintien de l'état souche et la radiorésistance
des cellules souches de glioblastomes : vers une nouvelle thérapie ciblée

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED BSB: Cancérologie

Unité de recherche :

INERM U1037 Equipe 11 CRCT Oncopôle

Directeur/trice(s) de Thèse :

Dr Aline KOWALSKI CHAUVEL

Dr Anthony LEMARIE

Jury :

Pr Sophie SIXOU, présidente du jury

Pr Maxime LEHMANN, rapporteur

Dr Mireille VERDIER, rapporteur

Pr José LUIS, examinateur

REMERCIEMENTS

A la Présidente du jury, la Pr Sophie SIXOU, pour votre disponibilité aujourd'hui et pour avoir accepté de présider ce jury de thèse. Je suis heureuse de pouvoir vous présenter la suite de mon travail.

Aux membres du jury, le Pr Maxime LEHMANN, la Dr Mireille VERDIER, le Pr José LUIS, pour avoir accepté de participer à ce jury et pour le temps consacré à l'examen de ma thèse.

A mon directeur de thèse, le Dr Anthony LEMARIE, pour la direction de ce travail de thèse. Merci pour le temps accordé, pour tous les conseils, les compétences scientifiques et techniques transmises. J'ai apprécié la liberté laissée dans mon approche des problèmes et de mes choix, ce qui m'a permis de développer confiance en moi et persévérance.

A ma directrice de thèse, la Dr Aline CHAUVEL, pour le soutien et les encouragements donnés. Merci pour ton aide « Aline 3000 », si précieuse dans l'équipe.

Aux membres de mon comité de thèse, la Dr Claire RACAUD-SULTAN et la Dr Monique DONTENWILL, pour avoir suivi mes travaux.

A toute l'équipe de radiorésistance tumorale,

La Pr Elizabeth COHEN-JONATHAN MOYAL et la Dr Christine TOULAS, pour m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein de leur équipe de recherche.

Aux membres de l'équipe, Annie, Aurore, Benjamin, Caro, Cathy, Cyrielle, Florent, Judith, Laurent, Marie-Julie, Monique, Solène, Valérie, pour votre accueil chaleureux, votre esprit d'équipe et tous les bons moments partagés. « Faites travailler les gens ensemble et vous en ferez des amis » (Saint Exupéry).

Aux extraordinaires thésardes, Perrine, Julie, Pauline et Sabrina pour votre soutien et votre bonne humeur. Vous êtes formidables. Je suis si heureuse d'avoir autant partagé avec vous.

Aux stagiaires, que j'ai eu la chance de co-encadrer Laurie, Guillaume et Claire, ou qui ont un jour croisé la route de l'équipe 11.

A tout le CRCT,

A Syllie Monferran, merci pour tes mots rassurants et tout ce que tu m'as appris.

A Isabelle Lajoie, merci pour nos discussions passionnées, ton aide et ta douceur.

Au plateau technique et à la zootechnie, merci de m'avoir permis de réaliser des expériences précieuses pour ma thèse. Merci à Manon Farcé, pour les heures passées au tri cellulaire.

A Anne-Marie Bénot, merci pour votre aide administrative et votre gentillesse.

A toutes les personnes du centre, Clothilde, Cyrielle, Iotefa, Laura, Maud, Pauline, Sarah, Samantha, ... qui m'ont un jour donné un conseil, un soutien, un sourire.

A la fac de pharmacie, et en particulier au service d'enseignement de Biochimie et de Biologie cellulaire. Merci de m'avoir fait découvrir l'enseignement, une expérience très enrichissante pour moi.

A mes amis,

Julie, ma « sœur de cœur », pour tes précieux conseils, ton soutien inestimable. Je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu as fait pour moi, je ne l'oublierai jamais.

Sabrinana, pour ta douceur, tes petits mots, nos fous-rires, ta présence, tes câlins, ta maturité.

Clèm, pour ta présence, ton suivi et ton réconfort tout au long de mes études. Merci pour ta bonne humeur ma « miss sourire » et nos millions de messages échangés.

Pauline, ma « jumelle de thèse », un merci tout particulier pour ce que tu as fait pour moi, je ne pourrai jamais l'oublier.

Les Aveyronnais, Clémence, Julie, Lucie, Sandrine, Arnaud, David, François, Hugo, Joan, Simon,

Les pharmaciens, Kalou et Camille, Laetitia, Sakina, Madly, Sarah, Brice et Sophie, Selma, Sophie et Johanna,

Les amis de Master 2, Irena, Aline et Claire,

Les Ksis,

et tous les autres,

Merci à tous pour les merveilleux moments partagés, essentiels pour me ressourcer et me donner du courage.

Irène, merci d'avoir cru en moi, merci de m'avoir rassurée, merci pour votre écoute, votre compréhension, votre aide, vos encouragements. Vous m'avez donné beaucoup de force et de courage.

Isabelle, merci pour votre soutien, votre aide et votre réconfort.

Sandra Bonnefont, merci pour votre temps et vos conseils qui m'ont énormément aiguillée.

A ma famille,

A mes parents, Maryline et Raymond, pour votre soutien, votre confiance, vos encouragements de chaque instant et votre accompagnement tout au long de ces années. Merci pour tout ce que vous m'avez appris et pour tout ce que vous avez fait pour moi. Je vous serai toujours reconnaissante. MERCI POUR TOUT. Ma thèse est pour vous.

A ma sœur Emilie, ma confidente, ma meilleure alliée, pour être toujours à mes côtés, pour m'avoir toujours soutenue sans faille, pour tes « câlins de sœurs » et pour ta présence indispensable.

A mon frère Arnaud, pour ta façon de me motiver, de me donner toujours le sourire et de prendre toujours ma défense et à *Pauline* pour ton écoute et ton soutien.

A mon parrain Jean, pour m'avoir permis de découvrir le monde de la recherche dans lequel je me suis éclatée.

A ma marraine Nicole, pour m'accueillir dans le meilleur endroit au monde pour me ressourcer.

A ma mamie, pour ton cœur d'or tout simplement. A 95 ans tu trouves encore le moyen de donner aux autres. Tu es mon exemple.

A mon cousin Domi, mon grand frère, tu es toujours le premier présent pour tout, merciiii. Merci d'être venu me délivrer, merci pour le nombre incalculable de fois où tu m'as aidée.

A ma cousine Aurélie, pour tes appels au bon moment et ton expérience.

A Pierre, mon « tonton », pour tes encouragements précieux, ton accompagnement, nos discussions passionnées.

A Jacques Salès, mon « grand père d'adoption ». Merci pour vos sages conseils que j'essaye d'appliquer et tout particulièrement aujourd'hui.

A Josiane et Michel, merci pour vos petits mots, vos encouragements et votre gentillesse.

A toute ma famille, pour votre affection et votre soutien, je tiens très fort à vous. Tous les cousins et cousines, les tontons et taties, ... MERCIIII. Merci de m'avoir supportée, de vous être impliqués, de m'avoir encouragée pendant toutes mes études. Merci de vous être intéressés à mes manips, et de demander si je « trouvais quelque chose » et d'avoir pris si souvent des nouvelles de mes souris.

A Joffrey, pour ton soutien immense de chaque instant, pour tout ce que tu as fait pour moi, au-delà de tout ce que je pouvais imaginer. Merci de m'avoir toujours écouté, toujours été là, toujours soutenue, toujours cru en moi, encouragé, réconforté, donné confiance, redonné le sourire. Tu es le moteur de ma « centrale nucléaire ».

Vraiment du fond du cœur merci à tous de m'avoir permis de réaliser mon rêve

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	3
SOMMAIRE	6
LISTE DES ABREVIATIONS	9
LISTE DES FIGURES	13
LISTE DES TABLEAUX	15
LISTE DES ANNEXES	16
RESUME.....	17
ABSTRACT	17
INTRODUCTION.....	19
PARTIE 1 : Les Glioblastomes	19
I. Définition et généralités	19
II. Epidémiologie.....	20
II.1. Incidence et autres données épidémiologiques.....	20
II.2. Facteurs de risque	21
III. Physiopathologie des GB	21
III.1. Origine des GB.....	21
III.2. Modèles de développement tumoral	23
III.3. Le microenvironnement tumoral	24
III.4. Principales caractéristiques tumorales des GB.....	25
IV. Diagnostic des Glioblastomes	28
IV.1. Clinique.....	28
IV.2. Imagerie	28
IV.3. Anatomopathologie.....	29
IV.4. Génétique	30
V. Classifications des Glioblastomes	31
V.1. Classification OMS	31
V.2. Classification génétique	32
VI. Traitements des GB.....	35
VI.1. Chirurgie	35
VI.2. Radiothérapie	35
VI.3. Chimiothérapie.....	36
VI.4. Nouvelles thérapies	38

VII. Résistances et récives	44
VII.1. Chimiorésistance.....	44
VII.2. Radiorésistance	44
VII.3. Traitement des récives	45
VIII. Pronostic	46
PARTIE 2 : Les cellules souches de Glioblastomes	49
I. Définition et généralités	49
II. Origine des GSC	49
III. Niches.....	50
III.1. Généralités.....	50
III.2. Niches périvasculaires.....	52
III.3. Niches hypoxiques	52
III.4. Niches invasives	53
IV. Propriétés principales.....	53
IV.1. Auto-renouvellement	53
IV.2. Différenciation	53
IV.3. Tumorigenèse.....	54
IV.4. Expression de marqueurs	54
V. Autres caractéristiques	55
V.1. Migration/invasion	55
V.2. Angiogenèse	56
V.3. Plasticité des GSC	56
V.4. Hétérogénéité des GSC	58
V.5. Résistance des GSC.....	58
PARTIE 3 : Les Intégrines	63
I. Définition et généralités.....	63
II. Structure.....	65
II.1. Sous-unité alpha	66
II.2. Sous-unité beta	66
II.3. Relation structure fonction	66
II.4. Diversité.....	67
III. Ligands.....	67
III.1. Ligands extracellulaires.....	67
III.2. Ligands intracellulaires	69
IV. Expression.....	69
V. Signalisation	71
VI. Fonctions.....	73

VII. Recyclage.....	75
VIII. Les intégrines en pathologie.....	76
IX. Intégrines et cancer	78
IX.1. Généralités	78
IX.2. Expression des intégrines dans les cancers	78
IX.3. Rôles des intégrines dans les cancers.....	79
IX.4. Ciblage des intégrines en cancérologie.....	82
PARTIE 4 : Les intégrines dans les glioblastomes	86
I. Intégrines et Glioblastome	86
I.1. Généralités	86
I.2. Intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$	86
I.3. Intégrine $\alpha6\beta1$	89
I.4. Autres intégrines	89
II. Mise en évidence et caractéristiques de l'intégrine $\beta8$ dans les GSC	91
II.1. Vers la mise en évidence de l'intégrine $\beta8$ dans les GSC	91
II.2. Présentation de l'intégrine $\beta8$	91
II.3. Intégrine $\beta8$, gliomes et GSC	95
HYPOTHESE ET OBJECTIFS DE LA THESE	98
RESULTATS	99
I. Introduction des résultats	99
II. Article	101
II.1. Abstract.....	102
II.2. Introduction	103
II.3. Results	105
II.4. Discussion.....	117
II.5. Materials and methods.....	119
II.6. Acknowledgements	123
II.7. References	124
II.8. Supplemental figures and data.....	127
III. Conclusion des résultats	132
DISCUSSIONS ET PERSPECTIVES	135
I. Identification de l'intégrine $\beta8$ comme nouveau marqueur membranaire des GSC.....	136
II. Identification de $\beta8$ comme nouveau marqueur fonctionnel et cible des GSC.....	139
III. Identification de $\beta8$ comme une cible radiosensibilisante potentielle des GSC	143
IV. Perspectives cliniques et thérapeutiques	145
ANNEXES	149
BIBLIOGRAPHIE	242

LISTE DES ABREVIATIONS

A2B5 : *Neuron cell surface antigen A2B5*

AC : Anticorps

ADAM : *A disintegrin and metalloprotease*

ADMIDAS : *adjacent MIDAS*

AKT : Protéine kinase B

AML : Leucémie myéloïde aigue

ANG : Angiopoïétine

AP-1 : *Activator protein 1*

APC : Cellules progénitrices d'astrocytes

ATM : *Ataxia telangectasia mutated*

ATRX : *Histone chaperone protein*

α -SMA : *Alpha smooth muscle actin*

BCL-2 : *B-cell lymphoma 2 protein*

BCL-2L : *B-cell lymphoma 2 like protein*

BCL-xL : *B-cell lymphoma-extra large protein*

BEHAB : *Brevican neurocan*

BER : *Base excision repair*

BHE : Barrière hémato-encéphalique

BRCA1 : *Breast cancer 1*

BSP : Sialoprotéine osseuse

CAM-DR : *Cell adhesion mediated drug resistance*

Cas : *CRK-associate substrate*

CARs T : *Chimeric antigen receptors T cells*

CCN3 : *An extracellular matrix protein*

CD15 : *3-fucosyl-N-acetyl-lactosamine*

CD44 : *Lymphocyte homing receptor*

CD133 : *Prominin-1*

CDK4/6 : *Cyclin dependant kinase 4/6*

CDKN2A : *CDK inhibitor 2A*

CHI3L1 : *Chitinase-3-like protein 1*

CKII : *Casein kinase II*

CNP : *2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase*

COMP : *Cartilage oligomeric matrix protein*

CPA : Cellules présentatrices d'antigène

CSC : Cellules souches cancéreuses

CTLA-4 : *Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*

CTSD : *Cathespain D*

CXRC4 : *Chemokine receptor type 4*

Cyr61 : *Cysteine-rich protein 61*

Dll4 : *Delta like ligand 4*

DMLA : *Dégénérescence maculaire liée à l'âge*

DMP-1 : *Dentin matrix protein 1*

DOCK-1 : *Docking protein 1*

DOCK-180 : *Dedicator of cytokinesis*

EGF : *Epidermal growth factor*

EGFR : *Epidermal growth factor receptor*

EphA2 : *Ephrin type-A receptor 2*

eNOS : *Endothelial nitric oxyde synthase*

ERK : *Extracellular signal regulated kinases*

FAK : *Focal adhesion kinase*

FGF : *Fibroblast growth factor*

FLAIR : *Fluid attenuated inversion recovery*

FLIP : *Cellular FLICE-like inhibitory protein*

FLT3 : *Fms-like tyrosine kinase 3*

GalC : *Galactocerebroside*

GABRA1 : *Gamma-aminobutyric acid type A receptor alpha 1*

GB : *Glioblastome*

GB I : *Glioblastome primaire*

GB II : *Glioblastome secondaire*

GEF : *Facteurs d'échange nucléotidiques*

GF : *Growth factor*

GFAP : *Protéine gliale acide fibrillaire*

GFP : *Green fluorescent protein*

GLAST : *Glutamate aspartate transporter*

Gli1 : *Glioblastoma family zinc finger 1*

GLT1 : *Glutamate transporter 1*

GLUT : *Glucose transporter*

Grb2 : *Growth factor receptor bound protein 2*

GRPC : Progéniteurs spécifiques des cellules gliales
GSC : Cellules souches de glioblastome
GSK3 β : *Glycogen synthase kinase 3 β*
GTPases : petites protéines G
Gy : Gray
HDAC : Histone déacétylase
HGFR : *Hepatocyte growth factor receptor*
HGF : *Hepatocyte growth factor*
HIF : *Hypoxia-inducibles factors*
H3F3A : Histone H3, famille 3A
IAP : Protéines inhibitrices de l'apoptose
I-CAM : *Intracellular adhesion molecule*
ICAP-1 : *Integrin cytoplasmic domain associated protein 1*
iC3b : *Inactivated complement component 3*
IDH1 : Isocitrate déshydrogénase 1
IDM : Infarctus du myocarde
IGF2 : *Insulin-like growth factor 2*
IgG : Immunoglobuline
IL : Interleukine
ILK : *Integrin linked kinase*
ILKAP : *ILK-associated protein serine/threonine phosphatase of the PP2C family*
IMD : *Integrin mediated death*
IP : Iodure de propidium
IRM : Imagerie par résonance magnétique
ITG : Intégrine
JNK : *c-Jun N-terminal kinase*
KO : *Knock-out*
LAD : *Leukocyte adhesion deficiency*
LAG-3 : *Lymphocyte-activation gene 3*
LAP-TGF β : Forme latente du TGF β
L-CAM : *Leucocyte cellular adhesion molecule*
LDL : Lipoprotéines de faible densité
LDH : Lactate deshydrogénase
LOH : *Loss of heterozygosity*
LCR : Liquide céphalo-rachidien
MAdCAM-1 : *Mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1*
MAL : *Myelin and lymphocyte protein*
MAP2 : *Microtubule-associated protein 2*
MAPK : *Mitogen-activated protein kinases*
MBP : *Myelin basic protein*
Mc : Monoclonal
MDM2 : *Mouse double minute 2*
MEC : Matrice extracellulaire
MEK : *Mitogen activated protein kinase kinase*
MERTK : *Myeloid-epithelial-reproductive tyrosine kinase*
MGMT : O⁶-méthylguanine-ADN méthyltransférase
MICI : Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
MIDAS : *Metal ion-dependent adhesion site*
MLCK : *Myosin light chain kinase*
MMP : Métalloprotéine
MMR : *Mismatch repair*
MTIC : 5-(3-Méthyl)-1-Triazen-1-yl-Imidazole-4-Carboxamide
mTOR : *Mammalian target of rapamycin*
NAA : N- acétyl aspartate
Nanog : *Homeobox protein nanog*
NCIC : Institut national du cancer du Canada
Nck2 : *Non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 2*
Néo : Gène de résistance à la néomycine
NeuN : *Neuronal nuclei antigen*
NEFL : *Neurofilament light*
NF1 : *Neurofibromatosis 1*
NF- κ B : *Nuclear factor kappa B*
NG2 : *Chondroitin sulfate proteoglycan*
NGF : *Nerve growth factor*
NHEJ : Recombinaison non homologue
NO : Oxyde nitrique
NPC : Cellules progénitrices neurales
NRP1 : Neuropiline 1
NS : Neurosphères
NSC : Cellules neurales souches
NSCLC : Cancer du poumon non à petites cellules
NT : Cellules non transfectées

OERTC : Organisation Européenne pour la Recherche et le Traitement du Cancer
O4 : *Oligodendrocyte marker O4*
Olig2 : *Oligodendrocyte lineage transcription factor 2*
OMG : *Oligodendrocyte-myelin glycoprotein*
OMS : Organisation mondiale de la santé
OPC : Cellules progénitrices d'oligodendrocytes
OPN : Ostéopontine
OS : *Overall survival*
PAK4 : *Serine/threonine p21-activating kinase 4*
PARP : Poly-ADP-ribose polymerase
p130Crk : *V-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog*
PD-1 : *Programmed cell death protein 1*
PDGF : *Platelet derived growth factor*
PDGFR : *Platelet derived growth factor receptor*
PEA-15 : *Phosphoprotein enriched in astrocytes 15*
PECAM-1 : *Platelet and endothelial cell adhesion molecule 1*
PGK : *Phosphoglycerate kinase*
PHD : *Prolyl hydroxylase domain enzyme*
PFS : *Progression-free survival*
PINCH-1 : *Particularly interesting new cysteine-histidine rich protein*
PKC : Protéine Kinase C
PLC : Phospholipase C
PLP : *Myelin proteolipid protein*
PNRE : *Perinuclear recycling endosome*
PPIX : *Protoporphirin IX*
PP2A : *Protein phosphatase A2*
PTEN : *Phosphatase-tensine homolog*
Rb : *Retinoblastoma*
RE : *Recycling endosome*
RGD : Arginine - Glycine - Acide aspartique
RGF : *Receptor growth factor*
RhoGDI1 : *Rho GDP-dissociation inhibitor 1*
RI : Radiations ionisantes
ROS : Dérivés réactifs de l'oxygène

RT : Radiothérapie
SCM : *Stem cell medium*
SCTF : Facteurs de transcription des cellules souches
SDF-1 : *Stromal cell-derived factor 1*
SFI : Intensité spécifique de fluorescence
shB8 : shRNA dirigé contre ITGβ8
shCTR : shRNA contrôle
Shc-1 : *Src homology 2 domain containing transforming protein 1*
siCTR : siRNA contrôle
siB8 : siRNA dirigé contre ITGβ8
Sox2 : *SRY-related HMG-box gene 2*
SPARC : *Secreted protein acidic and cystein rich*
SPN : *Spinophilin*
SP3 : *Transcription factor SP3*
SRC : *Sarcoma tyrosine kinase*
SRPK1 : *Serine/arginine protein kinase 1*
SVF : Sérum de veau fœtal
SyMBS : *Synergistic metal ion-dependent binding site*
SYT1 : *Synaptogamin 1*
TCGA : *The Cancer genome atlas*
TDM : Tomodensitométrie
TEP : Tomographie par émission de positons
TERT : *Telomerase reverse transcriptase*
TGFα : *Transforming growth factor α*
TGFβ : *Transforming growth factor β*
TGFβ-R : *Transforming growth factor β receptor*
TIC : Cellules initiatrices de tumeurs
TIE2 : *Tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains*
TIM-3 : *T-cell Ig and mucin-domain containing-3*
TMZ : Témazolomide
TNF : *Tumor necrosis factor*
TNF-R : *Tumor necrosis factor receptor*
TPC : Cellules propagatrices de tumeurs
TSP1 : *Thrombospondine 1*
TUJ1 : *Neuron-specific class III beta tubulin*
tTG : *Tissue transglutaminase*

uPA : *Urokinase plasminogen activator*
uPAR : *Urokinase plasminogen activator receptor*
V-CAM : *Vascular cellular adhesion molecule*
vWF : *Facteur de von Willebrand*
VEGF : *Vascular endothelial growth factor*

VEGFR : *Vascular endothelial growth factor receptor*
VS : *Vaisseaux sanguins*
VHL : *Von Hippel-Lindau protein*
Zeb1 : *Zinc finger E-box-binding homeobox 1*

LISTE DES FIGURES

Figures de la partie introductive :

- Figure 1 :** Cellules à l'origine des gliomes et glioblastomes : hypothèses.
- Figure 2 :** Modèles de développement tumoral.
- Figure 3 :** Représentation schématique du microenvironnement tumoral des GB.
- Figure 4 :** Hypoxie et voies de signalisation.
- Figure 5 :** IRM d'un patient atteint de gliome.
- Figure 6 :** Coupe histologique et immunohistochimique d'un GB.
- Figure 7 :** Altérations génétiques impliquées dans les GB.
- Figure 8 :** Classification génétique des GB.
- Figure 9 :** Mécanisme d'action de la radiothérapie sur sa cible principale : l'ADN.
- Figure 10 :** Courbe de Kaplan-Meier estimant la survie globale des patients atteints de GB selon le traitement administré.
- Figure 11 :** Mécanisme d'action du Témzolomide.
- Figure 12 :** Protocole standard actuel de traitement des GB.
- Figure 13 :** Principales thérapies ciblées à l'étude dans les GB.
- Figure 14 :** Bilan partie 1 : Les Glioblastomes.
- Figure 15 :** Origines potentielles des GSC et relations éventuelles avec les NSC, progéniteurs et cellules différenciées.
- Figure 16 :** Niches des GSC.
- Figure 17 :** Capacité d'auto-renouvellement et de différenciation des GSC.
- Figure 18 :** Marqueurs des GSC.
- Figure 19 :** Implication des GSC dans la migration et l'invasion tumorale.
- Figure 20 :** Implication des GSC dans l'angiogenèse tumorale.
- Figure 21 :** Bilan partie 2 : Les GSC.
- Figure 22 :** Membres de la superfamille des intégrines chez l'Homme et nature des 24 hétérodimères rencontrés.
- Figure 23 :** Représentation schématique de la structure des intégrines.
- Figure 24 :** Représentation schématique des mécanismes d'action des intégrines et des voies de signalisations associées.
- Figure 25 :** Principales voies de signalisation intracellulaire des intégrines.
- Figure 26 :** Représentation schématique du recyclage des intégrines.
- Figure 27 :** Rôles des intégrines dans les différentes étapes du développement tumoral.
- Figure 28 :** Bilan partie 3 : Les intégrines et leur implication en cancérologie.
- Figure 29 :** Structures chimiques du motif RGD (29A) et du Cilengitide (29B).
- Figure 30 :** Intégrine $\beta 8$.
- Figure 31 :** Représentation schématique des voies de signalisation de l'intégrine $\beta 8$ et des conséquences fonctionnelles associées.
- Figure 32 :** Expression tissulaire de l'intégrine $\beta 8$.

Figures de la publication :

Figure 1. *ITGβ8 is overexpressed in GB and particularly in GIC compared to GB differentiated cells (GDC).*

Figure 2. *ITGβ8 is efficiently downregulated in GIC by specific shRNA and siRNA.*

Figure 3. *shRNA-mediated ITGβ8 knock-down alters GIC self-renewal.*

Figure 4. *shRNA-mediated ITGβ8 knock-down alters GIC stemness.*

Figure 5. *shRNA-mediated ITGβ8 knock-down induces GIC apoptosis.*

Figure 6. *shRNA-mediated ITGβ8 knock-down reduces GIC adhesion and migration.*

Figure 7. *shRNA-mediated ITGβ8 knock-down radiosensitizes the GIC population.*

Figure 8. *High ITGβ8-expression is correlated with increased tumorigenesis in xenografted mice and with reduced GB-patient survival.*

Supplemental Figure 1. *Phenotypic characterization of GIC-enriched neurospheres and related GDC cultures.*

Supplemental Figure 2. *Expression of major integrins in GIC compared to GDC.*

Supplemental Figure 3. *Correlation of ITGB8 and stem/differentiated markers in GB patients from the TCGA database.*

Supplemental Figure 4. *siRNA-mediated ITGβ8 knock-down impairs GIC stemness and induces apoptosis. (A-D)*

Figure conclusive :

Figure bilan : Représentation schématique du bilan des données acquises au cours de cette thèse et des futures perspectives.

LISTE DES TABLEAUX

Tableaux de la partie introductive :

Table 1 : Classification OMS des tumeurs du SNC.

Table 2 : Caractéristiques épidémiologiques des GB.

Table 3 : Classification OMS des gliomes.

Table 4 : Tableau récapitulatif des principales thérapies ciblées à l'étude pour le traitement des GB.

Table 5 : Principaux marqueurs des cellules différenciées.

Table 6 : Les différentes sous-unités d'intégrines chez l'Homme.

Table 7 : Principaux ligands extracellulaires des différentes intégrines.

Table 8 : Expression des différentes intégrines chez l'Homme.

Table 9 : Phénotypes des souris KO pour les différentes sous-unités des intégrines.

Table 10 : Principaux inhibiteurs d'intégrines en essais cliniques.

Table 11 : Expression des intégrines en cancérologie.

Table 12 : Tableau récapitulatif des essais cliniques du Cilengitide dans les GB.

Table 13 : Tableau récapitulatif des intégrines impliquées dans les GB.

Tableau de la publication :

Supplementary Table 1: qPCR and fluidigm primers.

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Poster : “Role of $\beta 8$ integrin in stemness maintenance and radioresistance of glioblastoma stem like cells”.

Annexe 2 : Brevet scientifique : N° dépôt EP.14306644.7 (2014) et PCT/FR2016/050907 (2016) - New method for treating resistant glioblastoma. Lemarie A, **Malric L**, Toulas C, Cohen-Jonathan Moyal E.

Annexe 3 : Revue scientifique : Interest of integrins targeting in glioblastoma according to tumor heterogeneity and cancer stem cell paradigm: an update. **Malric L**, Monferran S, Gilhodes J, Boyrie S, Dahan P, Skuli N, Sesen J, Filleron T, Chauvel A, Toulas C, Cohen-Jonathan Moyal E, Lemarie A. *Oncotarget*. 2017

Annexe 4 : Publication en co-auteur : Ionizing radiations sustain glioblastoma cell dedifferentiation to a stem-like phenotype through survivin: possible involvement in radioresistance. Dahan P, Martinez Gala J, Delmas C, Monferran S, **Malric L**, Zentkowski D, Lubrano V, Toulas C, Cohen-Jonathan Moyal E, Lemarie A. *Cell Death Dis*. 2014 Nov 27;5:e1543.

RESUME

Les glioblastomes (GB) sont des tumeurs cérébrales invasives, résistantes et qui récidivent systématiquement malgré un traitement associant chirurgie, radio- et chimiothérapie. Ces tumeurs de très mauvais pronostic, se caractérisent par une survie médiane de 15 mois. L'agressivité des GB est notamment due à la présence d'une sous-population de cellules souches (GSC). Les GSC sont caractérisées par leurs capacités d'auto-renouvellement, d'expression de différents marqueurs souches, de multipotence et de tumorigenèse. Elles sont fortement impliquées dans la résistance et la récurrence tumorale et leur ciblage pourrait améliorer le traitement des GB. Au vu de la littérature et de résultats obtenus au laboratoire, l'intégrine $\beta 8$ est apparue comme une nouvelle cible potentielle de ces GSC. Cette intégrine est décrite comme possédant un rôle majeur dans la survie et l'auto-renouvellement des cellules progénitrices neurales saines et sa surexpression est associée à une diminution de la survie des patients. Nous avons alors émis **l'hypothèse que l'intégrine $\beta 8$ pourrait être impliquée dans le maintien de l'état souche des GSC**. J'ai démontré au cours de ma thèse que cette intégrine **est surexprimée dans des primocultures de GSC** issues de résections de GB ainsi que **dans des coupes de tumeurs de patients**. De plus, j'ai mis en évidence que **$\beta 8$ est associée à l'état souche et à des fonctionnalités propres à ces cellules**, notamment leur auto-renouvellement, leur viabilité, leur migration et leur radiorésistance. En inhibant sélectivement $\beta 8$ dans nos primocultures de GSC par si/shRNA, j'ai en effet observé *in vitro* une diminution de la formation de neurosphères et de la migration cellulaire ainsi qu'une augmentation de la différenciation et de la mort cellulaire, cette dernière étant potentialisée après irradiation. Enfin, *in vivo*, j'ai mis en évidence que **l'inhibition de $\beta 8$ se traduit par une diminution de la tumorigenèse et une augmentation de la survie des souris**. En conclusion, mes résultats de thèse permettent d'identifier l'intégrine $\beta 8$ comme une protéine membranaire nécessaire au maintien de l'état souche dans les GSC mais surtout comme une potentielle cible thérapeutique radiosensibilisante dans les GB.

ABSTRACT

Glioblastomas (GB) are invasive, resistant and recurrent brain tumors despite standard treatment including surgical resection, radio- and chemotherapy. GB display severe outcome with a median overall survival of 15 months. This tumor aggressiveness could partly be explained by the presence into the tumor of Glioblastoma-Stem like Cells (GSC). GSC are characterized by their ability to self-renew, their higher expression of specific GSC markers, their multipotent aptitude and their high tumorigenic potential. They are strongly involved in tumor resistance and recurrence and their targeting could improve GB treatment. Regarding current literature but also transcriptomic results obtained in our research team, a specific $\beta 8$ integrin emerged as a potential selective target in GSC. Indeed, this integrin is described as essential for neural progenitor cells viability and self-renewal and its overexpression is associated with reduced GB patients' survival. We then **hypothesized that $\beta 8$ integrin could be involved in stemness maintenance of GSC**. I first demonstrated, during my doctoral thesis, that **$\beta 8$ is overexpressed in primocultures of GSC** isolated from patients' resections **and also in human GB samples**. Moreover, I showed that **this integrin could be associated with stemness and features unique to these cells**, including self-renewal ability, viability, migration and radioresistance. Indeed, the selective inhibition of $\beta 8$ in GSC by si/shRNA resulted *in vitro* in a decrease of neurosphere formation and migration, associated with an increase of differentiation patterns and cell death, this one being potentiated after irradiation. Finally, *in vivo*, I showed that **$\beta 8$ inhibition decreased tumorigenesis and increased mice survival**. In conclusion, my doctoral results allow to identify $\beta 8$ integrin as a membrane protein essential for stemness maintenance of GSC but mostly as a new potential radiosensitizing therapeutic target for GB.

INTRODUCTION

PARTIE 1 : Les Glioblastomes

I. Définition et généralités

Les cancers représentent la première cause de mortalité en France. Il existe un très grand nombre de tumeurs différentes, cette pathologie pouvant se développer à partir de n'importe quel type cellulaire de l'organisme. Dans le cadre de cette Thèse nous allons nous intéresser à un type particulier de tumeur cérébrale : les glioblastomes (GB).

Parmi l'ensemble des tumeurs primaires, les tumeurs cérébrales représentent environ 2% des cancers. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (Louis et al., 2016), les tumeurs cérébrales peuvent être classées en différents sous-groupes (**Table 1**).

SOUS GROUPES DE TUMEURS CEREBRALES	EXEMPLES
Tumeurs diffuses astrocytaires et/ou oligodendrocytaires	Astrocytomes, glioblastomes , oligodendrogliomes
Autres tumeurs astrocytaires	Xantho astrocytomes
Tumeurs épendymaires	Ependymomes
Autres gliomes	Astroblastomes
Tumeurs des plexus choroïdes	Papillomes des plexus choroïdes
Tumeurs neuronales	Gangliogliomes
Tumeurs de la région pinéale	Pineoblastomes
Tumeurs embryonnaires	Médulloblastomes
Tumeurs des nerfs crâniens et périphériques	Schwannomes, neurofibromes
Tumeurs méningées	Méningiomes
Tumeurs mésenchymateuses	Angiosarcomes, lipomes
Tumeurs mélanocytaires	Mélanomes méningées
Lymphome primitif du Système Nerveux Central (SNC)	Lymphomes anaplasiques
Tumeurs histiocytaires	Maladie de Erdheim-Chester
Tumeurs des cellules germinales	Tératomes
Tumeurs de la région sellaire	Carniopharyngiomes

Table 1 : Classification OMS des tumeurs du SNC (Louis et al., 2016).

Ainsi, il existe plus de 100 types de tumeurs cérébrales différentes mais les **gliomes** sont les plus fréquentes (70%) (Furnari et al., 2007). Les gliomes malins sont issus de la prolifération anarchique des **cellules gliales** ou de leurs **précurseurs**. Ces cellules, qui regroupent trois types cellulaires (astrocytes, oligodendrocytes et microgliocytes), soutiennent et nourrissent les neurones dans le tissu cérébral. Rassemblés sous le terme de gliomes, on distingue principalement les astrocytomes, oligodendrogliomes et les épendymomes selon le phénotype des cellules gliales dont ils sont composés (Furnari et al., 2007).

Les gliomes sont classés selon leurs caractéristiques histologiques en différents grades (de I à IV) établis par l'OMS en 2007, et réactualisés en 2016 (Louis et al., 2007; Louis et al., 2016). Les critères de classification reposent essentiellement sur des critères immunohistologiques, c'est-à-dire la présence d'atypies cellulaires, l'activité mitotique, la prolifération microvasculaire et la nécrose, mais aussi depuis 2016 sur des paramètres moléculaires (cf. Partie I, Paragraphe IV.4).

Les GB correspondent aux gliomes de plus hauts grades (grade IV selon l’OMS), c’est-à-dire aux formes les plus agressives. Ils surviennent le plus souvent dans la substance blanche sous-corticale des hémisphères cérébraux (Brandes et al., 2008). Tous les lobes cérébraux peuvent être touchés, même si la localisation fronto-temporale semble être la plus fréquente (Chakrabarti et al., 2005). Une atteinte du cervelet ou de la moelle épinière est en revanche très rare (Thakkar et al., 2014).

Les GB sont des tumeurs très hétérogènes, cependant on peut distinguer deux sous-types principaux (**Table 2**). Les **GB primaires** (GB I ou isocitrate déshydrogénase (IDH) non mutée), qui se développent rapidement *de novo*, représentent 90 % des cas et apparaissent chez le sujet âgé. Les **GB secondaires** (GB II ou IDH mutée) progressent à partir de lésions préexistantes (astrocytomes de grade II le plus souvent ou de grade III) et sont plus fréquents chez les patients jeunes. Ces deux sous-types diffèrent de par leur origine mais aussi de par leurs altérations génétiques, leurs évolutions et leurs réponses aux traitements, comme cela sera détaillé plus loin (Louis et al., 2016; Ohgaki and Kleihues, 2013).

D’autres types de GB moins communs ont également été décrits : GB à cellules géantes, GB lipidisé, GB à petites cellules et GB à composante oligodendrogliale (Wen and Kesari, 2008). Tous ces différents types de GB, qui ne seront pas abordés ici, possèdent chacun des caractéristiques propres et attestent de la forte hétérogénéité de ces tumeurs cérébrales.

II. Epidémiologie

II.1. Incidence et autres données épidémiologiques

L’incidence des tumeurs cérébrales primitives dans le monde est de 10 à 15 nouveaux cas pour 100 000 habitants par an et la prévalence est de 60 cas pour 100 000 habitants. Parmi ces tumeurs cérébrales, les GB sont des tumeurs **rares** avec une incidence de 4 nouveaux cas par an pour 100 000 personnes. Ce sont cependant les tumeurs cérébrales les plus fréquentes puisqu’elles représentent 25 % des tumeurs du système nerveux (Brandes et al., 2008).

Le GB est codé 9440/3 par la Classification Internationale des Maladies pour l’Oncologie (CIM-O) établie par l’OMS. Ce codage repose sur des algorithmes tenant comptes de la localisation anatomique (topographie) et du type histologique des tumeurs (morphologie). Le dernier chiffre tient compte du degré de malignité : 0 pour les tumeurs bénignes, 1 pour les tumeurs d’évolution inconnue, 2 pour les tumeurs *in situ*, 3 et 4 pour les tumeurs malignes.

	GB	
Incidence	4 / 100 000	
Age diagnostic	64 ans	
	GB I	GB II
Proportion	90 %	10 %
Incidence	3,5	0,2
Age médian	62 ans	45 ans
Sexe ratio	1,42	1,05
Survie médiane	15 mois	31 mois

Table 2 : Caractéristiques épidémiologiques des GB (Brandes et al., 2008; Louis et al., 2016).

L’incidence est variable d’un pays à l’autre mais une augmentation annuelle du taux d’incidence est notable au cours du temps, de l’ordre de 1 à 3% (DeAngelis, 2001). Cette augmentation pourrait s’expliquer par le vieillissement de la population, par l’accès à l’imagerie permettant un meilleur diagnostic ou encore par l’apparition ou la majoration de facteurs de risque. De plus, les GB primaires ont une incidence plus importante que les GB secondaires (**Table 2**).

Le GB peut se manifester à tout âge mais un pic d'apparition de ces tumeurs se situe entre 45 et 70 ans, avec un âge médian de diagnostic à 64 ans. Les GB primaires apparaissent plus tardivement (62 ans en moyenne) tandis que les GB secondaires se développent chez des patients plus jeunes (45 ans). Ces cancers touchent plus fréquemment les hommes, avec un sexe ratio de 1,33 pour l'ensemble des GB (**Table 2**) (Brandes et al., 2008).

Des altérations génétiques caractéristiques des GB ont pu être établies (cf. paragraphe IV.4) mais il existe très peu de cas familiaux de GB. Ces **syndromes héréditaires** ne représenteraient seulement que **1 à 5 % des cas** (Wen and Kesari, 2008). Une étude récente a pu démontrer que les mutations germinales de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN et de l'apoptose tels que NF1 (*Neurofibromatosis 1*), p53, les gènes du MMR (*Mismatch repair*) et APC (*Adenomatous polyposis of the colon*), favoriseraient la formation des gliomes (Kyritsis et al., 2010). De plus, certains de ces cas familiaux ont pu être associés à des syndromes génétiques rares : syndrome de Li-Fraumeni (mutation de p53), syndrome de Turcot (mutation du MMR ou APC) ou la neurofibromatose (mutation de NF1) (Kyritsis et al., 2010; Wen and Kesari, 2008). Une étude internationale GLIOGENE est également en cours de réalisation afin d'identifier d'autres gènes de la gliomagenèse (Malmer et al., 2007).

Les GB sont des tumeurs de très mauvais pronostic avec, actuellement, une survie médiane de 14,5 mois. De plus, le taux de survie globale est inférieur à 30 % à 1 an et se situe aux environs de 5 % à 3 ans et 3 % à 5 ans (Brandes et al., 2008; Ohgaki and Kleihues, 2005). En effet, ces tumeurs récidivent rapidement de façon quasi-systématique, le plus souvent au site d'origine, mais dans 10 à 20 % des cas les lésions peuvent apparaître à distance (Park et al., 2010). Des métastases extracérébrales sont très rares (< 2%) probablement du fait du sombre pronostic de ces tumeurs agressives, et leurs mécanismes sont encore peu connus (Kalokhe et al., 2012).

II.2. Facteurs de risque

Concernant les facteurs de risque, seule l'exposition aux **radiations ionisantes** (radiothérapie encéphalique) a été démontrée comme pouvant favoriser l'apparition des GB (Wrensch et al., 2002). D'autres facteurs ont été suspectés comme l'exposition à certains pesticides, au plomb, au formaldéhyde, à des composés nitrosés, ou à des lignes à haute tension, mais les études réalisées n'ont pas confirmé ces soupçons. La part de ces facteurs environnementaux dans le développement de ces tumeurs demeurent donc à déterminer (Ostrom et al., 2014). L'utilisation des téléphones portables a également été mise en cause, l'incidence des GB ayant tendance à augmenter chez les adolescents et jeunes adultes. Cependant l'étude à large échelle INTERPHONE n'a pu établir de lien entre les deux (Interphone-study-group, 2010). En revanche, les allergies seraient associées à une diminution du risque de gliomes, bien que les raisons soient encore ignorées (Zhang and Zhu, 2017).

III. Physiopathologie des GB

III.1. Origine des GB

L'origine des GB reste encore **inconnue**. Le type cellulaire, ainsi que les principales voies de signalisation impliquées dans les phases d'initiation de la transformation ne sont actuellement pas connus, mais une dérégulation de **facteurs génétiques et épigénétiques** pourraient être en cause (Jiang and Uhrbom, 2012). Différentes altérations génétiques ont pu être établies et expliquent en partie la forte hétérogénéité de ces tumeurs cérébrales (cf. paragraphe IV.4).

Le **type cellulaire** à l'origine de la gliomagenèse reste encore inconnu aujourd'hui. Diverses hypothèses impliquant des cellules plus ou moins différenciées qui pourraient être à l'origine de ces tumeurs ont néanmoins été formulées (**Figure 1**). Il pourrait s'agir de cellules souches neurales (NSC), de progéniteurs spécifiques des cellules gliales (GRPC), de précurseurs de cellules gliales plus différenciées (précurseurs d'oligodendrocytes (OPC) ou d'astrocytes (APC)) ou encore des cellules gliales matures de type oligodendrocytaire ou astrocytaire (Jiang and Uhrbom, 2012). Ces différentes populations cellulaires pourraient acquérir un potentiel tumorigène suite à l'acquisition de mutations génétiques (cf. paragraphe IV.4). Chacune de ces populations cellulaires est caractérisée par un panel de marqueurs permettant de les isoler plus ou moins spécifiquement (**Figure 1**).

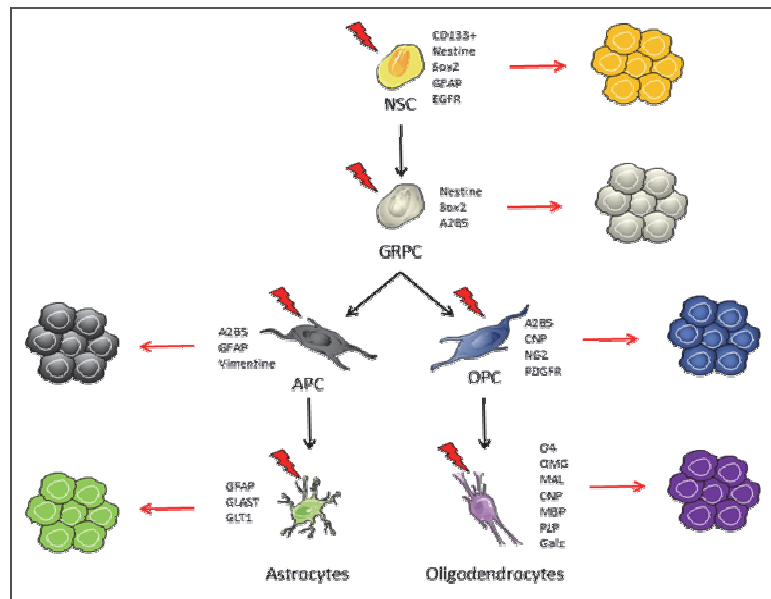


Figure 1 : Cellules à l'origine des gliomes et glioblastomes : hypothèses. Représentation schématisée du développement d'un gliome via diverses cellules initiatrices potentielles, d'après (Jiang and Uhrbom, 2012). A2B5 : *Neuron Cell Surface Antigen A2b5*, CD133 : *Prominin-1*, CNP : *2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase*, EGFR : *Epidermal growth factor receptor*, GalC : *Galactocerebroside*, GFAP : Protéine gliale fibrillaire acide, GLAST : *Glutamate aspartate transporter*, GLT1 : *Glutamate transporter 1*, MAL : *Myelin and lymphocyte protein*, MBP : *Myelin basic protein*, NG2 : *Chondroitin sulfate proteoglycan*, O4 : *Oligodendrocyte marker O4*, OMG : *Oligodendrocyte-myelin glycoprotein*, PDGFR : *Platelet derived growth factor receptor*, PLP : *Myelin proteolipid protein*, Sox2 : *SRY-related HMG-box gene 2*.

Via divers modèles murins, et notamment des souris ou rats génétiquement modifiés vis-à-vis de ces différentes populations cellulaires mises en cause, les cellules capables de former une tumeur ont été recherchées (Assanah et al., 2006; Jiang and Uhrbom, 2012). Cependant les résultats restent difficiles à interpréter et à transférer de la souris à l'Homme, même s'il apparaît que **les NSC, les OPC et les astrocytes** seraient les trois candidats avec le plus grand potentiel (Jiang and Uhrbom, 2012). Pour aller plus loin, en se basant notamment sur l'étude de Tamura (Tamura et al., 2013), R. Roesler propose comme hypothèse que les GB primaires pourraient préférentiellement dériver de NSC transformées, tandis que les OPC ou les astrocytes dédifférenciés seraient majoritairement à l'origine de gliomes de plus bas grades qui pourraient progresser en GB secondaires (Roesler, 2014). Cependant différents travaux semblent mettre en évidence que les OPC pourraient être à l'origine d'un sous-type particulier de GB : le sous-type pro-neural (cf. paragraphe V.2) (Lei et al., 2011; Lindberg et al., 2009). Plus récemment, l'équipe d'Alcantara *et al* a mis en évidence que le type cellulaire original détermine le sous-type de GB et sa diversité tumorale (Alcantara Llaguno and Parada, 2016; Alcantara Llaguno et al., 2015). L'équipe de Jiang *et al* a également identifié

différentes populations cellulaires d'origine dans des modèles murins et mis en évidence une signature de gènes spécifique à ces groupes. Ces signatures ont été corrélées aux différents sous-types moléculaires de GB humains, ainsi qu'à différents profils phénotypiques cellulaires souches, et ce dans les 2 espèces (Jiang et al., 2017). Par exemple, une population de NSC/GSC GFAP+ permettrait de développer une tumeur plus rapidement, mais cette tumeur serait moins chimiorésistante par rapport à une autre population de cellules Nestine+. La gliomagenèse est un processus complexe et d'autres études sont donc nécessaires pour clarifier si un type cellulaire donne lieu à un sous-type de GB, ou encore si des mutations génétiques distinctes au sein d'un même type cellulaire peuvent conduire à des GB différents.

III.2. Modèles de développement tumoral

Deux modèles ont été proposés concernant le développement tumoral : stochastique ou hiérarchique. Ces modèles différents peuvent se combiner lors du développement tumoral.

III.2.1. Modèle stochastique ou de l'évolution clonale

Selon ce modèle, qui a été le premier proposé, la progression tumorale est multi-étapes et se fait par une série de sélections darwiniennes (mécanismes génétiques et épigénétiques) conduisant à la transformation maligne (**Figure 2**) (Magee et al., 2012; Visvader, 2011). La pression de sélection naturelle sélectionne alors les clones les plus agressifs. Dans ce cas, 6 altérations majeures sont requises pour la cancérogenèse : autosuffisance en facteurs de croissance, insensibilité aux signaux de contrôle cellulaire, échappement à la mort cellulaire, potentiel de réplication illimité, angiogenèse et invasion (Hanahan and Weinberg, 2000). Ces altérations nécessitent le plus souvent l'activation d'un oncogène associée à la perte d'un gène suppresseur de tumeur. Par exemple, la perte de INK4A/Arf associée à l'activation de K-Ras et Akt (Protéine kinase B) dans des astrocytes matures conduisent à la formation de tumeurs proches des GB (Goffart et al., 2013). Plusieurs clones avec différents phénotypes sont ainsi générés, la tumeur est donc composée de cellules hétérogènes avec des différences fonctionnelles. De plus, des mutations différentes donnent des morphologies tumorales différentes. Cette évolution clonale est présente tout au long du développement tumoral et est favorisée particulièrement par la pression de sélection exercée par les thérapies anticancéreuses. Ainsi, dans les GB, de nombreuses altérations génétiques sont retrouvées (paragraphe IV.4), et après traitement l'examen des récurrences montre l'apparition de nouvelles altérations génétiques (Martinez et al., 2010).

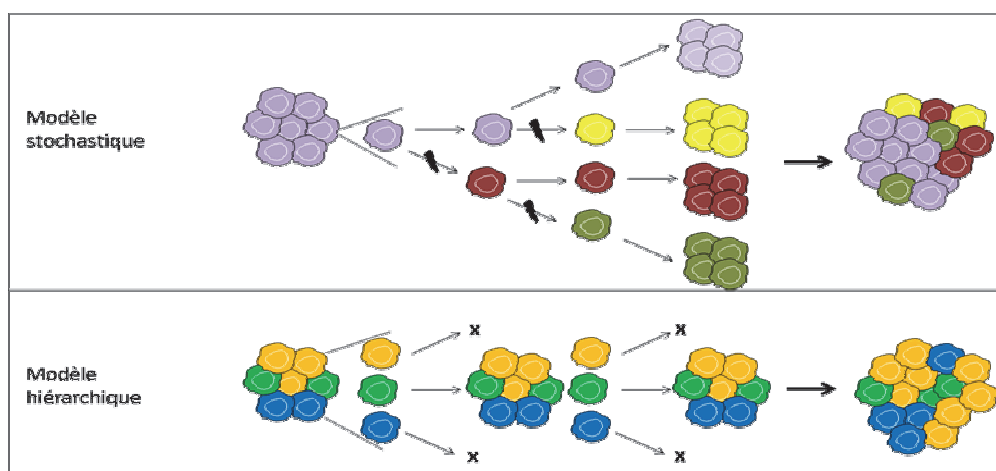


Figure 2 : Modèles de développement tumoral. Représentation schématique du développement tumoral à partir du modèle stochastique (figure du haut) ou du modèle hiérarchique (figure du bas). Adapté de (Magee et al., 2012).

III.2.2. Modèle hiérarchique ou de cellules souches cancéreuses

Cette théorie s'ajoute à la précédente. Le modèle hiérarchique repose sur le postulat qu'une sous-population restreinte de cellules tumorales possédant des caractéristiques semblables aux cellules souches normales (capables de s'auto-renouveler et de générer des cellules plus différenciées) est à l'origine de la tumeur (**Figure 2**) (se référer à la partie 2 de la thèse) (Magee et al., 2012; Visvader, 2011). Seules ces cellules seraient tumorigènes et capables de générer des cellules plus différenciées (progéniteurs puis cellules matures) à capacité de prolifération limitée, composant l'essentiel de la masse tumorale. Plusieurs études ont ainsi démontré la présence de cellules souches tumorales au sein des GB (Singh et al., 2003; Yuan et al., 2004). De plus, ces cellules génèrent des tumeurs chez la souris qui reflètent les caractéristiques phénotypique, génotypique et histologique de la tumeur humaine initiale (Lee et al., 2006). L'ensemble de ces travaux mettent donc en évidence une hiérarchie au sein des GB.

L'origine des GB est probablement liée à la fois à l'évolution clonale et à la présence de cellules souches cancéreuses. Le modèle hiérarchique explique la plasticité importante de ces tumeurs (cf. Partie 2) et comment seulement une sous-population bien particulière de la tumeur serait à l'origine de la tumorigenèse, tandis que le modèle stochastique permet de comprendre la forte hétérogénéité génétique (décrite paragraphe III.4.5) présente entre les différents patients.

III.3. Le microenvironnement tumoral

En plus des cellules tumorales, il faut également prendre un compte le microenvironnement tumoral qui participe activement au développement du GB. Il est composé de différents types cellulaires mais aussi de la matrice extracellulaire (MEC).

Parmi les cellules qui le composent on retrouve (**Figure 3**) des cellules neurales plus ou moins différenciées : progéniteurs et cellules matures de types astrocytaires, oligodendrocytaires et neuronales ; des cellules immunes : macrophages (aussi appelés cellules microgliales dans le cerveau), lymphocytes, cellules myéloïdes ; des fibroblastes et des cellules vasculaires : cellules endothéliales et péricytes (Hoelzinger et al., 2007).

La MEC tumorale (**Figure 3**), qui diffère de la MEC du cerveau sain, renferme de l'acide hyaluronique en grande quantité, de l'ostéopontine, de la vitronectine et du BEHAB (Brevican neurocan) (Bellail et al., 2004). Autour des vaisseaux sanguins (VS), la MEC est enrichie en Tenascine C, SPARC (*secreted protein acidic and cysteine rich*) et TSP1 (Thrombospondine 1). De plus, la MEC constitue un réservoir de différentes cytokines, chimiokines et facteurs de croissances.

Des microenvironnements particuliers seront retrouvés au sein de différentes zones spécifiques enrichies en cellules souches de GB. Ils seront alors caractérisés par le terme de « niches », comme cela sera détaillé plus loin (cf. Partie 2, Paragraphe III)

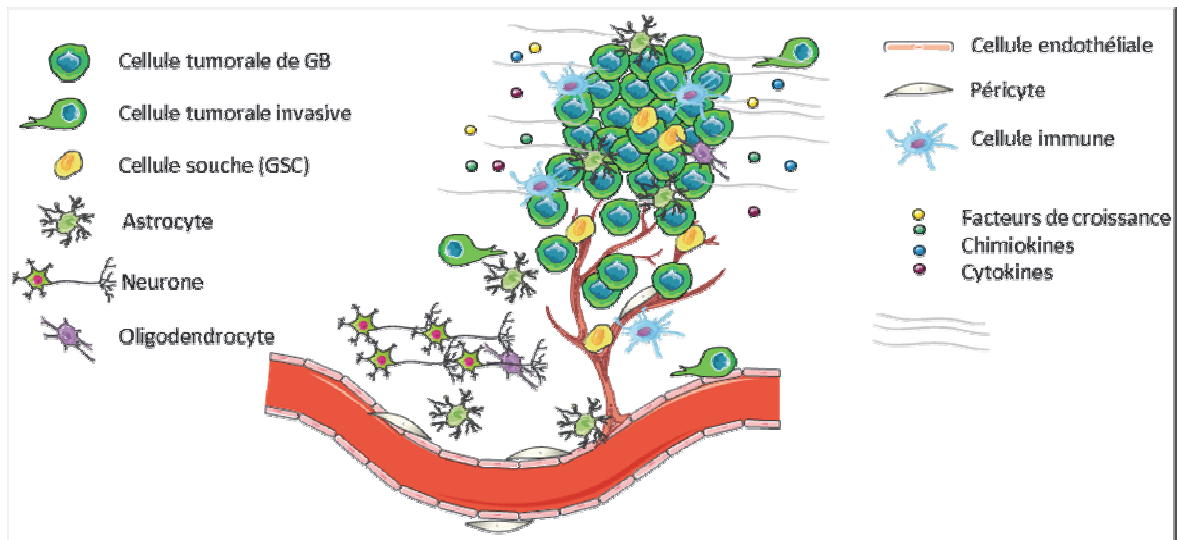


Figure 3 : Représentation schématique du microenvironnement tumoral des GB. Les GB sont composés de cellules tumorales plus ou moins différenciées et du microenvironnement comprenant des composants cellulaires (cellules neurales de types astrocytes, neurones et oligodendrocytes, de cellules vasculaires endothéliales et péricytes et de cellules immunes) et des composants matriciels avec la MEC et les facteurs solubles qu'elle contient (facteurs de croissance, chimiokines et cytokines).

III.4. Principales caractéristiques tumorales des GB

III.4.1. Hypoxie

L'hypoxie correspond à une diminution de la quantité en oxygène distribuée aux tissus et/ou aux cellules par voie sanguine ($\text{PaO}_2 < 80\text{mmHg}$). Dans le cerveau, la concentration en oxygène se situe entre 2 et 10%. Dans les GB, la concentration en oxygène chute entre 0,1 et 2%. Cette diminution s'explique par une prolifération tumorale élevée qui entraîne un éloignement des cellules des vaisseaux sanguins (VS) ainsi qu'une vascularisation tumorale anormale. Ainsi, il est décrit un manque d'oxygène à partir d'une distance de 100 à 200 μm des VS, soit une dizaine d'assises cellulaires, et lorsque la taille de la tumeur est supérieure à 2 mm^3 . Des **régions hypoxiques sont fréquemment retrouvées** dans les GB et leur présence est corrélée avec un mauvais pronostic (pour revue (Yang et al., 2012)). Au niveau cellulaire, les HIFs (*Hypoxia-inducible factors*, HIF-1 et HIF-2) sont les régulateurs transcriptionnels majeurs en réponse à l'hypoxie (**Figure 4**). Selon la concentration en oxygène ces HIFs vont pouvoir réguler la transcription de plus de 50 gènes impliqués dans la survie cellulaire, le métabolisme glycolytique, l'angiogénèse et l'invasion. Dans les GB, les cellules tumorales sont capables de s'adapter à l'hypoxie, ce qui favorise la progression tumorale.

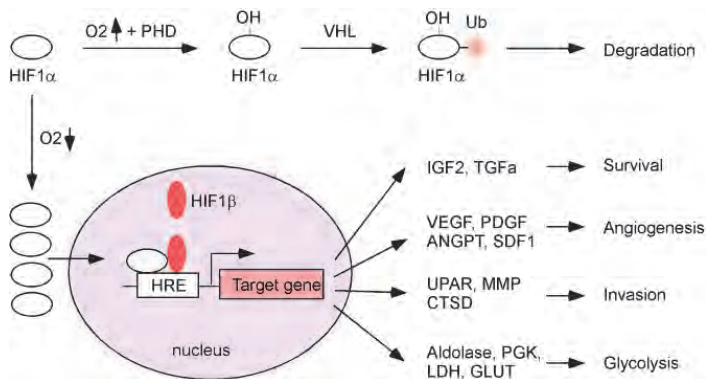


Figure 4 : Hypoxie et voies de signalisation (Province et al. 2013). Selon les conditions en oxygène, HIF1- α est soit dégradé (normoxie) après hydroxylation (PHD : *Prolyl Hydroxylase Domain enzyme*, VHL : *Von Hippel-Lindau protein*), soit stabilisé (hypoxie). Il peut alors activer la transcription de gènes cibles. IGF2 : *Insulin-like growth factor 2*, TGF α : *Transforming growth factor alpha*, VEGF : *Vascular endothelial growth factor*, PDGF : *Platelet derived growth factor*, SDF1 : *Stromal cell-derived factor 1*, UPAR : *Urokinase receptor*, MMP : *Matrix metalloproteinases*, CTSD : *Cathepsin D*, PGK : *Phosphoglycerate kinase*, LDH : *Lactate dehydrogenase*, GLUT : *Glucose transporter*.

III.4.2. Angiogenèse

L'angiogenèse est un processus physiologique complexe qui correspond à la formation de nouveaux VS à partir de vaisseaux pré-existants. Plusieurs mécanismes ont été décrits dans la littérature : bourgeonnement angiogénique (*sprouting*), vasculogenèse, intussusception, cooptation des vaisseaux, et le mimétisme vasculaire (*vascular mimicry*). L'angiogenèse est finement régulée par des facteurs pro-angiogéniques (exemple : VEGF) et anti-angiogéniques (exemple : TSP1). L'équilibre de ces facteurs, appelé **balance angiogénique**, est retrouvé modifié dans les cancers, et ce en faveur de la progression tumorale (Folkman, 1971). Dans les GB, l'hypoxie est un moteur de l'angiogenèse (Onishi et al., 2011). En effet, à cause de la prolifération tumorale, les cellules s'éloignent de plus en plus des VS et se retrouvent en hypoxie, conduisant alors à la libération de facteurs induisant l'angiogenèse (EGF et FGF). De plus, des mutations génétiques (PTEN, EGFR) retrouvées au sein de la tumeur participent également au « switch angiogénique » (Furnari et al., 2007).

C'est ainsi que les GB font partie des tumeurs les plus vascularisées. En effet, il est retrouvé dans les GB **un haut niveau d'angiogenèse**, une prolifération microvasculaire élevée, un fort taux de VEGF ainsi que l'expression de nombreux gènes pro-angiogéniques (pour revue (Zhang et al., 2015)). Les 5 mécanismes d'angiogenèse cités au début du paragraphe ont tous été reportés comme participant à la vascularisation des GB. Les VS issus de cette angiogenèse tumorale sont caractérisés par un diamètre supérieur à la normale, une architecture tortueuse, une forte perméabilité vasculaire, une membrane basale épaissie, une diminution de la couverture péricytaire et une hyperplasie des cellules endothéliales. La présence de cette forte densité vasculaire anormale est un élément clé du diagnostic histologique du GB et est associée à un mauvais pronostic (Lebelt et al., 2008).

III.4.3. Invasion

Bien que les GB ne donnent quasiment jamais de métastases, ces tumeurs sont particulièrement reconnues pour leur **capacité invasive** au niveau local (Onishi et al., 2011). Dans 90% des cas, les récidives se développent à proximité des marges de la résection. Des récidives peuvent parfois apparaître à distance du site d'origine de la tumeur primaire, mais les métastases extracérébrales sont quasi-inexistantes (inférieur à 2%). L'invasion est un processus multifactoriel associant interactions cellulaires et mécanismes biochimiques et comporte différentes étapes. Les cellules tumorales de GB vont (i) se détacher de la tumeur primaire, (ii) adhérer à la MEC (grâce aux intégrines notamment) puis (iii) la dégrader via l'activation de métalloprotéinases (MMP) (principalement MMP-2 et MMP-9) pour enfin (iv) se contracter, ce qui permet la migration/invasion pour propager la tumeur et/ou établir des nouveaux foyers tumoraux (Onishi et al., 2011). Les voies les plus décrites sont le long des faisceaux de substance blanche (corps calleux), dans la couche superficielle du cortex et le long de la membrane basale des VS (Bellail et al., 2004; Vehlow and Cordes, 2013).

Au niveau cellulaire, les acteurs centraux de l'invasion sont les **intégrines** (qui seront développées dans la partie 3 de cette thèse) et notamment dans le GB les intégrines $\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$ et $\beta1$ (Vehlow and Cordes, 2013). Ces intégrines activent des voies de signalisation intracellulaires, comme les MAPK ou des RhoGTPases, qui vont permettre la réalisation des différentes étapes de l'invasion décrites en début de paragraphe (Kwiatkowska and Symons, 2013). Trois autres voies de signalisations majeures participent à la régulation de l'invasion : PI3K-Akt, Wnt et Hedgehog (Shh-GLI1) (Paw et al., 2015). De plus, il a été montré que l'hypoxie est un moteur de l'invasion (Elstner et al., 2007) et que cette dernière est un facteur pronostic critique des tumeurs cérébrales (Bellail et al., 2004).

III.4.4. Immunosuppression

Une autre caractéristique établie des GB est l'immunosuppression observée dans le microenvironnement tumoral. Le SNC, protégé par la BHE, a longtemps été présumé exempt de système immunitaire (SI), de par l'absence de système lymphatique. En réalité, le SNC est immunocompétent et possède un SI unique qui diffère du reste du corps. Ce SI comprend un système « glymphatique » fonctionnel situé à l'intérieur des parois des sinus veineux et reliés aux ganglions lymphatiques cervicaux, capables de transporter des cellules immunitaires et des macromolécules. De plus, des immunoglobulines (IgG), des cytokines, des cellules immunes (cellules dendritiques, cellules présentatrices d'antigènes (CPA), macrophages et lymphocytes T) et des antigènes ont été détectés dans différentes parties du cerveau (Carson et al., 2006).

Dans les GB, les cellules tumorales génèrent un **microenvironnement immunosuppresseur** et utilisent différentes stratégies pour **échapper au SI**. Ainsi, les cellules de GB produisent des cytokines immunosuppressives telles que TGF- β , IL-10 et certaines prostaglandines (PGE2) (Razavi et al., 2016). Ces molécules vont inhiber la prolifération des lymphocytes T et autres effecteurs de la réponse immunitaire (cellules dendritiques et monocytes) mais aussi activer les lymphocytes T régulateurs (Razavi et al., 2016). De plus, ces cytokines favorisent l'infiltration de macrophages de type 2 qui contribuent également à l'inhibition de la réponse immune et même soutiennent la progression tumorale. Enfin, les cellules de GB expriment d'autres régulateurs négatifs de la réponse immune comme CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*), PD-1 (*Programmed cell death-1*), CD80, LAG-3 (*Lymphocyte-activation gene 3*) et TIM-3 (*T-cell Ig and mucin-domain containing-3*) (Kamran et al., 2016).

III.4.5. Hétérogénéité

L'hétérogénéité tumorale est probablement la caractéristique qui complexifie encore davantage l'étude, la compréhension, et par conséquent le traitement des GB. Ces tumeurs sont **extrêmement hétérogènes**, entre les différents patients mais aussi pour un même individu.

III.4.5.1. Hétérogénéité intra-tumorale

Le premier degré d'hétérogénéité des GB se situe au niveau **cellulaire**. D'importantes variations morphologiques et structurales ont été observées pour la forme et la taille des cellules tumorales (Burger and Green, 1987). De plus, de nombreux types cellulaires différents sont présents de façon très hétérogène au sein de la tumeur : cellules neurales plus ou moins différenciées (la seconde partie de cette thèse sera focalisée sur les cellules les plus indifférenciées appelées cellules souches de GB), cellules endothéliales, péricytes et cellules immunes. Ces types cellulaires possèdent tous des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles (prolifératives, invasives...) distinctes.

Le second degré d'hétérogénéité des GB est **micro-environnemental**. En effet, la distribution des zones de nécroses, d'hypoxie et de vascularisation est très irrégulière dans la tumeur (Burger and Green, 1987; Eder and Kalman, 2014). Une hétérogénéité métabolique a également été observée dans les GB avec des variations de la glycolyse aérobie et anaérobie selon les zones tumorales (Vartanian et al., 2014).

Un troisième degré d'hétérogénéité est retrouvé au niveau **moléculaire (génétique et épigénétique)**. Grâce aux récentes analyses génomiques réalisées à partir de prélèvements de différentes zones d'une même tumeur, il a été montré que les cellules de GB possèdent des altérations génétiques communes aux différentes zones analysées mais aussi que d'autres altérations étaient spécifiques de certaines zones tumorales (Nobusawa et al., 2010). Une autre étude a mis en évidence que des prélèvements distincts d'une même tumeur peuvent

correspondre à des sous-groupes différents de la classification génétique de Verhaak (cf. paragraphe V.2) (Sottoriva et al., 2013). Plus récemment encore, des analyses transcriptomiques à cellules uniques (*RNA-seq single cell*) ont démontré de très fortes variations d'expression entre les cellules tumorales d'un même GB (Patel et al., 2014).

Enfin, il existe également une hétérogénéité entre **la tumeur primitive** et **la récurrence** d'un même patient avec notamment l'apparition de nouvelles mutations lors d'une rechute (Wang et al., 2017).

III.4.5.2. Hétérogénéité inter-tumorale

Les différents niveaux d'hétérogénéité décrits dans le paragraphe précédent s'appliquent également entre différents patients atteints de GB, ce qui rajoute un niveau de difficulté supplémentaire.

Au niveau cellulaire et micro-environnemental, tous les types cellulaires et les différentes zones tumorales (nécrose, hypoxie et vascularisation) sont distribués et localisés de façon très variable selon les patients. Là encore, nous verrons en seconde partie de thèse le rôle prépondérant des cellules souches de GB.

Au niveau moléculaire, la classification génétique de Verhaak en différents sous types (cf. paragraphe V.2) atteste d'une forte hétérogénéité génétique des GB (Pour revue (Eder and Kalman, 2014)). Ainsi, de nombreuses mutations (IDH1, TP53, EGFR, PDGFR, ...) ont pu être observées dans les GB, mais chaque patient possède un profil génétique différent. A ces différentes mutations, il faut également ajouter d'importantes variations épigénétiques (hyperméthylation CpG, méthylation de l'ADN et expression de miRNA).

IV. Diagnostic des Glioblastomes

IV.1. Clinique

Les symptômes généraux les plus communs incluent des **signes d'hypertension intracrânienne** tels que des maux de tête, des nausées et des vomissements. Des déficits neurologiques, des crises d'épilepsies, une faiblesse musculaire, des changements d'humeur et/ou une perte progressive de la mémoire peuvent également être retrouvés. De plus, des symptômes plus spécifiques de la localisation de la tumeur comme l'hémiplégie, l'aphasie ou encore des signes de fatigue, d'engourdissement, de perte de tonus musculaire, ou des troubles de la vision peuvent être présents (Brandes et al., 2008).

Le plus souvent, dans le cas de GB primaire, le diagnostic est établi assez tardivement après l'apparition des premiers signes cliniques, les symptômes étant souvent d'apparition insidieuse. Une évaluation neurologique peut être réalisée par un neurologue, afin d'identifier certains symptômes et éventuellement la zone du cerveau touchée par la lésion.

IV.2. Imagerie

Les symptômes permettent, seulement dans un premier temps, de suspecter le diagnostic et l'imagerie vient ensuite renforcer fortement la présence d'un GB car ce sont des tumeurs assez facilement reconnaissables. Suite à la consultation et à l'évaluation neurologique, les patients sont donc soumis à des examens d'imagerie médicale de manière à identifier la présence et la localisation de la lésion.

Le scanner, ou tomodensitométrie (TDM), peut être utilisé et associé à un produit de contraste iodé. Il permet la mise en évidence d'une lésion aux contours irréguliers avec une zone hypodense au centre de la tumeur qui correspond à une zone nécrosée, et des zones hyperdenses en périphérie ainsi que des œdèmes péri-lésionnels.

L’Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) est cependant l’imagerie de référence dans le cas des GB car elle permet d’obtenir une image très précise de la tumeur, surtout lorsqu’elle est associée au Gadolinium (**Figure 5**). L’IRM conventionnelle montre, comme le scanner, une lésion infiltrant le parenchyme cérébral associée à une prise de contraste hétérogène. La tumeur apparaît hypointense en pondération « anatomique » T1 après injection de Gadolinium et hyperintense en pondération « tissulaire » T2 et en séquences FLAIR (*Fluid Attenuated Inversion Recovery*) (Paek et al., 2013). L’IRM permet ainsi de décrire : la localisation précise de la tumeur (unique, multifocale ou diffuse) et ses dimensions, la prise ou non de contraste, la présence d’un œdème et ou d’une hémorragie.

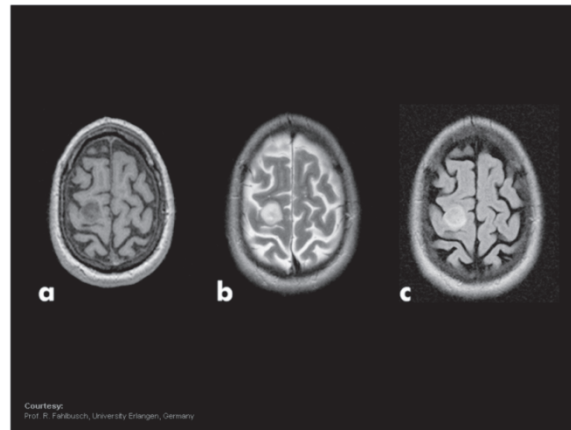


Figure 5 : IRM d’un patient atteint de gliome. A) T1, B) T2, C) T2 FLAIR (<http://www.healthcare.siemens.com/magnetic-resonance-imaging/mri-guided-therapy/magnetom-combi-suite/use>).

D’autres types d’IRM (IRM de diffusion ou IRM de perfusion) peuvent également apporter des précisions supplémentaires : localisation précise de la lésion, activité proliférative ou degré d’invasion du cortex (Khalifa et al., 2017). De plus, la spectro-IRM, par l’analyse multiparamétrique de la distribution en Créatine, N-acétyl aspartate (NAA, marqueur neuronal), Choline (marqueur membranaire) et lactate (produit final de la glycolyse anaérobie), permet de visualiser l’étendue de la tumeur, son statut métabolique et apparaît prometteuse pour suivre la réponse au traitement ainsi que la détection précoce de la récurrence tumorale (Nguyen et al., 2014). En effet, la diminution de NAA témoigne d’une souffrance neuronale, l’augmentation de la Choline indique une perte d’intégrité membranaire et une forte concentration en lactates témoigne des zones de nécrose, hypoxie et résistance (Deviers et al., 2014). De plus un fort ratio Choline/NAA est associé à un fort index de prolifération tumorale.

IV.3. Anatomopathologie

Bien que les images obtenues par IRM permettent d’apporter des preuves supplémentaires, le diagnostic de certitude de GB ne peut être établi que par une **biopsie** permettant l’examen d’un échantillon de la tumeur. La biopsie est réalisée pendant la chirurgie de résection ou, si la tumeur est inopérable, une biopsie stéréotaxique sera effectuée. Cette dernière consiste à prélever un fragment tumoral par trépanation (perforation du crâne) grâce à un système guidé par ordinateur qui permet de cibler la localisation exacte de l’échantillon à prélever à partir des clichés de neuro-imagerie.

D’un point de vue histologique, les GB sont composés de cellules astrocytaires peu différenciées, avec diverses **anomalies cyto-nucléaires** marquées et une forte activité mitotique (**Figure 6**). Les zones de prolifération microvasculaire et de nécrose sont des caractéristiques essentielles de ces tumeurs. La distribution de ces éléments clés au sein de la tumeur est variable mais les zones nécrotiques occupent généralement le centre de la lésion, alors que les cellules tumorales tendent à s’accumuler en périphérie (Redzic et al., 2014).

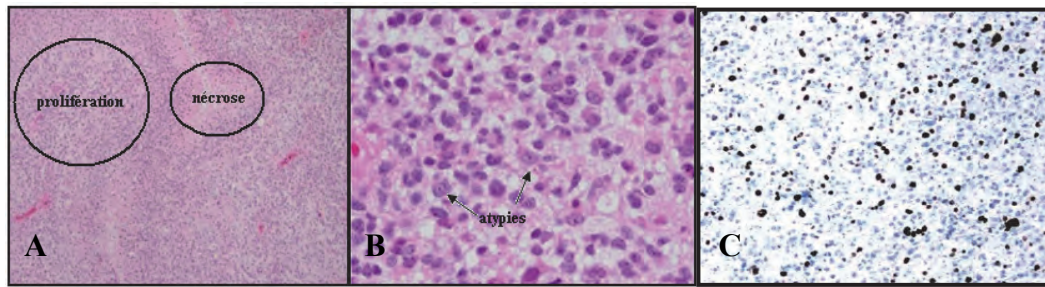


Figure 6 : Coupe histologique d'un GB et marquage hématoxyline et éosine (A et B) Coupe immunohistochimique d'un GB et marquage Ki67 (C).

A) Observation de l'hypercellularité, des atypies cytologiques et des zones de nécrose, caractéristiques des GB (100x). B) Illustration des atypies cellulaires et d'une forte activité mitotique (600x) (Redzic et al., 2014). C) Marquage Ki67 montrant la prolifération cellulaire sur une coupe d'IHC de tumeur de patient (Wen and Kesari, 2008).

Concernant les caractéristiques immunohistochimiques, **l'activité proliférative**, déterminée par le marquage Ki67, est souvent élevée, avec de nombreuses mitoses typiques et atypiques (**Figure 6C**) (Wen and Kesari, 2008). L'activité mitotique est très variable d'un GB à l'autre, sachant qu'un index de prolifération important est souvent synonyme de faible pronostic. Le marquage CD34 des cellules endothéliales permet de visualiser la prolifération microvasculaire. La nature astrocytaire de la lésion peut être étudiée par marquage de la Protéine Gliale Acide Fibrillaire (GFAP), constituant les filaments intermédiaires spécifiques des astrocytes. L'expression de la GFAP est très variable dans les GB et il semblerait que cette expression tende à diminuer au cours de la progression tumorale (Wen and Kesari, 2008).

IV.4. Génétique

Même si l'incidence des gliomes est relativement faible, l'issue fatale de ces tumeurs a incité l'étude de leur profil via des explorations moléculaires et phénotypiques à grande échelle. À ce jour, les GB ont été soumis à de vastes analyses génomiques, comme par exemple le projet « *The Cancer Genome Atlas* » (TCGA), afin d'identifier les grandes altérations chromosomiques et les pilotes d'expression potentiellement impliqués dans la pathogenèse et la biologie de ces tumeurs. Il se trouve que, parmi l'ensemble des néoplasmes astrocytaires, le GB est celui qui compte le plus grand nombre de modifications génétiques (**Figure 7**) (Bastien et al., 2015; Hamerlik et al., 2013; Touat et al., 2017).

L'altération la plus fréquemment retrouvée dans le GB est la **perte d'hétérozygotie sur le chromosome 10q** (Rasheed et al., 1995). Elle apparaît dans 70 et 63 % des GB primaires et secondaires respectivement. Des gains sur le chromosome 7 et des anomalies de structure des chromosomes 9p et 19q sont également fréquents.

L'amplification ou la surexpression de l'**EGFR** (*Epidermal Growth Factor Receptor*) ainsi que la mutation du gène **PTEN** (*Phosphatase-TENSine homolog*) sont des modifications génétiques typiques des GB primaires (30 à 50 % et 15 à 40 % respectivement). La mutation du gène **TP53** est plus spécifique des GB secondaires (81 % contre 27 % des GB primaires) (**Figure 7**) (Tohma et al., 1998; Watanabe et al., 1996).

D'autres altérations génétiques ont été décrites telles qu'une perte de l'expression de p14^{ARF} (75 %), une amplification de CDK4/6 (*Cyclin dependant kinase 4/6*) (18 %), ou encore une mutation de l'**IDH1** (Isocitrate déshydrogénase 1) (Nakamura et al., 2001; Rasheed et al., 1995). De plus, une hypométhylation globale de l'ADN est fréquemment observée (Cadieux et al., 2006).

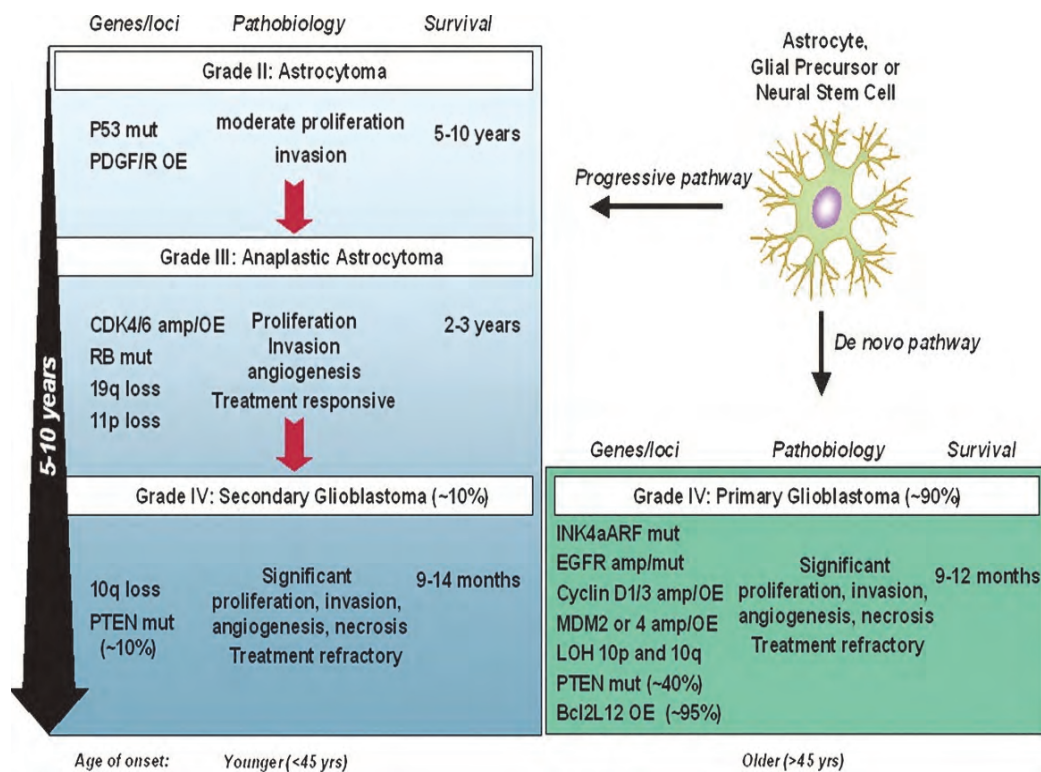


Figure 7 : Altérations génétiques impliquées dans les GB.

Les voies moléculaires diffèrent entre GB primaire et secondaire. (Amp : *amplified*/amplifié, Mut : *mutated*/muté, OE : *overexpressed*/surexprimé, RB : *Retinoblastoma protein*, MDM2 : *Mouse double minute 2*, LOH : *Loss of heterozygosity*, BCL-2L : *B-cell lymphoma 2 like protein*) (Furnari et al., 2007).

Toutes ces modifications génétiques entraînent des perturbations de voies de signalisation cellulaire et en particulier de trois grandes voies impliquées dans le développement des GB. La voie EGFR/PTEN/Akt/mTOR est fortement impliquée dans le développement des GB primaires (Tohma et al., 1998; Watanabe et al., 1996). La voie TP53/MDM2/p14ARF est majoritairement impliquée dans l'évolution des GB secondaires (Watanabe et al., 1996). La voie p16INK4a/CDK4/Rb1 joue un rôle important pour les deux types de GB, et l'on retrouve dans 90 % de ces tumeurs une anomalie de l'un des acteurs impliqués dans cette voie (Nakamura et al., 2001). Ces différentes voies de signalisation interviennent dans de multiples processus cellulaires dont la survie, la prolifération, la différenciation, le contrôle du cycle cellulaire ou encore l'apoptose.

V. Classifications des Glioblastomes

V.1. Classification OMS

Les gliomes sont classés selon leurs caractéristiques histologiques en différents grades établis par l'OMS (Louis et al., 2007; Louis et al., 2016). Les critères de classification reposent essentiellement sur des critères immunohistologiques, c'est-à-dire la présence d'atypies cellulaires, l'activité mitotique, la prolifération microvasculaire et la nécrose. Depuis 2016, l'OMS a établi une nouvelle classification des gliomes selon leur mode d'infiltration (**Table 3**) et qui intègre, en complément des précédents, des critères moléculaires décrits plus loin.

GRADE	TUMEUR	CARACTERISTIQUES IMMUNOHISTOLOGIQUES
I	Astrocytome pilocyttaire	Prolifération cellulaire anarchique
II	Astrocytome diffus	Atypies nucléaires discrètes
III	Astrocytome anaplasique	Atypies importantes avec mitoses
IV	Glioblastome	Atypies, mitoses, nécrose, angiogenèse
NOUVELLES CLASSES	GRADES	CARACTERISTIQUES
Gliomes circonscrits	I (astrocytome pilocyttaire, gangliogliome...)	Exérèse possible, bon pronostic
Gliomes infiltrants	II ou III (astrocytome ou oligodendrogliome)	Exérèse impossible, récidives
Gliomes infiltrants grade IV	IV (glioblastomes)	Pronostic très sombre

Table 3 : Classification OMS des gliomes. La partie supérieure rappelle les différents grades initialement décrits et la partie inférieure présente les nouvelles classes des gliomes établis depuis 2016 par l'OMS.

On distingue ainsi les **gliomes de grade I** ou astrocytomes pilocytaires, qui sont des tumeurs bénignes se développant majoritairement chez l'enfant, avec un faible potentiel de prolifération et généralement curable par chirurgie. Les **gliomes de grade II** ou astrocytomes diffus sont des tumeurs de bas grades, le plus souvent retrouvées chez l'adulte jeune, et d'évolution lente. Les **gliomes de grade III** ou astrocytomes anaplasiques correspondent à des tumeurs malignes avec un potentiel de prolifération plus marqué et évoluant en tumeur de grade IV dans les 2 ans. Les atypies cellulaires sont évidentes, les mitoses nombreuses et une forte densité cellulaire est retrouvée. Enfin les **gliomes de grade IV** ou **Glioblastomes (GB)** sont les tumeurs les plus agressives avec le plus mauvais pronostic, qui représentent plus de la moitié des gliomes. Elles sont caractérisées par de nombreuses atypies cyto-nucléaires, un index mitotique élevé, une forte prolifération vasculaire ainsi que des zones de nécrose (**Table 3**) (Figarella-Branger and Bouvier, 2005).

V.2. Classification génétique

Le premier niveau de classification des GB d'un point de vue génétique (ou épigénétique) repose sur le statut de **méthylation du promoteur du gène MGMT** (O6-methylguanine-DNA-methyltransferase). Ce gène code pour l'enzyme de réparation du même nom, capable de réparer les lésions O6-methylguanine induites par les agents alkylants comme le Témazolomide, chimiothérapie de référence des GB (cf. paragraphe VI.3). La méthylation du promoteur MGMT est associée à une inhibition de la transcription de ce gène, ce qui entraîne une diminution de la réparation des lésions induites par la chimiothérapie et donc une meilleure efficacité de cette dernière. Ceci se traduit en clinique par une augmentation significative de la survie des patients atteints de GB méthylés pour MGMT.

En 2016, l'OMS tient compte pour la première fois d'un paramètre moléculaire : l'état de **IDH1**. Les GB sont désormais séparés en IDH-sauvage (90%) et IDH-mutant (fortement corrélés aux GB secondaires). D'autres études ont révélé de nouvelles différences biologiques, qui sont également de plus en plus prises en compte pour la classification des gliomes : la méthylation des îlots CpG de l'ADN, la codélétion 1p/19q, les mutations de **H3F3A** (Histone H3, famille 3A), les mutations de **TERT** (*Telomerase reverse transcriptase*) et d'**ATRX** (*Histone chaperone protein*) (**Figure 8**) (Ceccarelli et al., 2016; Sturm et al., 2012).

Ces grandes études du profil d'expression des gènes dans les GB, réalisées depuis 1990 et de plus en plus nombreuses, ont conduit à la définition de signatures moléculaires différentes au sein des GB. D'abord en 2006, 3 sous-groupes ont été décrits (pro-neural 5-20%, prolifératif 40-50% et mésenchymal 35-50%) (Phillips et al., 2006), pour arriver en 2010 (notamment grâce à la base de données TCGA) à la caractérisation de **4 sous-groupes tumoraux distincts : proneural, neural, classique et mésenchymal (Verhaak et al., 2010)**. Dans cette étude l'association neural/classique permet de retrouver le sous-groupe prolifératif initialement décrit. Chaque sous-type est défini par des anomalies génétiques, des réponses aux thérapies et des survies distinctes.

Brièvement, le **sous-type proneural** est majoritairement enrichi pour les amplifications de PDGFRA, Olig2, CDK6 (*cyclin-dependent kinase*), CDK4, et MET. Des mutations ou perte d'hétérozygotie de TP53 sont très fréquentes. Ce sous type est plutôt retrouvé chez des patients d'âge jeune et associé à une meilleure survie. **Le sous-type neural** présente une forte expression en marqueurs neuronaux tels que NEFL (*Neurofilament Light*), GABRA1 (*Gamma-Aminobutyric Acid Type A Receptor Alpha1*), SYT1 (*Synaptotagmin 1*) et SCL12A5. **Le sous-groupe classique** est caractérisé par des amplifications du chromosome 7 et des délétions du chromosome 10 associées à l'amplification ou à la mutation de l'EGFR et à des délétions du locus Ink4a/ARF. Des pertes de PTEN et CDKN2A (*CDK Inhibitor 2A*), tandis que des augmentations d'expression de marqueurs des cellules souches ou précurseurs neuronaux (Nestine, Notch) sont fréquemment observées. Il a été retrouvé d'autres altérations additionnelles pour les gènes TP53, NF1, PDGFRA ou IDH1 pour ce sous-type. **Le sous-type mésenchymal** est représenté par des mutations ou pertes de NF1, TP53 et PTEN ainsi que la présence de marqueurs moléculaires comme CHI3L1 (*Chitinase-3-like protein 1*), MET, CD44 et MERTK (*Myeloid-epithelial-reproductive tyrosine kinase*). Ce sous-type est également associé à un taux élevé de nécrose et d'inflammation, avec une forte expression des gènes des voies de signalisation du TNF (*Tumor necrosis factor*) et de NF- κ B (*Nuclear factor kappa B*). Selon cette classification, il semblerait que les GB appartenant aux sous-types classiques ou mésenchymateux répondraient mieux aux traitements en comparaison aux deux autres sous-groupes de GB (Verhaak et al., 2010). De plus, les sous-types proneural et classique ont été associés au statut souche, tandis que le sous-groupe mésenchymal contiendrait un phénotype plus progéniteur (Cusulin et al., 2015; Gunther et al., 2008; Patel et al., 2014). Toutefois, il a récemment été supposé qu'un patient pourrait avoir, au sein de la tumeur, différents sous-types selon la localisation (Gill et al., 2014; Patel et al., 2014).

D'autres très récentes études à large échelle (par des combinaisons des profils d'ARN, ADN et génomiques) tentent toujours de proposer une meilleure classification des GB (**Figure 8**) (Brennan et al., 2013; Ceccarelli et al., 2016; Sturm et al., 2012). Finalement, en 2017, la nouvelle étude du groupe de Verhaak, dans les GB IDH non mutés, exclue le sous-groupe neural qui ne serait pas spécifique de la tumeur mais correspondrait à des cellules du microenvironnement (Wang et al., 2017).

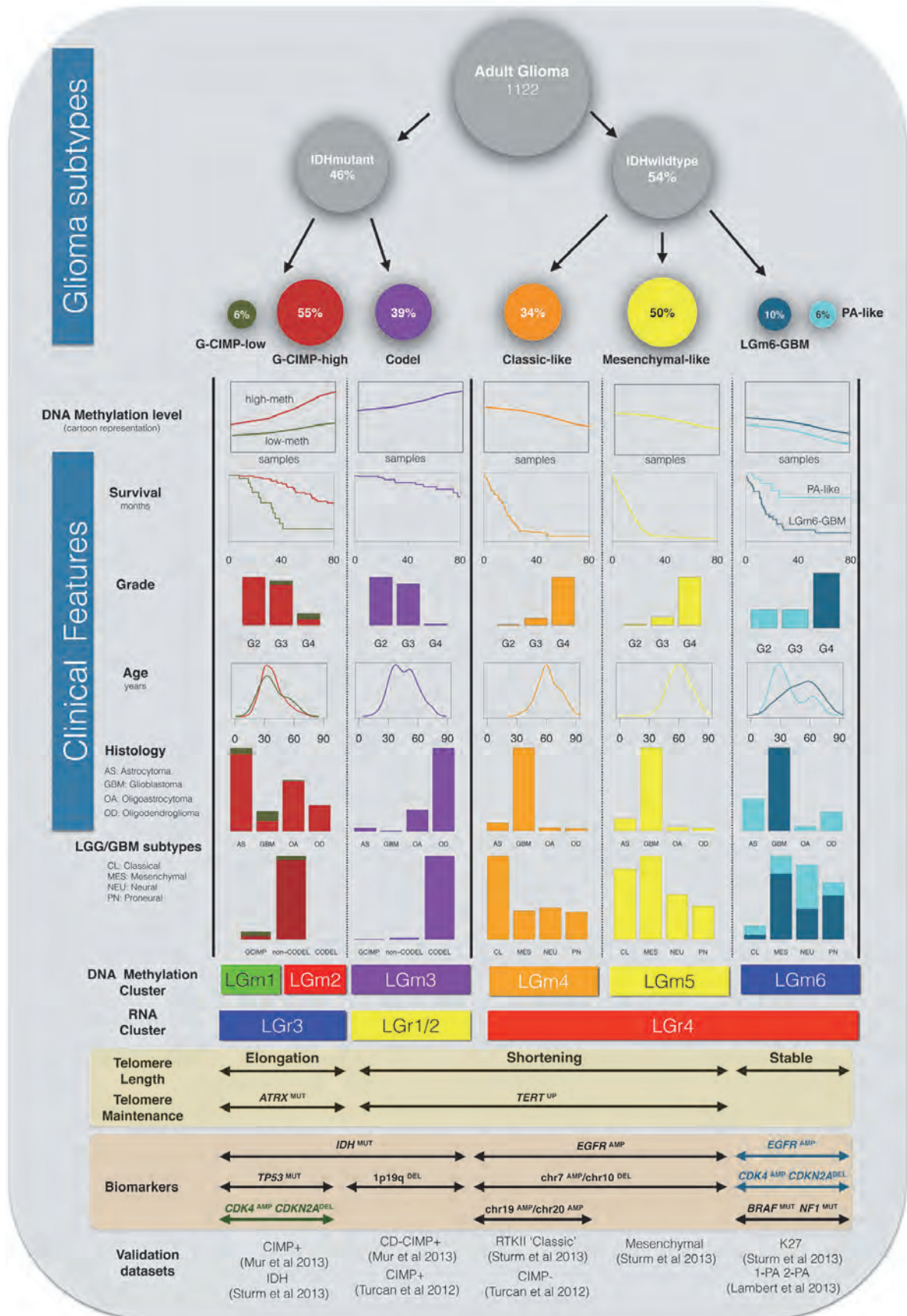


Figure 8 : Classification génétique des GB (Ceccarelli et al., 2016).

VI. Traitements des GB

Le traitement standard actuel d'un GB repose sur **3 axes complémentaires**. **L'exérèse chirurgicale** de la tumeur, lorsqu'elle est possible, constitue le premier axe de traitement. Elle est suivie d'une **radiothérapie** associée à une **chimiothérapie** alkylante à base de Témzolomide. Ce protocole de traitement mis en place par Stupp *et coll* a permis d'améliorer sensiblement la survie médiane des patients (14,6 mois) (Stupp et al., 2005).

VI.1. Chirurgie

La chirurgie est donc le traitement de première intention, lorsque la tumeur est accessible. Elle représente le moyen le plus efficace pour retirer le maximum de la masse tumorale mais elle n'est cependant jamais curative. En effet, la localisation de la tumeur rend l'exérèse difficile et la moindre erreur peut provoquer de graves dommages neurologiques irréversibles. De plus, les GB sont des tumeurs invasives et infiltrantes où une résection macroscopique complète ne signifie pas l'élimination de la totalité des cellules tumorales (Wolbers, 2014). **La chirurgie la plus large possible** permettrait cependant de réduire les symptômes dus à l'hypertension intracrânienne, améliorant ainsi la qualité de vie des patients et permettant parfois d'augmenter la survie. Diverses études cliniques ont ainsi démontré que plus le volume résiduel de la tumeur est faible, plus la réponse au traitement est importante et le taux de survie est amélioré (Hess, 1999; Keles et al., 2004; Simpson et al., 1993).

Selon la taille et la localisation de la tumeur, la chirurgie peut aboutir soit à une résection totale de la masse tumorale, soit à une résection partielle (Hsieh and Lesniak, 2005). Le chirurgien procède par craniotomie, opération durant laquelle un segment de la boîte crânienne est retiré afin de libérer un accès au site de la tumeur, puis remis en place à la fin de la procédure chirurgicale. Pour les cas les plus difficiles (tumeur trop invasive, localisation dans une zone inopérable), une biopsie stéréotaxique sera réalisée uniquement. De plus, il existe aujourd'hui des stratégies émergentes, comme l'IRM intra-opératoire, l'échographie, la neuronavigation ou encore la chirurgie guidée par fluorescence afin d'optimiser l'exérèse de la tumeur en la rendant la plus large possible (Wolbers, 2014).

VI.2. Radiothérapie

Suite à la chirurgie, le traitement de radiothérapie a pour but d'éliminer les cellules tumorales résiduelles afin de retarder le plus possible la récurrence tumorale. Plusieurs études de phase III ont pu démontrer que la radiothérapie, comparée à la chirurgie seule ou uniquement associée à la chimiothérapie, **améliore significativement la survie des patients** (Salzman, 1980; Walker et al., 1978), permettant à cette approche d'entrer dans le standard thérapeutique.

De nombreux travaux ont tenté par la suite d'augmenter l'efficacité de l'irradiation, tout en diminuant le risque d'effets indésirables, en modifiant les modalités d'administration. Il existe par exemple des techniques de radiothérapie hypofractionnée (dose plus élevée par séance mais durée de traitement plus courte), de radiothérapie hyperfractionnée (dose réduite mais nombre de séances plus important) ou d'irradiation en condition stéréotaxique. D'autres stratégies reposent sur l'addition de radiosensibilisants (dérivés de noyaux imidazolés, nitrosourées...). Aucune technique ne s'est cependant révélée supérieure à ce protocole standard (Simon et al., 2005). D'autres recherches demeurent en cours afin d'essayer d'améliorer l'efficacité de cette radiothérapie, notamment par l'optimisation de la balistique (Corwin et al., 2013; Hau et al., 2016).

Le mécanisme d'action de cette irradiation consiste en l'ionisation de la matière qui, par arrachement d'électrons, va pouvoir induire des dommages à l'ADN (altération de bases,

destruction de désoxyriboses, formation de pontages inter ou intra-brins, liaison protéine-acide nucléique, cassures simple brin et cassures double brin, les plus létales). Ces dommages peuvent être provoqués soit de façon directe, soit indirectement via la radiolyse de l'eau et la synthèse de ROS (dérivés réactifs de l'oxygène) (**Figure 9**) (Radford, 1986). Ce dernier mécanisme est d'ailleurs le mécanisme d'action majoritaire.

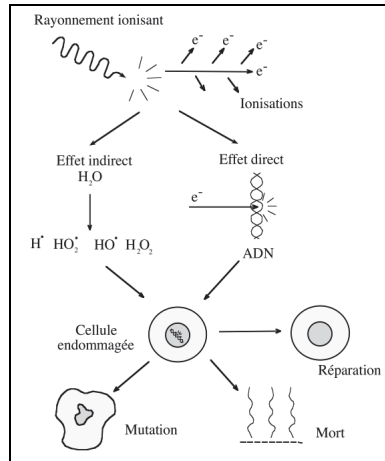


Figure 9 : Mécanisme d'action de la radiothérapie sur sa cible principale : l'ADN
(<http://www.radiotherapie-lyon-macon.fr/lyon/radiotherapie-lyon.asp?idcat=1>).

L'ADN est donc la principale cible des radiations ionisantes, mais **la membrane plasmique** peut également être visée, par l'activation de la sphingomyélinase qui permet la synthèse du céramide, un lipide pro-apoptotique (Haimovitz-Friedman et al., 1994) ou encore via les ROS responsables de la peroxydation lipidique (Gulbahar et al., 2009). Ces lésions vont alors entraîner la mort de la cellule, le plus fréquemment par mort post-mitotique ou par apoptose et plus rarement par sénescence ou autophagie (Ross, 1999; Yao et al., 2003).

La radiothérapie est débutée maximum 6 semaines après la chirurgie. Le protocole de traitement consiste en une **irradiation focale fractionnée** à raison de **2 Grays par jour**, cinq jours par semaine durant **6 semaines** (total de 60 Gy en 30 séances) (Stupp et al., 2005). Le volume irradié comprend le volume de la tumeur observée par l'imagerie (scanner ou IRM), plus un périmètre de 2 cm de marge autour de cette tumeur (Weller et al., 2014).

Cependant, malgré les résultats bénéfiques de cette radiothérapie, son efficacité reste modérée car les GB sont des tumeurs très **radiorésistantes** (cf. chapitre VII). Cette radiorésistance peut s'expliquer notamment par une forte hypoxie, caractéristique majeure de ces tumeurs (Yang et al., 2012), ainsi que par la présence des cellules souches de GB, connues pour être particulièrement radiorésistantes (Attal et al., 2018; Cheng et al., 2010; Khalifa et al., 2017).

VI.3. Chimiothérapie

Le traitement de première ligne a longtemps reposé sur l'utilisation de molécules de la famille des nitrosourées tel que la Carmustine (BCNU[®]) ou la Lomustine (CCNU[®]), bien que les études cliniques n'aient pas démontré de réel bénéfice quant à la survie des patients (MRCBTWP, 2001). En effet, jusqu'au début des années 2000, malgré de nombreux essais cliniques randomisés de phase III, aucune chimiothérapie n'avait permis d'améliorer significativement le pronostic des patients atteints de GB (Pour revue : (Olson et al., 2014)). Cela s'explique notamment par le fait que le choix de ces agents est restreint aux molécules capables de franchir la Barrière Hémato-Encéphalique (BHE).

Il faut toutefois noter que cette BHE est désorganisée dans les GB, en raison de la progression et de l'invasion tumorale mais aussi à cause de la radiothérapie (Deeken and Loscher, 2007).

La BHE présente notamment des altérations au niveau des cellules endothéliales et des jonctions serrées, une augmentation des espaces périvasculaires ainsi que des fenestrations capillaires, ce qui la rendrait plus perméable (Deeken and Loscher, 2007). Malgré l'augmentation de la perméabilité observée, le choix d'une chimiothérapie efficace et de sa délivrance au sein de la tumeur reste encore un challenge (Woodworth et al., 2014).

Cependant, plus récemment, une étude multicentrique randomisée menée par l'Organisation Européenne pour la Recherche et le Traitement du Cancer (OERTC) et l'Institut National du Cancer du Canada (NCIC) a démontré que le Témzolomide, un agent alkylant (Témodal[®]), administré pendant et après la radiothérapie permettait de **prolonger la survie** des patients de manière significative (14,6 mois) comparativement à la radiothérapie seule (12,1 mois) (**Figure 10**) (Stupp et al., 2005). Ces résultats représentent ainsi la première utilisation efficace de la chimiothérapie dans les GB. Depuis cette étude, le Témzolomide fait partie, en association avec la radiothérapie, du traitement standard des GB (Weller et al., 2014). L'efficacité de cette association radio-chimiothérapie pourrait s'expliquer par une augmentation du nombre de lésions de l'ADN, mais aussi par une diminution du risque de résistance liée à la combinaison de deux mécanismes d'action différents (Chakravarti et al., 2006). De plus, le Témodal[®] permet d'augmenter la réponse aux radiations ionisantes via l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M, phase où les cellules sont particulièrement radiosensibles (Chalmers et al., 2009).

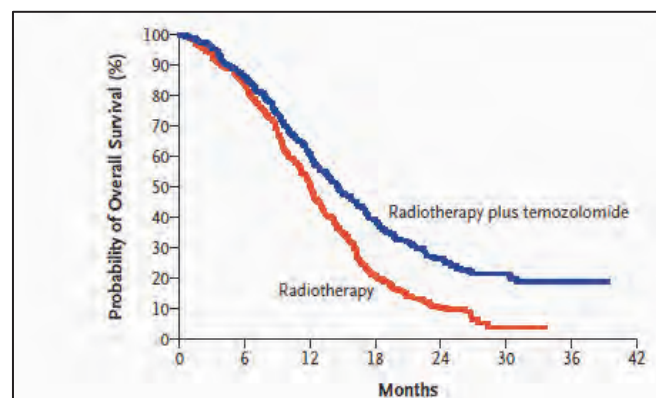


Figure 10 : Courbe de Kaplan-Meier estimant la survie globale des patients atteints de GB selon le traitement administré. La courbe rouge correspond aux patients ayant reçu la radiothérapie seule tandis que la courbe bleue représente les patients traités par radiothérapie associée au Témzolomide (Stupp et al., 2005).

Le Témzolomide est une Imidazotétrazine dérivée de la Dacarbazine. Cette molécule est administrée par voie orale et présente une bonne diffusion à travers la barrière hémato-encéphalique et dans le liquide céphalorachidien (LCR) (Goldwirt et al., 2014). Le Témzolomide est converti spontanément au pH physiologique en un métabolite actif, le 5-(3-Méthyl)-1-Triazen-1-yl-Imidazole-4-Carboxamide (MTIC). Ce composé est alors capable de **méthyler l'ADN** généralement au niveau de résidus guanine (en position O6 ou N7) situés au centre des séquences GGG (Denny et al., 1994). La formation de O⁶-méthylguanine entraîne l'activation de processus de réparation tel que la MGMT, enzyme capable de reconnaître spécifiquement cette lésion et d'exciser le groupement alkyl, ou bien le Mismatch Repair (MMR). Ce dernier mécanisme aboutit, après plusieurs cycles cellulaires, à une réparation aberrante de l'ADN, et au cours des cycles cellulaires suivants, il s'en suit une fragmentation de l'ADN conduisant finalement à la mort cellulaire principalement par apoptose (**Figure 11**).

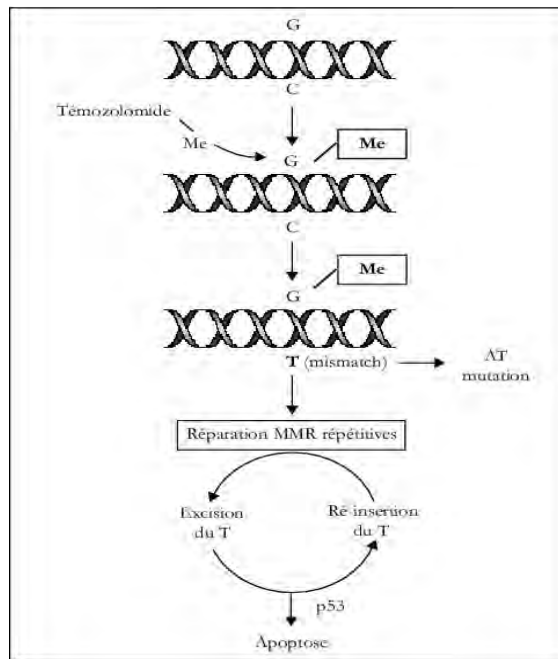


Figure 11 : Mécanisme d'action du Témolozolomide (Benouaich-Amiel et al., 2005).

Le protocole d'administration standard du Témolozolomide dans le traitement des GB consiste en **une prise quotidienne par voie orale une heure avant la radiothérapie** (60 Gy en 30 séances), à la dose de 75 mg/m^2 par jour pendant les 6 semaines de radiothérapie. Puis, à l'issue de l'irradiation, un **traitement adjuvant** est poursuivi à la dose de 200 mg/m^2 par jour sur 5 jours consécutifs tous les 28 jours, durant 6 cycles (Stupp et al., 2005) (Figure 12). Cette molécule présente un excellent profil de tolérance avec pour faible risque (<10%) une toxicité hématologique (neutropénie, thrombopénie, leucopénie).

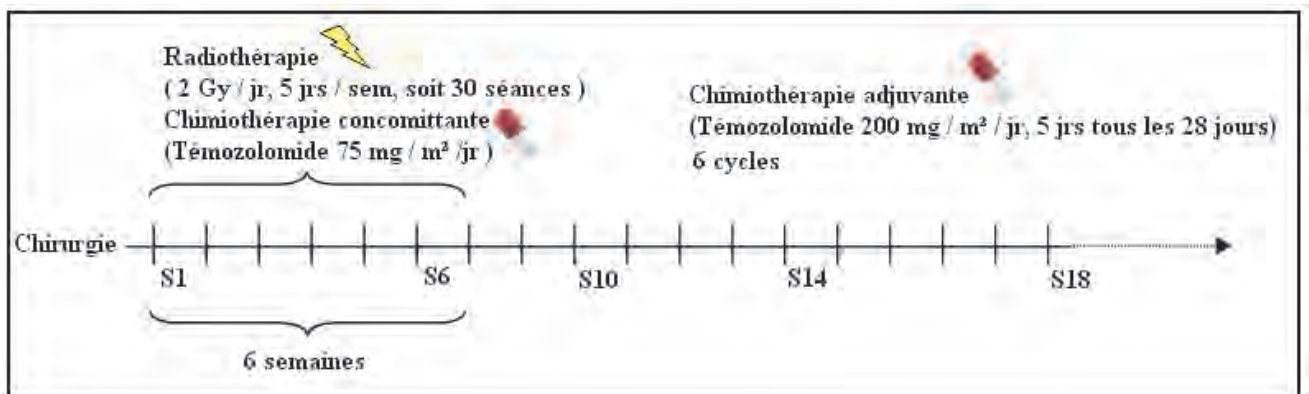


Figure 12 : Protocole standard actuel de traitement des GB (Stupp et al., 2005).

VI.4. Nouvelles thérapies

Malgré les traitements standards mis en place, le pronostic des GB demeure très sombre. C'est pourquoi d'intenses recherches se concentrent sur l'identification de cibles permettant d'améliorer le traitement de ces tumeurs agressives. Les progrès de la biologie ont ainsi permis d'améliorer les techniques de chirurgie, radio ou chimiothérapie actuelles mais aussi de développer de nouvelles approches thérapeutiques innovantes via des thérapies ciblées, l'immunothérapie et la thérapie génique.

VI.4.1. Améliorer l'efficacité de la chirurgie

Une nouvelle technique de chirurgie guidée par fluorescence s'appuie sur l'utilisation de l'acide 5-aminovulinique (5-ALA) (Gliolan®). Cette molécule est un précurseur naturel de l'hémoglobine qui est métabolisé en porphyrines fluorescentes, visualisables après excitation sous lumière bleue. Dans les gliomes, après son administration, le 5-ALA est métabolisé par les cellules tumorales en protoporphyrine IX (PPIX) qui s'accumule fortement, à l'inverse du tissu sain (Piccirillo et al., 2012). Cette accumulation sélective permet ainsi d'augmenter la probabilité d'exérèse complète à l'aide d'un microscope neurochirurgical approprié, où le tissu tumoral est visualisé en rouge alors que le tissu sain apparaît en bleu.

VI.4.2. Améliorer l'efficacité de la radiothérapie

Pour augmenter l'efficacité de la radiothérapie, de nombreuses études de **balistique** sont en cours de réalisation, avec pour but d'irradier au maximum la tumeur tout en épargnant les tissus sains avoisinants (Corwin et al., 2013). L'utilisation **d'agents radiosensibilisants** est une autre possibilité pouvant permettre d'améliorer la radiothérapie. Ces agents peuvent correspondre soit à des molécules cytotoxiques (dérivés de noyaux imidazolés, nitrosourées, 5-fluorouracile, Témazolomide, ...) soit à des nouvelles molécules de thérapies ciblées moléculaires à visée radiosensibilisante (Inhibiteurs de l'EGFR, VEGFR, mTOR, Ras, ...). Ces molécules seront détaillées dans le paragraphe VI.4.4 (Zhang and Chakravarti, 2006).

VI.4.3. Améliorer l'efficacité de la chimiothérapie

Plusieurs études visent à améliorer l'efficacité de la chimiothérapie en augmentant sa concentration dans la tumeur tout en limitant la toxicité systémique. Pour cela, la chimiothérapie est administrée en **intra-artériel** par angiographie cérébrale. C'est une procédure relativement bien tolérée qui semble apporter des bénéfices thérapeutiques mais l'absence d'essais de phase III ne permet pas de conclure à une augmentation de l'efficacité par rapport au protocole standard (Burkhardt et al., 2011). Une autre possibilité à l'étude repose sur **l'implantation de sondes imprégnées d'agents chimiothérapeutiques** directement dans le lit de la tumeur lors de la résection chirurgicale. Un essai de phase III a ainsi montré un bénéfice de survie chez les patients traités avec des implants imprégnés de Carmustine (Gliadel®) comparativement aux patients implantés avec un placebo (Ashby et al., 2016; Nagpal, 2012; Westphal et al., 2003). Le bénéfice reste toutefois modeste certainement en raison de la faible durée de vie de ce cytotoxique et de sa faible capacité de diffusion dans la tumeur. La combinaison avec d'autres molécules est en cours d'étude.

VI.4.4. Thérapies ciblées moléculaires

Le développement des études de génomique a permis d'identifier les voies de signalisation retrouvées fréquemment mutées dans les GB. Ces altérations peuvent représenter des **cibles potentielles** pour lesquelles ont été développées des thérapies spécifiques. Ces cibles sont des récepteurs de facteurs de croissance ou des protéines impliquées dans de grandes voies de signalisation cellulaire. Divers essais cliniques ont ainsi permis de tester de nombreuses molécules de thérapie ciblée incluant des inhibiteurs du VEGF/VEGFR, de l'EGF/EGFR, du PDGFR, de certaines intégrines, de la voie RAS/MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*), de la voie PI3K/Akt, de mTOR (*mammalian target of Rapamycin*), de la PKC (Protéine Kinase C), de kinases de la famille SRC (*Sarcoma tyrosine kinase*), du TGF- β (*Transforming growth factor β*) ou encore des HDACs (Histones Déacétylases) (**Figure 13**). Les principales thérapies ciblées à l'étude actuellement sont abordées ci-dessous.

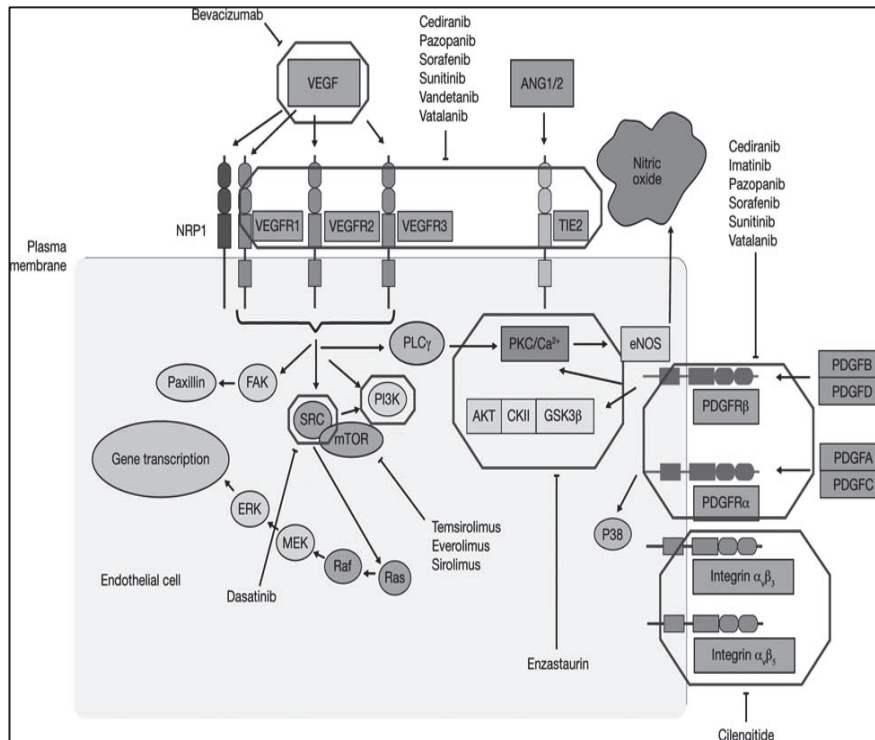


Figure 13 : Principales thérapies ciblées à l'étude dans les GB. Les récepteurs de croissance et les principales voies de signalisation retrouvées mutées dans les GB sont ciblées par des petites molécules ou des anticorps spécifiques (ANG : Angiopoïétine, CKII : *Casein kinase II*, eNOS : *Endothelial nitric oxide synthase*, ERK : *Extracellular signal regulated kinases*, FAK : *Focal adhesion kinase*, GSK3β : *Glycogen synthase kinase 3β*, MEK : *Mitogen activated protein kinase kinase*, NRP1 : *Neuropiline 1*, PLC : *Phospholipase C*, TIE2 : *Tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains*) (Wick et al., 2011).

VI.4.4.1. VEGF/VEGFR

L'axe du VEGF/VEGFR joue un rôle majeur dans l'angiogénèse tumorale. L'inhibition de l'angiogénèse représente une approche thérapeutique intéressante étant donné son rôle dans la progression tumorale (Jain et al., 2007). C'est pourquoi des thérapies anti-angiogéniques dirigées contre le VEGF, **Bévacizumab** (Avastin®) ou son récepteur le VEGFR, **Cédiranib** (Recentin®) ont été développées.

Le Bévacizumab est un anticorps monoclonal qui se lie spécifiquement au VEGF, bloquant alors sa liaison sur ses récepteurs présents à la surface des cellules endothéliales. La neutralisation du VEGF se traduit par l'inhibition de la formation de nouveaux vaisseaux voire la normalisation de la vascularisation tumorale. Cette molécule a fait l'objet de nombreux essais cliniques dans les GB en traitement de seconde ligne qui ont conduit à son approbation aux Etats-Unis dans le traitement des GB récurrents (Friedman et al., 2009). Des essais utilisant le Bévacizumab en première intention ont alors été menés (AVAglio, RTOG0825) mais les derniers résultats sont mitigés. En effet, si le Bévacizumab augmente la survie sans progression en association avec la radiothérapie et le Témzolomide, la survie globale des patients n'est pas pour autant significativement augmentée (Chinot et al., 2014; Gilbert et al., 2014). D'autres essais sont en cours afin d'évaluer le meilleur schéma thérapeutique de cette molécule en association ou non avec d'autres thérapies (Field et al., 2015; Jeck et al., 2018).

Le Cédiranib est une petite molécule inhibitrice du VEGFR disponible par voie orale qui, en association avec la radio/chimiothérapie, normalise rapidement la vascularisation tumorale et a également montré des bénéfices en clinique en phase III (Batchelor et al., 2013; Batchelor et al., 2007).

VI.4.4.2. EGF/EGFR

L'EGFR est un récepteur à tyrosine kinase retrouvé surexprimé dans plus de la moitié des GB et muté sous une forme constitutivement active dans 25 % des cas. Ce récepteur représente une cible attractive, d'autant plus que son inhibition dans d'autres cancers s'est révélée bénéfique (Kalman et al., 2013). Des molécules inhibitrices de l'EGFR ont donc fait l'objet d'essais cliniques. Il s'agit principalement de l'**Erlotinib** (Tarceva[®]) et du **Géfitinib** (Iressa[®]), des petites molécules inhibitrices de l'activité tyrosine kinase du récepteur, ou le **Cetuximab** (Erbix), un anticorps dirigé contre son ligand l'EGF.

Les essais cliniques de phases I et II (GERT) à partir de ces molécules se sont cependant montrés décevants, ne permettant pas d'amélioration de la survie globale, même en association avec la radiothérapie (Combs et al., 2006; Peereboom et al., 2010; Yung et al., 2010). D'autres études sont en cours et tentent notamment de définir des marqueurs prédictifs d'une réponse positive pour ces molécules, comme cela a été suggéré pour les patients mutés pour EGFR mais avec PTEN intact (D'Alessandris et al., 2013).

VI.4.4.3. PDGFR et autres récepteurs tyrosines kinases

Le PDGFR, un autre récepteur tyrosine kinase impliqué dans la prolifération et l'angiogenèse, est fréquemment surexprimé dans les GB, suggérant un rôle potentiel dans le développement tumoral. Différents inhibiteurs de ce récepteur tels que le **Sorafénib** (Nexavar[®]), l'**Imatinib** (Gleevec[®]), le **Sunitinib** (Student[®]), le **Tandutinib**, le **Vatalanib** et le **Pazopanib** ont été développés. Plus précisément, ces molécules sont des inhibiteurs multikinases, car elles possèdent plusieurs cibles telles que PDGFR, VEGFR, Raf, BCR-ABL, c-kit, FLT3 (*Fms-like tyrosine kinase 3*) (cf. **Table 4**). Ces molécules font l'objet d'essais cliniques dans le cas de GB récurrents, en monothérapie ou en association avec une chimiothérapie (Témazolomide, Hydroxyurée) mais n'ont pour l'instant pas démontré d'activité anti-tumorale majeure (Morris and Abrey, 2010).

VI.4.4.4. Intégrines

Deux intégrines, $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$, exprimées à la fois par les cellules tumorales de GB et les cellules endothéliales, ont été impliquées dans l'adhérence, la migration, l'invasion, l'angiogenèse et la radiorésistance des GB (Monferran et al., 2008; Scaringi et al., 2012).

Le **Cilengitide**, un inhibiteur spécifique de ces deux intégrines a été évalué dans le cadre d'essais cliniques, en association avec la chimio/radiothérapie standard. Cette molécule, qui a montré une activité antitumorale intéressante dans des essais de phase II (Stupp et al., 2010), ne s'est cependant pas révélée concluante dans les différents essais plus avancés CORE et CENTRIC, n'augmentant pas la survie moyenne des patients (Nabors et al., 2013; Stupp et al., 2014) (se référer au chapitre I.2 partie 4).

VI.4.4.5. Voie RAS/MAPK

RAS est une GTPase (petite protéine G) fréquemment surexprimée dans les GB. Cette protéine nécessite d'être farnésylée pour être adressée à la membrane plasmique où elle pourra réaliser sa fonction et notamment activer la voie des MAPK. Des inhibiteurs de farnesyltransférases comme le **Lonafarnib** (Sarasar[®]) ou le **Tipifarnib** (Zarnestra[®]), capables de bloquer cette voie de signalisation, sont en cours d'études, mais les premiers résultats ne montrent qu'une faible activité anti-tumorale (Moorthy et al., 2013). Ces molécules, via l'inhibition des farnesyltransférases, bloquent également l'activité d'autres GTPases, comme RhoB. Cette dernière a d'ailleurs été mise en évidence dans la radiorésistance et l'hypoxie des

GB, en aval des intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$ (Monferran et al., 2008; Skuli et al., 2009). Un essai clinique de phase I-II associant le Tipifarnib à la radiothérapie a ainsi pu montrer, avec une bonne tolérance, une amélioration sensible de la survie globale des patients atteints de GB (Ducassou et al., 2013).

VI.4.4.6. Voie PI3K/Akt

Le blocage de la voie PI3K/Akt est également très étudié dans le traitement des GB, étant donné les nombreuses altérations de cette voie retrouvées dans les analyses génomiques et son rôle dans la prolifération et la survie cellulaire. L'**Enzastaurine** a ainsi démontré en clinique certains bénéfices en association avec le Témazolomide (Rampling et al., 2012). De plus, les inhibiteurs de mTOR comme le **Temsirolimus** (Torisel[®]) permettent également d'interférer sur cette voie de signalisation et font l'objet d'autres recherches, notamment en combinaison avec d'autres molécules de chimiothérapie (Lee et al., 2012; Wick et al., 2016).

VI.4.4.7. Autres cibles moléculaires

D'autres molécules ont été développées dans le but de bloquer des protéines ou voies de signalisation impliquées dans l'initiation, la croissance, la migration ou encore l'invasion tumorale dans les GB. Parmi ces nouvelles thérapies ciblées, le **Trabedersen** est dirigé contre le TGF- β (Joseph et al., 2012), le **Dasatinib** (Sprycel[®]) cible des protéines de la famille SRC (Franceschi et al., 2012) et le **SAHA** (acide hydroxamique suberoylanilide, Vorinostat[®]) est un inhibiteur d'HDAC (Bezecny, 2014). Toutes ces molécules font l'objet d'essais cliniques, le plus souvent en association avec le traitement standard ou d'autres thérapies (Paolillo et al., 2018).

MOLECULE	CIBLE	PHASE	GB
Bévacizumab	VEGF	IV	Primaire et récurrent
Aflibercept	VEGF	II	Récurrent
Cédiranib	VEGFR	III	Récurrent
Cétuximab	EGF	I/II	Primaire
Erlotinib	EGFR	II	Primaire
Gefitinib	EGFR	II	Primaire
Imatinib	PDGFR/BCR-ABL/c-kit	II	Récurrent
Sorafenib	PDGFR/VEGFR/Raf	I/II	Récurrent
Sunitinib	PDGFR/VEGFR/c-kit/FLT3	II	Récurrent
Vatalanib	PDGFR/VEGFR/c-kit	I/II	Récurrent
Pazopanib	PDGFR/VEGFR/c-kit	II	Récurrent
Cilengitide	$\alpha\beta3/ \alpha\beta5$	III	Primaire et récurrent
Lonafarnib	Ras	Ib	Récurrent
Tipifarnib	Ras	I/II	Primaire et récurrent
Enzastaurin	PI3K/Akt et PKC	III	Récurrent
Trabedersen	TGF- β	III	Récurrent
Temsirolimus	mTOR	II	Récurrent
Sirolimus	mTOR	II	Récurrent
Everolimus	mTOR	II	Récurrent
Dasatinib	SRC	I/II	Récurrent
Vorinostat	HDAC	II	Récurrent

Table 4 : Tableau récapitulatif des principales thérapies ciblées à l'étude pour le traitement des GB.

Ces thérapies ciblées innovantes sont porteuses d'espoir puisqu'elles inhibent spécifiquement des mécanismes moléculaires et cellulaires essentiels à la survie des cellules tumorales. Elles nécessitent cependant **l'identification de sous-groupes de patients** pour lesquels la molécule pourrait agir, car, comme vu précédemment, les GB sont des tumeurs très hétérogènes, caractérisées par des altérations moléculaires différentes, et qui ne répondront pas toutes de la même façon à un traitement donné. Elles nécessitent également **l'identification des patients répondeurs** grâce à la mise en évidence de **marqueurs biologiques prédictifs**.

VI.4.5. Immunothérapie

Différents mécanismes immunosuppresseurs ont été décrits dans les GB (cf. précédemment paragraphe III.4.4). De ce fait, des stratégies d'immunothérapie sont développées et pourraient permettre l'obtention de bénéfices thérapeutiques intéressants.

VI.4.5.1. Immunostimulants

Diverses molécules ont d'abord été testées afin de stimuler la réponse immunitaire anti-tumorale. Il s'agit notamment de **la toxine diphtérique** conjuguée à **l'EGF** ou **l'IL-13** ou encore de **l'exotoxine A** de *Pseudomonas aeruginosa* fusionnée avec **l'IL-4**. Ces composés ont fait l'objet de diverses études chez la souris xéno greffée, voire chez l'humain à travers des essais de phase I et ont pu montrer une réponse anti-tumorale intéressante. Ils semblent toutefois relativement toxiques et pénètrent difficilement dans la tumeur (Candolfi et al., 2011; Oh et al., 2009).

VI.4.5.2. Stratégies d'immunothérapies

Il existe différentes stratégies d'immunothérapie : active, passive, immunomodulatrice et adoptive (Pour revue : (Kamran et al., 2016)).

Un exemple d'immunothérapie active est le **Rindopepimut**, un peptide synthétique dirigé contre EGFRvIII, pour les patients concernés par cette mutation. En effet la mutation EGFRvIII, rendant l'EGFR constitutivement actif, est retrouvée dans 30% des GB mais n'est pas exprimée par les cellules saines. Ce vaccin peptidique a ainsi permis d'améliorer la durée de vie des patients traités dans divers essais de phase I et II et fait désormais l'objet d'un essai clinique de phase III (NCT01480479) (Zussman and Engh, 2015).

L'immunothérapie passive repose sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux, comme le **Bevacizumab** ou le **Cetuximab** (cf. paragraphe VI.4.4).

La stratégie immunomodulatrice consiste à cibler des « checkpoints immunosuppresseurs » c'est-à-dire des interactions ligands récepteurs impliquées dans la régulation des signaux de la réponse immunitaire. Les exemples les plus décrits sont l'utilisation de **l'Ipilimumab**, un anticorps dirigé contre CTLA-4 (protéine exprimée par les lymphocytes T qui inhibe leur activation) et du **Nivolumab**, un anticorps dirigé contre le récepteur PD-1 (*Programmed cell death protein 1*, également immunosuppresseur) (Paolillo et al., 2018).

Le transfert adoptif repose sur le **prélèvement de cellules dendritiques circulantes** du patient, leur **stimulation in vitro** par différents antigènes de la tumeur (lysats tumoraux obtenus à partir de la résection chirurgicale), puis **leur réinjection** dans la circulation générale. Ces cellules vont alors pouvoir permettre l'activation et la prolifération des lymphocytes T CD8+ et CD4+ spécifiques des cellules tumorales. Un essai de phase I (NCT00068510) reposant sur cette technique a ainsi permis d'améliorer sensiblement la survie des patients (31,4 mois contre 15 mois pour le groupe contrôle) (Prins et al., 2011).

Divers autres essais sont également en cours, avec notamment le transfert de cellules T autologues ou des cellules CARs T (*chimeric antigen receptors T cells*) (Kamran et al., 2016).

VI.4.6. Thérapie génique

La thérapie génique consiste à **insérer *in vivo* un gène thérapeutique** dans des cellules cibles, ici tumorales. Plusieurs stratégies sont possibles pour introduire le gène d'intérêt comme l'utilisation de vecteurs viraux (adénovirus, rétrovirus, lentivirus...) ou non viraux (phosphate de calcium, électroporation, lipofection). La nature du gène introduit est également très diverse. Il peut s'agir d'une séquence d'ADN ciblant un oncogène ou visant à remplacer la perte d'un gène suppresseur de tumeur (p53, PTEN). Le gène introduit peut aussi coder pour des protéines permettant la stimulation du système immunitaire (interleukines), bloquant l'angiogenèse ou encore ayant une fonction favorisant la mort de la cellule (thymidine kinase du virus de l'herpès), dans ce dernier cas on parle alors de thérapie génique « suicide ». Divers essais cliniques reposant sur ces différents principes sont en cours d'évaluation pour des patients atteints de GB (Kane et al., 2015; Murphy and Rabkin, 2013).

VII. Résistances et récurrences

Malgré les traitements disponibles, les GB récidivent rapidement de façon quasi-systématique. Bien que ces récurrences soient en grande partie attribuées à une sous-population de cellules souches de GB, particulièrement agressives et résistantes (détaillées dans la seconde partie de cette thèse), il ne sera évoqué ci-dessous que les autres mécanismes de résistances connus et liés aux différentes propriétés des GB vues précédemment (paragraphe III.4), c'est-à-dire l'hypoxie, l'angiogenèse, l'invasion, l'immunosuppression et l'hétérogénéité tumorale.

VII.1. Chimiorésistance

La **localisation** de la tumeur, sa taille et la présence de la BHE limite le passage des chimiothérapies. De plus, les cellules tumorales et vasculaires expriment des protéines d'efflux (P-gp, MRP1) qui diminuent la concentration de la chimiothérapie au niveau tumoral (Veringa et al., 2013). D'autre part, la résistance au Témzolomide est largement dépendante du niveau de **méthylation du promoteur MGMT**. Le gène codant cette protéine de réparation, qui prend en charge les lésions O⁶-méthylguanine induites par le Témzolomide, induit une diminution de l'efficacité de la chimiothérapie. Cependant, le gène MGMT peut être retrouvé inhibé, dans certains types de GB, par hyperméthylation de son promoteur, donnant lieu à une meilleure réponse au traitement (Hegi et al., 2005). D'autres systèmes de **réparation de l'ADN** (MMR et BER (*Base excision repair*)) sont également mis à contribution dans les cellules tumorales pour résister à la mort cellulaire en réponse à la chimiothérapie (Eich et al., 2013; Erasmus et al., 2016; Quiros et al., 2011). La voie de signalisation **PI3K/Akt** (souvent activée suite à la mutation de PTEN) a également été montrée fortement impliquée dans la résistance au Témzolomide (Dai et al., 2013; Jiang et al., 2007). Enfin, les propriétés **invasives** des cellules de GB leur permettent également d'échapper au traitement (Dong et al., 2015; Wu et al., 2014). Ainsi la forte plasticité et adaptabilité des cellules de GB leur confèrent une importante chimiorésistance.

VII.2. Radiorésistance

En plus d'être chimiorésistants, les GB sont également très radiorésistants. Cette radiorésistance, impliquant des voies biologiques complexes et des *cross-talk* avec de

nombreux facteurs de croissance et récepteurs, est à la fois intracellulaire (intrinsèque) et micro-environnementale (extrinsèque) (Barker et al., 2015).

Au niveau **intracellulaire**, face aux rayonnements ionisants, les cellules tumorales de GB surexpriment différents récepteurs qui vont alors activer des voies de signalisations de survie (PI3k/Akt), inhiber celles de la mort cellulaire (via p53, Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2 protein*) et survivine) ou encore favoriser la réparation des lésions de l'ADN. C'est le cas de l'EGFR (Mukherjee et al., 2009), du FGFR (Ader et al., 2014) et du VEGFR (Knizetova et al., 2008). Les intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$, exprimées par les cellules tumorales mais aussi les cellules endothéliales, vont également participer via ILK et RhoB à la radiorésistance (Monferran et al., 2008) (cf. partie 3, chapitre IX.3.4).

Au niveau **microenvironnemental**, l'hypoxie est un facteur majeur de radiorésistance. Comme nous l'avons vu précédemment un des mécanismes d'action de la radiothérapie passe par la radiolyse de l'eau et la formation de ROS, qui n'a lieu qu'en présence d'oxygène. Cependant, les GB sont très hypoxiques ce qui limite la production de ROS, diminue les dommages de l'ADN et donc entraîne une radiorésistance. De plus l'hypoxie conduit à la stabilisation des HIF qui à leur tour vont favoriser la survie cellulaire en activant la transcription de gènes cibles (VEGF, TGF, MMP...). Le réseau vasculaire joue également un rôle important dans la radiorésistance des GB. En effet, les VS tumoraux favorisent non seulement la survie des cellules tumorales via l'apport en oxygène et nutriments, mais aussi leur échappement vers d'autres régions du cerveau. Enfin, l'irradiation induit une inflammation et un remodelage de la MEC qui peuvent aussi participer à la radiorésistance (Barker et al., 2015).

VII.3. Traitement des récurrences

Malgré les traitements disponibles les GB récidivent rapidement de façon quasi-systématique. Il faut alors reconsidérer le traitement initialement mis en place, et selon l'état du patient, la localisation et la taille de la récurrence, les options envisageables restent limitées, malgré les récentes avancées et les efforts de recherche constants dans ce domaine. Il peut s'agir : d'une nouvelle chirurgie, d'autres séances de radiothérapie, d'une chimiothérapie de deuxième ligne, d'une nouvelle thérapie ciblée moléculaire ou encore de la combinaison de plusieurs de ces stratégies (Weller et al., 2014).

Une **seconde chirurgie** est possible pour environ un quart des patients en récurrence, mais les effets indésirables liés à une nouvelle exérèse restent importants et le bénéfice d'une réintervention n'a pas été établi (Niyazi et al., 2010; Weller et al., 2014). Bien que la **radiothérapie** ait prouvé son efficacité dans le traitement du GB, son utilisation pour le traitement des récurrences reste modérée, en raison des effets indésirables sévères et de l'impact qu'elle pourrait avoir sur la qualité de vie des patients (Niyazi et al., 2010; Weller et al., 2014). Une **chimiothérapie de seconde ligne** demeure la solution la plus envisagée. Elle doit toujours tenir compte de l'état du patient, du risque d'effets indésirables et de l'éventuelle acquisition de résistances aux molécules de chimiothérapie. Parmi les molécules les plus utilisées seules ou en association, en situation de récurrence, nous pouvons citer : le Témazolomide, l'Irinotécan, le Topotécan, le Cisplatine, le Paclitaxel, la Carmustine, la Foetomustine, le Cyclophosphamide, ou encore le Bévacicumab (Niyazi et al., 2010; Weller et al., 2014).

L'inclusion des patients en récurrence dans des études cliniques testant de **nouvelles stratégies** (molécules de thérapies ciblées, immunothérapies ou thérapies géniques) (décrites dans le paragraphe VI.4) est souvent proposée à ce stade et pourrait permettre d'améliorer leur prise en charge.

VIII. Pronostic

Les GB font partie des **tumeurs les plus agressives** chez l'homme avec une survie médiane ne dépassant pas 15 mois. Le taux de survie est inférieur à 30 % à 1 an, à 5 % à 3 ans et à 3 % à 5 ans (Brandes et al., 2008). De nombreux essais cliniques ont été réalisés mais le devenir clinique d'un patient atteint de GB reste difficile à établir. De plus, il existe peu de facteurs pronostics.

L'**âge** est un facteur important puisque les patients jeunes (moins de 45 ans) ont un pronostic de survie supérieur à celui des personnes plus âgées. Ceci peut s'expliquer en partie par la plus grande fréquence de GB secondaires chez les patients plus jeunes, mais certaines données indiquent également une progression maligne plus rapide chez les patients plus âgés.

La **taille et la localisation** de la tumeur sont à prendre en compte et ont un impact sur le pronostic, les GB en contact avec la zone subventriculaire (SVZ) étant les plus agressifs (Jafri et al., 2013; Khalifa et al., 2017). La présence et l'étendue de la nécrose corrélient également avec un faible pronostic clinique, ainsi que l'étendue de la résection chirurgicale (Wolbers, 2014).

D'un point de vue moléculaire, des marqueurs pronostics ont pu être identifiés. Le premier marqueur correspond à la **méthylation du promoteur MGMT**. Une meilleure réponse au traitement standard (radiothérapie et témozolomide) a été observée chez ces patients (survie médiane de 21,7 mois contre 12,7 mois) (Hegi et al., 2005). Depuis peu, les mutations IDH1/2 sont également à prendre en compte, puisqu'elles confèrent clairement un meilleur pronostic, particulièrement pour les GB secondaires (Karsy et al., 2017). D'autres nouveaux facteurs pronostics récemment identifiés sont les mutations de TERT (70% des GB primaires, facteur de mauvais pronostic), les mutations des histones H3F3A K27 et G34 (5% des GB adultes), les mutations de ATRX, ainsi que le phénotype de méthylation des îlots cpG G-CIMP qui représente, lui, un facteur pronostic bénéfique, étroitement associé aux GB secondaires IDH mutés (Aldape et al., 2015; Karsy et al., 2017).

Devant ce risque majeur de récurrence rapide, il y a un besoin urgent d'améliorer le traitement de ces tumeurs agressives. En ce sens, une cible prioritaire concerne les cellules souches de GB (GSC), une sous-population de cellules récemment identifiée, au sein de ces tumeurs hétérogènes, comme fortement impliquées dans l'agressivité, la résistance aux traitements et la récurrence. La seconde partie de cette thèse leur est donc consacrée.

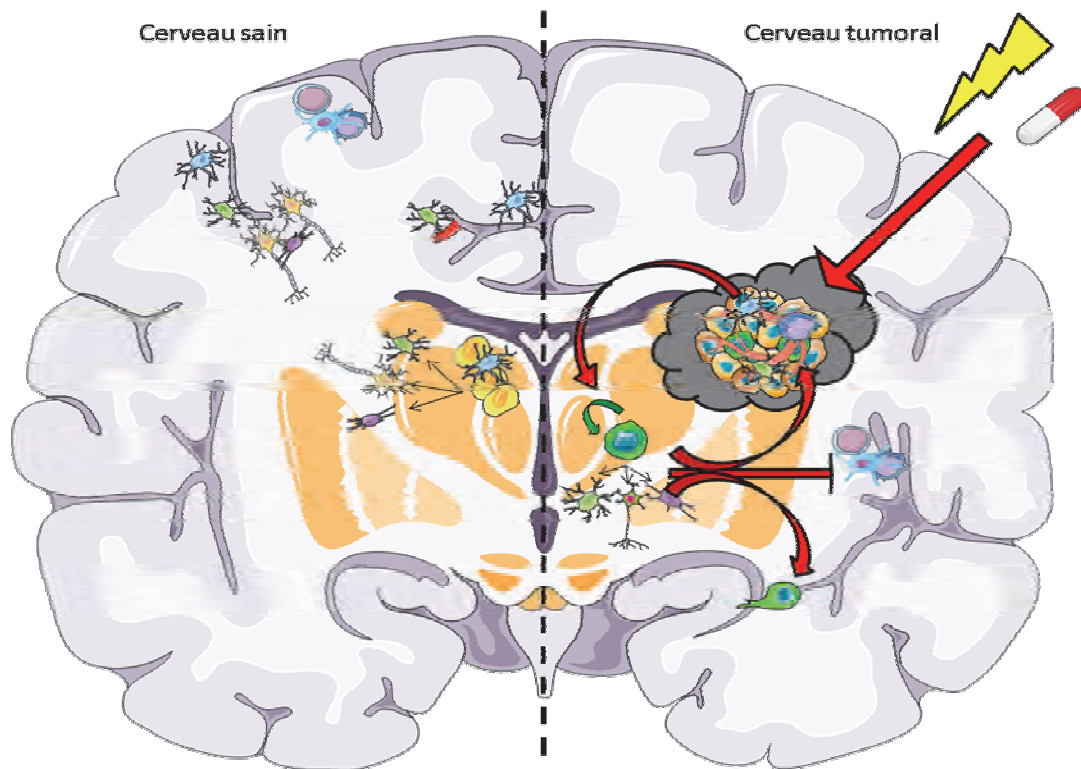


Figure 14 : Bilan partie 1 : Les Glioblastomes. Partie gauche, illustration des différents types cellulaires retrouvés dans le cerveau sain. Les cellules souches neurales, au niveau de la zone subventriculaire, se différencient en neurones, astrocytes et oligodendrocytes qui constituent le tissu cérébral, où l'on retrouve également des vaisseaux sanguins et cellules immunes. Partie droite, cerveau atteint d'un GB, tumeur très hypoxique, angiogénique, invasive, hétérogène, immunosuppressive et résistante aux traitements.

PARTIE 2 : Les cellules souches de Glioblastomes

I. Définition et généralités

Bien que l'origine exacte des GB ne soit pas encore établie, il a cependant pu être identifié, au sein de ces tumeurs hétérogènes, une sous-population de cellules particulièrement impliquées dans la physiopathologie, la résistance aux traitements et la récurrence des GB. Il s'agit de **Cellules Souches Cancéreuses (CSC)** (Assanah et al., 2006; Cheng et al., 2010). Ces CSC font l'objet d'une grande attention dans la littérature actuelle, et de plus en plus d'études permettent de penser qu'elles pourraient être à l'origine de l'initiation et du développement de la tumeur. Le nom de CSC fait référence à l'homologie avec les cellules souches normales mais est controversé. Les CSC ont aussi été appelées cellules initiatrices de tumeur (TIC) ou encore cellules propagatrices de tumeurs (TPC).

Le **concept de ces CSC** est assez récent et supporte l'idée qu'il existe au sein des tumeurs une population de cellules plus indifférenciées, capable d'auto-renouvellement, de multipotence et très résistantes aux thérapies actuelles (Tang, 2012). De plus, seule cette population de CSC serait capable de régénérer une nouvelle tumeur après réimplantation. Ces cellules ne représenteraient qu'un faible pourcentage de la masse tumorale, mais du fait de leur fort potentiel tumorigène et invasif, seraient responsables de la récurrence de nombreux cancers (Tang, 2012).

C'est ainsi que durant les vingt dernières années, des CSC ont pu être identifiées tout d'abord dans des tumeurs hématologiques comme la leucémie myéloïde aigüe (Bonnet and Dick, 1997), puis ce concept s'est ensuite élargi à différentes tumeurs solides telles que le cancer du sein (Al-Hajj et al., 2003), le cancer du côlon (Ricci-Vitiani et al., 2007), du pancréas (Li et al., 2007), de la prostate (Sadri-Ardekani et al., 2009), ainsi que dans des tumeurs du système nerveux central, comme le GB (Singh et al., 2003).

Les GB possèdent donc une sous-population de CSC nommées **cellules souches de glioblastome** (*GB Stem-like Cell*, GSC) ou encore cellules initiatrices de GB (GIC).

II. Origine des GSC

L'origine des GSC est très controversée et plusieurs hypothèses ont été formulées (**Figure 15**).

Certains pensent (**hypothèse 1**) (**Figure 15**) qu'il pourrait s'agir de **cellules souches neurales (NSC) ou cellules progénitrices neurales (NPC) saines** devenues cancéreuses, par l'acquisition d'altérations génétiques et épigénétiques. En ce sens, il a été montré que l'inactivation de PTEN, p53 ou NF1 dans des NSC, ainsi que la réactivation de Ras et Akt dans des NPC permettent d'induire la gliomagenèse dans des souris immunodéprimées (Holland, 2001; Jiang and Uhrbom, 2012). De plus, les voies majeures de signalisation des NSC (EGFR, PTEN, BMI-1, Notch, Wnt) sont fréquemment altérées dans les GB (Jiang et al., 2017; Jiang and Uhrbom, 2012). D'autre part, des GB sont localisés à proximité de la zone sub-ventriculaire, région où se situent les NSC (Eriksson et al., 1998).

D'autres proposent (**hypothèse 2**) (**Figure 15**) une ré-acquisition de caractéristiques phénotypiques de cellules souches (auto-renouvellement, marqueurs souches) par **des cellules plus différenciées déjà cancéreuses**. Ainsi, différentes études ont montré la possibilité de gliomagenèse à partir d'astrocytes matures ou de précurseurs d'oligodendrocytes (Cheng et al., 2010; Jiang and Uhrbom, 2012).

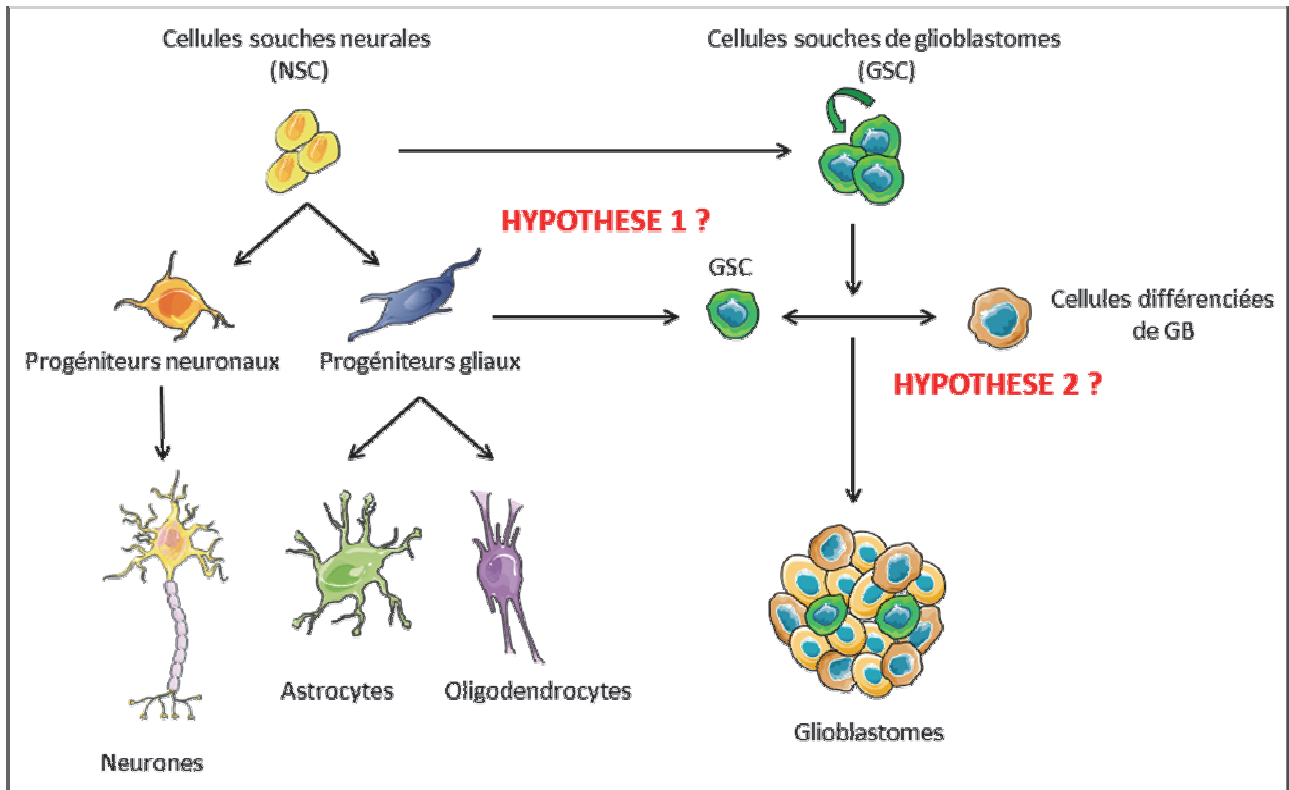


Figure 15 : Origines potentielles des GSC et relations éventuelles avec les NSC, progéniteurs et cellules différenciées. D'après (Goffart et al., 2013).

Ces deux hypothèses, chacune probable, pourraient même avoir lieu simultanément, différentes populations de GSC ayant été retrouvées au sein d'un même GB (Piccirillo et al., 2009). Une origine multiple des GSC pourrait aussi expliquer l'hétérogénéité retrouvée entre des GB différents mais également entre deux localisations différentes au sein d'un même GB.

III. Niches

III.1. Généralités

Le microenvironnement cérébral se compose de la matrice extracellulaire et des cellules présentes à proximité (neurones, astrocytes, oligodendrocytes, cellules microgliales, progéniteurs neuraux, cellules endothéliales, péricytes et cellules immunes). Tous ces acteurs constituent un réseau ayant un rôle essentiel pour les cellules souches. En effet, les cellules souches sont principalement retrouvées au niveau de zones cérébrales bien spécifiques, nommées **niches** (Figure 16).

Les NSC adultes sont ainsi précisément localisées au niveau de deux zones cérébrales fortement vascularisées : majoritairement dans la zone sous-ventriculaire qui borde les ventricules latéraux mais aussi dans la zone sous-granulaire du gyrus denté de l'hippocampe (Barkho and Zhao, 2011; Eriksson et al., 1998). Là, chaque constituant participe à la composition d'un microenvironnement complexe dont la balance des signaux (EGF, Notch, BMP, ...) assure le maintien des NSC. Ainsi, ces niches maintiennent l'homéostasie tissulaire en régulant la quiescence, l'auto-renouvellement, la différenciation, la migration et l'apoptose des NSC.

D'une façon similaire, les GSC n'ont principalement été retrouvées qu'au niveau de certaines zones cérébrales définies. Dans la littérature plusieurs types de niches de GSC ont été décrites : les niches **périvasculaires**, **nécro-hypoxiques** et **invasives** (Lathia et al., 2011). Le micro-environnement présent au sein de ces niches, très spécifique et contrôlé, tient un rôle majeur dans le maintien du phénotype souche des GSC mais aussi dans leurs fonctionnalités. En effet, c'est au cœur de ces niches que des interactions réciproques, complexes et dynamiques entre le microenvironnement et les GSC vont pouvoir se mettre en place, via l'activation de multiples voies de signalisation. La présence des GSC apparaît ainsi être favorisée par l'hypoxie (Mohyeldin et al., 2010), l'acidification extracellulaire (Hjelmeland et al., 2011), le monoxyde d'azote (NO) (Charles et al., 2010; Eyler et al., 2011) mais aussi par une phosphorylation oxydative soutenue (Vlashi et al., 2011). De plus, des facteurs de croissance maintiennent également la présence des GSC comme par exemple le FGF (Haley and Kim, 2014) et le TGF- β (Joseph et al., 2012). Nous allons détailler ci-dessous chaque type de niches des GSC.

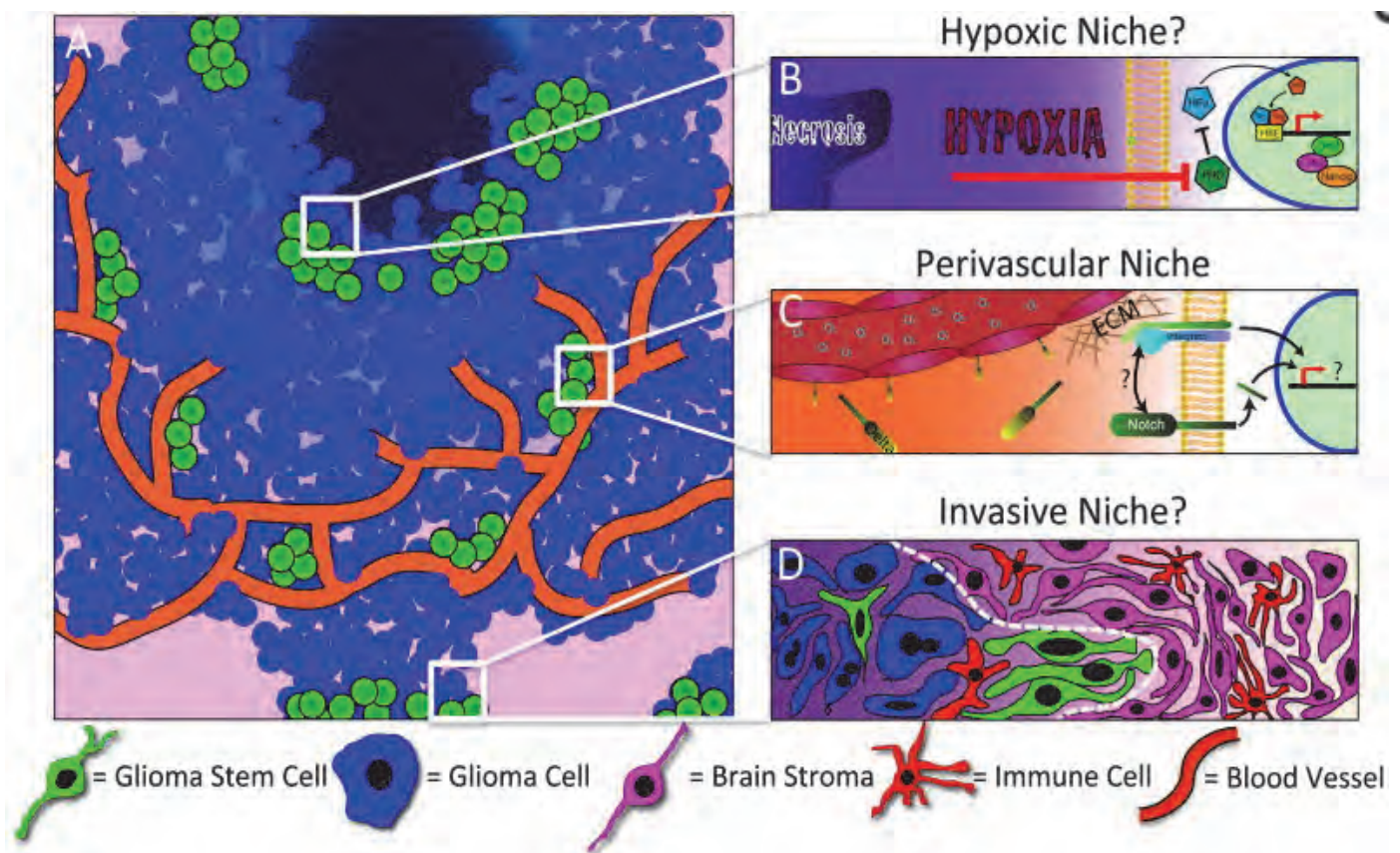


Figure 16 : Niches des GSC (Lathia et al., 2011). A) Les différents types de niches des GSC retrouvées au sein d'un GB, B) Niche hypoxique au niveau des zones de nécrose, le phénotype des GSC est maintenu par la présence des HIFs qui régulent l'expression de gènes souches, C) Niche périvasculaire où les GSC interagissent étroitement avec les cellules endothéliales, D) Niche invasive aux marges tumorales.

III.2. Niches périvasculaires

Les niches périvasculaires (**Figure 16C**) sont les mieux définies et établies dans les tumeurs cérébrales. Il a d'abord été mis en évidence, dans des coupes humaines de GB, que les cellules Nestine+/CD133+ (2 marqueurs des GSC, voir plus loin paragraphe IV.4) sont à proximité des cellules CD34+ (marqueur des cellules endothéliales) (Calabrese et al., 2007). Les interactions ayant lieu dans ces niches périvasculaires sont déterminantes pour le maintien de l'état souche des GSC. Au niveau de ces niches, les GSC interagissent avec les **cellules endothéliales** des vaisseaux sanguins, en sécrétant des facteurs de croissance endothéliaux (VEGF, FGF-2, SDF-1 (*stromal derived factor 1*)). Ces facteurs angiogéniques vont stimuler la croissance des cellules endothéliales. En retour, ces dernières peuvent à leur tour interférer avec les GSC et favoriser le maintien de leur état souche (formation de neurosphères *in vitro*). Les cellules endothéliales assurent l'auto-renouvellement des GSC notamment via l'axe Dll4 (*Delta like ligand 4*) / Notch et le NO (Calabrese et al., 2007), la sécrétion d'IL8 et de CXCL12 (Codrici et al., 2016; Infanger et al., 2013) et l'activation de la voie Hedgehog (SHH et Gli1) (Yan et al., 2014). Les cellules endothéliales ne sont pas les seuls éléments présents dans ces niches périvasculaires. Les GSC sont également en contact avec la membrane basale des VS, physiologiquement composée de collagène, fibronectine, laminine, héparane sulfate, vitronectine et entactine. Ces composés sont aussi retrouvés dans la membrane basale des VS tumoraux, qui est de plus enrichie en Tenascine C et SPARC. L'augmentation d'expression de ces derniers favorise l'invasion et l'angiogenèse (Bellail et al., 2004). D'autres composants de la MEC, telles que les intégrines, participent à la communication et au maintien des GSC, par exemple l'intégrine $\alpha 6$ et un de ses ligands la laminine $\alpha 2$ (Lathia et al., 2012) ou encore l'intégrine $\alpha \beta 3$ (Burgett et al., 2016). De plus, ce microenvironnement contient également des péricytes, fibroblastes, cellules microgliales et macrophages dont le rôle sur les GSC demeure encore à explorer (Turpin et al., 2015).

III.3. Niches hypoxiques

Un autre type de niches, moins décrit que le précédent, pourrait constituer un second réservoir de GSC. Il s'agit des niches hypoxiques ou péri-nécrotiques (**Figure 16B**). Comme vu dans la partie anatomopathologie (cf. Partie 1, chapitre IV.3), les GB comprennent des zones de nécrose qui sont très hypoxiques et dans lesquelles seraient préférentiellement localisées des GSC (Seidel et al., 2010). Le maintien du phénotype souche y est possible en grande partie par la présence des **HIFs** : HIF1 α et HIF2 α . HIF1 α est exprimé à la fois par les GSC et les autres cellules de la tumeur alors qu'HIF2 α est sélectivement exprimé dans les GSC (Li et al., 2009). Ces facteurs de transcription, activés en cas d'hypoxie, sont impliqués dans la transcription de gènes essentiels à l'état souche (Li et al., 2009). Leur inhibition par shRNA entraîne une diminution de l'état souche tandis qu'un microenvironnement hypoxique favorise l'auto-renouvellement des GSC (Li et al., 2009). Ces HIFs, et surtout HIF2 α , régulent notamment l'expression de marqueurs souches (Oct-4, nanog et c-myc), la prolifération, l'auto-renouvellement et le métabolisme des GSC (Heddleston et al., 2009). De plus, l'hypoxie favorise la sécrétion de VEGF, l'activation de voies de signalisation (PI3K/Akt, Notch), la transcription de nombreux gènes (CXCR4, GLUT1, MAML3, NFATC2, ASPH2, ZNF217...), ainsi que des reprogrammations métaboliques (modifications du pH avec augmentation de l'acidité), tous ces effets participant également à la régulation des GSC (Codrici et al., 2016; Thomas and Yu, 2017; Turpin et al., 2015).

III.4. Niches invasives

Un troisième type de niches, encore hypothétique, concerne les zones d'invasion (**Figure 16D**). Ces niches n'ont pas été clairement définies mais il semblerait que des GSC aient été retrouvées au front invasif de la tumeur et participeraient particulièrement à l'invasion et à la récurrence tumorale, en coopérant notamment avec les cellules immunes (Lathia et al., 2011).

En résumé, l'ensemble de ces niches souligne l'importance primordiale du microenvironnement dans le maintien du statut souche et de la fonctionnalité des GSC.

IV. Propriétés principales

Les GSC ont tout d'abord été caractérisées pour leurs 4 capacités principales (i) d'**auto-renouvellement**, (ii) de **différenciation**, (iii) de **tumorigenèse** et (iv) d'**expression d'un panel de marqueurs** souches.

IV.1. Auto-renouvellement

L'auto-renouvellement des cellules souches se définit par la capacité à **se diviser de façon symétrique** pour redonner une cellule fille identique afin de maintenir cette sous-population cellulaire et toutes leurs propriétés associées (**Figure 17, partie de gauche**).

In vitro, la capacité d'auto-renouvellement s'étudie par la formation de neurosphères (NS) primaires et secondaires en condition de dilution limite, c'est-à-dire à des faibles concentrations de cellules (1 à 200 cellules). *In vivo*, la capacité d'auto-renouvellement est démontrée par la formation de tumeurs après transplantation en série.

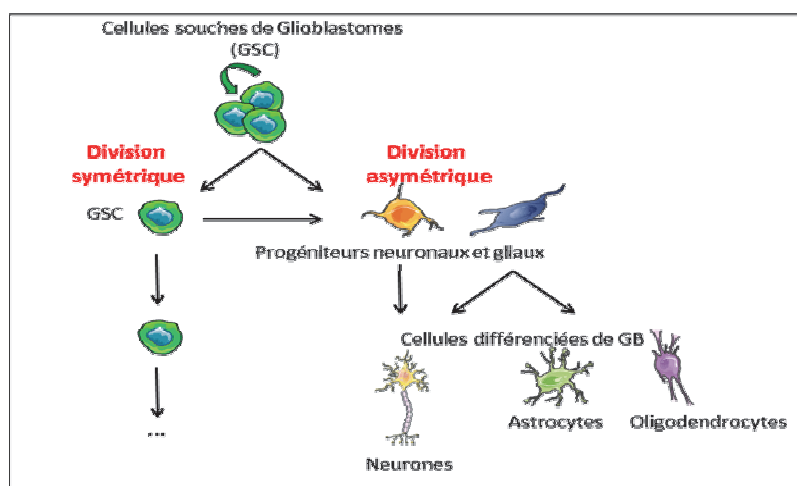


Figure 17 : Capacité d'auto-renouvellement et de différenciation des GSC. Les GSC peuvent se diviser de façon symétrique pour redonner une GSC identique ou de façon asymétrique pour donner lieu à un progéniteur plus différencié.

IV.2. Différenciation

Les cellules souches, y compris tumorales, sont **multipotentes** et ont donc également la capacité de **se diviser de façon asymétrique** en tant que progéniteurs neuronaux et gliaux qui eux même pourront donner à leur tour des cellules différenciées de types neuronales, astrocytaires et oligodendrocytaires (**Figure 17, partie de droite**). Ces cellules plus différenciées, perdent alors les propriétés des GSC décrites dans ce paragraphe IV.

IV.3. Tumorigenèse

La tumorigenèse des GSC est leur capacité à redonner une tumeur identique à la tumeur dont elles sont issues par xéno greffe orthotopique chez la souris athymique. Ainsi, un fort potentiel **tumorigène** est démontré par la formation de tumeurs après transplantation en série *in vivo*, qui sont identiques à chaque fois à la tumeur humaine initiale au niveau cellulaire et moléculaire (Gursel et al., 2011). Les cellules tumorales différenciées de GB ne sont à l'inverse pas capable, le plus souvent, de redonner une tumeur après xéno greffe orthotopique. Dans certains cas, mais à plus long terme, les cellules différenciées parviennent à reformer une tumeur qui ne présentera pas cependant les mêmes caractéristiques que la tumeur initiale.

IV.4. Expression de marqueurs

Devant l'importance majeure des GSC, des marqueurs de cette sous-population ont été recherchés afin de permettre de l'identifier, l'étudier et même la cibler. Ces marqueurs sont le plus souvent des protéines, initialement surexprimées dans les cellules présentant les caractéristiques souches, et qui tiennent fréquemment un rôle fonctionnel au sein de cette sous-population.

CD133 (Prominin-1), une glycoprotéine transmembranaire, a été le premier marqueur utilisé pour caractériser cette sous-population de cellules. Mais cette population de GSC apparaît comme fortement hétérogène et ne peut être définie par l'expression d'un seul et unique marqueur, puisque des cellules CD133 négatives possèdent aussi des caractéristiques souches (Clement et al., 2009).

Différents marqueurs **membranaires** comme **A2B5** (un ganglioside) et **CD15** (3-fucosyl-N-acetyl-lactosamine), ainsi que différents récepteurs tels que **CD44** (*lymphocyte homing receptor*), **ITGA6** (intégrine $\alpha 6$), **Notch1**, **CXCR4** (*Chemokine receptor 4*) ont alors été proposés pour essayer de mieux caractériser ces GSC (Cheng et al., 2010; Lathia et al., 2015).

Des marqueurs **intracellulaires** ont également été identifiés tels que la **Nestine**, une protéine qui constitue les filaments intermédiaires des cellules souches neurales. Différents facteurs de transcription ont aussi été identifiés : **Gli1** (*Glioblastoma family zinc finger 1*), **Nanog** (*Homeobox protein nanog*), **Sox2** (*SRY-related HMG-box gene 2*), **Olig2** (*Oligodendrocyte lineage transcription factor 2*), **c-myc**, **Oct4** ou encore **EZH2** (*Enhancer of zeste homolog 2*) (Cheng et al., 2010) (**Figure 18**). Parmi ces marqueurs intracellulaires, Nanog, Oct4 et Sox2 appartiennent au groupe des SCTF (Facteurs de Transcription des Cellules Souches), protéines primordiales à l'établissement et au maintien du statut souche.

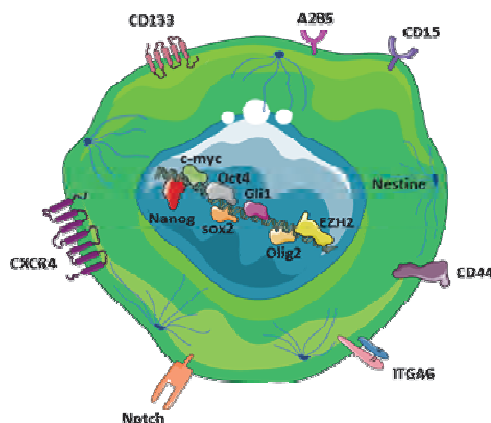


Figure 18 : Marqueurs des GSC. Les GSC expriment différents marqueurs membranaires (CD133, A2B5, CD15, CD44, ITGA6, Notch, CXCR4) et intracellulaires (Nestine, Gli1, nanog, sox2, olig2, c-myc, oct4 et EZH2).

V. Autres caractéristiques

En plus des 4 propriétés principales que nous venons de voir, les GSC possèdent également d'autres caractéristiques telles que les capacités d'invasion, d'angiogenèse, de résistance, de plasticité et d'hétérogénéité tumorale que nous allons maintenant détailler.

V.1. Migration/invasion

Comme vu précédemment dans la première partie de cette thèse, les GB sont des tumeurs hautement invasives, les cellules tumorales étant capables de migrer et d'envahir le parenchyme cérébral (cf. Partie 1 paragraphe III.4.3). Les GSC peuvent, comme les autres cellules plus différenciées, subir des changements morphologiques (polarisation, émission de pseudopodes) permettant la migration et l'invasion (**Figure 19**). Cependant les propriétés **migratoires** et **invasives** des GSC seraient supérieures à celles des autres cellules de la masse tumorale. Ainsi les GSC ont été retrouvées aux marges de la tumeur voire dans des zones du tissu cérébral sain (Lee et al., 2006; Yuan et al., 2004). Différents mécanismes ont été décrits pour expliquer ce phénotype pro-migratoire et ce fort potentiel invasif des GSC (**Figure 19**). En effet, ces cellules surexpriment des protéines pro-invasives comme certaines **métalloprotéinases** (MMP-13 (Inoue et al., 2010) et ADAM17 (Chen et al., 2013)), **intégrines** ($\alpha 6$ (Delamarre et al., 2009), $\alpha 3$ (Nakada et al., 2013) et $\alpha 7$ (Haas et al., 2017)) ou **interleukines** (IL-6 (Qiu et al., 2013) et IL-8 (Zhou et al., 2014)). De plus, dans cette sous-population des **voies de signalisation pro-invasives** sont activées telles que Akt, EphA2 (*Ephrin type-A receptor 2*), Notch, HGFR/Met, Zeb1 (*Zinc finger E-box-binding homeobox 1*) ou encore l'axe SDF-1/CXCR4 (*Chemokine receptor type 4*) (Goffart et al., 2015; Kahlert et al., 2015; Miao et al., 2015; Ortensi et al., 2013; Yu et al., 2011). Les GSC semblent donc particulièrement impliquées dans l'infiltration et la dissémination tumorale. Enfin, les GSC partagent des caractéristiques communes avec les NSC et NPC, qui ont également des hautes capacités migratoires, que ce soit au cours de l'embryogenèse pour le développement du tissu neural mais aussi dans le cerveau adulte pour assurer l'homéostasie tissulaire ou encore répondre en cas de blessure cérébrale (Barkho and Zhao, 2011).

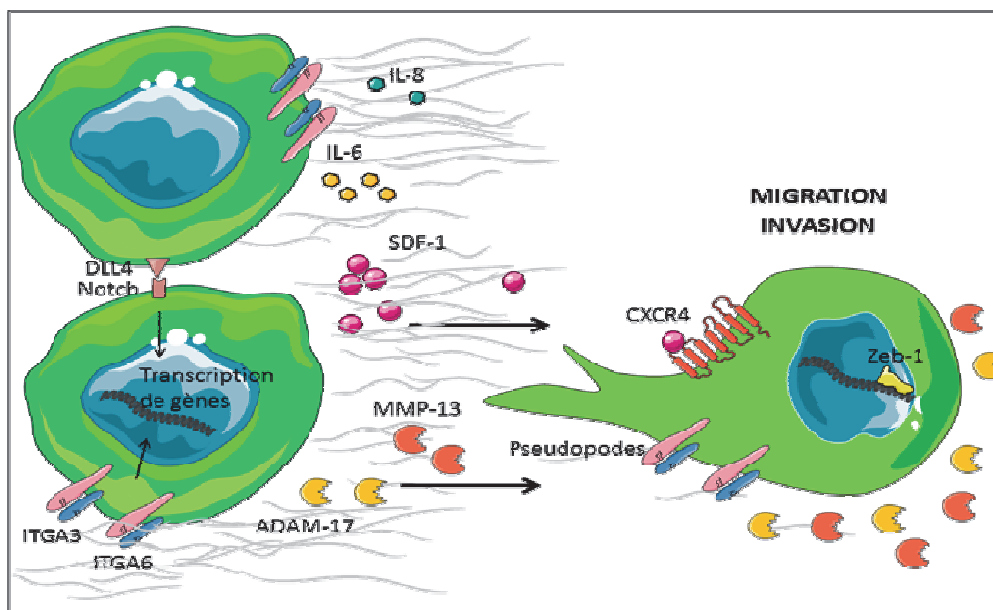


Figure 19 : Implication des GSC dans la migration et l'invasion tumorale. Les GSC expriment et sécrètent des facteurs pro-invasifs et migratoires IL-8, IL-9, MMP13, ADAM-17, ITGA3, ITGA6 et activent des voies de signalisations Dll4/Notch, SDF-1/CXCR4 qui favorisent la migration et l'invasion cellulaire. Les GSC acquièrent un phénotype pro-invasif avec notamment la formation de pseudotubes et la transcription de Zeb-1.

V.2. Angiogenèse

Nous avons vu dans cette seconde partie (paragraphe III) que les GSC sont retrouvées au niveau de niches spécifiques, dont la plus décrite est la niche périvasculaire. Là, le statut souche de ces cellules y est maintenu grâce au microenvironnement spécifique. De plus, dans ces niches, les GSC vont pouvoir participer activement à l'**angiogenèse** tumorale (**Figure 20**). Il a en effet été montré que les GSC ont une action paracrine sur les cellules endothéliales en sécrétant des facteurs pro-angiogéniques VEGF, SDF-1, HDGF (*Heparin Binding Growth Factor*) et GHRH (*Growth Hormon Releasing Hormon*) qui favorisent la migration des cellules endothéliales et la formation de tubes (Bao et al., 2006b; Wurth et al., 2014). VEGF et SDF-1, sécrétés par les GSC, peuvent en plus induire le recrutement de cellules endothéliales progénitrices au niveau de la moëlle osseuse pour favoriser la vasculogenèse (Folkins et al., 2009). D'autre part, les GSC qui expriment fortement le VEGFR2, sont capables de mimétisme vasculaire ou « vascular mimicry » et contribuent donc à la formation de la vascularisation tumorale (Yao et al., 2013). Enfin, les GSC sont capables de se transdifférencier à la fois en cellules endothéliales mais aussi en péricytes (cf. paragraphe ci-dessous), ce qui participe également à l'angiogenèse tumorale.

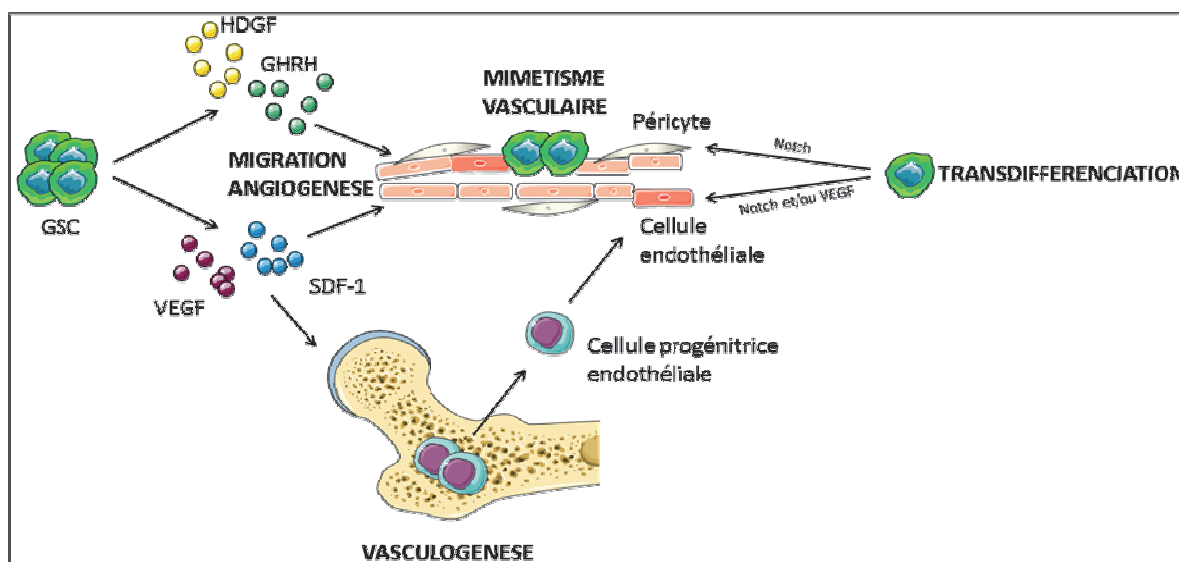


Figure 20 : Implication des GSC dans l'angiogenèse tumorale. Les GSC produisent des facteurs pro-angiogéniques (HDGF, GHRH, VEGF et SDF-1) qui favorisent la migration des cellules endothéliales et l'angiogenèse. SDF-1 et VEGF peuvent recruter des cellules endothéliales progénitrices de la moelle osseuse pour la vasculogenèse. Les GSC sont aussi capables de mimétisme vasculaire et de transdifférenciation en péricytes et cellules endothéliales. Adapté de (Jhaveri et al., 2016).

V.3. Plasticité des GSC

La plasticité cellulaire se définit par un changement phénotypique d'une cellule conduisant à l'acquisition de nouvelles caractéristiques morphologiques et fonctionnelles. C'est une véritable **reprogrammation** de la cellule, en réponse à des facteurs intrinsèques ou environnementaux qui conduit, via la modification de l'expression génique et épigénétique, à la conversion d'un type cellulaire vers un autre type de cellule. Il existe trois différents niveaux de plasticité cellulaire : la **différenciation**, la **dédifférenciation** ou encore la **transdifférenciation**.

Dans le cas des GB, ces trois types de plasticité sont possibles et détaillés ci-dessous.

V.3.1. Différenciation

Cette capacité de différenciation, déjà abordée dans le paragraphe IV.2, conduit à la génération, à partir des GSC, de cellules plus différenciées de types neurales (neurones, astrocytes, oligodendrocytes) dont les principaux marqueurs de chaque type cellulaire sont résumés dans le tableau ci-dessous (**Table 5**).

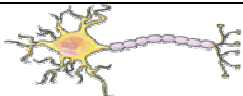


NEURONES	TUJ1/TUBB3, NeuN, MAP2	
ASTROCYTES	GFAP, GLAST, GLT1	
OLIGODENDROCYTES	O4, OMG, MAL, MBP, CNP, PLP	

Table 5 : Principaux marqueurs des cellules différenciées. MAP2 : *Microtubule-Associated Protein 2*, TUJ1 : *Neuron-specific class III beta-tubulin*, NeuN : *Neuronal nuclei antigen*, CNP : *2',3'-Cyclic Nucleotide 3' Phosphodiesterase*, PLP : *Myelin proteolipid protein*.

V.3.2. Dédifférenciation

La dédifférenciation fait référence à un retour de cellules différenciées de GB vers des stades indifférenciés c'est-à-dire à un statut s'apparentant à celui des GSC. Les cellules tumorales de GB sont en effet capables, sous l'effet de signaux spécifiques, de **se reprogrammer en GSC**. Elles acquièrent alors les différentes propriétés des GSC telles que l'expression des marqueurs souches, la capacité de formation de neurosphères et une plus forte tumorigénicité. Les inducteurs identifiés jusqu'à présent sont l'hypoxie (Heddleston et al., 2009), le HGF (Li et al., 2011), le FGF (Fessler et al., 2015), l'EGFRvIII (Kim et al., 2015), les infections virales (Fornara et al., 2016), le TMZ (Auffinger et al., 2014) et les radiations ionisantes (Dahan et al., 2014). Les mécanismes de la transdifférenciation impliquent notamment HIF1 α (Heddleston et al., 2009) et la survivine (Dahan et al., 2014). Pour plus de détails, voir l'article, présenté en **Annexe 4**, auquel j'ai participé en tant que co-auteur.

V.3.3. Transdifférenciation

Les GSC sont en plus capables de se transdifférencier en un nouveau type cellulaire. La transdifférenciation correspond à la maturation de cellules indifférenciées vers un phénotype plus différencié, qui n'appartient pas à la lignée engagée mais à une lignée tout à fait distincte. La cellule est alors convertie en un autre type cellulaire et acquiert de nouvelles fonctions.

Les GSC sont capables de se transdifférencier en **cellules endothéliales** et en **pérycites** (Bao et al., 2014; Cheng et al., 2013; Guichet et al., 2015; Ricci-Vitiani et al., 2010). Ce nouveau concept de plasticité des GSC a été proposé suite à la constatation que des cellules endothéliales et des pérycites intra-tumoraux présentaient des anomalies génétiques identiques à celles des GSC. La transdifférenciation des GSC en cellules endothéliales a été la première démontrée *in vitro* et *in vivo* (Ricci-Vitiani et al., 2010; Wang et al., 2010b). Certaines cellules générées à partir de GSC possèdent en effet des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des cellules endothéliales, c'est-à-dire qu'elles expriment des marqueurs endothéliaux (CD31, Tie2), qu'elles sont capables de former des tubes et qu'elles captent les lipoprotéines de faibles densités (LDL) (Ricci-Vitiani et al., 2010; Wang et al., 2010b). Les mécanismes mis en jeu dans ce processus sont en cours d'analyse mais les voies de signalisation de Notch et du VEGF ont d'ores et déjà été incriminées (**Figure 20**) (Wang et

al., 2010b). La transdifférenciation des GSC en péricytes a également été démontrée *in vitro* et *in vivo* avec l'acquisition de marqueurs péricytaire (α -SMA (*alpha smooth muscle actin*), NG2 et PDGFR) et impliquerait à nouveau la voie Notch (Cheng et al., 2013; Guichet et al., 2015).

Il y a donc une très forte plasticité des GSC. Tous ces phénomènes peuvent se produire simultanément et sont en plus réversibles. Cette capacité d'interconversion est dirigée par des régulations génétiques, épigénétiques et microenvironnementales et participe à la croissance de la tumeur, à son hétérogénéité et surtout à sa résistance, deux sujets que nous allons détailler par la suite.

V.4. Hétérogénéité des GSC

L'hétérogénéité des GSC ajoute un niveau de variabilité supplémentaire à cette sous-population cellulaire déjà très complexe. Cette hétérogénéité est inter- et intra-individuelle à nouveau. Des patients distincts présenteront des profils de GSC différents (marqueurs différents et propriétés plus ou moins marquées) et un même patient peut également présenter différentes population de GSC. Une étude de 2009 a ainsi démontré qu'au sein d'une même tumeur, différents pools de GSC pouvaient coexister (Piccirillo et al., 2009). Cette hétérogénéité est particulièrement détaillée dans notre revue (Malric et al., 2017) présentée en **Annexe 3**.

V.5. Résistance des GSC

Nous avons vu dans la première partie de cette thèse que les cellules de GB étaient chimio et radiorésistantes (cf. Partie 1 paragraphe VII). Cependant, les GSC, dans lesquelles on retrouve les mécanismes de résistance classiquement mis en jeu dans les GB, **résistent** particulièrement et plus fortement encore aux différents traitements. Grâce notamment à leurs différentes propriétés que nous venons de détailler (tumorigènes, migratoires, invasives, et angiogéniques) et leur fort potentiel de plasticité, les GSC sont capables de survivre aux différents traitements pour finalement favoriser l'apparition de tumeurs secondaires localement ou à distance.

V.5.1. Chimiorésistance

Les GSC possèdent une forte chimiorésistance **intrinsèque** mais aussi de grandes **capacités adaptatives** en réponse à la chimiothérapie.

D'une part, nous avons vu que les cellules de GB pouvaient favoriser l'expression de la **MGMT** afin de diminuer les lésions induites par le Témzolomide (cf. Partie 1 paragraphe VIII.1). De façon intéressante, il a été montré que les GSC exprimaient des niveaux d'expression particulièrement élevés pour cette enzyme (Liu et al., 2006).

De plus, les GSC, comme les cellules tumorales plus différenciées, activent des **voies de signalisation pro-survie**. Dans le cas des GSC, les voies Notch et Hedgehog, qui sont de voies soutenant l'état souche des GSC, participent au phénotype chimiorésistant et l'inhibition simultanée de ces 2 voies permet d'augmenter la sensibilité au Témzolomide (Ulasov et al., 2011). A l'inverse, les GSC répriment des voies de mort cellulaire via la surexpression de gènes anti-apoptotiques codant pour Bcl-2, Bcl-xL (*B-cell lymphoma extra large protein*), FLIP (Cellular FLICE-like inhibitory protein) et des protéines de la famille des IAP (Protéines inhibitrices de l'apoptose, comme par exemple la survivine) (Liu et al., 2006). A noter, l'**autophagie** participe également à la chimiorésistance des GSC (Bischof et al., 2017).

Un autre mécanisme intrinsèque de chimiorésistance des GSC est la surexpression à leur surface des **ABC transporteurs** (*ATP binding cassette*) comme la P-gp/ABCB1, ABCG2/BRCP1, ABCC1 et ABCA3 (de Vries et al., 2012; Hirschmann-Jax et al., 2004; Liu et al., 2006). Ces protéines sont des pompes ATPases pour lesquelles l'hydrolyse de l'ATP fournit l'énergie nécessaire à l'expulsion par transport actif de substrats spécifiques. Dans les GSC, ces protéines d'efflux participent à la chimiorésistance en entraînant un efflux accru des molécules thérapeutiques telles que le Témazolomide, l'étoposide, le topotécan et l'erlotinib. Très récemment, il a été mis en évidence que ABCG2 participait activement au maintien de l'état souche des GSC (Wee et al., 2016). D'autres mécanismes d'élimination des molécules thérapeutiques par les cellules tumorales ont été décrits comme leur accumulation dans des microvésicules permettant leur séquestration ou dégradation, la modification de la cible cellulaire ou la compensation par une autre voie similaire, ou encore l'inactivation de la molécule par augmentation de sa métabolisation.

Enfin, les GSC sont en général en état de **quiescence** et restent en phase stationnaire G0 du cycle cellulaire. Ceci participe également à leur chimiorésistance, la plupart des chimiothérapies ciblant les cellules en prolifération pour aboutir à des lésions de l'ADN et déclencher l'apoptose.

D'autre part, les GSC sont associées à des hautes capacités **migratoires et invasives** qui sont d'autres processus d'échappement à la chimiothérapie et qui seront développés dans la partie 3 sur les intégrines.

V.5.2. Radiorésistance

Bao *et al* ont été parmi les premiers à démontrer la radiorésistance des GSC (Bao et al., 2006a). Cette équipe a en effet mis en évidence que la fraction des GSC CD133+ est retrouvée après irradiation des cellules de GB, et est même enrichie au sein des cultures irradiées. De plus, ces cellules conservent leurs capacité de différenciation *in vitro* et de tumorigénécité *in vivo* (Bao et al., 2006a). Ils expliquent cet effet par une **meilleure détection, activation et efficacité des systèmes de réparation des GSC**. En effet, elles activent préférentiellement les points de contrôle des lésions de l'ADN via la phosphorylation activatrice de ATM (*Ataxia Telangetasia Mutated*, kinase spécialisée dans la détection des cassures doubles brins), Rad17, Chk1 et Chk2 (kinases des points de contrôle du cycle cellulaire). L'activation de ces protéines favorise un arrêt du cycle cellulaire permettant la réparation des lésions induites par les radiations ionisantes, notamment les cassures doubles brins, pour ainsi échapper à la mort cellulaire radio-induite. Un peu plus tard, une autre équipe a démontré que la réparation des GSC reposait plus sur la recombinaison homologue que sur la NHEJ (recombinaison non homologue), via Rad51 et BRCA1 (*Breast cancer 1*) (Lim et al., 2012). Les GSC réparent également mieux les cassures simples brins, grâce à la surexpression de la poly-ADP-ribose polymérase (PARP) (Venere et al., 2013).

Par la suite, des mécanismes autres que la réparation ont été mis en évidence. Les GSC activent des **voies de signalisation** essentielles à la maintenance de leur état multipotent mais également impliquées dans la radiorésistance comme Akt, Notch, Hedgehog, STAT3/Foxm1, Wnt/ β cat, BMI-1, L1CAM ou encore PTEN (Cheng et al., 2010; Maachani et al., 2016; Wang et al., 2010a). Enfin, les voies de signalisation pro-survie ont également été montrées plus activées dans les GSC (EGFR, MAPK, PI3K/Akt/mTOR, NF- κ B, TGF- β , JNK, PKC et MET) (Rycaj and Tang, 2014), ce qui contribue à leur radiorésistance.

La plasticité majeure des GSC et leur dédifférenciation consécutive à l'irradiation participe également à la survie de cette population tumorale (Dahan et al., 2014)

A nouveau, la prolifération plus lente des GSC, due à leur état de quiescence, de même que les processus autophagiques, en favorisant la survie des GSC (Lomonaco et al., 2009), constituent d'autres causes de radiorésistance.

Par ailleurs, un autre facteur important pour la radio-résistance des GSC est le **microenvironnement tumoral**. En effet, il a été mis en évidence une diminution des effets des irradiations (diminution des lésions de l'ADN associée à une augmentation de la réparation) dans les cellules CD133+ *in vivo* par rapport à ces mêmes cellules irradiées *in vitro*, ce qui suggère une meilleure réparation de l'ADN en présence de facteurs environnementaux (Jamal et al., 2010). Ainsi, les niches vasculaires et hypoxiques décrites précédemment participent activement à la radio-résistance des GSC.

Tout d'abord, il a été montré un rôle radioprotecteur des **cellules endothéliales** sur les GSC. L'apoptose des cellules endothéliales en réponse à l'irradiation peut conditionner la réponse tumorale. En effet, les GSC survivent davantage après irradiation lorsqu'elles sont cultivées en association avec des cellules endothéliales (Brown et al., 2004; Calabrese et al., 2007). De plus, la croissance tumorale est considérablement accélérée dans un modèle murin où l'apoptose endothéliale est génétiquement inhibée par déplétion de l'ASMase (*Acid sphingomyelinase*) (Garcia-Barros et al., 2003). Par ailleurs, les cellules endothéliales produisent du monoxyde d'azote (NO) qui augmente la radio-résistance des GSC à proximité (Charles et al., 2010).

L'**hypoxie** tumorale, niche privilégiée des GSC, est un autre acteur majeur de résistance à la radiothérapie. En absence d'oxygène, les ROS sont moins synthétisés et en conséquence les niveaux de dommage à l'ADN sont réduits. De plus, les cellules tumorales en hypoxie induisent, via les HIFs, la transcription de gènes impliqués dans la survie cellulaire (cf. Partie 1, paragraphe III.4.1). Il existe cependant une réponse différentielle à l'hypoxie entre les GSC et les autres cellules tumorales. Les GSC expriment, en effet, de hauts niveaux de HIF-2 α et régulent la transcription de gènes spécifiques (Li et al., 2009).

Enfin, le microenvironnement renferme de nombreux **composants de la MEC** qui influencent la survie et la radio-résistance des GSC. Une revue récente décrit trois mécanismes impliqués : la MEC (i) sert de recueil de protéines qui modulent la résistance aux irradiations (heparane sulfate qui lie bFGF), (ii) permet l'activation d'intégrines dont la cascade de signalisation aboutit à la radio-résistance (β 1, α β 3, α β 5) et (iii) crée une niche plus favorable à la prolifération et survie des cellules (Tenascin C majoritairement, SPARC et TSP1) (Mannino and Chalmers, 2011).

V.5.3. Autres résistances

En plus de la forte chimio/radio-résistance des GSC, il faut mentionner leur effet délétère vis-à-vis du système immunitaire. Ces cellules peuvent faciliter l'**échappement** envers le SI et l'**immunosuppression**. Il a d'abord été mis en évidence un rôle des GSC dans l'immunité adaptative. L'équipe de Pellegatta démontre en effet une diminution de la réponse immunitaire médiée par les cellules dendritiques lorsque les cellules sont sous forme de neurosphères enrichies en GSC (Pellegatta et al., 2006). L'équipe de Di Tomaso a ensuite réalisé une caractérisation immunobiologique de différentes lignées de GSC, par rapport à leurs homologues différenciées, et mis en évidence une plus faible immunogénicité et une plus forte activité immunosuppressive en faveur des GSC (Di Tomaso et al., 2010). Une autre étude de 2010 a montré que la voie STAT3 activée dans les GSC contribuait à l'évasion immunitaire, en inhibant l'activation et la prolifération des lymphocytes T et en favorisant leur apoptose ainsi que l'induction de lymphocytes T régulateurs (Wei et al., 2010). Six mois plus tard, la même équipe a démontré que les GSC, toujours via STAT3, modulent les macrophages de la microglie en induisant un phénotype immunosuppresseur de type M2 dans ces cellules (Wu et al., 2010). Ces résultats permettent de conclure que les GSC ont un effet inhibiteur à la fois sur l'immunité innée et adaptative. Actuellement, des essais pré-cliniques et cliniques sont en cours pour évaluer si l'injection de cellules dendritiques chargées notamment avec des GSC pourrait avoir un bénéfice pour les patients atteints de GB, en ciblant les GSC (Finocchiaro and Pellegatta, 2016).

Les GSC, en échappant ainsi aux mécanismes de contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire, permettraient le développement des gliomes malins, **contribueraient fortement à la résistance aux thérapies actuelles et favoriseraient la récurrence de la pathologie (Figure 21)**. Les stratégies de recherche actuelles consistent donc à déterminer les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu dans le maintien, l'expansion et la résistance aux traitements de ces GSC afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et permettre, à terme, d'établir de nouvelles thérapies visant à la fois les cellules tumorales différenciées et souches. Parmi les nouvelles thérapies ciblées à l'étude actuellement, les intégrines font particulièrement l'objet de nombreuses recherches et la suite de cette thèse leur est consacrée.

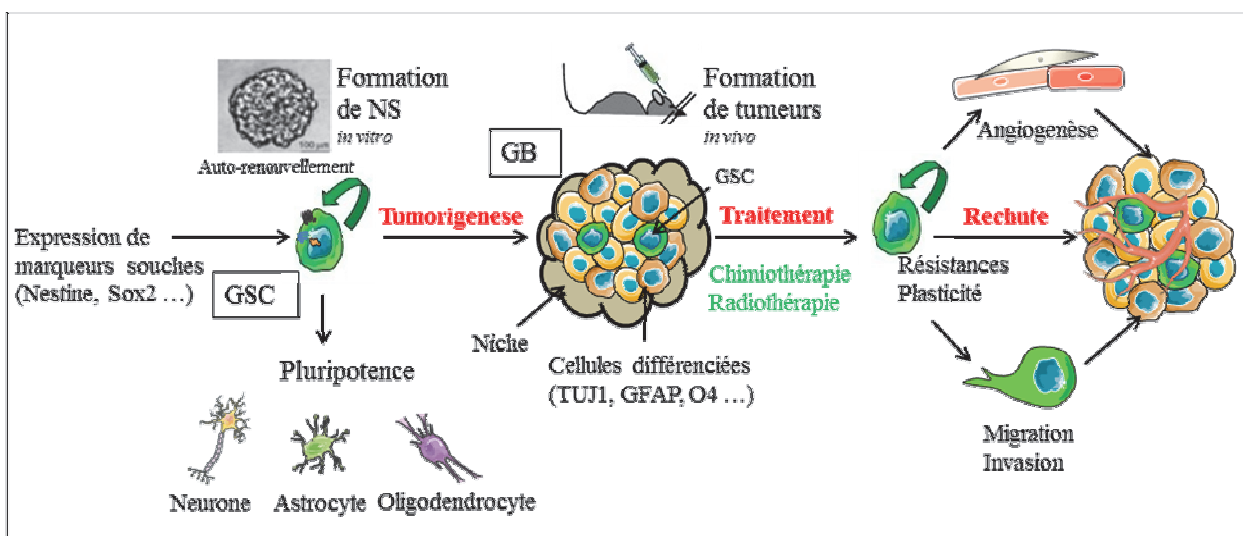


Figure 21 : Bilan partie 2 : Les GSC. Les GSC sont caractérisées par leur capacité d'auto-renouvellement et de différenciation, d'expression de marqueurs spécifiques et de tumorigenèse. Ces cellules résistent aux différents traitements et favorisent la récurrence tumorale.

PARTIE 3 : Les Intégrines

I. Définition et généralités

Les intégrines sont des protéines appartenant à la grande **famille des récepteurs d'adhérence cellulaire**, avec les cadhérines, les immunoglobulines et les sélectines. Toutes ces molécules permettent l'interaction des cellules entre elles et/ou avec la matrice extracellulaire. Parmi ces récepteurs, les intégrines jouent un rôle primordial dans de nombreux processus cellulaires physiologiques mais peuvent également être impliquées dans certaines pathologies (Hynes, 2002).

Les intégrines sont des **glycoprotéines transmembranaires** exprimées à la surface de la plupart des cellules eucaryotes. En effet, ces protéines sont très conservées au cours de l'évolution et retrouvées exprimées chez les mammifères (Homme, souris...) mais aussi le poisson zèbre (*Zebrafish*), en passant par la drosophile (*Drosophila melanogaster*) et le ver (*Caenorhabditis elegans*). Toutefois, leur nombre varie en fonction des espèces (Takada et al., 2007).

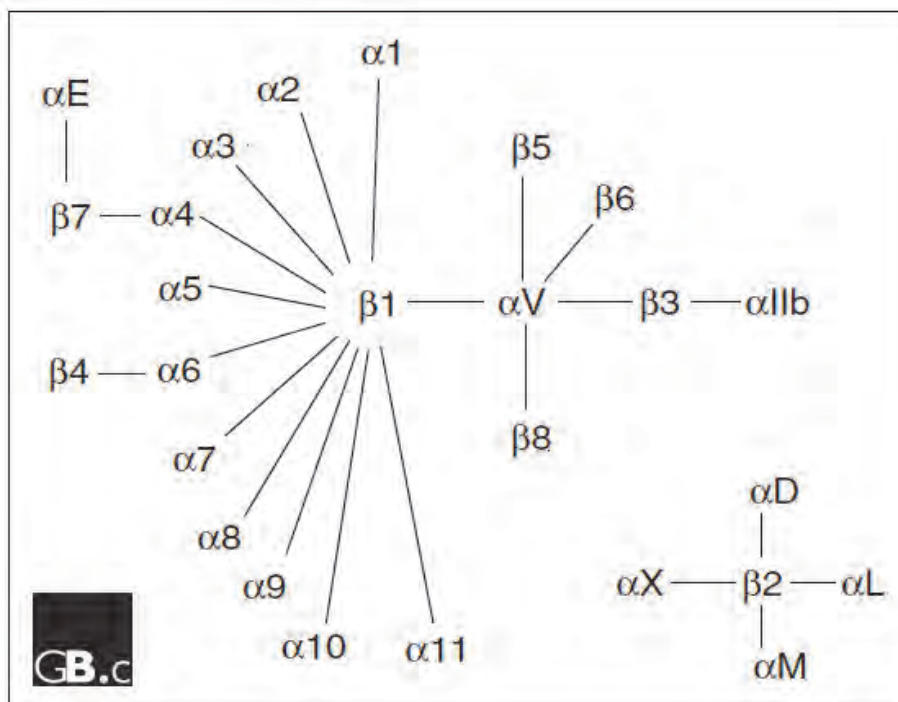


Figure 22 : Membres de la superfamille des intégrines chez l'Homme et nature des 24 hétérodimères rencontrés (Takada et al., 2007).

Les intégrines sont des **hétérodimères** (>1600 acides aminés) toujours constitués chez l'homme d'une chaîne α (120 à 180kDa, ~1100 acides aminés) associée de façon non covalente à une chaîne β (90 à 110kDa, ~800 acides aminés). Il est connu à ce jour 24 hétérodimères différents chez l'Homme, formés à partir de 18 sous-unités α et 8 sous-unités β (**Figure 22**) (**Table 6**) (Takada et al., 2007). C'est l'association $\alpha\beta$ qui détermine la spécificité de l'intégrine pour son substrat.

NOM GENE	NOM PROTEINE	SYNONYMES	NUMERO DU GENE	LOCALISATION CHROMOSOMIQUE	NUMERO DE LA PROTEINE
ITGA1	$\alpha 1$	CD49a	NM_181501	5q11.2	P56199
ITGA2	$\alpha 2$	CD49b, VLA-2	NM_002203	5q23-q31	P17301
ITGA2B	αIIb	GTA, CD41, GP2B, HPA3, CD41b, GPIIb	NM_000419	17q21.32	P08514
ITGA3	$\alpha 3$	CD49c, VLA-3	NM_002204 NM_005501	17q21.33	P26006
ITGA4	$\alpha 4$	CD49d, VLA-4	NM_000885	2q31.3	AAB25486
ITGA5	$\alpha 5$	CD49e, fibronectin receptor alpha	NM_002205	12q11-q13	P08648
ITGA6	$\alpha 6$	CD49f, ITGA6B	NM_000210	2q31.1	P23229
ITGA7	$\alpha 7$		NM_002206	12q13	Q86W93
ITGA8	$\alpha 8$		NM_003638	10p13	P53708
ITGA9	$\alpha 9$		NM_002207	3p21.3	Q13797
ITGA10	$\alpha 10$		NM_003637	1q21	O75578
ITGA11	$\alpha 11$		NM_001004439 NM_012211	15q23	Q9UKX5
ITGAD	αD		NM_005353	16p11.2	Q13349
ITGAE	αE	CD103	NM_002208	17p13	P38570
ITGAL	αL	CD11a, LFA-I	NM_002209	16p11.2	P20701
ITGAM	αM	Mac-1, CD11b, CR3	NM000632 J03925	16p11.2	P11215
ITGAV	αV	CD51, MSK8, VNR α	NM_002210	2q31-q32	P06756
ITGAX	αX	CD11c, CR4	NM_000887	16p11.2	P20702
ITGB1	$\beta 1$	CD29, MDF2, MSK12	BC020057	10p11.2	P05556
ITGB2	$\beta 2$	CD18, CR3, CR4	NM_000211	21q22.3	P05107
ITGB3	$\beta 3$	CD61, GP3A, GPIIIa	NM_000212	17q21.32	P05106
ITGB4	$\beta 4$	CD104	NM_000213	17q25	P16144
ITGB5	$\beta 5$		NM_002213	3q21.2	P18084
ITGB6	$\beta 6$		NM_000888	2q24.2	P18564
ITGB7	$\beta 7$		NM_000889	12q13.13	P26010
ITGB8	$\beta 8$		NM_002214	7p15.3	P26012

Table 6 : Les différentes sous-unités d'intégrines chez l'Homme (Takada et al., 2007).

De plus, il existe des formes alternatives pour certaines sous-unités (α_2 , α_5 , α_6 , α_7 , β_1 , β_3 , ...) du fait d'un épissage alternatif de leur ARNm (Goel et al., 2014). Tout ceci participe à une **diversité combinatoire** importante de ces protéines dont l'assemblage permet un grand nombre potentiel de récepteurs différents.

A l'interface entre la **partie intracellulaire** et la **MEC** où elles sont capables d'interagir avec des protéines de la matrice, des protéines du cytosquelette mais aussi avec certains ligands, les intégrines sont à la fois des **molécules d'adhérence** et de **signalisation cellulaire** (Hynes, 2002). Elles peuvent ainsi activer différents mécanismes d'adhérence, migration et invasion mais aussi diverses voies de signalisation intracellulaire. Les intégrines assurent donc un **transfert bidirectionnel d'informations** entre les cellules et leur environnement.

II. Structure

Les intégrines sont des molécules **hétérodimériques** composées de 2 sous-unités, elles-mêmes formées par différentes parties et domaines (**Figure 23**). Les études par microscopie électronique et par cristallographie ont montré que les intégrines sont composées d'une « tête » globulaire en extracellulaire et de deux « queues » ou « pattes » linéaires intracellulaires. La tête est constituée d'une région contenant la poche de liaison du ligand et mettant en jeu des résidus des deux sous-unités (Humphries, 2000; Takada et al., 2007).

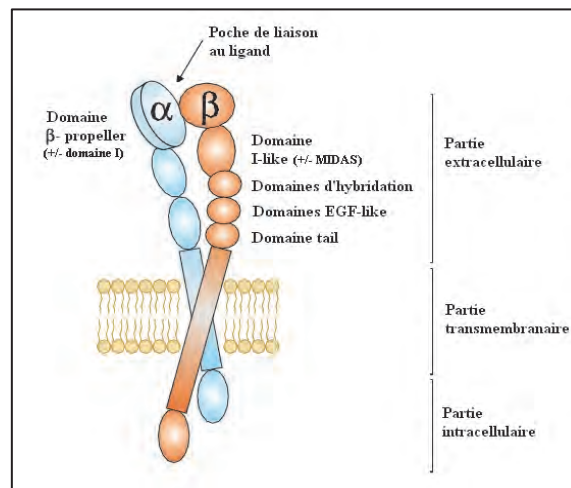


Figure 23 : Représentation schématique de la structure des intégrines (Mas-Moruno et al., 2011).

La **partie extracellulaire** constitue la majorité de la protéine (700 à 1200 acides aminés) (**Figure 23**) et détermine la **spécificité** du ligand, qui dépend plus particulièrement de la partie N-terminale des sous-unités α et β . De plus, selon l'état d'activation de l'intégrine, cette partie extracellulaire peut exister sous une conformation repliée/courbée (inactive) ou dépliée (active) (Mas-Moruno et al., 2011).

La **partie transmembranaire** est formée d'une courte section (20 à 30 acides aminés) permettant l'ancrage de la protéine dans la membrane plasmique (**Figure 23**). Il n'est pas connu d'autre rôle à notre connaissance.

La **partie intracellulaire** est également très courte (moins de 75 acides aminés, à l'exception de β_4 qui comprend près de 1000 acides aminés) (**Figure 23**). Elle permet la reconnaissance et la liaison avec diverses protéines cytosoliques adaptatrices ou des composants du cytosquelette, en particulier la paxilline au niveau de la chaîne α et la taline au niveau de la chaîne β (Humphries, 2000) (cf. Partie 3, paragraphe V).

II.1. Sous-unité alpha

La sous-unité α (environ 1100 acides aminés au total) comprend au niveau N-terminal un domaine β -*propeller* (propulseur) formé de 7 séquences répétées (environ 60 acides aminés chacune) en hélices β avec, au niveau de la surface intérieure, des sites de liaison à des cations divalents (MIDAS, *Metal ion-dependent adhesion site* ; ADMIDAS, *adjacent MIDAS* ou SyMBS, *synergistic metal ion-dependent binding site*). Ces 3 sites peuvent lier des cations tels que le Calcium (Ca^{2+}) pour induire dans la plupart des cas l'inactivation de l'intégrine ou bien le Magnésium (Mg^{2+}) ou le Manganèse (Mn^{2+}) pour au contraire induire son activation. En effet, les cations en se liant à ces sites de liaison, coordonnent la liaison des ligands des intégrines en interagissant avec le groupe carboxyl des ligands. Les ions Mg^{2+} se lient préférentiellement à la séquence MIDAS, tandis que les ions Ca^{2+} ont une plus forte affinité pour les séquences ADMIDAS et SyMBS (Hu and Luo, 2017).

Pour certaines intégrines ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 10$, $\alpha 11$, αE , αL , αM , αD) le domaine β -*propeller* peut être associé à un domaine α -I (aussi nommé α -A) (200 acides aminés), homologue au domaine A du facteur von Willebrand (vWF), qui module la liaison de ligands spécifiques (Takada et al., 2007). De plus, ce domaine α -I (ou α -A) peut contenir une séquence MIDAS. Lorsqu'il est présent, le domaine α -I constitue le site de liaison extracellulaire exclusif du ligand. Les autres sous-unités α ne possédant pas le domaine α -I (ou α -A) sont clivées (à l'exception d' $\alpha 4$) et alors constituées de deux chaînes reliées entre elles par des ponts disulfures. Le reste de la partie extracellulaire de la sous-unité est formé d'une région linéaire constituée de 3 feuillets β . La partie intracellulaire de la sous-unité α est très variable, excepté un motif GFFKR au niveau de la région transmembranaire qui est conservé entre les différentes sous-unités α . Cette sous-unité interagit de façon spécifique avec certains ligands intracellulaires (Calréticuline, *calcium- integrin binding protein* (CIB) et calvéoline) (Takada et al., 2007).

II.2. Sous-unité beta

La sous-unité β quant à elle est plus petite que la sous-unité α (environ 800 acides aminés). Elle se compose en N-terminal d'un domaine β -I-*like* (ou β -A-*like*). Ce domaine β -I-*like* présente la même conformation que le domaine I de la sous-unité α et peut être associé à une séquence MIDAS, impliquée dans la stabilisation de la liaison avec le ligand (Humphries, 2000). De plus, ce domaine interagit avec la structure en hélice de la sous-unité α . Le reste de la partie extracellulaire de la sous-unité β est riche en cystéines très conservées (56 pour la majorité des sous-unités β , à l'exception de $\beta 4$, $\beta 6$ et $\beta 8$) et est constituée de domaines d'hybridation et *EGF-like* ainsi que d'un domaine *tail*. La queue cytoplasmique de la sous-unité β est mieux conservée et est capable de lier un plus grand nombre de protéines cytoplasmiques (taline, kindline). En effet, elle contient des motifs spécifiques (NpxY, NxxY où x correspond à n'importe quel acide aminé) qui représentent les séquences de reconnaissance des domaines de liaison phosphotyrosine (domaines PTB) de nombreuses protéines intracellulaires (Hynes, 2002; Takada et al., 2007).

II.3. Relation structure fonction

Bien que la structure des sous-unités α et β soit différente, leurs domaines extracellulaires sont complémentaires et déterminent la spécificité du ligand. C'est plus précisément le domaine β -*propeller* de la sous-unité α et le domaine β -I-*like* de la sous-unité β qui permettraient particulièrement la liaison du ligand et sa spécificité (Humphries, 2000).

La structure des intégrines est très flexible et dynamique afin de réguler les différentes fonctions cellulaires, via des changements de conformation. Ainsi, les intégrines peuvent

adopter deux conformations majeures : **inactive** (« fermée et recourbée ou penchée », de faible affinité avec le substrat) ou **active** (« ouverte et déployée », de haute affinité). La forme inactive est majoritairement retrouvée en conditions physiologiques. Les intégrines en conformation inactive sont caractérisées par l'interaction des domaines transmembranaires et cytoplasmiques de leur deux sous-unités α et β , empêchant la liaison de toute protéine côté intracellulaire. La séparation des segments transmembranaires et cytoplasmiques est en partie bloquée par un pont salin formé entre les deux sous-unités. L'activation et le dépliage des intégrines peuvent se faire par liaison d'un ligand extracellulaire ou cytoplasmique, qui va entraîner la rupture du pont salin pour favoriser la conformation active, de haute affinité. L'intégrine va alors « s'étendre ou s'allonger », par le pivotement des domaines d'hybridation de la sous-unité β , qui permet d'abaisser les hélices du domaine β -I-like et induire finalement l'ouverture du site de liaison au ligand (Hu and Luo, 2017; Hynes, 2002; Luo et al., 2007).

II.4. Diversité

Chaque intégrine varie par la **taille et la nature** de ses 2 sous-unités et par leur **spécificité de liaison**. A partir des 18 sous-unités α et des 8 sous-unités β , 24 hétérodimères sont actuellement connus (**Figure 22**), tous distincts, chacun semblant avoir un rôle spécifique. La combinaison des 2 chaînes s'effectue dans le réticulum endoplasmique. Habituellement il existe un excès intracellulaire de sous-unité β et c'est la quantité de sous-unité α qui détermine la quantité de récepteurs à la surface. Des sous-unités libres au niveau de la membrane plasmique ne seraient pas observées (Barczyk et al., 2010). Cependant, cette liste de 24 intégrines n'est pas exhaustive et d'autres hétérodimères pourraient être découverts. De plus, il pourrait exister des phénomènes de compensation entre certaines sous-unités qui pourraient prendre le relais si l'une se retrouvait mutée. Il existe également un épissage alternatif des ARNm de ces différentes sous-unités qui augmente encore le nombre potentiel de ces récepteurs. Par exemple, $\beta 1$ possède 4 variants d'épissage et $\alpha 6$ en a au moins 2. Ces variants peuvent avoir des fonctions identiques ou opposées. Enfin, les intégrines peuvent subir des modifications post-traductionnelles qui sont principalement des N- et des O-glycosylations, pouvant réguler leurs stabilité, conformation et activité (Gu et al., 2012; Zhang and Ten Hagen, 2011).

III. Ligands

Certaines intégrines peuvent avoir un ligand unique ($\alpha 1 \beta 1$ et collagène, par exemple), tandis que d'autres peuvent fixer des ligands divers intra et/ou extracellulaires ($\alpha \nu \beta 3$). De plus, un même ligand peut se lier à plusieurs intégrines différentes. La spécificité de la liaison des intégrines à leur(s) ligand(s) résulte donc de l'accessibilité de ces substrats, de l'expression différentielle des différentes intégrines, de la conformation de ces dernières (**affinité**) et de leur nombre ainsi que de leur agrégation ou « *clustering* » à la membrane (**avidité**).

III.1. Ligands extracellulaires

Côté extracellulaire, les intégrines peuvent lier des ligands variés (**Table 7**) de la matrice extracellulaire, mais aussi des protéines plasmatiques solubles (facteurs de croissance, cytokines, protéases) ou situées à la surface de certaines cellules (récepteurs divers, immunoglobulines), voire encore certains micro-organismes, toxines ou pathogènes (Hynes, 2002; Takada et al., 2007).

INTEGRINE	LIGANDS EXTRACELLULAIRES
$\alpha 1\beta 1$	Laminine, collagène
$\alpha 2\beta 1$	Laminine, collagène, TSP, E-cadhérine, tenascine, chondroadherine, MMP-1
$\alpha 3\beta 1$	Laminine, collagène, TSP1, fibrilline, fibronectine, uPAR, tétraspanine CD151, Reeline
$\alpha 4\beta 1$	TSP, fibronectine, ostéopontine, ADAMs, ICAM-4, MAdCAM-1, VCAM-1
$\alpha 5\beta 1$	Fibronectine, ostéopontine, fibrilline, TSP, tTG, endostatine, ADAMs(-15-17), COMP, LI
$\alpha 6\beta 1$	Laminine, TSP, Cyr61, ADAMs(-2-9)
$\alpha 7\beta 1$	Laminine, fibronectine
$\alpha 8\beta 1$	Tenascine, fibronectine, ostéopontine, vitronectine, néphronectine, LAP-TGFβ
$\alpha 9\beta 1$	Tenascine, ostéopontine, uPAR, plasmine, collagène, laminine, tTG, angiostatine, EGF(-C-D), ADAM1, VCAM1
$\alpha 10\beta 1$	Laminine, collagène
$\alpha 11\beta 1$	Collagène
$\alpha v\beta 1$	Fibronectine, vitronectine, ostéopontine, LAP-TGFβ, LI
$\alpha L\beta 2$	ICAM(-1-4-5)
$\alpha M\beta 2$	Fibrinogène, héparine, iC3b, Factor X, ICAM-1-4, VCAM-1
$\alpha X\beta 2$	Fibrinogène, héparine, collagène, iC3b, ICAM-4
$\alpha D\beta 2$	Fibrinogène, fibronectine, vitronectine, plasminogène, Cyr61, ICAM-3, VCAM-1
$\alpha IIb\beta 3$	Fibrinogène, TSP, fibronectine, vitronectine, vWF, Cyr61, prothrombine, ICAM-4, LI, CD40L
$\alpha v\beta 3$	Fibrinogène, fibronectine, vitronectine, vWF, TSP, fibrilline, tenascine, ostéopontine, BSP, plasmine, cardiotoxine, MFG-8, COMP, uPA, uPAR, DEL-1, Cyr61, MMP2, FGF-2, angiostatine, endostatine, PECAM-1, ADAM(-15-23), ICAM-4, CD31, LI
$\alpha 6\beta 4$	Laminine, tétraspanine CD151
$\alpha v\beta 5$	Ostéopontine, BSP, vitronectine, fibronectine, CCN3, Cyr61, endostatine, LAP-TGFβ
$\alpha v\beta 6$	Fibronectine, vitronectine, tenascine, ostéopontine, LAP-TGFβ, ADAM
$\alpha 4\beta 7$	Fibronectine, ostéopontine, MAdCAM-1, VCAM-1
$\alpha E\beta 7$	E-cadhérine, MAdCAM-1
$\alpha v\beta 8$	Fibronectine, vitronectine, collagène, laminine, LAP-TGFβ

Table 7 : Principaux ligands extracellulaires des différentes intégrines. Les ligands inscrits en noir correspondent à des ligands de la MEC, **ceux en violet à des ligands solubles** et **ceux en orange à des interactions cellulaires-cellules**. (ADAM : A Disintegrin and metalloprotease, BSP : Bone Sialic Protein / Sialoprotéine osseuse, CCN3 : An extracellular matrix protein, COMP : Cartilage oligomeric matrix protein, Cyr61 : Cysteine-rich protein 61, iC3b : Inactivated complement component 3, MAdCAM-1 : Mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1, PECAM-1 : Platelet and endothelial cell adhesion molecule 1, tTG : tissue transglutaminase, TSP : Thrombospondine, uPA : Urokinase plasminogen activator, uPAR : Urokinase plasminogen activator receptor. Adapté de (Takada et al., 2007; van der Flier and Sonnenberg, 2001).

Trois principaux types de ligands ont cependant permis de regrouper les intégrines en autant de classes (Humphries et al., 2006). Tout d'abord, la première classe correspond aux intégrines liant le **collagène**, telles que $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$ et $\alpha 6\beta 4$. Toutes ces intégrines possèdent une insertion du domaine α -I (ou α -A) dans leur structure. Ensuite, les intégrines $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 10\beta 1$, et $\alpha 11\beta 1$ appartiennent à une seconde classe qui se fixe à **la laminine**. Enfin, la dernière classe comprend les intégrines $\alpha 5\beta 1$, $\alpha V\beta 1$, $\alpha V\beta 3$, $\alpha V\beta 5$, $\alpha V\beta 6$, $\alpha V\beta 8$ et $\alpha IIb\beta 3$ reconnaissant **la séquence RGD : Arginine - Glycine - Acide aspartique** (Arg - Gly - Asp) présente notamment sur la fibronectine, la vitronectine et le fibrinogène. Une classe supplémentaire regroupe les intégrines qui interagissent directement avec un type cellulaire : **les leucocytes**, par liaison à un CAM (*Cellular Adhesion Molecule*) (Vascular-CAM (V-CAM), Intracellular-CAM (I-CAM), Leucocyte-CAM (L-CAM)), comme $\alpha L\beta 2$, $\alpha M\beta 2$, $\alpha X\beta 2$ et $\alpha D\beta 2$. En reconnaissant ainsi des récepteurs de la superfamille des immunoglobulines, elles vont permettre l'adhérence intercellulaire, en particulier avec des cellules de l'immunité.

D'autres intégrines peuvent reconnaître des séquences peptidiques différentes comme EILDV (Glu - Ile - Leu - Asp - Val) ($\alpha 4\beta 1$), KQAGDV (Lys - Gln - Ala - Gly - Asp - Val) ($\alpha 2b\beta 3$), DGEA (Gly - Glu - Ala) ($\alpha 2\beta 1$) ou encore REDV (Arg - Glu - Asp - Val) ($\alpha 4\beta 1$).

Enfin, certaines métalloprotéinases, l'angiotatine, la thrombospondine, l'ostéopontine, les formes latentes du TGF- β (LAP-TGF- β) ou encore certains cations divalents (ions calcium ou magnésium) sont également des ligands extracellulaires potentiels des intégrines (Humphries et al., 2006).

III.2. Ligands intracellulaires

Au niveau intracellulaire, c'est particulièrement la sous-unité β qui est capable d'interagir avec de nombreux partenaires.

Certains ligands ont un **rôle structural** en permettant la liaison au cytosquelette d'actine. **Taline** et **paxilline** sont les 2 protéines de liaison majoritaires, mais l'on retrouve également la vinculine, la kindline, la tensine, l' α -actinine, la parvine, la filamine, la cofiline (Takada et al., 2007). Toutes ces protéines, qui permettent le relais pour des interactions avec des protéines cytosoliques, forment une connexion avec le cytosquelette (notamment l'actine). Cette connexion est essentielle à la réalisation de différentes fonctions des intégrines.

D'autres intégrines peuvent également lier, au niveau cytoplasmique, des ligands impliqués dans la **transduction de signaux** tels que des **protéines kinases** (comme la *Focal adhesion kinase* (FAK) ou l'*Integrin linked kinase* (ILK)...), des phosphatases (PTEN, *protein phosphatase A2* (PP2A)...), ou des protéines adaptatrices (p130CAS (*CRK-Associate Substrate*), Grb2 (*Growth factor Receptor Bound protein 2*), CRK, Shc-1 (*Src Homology 2 domain Containing transforming protein 1*),...) qui à leur tour pourront lier et activer d'autres molécules de signalisation (cf. Partie 3, paragraphe V) (Miranti and Brugge, 2002).

IV. Expression

La plupart des cellules de l'organisme expriment des intégrines à l'exception des globules rouges. Ainsi, toute cellule nucléée possède une signature intégrine spécifique. Ces intégrines sont souvent exprimées de façon constitutive, mais sous forme inactive, et s'activent ensuite lors de la fixation de leurs ligands (cf. Partie 3, paragraphe V). L'expression et l'activation des intégrines est très dynamique et sensible aux variations de l'environnement.

Une cellule peut exprimer plusieurs intégrines différentes à sa surface, de même une intégrine peut être exprimée par divers types cellulaires. La combinaison d'intégrines exprimées par un type cellulaire donné détermine en partie certaines de ses propriétés (adhérence, migration). Certaines intégrines sont exprimées de **façon spécifique à certains tissus ou types cellulaires** ($\alpha6\beta4$ pour les kératinocytes, $\alphaIIb\beta3$ pour les plaquettes, $\alpha4\beta1$ et $\beta2$ pour les leucocytes, ...) tandis que d'autres sont retrouvées **plus largement distribuées dans l'organisme** ($\alpha v\beta3$, $\alpha6\beta1$) (**Table 8**) (Takada et al., 2007).

INTEGRINE	EXPRESSION
$\alpha1\beta1$	Lymphocytes T CD4+, placenta
$\alpha2\beta1$	Leucocytes, cellules mésothéliales, fibroblastes
$\alpha3\beta1$	Kératinocytes, cellules épithéliales, cellules mésothéliales
$\alpha4\beta1$	Leucocytes
$\alpha5\beta1$	Epithéliums, endothélium
$\alpha6\beta1$	Ubiquitaire (épithéliums, NPC, astrocytes, ...)
$\alpha7\beta1$	Cellules musculaires
$\alpha8\beta1$	Cellules interstitielles alvéolaires, cellules épithéliales intestinales et rénales
$\alpha9\beta1$	Cellules épithéliales intestinales, cellules musculaires lisses
$\alpha10\beta1$	Chondrocytes
$\alpha11\beta1$	Ondotoblastes, fibroblastes
$\alpha v\beta1$	Cellules épithéliales
$\alpha L\beta2$	Leucocytes
$\alpha M\beta2$	Leucocytes
$\alpha X\beta2$	Leucocytes
$\alpha D\beta2$	Leucocytes
$\alpha IIb\beta3$	Plaquettes
$\alpha v\beta3$	Ubiquitaire (endothélium vasculaire et divers épithéliums, ...)
$\alpha6\beta4$	Kératinocytes
$\alpha v\beta5$	Ubiquitaire (endothélium vasculaire et divers épithéliums, ...)
$\alpha v\beta6$	Epithéliums digestif et pulmonaire
$\alpha4\beta7$	Leucocytes
$\alpha E\beta7$	Lymphocytes T, cellules dendritiques des muqueuses, assez ubiquitaires
$\alpha v\beta8$	NSC, NPC, astrocytes, cellules mésangiales rénales, épithélium pulmonaire, placenta

Table 8 : Expression des différentes intégrines chez l'Homme (liste non exhaustive) (NSC : Cellules souches neurales, NPC : Cellules progénitrices neurales).

V. Signalisation

La signalisation des intégrines est bidirectionnelle (Hynes, 2002).

D'une part, des voies de signalisation intracellulaires peuvent moduler la partie extracellulaire des intégrines, on parle alors de signalisation « *inside out* » (Figure 24). L'association des sous-unités α et β au niveau intracellulaire maintient les intégrines sous forme inactive ou « repliée ». Pour être actives ou « dépliées », les intégrines doivent être « démasquées » (ouverture de la poche de liaison au ligand, rendant ce site plus accessible) au niveau extracellulaire, par le biais de modifications conformationnelles (cf. ci-dessus paragraphe II.3 de cette partie).

Les intégrines étant **dépourvues d'activité tyrosine kinase ou d'activité enzymatique intrinsèque**, c'est l'interaction au niveau cytoplasmique des sous-unités α et β avec des protéines du cytosquelette (taline...) (Wegener et al., 2007), avec des tyrosines kinases cytoplasmiques (ILK, FAK) (Miranti and Brugge, 2002) ou avec des protéines couplées à une protéine G (Rac1, CDC42...) (Takada et al., 2007), qui va pouvoir induire leur phosphorylation et/ou leur dissociation et modifier en extracellulaire la conformation des intégrines en les redressant (forme dépliée) afin de réguler leur affinité pour leurs ligands.

Par exemple, la taline se lie au motif NpxY proximal dans la partie cytoplasmique de la sous-unité β , alors que les kindlines se lient au motif NxxY distal. La protéine FAK interagit au niveau de ces mêmes motifs. A l'inverse, des protéines telles que DOK-1 (*Docking protein 1*), ICAP-1 (*Integrin Cytoplasmic domain-Associated Protein 1*) et filamine régulent de manière négative l'activation des intégrines, en entrant en compétition avec la taline ou la kindline (Hynes, 2002).

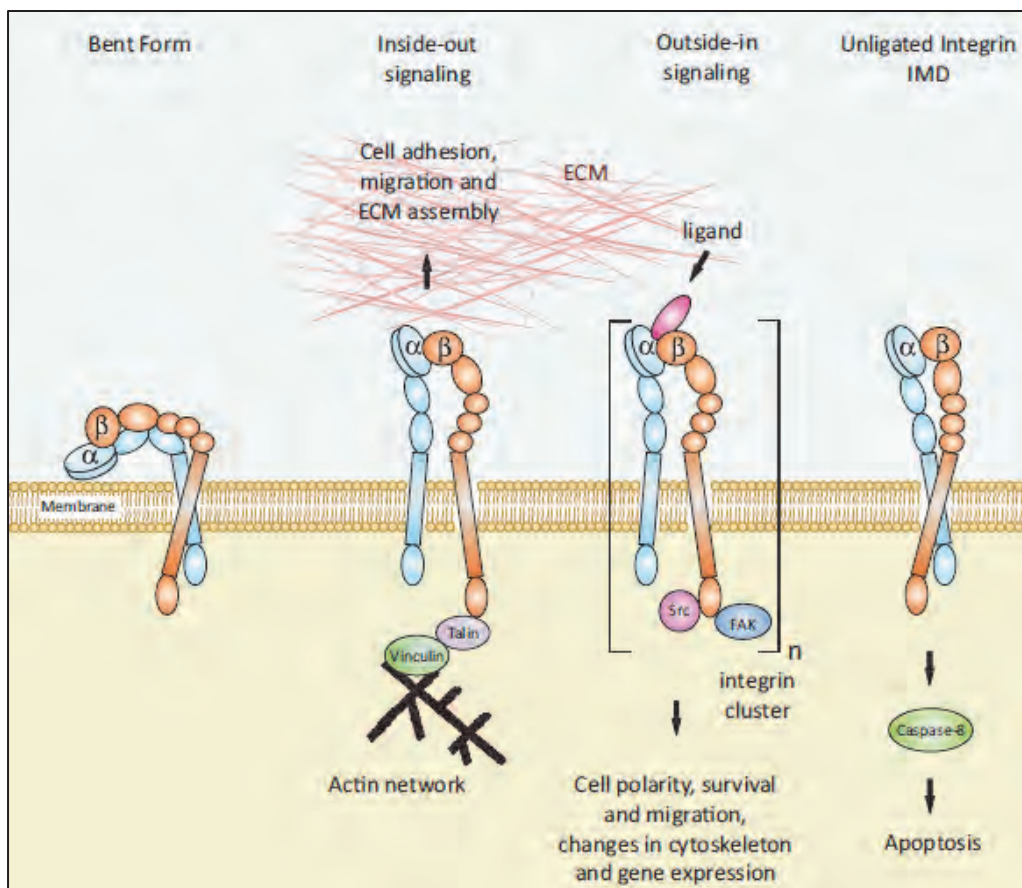


Figure 24 : Représentation schématique des mécanismes d'action des intégrines et des voies de signalisation associées (Mas-Moruno et al., 2011).

D'autre part, des signaux extracellulaires sont capables à leur tour d'interagir avec les intégrines et de déclencher alors des voies de signalisation à l'intérieur de la cellule, c'est la signalisation « *outside in* » (**Figure 24**). La liaison du ligand entraîne l'agrégation (*cluster*) de plusieurs intégrines qui peuvent former des **complexes focaux d'adhérence** à l'origine, non seulement de point d'ancrage de la cellule à la MEC, mais aussi de changements conformationnels permettant l'interaction des parties cytoplasmiques des intégrines avec différentes molécules de signalisation intracellulaire.

Ces molécules comprennent majoritairement des kinases spécialisées comme FAK ou ILK (Khyrul et al., 2004) (**Figure 25**). Ces dernières vont pouvoir phosphoryler des protéines adaptatrices (Grb2, Shc-1, Cas, PINCH-1 (*Particularly interesting new cysteine-histidine rich protein*), Nck2 (*Non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 2*)...), faire le relais avec des protéines du cytosquelette (Paxilline) et déclencher l'activation de grandes voies de signalisation cellulaire comme la voie des MAP-kinases (MAPK), la voie PI3K/Akt, la voie SRC (**Figure 25**) ou encore la voie NF- κ B.

De plus, FAK et ILK peuvent également recruter des GEF (Facteurs d'échange nucléotidiques, protéines d'échange GDP/GTP), comme par exemple Rho-GEF. Ces derniers vont activer des GTPases comme les protéines Rho, Ras, Cdc42, Rac, capables d'activer à leur tour des protéines agissant sur le cytosquelette.

Les intégrines peuvent aussi interagir directement avec des molécules impliquées dans le fonctionnement du cytosquelette d'actine (Taline, Vinculine, ...) (**Figure 25**).

L'ensemble de ces voies de signalisation vont ensuite converger vers le noyau et permettre des modifications d'expression de gènes (**Figure 25**), mais aussi du cytosquelette, indispensables à la réalisation des différentes fonctions des intégrines (cf. paragraphe VI).

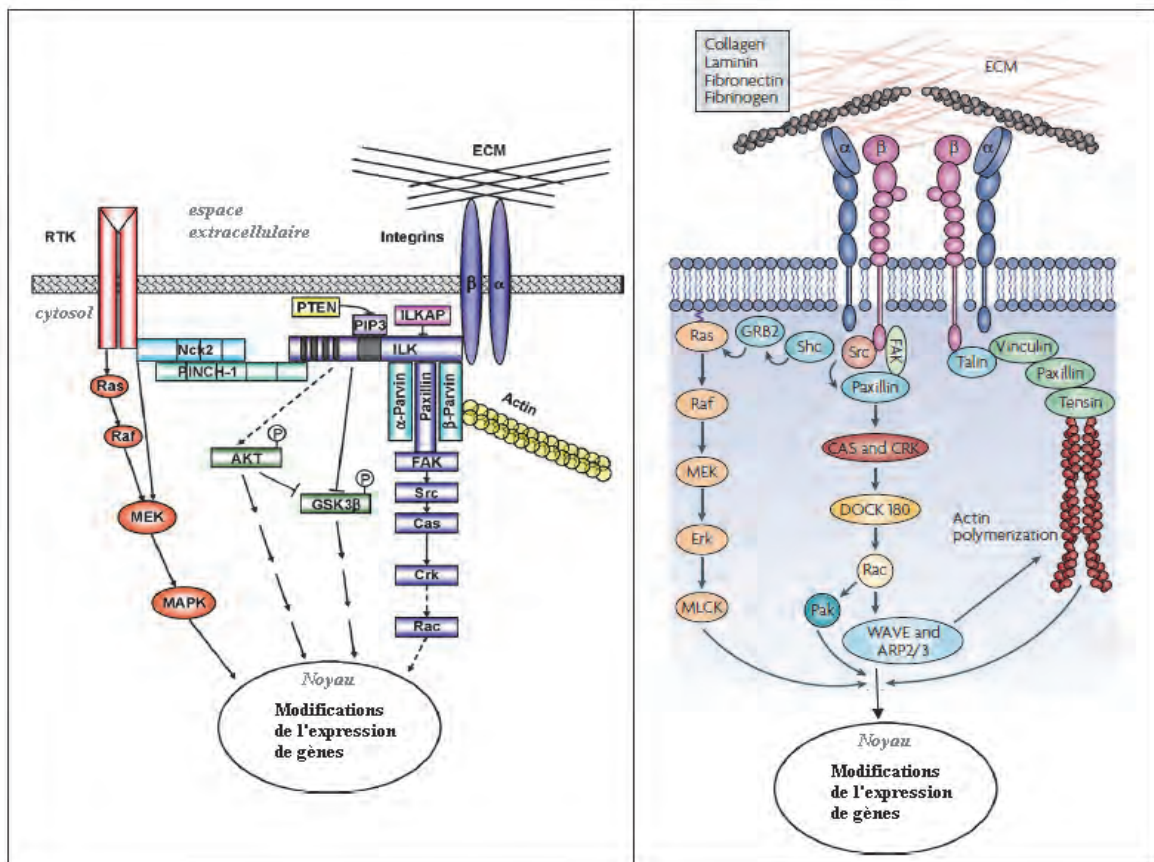


Figure 25 : Principales voies de signalisation intracellulaire des intégrines. Les intégrines peuvent déclencher des voies de signalisation via différentes protéines comme ILK à gauche et FAK à droite (ILKAP : *ILK-associated protein serine/threonine phosphatase of the PP2C family*, MLCK : *Myosin light chain kinase*, DOCK-180 : *Dedicator of cytokinesis*) (Avraamides et al., 2008; Hehlhans et al., 2006).

De plus, les intégrines peuvent **interagir avec des récepteurs de facteurs de croissance (RFC)** comme l'EGFR, VEGFR, PDGFR et l'HGFR/Met (**Figure 25**). En effet, l'activation des intégrines entraîne la formation de complexes focaux d'adhérence qui permet à la fois l'accumulation des intégrines et de ces RFC, favorisant leur interaction. Cette proximité va alors permettre l'activation croisée (transactivation) du RFC ou de l'intégrine en question, leur coordination pour l'activation de voies de signalisation intracellulaire ou encore la régulation mutuelle de leur expression (Miranti and Brugge, 2002). Ces interactions sont donc **cruciales** et permettent le franchissement d'un « seuil » entraînant ainsi un large choix de réponses cellulaires.

D'autre part, certaines intégrines ($\beta 1$, $\beta 3$) se comporteraient comme des récepteurs à dépendance. En l'absence de ligand, une caspase initiateur, la caspase 8, est recrutée au niveau membranaire et activée afin de provoquer l'apoptose de la cellule, phénomène nommé ***integrin-mediated death (IMD)*** (**Figure 24**) (Stupack et al., 2001).

Enfin, les intégrines sont également impliquées dans un autre mécanisme de mort cellulaire : l'**anoikis**, une mort cellulaire passive de type apoptotique, provoquée par le détachement des cellules de leur(s) substrat(s) (Taddei et al., 2012). En effet, certaines cellules, pour réaliser leurs fonctions, acquièrent des propriétés migratoires ou prolifératives, qui peuvent parfois conduire à leur localisation dans un environnement inapproprié. Le mécanisme d'anoikis va donc permettre l'élimination de ces cellules indésirables, afin de protéger l'organisme d'une éventuelle dysplasie. En revanche, les cellules adhérentes nécessitent d'être protégées contre ce type de mort cellulaire, et cela est possible grâce aux intégrines. Lorsque ces dernières sont liées à leurs ligands, elles vont activer différents signaux (via FAK et ILK qui activent les voies PI3K et NF- κ B) qui permettent l'adhérence des cellules entre elles et à la matrice, les protégeant ainsi de l'anoikis (Taddei et al., 2012).

VI. Fonctions

Nous venons de voir toute la complexité de la biologie des intégrines, de leur structure en passant par leurs voies de signalisation multiples, à l'origine de leurs nombreuses fonctions. En effet, c'est parce que ces protéines sont au carrefour entre le microenvironnement extracellulaire et les cascades de signalisation intracellulaires qu'elles vont pouvoir exercer de multiples fonctions, détaillées ci-dessous. Elles sont à la fois **détecteurs et acteurs** de mécanismes cellulaires et moléculaires majeurs. Il faut aussi garder à l'esprit que chaque intégrine possède de **multiples statuts** d'activation, divers **variants d'épissage** et que leur expression, glycosylation et activité varient selon le contexte. Ainsi, selon le microenvironnement, l'effet biologique d'une intégrine liée ou non à un ligand peut être très différent.

Afin d'identifier leurs fonctions, les intégrines ont fait l'objet de nombreuses études. Leurs différents rôles ont pu être découverts grâce à l'étude du phénotype de **souris Knock-Out (KO)** spécifique de chaque sous-unité (**Table 9**) (De Arcangelis and Georges-Labouesse, 2000; Takada et al., 2007). Chaque sous-unité est associée à un phénotype unique et semble ainsi avoir des fonctions relativement spécifiques.

INTEGRINE	VIABILITE	FERTILITE	PHENOTYPE
$\alpha 1$	+	+	Défauts de cicatrisation osseuse et angiogenèse tumorale réduite
$\alpha 2$	+	+	Altération morphogénèse et adhérence plaquettaire
$\alpha 3$	Létal (périnatal)	+	Défauts de la peau, des reins et du poumon
$\alpha 4$	Létal (embryonnaire)	-	Défauts du placenta et du cœur
$\alpha 5$	Létal (embryonnaire)	-	Défauts vasculaires et mésodermiques
$\alpha 6$	Létal (périnatal)	+	Détachement de l'épiderme, défauts de neurogenèse
$\alpha 7$	+	+	Dystrophie musculaire
$\alpha 8$	Létal (périnatal)	+	Défauts des reins
$\alpha 9$	Létal (périnatal)	+	Défauts du drainage lymphatique
αV	Létal (embryonnaire et périnatal)	+	Hémorragie cérébrale
αL	+	+	Adhérence des neutrophiles et dégranulation
αM	+	+	Emigration des neutrophiles
αD	+	+	Diminution de la réponse des LT et modifications phénotypiques
αE	+	+	Inflammation de la peau
$\beta 1$	Létal (embryonnaire)	-	Echec de la gastrulation
$\beta 2$	+	+	Déficience d'adhérence des leucocytes
$\beta 3$	+	+	Déficits plaquettaires
$\beta 4$	Létal (périnatal)	+	Détachement de l'épiderme
$\beta 5$	+	+	Cécité accélérée liée à l'âge
$\beta 6$	+	+	Inflammation de la peau et des poumons
$\beta 7$	+	+	Déficits des lymphocytes
$\beta 8$	Létal (embryonnaire et périnatal)	+	Hémorragie cérébrale

Table 9 : Phénotypes des souris KO pour les différentes sous-unités des intégrines (Takada et al., 2007).

Au niveau cellulaire, les intégrines sont impliquées particulièrement dans la forme, l'organisation du cytosquelette et la polarité des cellules. Situées à la surface cellulaire, elles permettent des interactions à la fois entre les cellules mais aussi avec la matrice extracellulaire. En conséquent, ces protéines régulent des **processus cellulaires** cruciaux lors de l'**embryogenèse** comme l'adhérence, la motilité, la migration, l'invasion, la prolifération, la différenciation, la vasculogenèse, l'angiogenèse, la lymphangiogenèse, l'hémostase, la survie et l'apoptose (Miranti and Brugge, 2002).

La plupart de ces fonctions sont retrouvées **chez l'adulte** où elles permettent le maintien de l'intégrité tissulaire et la régulation des comportements cellulaires. Il est intéressant de noter que parfois certaines intégrines peuvent avoir des rôles différents entre l'embryon et l'adulte.

De plus, certaines ont des rôles bien spécifiques. Ainsi, les intégrines associées à la sous-unité $\beta 2$ jouent un rôle dans le système immunitaire, via l'activation des lymphocytes T, l'adhérence des cellules immunitaires aux cellules endothéliales (« *rolling* ») et participent à la cicatrisation. Enfin l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$ est essentielle à l'agrégation plaquettaire.

VII. Recyclage

Les intégrines, après activation, peuvent être internalisées par endocytose médiée par la clathrine ou par les cavéoles. Ceux sont les motifs de type NxxY, situés sur la partie intracellulaire de la sous-unité β , qui sont reconnus par des protéines adaptatrices (Numb ou Hax-1) et qui permettent la formation de vésicules d'endocytose recouvertes de clathrine. D'autres intégrines peuvent subir une endocytose indépendante de la clathrine, via les cavéoles et des GTPases Rab (De Franceschi et al., 2015; Pellinen and Ivaska, 2006). Les vésicules internalisées fusionnent ensuite avec les endosomes précoces localisés à la périphérie de la cellule (sous la membrane plasmique) puis avec les endosomes tardifs (juxta-nucléaires). De là, elles sont soit recyclées vers la membrane plasmique ou soit dirigées vers les lysosomes pour être dégradées (**Figure 26**). Ce trafic moléculaire permet la régulation du pool d'intégrines présentes à la surface et, ainsi, le contrôle directionnel par la cellule de son adhérence au substrat et ainsi la modulation des différentes fonctions de l'intégrine impliquée.

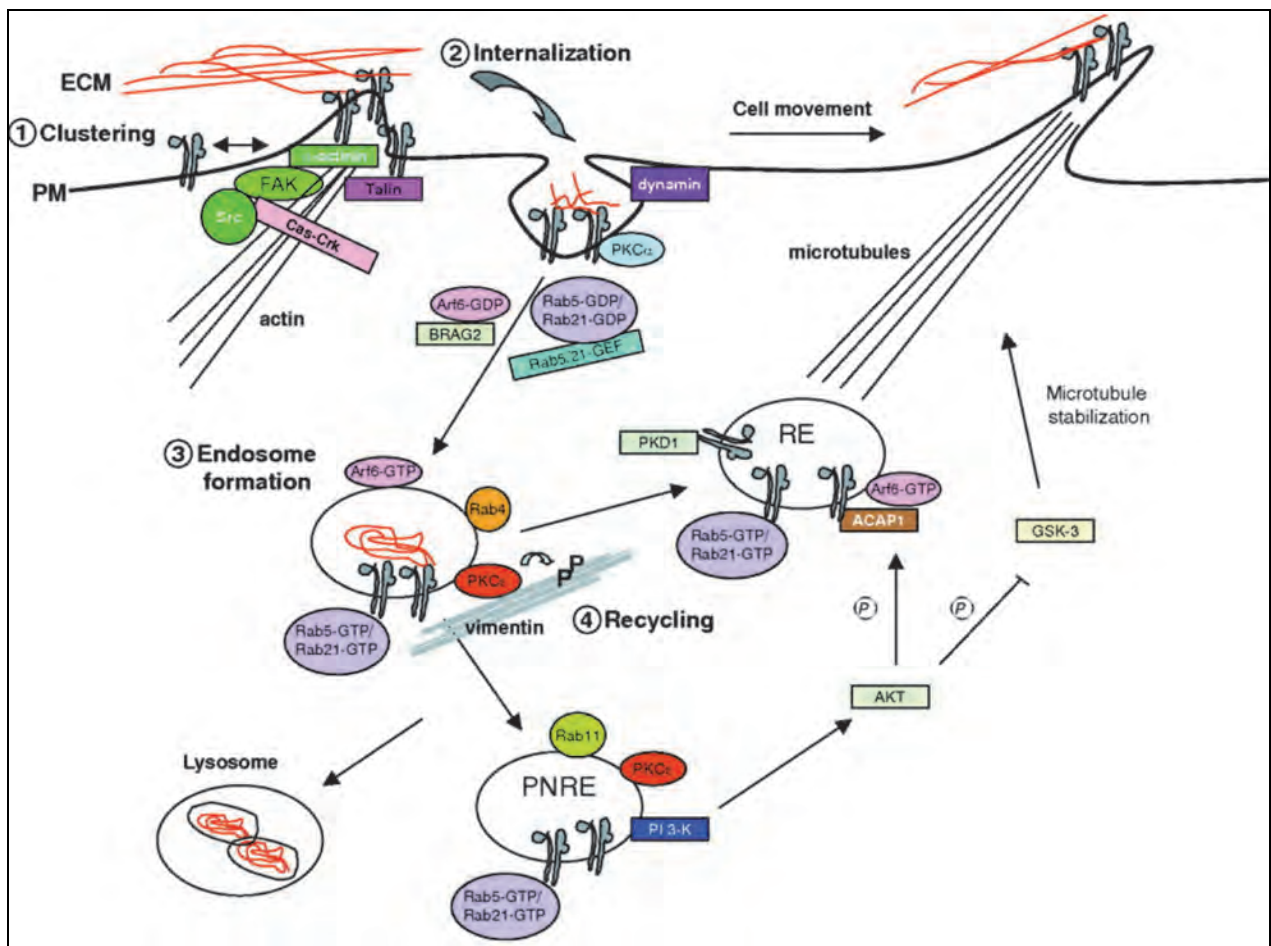


Figure 26 : Représentation schématique du recyclage des intégrines. Les intégrines peuvent être internalisées par endocytose par l'intermédiaire de différentes protéines telles que les GTPases Rab. Elles fusionnent ensuite avec les endosomes pour être soit recyclées à la membrane, soit dégradées par les lysosomes (Pellinen and Ivaska, 2006). (PNRE : *perinuclear recycling endosome*, RE : *recycling endosome*)

VIII. Les intégrines en pathologie

La surexpression ou la perte des intégrines peut conduire au développement de plusieurs pathologies. Ainsi, certaines intégrines ont pu être impliquées dans des déficits spécifiques.

La perte ou la mutation de l'intégrine α IIb β 3 se traduit par des **troubles de l'agrégation plaquettaire**, entraînant un risque d'hémorragie (Nurden and Nurden, 2014). Des mutations ou l'inhibition d'expression de β 2 entraînent des **déficits immunitaires** aussi nommés LAD (*Leukocyte Adhesion Deficiency*) liés à un défaut du recrutement des monocytes ou neutrophiles aux sites d'infection (Bunting et al., 2002). Les patients atteints de ce déficit souffrent alors d'infections récurrentes. Les modifications des intégrines α 4 β 1 et α 4 β 7 sont à l'origine de **maladies inflammatoires** telles que l'asthme, la maladie de Crohn ou la sclérose multiple (Cesarini and Fiorino, 2013; Ray, 2013). D'autres intégrines semblent participer à la **fibrose** cardiaque (α 8 β 1) (Bouzeghrane et al., 2004), pulmonaire (α 3) (Borok, 2009) ou hépatique (α v β 6) (Sullivan et al., 2010). Des patients porteurs d'une mutation de la sous-unité β 4 présentent de **graves maladies de peau**, comme l'épidermolyse bulleuse, causées par un défaut d'attachement de la laminine (Schumann et al., 2013). Enfin des modifications de la localisation ou de l'expression de diverses intégrines (α v β 3, α v β 5, α 5 β 1...) sont retrouvées dans diverses **pathologies cancéreuses**, telles que les mélanomes, les carcinomes rénaux, les glioblastomes, certaines leucémies ainsi que les cancers du sein, de la prostate et du colon (Desgrosellier and Cheresch, 2009). Ces altérations seront détaillées dans le paragraphe IX de cette Partie 3.

Les intégrines ayant été identifiées dans diverses pathologies, elles représentent des **cibles thérapeutiques** potentielles. Situées à la **surface** des cellules, et au **carrefour** de nombreux mécanismes cellulaires majeurs, leur ciblage semble particulièrement attrayant. En effet, il permettrait notamment de bloquer des voies de signalisation intracellulaire à partir d'une molécule ne nécessitant pas de pénétrer dans la cellule. Il permettrait également de bloquer des interactions cellulaires avec l'ECM, les cellules voisines ou certains ligands. Enfin, chaque intégrine étant unique, il semble possible de les cibler très spécifiquement et de limiter ainsi la toxicité de ce type de thérapie.

Différents inhibiteurs de type anticorps, peptides antagonistes (mimant le motif RGD par exemple) ou petites molécules inhibitrices ont alors été développées et font l'objet d'essais cliniques (**Table 9**) (Goodman and Picard, 2012; Hehlhans et al., 2006). Toutes ces molécules ciblent la partie extracellulaire du récepteur, au niveau du site de liaison du ligand, empêchant sa fixation et donc l'activation des voies en aval. Grâce aux connaissances structurales des intégrines et aux progrès de la chimie, ces molécules s'avèrent toutes relativement spécifiques et de haute affinité pour leur cible.

Actuellement, les molécules qui ont montré une activité intéressante et qui ont été approuvées en thérapeutique sont **l'Abciximab** (Reopro[®]) (un anticorps humanisé), **l'Eptifibatide** (Integrilin[®]) et **le Tirofiban** (Agrastat[®]) (deux peptides antagonistes) pour la prévention des thromboses ou le traitement de l'angor instable. Ces 3 molécules ciblent l'intégrine α IIb β 3 présente à la surface des plaquettes, empêchant ainsi leur liaison au fibrinogène. Un autre anticorps anti-intégrine approuvé est le **Natalizumab** (Tysabri[®]) pour le traitement des scléroses multiples et la maladie de Crohn (Brandstadter and Katz Sand, 2017). Ce dernier, ciblant l'intégrine α 4 β 1, bloque notamment le trafic leucocytaire et modère ainsi l'inflammation. Tout récemment, le Védolizumab (ciblant α 4 β 7) est également utilisé dans la maladie de Crohn (Argollo et al., 2018). D'autres inhibiteurs d'intégrines sont en cours d'essais cliniques pour le traitement de maladies inflammatoires, ischémiques ou tumorales (**Table 10**). Au total, plus de 260 molécules anti-intégrines sont en cours d'évaluation (Goodman and Picard, 2012).

NOM	DCI / NOM COMMERCIAL	INDUSTRIE	TYPE	CIBLE	MALADIES	STATUT
L000845704	x	Merck (Allemagne)	peptide antagoniste	$\alpha v\beta 3$	ostéoporose	Phase I
JSM6427	x	Jerini Ophthalmic (USA)	peptide antagoniste	$\alpha 5\beta 1$	DMLA	Phase I
MLN01	x	Millenium Pharm. (USA)	AC	$\alpha 2$	Maladies cardiovasculaires, thromboses, AVC	Phase I/II
MLN02	Vedolizumab	Millenium Pharm. (USA)	AC humanisé	$\alpha 4\beta 7$	Maladie de Crohn, colite ulcéreuse	Phase II
BIO-1211	x	Biogen (USA), Merck (Allemagne)	Peptide	$\alpha 4\beta 1$	Asthme, allergie	Phase II
TR-14035, SB683698	Firetegrast	TanabeSeiyaku (Japon) GSK (UK)	Composé non peptidique	$\alpha 4\beta 1$ $\alpha 4\beta 7$	Asthme, MICI, sclérose multiple	Phase II
RhuMAB	Erlizumab	Genentech (USA) et Roche (Suisse)	IgG1 AC Mc humanisé	CD18 $\alpha L\beta 2$	AVC ischémique, IDM	Phase II
HU23F2G	LeukArrest Rovelizumab	Icos (USA)	IgG4 AC Mc humanisé	CD11 $\beta 2 \alpha L\beta 2$	AVC ischémique	Phase III
c7E3 Fab	Abciximab (Reopro®)	Centocor (USA)	AC Mc chimérique	$\alpha IIb\beta 3$	Angor, IDM	AMM
x	Eptifibatide (Integrilin®)	Millenium Pharm. (USA)	Peptide	$\alpha IIb\beta 3$	Syndrome coronarien aigu	AMM
x	Tirofiban (Aggrastat®)	Iroko cardio (UK)	Composé non peptidique	$\alpha IIb\beta 3$	Syndrome coronarien aigu	AMM
x	Natalizumab (Tysabri®)	Biogen (USA)	Ac Mc humanisé	$\alpha 4$	Sclérose en plaque, Maladie de Crohn	AMM
GLPG0187	x	Galapagos SASU (France)	Antagoniste du récepteur	$\alpha v/\alpha 5\beta 1$	Tumeurs solides avancées	Phase I
PF0460541	x	Pfizer (USA)	IgG1 AC Mc humanisé	$\alpha 5\beta 1$	Tumeurs solides	Phase I
OS2966	x	Oncosynergy (USA)	AC Mc humanisé	$\beta 1$	GB et cancer de l'ovaire	Phase I
ATN-161	x	Attenuon, LLC (USA)	Peptido-mimétique	$\alpha 5\beta 1$	Gliomes et cancers solides avancés	Phases I/II
M200	Volociximab	Protein design labs (USA)	AC Mc chimérique	$\alpha 5\beta 1$	Carcinomes rénaux métastatiques et mélanome, NSCLC	Phase II
MEDI-523	Vitaxin	Medimmune Inc. (USA)	IgG1 AC Mc humanisé	$\alpha v\beta 3$	Tumeurs solides avancées	Phases I/II
MEDI-522	Etaracizumab Abegrin	Medimmune Inc. (USA)	IgG1 AC Mc humanisé	$\alpha v\beta 3$	Mélanome métastatique, cancer de la prostate, arthrite rhumatoïde, psoriasis	Phase II
CNTO 95	Intetumumab	Centocor (USA)	AC Mc humanisé	αv	Cancers réfractaires avancés	Phase II
EMD121974	Cilengitide	EMD pharm. Merck KGaA (Allemagne)	Peptido-mimétique	$\alpha v\beta 3$ $\alpha v\beta 5$	Tumeurs solides avancées (cancer du rein, du colon, GB, mélanome) et AML	Phases I/II Phase III (GB)
EMD525797	x	Merck (Allemagne)	AC Mc humanisé	αv	Cancer colon et prostate	Phase II
E7820	x	Esai medical research (USA)	Dérivé sulfonamide	$\alpha 2$	Carcinome colorectal	Phase II

Table 10 : Principaux inhibiteurs d'intégrines en essais cliniques. La partie foncée représente les molécules à visée anti-cancéreuse. (AC : anticorps, Mc : Monoclonal, DMLA : dégénérescence maculaire liée à l'âge, MICI : maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, IDM : infarctus du myocarde, NSCLC : Cancer du poumon non à petites cellules, AML : Leucémie myéloïde aigue) D'après (Avraamides et al., 2008; Hehlhans et al., 2006).

IX. Intégrines et cancer

IX.1. Généralités

En raison de leur large spectre d'action, les intégrines ont pu être mises en évidence dans divers types de cancers au cours de **différentes étapes du développement tumoral**. Elles sont rarement retrouvées mutées dans les cancers et ne sont pas considérées comme des oncogènes mais peuvent en revanche **coopérer** avec eux pour favoriser la progression tumorale. Ainsi, même si certaines semblent potentiellement anti-tumorales ($\alpha 2\beta 1$), une plus grande majorité d'entre elles apparaissent plutôt pro-tumorales ($\alpha \nu \beta 3$, $\alpha \nu \beta 5$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$,...) (Desgrosellier and Cheresch, 2009; Guo and Giancotti, 2004; Malric et al., 2017).

IX.2. Expression des intégrines dans les cancers

Certaines intégrines voient des modifications de leur expression (surexpression, répression, nouvelle expression) et/ou de leur localisation au cours de la progression cancéreuse. L'expression des intégrines **$\alpha \nu \beta 3$, $\alpha \nu \beta 5$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$, $\alpha 4\beta 1$ et $\alpha \nu \beta 6$** est ainsi associée à la progression tumorale dans divers types de cancers, voire à une diminution de la survie des patients (**Table 11**) (Desgrosellier and Cheresch, 2009). Par exemple, l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ est surexprimée dans le cancer de la thyroïde mais faiblement exprimée dans le tissu thyroïdien sain (Dahlman et al., 1998). Les intégrines $\alpha \nu \beta 3$ et $\alpha \nu \beta 5$ sont, elles, fortement exprimées par les cellules de mélanomes, de GB et dans les carcinomes rénaux alors que leur expression est plus faible dans les *naevi*, le système nerveux central sain et le rein (Schittenhelm et al., 2013). Il n'a cependant pas été retrouvé une seule intégrine impliquée dans tous les types tumoraux. Ainsi, l'importance d'une intégrine semble plutôt dépendre du stade et du type tumoral et chaque cancer pourrait mettre en jeu des intégrines spécifiques différentes.

TYPE TUMORAL	INTEGRINES EXPRIMEES	PHENOTYPES ASSOCIES
Mélanome	$\alpha \nu \beta 3$ et $\alpha 5\beta 1$	Phase de croissance verticale et métastases ganglionnaires
Sein	$\alpha 6\beta 4$ et $\alpha \nu \beta 3$	Augmentation taille et grade tumorale, diminution survie ($\alpha 6\beta 4$), augmentation métastases osseuses ($\alpha \nu \beta 3$)
Prostate	$\alpha \nu \beta 3$	Métastases osseuses
Pancréas	$\alpha \nu \beta 3$	Métastases ganglionnaires
Ovaire	$\alpha 4\beta 1$ et $\alpha \nu \beta 3$	Métastases péritonéales ($\alpha 4\beta 1$), et prolifération tumorale ($\alpha \nu \beta 3$)
Cervical	$\alpha \nu \beta 3$ et $\alpha \nu \beta 6$	Diminution survie des patients
Glioblastome	$\alpha \nu \beta 3$ et $\alpha \nu \beta 5$	Forte expression, rôles dans l'invasion, l'angiogenèse et la radorésistance, diminution survie des patients ($\alpha \nu \beta 3$)
NSCLC	$\alpha 5\beta 1$	Diminution survie des patients
Colon	$\alpha \nu \beta 6$	Diminution survie des patients

Table 11 : Expression des intégrines en cancérologie d'après (Desgrosellier and Cheresch, 2009).

Les cellules tumorales **moduleraient** donc en leur faveur l'expression et/ou l'activation des intégrines à la fois au niveau qualitatif et quantitatif. En conséquence, de nombreux types de tumeurs présentent un panel d'expression de ces protéines différent du tissu sain. D'autre part, certaines peuvent subir des phosphorylations ou des modifications post-traductionnelles (glycosylation, sialylation, citrullination, carbamoylation) ce qui peut affecter leur interaction avec les ligands extracellulaires et les partenaires cytoplasmiques et en conséquent moduler leurs fonctions. Par exemple, dans le cancer du colon, une altération de la glycosylation de l'intégrine $\beta 1$ contribue à un phénotype invasif et métastatique (von Lampe et al., 1993) tandis que les niveaux de sialylation de $\beta 1$ sont impliqués dans la migration radio-induite (Lee et al., 2010). De plus, leurs fonctions et dégradations seraient également modulées au cours de la transformation tumorale (Hehlgans et al., 2006). D'autres intégrines que celles précédemment citées sont probablement impliquées et des études sont en cours afin de les identifier.

Il faut aussi garder à l'esprit que ces protéines sont également exprimées par **les cellules du microenvironnement** : cellules endothéliales, péricytes, fibroblastes, cellules immunitaires et plaquettes. Le microenvironnement joue un rôle central dans le développement des tumeurs, et les intégrines vont donc permettre les interactions entre les cellules cancéreuses et ces différents acteurs.

IX.3. Rôles des intégrines dans les cancers

La surexpression d'intégrines sélectives dans certaines tumeurs, suggère un rôle majeur de ces protéines dans des cancers bien définis. Tous les rôles physiologiques des intégrines (prolifération, adhérence, migration, survie, ...) sont susceptibles d'être exploités par les cellules cancéreuses pour favoriser la progression tumorale. Les intégrines vont ainsi participer, au sein d'une tumeur, à la prolifération, la formation de métastases, l'angiogenèse, la survie, les résistances aux thérapies, voire même au maintien de l'état souche (**Figure 27**). D'autre part, les intégrines sont également capables de coopérer avec les récepteurs des facteurs de croissance pour amplifier tous les phénomènes décrits ci-dessous (Pour revue (Streuli and Akhtar, 2009)).

IX.3.1. Prolifération tumorale

Tout d'abord, les intégrines peuvent soutenir la **prolifération** tumorale (**Figure 27A**). Par exemple, la surexpression de l'intégrine $\alpha v \beta 6$ est associée à un niveau de prolifération élevée dans le cancer du colon (Cantor et al., 2013), la stabilisation d' $\alpha 5 \beta 1$ favorise la croissance tumorale dans le cancer de la prostate (Sayeed et al., 2013) et $\alpha v \beta 3 / \alpha v \beta 5$ régulent la prolifération de tumeurs ovariennes (Cruet-Hennequart et al., 2003). Pour cela, les cellules tumorales vont produire et sécréter en grande quantité divers ligands d'intégrines comme l'ostéopontine (OPN) ou la sialoprotéine osseuse (BSP). Ces protéines vont pouvoir se fixer à leurs intégrines spécifiques à la surface des cellules tumorales et favoriser leur prolifération via l'activation de la FAK et de la voie des MAPK ainsi que la régulation de l'expression de protéines du cycle cellulaire (cycline D1...) (Danen et al., 2000; Wang et al., 2011). De plus, toujours via les intégrines, les cellules tumorales peuvent recruter des cellules myéloïdes (comme les monocytes) ($\alpha 4 \beta 1$ et $\alpha v \beta 3$) et des fibroblastes ($\alpha 11 \beta 1$) qui sécrètent des cytokines (IL-4, IL-13, IL-10, TGF β) et des facteurs de croissance (EGF, VEGF) favorisant la prolifération et la progression tumorale (Schmid et al., 2013; Zhu et al., 2007).

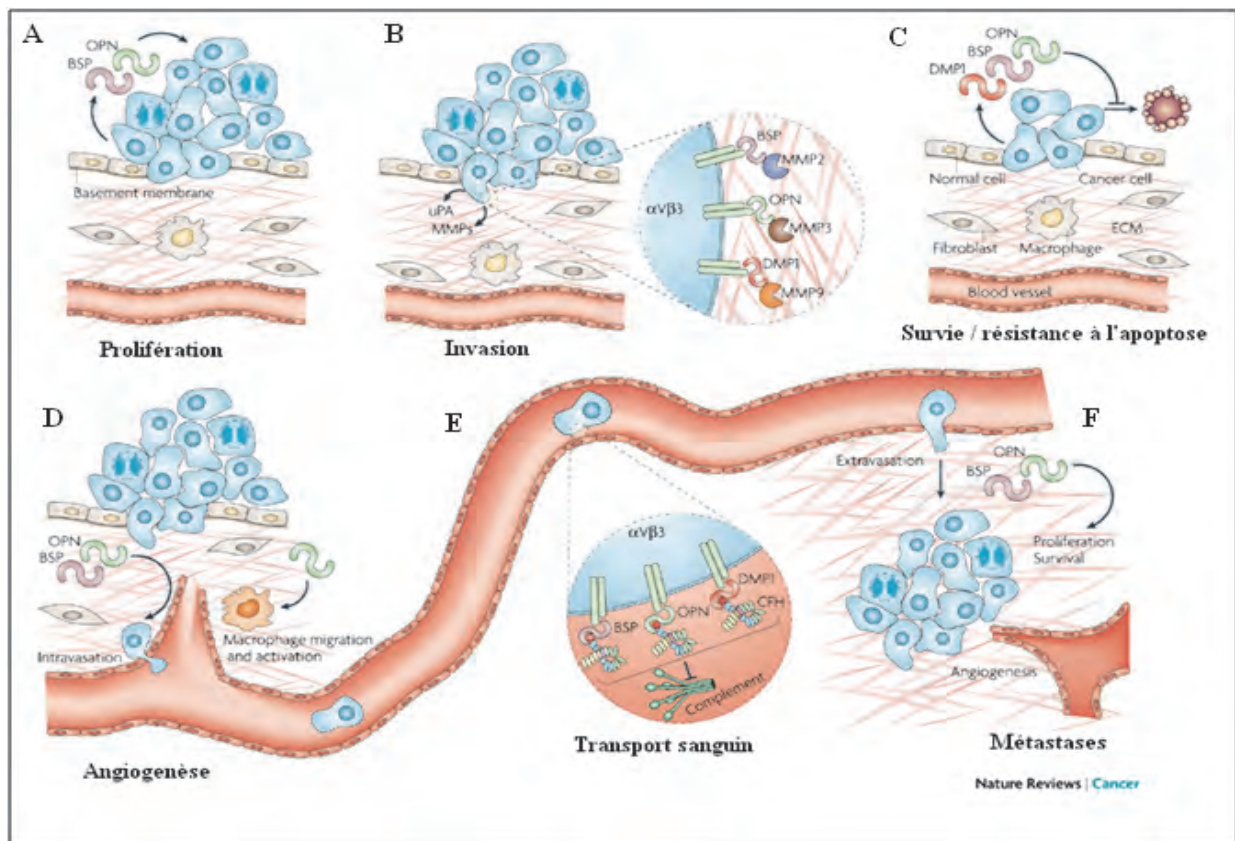


Figure 27 : Rôles des intégrines dans les différentes étapes du développement tumoral. Adapté de (Bellahcene et al., 2008).

27A) Les intégrines fixent divers ligands (ostéopontine (OPN), sialoprotéine osseuse (BSP)) qui activent des voies de signalisation (FAK, MAPK) favorisant la prolifération tumorale. **27B)** Les intégrines modulent les capacités d'adhérence et de migration des cellules tumorales afin de favoriser le détachement de la tumeur primaire et la dégradation de la membrane basale (via l'activation de différentes MMP) pour envahir le stroma. **27C)** Divers signaux de survie sont médiés par les intégrines et leurs interactions avec des ligands spécifiques (OPN, BSP, DMP-1 (*Dentin matrix protein 1*)). **27D)** Les intégrines jouent un rôle majeur dans l'angiogenèse en favorisant des signaux de prolifération, survie et migration des cellules endothéliales. **27E)** Le transport sanguin des cellules tumorales est facilité par l'intermédiaire d'intégrines. **27F)** Les intégrines permettent l'extravasation des cellules tumorales et sont à nouveau impliquées dans les signaux de prolifération, survie et angiogenèse pour le développement des métastases.

IX.3.2. Migration, invasion et métastases

D'autre part, via leurs rôles dans les mécanismes de **migration** et d'**invasion**, les intégrines facilitent les différentes étapes de la formation des métastases (**Figure 27B-E-F**). En effet, les contacts qu'elles exercent avec la MEC permettent les forces de traction nécessaires à la migration puis l'invasion des cellules tumorales à partir du site initial de la tumeur (Missan and DiPersio, 2012). Les intégrines vont également concentrer des MMP spécifiques (MMP-2,-3,-9, uPA) au niveau du front de migration et les activer, ce qui entraîne une dégradation de la MEC en faveur du détachement et de l'intravasation des cellules tumorales à travers la paroi des vaisseaux sanguins et/ou lymphatiques. De plus, les intégrines peuvent coopérer avec des récepteurs de facteurs de croissance pour faciliter ces mécanismes de migration et d'invasion, comme cela a été montré entre $\alpha 6\beta 4$ et des membres de la famille de l'EGFR dans le cancer du sein (Falcioni et al., 1997; Folgiero et al., 2007).

Dans la circulation sanguine, les intégrines, en présentant à la membrane plasmique l'OPN, la BSP ou la DMP-1, peuvent bloquer l'activation du complément et protéger ainsi les cellules tumorales des défenses de l'hôte (Bellahcene et al., 2008). Ensuite, toujours via des mécanismes médiés par les intégrines, notamment $\alpha IIb\beta 3$ présente à la surface des plaquettes,

les cellules tumorales circulantes peuvent s'arrêter au niveau de microvaisseaux, permettant par la suite leur extravasation et leur implantation dans un nouveau tissu (Ganguly et al., 2013). Enfin, les intégrines vont à nouveau fournir tous les signaux de survie, prolifération, adhérence, mais aussi d'angiogenèse nécessaires à la formation et la croissance de ces métastases. Ainsi, les intégrines $\alpha\beta3/\alpha\beta5$ sont impliquées dans les métastases des cancers du rein, de la peau, du poumon et de la prostate tandis que $\beta1$ favorise les métastases à partir des cancers du sein et des ovaires (Desgrosellier and Cheresch, 2009; Guo and Giancotti, 2004).

IX.3.3. Angiogenèse

Le rôle des intégrines dans l'**angiogenèse** tumorale est désormais largement établi (**Figure 27D**). Il a dans un premier temps été mis en évidence que les cellules cancéreuses sécrètent des facteurs pro-angiogéniques (FGF, VEGF) qui vont induire une augmentation de l'expression de deux intégrines majeures : $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$, à la surface des cellules endothéliales. Ces intégrines favorisent, via la liaison à divers ligands de la MEC (vitronectine, fibronectine), la survie, la prolifération et la migration des cellules endothéliales, mécanismes nécessaires à la formation de nouveaux vaisseaux (Friedlander et al., 1995). Par la suite, il est apparu que l'intégrine $\alpha5\beta1$ se comportait de manière assez similaire et favorisait également l'angiogenèse (Kim et al., 2000). De plus, l'intégrine $\alpha4\beta1$ permet la stabilisation des vaisseaux néoformés grâce aux interactions avec les péricytes (Garmy-Susini et al., 2005). D'autres intégrines ($\alpha1\beta1$, $\alpha2\beta1$, $\alpha6\beta4$, $\alpha9\beta1$ et $\alpha\nu\beta8$), exprimées par les cellules endothéliales et/ou par les cellules cancéreuses, ont également été décrites comme impliquées au cours de l'angiogenèse tumorale (Avraamides et al., 2008).

IX.3.4. Survie et résistance aux thérapies

Par ailleurs, ces récepteurs sont fortement impliqués dans la régulation de la **survie** cellulaire (**Figure 27C**). Selon le contexte, les intégrines peuvent moduler la balance survie / mort cellulaire, et dans le cas du cancer, les cellules tumorales vont préférentiellement faire pencher cette balance en faveur de la survie cellulaire.

En effet, les intégrines **associées à leurs ligands** (OPN, BSP, DMP-1...) induisent des signaux de survie via notamment une augmentation de l'expression de protéines anti-apoptotiques comme Bcl2 et FLIP, l'activation de voies de survies telles que PI3K/Akt ou NF- κ B, ou encore l'inactivation de la voie pro-apoptotique p53 (Frisch and Screaton, 2001; Lim et al., 2008; Matter and Ruoslahti, 2001).

En revanche, certaines intégrines ($\beta1$, $\beta3$), **non liées à leurs ligands**, joueraient un rôle de récepteur à dépendance et pourraient déclencher l'apoptose via l'IMD (Stupack et al., 2001) (cf. Partie 3, paragraphe V). Cependant, les cellules tumorales seraient capables de résister à cette IMD en perdant l'expression de la caspase 8 (Stupack et al., 2006). La modulation des voies associées aux intégrines dans les cellules tumorales vont également permettre aux cellules tumorales non adhérentes d'acquérir une résistance marquée à l'anoikis, toujours via l'activation de voies de survie cellulaire telles que PI3K/Akt ou NF- κ B (cf. Partie 3, paragraphe V) (Paoli et al., 2013).

L'engagement des intégrines avec des composants de la MEC permet de protéger les cellules tumorales, favorisant des phénomènes de résistance à certaines thérapies, connus sous les termes de CAM-DR (*Cell Adhesion Mediated drug resistance*) et CAM-RR (*Cell Adhesion Mediated radioresistance*) pour les résistances à la chimiothérapie et à la radiothérapie respectivement. En effet, comme les intégrines sont capables de promouvoir des signaux de survie, elles confèrent ainsi une plus forte résistance des cellules tumorales à l'apoptose après chimio et/ou radiothérapie. Cette protection, dont les mécanismes ne sont pas clairement

établis, dépend de l'agent cytotoxique utilisé, du type cellulaire visé, ainsi que des intégrines impliquées. $\alpha 4\beta 1$ serait ainsi associée à une résistance au carboplatine dans le cancer de l'ovaire (Scalici et al., 2014) et à la doxorubicine dans les myélomes (Damiano et al., 1999). L'intégrine $\beta 6$, elle, serait impliquée dans la résistance au 5-fluorouracile dans le cancer du colon (Liu et al., 2013).

A nouveau, la coopération des intégrines avec les récepteurs des facteurs de croissance peut cette fois favoriser la résistance des cellules tumorales (Folgiro et al., 2007).

IX.3.5. Etat souche

Enfin, plus récemment, il a été montré que certaines intégrines participeraient également à la **régulation de l'état souche des cellules tumorales**. L'intégrine $\alpha \nu \beta 3$ est ainsi associée à une population de cellules souches très tumorigènes dans le cancer du sein luminal (Kannan et al., 2014; Vaillant et al., 2008), tandis que $\alpha 6$ et $\alpha 7$ sont fortement exprimées par les cellules souches de GB où elles jouent un rôle important dans leur maintien (Haas et al., 2017; Lathia et al., 2010). De plus, $\beta 4$ a récemment été caractérisée comme nouveau marqueur des CSC du cancer du poumon (Zheng et al., 2013). Il apparaît donc que les CSC pourraient exprimer certaines intégrines bien spécifiques, et que ces dernières participeraient aux propriétés agressives de cette sous-population cellulaire tumorale.

Il est à noter que même dans un contexte physiologique, des intégrines spécifiques ont été identifiées dans la régulation des cellules souches saines. C'est le cas, par exemple, de $\alpha \nu \beta 3$ dans les cellules souches mammaires, de $\beta 1$ dans les cellules souches de divers organes et de $\beta 8$ dans les cellules souches neurales (Mobley et al., 2009; Seguin et al., 2015).

IX.4. Ciblage des intégrines en cancérologie

Les intégrines sont de véritables plateformes de signalisation pour les mécanismes de prolifération, de survie, de migration, d'invasion, d'angiogenèse tumorale et d'état souche. Elles semblent donc représenter d'excellents candidats pour une **thérapie anticancéreuse**.

Les études précliniques employant divers inhibiteurs d'intégrines ont démontré des activités anti-tumorales encourageantes, en particulier au niveau anti-angiogénique (Avraamides et al., 2008). Par exemple, l'inhibition dans divers modèles *in vitro* (lignées cellulaires) ou *in vivo* (modèles de souris ou lapins xénogreffés) des intégrines $\alpha \nu \beta 6$ (Eberlein et al., 2013), $\alpha 5\beta 1$ (Bhaskar et al., 2007) ou encore $\alpha \nu \beta 3$ et $\alpha \nu \beta 5$ (Taga et al., 2002), permet une diminution de la croissance tumorale, une réduction de l'angiogenèse et/ou induit l'apoptose des cellules tumorales.

Certaines molécules anti-intégrines (Abegrin, Volociximab, Intetumumab, Cilengitide, ATN-161, ...) sont donc passées en phase clinique (**Table 12, partie foncée**). L'**Abegrin**, un anticorps dirigé contre $\alpha \nu \beta 3$ est une des premières molécules testées en clinique et a permis de prolonger la survie de patients atteints de mélanome de stade IV dans un essai clinique de phase II (Hersey et al., 2005). L'anticorps **Volociximab** ciblant $\alpha 5\beta 1$ fait l'objet d'études de phase II, en monothérapie ou en association avec la chimiothérapie, chez des patients atteints de carcinomes rénaux avancés, de mélanomes métastatiques, ou de cancer du poumon non à petites cellules, métastatique (Kuwada, 2007). Les premiers résultats révèlent que cette molécule est bien tolérée et qu'elle présente une réponse antitumorale intéressante dans ces différentes tumeurs étudiées (Almokadem and Belani, 2012). Un autre anticorps en développement est l'**Intetumumab**, dirigé contre les intégrines $\alpha \nu$ ($\alpha \nu \beta 3$ et $\alpha \nu \beta 5$

majoritairement). Cette molécule s'est également avérée bien tolérée en phase I et est désormais à l'étude en phase II pour le traitement du mélanome (O'Day et al., 2011). Le **Cilengitide**, un peptide antagoniste d' $\alpha v\beta 3$ et $\alpha v\beta 5$, vient de faire l'objet d'une étude de phase III dans le traitement des GB, après avoir montré des résultats intéressants dans des essais de phase II (Nabors et al., 2012; Nabors et al., 2007). Cet aspect sera développé dans le paragraphe I.2 de la partie 4. Cette molécule fait également l'objet d'essais cliniques dans d'autres cancers (Haddad et al., 2017; Vansteenkiste et al., 2015). L'**ATN-161** est un autre peptide anti-intégrine à visée anticancéreuse. Dirigée contre l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, cette molécule aurait permis de stabiliser la maladie de patients atteints de tumeurs solides dans un essai de phase I (Cianfrocca et al., 2006). Ces molécules apparaissent donc bien tolérées mais sont encore dans des essais cliniques de phases précoces, et nécessitent des études complémentaires pour conclure sur leur efficacité potentielle.

L'un des principaux avantages d'une thérapie anti-intégrine est de cibler des intégrines exprimées ou activées uniquement par le tissu tumoral. Par conséquent, ces molécules sont peu toxiques et très bien tolérées. Cet avantage permet également la possibilité de combiner un anti-intégrine avec d'autres traitements comme la chimio et/ou la radiothérapie, afin d'obtenir un effet synergique et d'améliorer ainsi l'efficacité de traitement.

D'autre part, comme les intégrines possèdent des sites de liaison pour des ligands extracellulaires, elles peuvent être d'un grand intérêt en **diagnostic**. Il est possible d'étudier leur expression chez les patients par des techniques d'imagerie non invasive. Ainsi des agents d'imagerie basés sur le motif RGD couplés au fluorodésoxyglucose (^{18}F -FDG) et associés à la Tomographie par Emission de Positons (TEP), ont démontré dans une variété de tumeurs, l'expression sélective de certaines intégrines (αv , $\alpha v\beta 3$...) (Beer and Schwaiger, 2011). Pour développer ces méthodes d'imagerie, deux molécules à visée diagnostic sont en cours de développement et font l'objet d'essais de phase II : le Maraciclatide-Tc-99m, reconnaissant $\alpha v\beta 3$ (Axelsson et al., 2010) et la ^{18}F -flucitadine, détectant les intégrines αv (Battle et al., 2011). Une autre molécule spécifique d' $\alpha v\beta 3$, l'IntégriSense, n'est pas encore développée en clinique mais a montré des résultats intéressants *in vivo* (Trajkovic-Arsic et al., 2014). D'autres études s'intéressent à présent aux intégrines $\alpha v\beta 6$ et $\alpha 5\beta 1$ (Abadjian et al., 2017; Haubner et al., 2014). Dans le futur, ces agents pourraient permettre la sélection des patients pour une éventuelle thérapie ciblée anti-intégrine ainsi que le suivi de l'efficacité de ce traitement.

Enfin, les intégrines pourraient également être utilisées pour **délivrer sélectivement** une chimiothérapie, un radionucléotide, une molécule d'immunothérapie, un agent de thérapie génique ou encore des nanoparticules. Tout en améliorant l'efficacité via le ciblage des cellules tumorales, elles diminueraient les risques de toxicité. Par exemple, une nanoparticule liposomale spécifique des intégrines $\alpha v\beta 3$ et $\alpha v\beta 5$ a été utilisée pour délivrer un mutant de Raf dans des tumeurs chez l'animal, et a permis d'induire une réduction de la croissance tumorale (Hood et al., 2002). De plus, un anticorps anti- $\alpha v\beta 3$ (Abegrin) associé à un agent radioimmunothérapeutique a été capable de réduire la croissance tumorale de GB murins xénogreffés (Veeravagu et al., 2008).

Les intégrines apparaissent donc être des cibles prometteuses en cancérologie, à la fois au niveau thérapeutique et diagnostic. Au total, plus de 65 molécules anti-intégrines sont en cours d'étude dans le cadre de la cancérologie.

Les intégrines, sont des récepteurs à la surface cellulaire qui constituent de véritables plateformes de signalisation pour les mécanismes de prolifération, de survie, d'adhérence, de migration, d'invasion, d'angiogenèse, de différenciation et de viabilité cellulaire. Toutes ces fonctions sont modifiées et détournées lors du cancer, au profit des cellules tumorales. C'est pourquoi les intégrines représentent d'excellents candidats pour une **thérapie anticancéreuse**.

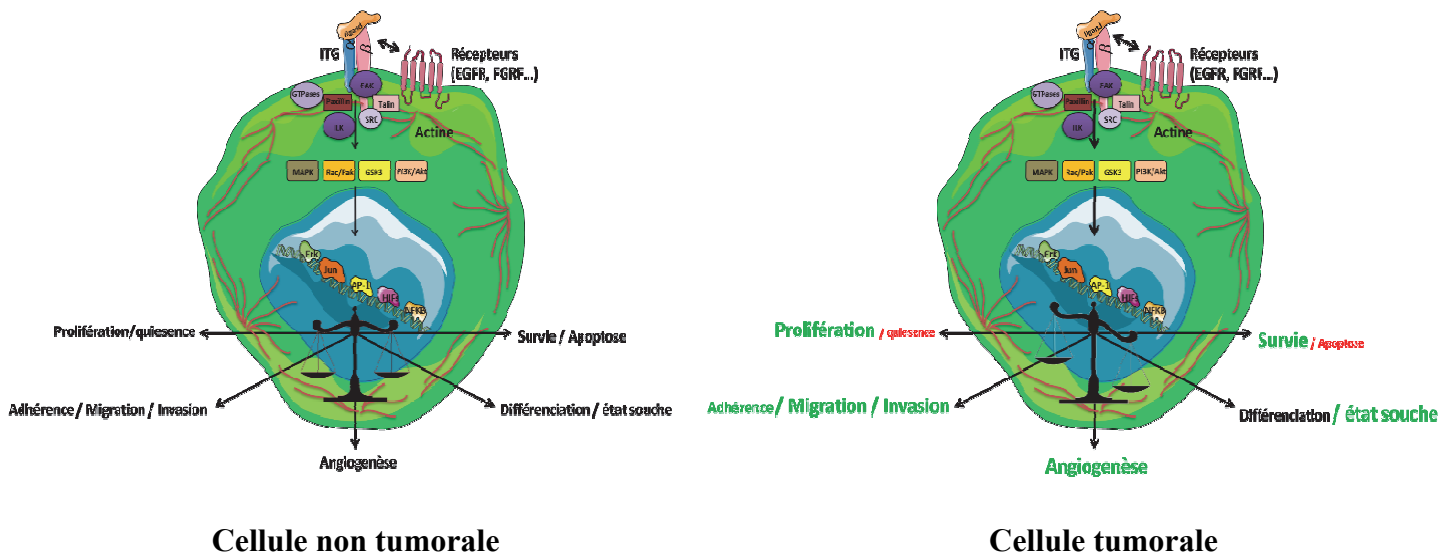


Figure 28 : Bilan partie 3 : Les intégrines et leur implication en cancérologie. Cellule de droite non tumorale : les intégrines interrogent leur environnement et participent à l'homéostasie cellulaire, régulant différentes balances cellulaires (prolifération/quiescence, adhérence/migration/invasion, différenciation/état souche et survie/apoptose). Cellule de gauche tumorale : les intégrines favorisent la prolifération, l'invasion, l'angiogenèse, l'état souche et la survie cellulaire, contribuant ainsi à la progression tumorale.

PARTIE 4 : Les intégrines dans les glioblastomes

I. Intégrines et Glioblastome

I.1. Généralités

Comme nous l'avons vu précédemment les intégrines représentent des cibles thérapeutiques intéressantes en cancérologie. Dans le cas des glioblastomes, qui sont des tumeurs très invasives et angiogéniques, diverses intégrines ont pu être mises en évidence de par leur **forte expression** et/ou leurs rôles dans le **développement tumoral**. Ces rôles sont variés et concernent la **prolifération**, la **migration**, l'**invasion**, l'**angiogenèse**, l'**état souche**, la **survie** ainsi que la **résistance** à la radio/chimiothérapie. Dans un premier temps, les intégrines **$\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$** ont été les premières identifiées dans ces tumeurs, puis d'autres intégrines comme **$\beta1$, $\alpha2$, $\alpha3$, $\alpha5$, $\alpha6$, $\alpha5\beta1$, $\alpha6\beta1$, $\alpha7$** ont également été mises en cause dans les GB (Gingras et al., 1995). Au cours de ma thèse, nous avons rédigé une **revue détaillée des intégrines retrouvées dans les GB, en faisant un bilan sur leur expression leurs différentes fonctions/implications dans la progression tumorale et leurs usages en clinique** (cf. **Annexe 3**) (Malric et al., 2017). Nous avons mis en avant ces caractéristiques en tenant compte de l'hétérogénéité tumorale des GB. Certains points clés sont résumés ci-dessous.

I.2. Intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$

Les intégrines **$\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$** appartiennent à la classe des intégrines liant le motif RGD et notamment la vitronectine. Ces deux intégrines sont exprimées de façon relativement importante dans l'organisme, par les cellules épithéliales, les cellules musculaires lisses, les fibroblastes, les ostéoblastes et en particulier au niveau de l'endothélium vasculaire (Desgrosellier and Cheresch, 2009; Kokubo et al., 2007; Takada et al., 2007).

Dans les glioblastomes, $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$ ont été retrouvées très **fortement exprimées** par les cellules tumorales, mais aussi à la surface des cellules endothéliales activées (Bello et al., 2001; Gladson et al., 1995). De plus, pour les patients atteints de GB, leur expression est corrélée au grade tumoral (Roth et al., 2013). D'autre part, il a été montré que les ligands de ces deux intégrines tels que la vitronectine et la fibronectine sont également surexprimés dans les GB (Gladson et al., 1995; Serres et al., 2014).

Les intégrines **$\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$** ont d'abord été impliquées dans l'**adhérence**, la **migration**, l'**invasion** et l'**angiogenèse** tumorale des GB (Scaringi et al., 2012). En effet, ces différents mécanismes sont notamment liés à la forte expression d' $\alpha\beta3$ et d' $\alpha\beta5$ à la surface des cellules endothéliales. Ces dernières peuvent interagir respectivement avec FGFR ou VEGFR2 présents sur les cellules tumorales, et ces interactions distinctes peuvent déclencher des voies de signalisation pro-tumorales comme décrit précédemment dans le paragraphe V de la partie 3 (Malric et al., 2017).

D'autre part, notre laboratoire a pu mettre en évidence que l'expression d' $\alpha\beta3$ est associée à un **mauvais pronostic** dans les GB (Ducassou et al., 2013). De plus, nous avons également montré qu' $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$ sont impliquées dans la **radiorésistance** des GB. En effet, elles sont capables d'inhiber la mort post-mitotique radio-induite, via l'activation de l'ILK (Monferran et al., 2008) mais aussi d'induire une boucle autocrine de régulation des voies de l'hypoxie, en stabilisant HIF1 α via l'activation de FAK (Skuli et al., 2009). Il a été montré par ailleurs que les rayonnements ionisants augmenteraient l'expression de ces deux intégrines et favoriseraient ainsi le potentiel invasif et angiogénique des cellules de GB (Abdollahi et al., 2005; Wild-Bode et al., 2001). L'ensemble de ces résultats a permis de mettre en évidence la contribution des intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$ à la radiorésistance des GB.

D'abord à visée anti-angiogénique dans le GB, différents inhibiteurs des intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$ ont été synthétisés (**Table 10**) tels que des anticorps monoclonaux (MEDI-522, CNTO 95), des peptides (Cilengitide), des peptidomimétiques (S247) ou des petites molécules antagonistes. Parmi eux, le **Cilengitide**, est la molécule la plus étudiée. Cette dernière est un pentapeptide cyclique synthétique, associé à une N-méthyl Valine, qui mime le motif RGD et permet le blocage spécifique des intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$ (**Figure 29**) (Mas-Moruno et al., 2011).

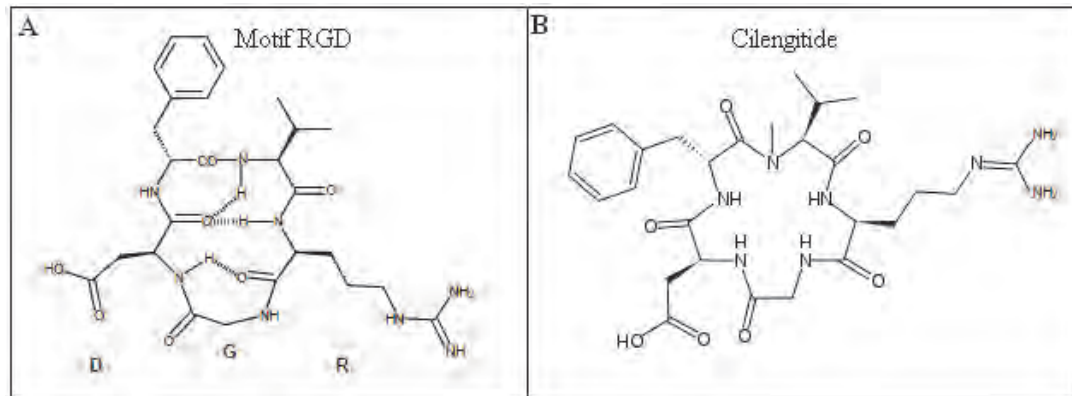


Figure 29 : Structures chimiques du motif RGD (29A) et du Cilengitide (29B) (Mas-Moruno et al., 2011) (Internet : <http://en.academic.ru/dic.nsf/enwiki/5496717>).

Le Cilengitide a d'abord fait l'objet d'études précliniques *in vitro* (lignées cellulaires de GBM : U87, SF763) puis *in vivo* (xénogreffes orthotopiques chez la souris *nude*) où il a pu montrer une activité antitumorale intéressante en inhibant à la fois l'angiogenèse et l'invasion tumorale et en favorisant l'apoptose des cellules endothéliales et des cellules de GB (Abdollahi et al., 2005; MacDonald et al., 2001; Nisato et al., 2003). En effet, en bloquant l'interaction des intégrines avec leurs ligands, le Cilengitide empêche notamment l'activation des voies de prolifération et survie cellulaire FAK, Src et Akt et favorise également le détachement des cellules, à l'origine des effets anti-angiogéniques et pro-apoptotiques observés (Oliveira-Ferrer et al., 2008).

D'autre part, l'inhibition des intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$ permettrait d'augmenter l'efficacité de la chimio- et de la radiothérapie. En effet, de par ses effets anti-angiogéniques, le Cilengitide réduit l'hypoxie, en faveur d'un plus grand apport en oxygène et donc d'une meilleure réponse à la radiothérapie (Skuli et al., 2009). Ceci pourrait favoriser la normalisation de la vascularisation, ce qui supporterait aussi une meilleure délivrance de la chimiothérapie. De plus, le Cilengitide étant lui-même cytotoxique, son association avec différents traitements, comme la chimio/radiothérapie conventionnelle ou encore avec des molécules de thérapies ciblées, apparaîtrait synergique (Tabatabai et al., 2010; Wachsberger et al., 2004).

Les résultats encourageants de ces études précliniques ont conduit à l'introduction du Cilengitide dans différents **essais cliniques** de phase I et II, en association avec la radio/chimiothérapie et en monothérapie, d'abord dans des GB récurrents puis nouvellement diagnostiqués, qui ont montré des réponses cliniques intéressantes (**Table 12**) (Nabors et al., 2012; Nabors et al., 2007; Stupp et al., 2010). Cette molécule s'est révélée très bien tolérée avec des bénéfices cliniques observés à la fois au niveau de la survie globale (*Overall Survival*, OS) et de la survie sans progression (*Progression-Free Survival*, PFS).

Suite à ces 1ers essais, d'autres études plus avancées comme CENTRIC (phase III) ou CORE (phase II) ont évalué l'efficacité du Cilengitide chez des patients atteints de GB avec

MGMT méthylé ou non respectivement, la méthylation de MGMT influant positivement le pronostic (cf. Partie 1, chapitre VIII). Ces essais n'ont pourtant pas permis d'obtenir les résultats escomptés (Nabors et al., 2013; Stupp et al., 2014). D'autres essais sont en cours (**Table 12**) mais les résultats ne sont pas encore connus. Le Cilengitide reste malgré tout à l'étude dans d'autres tumeurs solides où il pourrait devenir un traitement alternatif pour certains patients.

NOM de l'ESSAI	PHASE	PATIENTS	TYPE de TUMEUR	CILENGITIDE (DOSE + TRAITEMENTS)	RESULTATS (OS en mois, PFS à 6 mois)
NABTT9911 NCT00006093	I	51	Gliomes récurrents	Monothérapie 120 à 2400mg/m ² 2x/semaine	OS: 5.6
PBTC-012 NCT00063973	I	31	Tumeurs cérébrales récurrentes de l'enfant	Monothérapie 120 à 2400mg/m ² 2x/ semaine	Réponse complète: 1 Maladie stabilisée: 2
NCT00979862	I	45	Gliomes récurrents	Cilengitide 2000 mg/m ² 2x/ semaine + Cediranib 30mg/jour	OS : 6.5 PFS-6 : 4.4 %
CILENT-0902 NCT01165333	I	40	Gliomes diffus de l'enfant	Radiothérapie + Cilengitide 240 à 1800 mg/m ²	Terminé mais pas de résultats publiés
EMD-009 NCT00093964	II	81	GB récurrents	Monothérapie 500 ou 2000 mg/m ² 2x/ semaine	500mg: OS: 6.5; PFS-6: 10% 2000mg: OS: 9.9; PFS-6: 15%
EMD-010	I/IIa	52	GB nouvellement diagnostiqués	Traitement standard + 500 mg/m ² 2x/ semaine	OS : 16.1 PFS-6 : 69%
NABTC03-02 NCT00112866	II	30	GB récurrents	Monothérapie 500 vs 2000 mg/m ² 3 jours avant chirurgie puis 2000 mg/m ² 2x/ semaine	PFS-6: 12%
NABTT0306 NCT00085254	II	112	GB nouvellement diagnostiqués	Traitement standard + 500 vs 2000 mg/m ² 2x/ semaine	500mg: OS: 17.4 2000mg: OS : 20.8
ACNS0621 NCT00679354	II	30	Tumeurs cérébrales récurrentes de l'enfant	Monothérapie 1800 mg/m ² 2x/ semaine	Maladie stabilisée: 1
CORE NCT00813943	II	264	GB nouvellement diagnostiqués (MGMT non méthylé)	Traitement standard + 2000 mg/m ² 2 ou 5x/ semaine vs traitement standard	Cilengitide2x/sem. : OS : 16.3 Cilengitide5x/sem. : OS : 14.5
EXCENTRIC NCT01124240	II	48	GB nouvellement diagnostiqués (MGMT non méthylé)	Traitement standard + Cilengitide 2000 mg/m ² 2x/ semaine + Procarbazine 50 ou 100mg par jour pendant 6 semaines (+ traitement adjuvant)	OS : 14.5 PFS médian : 7.4
CENTRIC NCT00689221	III	504	GB nouvellement diagnostiqués (MGMT méthylé)	Traitement standard + 2000 mg/m ² 2x/ semaine vs traitement standard	OS : 26.3
NCT01517776	II		Gliomes récurrents (enfants et adolescents)	TMZ 75 mg/m ² /jour + Cilengitide1800 mg/m ² 2x/ semaine	Terminé (due à un rapport bénéfice/risque altéré)
NCT01044225	II		GB nouvellement diagnostiqués (MGMT non méthylé)	Traitement standard + Cilengitide 2000 mg/m ² 2x/ semaine vs traitement standard + Cetuximab (dose initiale 400 mg/m ² puis 250 mg/m ² par semaine)	Terminé (à cause des résultats de la phase III de l'essai RTOG0525/NCT00304031)

Table 12 : Tableau récapitulatif des essais cliniques du Cilengitide dans le GB (Malric et al., 2017).

I.3. Intégrine $\alpha 6\beta 1$

Une autre intégrine, **$\alpha 6\beta 1$** , a également été mise en évidence dans les GB. Cette intégrine est un récepteur de la laminine exprimé de façon relativement ubiquitaire dans l'organisme.

Elle a dans un premier temps été décrite comme **surexprimée** dans les GB et associée à un **potentiel invasif supérieur** (Delamarre et al., 2009). Puis, l'équipe de Lathia *et al.*, a démontré que cette intégrine était préférentiellement exprimée **à la surface des GSC** par rapport aux cellules différenciées de GB (Lathia et al., 2010). En effet, en étudiant la localisation de cette intégrine sur des coupes de tumeurs de patients, Lathia *et al.* ont mis en évidence qu' $\alpha 6$ colocalise avec d'autres marqueurs souches (CD133, Nestine...) et ce au niveau de zones périvasculaires, connues pour être des niches préférentielles pour les GSC. $\alpha 6$ s'ajoute ainsi au panel de **marqueurs** déjà établis des GSC afin de mieux définir cette population. L'équipe de Lathia a ensuite étudié un potentiel rôle tumorigène de cette intégrine $\alpha 6$, en triant par cytométrie les cellules de GB positives pour cette intégrine. Cette population cellulaire présente un taux de prolifération élevé, une forte capacité à former des neurosphères et l'injection en orthotopique de ces cellules chez la souris *nude* résulte en la formation rapide de tumeurs avec une diminution de la survie (Lathia et al., 2010). Une autre étude a démontré qu' $\alpha 6$ est impliquée dans la régulation des mécanismes d'invasion des GSC, en coopérant avec la N-cadherine et la voie Erk (*Extracellular signal regulated kinases*) (Velpula et al., 2012). L'expression de cette intégrine est donc associée *in vitro* et *in vivo* à un fort niveau de prolifération, des capacités d'invasion et des **propriétés souches agressives**. De plus, dans les GB, l'intégrine $\alpha 6\beta 1$ favoriserait la **survie** des cellules endothéliales en inhibant les voies pro-apoptotiques induites par la voie du TNF-R1 (*Tumor necrosis factor receptor*) (Huang et al., 2012).

Le **ciblage** de cette intégrine pourrait de fait apparaître prometteur au vu de ces données. Son inhibition par ARN interférant ou anticorps bloquant a ainsi montré *in vitro* et *in vivo* des effets bénéfiques (Lathia et al., 2010). Malgré ces résultats encourageants, cette cible putative ne fait actuellement pas l'objet d'essais cliniques à notre connaissance.

I.4. Autres intégrines

Bien qu' $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$ et $\alpha 6\beta 1$ soient actuellement les intégrines les plus décrites et les plus étudiées dans les GB, d'autres intégrines pourraient jouer un rôle important au sein de ces tumeurs. Ainsi, des études d'immunohistochimie portant sur l'expression des intégrines dans les glioblastomes par rapport au tissu sain adjacent, ont mis en évidence, en plus d' $\alpha v\beta 3$ et $\alpha v\beta 5$, une surexpression des intégrines **$\beta 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 6\beta 1$** dans les cellules de glioblastomes (Gingras et al., 1995) et des intégrines **$\beta 8$ et $\alpha 5\beta 1$** au niveau des zones périnécrotiques et périvasculaires des GB (Riemenschneider et al., 2005). La surexpression significative de ces intégrines suggère qu'elles pourraient jouer un rôle dans le développement et la progression de ces tumeurs cérébrales. De plus, la forte expression de certaines d'entre elles dans les gliomes ($\alpha 4$, $\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$) est associée au grade tumoral et à un pronostic de survie défavorable (Janouskova et al., 2012; Kawataki et al., 2007; Malric et al., 2017) (**Table 13**).

L'intégrine **$\beta 1$** en particulier, apparaît comme une nouvelle intégrine cible dans les GB. Qu'elle soit associée à la sous-unité **$\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ ou $\alpha 9$** , elle a été impliquée dans la prolifération, l'adhérence, la migration et la survie des cellules de glioblastomes *in vitro* (Delamarre et al., 2009; Kawataki et al., 2007; Maglott et al., 2006; Veeravalli et al., 2012). Ces mécanismes seraient possibles notamment par l'activation, via $\beta 1$, de la voie Akt/p130Cas/Paxilline (Cordes, 2006) ou encore de la voie Erk (Han et al., 2014). L'équipe de Cordes *et al.*, a également démontré que $\beta 1$ contribuerait à la radiorésistance tumorale, en interagissant notamment avec FAK, JNK, paxilline et p130Crk (*V-crk sarcoma virus CT10*

oncogene homolog) (Cordes and Park, 2007; Eke and Cordes, 2014; Vehlow et al., 2017). En effet, l'inhibition de cette intégrine par siRNA ou anticorps spécifique dans différentes lignées de gliomes permet de radiosensibiliser les cellules tumorales (Cordes et al., 2006; Vehlow et al., 2017). De plus, l'hétérodimère $\alpha 5\beta 1$ participe à la **prolifération** (Choy et al., 2013; Maglott et al., 2006), l'**invasion** (Blandin et al., 2016), l'**angiogenèse** tumorale (Desgrosellier and Cheresh, 2009) et la **résistance** (Renner et al., 2016), tandis qu' $\alpha 3\beta 1$ régulerait des processus d'**invasion** cellulaire (Chintala et al., 1996) et serait fortement exprimée par les **GSC** (Nakada et al., 2013). Son inhibition *in vivo* chez la souris *nude* xénogreffée a d'ailleurs permis de diminuer l'invasion tumorale (Kawataki et al., 2007).

Plus récemment encore, il a été montré que $\beta 4$ favoriserait, en interagissant avec la Netrine-4, la **prolifération** des cellules de GB (Hu et al., 2012) ainsi que la résistance à la sénescence induite par le Témzolomide (Li et al., 2013).

Enfin, la dernière intégrine tout nouvellement identifiée dans les GB et les GSC est $\alpha 7$, qui correspondrait à un marqueur fonctionnel voire une cible potentielle de ces tumeurs (Haas et al., 2017).

INTEGRINES	ROLES DANS LES GB	VOIES DE SIGNALISATION ASSOCIEES
$\alpha v\beta 3$	Migration, Invasion Angiogenèse Survie Résistance aux thérapies Marqueur pronostic	FAK, shc/MAPK, RhoGTPases, Src, MMP-2 FGF, TNF α , FAK, ILK, PI3K/Akt, SDF-1/CXCR4, Plexin-B1/RhoB/SRPK1 PAK4 ILK/RhoB, FAK/HIF α
$\alpha v\beta 4$	Prolifération Résistance aux thérapies	Netrine-4 Netrine-4
$\alpha v\beta 5$	Migration, Invasion Angiogenèse Résistance aux thérapies	FAK, shc/MAPK, RhoGTPases, Src VEGF, FAK, ILK, PI3K/Akt, SDF-1/CXCR4 ILK/RhoB, FAK/HIF α
$\alpha v\beta 8$	Invasion Angiogenèse	RhoGDI-1 TGF- β
$\alpha 3\beta 1$	Migration, Invasion Etat souche Marqueur pronostic	Tétraspamine CD151
$\alpha 5\beta 1$	Prolifération Migration, Invasion Angiogenèse Survie Résistance aux thérapies	Anosmin-1, RhoGTPase Rap1A MMP-2, fibronectine FGF p53/PEA-15/survivine, Périostine, Akt/paxillin/p130Cas/JNK
$\alpha 6\beta 1$	Invasion Etat souche	Erk, N-cadherine Tétraspamine CD151
$\alpha 7$	Marqueur fonctionnel Etat souche	
$\alpha 9\beta 1$	Migration Angiogenèse	NGF

Table 13 : Tableau récapitulatif des intégrines impliquées dans les GB. SRPK1 : *Serine/arginine protein kinase 1*, PAK4 : *Serine/thrénine p21-activating kinase 4*, PEA-15 : *Phosphoprotein enriched in astrocytes 15*, JNK : *c-Jun N-terminal kinase*, NGF : *Nerve growth factor* (Malric et al., 2017).

D'autres intégrines sont probablement impliquées dans la tumorigenèse des GB (Malric et al., 2017). Diverses équipes de recherche, et notamment mon équipe d'accueil, tentent de les identifier afin de définir de nouvelles cibles thérapeutiques qui pourraient permettre d'améliorer sensiblement le traitement de ces tumeurs cérébrales.

Notre laboratoire s'intéresse particulièrement aux intégrines qui pourraient être présentes à la surface des GSC, étant donné la forte agressivité et la forte résistance de cette population cellulaire. L'intégrine $\beta 8$ a ainsi pu être mise en évidence au sein du laboratoire comme une cible potentielle des GSC, et fait l'objet de la suite de ce mémoire de thèse.

II. Mise en évidence et caractéristiques de l'intégrine $\beta 8$ dans les GSC

II.1. Vers la mise en évidence de l'intégrine $\beta 8$ dans les GSC

L'équipe d'accueil de ma thèse est spécialisée dans la recherche translationnelle sur la radiosensibilisation des GB et compte parmi ses objectifs l'identification de nouveaux acteurs moléculaires favorisant le maintien et la survie des GSC afin de les cibler plus particulièrement. Comme exposé précédemment, les intégrines, via leurs rôles majeurs tout au long de la progression tumorale, sont des candidates potentielles intéressantes. Il a récemment été décrit dans la littérature que les GSC exprimaient peu $\alpha v\beta 3/\alpha v\beta 5$ (Roth et al., 2013), ce qui pourrait en partie expliquer l'échec du Cilengitide en clinique. Cependant, d'autres études ont pu montrer que l'intégrine $\alpha 6\beta 1$ est plus fortement exprimée à la surface des GSC par rapport aux cellules différenciées et que cette intégrine aurait un rôle important dans le maintien des caractéristiques souches des GSC (Lathia et al., 2010). D'autres intégrines ($\alpha 3$, $\alpha 7$ et $\beta 8$) ont par la suite été associées aux GSC (Guerrero et al., 2017; Haas et al., 2017; Nakada et al., 2013). Il apparaît donc que **certaines intégrines bien spécifiques pourraient être d'une importance majeure dans la régulation des GSC** et par conséquent d'un intérêt potentiel afin de cibler cette population.

En ce sens, mon laboratoire d'accueil a mis en place une **analyse transcriptionnelle à haut-débit** (technologie Fluidigm Biomark) afin d'analyser les profils d'expression des différentes intégrines dans plusieurs primocultures de GSC (isolées à partir de résections tumorales de patients) comparativement aux primocultures de cellules de GB différenciées. Ces résultats ont pu confirmer l'augmentation relative de l'intégrine $\alpha 6$ dans les GSC par rapport aux cellules différenciées de GB, mais ont également mis en évidence **une forte surexpression de l'intégrine $\beta 8$** dans toutes les primocultures de GSC étudiées. L'intérêt de l'équipe s'est donc porté sur $\beta 8$ afin d'identifier son rôle dans les GSC.

II.2. Présentation de l'intégrine $\beta 8$

L'intégrine $\beta 8$ est encore peu étudiée dans la littérature, mais quelques études ont pu mettre en évidence des caractéristiques structurelles et fonctionnelles uniques de cette protéine par rapport aux autres intégrines.

II.2.1. Structure de l'intégrine $\beta 8$

L'intégrine $\beta 8$ est codée par le gène ITGB8 présent sur le chromosome 7 (localisation 7p21.1, exon 20) et sa séquence est très conservée chez les vertébrés. D'un point de vue structurel, cette intégrine est une glycoprotéine qui se présente sous la forme d'un **hétérodimère** toujours associé à la sous-unité αv (Takada et al., 2007) et qui appartient à la classe des intégrines capables de reconnaître le motif RGD (cf. Partie 3, chapitre III) (**Figure 30**). La structure de $\beta 8$ (90kDa) se compose, comme toutes les intégrines, d'une large partie extracellulaire (environ 639 acides aminés), d'une portion transmembranaire (environ 30 acides aminés) et d'une partie cytoplasmique C-terminale (environ 58 acides aminés) (Moyle et al., 1991). Toutefois, la séquence en acides aminés de $\beta 8$ s'avère différente de toutes les autres sous-unités β . En effet, 6 des 56 cystéines normalement conservées dans la partie extracellulaires des sous-unités β , sont absentes de l'intégrine $\beta 8$ et sa séquence ADMIDAS est distincte de celles des autres β intégrines. De plus, la partie cytoplasmique ne partage aucune homologie avec les autres régions cytoplasmiques des autres sous-unités β (elle ne contient pas notamment les motifs de types NPXY hautement conservés) (Hu and Luo, 2017; Moyle et al., 1991; Nishimura et al., 1994) (**Figure 30D**).

Ces caractéristiques structurales uniques, laissent supposer que $\beta 8$ pourrait avoir des modes d'activation (pas « d'*inside-out* classique ») ainsi que des rôles différents des autres sous-unités β . En effet, elle est décrite comme une « exception » et serait toujours sous forme activée, même en conditions physiologiques (conformation de haute affinité constitutive) (Hu and Luo, 2017).

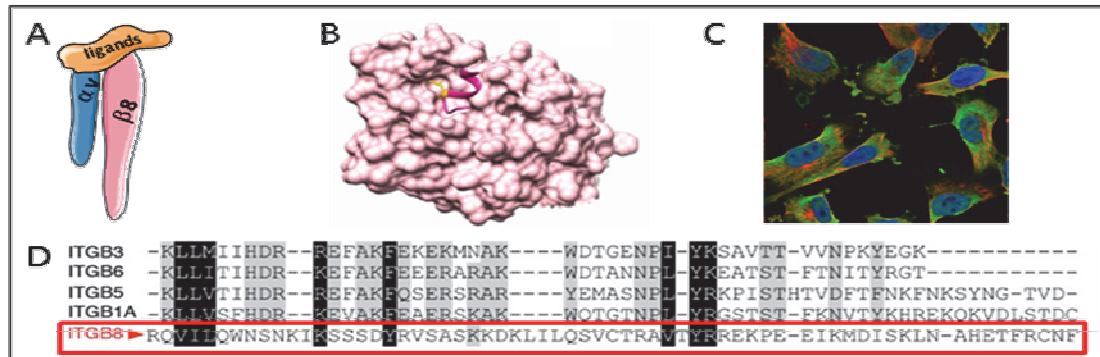


Figure 30 : Intégrine $\beta 8$. A. Représentation schématique de $\beta 8$. B. Structure cristallographique prédictive de $\beta 8$ (Ozawa et al., 2016). C. Immunofluorescence de $\beta 8$ retrouvée à la surface cellulaire et au niveau cytoplasmique. D. Séquences primaires en acides aminés de $\beta 8$ et des autres sous-unités β (Cheerathodi et al., 2016).

II.2.2. Ligands, voies de signalisation et régulation de $\beta 8$

Les ligands identifiés d' $\alpha v\beta 8$ sont essentiellement des **protéines de la MEC** (vitronectine, fibronectine, laminine, fibrilline) (Takada et al., 2007; van der Flier and Sonnenberg, 2001) mais surtout (affinité 100 fois plus importante) le **LAP-TGF- $\beta 1/3$** , la protéine latente du complexe du TGF- $\beta 1$ et 3 (**Figure 31**). La liaison de $\beta 8$ avec cette protéine latente entraîne l'activation du TGF- β selon différents mécanismes. Le premier mécanisme consiste au recrutement de MMP (MT1-MMP par exemple), qui vont cliver le LAP-TGF- β et libérer ainsi le TGF- β afin que ce dernier puisse se fixer sur ses récepteurs et exercer ses différentes fonctions. Le second mécanisme correspond à des modifications de conformation qui conduisent à l'exposition du domaine fonctionnel du TGF- β (Cambier et al., 2005). Il est intéressant de noter que plusieurs intégrines αv ($\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha v\beta 6$ et $\alpha v\beta 8$) sont capables de lier le LAP-TGF- β (Munger and Sheppard, 2011), et seraient donc susceptibles d'induire l'activation potentielle du TGF- β (Hinz, 2013). Les intégrines ne sont toutefois pas les seules protéines capables d'activer le TGF- β , ce dernier peut également être activé par la TSP-1, la neuropiline-1, la plasmine ou d'autres MMP (MMP-2 et MMP-9) (Annes et al., 2003). Cependant, un nombre croissant d'études démontrent des rôles essentiels du TGF- β , au niveau physiologique ou dans les pathologies, sous le contrôle de son activation par $\beta 8$, ce qui signifie que même si $\beta 8$ n'est pas l'unique activateur du TGF- β , l'activation de ce dernier par cette intégrine semble être relativement majoritaire et associée à des conséquences spécifiques (Ozawa et al., 2016).

La liaison des différents ligands à $\beta 8$ permet l'activation de cette intégrine qui va pouvoir déclencher différentes voies de signalisation (**Figure 31**). Comme vu précédemment, $\beta 8$ peut activer la voie du TGF- β , qui de façon autocrine ou paracrine sur les cellules tumorales ou endothéliales, peut favoriser la prolifération, la migration, l'invasion ou encore l'angiogenèse. De plus, au niveau intracellulaire, $\beta 8$ peut interagir, contrairement aux autres sous-unités β , avec des protéines de la famille **Band4.1** (McCarty et al., 2005a), la **Neuropilin-1** (Hirota et al., 2015), la protéine adaptatrice du cytosquelette **Spinophilin** (SPN) (Cheerathodi et al., 2016) ou encore avec la protéine **RhoGDI-1** (*Rho GDP-dissociation inhibitor 1*) (Lakhe-Reddy et al., 2006; Lee et al., 2015), un régulateur de l'activation de RhoGTPases (par exemple **Rac1**(=PAK1) et **Cdc42**). Toutes ces interactions peuvent notamment induire la prolifération, la migration et l'invasion cellulaire (Mobley et al., 2009).

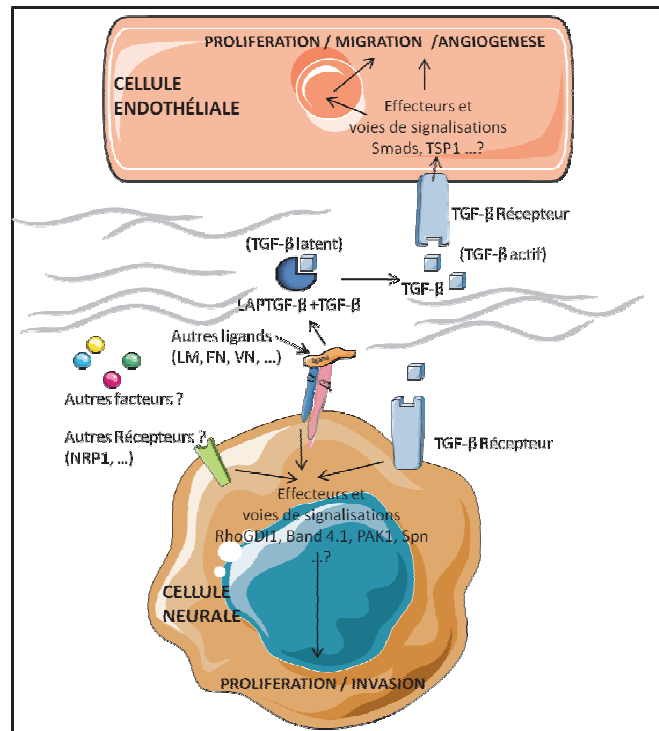


Figure 31 : Représentation schématique des voies de signalisation de l'intégrine $\beta 8$ et des conséquences fonctionnelles associées. D'après (Hinz, 2013; Mobley et al., 2009).

D'autre part, l'équipe de Nishimura a permis d'identifier et de caractériser le promoteur de $\beta 8$ et de démontrer une régulation fine de l'expression de cette intégrine sous le contrôle des facteurs de transcriptions **SP3** (*Transcription factor SP3*), **AP-1** (*Activator protein 1*) et de la MAP kinase pro-inflammatoire **p38** (Markovics et al., 2010). Un an après, cette même équipe rajoute l'implication de l'IL-1 β qui, par des remodelages de la chromatine induits via les voies NF- κ B et p38, favorise également la transcription de $\beta 8$ (Markovics et al., 2011). De plus, l'expression de $\beta 8$ est aussi régulée par des miRNA tels que miRNA-93 (Fang et al., 2011; Li et al., 2014), miR-142-3p (Li et al., 2018), miR19B-3p (Huang et al., 2017).

II.2.3. Expression et fonctions de l'intégrine $\beta 8$

A ce jour, $\beta 8$ n'est retrouvée exprimée qu'au niveau de certains tissus bien particuliers que sont le **cerveau**, le **rein**, les **poumons**, le **système immunitaire** et le **placenta** (Figure 32).

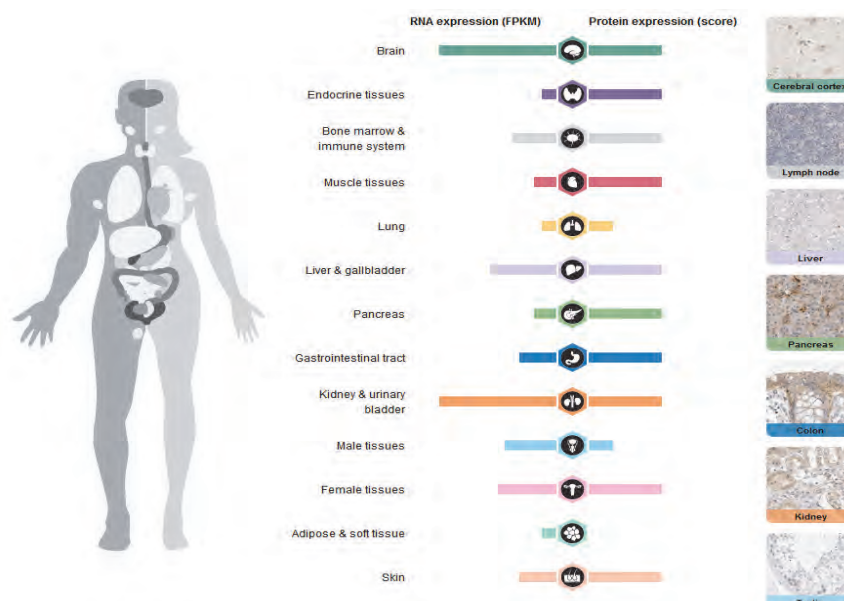


Figure 32 : Expression tissulaire de l'intégrine $\beta 8$ (<http://www.proteinatlas.org/>).

Au niveau cérébral, l'intégrine $\beta 8$ est située principalement à la surface des **cellules souches neurales (NSC) et progénitrices neurales (NPC)**, ainsi qu'à la membrane des **astrocytes et des cellules neuroépithéliales**. Là, elle est essentielle à la **neurogenèse** (Mobley and McCarty, 2011; Mobley et al., 2009) et la **neuroprotection** en cas d'hypoxie (Li et al., 2010). Ce dernier mécanisme s'expliquerait par une surexpression de $\beta 8$ à la surface des astrocytes sous hypoxie. Celle-ci permettrait l'activation du TGF- β qui pourrait alors, de façon paracrine, protéger les neurones à proximité, de la mort cellulaire, en induisant notamment la synthèse des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL (Li et al., 2010). De plus, $\beta 8$ serait impliquée dans le contrôle de l'**angiogenèse** cérébrale au niveau fœtal mais aussi chez l'adulte, toujours via l'activation du TGF- β et une action paracrine de ce dernier au niveau des CE (Cambier et al., 2005). $\beta 8$ pourrait aussi favoriser le développement des VS cérébraux par l'adhérence de ligands de la MEC le long de la membrane basale vasculaire, les cellules gliales exprimant $\beta 8$ étant juxtaposées aux CE (McCarty et al., 2004)

En ce qui concerne le rein, elle est exprimée par les **cellules mésangiales rénales** où elle favorise leur survie, leur maintien et leur migration (Lakhe-Reddy et al., 2006; Lakhe-Reddy et al., 2014) ainsi que la protection des cellules endothéliales glomérulaires présentes à proximité (Khan et al., 2011). Ces fonctions de $\beta 8$ seraient sous le contrôle du récepteur Fas (Jarad et al., 2002).

Dans les poumons, $\beta 8$ serait également impliquée dans la régulation de la prolifération des cellules **épithéliales pulmonaires** (Cambier et al., 2000).

$\beta 8$ est également exprimée par les lymphocytes T régulateurs où via la régulation de l'activation du TGF- β , elle supprime l'inflammation induite par ces lymphocytes T régulateurs (Boucard-Jourdin et al., 2016; Edwards et al., 2014; Stockis et al., 2017; Worthington et al., 2015).

Enfin, son expression au niveau du placenta apparaît primordiale, puisque le KO de cette intégrine est **embryonnaire léthal** (Proctor et al., 2005; Zhu et al., 2002). Le déficit en $\beta 8$ se traduit en effet par des défauts de vascularisation importants à la fois placentaires et cérébraux (Proctor et al., 2005; Zhu et al., 2002). Cette intégrine apparaît donc essentielle, d'autant plus que c'est la seule sous-unité β de la classe des intégrines liant la vitronectine ($\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha v\beta 6$ et $\alpha v\beta 8$) pour laquelle le KO est léthal (Markovics et al., 2010). De plus, ce phénotype KO est similaire à celui observé chez les souris KO pour la sous-unité αv (Bader et al., 1998). Récemment, il a été montré que $\beta 8$, en contrôlant l'activation du TGF- $\beta 1$ et via l'axe FAK/VAV/RAC1, régule l'implantation de l'embryon (Kumar et al., 2015; Kumar et al., 2017).

II.2.4. Intégrine $\beta 8$ en pathologie

Des altérations d'expression de $\beta 8$ ont pu être associées à diverses pathologies comme les malformations cérébrales artério-veineuses (Su et al., 2010), les hémorragies intracérébrales (Dardiotis et al., 2017), la sclérose systémique (Giusti et al., 2013), la fibrose pulmonaire (Araya et al., 2007), l'atrésie biliaire (Iordanskaia et al., 2014) ou encore des colites digestives (Travis et al., 2007).

De plus, cette intégrine a pu être mise en évidence récemment dans le domaine de la cancérologie. Elle apparaît ainsi surexprimée dans les cancers du sein associés à la mutation de BRCA1 (Culhane and Quackenbush, 2009) et dans les mélanomes métastatiques (Vizkeleti et al., 2017). Elle est également retrouvée associée au cancer du poumon métastatique (Xu and Wu, 2012), du côlon (Chao et al., 2012), de la prostate (Mertens-Walker et al., 2015) et au cancer du foie (Wang et al., 2015), ou dans ce dernier elle favorise la résistance au traitement (Géfitinib). Plus récemment encore, quelques études permettent de penser que $\beta 8$ pourrait avoir un rôle majeur dans la tumorigenèse des Glioblastomes (Reyes et al., 2013; Tchaicha et al., 2011).

II.3. Intégrine $\beta 8$, gliomes et GSC

Au vu des résultats préliminaires obtenus au laboratoire (cf. Partie 4, chapitre II.1), l'intégrine $\beta 8$ a retenu notre attention comme une intégrine pouvant avoir une fonction importante et spécifique dans les GSC. A ce jour, peu d'études se sont intéressées à ce possible rôle de $\beta 8$ dans ces cellules, mais différents arguments de la littérature viennent appuyer notre hypothèse.

Tout d'abord, il est décrit dans la littérature **un rôle majeur de $\beta 8$ dans la régulation et le maintien des Cellules Progénitrices Neurales saines** chez la souris (Mobley et al., 2009). Pour étudier ce rôle de $\beta 8$ chez la souris adulte, l'équipe de Mobley *et al* a utilisé des souris génétiquement modifiées hétérozygotes pour $\beta 8$ ($\beta 8+/-$), qu'elle a ensuite croisées avec des souris non mutées ($\beta 8+/+$) d'un autre fond génétique pour obtenir, au final, des souris KO ($\beta 8-/-$) qui parviennent à l'âge adulte (< 40 %) (Mobley et al., 2009). L'équipe de Mobley *et al* a ainsi pu démontrer que cette intégrine était essentielle à l'autorenouvellement et à la prolifération des NPC cultivées sous forme de neurosphères. La délétion de $\beta 8$ serait également associée à une augmentation de la mort cellulaire dans le cerveau des souris $\beta 8-/-$. Les souris $\beta 8-/-$ adultes ou au stade embryonnaire présentent aussi une altération de la formation des vaisseaux sanguins cérébraux, se traduisant par d'importantes zones hémorragiques cérébrales (McCarty et al., 2005b; Mobley et al., 2009). Au niveau mécanistique, $\beta 8$ régulerait la stabilisation des VS cérébraux en interagissant avec β -Pix (l'isoforme β de la protéine PAK) (Liu et al., 2012). Cette intégrine $\beta 8$ serait en conséquence indispensable à la **neurogenèse** et l'**homéostasie neurovasculaire** (Cambier et al., 2005; McCarty et al., 2005b; Mobley et al., 2009). Son rôle dans le maintien de la population de NPC laisse supposer que $\beta 8$ pourrait avoir une fonction similaire au sein des GSC.

De plus, de récents travaux ont révélé que certaines lignées humaines établies de GB (U87, LN18, U373, LNZ208, LN428, SNB19, LN229) expriment effectivement des niveaux variables de $\beta 8$ (Roth et al., 2013; Tchaicha et al., 2011) et que **des GSC de patients expriment également cette intégrine** sous la forme du dimère $\alpha\beta 8$ (Guerrero et al., 2017; Roth et al., 2013).

Ce dimère n'apparaît être exprimé, dans le cerveau sain, qu'au niveau des cellules neurales, notamment astrocytaires, à la différence de $\alpha\beta 3/\alpha\beta 5$, présentes également à la surface des cellules endothéliales cérébrales mais peu sur les GSC (Cambier et al., 2005). D'autre part, une autre étude a pu montrer que $\beta 8$ serait exprimée, chez les patients atteints de GB, au niveau des **zones péri-vasculaires et/ou péri-nécrotiques** (Riemenschneider et al., 2005), connues comme des niches privilégiées pour les GSC.

Le LAP-TGF- β compte parmi les ligands identifiés d' $\alpha\beta 8$, et sa liaison avec $\beta 8$ entraîne l'**activation du TGF- β** (Cambier et al., 2005). A ce propos, il a été montré que des antagonistes du récepteur au TGF- β dans les GSC permettaient de les cibler et de diminuer leur tumorigenèse ainsi que leur radiorésistance (Anido et al., 2010; Hardee et al., 2012).

Actuellement, différents rôles de $\beta 8$ ont pu être identifiés dans des modèles expérimentaux de GB. Cette intégrine aurait notamment un **rôle pro-invasif** dans les cellules de GB (Reyes et al., 2013) tout en **régulant négativement l'angiogenèse** dans des astrocytes humains transformés (Tchaicha et al., 2011). Ces effets pourraient être dépendants de l'activation du TGF- β via la liaison par $\beta 8$ du LAP-TGF- β et une action autocrine ou paracrine de ce facteur de croissance sur les cellules de GB ou les cellules endothéliales adjacentes. Ces effets pourraient également dépendre des voies de signalisation

intracellulaires activées par $\alpha v\beta 8$ dans les cellules de GB (Reyes et al., 2013). Enfin, une autre étude a démontré que le micro-RNA miR-93, en ciblant notamment l'intégrine $\beta 8$, favorisait la croissance et l'angiogenèse tumorale dans des modèles *vitro* et *vivo* de GB (Fang et al., 2011). Les fonctions précises de $\beta 8$ dans les GB restent encore à éclaircir. Très récemment, fin 2017, le rôle de l'intégrine $\beta 8$ dans la tumorigenèse des GSC a commencé à être exploré (Guerrero et al., 2017). Dans cette étude, il a été montré, à partir de cellules humaines de GB triées selon leur expression de $\beta 8$, que celles exprimant fortement $\beta 8$ sont définies par une capacité d'autorenouvellement supérieure, une meilleure expression des marqueurs souches *in vitro* et une augmentation de la tumorigénicité *in vivo*. Toutefois le rôle de l'intégrine $\beta 8$ dans la viabilité, la migration et la radiorésistance des GSC n'a jamais été exploré.

HYPOTHESE ET OBJECTIFS DE LA THESE

Nous avons supposé que les GSC nécessiteraient certaines intégrines bien spécifiques pour préserver leur intégrité et leurs fonctions. L'intégrine $\beta 8$ a ainsi retenu notre attention comme pouvant avoir des fonctions spécifiques dans les GSC, notamment au vu de son rôle dans les cellules progénitrices neurales. Cette intégrine, présentée en détail dans la Partie 4 - Chapitre II de cette thèse, pourrait ainsi avoir une fonction similaire dans les GSC, cette sous-population exprimant en effet $\alpha v\beta 8$. De plus, la surexpression de $\beta 8$ est associée à une diminution de la survie chez les patients atteints de gliomes.

Mon hypothèse est donc que $\beta 8$ serait impliquée dans le maintien de l'état souche des GSC et, en raison de la forte radiorésistance de ces cellules, contribuerait ainsi aux mécanismes de radiorésistance dans les GB.

Les objectifs de ma thèse ont donc été les suivants :

1) Etude de l'expression de $\beta 8$ dans différentes lignées primaires de GSC par rapport aux cellules différenciées de GB.

Objectif n°1 : utiliser $\beta 8$ comme marqueur sélectif des GSC.

2) Rôle de l'intégrine $\beta 8$ *in vitro* et *in vivo* dans le maintien de l'état souche, la survie, la prolifération, l'auto-renouvellement et la tumorigenèse des GSC. L'implication de $\beta 8$ et les voies de signalisation associées sont déterminées via l'inhibition spécifique de cette intégrine par ARN interférence.

Objectif n°2 : considérer $\beta 8$ comme une cible thérapeutique capable de réduire la population de GSC dans les tumeurs.

3) Rôle de l'intégrine $\beta 8$ *in vitro* dans les mécanismes de radiorésistance intrinsèques aux GSC. L'inhibition de $\beta 8$ permet d'étudier son rôle dans la radiorésistance et les voies de signalisation attenantes.

Objectif n°3 : utiliser l'inhibition de $\beta 8$ comme nouvelle stratégie radiosensibilisante en association à la radiothérapie dans le traitement des glioblastomes.

RESULTATS

I. Introduction des résultats

Les Glioblastomes (GB) sont des tumeurs cérébrales très agressives qui malgré un traitement associant chirurgie et radiochimiothérapie, **récidivent de façon quasi-systématique**. Le GB reste donc un cancer de pronostic très sombre, la survie médiane ne dépassant pas 15 mois. De nouvelles thérapies ciblées sont développées pour vaincre la forte résistance de ces tumeurs (Introduction Partie 1).

Depuis plusieurs années, notre équipe « Radiorésistance tumorale : des voies de signalisation à l'essai clinique » développe **un axe de recherche en transfert en radiothérapie** dans le but d'optimiser l'efficacité de l'irradiation dans les GB. Pour cela, nous explorons les voies biologiques contrôlant la radiorésistance tumorale et le micro-environnement, en particulier l'hypoxie, l'angiogenèse, la migration, et la plasticité radio-induite, à la fois *in vitro* puis *in vivo* sur modèle orthotopique. Nous réalisons ensuite des études pré-cliniques validant l'intérêt de l'inhibition des cibles potentielles identifiées en amont par des thérapies ciblées en association à la radiothérapie. Nous développons alors, en association avec le département de radiothérapie de l'Institut Universitaire du Cancer de Toulouse - Oncopole, des essais cliniques de phases précoces (I/II) issus des résultats du laboratoire associant les inhibiteurs de ces cibles à la radiothérapie dans le traitement des GB. Tous les essais développés intègrent également des études de marqueurs biologiques de réponse à ces associations thérapeutiques ainsi que de l'imagerie métabolique et fonctionnelle. Ainsi, notre équipe a notamment **pu démontrer l'implication de l'axe FGF2/FGFR1 et des intégrines $\alpha\beta3/\alpha\beta5$** ainsi que **de leurs voies en aval** dans la **radiorésistance, l'hypoxie et l'angiogenèse des GB**. Nous avons étudié la valeur pronostique de ces protéines dans la réponse clinique à la radio-chimiothérapie dans les GB, confirmant ainsi l'intérêt de ces protéines comme cibles thérapeutiques à inhiber afin d'accroître la radiosensibilité tumorale de certaines tumeurs.

Parmi nos cibles d'intérêt, les intégrines, très étudiées, font l'objet d'un nombre croissant d'essais cliniques. Ces molécules, présentes à la surface des cellules, favorisent leur adhérence avec le milieu extérieur et leur pouvoir invasif, deux éléments clés dans la progression tumorale (Introduction Partie 3). Dans le GB, le Cilengitide (inhibiteur des intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$), a suscité l'espoir mais une étude clinique de phase III a démontré récemment qu'il n'améliorait pas la survie moyenne des patients, comme la plupart des essais en cours pour ces tumeurs. **Il est donc urgent d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques s'opposant à la forte résistance des GB**. Une des raisons pouvant expliquer l'échec du Cilengitide est que, dans les GB, existent de nombreux types cellulaires, dont une population de cellules cancéreuses peu différenciées, résistantes et invasives, appelées cellules souches de GB (GSC) (Introduction Partie 2). Ces GSC, n'exprimant que faiblement $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$ à leur surface membranaire, pourraient ainsi échapper à l'action du Cilengitide et survivraient à la radio/chimiothérapie pour favoriser la récurrence tumorale.

Nous avons alors fait l'hypothèse dans le cadre de cette thèse que **les GSC pourraient avoir besoin de certaines intégrines bien spécifiques** pour préserver leur intégrité et leurs fonctions.

L'intégrine $\beta 8$ a retenu notre attention comme une nouvelle intégrine pouvant avoir des fonctions spécifiques dans les GSC. En effet, il est décrit un rôle majeur de $\beta 8$ dans la survie et l'auto-renouvellement des cellules progénitrices neurales saines. $\beta 8$ pourrait ainsi avoir une fonction similaire dans les GSC, de récents travaux ayant confirmé que cette sous-population exprime cette intégrine, à la différence d' $\alpha v\beta 3$ et $\alpha v\beta 5$. La surexpression de $\beta 8$ est aussi associée à une diminution de la survie chez les patients atteints de gliomes (bas et hauts grades) (Introduction Partie 4).

Notre hypothèse est donc que **$\beta 8$ serait impliquée dans le maintien de l'état souche des GSC** et, en raison de la forte radiorésistance de ces cellules, contribuerait ainsi à la mise en place de **mécanismes de résistance aux rayonnements ionisants dans les GB**.

Notre étude a abouti à l'élaboration, la rédaction et la soumission d'un article en février 2018, présenté ci-après. De plus, préalablement à cette publication, un dépôt de brevet, dont je suis co-inventrice, a été entrepris (cf. **Annexe 2**). J'ai également présenté ces résultats à différents congrès nationaux et internationaux sous la forme de communications affichées (cf. **Annexe 1**).

II. Article

THERAPEUTIC INTEREST OF INTEGRIN BETA-8 TARGETING TO DIFFERENTIATE AND RADIOSENSITIZE GLIOBLASTOMA-INITIATING CELLS

Laure Malric¹, Sylvie Monferran^{1,2}, Caroline Delmas¹, Florent Arnauduc^{1,3}, Perrine Dahan¹,
Sabrina Boyrie¹, Pauline Deshors¹, Vincent Lubrano^{3,4}, Dina Ferreira Da Mota³, Julia
Gilhodes⁵, Thomas Filleron⁵, Aurore Siegfried^{1,5}, Solène Evrard^{1,3,5}, Aline Kowalski-
Chauvel¹, Elizabeth Cohen-Jonathan Moyal^{1,3,5,*}, Christine Toulas^{1,5,*} and Anthony
Lemarié^{1,2,†,*}

¹ INSERM UMR 1037, Center for Cancer Research of Toulouse, Toulouse, France.

² Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, France.

³ Faculty of Medicine of Rangueil, University of Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, France.

⁴ INSERM UMR 1214 - ToNIC, Toulouse, France

⁵ IUCT-Oncopole, Toulouse, France.

Author Notes:

* These authors contributed equally to this work.

† Corresponding author: Anthony Lemarié,

Tumor radioresistance, from signalling pathways to therapy

Inserm U1037 Toulouse Cancer Research Center CRCT

2 av. Hubert Curien, 31100 Toulouse, FRANCE

Phone: +33 (0)5 82 74 16 06. E-mail: anthony.lemarie@inserm.fr.

Running Title: ITGB8-targeting hampers GB-initiating cells

II.1. Abstract

Glioblastomas are malignant brain tumors with poor prognosis despite treatment with surgery and radio/chemotherapy. These tumors are defined by an important cellular heterogeneity and notably contain a particular subpopulation of Glioblastoma-initiating cells (GIC), which largely contribute to tumor aggressiveness, resistance and recurrence. Current research focuses on developing GIC targeted therapies to improve treatment. Among these targets, integrins are the subject of numerous studies since these extracellular matrix transmembrane receptors notably control tumor invasion and progression. Moreover, some of these integrins may be considered as GIC markers. Here we identify $\beta 8$ integrin as a potential selective target in this highly tumorigenic GIC subpopulation. We first demonstrated in several primocultures isolated from patients, that $\beta 8$ is overexpressed in GIC compared to their differentiated progeny. Furthermore, $\beta 8$ is also overexpressed in Glioblastoma and its overexpression is correlated with a bad prognosis and with the expression of several other classic stem markers. Moreover, we showed that this integrin could be associated with characteristics and features unique to Glioblastoma-initiating cells, including self-renewal ability, stemness status and tumor formation capacity. We also demonstrated that $\beta 8$ integrin blockade can significantly impair GIC cell viability, migration and radioresistance. Finally, our findings identify $\beta 8$ integrin as a new selective GIC marker and point out that its targeting in GB represents a new promising therapeutic strategy in combination with standard chemo-radiotherapy.

Keywords

Glioblastoma; Integrin $\beta 8$; Glioblastoma-initiating cells; cancer stem cell marker; Targeted therapy; Radiosensitizing strategy.

II.2. Introduction

Glioblastoma (GB, Grade IV glioma) is the most frequent and lethal malignant primary adult brain tumour. Surgical resection followed by radio/chemotherapy (30x2Gy and Temozolomide) are the current standard of care. However, prognosis remains extremely poor (median survival of ~15 months) (Weller et al., 2014). Recurrences may be notably explained by the strong cellular heterogeneity of these tumors which contain GB-initiating cells (GIC) (Lathia et al., 2015). GIC are characterized by their unlimited self-renew ability, their stem markers overexpression (CD133, Nestin, Olig2, Sox2, Nanog, A2B5, ITGA6...), their multipotent aptitude to differentiate into neural lineages, their localization in perivascular niches, their invasion capacity, their strong radio/chemoresistance and their higher tumorigenic potential (Lathia et al., 2015). Consequently, GIC targeting represents a strong therapeutic interest in GB.

Among the most considered targets, integrins are the subject of an increasing number of studies. These transmembrane receptors are composed of two non-covalently associated α and β subunits and are key components of the dialogue between cells and their microenvironment. They regulate cell adhesion to extracellular matrix (ECM) or cell surface proteins. They also serve as transmembrane links between extracellular contacts and intracellular cytoskeleton via a bidirectional signaling (inside-out/outside-in) (Takada et al., 2007). Integrins can then activate pathways leading to gene transcription to sustain proliferation, survival, differentiation and migration (Hehlgans et al., 2006; Takada et al., 2007). In GB, several integrins have been implicated in GB progression. $\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$ and $\beta1$ are involved in invasion, angiogenesis and radioresistance (for review (Malric et al., 2017)). Moreover, $\alpha3$ (Nakada et al., 2013), $\alpha6$ (Lathia et al., 2010), $\alpha7$ (Haas et al., 2017) and $\beta8$ (Roth et al., 2013) were reported to be overexpressed in GIC and, particularly for $\alpha6$ and $\alpha7$, to be associated with GIC stemness (Malric et al., 2017). Thus, GIC might express a specific integrin pattern compared to other tumor cells and some of these integrins may be considered as specific GIC targets. Considering that clinical targeting of $\alpha\beta3/\alpha\beta5$ integrins in GB patients led to some disappointing results in a recent phase III trial, (Stupp et al., 2014) there is an urgent need to identify new targets specific to this GIC population.

Beta8 integrin ($\beta8$) has drawn our attention as a new integrin that may have specific functions in GIC. $\beta8$ heterodimerizes with αv and is able to link RGD (arginine-glycine-aspartic acid) motifs such as in vitronectin, laminin and latent-TGF β 1/3. $\beta8$, expressed in restrictive cell types including neural stem, neuroepithelial, embryonic and mesangial renal cells, (Lakhe-Reddy et al., 2014; Mobley et al., 2009) displays a major role in self-renewal and survival of neural progenitor cells, (Mobley et al., 2009) and, then, could have a similar function in GIC. Indeed, $\beta8$, highly expressed in this GIC-subpopulation (Roth et al., 2013), was preferentially found *in vivo* in GB perivascular and perinecrotic areas (Riemenschneider et al., 2005), some preferential GIC-enriched niches (Lathia et al., 2011). Furthermore, $\beta8$ -overexpression was also associated with glioma tumour grade (Roth et al., 2013). Although few studies were conducted in glioma, $\beta8$ appears to have a pro-invasive role in GB cells (Reyes et al., 2013) while it could negatively regulate angiogenesis in transformed human astrocytes (Tchaicha et al., 2011). Additionally, it was recently shown that $\beta8^{\text{HIGH}}$ -GB cells may display several stem characteristics (Guerrero et al., 2017). Nevertheless, the effects of $\beta8$ -targeting on GIC stemness, viability, migration, radioresistance and tumorigenicity have never been explored.

We hypothesized that $\beta 8$ could sustain GIC stemness and radioresistance and represent a new GIC targetable marker. We demonstrated that $\beta 8$ is overexpressed in GIC and associated with bad prognosis in GB patient cohorts. We highlighted in patient GIC primocultures that $\beta 8$ is associated *in vitro* and *in vivo* with characteristics and features unique to GIC, including self-renewal ability, stemness status, markers expression, viability, adherence/migration, radioresistance and tumorigenesis. We also showed that selective $\beta 8$ -inhibition can impair GIC properties *in vitro* and suppress orthotopic tumor growth *in vivo*. Together these results identify $\beta 8$ as a new membrane GIC marker and a potential therapeutic radiosensitizing target.

II.3. Results

ITG β 8 is overexpressed in GIC

As we hypothesized a specific integrin expression pattern in GIC, we screened at the RNA level the expression of a panel of integrins in 10 patient GIC-enriched neurosphere (NS) cell lines, fully characterized either in our previous work (Dahan et al., 2014) or in this study (**Supplemental Figure S1**). All stem markers (Olig2, Sox2, A2B5), as well as ITGB8 integrin (**Figure 1A**), appeared overexpressed at the mRNA and protein levels in all GIC compared to the corresponding GB differentiated cells (GDC), which contrarily overexpressed differentiation markers (neuronal TUJ1, astrocytic GFAP) (**Supplemental Figure S1**). Additionally, ITGB8 mRNAs appeared up-regulated in GIC compared to adult healthy neural tissues, Neural Stem Cells, GDC or conventional human GB cell lines, except for SF763 which strongly overexpressed ITGB8 (**Figure 1B**). Of note, U87/U138 and LN18 displayed a lower β 8 expression, as previously described (Tchaicha et al., 2011). Moreover, we confirmed in 4 patient cell lines (SRA5, SRB1, SRC3 and SB7) that β 8 protein was also overexpressed in GIC compared to their GDC counterparts, as well as in whole cell lysates by western-blot (**Figure 1C**) and at the membrane cell surface by FACS analysis of both β 8 and α β 8 (**Figure 1D**). We also analyzed mRNA and protein expressions of main integrins in GIC and GDC (**Supplemental Figure S2**). Briefly, ITG α 6 was overexpressed in GIC, as previously shown (Lathia et al., 2010). ITG β 3 displayed a similar pattern, but at varying degrees according to the cell line. Contrarily, ITG β 5 and ITG β 1 appeared to be restricted to the GDC cell surface, as well as ITG β 4 in GDC total protein extracts. Of note, ITG α v protein was equally expressed in both GIC and GDC. Based on this, ITG β 8, as ITG α 6, appeared to be selectively expressed at the GIC membrane and barely present in GDC.

Expression levels of ITG β 8 and stem markers are correlated in GB patients

As β 8 seemed to be selectively expressed in GIC, we performed statistical correlation analysis between ITGB8 expression and stem (NG2, GLI1, MS1, NANOG, NESTIN, NOTCH1, SOX2, SHH, PROM1, ITGA6, OLIG2 and CD44) and differentiated (GFAP, MAP2, TUJ1, MAL, OMG) markers in TCGA database (n=146 GB patients). We observed a significant positive correlation of β 8 with all the stem markers tested, except PROM1 and OLIG2 (**Figure 1E, Supplemental Figure S3**). In contrast, β 8 negatively correlated with neuronal markers (MAP2, TUBB3, HRNBP3) and oligodendrocytic markers (MAL, OMG) (**Figure 1E**). To further study the link between β 8 and stem markers, we performed immunohistochemistry (IHC) colocalizations in GB patients cohort (n=10) for both ITG β 8 and Sox2. Patients that did not express Sox2 (2-5 and 9) also failed to express β 8 (**Figure 1F** and data not shown). Contrarily, patients that were positive for Sox2 (1, 6-8 and 10) also expressed β 8 at varying degrees. Importantly, β 8-stained cells appeared to be positive for Sox2 as well (**Figure 1F**). Altogether, these results showed that ITG β 8 is selectively expressed by GIC *in vitro* and that ITG β 8-positive cells in GB patients are also Sox2-positive.

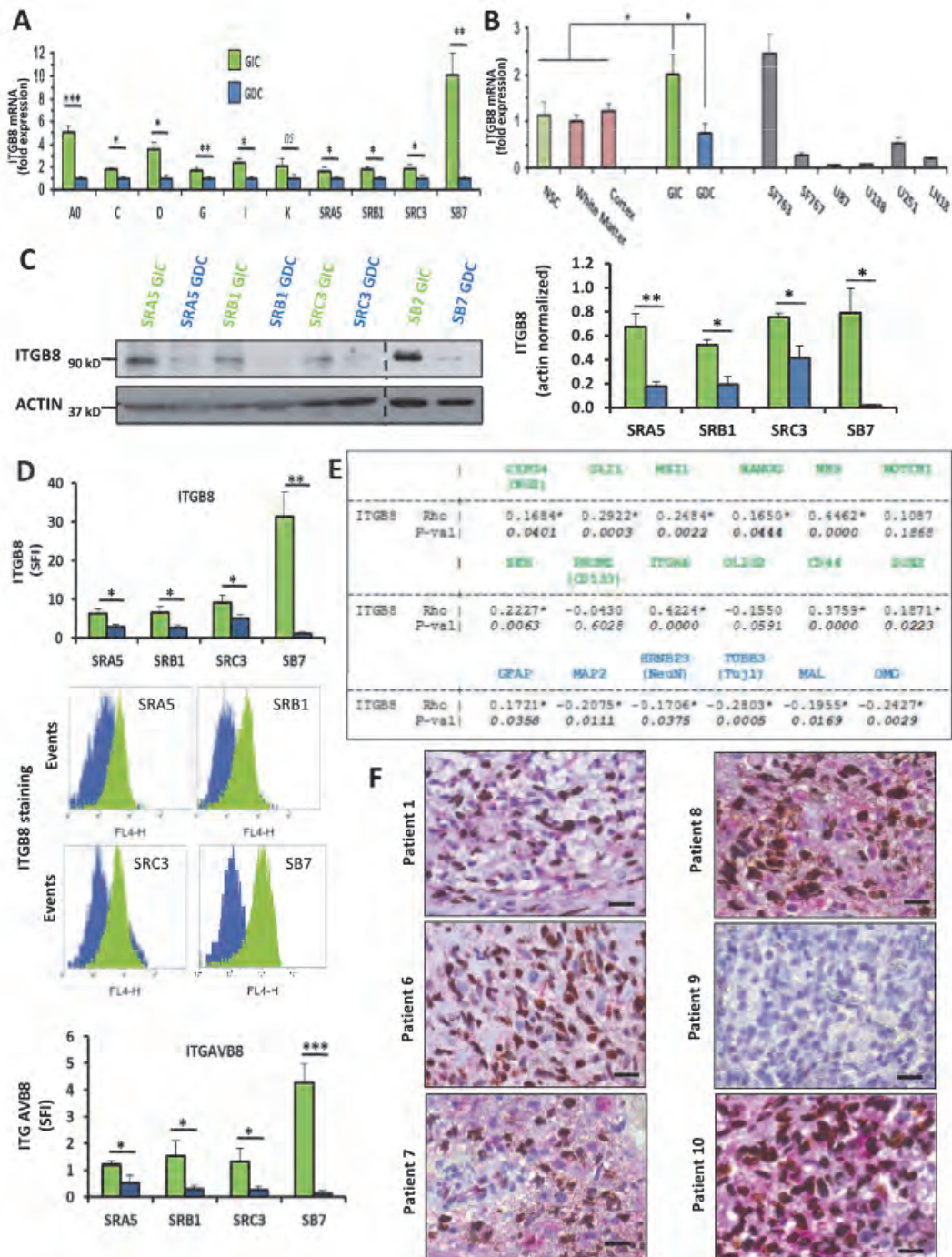


Figure 1. ITGβ8 is overexpressed in GB and particularly in GIC compared to GB differentiated cells (GDC). (A–D) GIC-enriched NS cell lines isolated from 10 patient tumors were maintained in stem cell medium or allowed to differentiate as adherent GDC for 15 days in FCS-enriched medium. (A) ITGβ8 mRNA levels in GIC and related-GDC. (B) ITGβ8 mRNA levels in GIC, human healthy samples (NSC, white matter and cortex), GDC and 6 GB cell lines. (C) Immunoblot analysis of the ITGβ8 expression in GIC and related-GDC. Equal gel loading and transfer efficiency were checked with anti-actin antibody. Blots were representative of at least 3 independent experiments in 4 patient cell lines (SRA5, SRB1, SRC3 and SB7) and were then quantified and normalized with actin. (D) Immunofluorescence analysis performed by FACS for membrane ITGβ8 and ITGαVβ8 expression. The SFI (Specific Fluorescence Index) allowed to evaluate the marker expression level (see Material and Methods). For each cell line, representative FACS plot overlays were depicted. (E) Statistical correlation analysis between expression of ITGβ8 and stem (NG2, GLI1, MSI1, NANOG, NES, NOTCH1, SOX2, SHH, CD133, ITGA6, OLIG2 and CD44) or differentiated markers (GFAP, MAP2, NeuN, TUJ1, MAL and OMG) from TCGA database (n=146 GB patients). Shown are the Spearman's rank correlation coefficients (Rho) and related p-values. (F) Immunohistochemical colocalizations of ITGβ8 and Sox2 in GB biopsies. Shown are the representative microphotographs of n=6/10 patient biopsies. Magnification x63, scale bar 50 μm. (A–B, D) Shown are the fold inductions expressed as means ± SEM of at least 3 independent experiments. *ns* non-significant, **p* ≤ 0.05, ***p* ≤ 0.01, ****p* ≤ 0.001.

ITGβ8 inhibition alters GIC stemness

We subsequently designed shRNA and siRNA strategies to selectively downregulate β8 and assess its functions in GIC. Two GFP-coupled β8-targeting shRNA sequences (shB8-1/-4) and a negative control (shCTR) were used to transiently transfect NS-dissociated cells for 7 days. We observed in SRB1 and SRC3 GIC cultures that shB8s potently inhibited ITGβ8 expression at mRNA and protein levels, particularly at the cell membrane, compared to non-transfected (NT) or shCTR conditions (**Figure 2A-C**). For stable inhibition, SRB1 and SRC3 GIC were transfected with the same shRNA sequences coupled to a neomycin-resistance gene and then G418-selected to establish stable cell lines, which displayed a significant inhibition for ITGβ8 mRNA and protein expression (**Figure 2E-F**). A similar effect was observed after GIC transfection for 5 days with two β8-targeting siRNAs (siB8-5/-6) compared to a control siRNA (siCTR) (**Figure 2F-H**). The self-renewal ability in limiting dilution condition, a major stem characteristic, was then assessed by evaluating the NS-forming capacity of GIC at low cell density after β8-targeting. Transient transfection of SRB1/SRC3 GIC with GFP-coupled shB8s dramatically abrogated by ~85% the NS forming ability of ITGβ8-/GFP+ GIC compared to the ITGβ8+/GFP+ shCTR GIC in FACS-sorted cells (**Figure 3A**). Moreover, stable GIC transfection with shB8-1/-4 induced a similar decrease of the NS generation ability (**Figure 3B-C**). This major alteration of the *in vitro* GIC self-renewal ability after ITGβ8 inhibition can be mediated by several processes, notably by an impairment of their stem phenotype. Consequently, we observed in SRB1/SRC3 GIC a noticeable decrease (~5 to 15%) of the GIC subpopulation within the NS structures in response to ITGβ8 inhibition after either transient or stable transfection (**Figure 4A-B**). Moreover, shB8s induced 7 days after transfection a significant decrease of Olig2 and Nestin stem markers and an increase of the differentiation markers TUJ1 (neuronal) and MAL (oligodendrocytic, Myelin and Lymphocyte protein) at the mRNA level (**Figure 4C**). We confirmed by western-blot the decrease of these stem markers in favor of an increase of TUJ1/OMG differentiation proteins after ITGβ8 silencing (**Figure 4D**). These variations in stem (Sox2, Nestin, ITGA6) and differentiation (GFAP, OMG, MAL, O4) markers were also found in GIC stably depleted for β8 at mRNA and protein levels (**Figure 4E-F**). Additionally, siRNA-mediated β8 inhibition (siB8-5/-6) was also associated with a strong downregulation of stem markers (Sox2, Nestin, NG2 and Olig2) and an up-regulation of differentiation markers (TUJ1, MAL or OMG) at the mRNA and protein levels, in 5 days-transfected SRB1/SRC3 GIC (**Supplemental Figure S4A-B**). Altogether, these results suggest that ITGβ8 knock-down may induce a differentiation process in GIC and an alteration of their stemness characteristics.

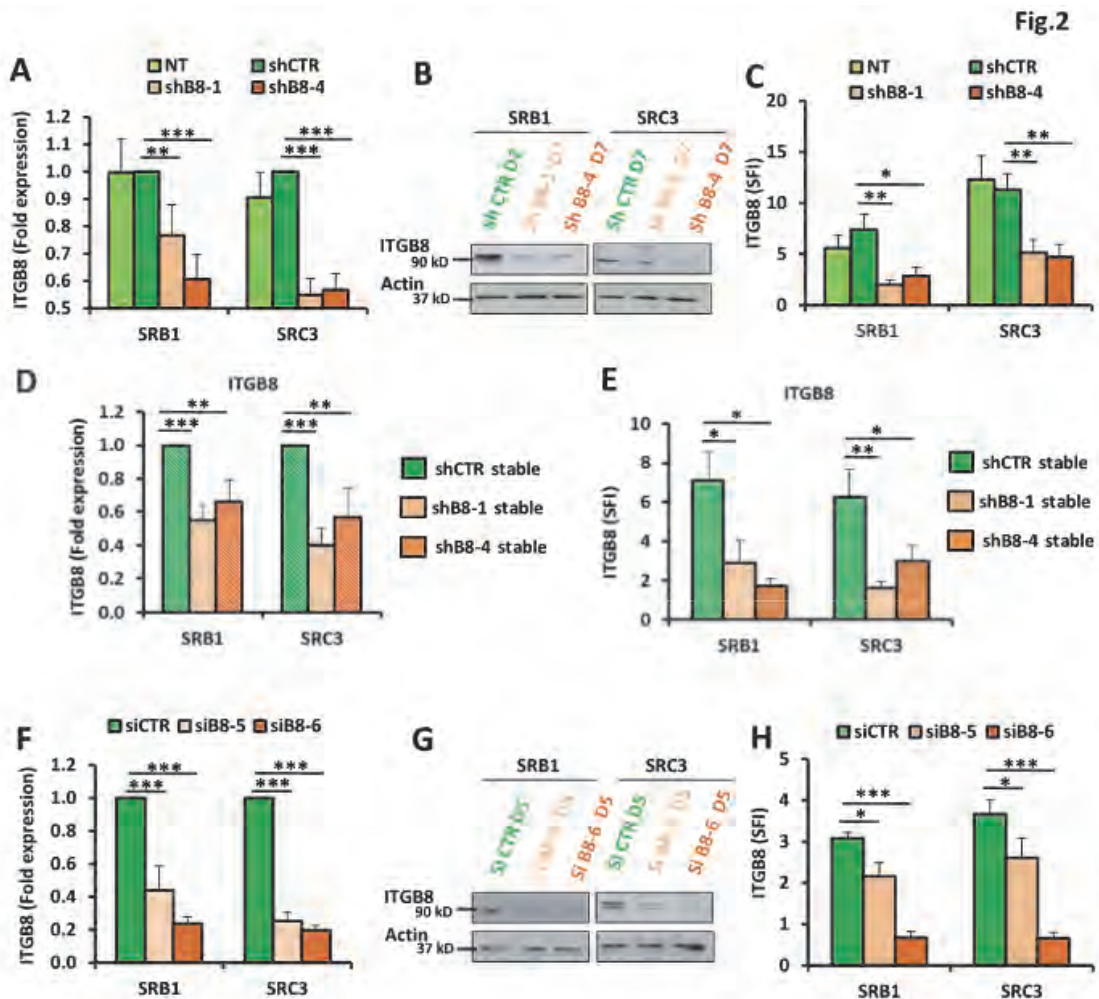


Figure 2. ITGβ8 is efficiently downregulated in GIC by specific shRNA and siRNA. (A-C) GIC-enriched NS cells isolated from 2 patient tumors (SRB1 and SRC3) were transfected or not (NT) for 7 days with 2 different ITGβ8-targeting shRNA (shB8-1 or -4) or with a negative control shRNA (shCTR). ITGβ8 expression levels were then analysed in NS cells at the mRNA or protein level either by qPCR (A), Immunoblot (B) or FACS (C). (D-E) SRB1 and SRC3 GIC previously transfected with shRNAs (shB8-1, shB8-4 or shCTR) expressing the neomycin-resistance gene were then selected by G418 during at least 20 days in order to establish stable cell lines. ITGβ8 expression levels were then analyzed at the mRNA and protein levels either by qPCR (D) or FACS (E), respectively. (F-H) GIC SRB1 and SRC3 were transfected for 5 days with 2 different ITGβ8-targeting siRNA (siB8-5 or -6) or with a negative control siRNA (siCTR). ITGβ8 expression levels were then analyzed at the mRNA and protein levels either by qPCR (F), Immunoblot (G) or FACS (H), respectively. (A-H) Results are expressed as the means ± SEM of at least 3 independent experiments. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ compared with the related control condition.

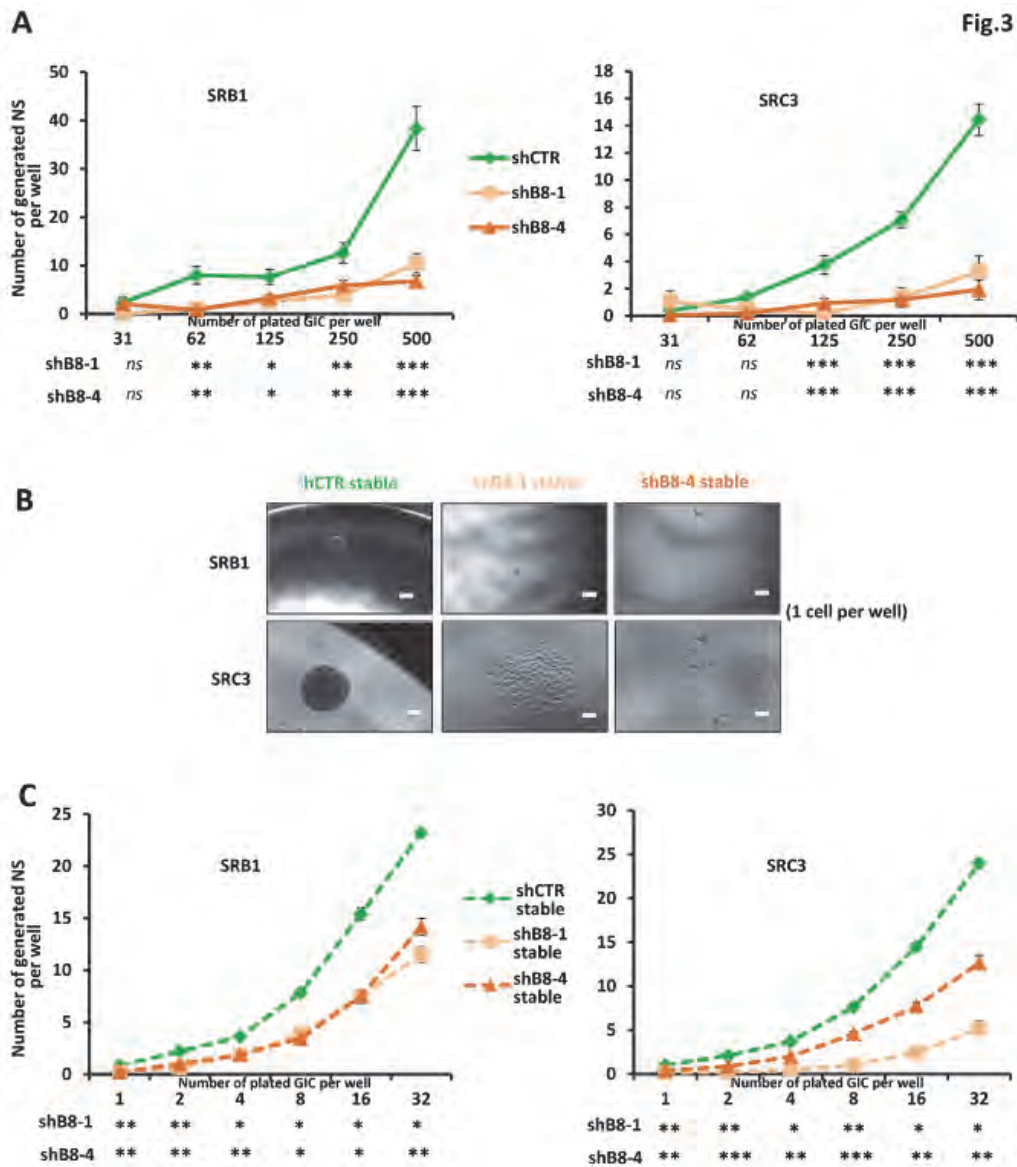


Figure 3. shRNA-mediated ITG β 8 knock-down alters GIC self-renewal. (A) SRB1 and SRC3 GIC were transfected with GFP-expressing shB8-1, shB8-4 or shCTR. 4 days after transfection, GIC were subjected to FACS sorting of either GFP $^{+}$ /ITG β 8 $^{+}$ or GFP $^{+}$ /ITG β 8 $^{-}$ GIC for the shCTR or the shB8 conditions, respectively. The sorted GIC were then plated in 96-well plates at low cell densities (31 to 500 cells/well) to study their ability to generate primary NS through limiting dilution assays. (B, C) A similar limiting dilution assay at lower densities (1 to 32 cells/well) was performed in G418-selected stable cell lines (SRB1 and SRC3) to assess the secondary NS forming ability of GIC transfected with shB8-1, shB8-4 or shCTR. (B) Phase contrast photomicrographs of the neurospheres generated at the density of 1 cell per well. Magnification x10, scale bar 6 μ m. (A, C) Results are expressed as the means \pm SEM of at least 3 independent experiments. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ compared with the related shCTR condition.

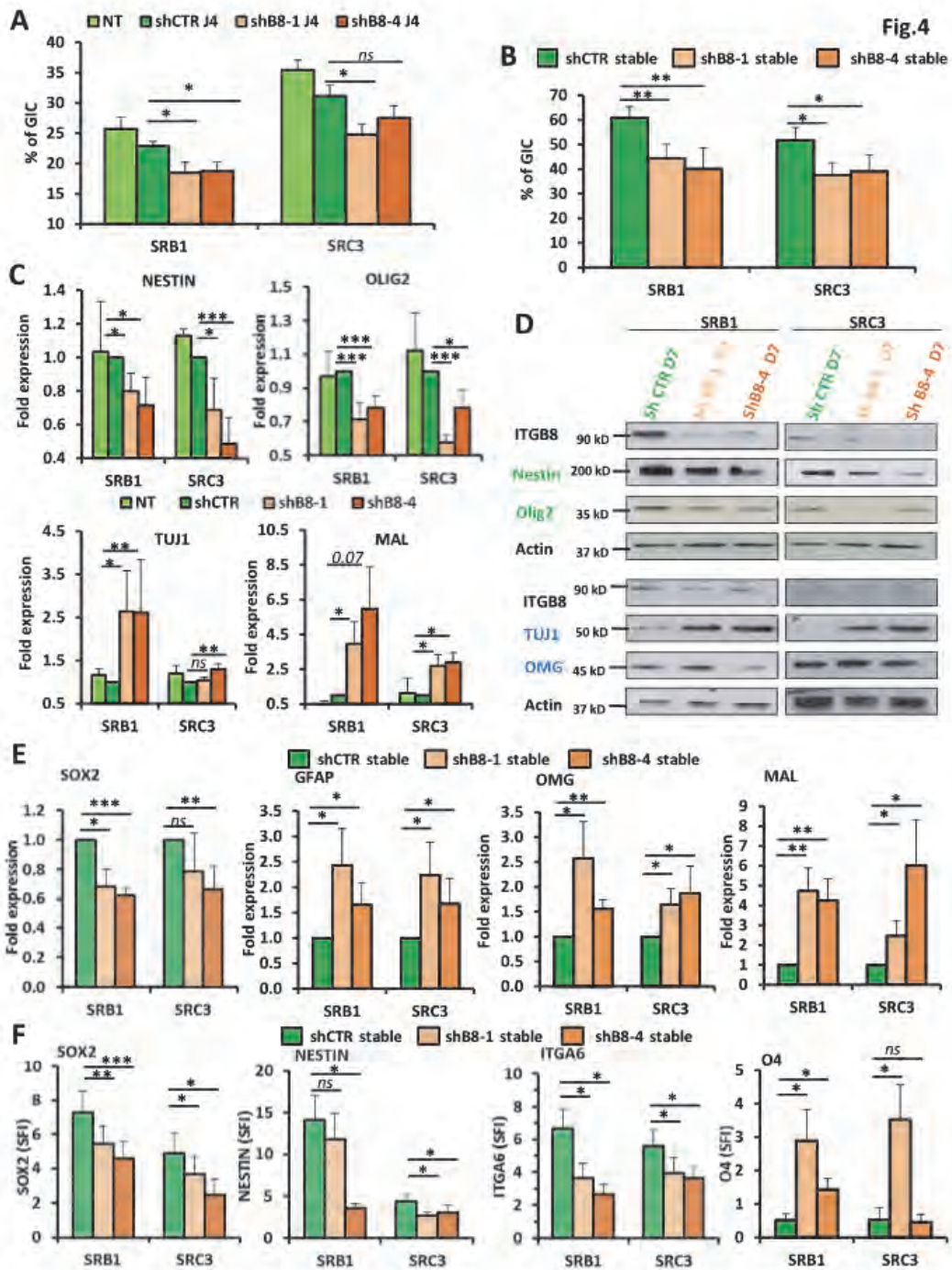


Figure 4. shRNA-mediated ITGβ8 knock-down alters GIC stemness. (A, C, D) GIC (SRB1 and SRC3) were transfected or not (NT) with shB8-1, shB8-4 or shCTR and harvested 4 (A, C) or 7 (D) days after transfection. (B, E, F) Stably-transfected GIC cell lines (SRB1 and SRC3) with shRNAs (shB8-1, shB8-4 or shCTR) expressing a Neomycin-resistance gene, were harvested after at least 20 days of G418-selection. (A-B) Transfected cells were processed by FACS either (A) 4 days after transfection or (B) on the stables cell lines to analyze the percentage of the GIC population (see Material and Methods). (C-F) Expression levels of stem (Nestin, Olig2, Sox2, ITGA6) and differentiation (GFAP, TUJ1, O4, MAL and OMG) markers were analyzed in NS cells at the mRNA or protein level either by qPCR (C, E), Immunoblots (D) or FACS immunofluorescence (F). (A-F) Results are expressed as the means ± SEM of at least 3 independent experiments. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ compared with the related shCTR condition.

ITG β 8 inhibition decreases GIC viability and induces apoptosis

As an impairment of GIC self-renewal ability could also be linked to viability alteration, we analyzed subG1 population after GIC transient transfection with β 8-shRNAs and demonstrated that this subpopulation was increased compared to shCTR condition 7 days post-transfection (**Figure 5A**). We hypothesized that this viability loss may be associated with the induction of a pro-apoptotic mechanism. We observed by quantitative PCR that GIC transient transfection with shB8s induced a decrease of Bcl2 and Survivin, two anti-apoptotic genes, and an increase of Bax/Bcl2 ratio (**Figure 5B**). These transcriptional data were confirmed by western blot as we noticed at day 7 an increase of effector caspases-3/7 and PARP cleavages, an overexpression of the pro-apoptotic protein Bax and a down-regulation of the anti-apoptotic protein Bcl2 (**Figure 5C**). To fully highlight this apoptotic process, we measured caspase activities and found an increase in caspases-3/7 activity in SRB1 and SRC3 GIC cell lines (**Figure 5D**). Interestingly, we similarly observed a reduction of Bcl2 and Survivin mRNAs and an increase in caspases-3/7 activity with siRNA-mediated ITG β 8 downregulation at day 5 (**Supplemental Figure S4C-D**). Of note, we also noticed with si β 8 a significant activation of initiator Caspase-8. Altogether, these results suggest that ITG β 8 knock-down may induce in GIC, in addition to their differentiation, the induction of an apoptotic process.

ITG β 8 inhibition reduces GIC adhesion and migration

Besides their roles in cell survival and stemness, integrins are mainly known as key players in adhesion and migration processes, both largely activated in GIC (Malric et al., 2017) (Roos et al., 2017). We consequently performed GIC adhesion assays for 6h on laminin, a known β 8-substrate, (van der Flier and Sonnenberg, 2001) and demonstrated that stable sh β 8-transfection decreased the cell adhesion and spreading rates, with a reduction of both cell area and polarization compared to shCTR (**Figure 6A**). We also assessed SRB1/SRC3 GIC migration by seeding stable shB8 or shCTR cells on laminin-coated transwells for 24 hours. ITG β 8 knock-down reduced migration rate by 30~50% compared to shCTR (**Figure 6B**). Collectively, these results show that ITG β 8 can support in GIC several major *in vitro* mechanisms, such as pro-survival processes, stemness maintenance and also their pro-adhesive and migratory properties.

ITG β 8 targeting mediates GIC radiosensitization

Consequently, we hypothesized that β 8-inhibition in clinic could contribute to sensitize GIC, strongly chemo/radioresistant, (Bao et al., 2006a; Lathia et al., 2015) to conventional therapies. Thus we studied the combined effects of ITG β 8 stable inhibition and ionizing radiations (IR) on GIC. We treated shB8 stable GIC clones (SRB1/SRC3) with IR (5 Gy) and observed 4 days after that ITG β 8-targeting significantly increased the percentage of subG1 (**Figure 7A**) and apoptotic AnnexinV-positive cells (**Figure 7B**), compared to shCTR cells irradiation. In addition, the post-mitotic cell death, a common death mechanism observed in cancer cells after irradiation and characterized by the presence of giant multinucleated cells and micronuclei, (Gouaze-Andersson et al., 2016) appeared also significantly increased in irradiated shB8s (**Figure 7C**). To fully demonstrate the radiosensitizing effect of ITG β 8 downregulation in GIC, we finally performed clonogenic assays at low cell density and measured the NS generation potential of shCTR or shB8s stably-transfected GIC (SRB1/SRC3) in response to increasing IR doses (0-10 Gy). We observed that ITG β 8-silencing led to a significant decrease in the NS surviving fraction in response to IR compared to shCTR or non-transfected NT cells (**Figure 7D**). Altogether, ITG β 8-targeting appears to radiosensitize GIC for cell death induction.

Fig.5

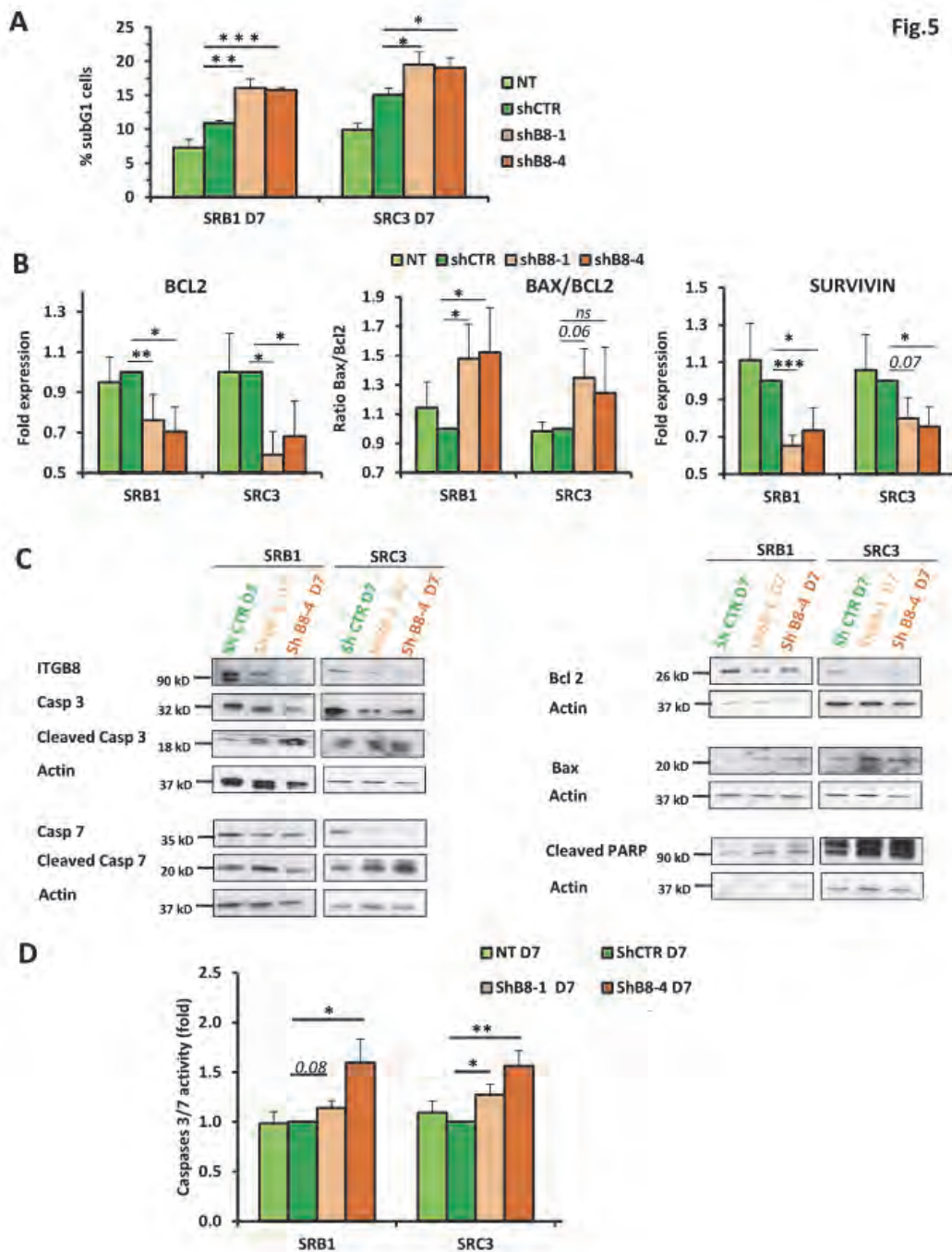


Figure 5. shRNA-mediated ITGβ8 knock-down induces GIC apoptosis. (A-D) GIC (SRB1 and SRC3) were transfected or not (NT) with shB8-1, shB8-4 or shCTR and were harvested 7 days after transfection. GIC were subjected to (A) subG1 analysis by FACS, (B) qPCR analysis of cell death markers (BCL2, BAX, Survivin), (C) immunoblots of cell death markers (Caspase-3, Caspase-7, BCL2, BAX, PARP) or (D) Caspases 3/7 activity assays. (A-B, D) Results are expressed as the means ± SEM of at least 3 independent experiments. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ compared with the related shCTR condition.

Fig.6

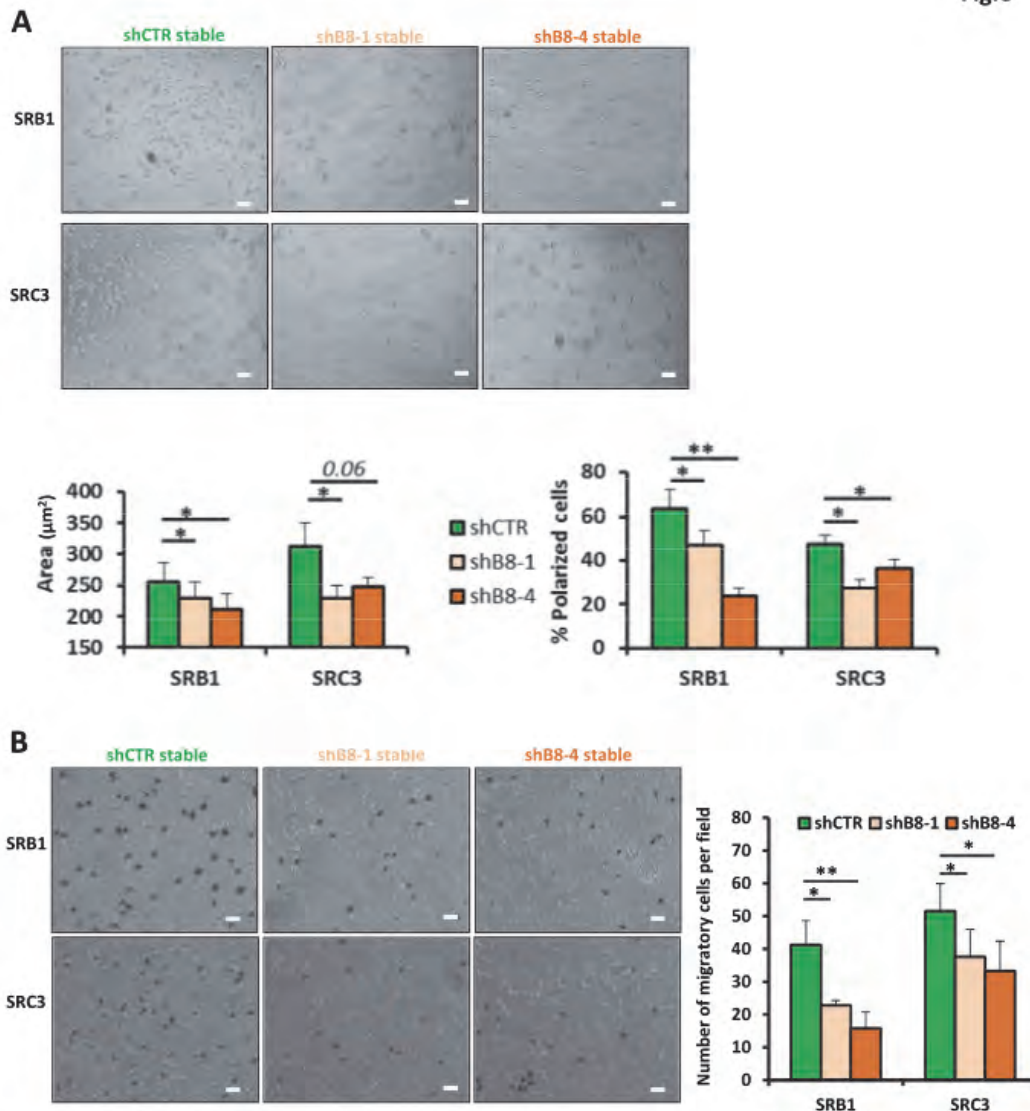


Figure 6. shRNA-mediated ITG β 8 knock-down reduces GIC adhesion and migration. (A-B) Stables GIC cell lines (SRB1 and SRC3) generated after transfection (shB8-1, shB8-4 or shCTR) and G418-selection were dissociated and submitted to **(A)** adhesion or **(B)** migration assays. **(A)** Phase contrast photomicrographs of adherent cells after 6h of adhesion assay on laminin-coated multiwell, Magnification x10, scale bar 6 μm . Area and percentage of polarized cells were then quantified. **(B)** Phase contrast photomicrographs of migratory cells after 24h of invasion assay on laminin-coated transwell, Magnification x10, scale bar 6 μm . Migration was quantified by counting hemalun-stained cells. **(A-B)** Results are expressed as the means \pm SEM of at least 3 independent experiments. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ compared with the related shCTR condition.

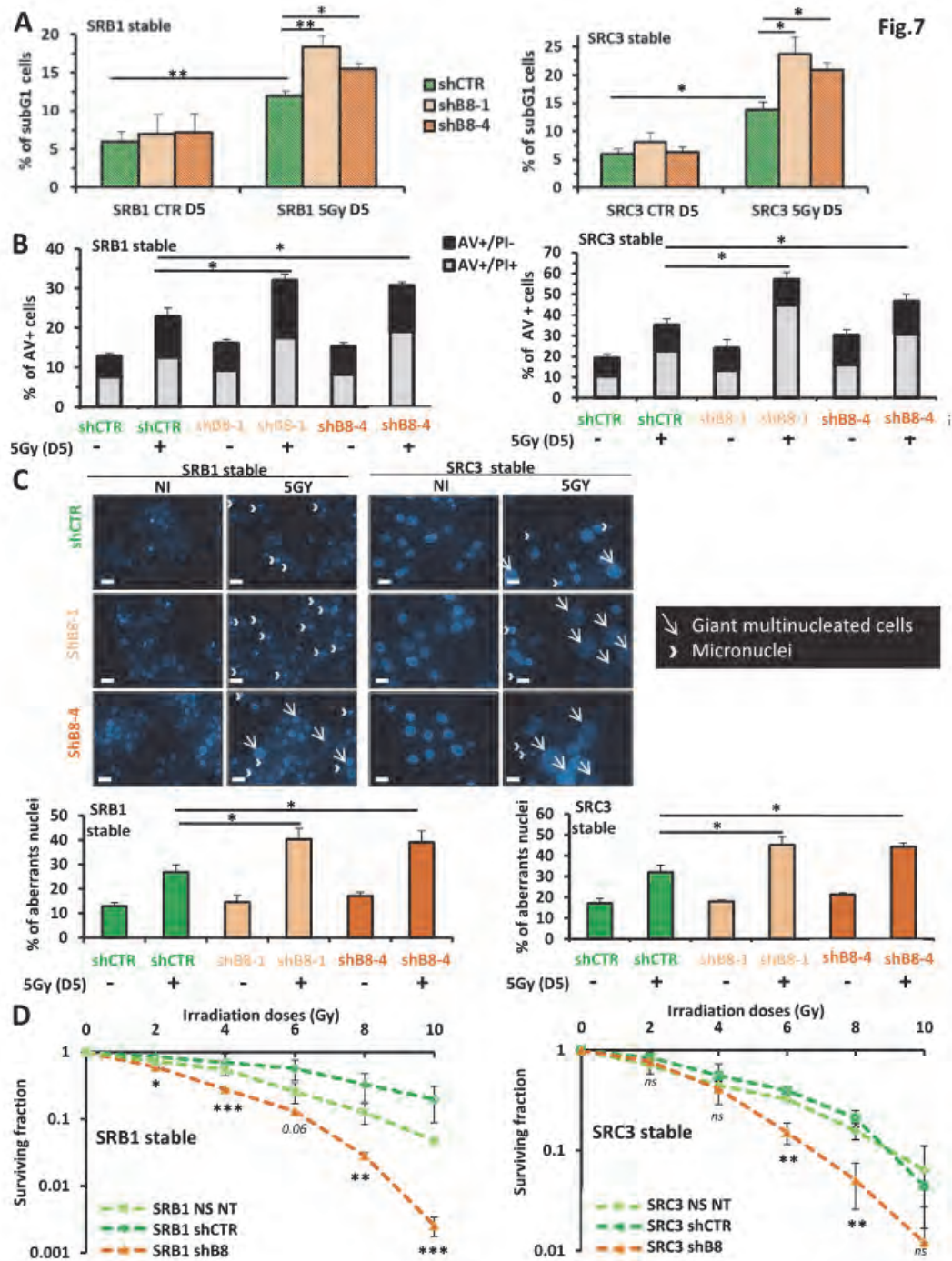


Figure 7. shRNA-mediated ITGβ8 knock-down radiosensitizes the GIC population. (A-D) Stable GIC cell lines (SRB1 and SRC3) generated after transfection (shB8-1, shB8-4 or shCTR) and G418-selection were dissociated and irradiated by the indicated dose. (A-C) Five days after a 5 Gy-irradiation, cells were subjected to either (A) subG1 analysis by FACS, (B) AnnexinV (AV) -Propidium Iodide (PI) double staining by FACS or (C) post-mitotic cell death assay. In the latter case, some representative DAPI photomicrographs are presented. Magnification x10, scale bar 6 μm. (D) Prior to irradiation (2, 4, 6, 8 or 10 Gy), parental (NT) or stably transfected NS were dissociated and plated in 96-well-plates (500 cells/well) in order to determine the surviving fraction by clonogenic assay. The number of growing NS clones was determined by microscopy after 10 days. (A-D) Results are expressed as the means ± SEM of at least 3 independent experiments. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ compared with the related shCTR condition.

ITG β 8 expression is associated to GIC tumorigenicity and patient worse prognosis

To further explore β 8 functions in GB cells stemness *in vivo*, we analyzed the tumorigenic potential of ITG β 8-downregulated GIC in orthotopically xenografted nude mice. All the three mice groups (shCTR/shB8-1/shB8-4) finally experienced neurological signs associated with the apparition of a Nestin-positive invasive brain tumor mass (**Figure 8A**). However, we noticed a significant survival advantage in mice xenografted with shB8-4 GIC compared to shCTR SRB1 cells, and a similar tendency with shB8-1 (**Figure 8B**). This trend was confirmed with the SRB3 cell line (data not shown). We then analyzed by IHC both β 8 and Sox2 expression patterns in tumor areas of xenografted mice (SRB1) and noticed a marked decrease of both ITGB8 and Sox2-positive cells (from 60-70% to 10-20%) in shB8s subgroups compared to shCTR (**Figure 8C**). As β 8-targeting appeared to decrease the GIC tumorigenicity, we hypothesized that low ITG β 8 expression could confer to GB patients a survival advantage after standard chemoradiation therapy. Using TCGA, we determined patient Overall Survival (OS) according to ITGB8 expression on a specific group of newly diagnosed primary GB solely treated with standard chemoradiotherapy (n=59). In this particular population, β 8 overexpression was significantly associated with OS decrease ($p=0.033$), from 21.3 (β 8^{LOW}) to 14.5 months (β 8^{HIGH}) (**Figure 8D**). REMBRANDT GB dataset (primary GB with survival data, n=177) confirmed (**Figure 8E**) that ITGB8 overexpression is associated with a reduced OS, as previously reported in a larger REMBRANDT cohort of low and high grade-gliomas (n=339) (Reyes et al., 2013). Interestingly, we showed in the REMBRANDT GB cohort that ITGB8 is significantly overexpressed in GB compared to normal brain tissues and to lower grade astrocytomas and oligodendrogliomas, both associated to a better prognosis than GB (**Figure 8F**) (Louis et al., 2016). Eventually, ITGB8 expression is associated *in vivo* to a reduced survival in GIC-xenografted mice and its overexpression in GB patients, positively correlated with a large panel of stem markers (**Figure 1E**), is linked to a worse prognosis in two independent GB cohorts.

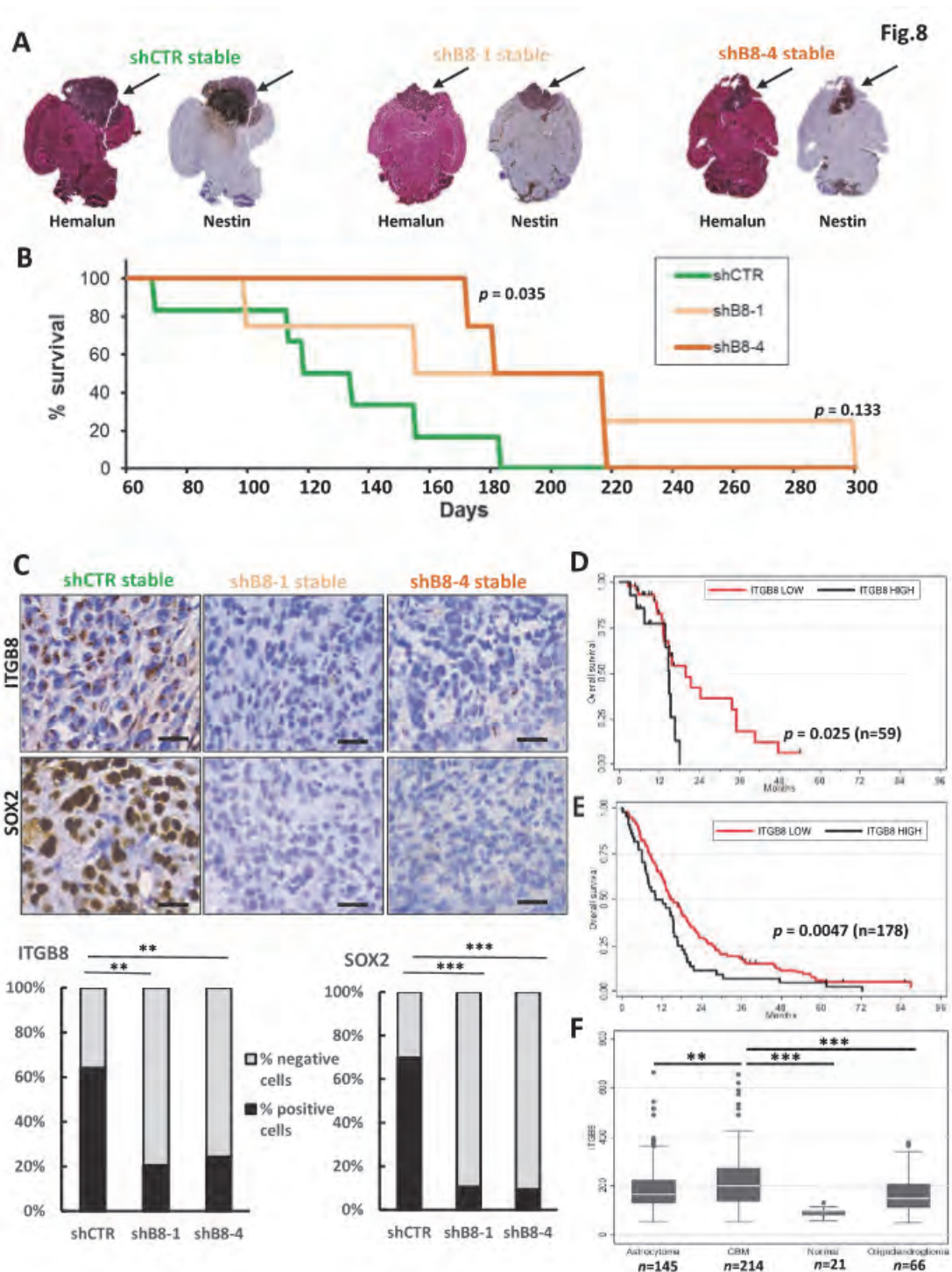


Figure 8. High ITGβ8-expression is correlated with increased tumorigenesis in xenografted mice and with reduced GB-patient survival. (A-C) SRB1 GIC stably-transfected with either shB8-1, shB8-4 or shCTR were dissociated and implanted in mice as described in materials and methods. (A) Representatives scans of Hemalun or Nestin staining to estimate the presence of an invasive tumor in the brains of sacrificed mouse. (B) Survival curves established in xenografted mice for the indicated injected cell lines (shB8-1 or -4 or shCTR). Exact P-values between shB8-1 or -4 groups and the related shCTR group were determined by log-rank analysis and indicated on the graph. (C) Immunohistological analysis and quantification of ITGβ8 and Sox2 stainings within the tumor area of sacrificed mouse. Shown are some representative phase contrast photomicrographs of IHC stainings. Magnification x63, scale bar 50 μm. ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ compared with the shCTR condition. (D-E) Kaplan-Meier survival plots based on differential gene expression of ITGβ8 for (D) GB patients of the TCGA database (n=59 newly diagnosed primary GB treated with standard chemoradiotherapy) and (E) GB patients of the REMBRANDT database (n=178 with survival data). (F) ITGβ8 differential gene expression plots for astrocytoma, GB, normal or oligodendroglioma patients from REMBRANDT database. ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

II.4. Discussion

Despite intense efforts to understand GB malignant processes and identify new drugable targets, it must be noted that prognostic and therapeutic protocols have not changed since more than a decade. To improve GB patient's outcome, current researches mostly focus on GIC biology to specifically target these tumorigenic stem-like cells and overpass their resistance mechanisms. In line with this, our study identifies $\beta 8$ integrin as a new GIC functional marker and highlights for the first time its potential therapeutic interest for GB radiosensitization. We first demonstrated in GB patient primocultures that $\beta 8$ is strongly overexpressed at the GIC surface. We also highlighted a stronger $\beta 8$ expression in GIC compared to their differentiated counterparts, as already suggested in GB cells (Guerrero et al., 2017; Roth et al., 2013) but also in colorectal cancer cells (Chao et al., 2012). In addition, we analyzed TCGA database and found that $\beta 8$ expression in GB samples is positively correlated with the expression of numerous stem markers and negatively with neural differentiation markers. We also performed IHC co-staining of the stem-factor Sox2 and $\beta 8$ in several patient GB biopsies and demonstrated that $\beta 8$ -positive cells were also positive for Sox2 (**Figure 1**). Altogether these elements are in favor of a more selective $\beta 8$ expression in GIC. Interestingly, GIC were proved *in vivo* to reside in perivascular niches (Lathia et al., 2011) and several works described indeed a positive correlation of $\beta 8$ -stained cells with perivascular areas in primary GB patient's samples (Guerrero et al., 2017; Riemenschneider et al., 2005). Besides, we previously showed that ITG $\beta 8$, as the GIC-associated integrins ITG $\alpha 6$ and ITG $\alpha 7$ (Haas et al., 2017; Lathia et al., 2010), is significantly overexpressed in the Classical molecular GB subtype, compared to Mesenchymal and Proneural subtypes in the Verhaak's molecular classification (Malric et al., 2017). Actually, this Classical subtype was characterized through single-cell molecular analysis by a notable stemness signature (Patel et al., 2014). Finally, it was recently shown in GB patient tumor bulks that $\beta 8^{\text{HIGH}}$ -sorted cells were defined by a superior self-renewal ability *in vitro* and an increased tumorigenicity *in vivo*, two major GIC properties (Guerrero et al., 2017). It could be concluded from our results and these observations that ITG $\beta 8$ may be used as a new biomarker to detect and, possibly, enrich GIC from the tumor mass.

Furthermore, several studies measured $\beta 8$ protein expression in tumor samples obtained from large patient cohorts and reported a rather specific expression of $\beta 8$ in tumor cells, much higher than in tumor endothelial cells and healthy brain tissues (Schittenhelm et al., 2013; Weller et al., 2016). In this context, $\beta 8$ expression was shown to positively correlate with the glioma grade, with a higher expression in grade IV GB (Roth et al., 2013; Schittenhelm et al., 2013). To go further, using TCGA and REMBRANDT databases, we demonstrated that $\beta 8$ is up-regulated in GB compared to healthy tissue (Malric et al., 2017) and that a high $\beta 8$ level is associated with a worse prognosis in GB patients (**Figure 8**). Consequently, it would be of great interest in clinic to take advantage of this new GIC biomarker as a potential prognostic marker. Of note, this new prognostic biomarker may be used in combination with other integrins previously described as prognostic factors in GB, such as $\alpha 5$ (Janouskova et al., 2012), $\beta 1$ (Virga et al., 2017) and $\alpha v\beta 3$ (Ducassou et al., 2013). Besides the potential of ITG $\beta 8$ as a new biomarker to detect GIC in tumor mass and to assess GB aggressiveness, we hypothesized that this particular integrin could be an attractive target to specifically impair GIC functions and survival. To this end, we demonstrated that $\beta 8$ -silencing by interference RNA in GIC resulted *in vitro* in a strong decrease of their neurosphere formation ability (**Figure 3**), linked to their self-renewal property, and of cell adhesion and migration capacities (**Figure 6**), some key features sustaining GIC invasion and tumorigenesis (Ortensi et al., 2013). These effects were correlated with a global increase of GIC differentiation pattern in response to $\beta 8$ -downregulation (**Figure 4**). In this respect,

stable $\beta 8$ -targeting significantly delayed the growth of GIC-derived orthotopic xenografts and improved nude mice survival, with a major decrease of Sox2-staining in $\beta 8$ -negative tumors (**Figure 8**). Interestingly, the $\beta 8$ role in stem markers maintenance and in self-renewal was previously evoked in murine NPC (Mobley et al., 2009) and in sorted- $\beta 8^{\text{HIGH}}$ GB cells isolated from tumors (Guerrero et al., 2017). In this study, the $\beta 8^{\text{LOW}}$ population was also shown to be less tumorigenic in orthotopically-xenografted nude mice, confirming our *in vivo* results with $\beta 8$ -targeted GIC. Finally, GIC display high capacities for migration/invasion (Mehta and Lo Cascio, 2017; Roos et al., 2017) and we demonstrated here that $\beta 8$ supports GIC adhesive and migratory properties (**Figure 6**). Interestingly, $\beta 8$ was previously described to sustain pro-invasive ability in GB cells and to increase the migration of transformed human astrocytes via TGF- β activation (Reyes et al., 2013; Tchaicha et al., 2011). Moreover, $\beta 8$ was highlighted to promote motility of prostatic tumor cells (Mertens-Walker et al., 2015) and pro-adhesive and metastatic properties in human lung cancer cells (Xu and Wu, 2012). In the last study, $\beta 8$ -inhibition was shown to alter pro-invasive pathways, such as MMP-9/-2 and their inhibitor Cystatin B, but also to induce a potent cell cycle blockade. In another study, $\beta 8^{\text{LOW}}$ -GB population was also described as enriched in mitotic checkpoint inhibitors (Guerrero et al., 2017).

Related to cell cycle impairment, we demonstrated here for the first time that, additionally to its role in GIC stemness maintenance, $\beta 8$ -inhibition can induce a significant increase of caspase-dependent GIC apoptosis, with activation of both initiator and effector caspases (**Figure 5**). Interestingly, this survival impairment appeared to be potentiated after irradiation, with a notable increase of post-mitotic cell death in $\beta 8$ -downregulated GIC (**Figure 7**). Regarding tumor cell death, $\beta 8$ -inhibition was shown in resistant hepatic cancer cells to decrease cell survival and proliferation via the inhibition of survivin and Bcl2, two anti-apoptotic proteins, and via the TGF- β /Smad pathway impairment (Wang et al., 2015). Regarding apoptosis, $\beta 8$ was associated to protection of Oligodendrocytic Progenitor Cells from H₂O₂-induced cell death in response to high levels of Osteopontin (OPN), a secreted ECM phosphoprotein (Mazaheri et al., 2017). Since OPN, a candidate ligand for $\alpha \beta 8$ (Ozawa et al., 2016), was described as a major actor for GIC stemness, GB cell dedifferentiation and tumorigenesis (Friedmann-Morvinski et al., 2016; Lamour et al., 2015; Pietras et al., 2014) and GB cell radioresistance, (Henry et al., 2016) it would be of interest to decipher the OPN role in the $\beta 8$ -induced molecular mechanisms to sustain GIC survival and stemness. Another thing to consider is the role of Survivin in $\beta 8$ -induced GIC stemness, viability and resistance, since we and other demonstrated that this protein, markedly overexpressed in GIC, is involved in GB cell-dedifferentiation, radioresistance and faster recurrence (Dahan et al., 2014). Finally, a particular focus is required on the TGF- β role in $\beta 8$ -mediated GIC survival and resistance. Indeed, this paracrine and autocrine pathway, notably activated via $\alpha \beta 8$ -binding to latent TGF- β complex, was shown to sustain GIC radioresistance, (Anido et al., 2010) as well as to promote proliferation, invasion, angiogenesis, stemness, resistance and tumor initiation/progression in GB (Joseph et al., 2013).

Growing evidences point out ITG $\beta 8$ as a specific GIC marker and highlight its role in GIC stemness, survival and resistance. We therefore propose this integrin as a new potential therapeutic target in GB, since $\beta 8$ appears to act by various mechanisms to alter GIC functions, aggressiveness and radioresistance. Significant effort is required to develop specific $\beta 8$ -inhibitors, already tested at the preclinical level for tumor immunotherapy, (Stockis et al., 2017) and to set-up new combined therapeutic strategies for GB outcome improvement. Manifestly, signaling pathways remain to be explored, notably the identification of ligands which may interact with $\beta 8$ to bi-directionally transduce signals and modulate GIC biological processes and functions.

II.5. Materials and methods

Human tumor collection

The study was conducted on newly diagnosed GB tumor samples isolated from 14 patients. 10 samples were used for immunohistochemistry studies and 4 additional GB samples were used to establish 4 primary GIC cell lines (SRA5, SRB1, SRC3 and SB7). For quantitative PCR (qPCR) experiments using Fluidigm, additional GIC patient cell lines were also used (A0, C1, D1, G, I and K). These samples were all obtained after written informed consent from patients admitted to the Neurosurgery Department at Toulouse University Hospital and processed in accordance with the Institution's Human research Ethics Committee. Tumors used in this study were histologically diagnosed as grade IV astrocytoma according to the WHO criteria.

Cell culture

Ten patient GIC primocultures were established from patient surgical GB samples and were fully characterized either in our previous work (Dahan et al., 2014) or in this study (**Supplemental Figure S1**). Briefly, GICs were cultured as GIC-enriched neurospheres (NS) in stem medium, compared to their differentiated counterparts (GB differentiated cells, GDC), kept in FCS-enriched differentiation medium for at least 15 days, as previously described (Dahan et al., 2014). Conventional human GB cell lines (SF763, SF767, U87, U138, U251 and LN18) were cultured as previously described. (Monferran et al., 2008; Sesen et al., 2015).

Neurospheres generation assays

NS from GIC were dissociated and viable GIC were plated in 96 well-plates (16 wells/condition) at different cellular densities (31 to 500 cells/well) in order to assess their ability to generate primary NS through limiting dilution assays. After 15 days, NS were counted by microscopy in each well. Cells could also be sorted by FACS to select the $\beta 8$ negative or positive cell population (SRB1 and SRC3 stables cell lines) before running the NS generation assay and plated in 96 well-plates (16 wells/condition) at different cellular densities (1 to 32 cells/well) in order to assess their ability to generate secondary NS through limiting dilution assays. After 15 days, secondary NS were counted by microscopy in each well. Of note, for neurospheres generation assay on SRB1 and SRC3 stables cell lines, a FACS sorting (Beckman MoFlo Astrios) was performed prior to the assay in order to only sort the GIC population GFP+/ $\beta 8$ + for shRNA-CTR or GFP+/ $\beta 8$ - for shRNA-B8-1 or -4.

siRNA and shRNA transfection

For siRNA transfection, NS from SRB1 and SRC3 patient cell lines were dissociated and seeded (500 000 cells/well) in 6 well-plates before being transfected using Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) with 3 μ L of siRNA (-CTR or -B8-5 or -B8-6 (10 μ M, Qiagen, Hilden, Germany)). Sequences of siRNA were respectively: AATTCTCCGAACGTGTCACGT, AACGTCTATGTCAAATCGACA and CAGCCTGTTTGCAGTGGTTCGA (5' to 3'). Cells were harvested for analysis 5 days after transfection. For shRNA transfection, NS from SRB1, SRC3 or SB7 patient cell lines were dissociated and seeded (750 000 cells/well) in 6 well-plates before being transfected using Fugene HD (Promega, Madison, WI, USA) with 3 μ g of shRNA (shRNA-CTR or -B8-1 or -B8-4) (Qiagen, Hilden, Germany). For transient transfections, GFP-coupled sequences were used. Cells were then observed by fluorescence microscopy (Nikon), photographed (Camera Coolsnap HQ) and used for experiments. For stable expression, shRNA sequences were coupled with a Neomycin (NEO) resistance gene. Transfected cells were then continuously selected 5 days after transfection with Neomycin (2000 μ g/ml, Merck, Darmstadt, Germany).

Sequences of shRNA-CTR, shB8-1 or shB8-4 were respectively (5' to 3'): GGAATCTCATTCGATGCATAC, CCAAGCTACTTGAGAATATTT and TCTCGCTCTTGATAGCAAATT.

Western blotting

Cells were lysed in RIPA buffer complemented with cocktails of proteases and phosphatase inhibitors (Merck). Proteins (20µg) were then separated by SDS-PAGE, electroblotted onto Nitrocellulose membranes (Amersham). The primary antibodies, incubated overnight, were: mouse anti-Bcl2, rabbit anti-ITGα6, rabbit anti-ITGαV, rabbit anti-ITGβ3, mouse anti-ITGB4, rabbit anti-ITGβ5, rabbit anti-ITGβ8, rabbit anti-OMG (Oligodendrocyte Myelin Glycoprotein), mouse anti-TUJ1 (Neuron-specific Class III β-tubulin) and rabbit anti-Sox2 (Abcam, Cambridge, UK); mouse anti-Actin, rabbit anti-GFAP (astrocytic marker, Glial Fibrillary Acidic Protein), mouse anti-Nestin, rabbit anti-Olig2 and mouse anti-GAPDH (Millipore, Billerica, MA, USA); rabbit anti-Bax, rabbit anti-Caspase 3, rabbit anti-Caspase 7 and rabbit anti-PARP (Cell Signaling, Danvers, MA, USA) and mouse anti-ITGβ1 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA). Membranes were then washed three times and incubated with secondary antibodies for 1h before revelation. All blots were representative of at least 3 independent experiments.

Flow cytometry analyses

Direct immunofluorescence assay was performed by FACS as previously described.(Dahan et al., 2014) The antibodies used were A2B5-APC, CD51/ITGαv-FITC and O4-PE (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany); ITGαvβ3-PE, ITGαvβ5-APC, ITGβ4-AlexaFluor488, ITGβ8-APC and Sox2-APC (R&D Systems Minneapolis, MN, USA); GFAP-PE (Millipore, Billerica, MA, USA); ITGα6-PE and ITGβ1-FITC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and TUJ1-AlexaFluor 488 (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). ITGαvβ8 antibody was a gift from Pr Nishimura (Markovics et al., 2010).

To evaluate the marker expression, we determined the specific fluorescence index (SFI) using the mean fluorescence intensity (MFI). The SFI was calculated with the following formula $SFI = (MFI \text{ antibody} - MFI \text{ isotype control}) / MFI \text{ isotype control}$. The gating strategy used in these analyses is based on previously published protocol (Dahan et al., 2014).

Quantitative real-time RT-PCR

Total RNAs were isolated either from GIC, GDC or conventional cell lines using RNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany). RNA from human neural stem cells (NSC), normal cortex and normal white matter were obtained from Biochain, Origene, Clontech, and Agilent. Total RNAs were then reverse-transcribed using iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Real-time qPCR reactions were carried out using Evagreen dye and ABI-Stepone+ Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) or the Fluidigm 96.96 dynamic array integrated fluidic circuits and the Biomark HD System according Advanced Development Protocol n°37 (Toulouse GeT Platform, France) (Dahan et al., 2014). β2-microglobulin (β2M) was used as endogenous control in the ΔCt analysis. Amplification folds were measured by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. The different primers (Eurogentec, Liege, Belgium) used in this study were described in **Supplementary Table 1**.

Cell adhesion and migration assays

For adhesion assay, NS cells from SRB1 or SRC3 stables patient cell lines were dissociated and GIC (50 000 cells in 100µl/well) were seeded on laminin-coated wells (10µg/ml, Sigma, Saint-Louis, MO, USA) in 96 well-plates for 6h at 37°C. Three random fields per well from triplicate wells were pictured under a 10X objective. Cells were manually delineated. The cell surface (A), perimeter (P) and circularity ($C=4\pi(A/P^2)$) of at least 30 cells per experiment

were calculated using Image J. Cells were classified in 2 groups: rounded cells with $0.85 < C < 1$; and polarized cells with $0 < C \leq 0.85$. Limits for C were determined by visual identification of a subset of rounded cells as previously described (Sadok et al., 2008). Results are presented as the percentage of polarized cells.

For migration assay, transwells (12 wells, BD Biosciences, San Diego, CA, USA) were pre-coated in their undersurface with laminin (10 μ g/ml). The upper chamber medium consisted of DMEM-F12 only (without EGF/FGF) and the lower chamber medium consisted of SCM. NS from SRB1 or SRC3 stables patient cell lines were dissociated and GIC (40 000 cells in 500 μ l/well) were seeded in Transwells incubated for 24h at 37°C. Non-migrated cells were removed by wiping the membrane upper side with cotton swab. Transmigrated cells were fixed with PFA 4% (ChemCruz, Dallas, TX, USA) and stained with Hematoxylin (Merck). The number of transmigrated cells was counted in at least 3 random fields from duplicate transwells under 10X magnification.

Cell death assays

Dead cells were quantified using FACS by determining the percentage of cells with subG1-DNA content. This subG1 population was analyzed after cell permeabilization and subsequent PI staining, as previously described (Dahan et al., 2014). Apoptosis and necrosis were also quantified on non-permeabilized cells by flow cytometry with an Alexa Fluor 488-conjugated AnnexinV (AV) and PI kit, according to the manufacturer's protocol (Invitrogen). SubG1 and AV measurements, previously described (Dahan et al., 2014), were conducted on at least 10 000 events, acquired on CellQuest software (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) and analyzed with VenturiOne software (Applied Cytometry, Sheffield, UK). Post-mitotic cell death was also analyzed after cells permeabilization with PBS-0.15% Triton for 5 min at room temperature and DAPI staining (0.2 μ g/ml, Sigma). The number of aberrant nuclei observed with DAPI staining was counted in at least 3 random fields using fluorescence microscopy (Axio-vert). For those three cell death assays, dissociated GIC were treated or not with a 5 Gy irradiation and harvested for analysis 5 days after irradiation (Gamma-cell Exactor 40, Nordion, Ottawa, Canada). Finally, Caspase-8 and Caspase-3/7 activity assays were also performed. GIC were dissociated and seeded (20 000 cells in 100 μ l/ well) on white 96 well-plates. After buffer resuspension, caspase substrate (Caspase-Glo8 or Caspases-Glo 3/7, Promega, Madison, WI, USA) was added in each well (100 μ l) for 1h at 37°C, according to the manufacturer instructions. Caspases activities were quantified by luminometry using a plate reader (FLUOstar Optima). Results show relative caspases activities measured after subtracting the background from all values.

Clonogenic irradiation assays

Stable cell lines SRB1 and SRC3 were dissociated and plated in 96 well-plates (500 cells/wells), irradiated at escalating doses (0, 2, 4, 6, 8 and 10 Gy) with the Gamma-cell Exactor 40, as previously described (Dahan et al., 2014). Irradiated cells were subsequently incubated at 37°C for 15 days. Survival fractions were then determined by counting the number of surviving NS clones by microscopy.

Orthotopic xenograft generation

Orthotopic human GB xenografts were established in 4-6 weeks-old female nude mice (Janvier Labs, France) as previously described (Dahan et al., 2014). Briefly, mice received a stereotaxically guided injection of 2.5×10^5 cells (SRB1 and SRC3 stables cell lines) resuspended in 5 μ l of DMEM-F12. The injection was precisely located into right forebrain (2mm lateral and 1mm anterior to bregma at a 5 mm depth from the skull surface). Survival curves were established and mice were sacrificed at the appearance of neurological signs. Excised brains were collected for subsequent immunohistochemistry analysis.

Immunohistochemistry (IHC)

IHC was performed on paraffin-embedded sections (5 μm) of excised brains of xenografted mice (single staining) or GB patients samples (double staining). The sections were incubated at 57°C for 20 min followed by rehydration in xylene and ethanol series. Antigen retrieval was performed at 95°C for 20 min using DAKO buffer pH9 (EnVision, Mankato, MN, USA) and washed with PBS.

For single staining, slides were blocked with Peroxidase Blocking Reagent (EnVision) (5 min), washed with PBS, incubated 30 min with primary antibodies diluted in antibody diluent (EnVision) and then washed with 0.3% Tween in PBS. The primary antibodies used were rabbit anti-ITG β 8 (Abcam), rabbit anti-Sox2 (Abcam) and mouse anti-Nestin (Millipore). Slides were then incubated with FLEX/HRP (EnVision) (20 min), washed (0.3% Tween in PBS) and revealed with DAB (Diaminobenzidine peroxidase buffer) mixed with FLEX/DAB chromogen (EnVision) (5 min). Sections were then washed with distilled water, counterstained with Hemalun of Mayer (Merck), dehydrated and mounted with Eukitt solution before being viewed on a Nikon microscope. The numbers of positive and total cells were counted in at least 3 random fields from each slide under 63X magnification. Results are presented as the average percentage of positive and negative cells for each marker (ITG β 8 or Sox2) in each condition (shCTR or shB8-1 or shB8-4) (4 mice / group).

For double staining, IHC were performed on tumor patients slides (n =10) according to the manufacturer's protocol (EnVision G2 Doublestain System, Rabbit/Mouse (DAB+/Permanent Red)), with rabbit anti-ITG β 8 marked with Permanent Red and rabbit anti-Sox2 marked with DAB.

TCGA and REMBRANDT datasets

We used The Cancer Genome Atlas (TCGA) dataset to analyze gene expression in newly diagnosed primary GB patients (TCGA, 2008; Verhaak et al., 2010). For our analyses, a dataset (processed data: version 2015-02-24, downloaded from <https://genome-cancer.ucsc.edu>) was used based on RNA-seq data (Illumina HiSeq 2000 RNA Sequencing platform, University of North Carolina TCGA genome characterization center, n=149). We first assessed Overall Survival (OS) using this TCGA dataset among a subgroup of newly diagnosed primary GB patients treated by standard chemo-radiotherapy (n=59). For these analyses, gene expression levels were dichotomized based on a high expression cutoff (within the 75% quartile). We also used the Repository for Molecular Brain Neoplasia Data (REMBRANDT) database (n=178 GB with available survival data) to validate the prognostic ability of ITGB8. Survival rates were estimated by the Kaplan-Meier method with 95% confidence intervals (CI). Univariate analyses were performed using the Log-rank test. We then performed correlation analyses between ITGB8 expression and several classic stem and differentiation genes in the TCGA dataset. Multiple comparisons between molecular subgroups were performed using Mann–Whitney U test. The Benjamini-Hochberg procedure was applied for multiple comparisons. Two-sided *P* values of less than 0.05 were considered statistically significant. Statistical analyses were performed using STATA 12.0 software.

Statistical analysis

All the results depicted in this study are presented as means \pm SEM of at least 3 independent experiments in the same cell line and were reproduced in at least 1 or 2 other cell lines. Significant differences (**P* < 0.05, ***P* < 0.01 and ****P* < 0.001) were evaluated with the unpaired Student t-test. Log-rank analysis of Kaplan-Meier survival curves was used to evaluate the tumorigenesis of injected cells, with *P* < 0.05 considered as significantly different (***P* < 0.01 and ****P* < 0.001).

II.6. Acknowledgements

We would like to thank Emmanuelle Uro-Coste and Monique Courtade-Saïdi at the IUCT-oncopole Anatomopathology service, Jean-José Maoret and Frédéric Martins at the Toulouse GeT Platform, Manon Farcé (Inserm U1037) for her technical assistance on the FACS sorting and Julie Sesen and Nicolas Skuli for their scientific inputs. We also want to acknowledge the Institut Claudius Regaud and GRICR, RITC foundation (Stemri), INSERM, the Canceropôle Grand Sud-Ouest (A.L), the Association pour la Recherche sur les Tumeurs Cérébrales (A.L and L.M.) and the THE program from Plan Cancer 2016 (MoGlimaging). L.M and S.B were supported by a PhD fellowship from Plan Cancer/ITMO and P.D and P.D. by a government PhD fellowship.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

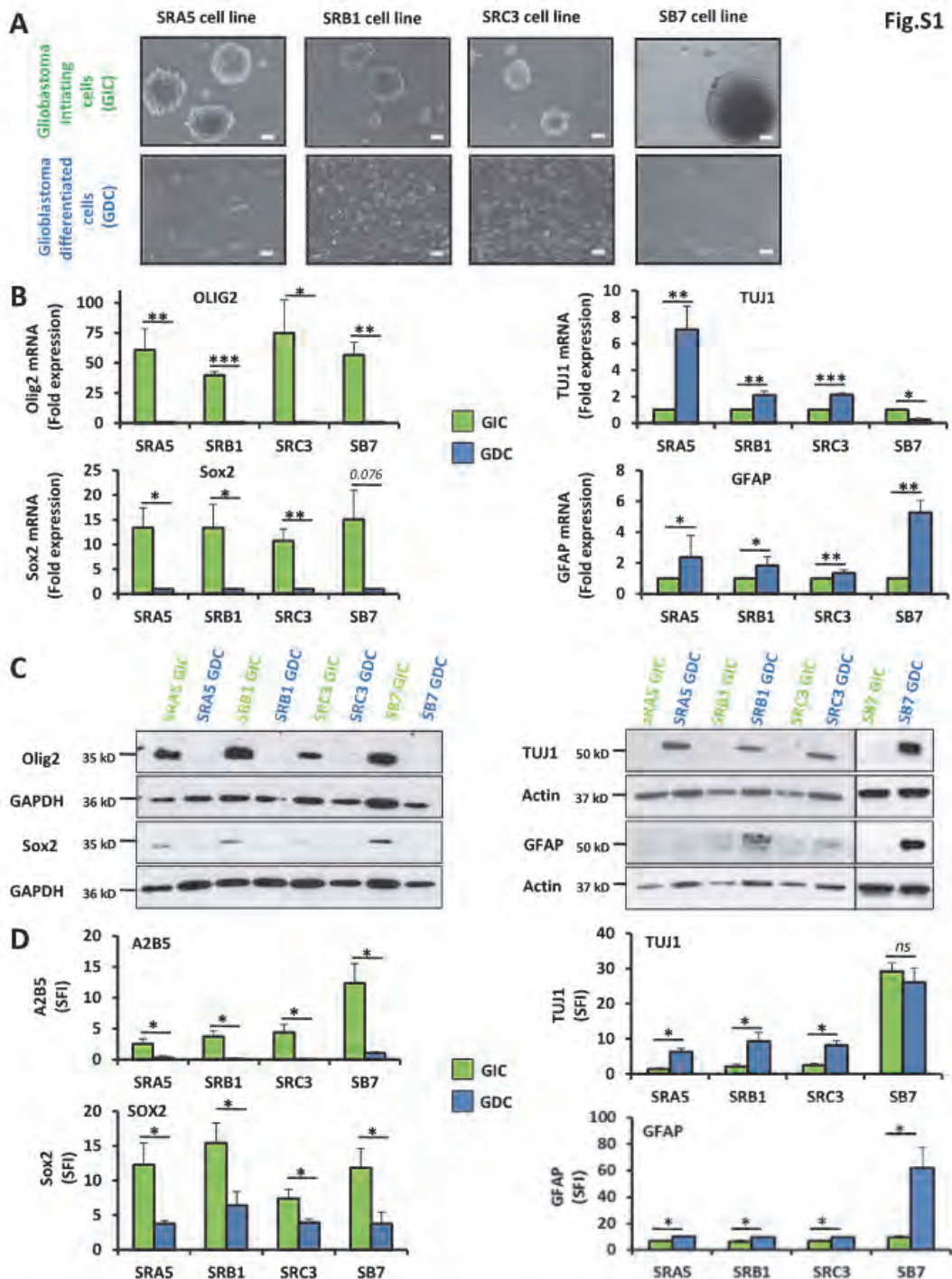
II.7. References

1. Weller M, van den Bent M, Hopkins K, Tonn JC, Stupp R, Falini A *et al.* EANO guideline for the diagnosis and treatment of anaplastic gliomas and glioblastoma. *Lancet Oncol* 2014; **15**: e395-e403.
2. Lathia JD, Mack SC, Mulkearns-Hubert EE, Valentim CL, Rich JN. Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes Dev* 2015; **29**: 1203-1217.
3. Takada Y, Ye X, Simon S. The integrins. *Genome Biol* 2007; **8**: 215.
4. Hehlhans S, Haase M, Cordes N. Signalling via integrins: implications for cell survival and anticancer strategies. *Biochim Biophys Acta* 2006; **1775**: 163-180.
5. 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* 2017; **8**: 86947-86968.
6. Nakada M, Nambu E, Furuyama N, Yoshida Y, Takino T, Hayashi Y *et al.* Integrin alpha3 is overexpressed in glioma stem-like cells and promotes invasion. *Br J Cancer* 2013; **108**: 2516-2524.
7. Lathia JD, Gallagher J, Heddleston JM, Wang J, Eyler CE, Macswords J *et al.* Integrin alpha 6 regulates glioblastoma stem cells. *Cell Stem Cell* 2010; **6**: 421-432.
8. Haas TL, Sciuto MR, Brunetto L, Valvo C, Signore M, Fiori ME *et al.* Integrin alpha7 Is a Functional Marker and Potential Therapeutic Target in Glioblastoma. *Cell Stem Cell* 2017; **21**: 35-50 e39.
9. Roth P, Silginer M, Goodman SL, Hasenbach K, Thies S, Maurer G *et al.* Integrin control of the transforming growth factor-beta pathway in glioblastoma. *Brain* 2013; **136**: 564-576.
10. Stupp R, Hegi ME, Gorlia T, Erridge SC, Perry J, Hong YK *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* 2014.
11. Lakhe-Reddy S, Li V, Arnold TD, Khan S, Schelling JR. Mesangial cell alphavbeta8-integrin regulates glomerular capillary integrity and repair. *Am J Physiol Renal Physiol* 2014; **306**: F1400-1409.
12. Mobley AK, Tchaicha JH, Shin J, Hossain MG, McCarty JH. Beta8 integrin regulates neurogenesis and neurovascular homeostasis in the adult brain. *J Cell Sci* 2009; **122**: 1842-1851.
13. Riemenschneider MJ, Mueller W, Betensky RA, Mohapatra G, Louis DN. 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* 2005; **167**: 1379-1387.
14. Lathia JD, Heddleston JM, Venere M, Rich JN. Deadly teamwork: neural cancer stem cells and the tumor microenvironment. *Cell Stem Cell* 2011; **8**: 482-485.
15. Reyes SB, Narayanan AS, Lee HS, Tchaicha JH, Aldape KD, Lang FF *et al.* alphavbeta8 integrin interacts with RhoGDI1 to regulate Rac1 and Cdc42 activation and drive glioblastoma cell invasion. *Mol Biol Cell* 2013; **24**: 474-482.
16. Tchaicha JH, Reyes SB, Shin J, Hossain MG, Lang FF, McCarty JH. Glioblastoma angiogenesis and tumor cell invasiveness are differentially regulated by beta8 integrin. *Cancer Res* 2011; **71**: 6371-6381.
17. Guerrero PA, Tchaicha JH, Chen Z, Morales JE, McCarty N, Wang Q *et al.* Glioblastoma stem cells exploit the alphavbeta8 integrin-TGFbeta1 signaling axis to drive tumor initiation and progression. *Oncogene* 2017.

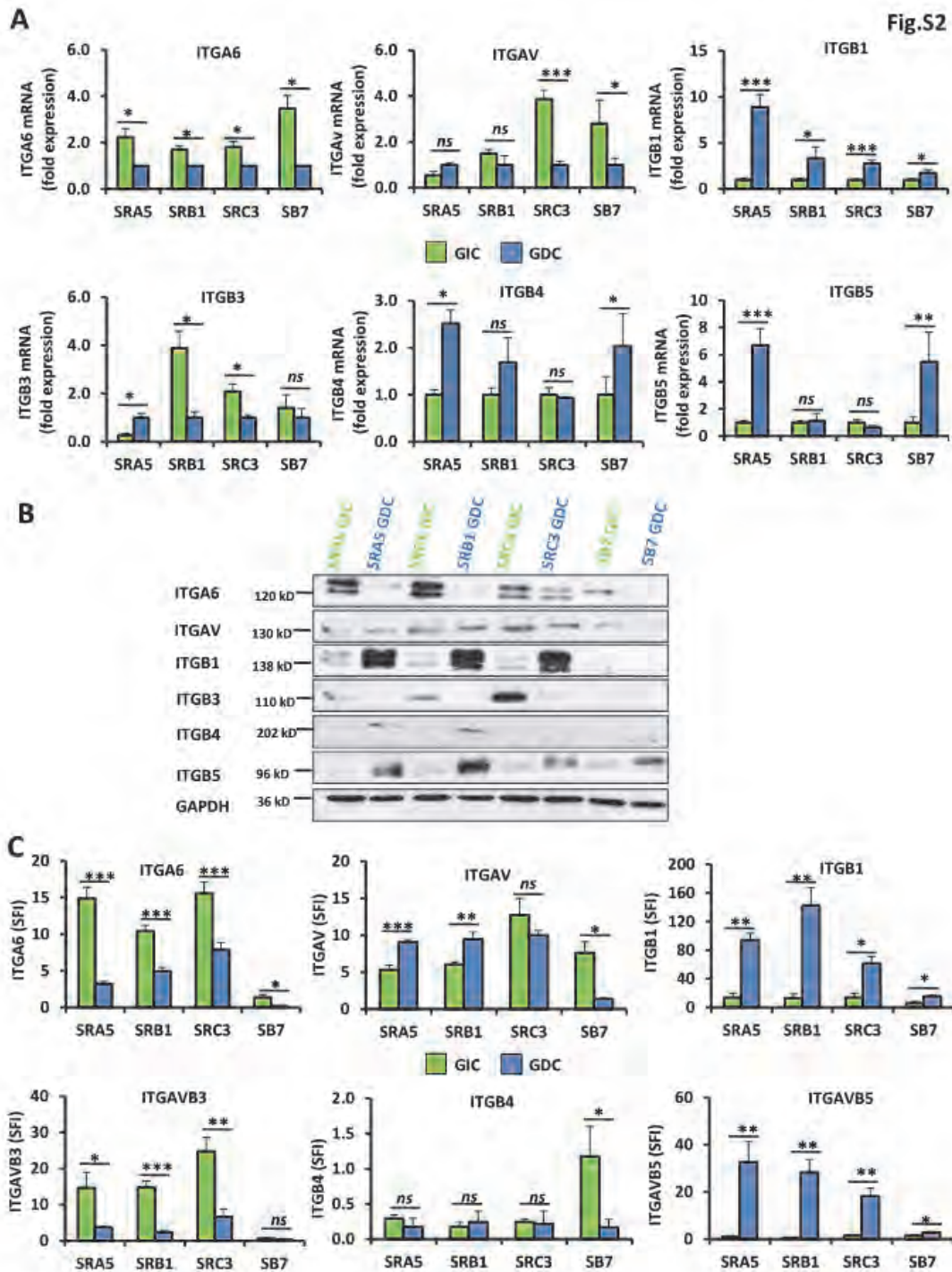
18. Dahan P, Martinez Gala J, Delmas C, Monferran S, Malric L, Zentkowski D *et al.* Ionizing radiations sustain glioblastoma cell dedifferentiation to a stem-like phenotype through survivin: possible involvement in radioresistance. *Cell Death Dis* 2014; **5**: e1543.
19. Roos A, Ding Z, Loftus JC, Tran NL. Molecular and Microenvironmental Determinants of Glioma Stem-Like Cell Survival and Invasion. *Front Oncol* 2017; **7**: 120.
20. van der Flier A, Sonnenberg A. Function and interactions of integrins. *Cell and tissue research* 2001; **305**: 285-298.
21. 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* 2006; **444**: 756-760.
22. Gouaze-Andersson V, Delmas C, Taurand M, Martinez-Gala J, Evrard S, Mazoyer S *et al.* FGFR1 Induces Glioblastoma Radioresistance through the PLCgamma/Hif1alpha Pathway. *Cancer Res* 2016; **76**: 3036-3044.
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 neuropathologica* 2016; **131**: 803-820.
24. Chao C, Carmical JR, Ives KL, Wood TG, Aronson JF, Gomez GA *et al.* CD133+ colon cancer cells are more interactive with the tumor microenvironment than CD133-cells. *Lab Invest* 2012; **92**: 420-436.
25. Patel AP, Tirosch I, Trombetta JJ, Shalek AK, Gillespie SM, Wakimoto H *et al.* Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science* 2014; **344**: 1396-1401.
26. Schittenhelm J, Klein A, Tatagiba MS, Meyermann R, Fend F, Goodman SL *et al.* Comparing the expression of integrins alphavbeta3, alphavbeta5, alphavbeta6, alphavbeta8, fibronectin and fibrinogen in human brain metastases and their corresponding primary tumors. *Int J Clin Exp Pathol* 2013; **6**: 2719-2732.
27. Weller M, Nabors LB, Gorlia T, Leske H, Rushing E, Bady P *et al.* Cilengitide in newly diagnosed glioblastoma: biomarker expression and outcome. *Oncotarget* 2016; **7**: 15018-15032.
28. Janouskova H, Maglott A, Leger DY, Bossert C, Noulet F, Guerin E *et al.* Integrin alpha5beta1 plays a critical role in resistance to temozolomide by interfering with the p53 pathway in high-grade glioma. *Cancer Res* 2012; **72**: 3463-3470.
29. Virga J, Bogнар L, Hortobagyi T, Zahuczky G, Csosz E, Kallo G *et al.* Prognostic Role of the Expression of Invasion-Related Molecules in Glioblastoma. *Journal of neurological surgery. Part A, Central European neurosurgery* 2017; **78**: 12-19.
30. Ducassou A, Uro-Coste E, Verrelle P, Filleron T, Benouaich-Amiel A, Lubrano V *et al.* alphavbeta3 Integrin and Fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1): Prognostic factors in a phase I-II clinical trial associating continuous administration of Tipifarnib with radiotherapy for patients with newly diagnosed glioblastoma. *Eur J Cancer* 2013; **49**: 2161-2169.
31. Ortensi B, Setti M, Osti D, Pelicci G. Cancer stem cell contribution to glioblastoma invasiveness. *Stem cell research & therapy* 2013; **4**: 18.
32. Mehta S, Lo Cascio C. Developmentally regulated signaling pathways in glioma invasion. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2017.
33. Mertens-Walker I, Fernandini BC, Maharaj MS, Rockstroh A, Nelson CC, Herington AC *et al.* The tumour-promoting receptor tyrosine kinase, EphB4, regulates expression of Integrin-beta8 in prostate cancer cells. *BMC cancer* 2015; **15**: 164.
34. Xu Z, Wu R. Alteration in metastasis potential and gene expression in human lung cancer cell lines by ITGB8 silencing. *Anat Rec (Hoboken)* 2012; **295**: 1446-1454.

35. Wang WW, Wang YB, Wang DQ, Lin Z, Sun RJ. Integrin beta-8 (ITGB8) silencing reverses gefitinib resistance of human hepatic cancer HepG2/G cell line. *International journal of clinical and experimental medicine* 2015; **8**: 3063-3071.
36. Mazaheri N, Peymani M, Galehdari H, Ghaedi K, Ghoochani A, Kiani-Esfahani A *et al.* Ameliorating Effect of Osteopontin on H2O2-Induced Apoptosis of Human Oligodendrocyte Progenitor Cells. *Cellular and molecular neurobiology* 2017.
37. Ozawa A, Sato Y, Imabayashi T, Uemura T, Takagi J, Sekiguchi K. Molecular Basis of the Ligand Binding Specificity of alphavbeta8 Integrin. *The Journal of biological chemistry* 2016; **291**: 11551-11565.
38. Friedmann-Morvinski D, Bhargava V, Gupta S, Verma IM, Subramaniam S. Identification of therapeutic targets for glioblastoma by network analysis. *Oncogene* 2016; **35**: 608-620.
39. Pietras A, Katz AM, Ekstrom 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* 2014; **14**: 357-369.
40. Lamour V, Henry A, Kroonen J, Nokin MJ, von Marschall Z, Fisher LW *et al.* Targeting osteopontin suppresses glioblastoma stem-like cell character and tumorigenicity in vivo. *Int J Cancer* 2015; **137**: 1047-1057.
41. Henry A, Nokin MJ, Leroi N, Lallemand F, Lambert J, Goffart N *et al.* New role of osteopontin in DNA repair and impact on human glioblastoma radiosensitivity. *Oncotarget* 2016; **7**: 63708-63721.
42. Anido J, Saez-Borderias A, Gonzalez-Junca A, Rodon L, Folch G, Carmona MA *et al.* TGF-beta Receptor Inhibitors Target the CD44(high)/Id1(high) Glioma-Initiating Cell Population in Human Glioblastoma. *Cancer Cell* 2010; **18**: 655-668.
43. Joseph JV, Balasubramaniyan V, Walenkamp A, Kruyt FA. TGF-beta as a therapeutic target in high grade gliomas - promises and challenges. *Biochem Pharmacol* 2013; **85**: 478-485.
44. Stockis J, Lienart S, Colau D, Collignon A, Nishimura SL, Sheppard D *et al.* Blocking immunosuppression by human Tregs in vivo with antibodies targeting integrin alphaVbeta8. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017; **114**: E10161-E10168.
45. 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* 2008; **123**: 357-364.
46. Sesen J, Dahan P, Scotland SJ, Saland E, Dang VT, Lemarie A *et al.* Metformin inhibits growth of human glioblastoma cells and enhances therapeutic response. *PLoS One* 2015; **10**: e0123721.
47. Markovics JA, Araya J, Cambier S, Jablons D, Hill A, Wolters PJ *et al.* Transcription of the transforming growth factor beta activating integrin beta8 subunit is regulated by SP3, AP-1, and the p38 pathway. *The Journal of biological chemistry* 2010; **285**: 24695-24706.
48. Sadok A, Bourgarel-Rey V, Gattacceca F, Penel C, Lehmann M, Kovacic H. Nox1-dependent superoxide production controls colon adenocarcinoma cell migration. *Biochim Biophys Acta* 2008; **1783**: 23-33.
49. TCGA CGARN. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 2008; **455**: 1061-1068.
50. Verhaak RG, 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* 2010; **17**: 98-110.

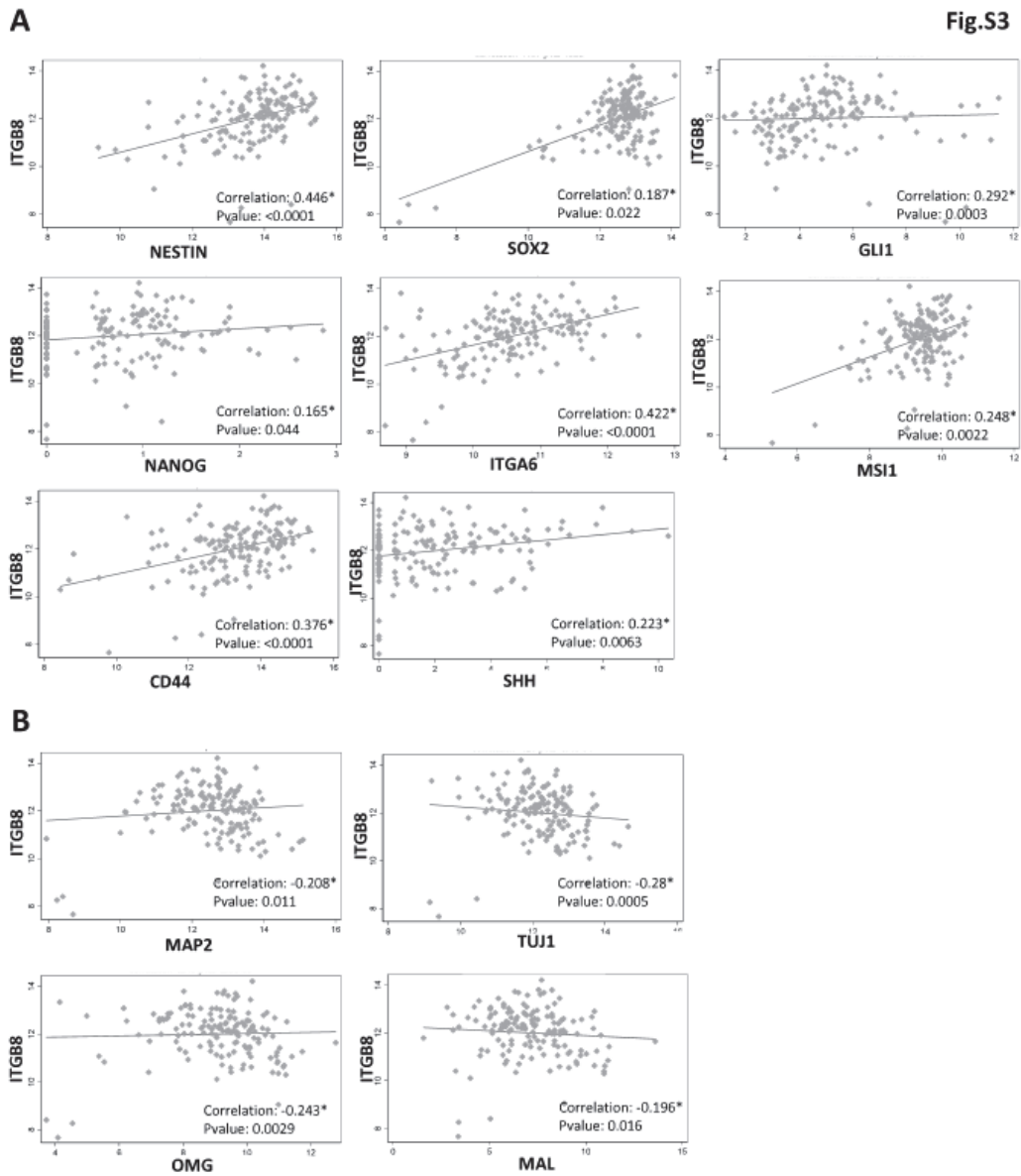
II.8. Supplemental figures and data



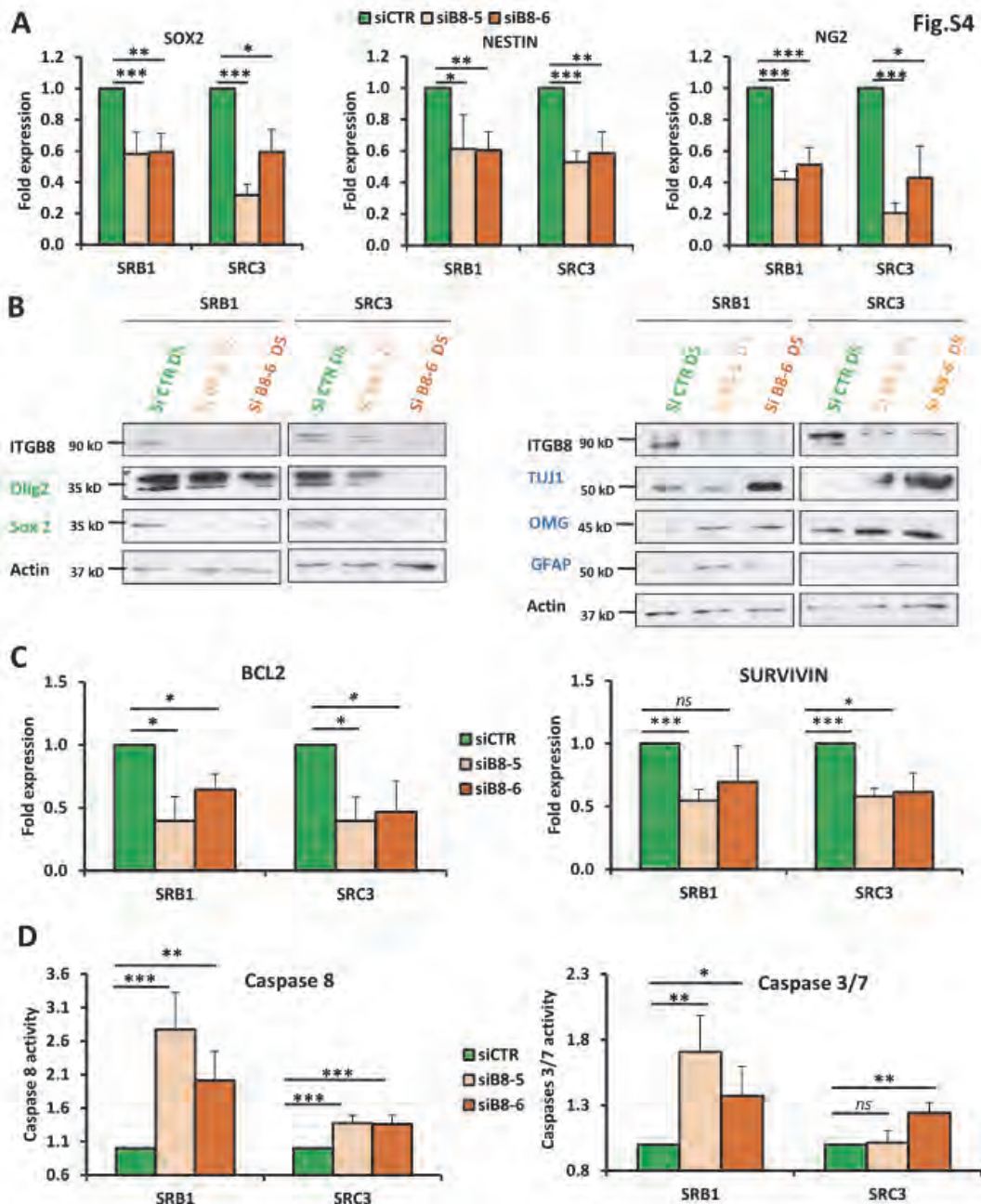
Supplemental Figure 1. Phenotypic characterization of GIC-enriched neurospheres and related GDC cultures. (A–D) GIC-enriched neurosphere cell lines isolated from 4 patient GB (SRA5, SRB1, SRC3, and SB7) were kept in stem cell medium (SCM) or allowed to differentiate as adherent GB cells for at least 15 days in FCS medium. (A) Phase contrast photomicrographs of neurospheres or GB differentiated cells. Magnification x10, scale bar 6 μ m. (B) qPCR analysis of the stem (Olig2 and Sox2) and differentiation (TUJ1 and GFAP) markers in GIC and GDC. Shown are the fold inductions expressed as means \pm SEM of at least 3 independent experiments. (C) Immunoblots of the stem (Olig2 and Sox2) and differentiation (TUJ1 and GFAP) markers in GIC or GDC. Equal gel loading and transfer efficiency were checked with anti-actin or anti-GAPDH antibodies. (D) Immunofluorescence FACS analysis of the stem (A2B5 and Sox2) and differentiation (TUJ1 and GFAP) markers in GIC and GDC. Shown SFI were representative of 3 independent experiments. (B, C) $p < 0.05$, $** p < 0.01$, $*** p < 0.001$ compared with the related control.



Supplemental Figure 2. Expression of major integrins in GIC compared to GDC. (A-C) GIC-enriched neurospheres cell lines isolated from 4 patient GB (SRA5, SRB1, SRC3, and SB7) were maintained in stem cell medium or allowed to differentiate as adherent GB cells for 15 days in FCS-enriched medium. Analysis of the major integrins (ITGA6, ITGAV, ITGB1, ITGB3, ITGB4 and ITGB5) expression in GIC and GDC was performed at the mRNA or protein level either by (A) qPCR or (B) immunoblots. (C) Immunofluorescence FACS analysis was also performed to determine membrane expression of ITGA6, ITGAV, ITGB1, ITGAVB3, ITGB4 and ITGAVB5. (A, C) Results are expressed as the means \pm SEM of at 3 three independent experiments. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.



Supplemental Figure 3. Correlation of ITGB8 and stem/differentiated markers in GB patients from the TCGA database. Shown are the statistical correlation graphs between the expression of ITGB8 and **(A)** stem (NESTIN, SOX2, GLI1, NANOG, ITGA6, MSI1, CD44 and SHH) or **(B)** differentiated markers (MAP2, TUJ1, MAL and OMG) based on the TCGA database analysis (n=146 GB patients). Shown are the Spearman's rank correlation coefficients and related *p*-values.



Supplemental Figure 4. siRNA-mediated ITGβ8 knock-down impairs GIC stemness and induces apoptosis. (A-D) GIC (SRB1 and SRC3 cell lines) were transfected with siB8-5, siB8-6 or siCTR and harvested 5 days after transfection. (A-B) Expression levels of stem (Sox2, Nestin, NG2 and Olig2) and differentiation (TUJ1, OMG and GFAP) markers were analyzed in GIC at the mRNA or protein level either by (A) qPCR or (B) immunoblots respectively. (C-D) In order to analyze the pro-apoptotic process, GIC were subjected either to (C) qPCR analysis of cell death markers (BCL2, Survivin) or (D) Caspases 8 and 3-7 activity assays. (A, C-D) Results are expressed as the means ± SEM of at least 3 independent experiments. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ compared with the related siCTR condition.

Supplementary Table 1: qPCR and fluidigm primers.

GENE	PRIMER FORWARD (5' – 3')	PRIMER REVERSE (3' – 5')
BAX	CGAGAGGTCTTTTTCCGAGTG	TAGAAAAGGGCGACAACCCG
BCL2	TGCGGCCTCTGTTTGATTTC	GGGCCAAACTGAGCAGAGTCT
GAPDH	TGCACCACCAACTGCTTAGC	GGCATGGACTGTGGTCATGAG
GFAP	GGCAAAGCACCAAAGACGG	GGCGGCCTTCCATTTACAAT
ITGA6	TGATCGAAATTCCTACCCTGATG	TAATCACAGGCCGGGATCTG
ITGAV	GGAGCAATTCGACGAGCACT	TTCATCCCGCAGATACGCTA
ITGB1	CAAAGGAACAGCAGAGAAGC	ATTGAGTAAGACAGGTCCATAAGG
ITGB3	GTGGTAGAAGAGCCAGAGTGTCC	CGTGGATGGTGTGAGGAGTTTC
ITGB4	CTGTACCCGTATTGCGACT	AGGCCATAGCAGACCTCGTA
ITGB5	AAGTGCCACCTCATGTGAAGA	CCACAGCCATTTTTGACAAGG
ITGB8	ACCAGGAGAAGTGTCTATCCAG	CCAAGACGAAAGTCACGGGA
MAL	CGCTGCCCTCTTTTACCTCAG	GAAGCCGTCTTGCATCGTGAT
NESTIN	ATCGCTCAGGTCCTGGAAGG	AAGCTGAGGGAAGTCTTGAG
Olig2	CAGAAGCGCTGATGGTCATA	TCGGCAGTTTTGGGTATTTC
Survivin	CGAGGCTGGCTTCATCCA	AGAAGAAACACTGGGCCAAGTC
Sox2	GCACATGAACGGCTGGAGCAACG	TGCTGCGAGTAGGACATGCTGTAG
TUJ1	GCTCAGGGGCCTTTGGACATCTCTT	TTTTCACACTCCTTCCGCACCACAT

III. Conclusion des résultats

En conclusion, les résultats présentés dans ce manuscrit ont permis de répondre aux objectifs suivants, énoncés précédemment :

1) Etude de l'expression de $\beta 8$ dans différentes lignées primaires de GSC par rapport aux cellules différenciées de GB.

J'ai démontré au cours de ma thèse, par des analyses transcriptionnelles et protéiques, que l'intégrine **$\beta 8$ est surexprimée dans des primocultures de GSC** issues de résections de GB, et que cette expression est supérieure à celle des cellules plus différenciées de GB. De plus, j'ai également participé à mettre en évidence l'**expression de $\beta 8$ dans des coupes de tumeurs de patients et sa colocalisation avec le marqueur souche Sox2** (Services IHC Ranguel et IUCT-O, D. Da Mota, F. Arnauduc, S. Evrard, M. Courtade, A. Siegfried, E. Uro-Coste). Enfin, l'analyse bioinformatique des données TCGA (Bureau des essais cliniques de l'IUCT-O, T. Filleron, J. Gilhodes), a permis de mesurer l'expression de $\beta 8$ dans les différents sous-types de GB et de démontrer que l'expression de $\beta 8$ est **corrélée à celles de nombreux marqueurs souches** et qu'une **forte expression de $\beta 8$ est associée à un mauvais pronostic** dans les GB.

Conclusion n°1 : Nous avons identifié $\beta 8$ comme marqueur membranaire sélectif des GSC.

2) Rôle de l'intégrine $\beta 8$ *in vitro* et *in vivo* dans le maintien de l'état souche, la survie, la prolifération, l'auto-renouvellement et la tumorigenèse des GSC.

J'ai ensuite mis en évidence que **$\beta 8$ est associée à l'état souche et à des fonctionnalités propres à ces cellules**, notamment leur **auto-renouvellement, leur viabilité, leur adhérence et leur migration**. En inhibant sélectivement $\beta 8$ dans nos primocultures de GSC par si/shRNA, j'ai en effet démontré, par plusieurs techniques *in vitro*, une diminution de la formation de neurosphères (Plateau Cytométrie CRCT, M. Farcé) et de la migration cellulaire (CRCT Equipe 3, S. Monferran) ainsi qu'une augmentation de la différenciation et de la mort cellulaire. Enfin, *in vivo*, via la mise en place de xénogreffes orthotopiques (Zootechnie du CREFRE, C. Delmas), j'ai montré que **l'inhibition de $\beta 8$ se traduit par une diminution de la tumorigenèse et une augmentation de la survie des souris**, avec une **diminution importante de Sox2** dans les tumeurs négatives pour $\beta 8$.

Conclusion n°2 : Nous avons caractérisé $\beta 8$ comme un marqueur fonctionnel des GSC et comme une cible thérapeutique capable de réduire la population de GSC dans les tumeurs.

3) Rôle de l'intégrine $\beta 8$ *in vitro* dans les mécanismes de radiorésistance intrinsèques aux GSC.

J'ai montré, en analysant les différents types de morts cellulaires radio-induites et par la réalisation d'expériences de clonogénies en réponse à des doses croissantes d'irradiation (C. Delmas), que l'inhibition de $\beta 8$ *in vitro* permet **de radiosensibiliser les GSC à la radiothérapie**. L'intégrine $\beta 8$ est donc impliquée dans la radiorésistance des GSC.

Conclusion n°3 : Nous proposons l'inhibition de $\beta 8$ comme nouvelle stratégie radiosensibilisante en association à la radiothérapie dans le traitement des glioblastomes.

Au final, mes résultats de thèse permettent d'identifier l'intégrine $\beta 8$ comme une protéine membranaire nécessaire au maintien de l'état souche dans les GSC mais surtout comme une potentielle cible thérapeutique radiosensibilisante dans les glioblastomes.

DISCUSSIONS ET PERSPECTIVES

Les GB sont des tumeurs invasives, radio- et chimio-résistantes, qui récidivent rapidement. Ces propriétés agressives reposent notamment sur la présence, au sein de ces tumeurs hétérogènes, de GSC très tumorigènes et radiorésistantes (Cheng et al., 2010). Les stratégies de recherche actuelles visent donc à cibler spécifiquement cette population pour améliorer le traitement de ces tumeurs cérébrales dévastatrices. Les intégrines, via leurs rôles majeurs dans l'invasion, l'angiogenèse et la radiorésistance tumorale représentent des candidats potentiels intéressants (Goodman and Picard, 2012). Nous avons fait l'hypothèse que les GSC pourraient présenter des profils d'expression d'intégrines différents de ceux rencontrés dans les cellules tumorales différenciées. Certaines pourraient alors constituer des cibles spécifiques à cette population souche, comme cela a pu être suggéré pour l'intégrine $\alpha 6$ (Lathia et al., 2010) et tout récemment pour $\alpha 7$ (Haas et al., 2017).

Au vu de résultats préliminaires obtenus au laboratoire, appuyés par la littérature, c'est l'intégrine $\beta 8$ qui a retenu notre attention. En effet, mon équipe d'accueil a observé, lors d'une analyse transcriptionnelle à haut-débit réalisée en 2013, une surexpression de $\beta 8$ dans toutes les primocultures de GSC étudiées. De plus, la même année, une étude a démontré que $\beta 8$ est effectivement exprimée à la membrane des GSC (Roth et al., 2013) tandis que d'autres travaux commencent à mettre en évidence un rôle pro-tumoral de $\beta 8$ dans les GB (Reyes et al., 2013; Tchaicha et al., 2011). Cependant, à l'initiation de cette thèse, il n'existait aucune donnée sur les fonctions de $\beta 8$ dans les GSC, notamment vis-à-vis de leurs caractéristiques souches, leur résistance aux traitements et leur tumorigenèse. C'est dans ce contexte que nous avons émis **l'hypothèse que $\beta 8$ serait surexprimée à la surface de ces GSC de façon sélective par rapport aux cellules différenciées de GB et qu'elle pourrait jouer un rôle fonctionnel important dans cette population**. Mon projet de thèse a donc consisté à étudier (i) l'expression de cette intégrine $\beta 8$ dans les GSC, ainsi que son rôle (ii) dans le maintien de l'état souche et (iii) dans la radiorésistance de ces cellules.

Pour mener à bien ce projet, nous avons utilisé comme modèles cellulaires **quatre lignées de GSC isolées à partir de tumeurs de patients**, ainsi que les cellules différenciées de GB obtenues après différenciation forcée de ces GSC en milieu riche en SVF. Nous avons dans un premier temps caractérisé ces primocultures et leurs homologues différenciées. En effet, toutes les lignées de GSC forment des NS en suspension et expriment fortement un large panel de marqueurs souches. Après 15 jours de culture en milieu SVF, les cellules adhèrent, acquièrent une morphologie de type neurale différenciée et répriment l'expression des marqueurs souches au profit des marqueurs de différenciation neuronaux, astrocytaires et oligodendrocytaires. Le potentiel tumorigène de ces GSC *in vivo*, a également été confirmé, via la mise en place de xénogreffes orthotopiques, chez la souris athymique afin de compléter cette caractérisation. Nous avons pu établir ici les pré-requis indispensables à l'utilisation de ces quatre primocultures de NS, ces lignées issues de patients nous servant alors de références pour l'étude de l'expression et du rôle de l'intégrine $\beta 8$ dans les GSC. Ces primocultures de GSC, capables de récapituler *in vivo* les caractéristiques moléculaires des tumeurs initialement présentes chez les patients atteints de GB, sont un modèle d'étude beaucoup plus proche, quoiqu'encore fortement différent de la réalité clinique, que les lignées conventionnelles de GB, notamment par leur potentiel invasif *in vivo*. Il faut également noter que, les GB étant des tumeurs extrêmement hétérogènes (Malric et al., 2017), nos résultats ont été reproduits sur deux lignées de patients au moins, afin de généraliser au maximum nos observations.

I. Identification de l'intégrine $\beta 8$ comme nouveau marqueur membranaire des GSC

Nous avons débuté ce travail de recherche par l'analyse de l'expression de $\beta 8$ dans les GSC. Pour cela, nous avons mesuré son expression (ARNm et protéine) dans nos quatre primocultures de NS issues de patients. Comme décrit par Roth *et al* (Roth et al., 2013), nous avons détecté **une forte expression de $\beta 8$ dans les GSC**. De surcroît, cette expression s'est avérée **plus importante dans ces cellules initiatrices de tumeurs que dans leurs homologues différenciées**, de façon similaire aux marqueurs souches classiques (Sox2, Nestine, Olig2, ...). Ces résultats viennent conforter les données préliminaires précédemment établies au laboratoire sur 5 autres primocultures. Une étude extrêmement récente du groupe de McCarty (Houston, USA) appuie nos résultats en montrant que $\beta 8$ est également fortement exprimée dans des modèles sphéroïdes de GSC issus de 5 patients (Guerrero et al., 2017). En parallèle, nous avons étudié l'expression de l'intégrine $\alpha 6$ dans nos modèles, en raison de son rôle connu dans le maintien de l'état souche des GSC (Lathia et al., 2010). Nous avons constaté que cette intégrine présente un profil d'expression similaire à celui de $\beta 8$. Ces premiers éléments obtenus semblent donc en faveur **d'une expression plus sélective de $\beta 8$ dans les GSC**. Pour compléter cette partie de l'étude, nous avons analysé l'expression transcriptionnelle de $\beta 8$ dans des tissus neuraux humains normaux (adultes) ainsi que dans des NSC. Nous avons ainsi montré que **$\beta 8$ est également surexprimée dans les tumeurs par rapport aux tissus sains et que son plus fort niveau d'expression est retrouvé dans les GSC**.

D'autre part, nous avons réalisé avec le Bureau des Essais Cliniques de l'IUCT-Oncopôle une analyse bioinformatique des données issues de la base TCGA (The Cancer Genome Atlas). Cette étude statistique a permis de démontrer que **$\beta 8$ est significativement surexprimée dans les GB par rapport aux tissus neuraux sains** et surtout qu'une plus **forte expression de $\beta 8$ est associée à un mauvais pronostic chez ces patients** (diminution de la survie médiane) (n=184 GB). Ce résultat, démontré auparavant dans les gliomes (tous grades) avec la base de données REMBRANDT ((Reyes et al., 2013), n=339 gliomes) et de façon similaire à ce qui a été observé pour des marqueurs souches « classiques » comme CD133 (Pallini et al., 2008), constitue un argument supplémentaire à l'utilisation potentielle de l'intégrine $\beta 8$ comme marqueur des GSC. De plus, notre analyse statistique a permis de **corrélér positivement et significativement l'expression de $\beta 8$ avec celle de différents marqueurs souches** comme Nanog, Nestine, ITGA6, GLI1, MSH1, SHH et SOX2. Par ailleurs, toujours avec la base de données TCGA, nous avons analysé l'expression de $\beta 8$ dans les différents sous-types moléculaires de GB. Nous avons alors mis en évidence que **cette intégrine est majoritairement retrouvée associée au sous-groupe « classique »** (Malric et al., 2017), observation également mentionnée cette année par l'équipe de McCarty (Guerrero et al., 2017). Pour aller plus loin, nous avons comparé ces résultats avec ceux obtenus pour les autres intégrines ayant un rôle majeur dans les GB, dont la majorité ($\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 4$, $\beta 5$, $\alpha 3$ et $\alpha 5$) est globalement surexprimée dans le sous-type « mésenchymateux » (Malric et al., 2017). De façon intéressante, nous avons ainsi remarqué que $\beta 8$ présente un profil différent de ces intégrines, à l'instar d' $\alpha 6$ et $\alpha 7$, deux intégrines impliquées dans le maintien de l'état souche des GSC (Haas et al., 2017; Lathia et al., 2010) et également surexprimées dans les GB « classiques ». Il est à souligner que ces GB de type « classique » ont été caractérisés, contrairement aux GB de type « mésenchymateux », comme des GB possédant une signature moléculaire enrichie en gènes souches (Patel et al., 2014).

Pour finaliser cette partie, nous avons analysé l'expression et la localisation de $\beta 8$ dans les biopsies de tumeurs de 10 patients atteints de GB. En réalisant des comarquages immunohistochimiques (IHC) de $\beta 8$ et du marqueur souche Sox2, nous avons montré que les cellules **positives pour l'intégrine $\beta 8$, sont également positives pour le facteur de transcription souche Sox2**. En plus de la corrélation positive entre $\beta 8$ et Sox2 retrouvée via la base de données TCGA, nous observons donc que ces deux protéines présentent des profils d'expression similaires chez les patients atteints de GB. Il serait également intéressant d'analyser dans nos modèles *in vivo* de GB (xénogreffes orthotopiques de GSC chez la souris *nude*), les caractéristiques d'expression et de localisation de $\beta 8$, afin de voir si nous retrouvons cette colocalisation au sein des tumeurs avec les zones riches en GSC.

D'autres équipes ont également étudié par IHC l'expression de $\beta 8$ dans différents GB de patients et ont décrit une expression assez spécifique de $\beta 8$ au niveau des cellules tumorales, expression largement supérieure à celle retrouvée dans divers tissus sains ((Weller et al., 2016), n=224+274), ((Schittenhelm et al., 2013), n=147~160), ((Guerrero et al., 2017), n=7). En complément, nous avons analysé les données du site « The Human Protein Atlas » issues d'analyses IHC, et avons noté une surexpression de $\beta 8$ dans des échantillons de patients atteints de gliomes de hauts grades par rapport à des tissus contrôles de cortex sain (Uhlen et al., 2015). Une autre étude de 2005 a mis en évidence, par des analyses IHC sur deux coupes de patients atteints de GB, que $\beta 8$ est préférentiellement retrouvée au niveau des zones nécrotiques et péri-vasculaires, niches privilégiées des GSC (Riemenschneider et al., 2005). Ces observations ont été également retrouvées dans l'étude récente de McCarty sur trois autres coupes de GB (Guerrero et al., 2017). Mes résultats, appuyés par la littérature, constituent donc des preuves additionnelles concernant une expression plus spécifique de $\beta 8$ dans la population souche cancéreuse de GB.

Pour poursuivre cette première partie de ma thèse, il serait intéressant d'analyser plus précisément **les caractéristiques structurales et les modulations d'expression** de la protéine $\beta 8$ à la membrane des GSC. L'étude de sa séquence protéique, de ses niveaux de modifications post-traductionnelles, de son association avec sa sous-unité α et des mécanismes induisant sa forte expression restent à définir dans nos modèles.

Concernant la séquence en acide aminés de $\beta 8$ d'une part, des divergences importantes ont été notées avec les séquences des autres β intégrines dès 1991 (Moyle et al., 1991). Récemment, deux études mettent en évidence, en conditions physiologiques, **une protéine $\beta 8$ singulièrement différente des autres sous-unités β** , avec des particularités moléculaires uniques, liées à un **mode d'activation totalement distinct** (pas « *d'inside out* ») (Hu and Luo, 2017; Ozawa et al., 2016). Ces caractéristiques suggèrent que cette intégrine pourrait avoir des rôles différents de toutes les autres sous-unités β , rôles que nous aborderons dans la deuxième partie de cette discussion. Il serait cependant intéressant d'étudier si la séquence primaire de $\beta 8$ dans nos GSC présente des différences par rapport à celles des cellules saines, bien que les intégrines ne soient que rarement retrouvées mutées dans les cancers (Desgrosellier and Cheresch, 2009).

A propos des glycosylations et autres modifications post-traductionnelles d'autre part, elles sont connues pour participer à la stabilisation et l'activation des intégrines. Nous pourrions rechercher si de telles modifications s'appliquent à $\beta 8$ dans les GSC et seraient responsables d'une potentialisation de son activité. En ce sens, il a été décrit une **augmentation de la sialylation de $\beta 8$** dans les GB en comparaison aux astrocytes (Autelitano et al., 2014).

Après sa traduction, d'après la littérature, l'intégrine $\beta 8$ n'est connue pour s'associer qu'à un unique partenaire : αv . En effet, de nombreuses analyses ont permis de mettre en évidence, à ce jour, la combinaison des différentes sous-unités α et β des intégrines pour la formation de 24 hétérodimères distincts (Takada et al., 2007). Toutefois, dans nos modèles de GB, nous avons observé de façon très intéressante, que les effets observés suite à l'inactivation de $\beta 8$ sont très proches de ceux décrits pour l'inhibition d' $\alpha 6$ (Lathia et al., 2010) voire d' $\alpha 7$ (Haas et al., 2017). De plus, les GSC inhibées de façon stable pour $\beta 8$ montrent également une diminution similaire de l'intégrine $\alpha 6$ à la membrane de ces cellules (résultats non publiés). Ces importantes similitudes nous amènent à soulever une nouvelle problématique, à savoir s'il est possible que, dans le cas des cellules cancéreuses, les sous-unités des intégrines puissent s'assembler différemment que dans les cellules saines, et que la nouvelle combinaison formée soit en faveur d'un effet oncogénique. Un tel phénomène n'a cependant, à notre connaissance, jamais été décrit dans la littérature. Pour répondre à cette question, il serait nécessaire d'analyser des fractions membranaires isolées à partir de GSC par immuno-précipitation, puis par des analyses plus approfondies de colocalisation directe (microscopie confocale, FRET), afin de savoir si la sous-unité $\beta 8$ peut ou non s'hétérodimériser avec $\alpha 6$, voire $\alpha 7$. Une autre hypothèse pouvant, plus simplement expliquer ces similitudes entre $\alpha 6$ et $\beta 8$, pourrait être la mise en place d'un *crossstalk* entre ces deux intégrines qui potentialiserait leurs voies de signalisation en aval.

Enfin, les mécanismes d'augmentation du pool total de $\beta 8$ et de sa surexpression à la membrane dans les GSC restent à explorer. Les voies que nous privilégions et qu'il nous faudra étudier seraient l'augmentation de sa transcription et/ou sa traduction ou encore l'amélioration de son recyclage à la membrane. Le promoteur du gène ITGB8 a d'ores et déjà été caractérisé par l'équipe du Pr Nishimura, avec une fine régulation de l'expression de $\beta 8$ sous le contrôle des facteurs de transcription SP3 et AP-1 (Markovics et al., 2010), dont nous souhaitons étudier l'activité dans nos modèles. En plus de ces facteurs de transcription, la MAP-kinase pro-inflammatoire p38 et l'interleukine IL1- β participent également au contrôle de la transcription de $\beta 8$ (Markovics et al., 2011) et pourront aussi être analysées dans nos GSC. Par ailleurs, la régulation de l'expression de $\beta 8$ pourrait également dépendre des miRNAs, notamment le miR-93 qui est capable de cibler cette intégrine et qui est décrit avec un rôle pro-tumoral dans les gliomes (Fang et al., 2011) ou encore les miRNAs miR-142-3p (Li et al., 2018) et le miR-19B-3p (Huang et al., 2017).

Pour conclure cette première partie, l'ensemble de mes résultats, appuyés par la littérature, concourent à la **définition de $\beta 8$ comme un nouveau marqueur membranaire des GSC chez l'Homme**. En effet, le fait que cette surexpression de $\beta 8$ soit retrouvée à la fois dans les GSC *in vitro* mais aussi dans les tumeurs de patients nous permet de souligner l'utilité potentielle de cette intégrine comme biomarqueur des GSC, en combinaison avec ceux déjà existants. Un panel de marqueurs est en effet nécessaire pour définir cette sous-population souche très plastique et hétérogène. L'intégrine $\beta 8$ pourrait également représenter un potentiel **marqueur pronostic**, puisque son expression est corrélée avec une diminution de la survie des patients atteints de GB après radiochimiothérapie. Elle pourrait également servir de **marqueur prédictif** d'une réponse au traitement d'une éventuelle thérapie anti- $\beta 8$ (voir plus loin dans la discussion), et particulièrement pour le sous-type « classique » qui exprime le plus cette intégrine.

II. Identification de $\beta 8$ comme nouveau marqueur fonctionnel et cible des GSC

Dans un second temps, ayant démontré une forte expression de l'intégrine $\beta 8$ dans les GSC, nous avons cherché à savoir **si cette protéine détenait une fonction particulière au sein de cette sous-population souche**. Cette intégrine étant impliquée dans le maintien de l'état souche et la viabilité des NPC murines (Mobley et al., 2009), nous nous sommes demandés si elle pouvait jouer un rôle similaire dans les GSC. Pour cela, dans deux lignées de GSC de patients, nous avons **invalidé l'expression de $\beta 8$ par siRNA ou shRNA**. Ces stratégies d'inhibition nous ont permis de réduire d'au moins 50% l'expression de $\beta 8$ dans les GSC et d'étudier les effets à court et long terme (sur des lignées stables). Après avoir validé ces inhibitions en termes d'efficacité et de spécificité, vis-à-vis des autres intégrines notamment, nous avons pu étudier les conséquences fonctionnelles de l'inhibition de $\beta 8$ sur les GSC.

Nous avons d'abord évalué le rôle de l'intégrine $\beta 8$ dans le **maintien du statut souche** via des tests de formation de NS en condition de dilution limite (faible densité cellulaire) qui reflètent *in vitro* la capacité d'auto-renouvellement des cellules souches. Mes résultats mettent en évidence que la formation des NS primaires ou secondaires est nettement diminuée lorsque $\beta 8$ est invalidée à court ou long terme. Ces résultats témoignent d'une plus faible proportion de cellules capables de s'auto-renouveler dans les cellules invalidées pour $\beta 8$, une des caractéristiques fondamentales des GSC. McCarty *et al* sont arrivés à la même conclusion en étudiant la capacité à former des NS à partir de cellules de GB fraîchement réséquées et triées selon une forte ou faible expression de $\beta 8$ (Guerrero et al., 2017). En conséquent, l'expression de **$\beta 8$ est associée à un meilleur potentiel d'auto-renouvellement *in vitro*** de ces cellules.

Pour expliquer ces effets sur l'auto-renouvellement des GSC, nous avons d'une part étudié **la viabilité** des lignées de GSC invalidées à court terme pour $\beta 8$. Tout d'abord, aucun effet notable n'a été noté sur la prolifération des GSC invalidées pour $\beta 8$, que ce soit à court terme après transfection ou bien dans les lignées stables (données non montrées). Des analyses de la mortalité cellulaire (fraction subG1) ont ensuite montré que l'inhibition de $\beta 8$ dans les GSC était capable d'induire une augmentation de la fraction subG1 après 7 jours. Ces données permettent de suspecter un éventuel effet pro-apoptotique suite à l'inhibition de $\beta 8$ dans les GSC, comme cela a d'ailleurs été montré après l'invalidation d' $\alpha 6$ dans ce même modèle cellulaire (Lathia et al., 2010). Nous avons alors caractérisé ce processus d'apoptose, en analysant l'expression (ARNm ou protéine) de marqueurs pro- et anti-apoptotiques (Bax, Bcl2, Caspase3, Caspase7, survivine et PARP) et l'activation des caspases. Nous avons alors observé, lorsque $\beta 8$ est inhibée, une augmentation du ratio bax/bcl2, de l'activité des caspases 3/7 et du clivage de PARP associée à une diminution de l'expression de la survivine. Tous nos résultats sont donc en faveur de **l'activation d'un processus apoptotique dans les GSC suite à l'inhibition à court terme de $\beta 8$** . Il faut cependant noter que d'autres processus de mort cellulaire pourraient également intervenir comme la nécrose, la mort par autophagie ou encore l'anoikis et qui restent à explorer. En ce sens, Roth et son équipe ont mis en évidence que l'utilisation d'un inhibiteur d'intégrines (ciblant notamment $\beta 8$), provoque une mort cellulaire nommée anoikis atypique dans des cellules de gliomes, impliquant à la fois nécrose et autophagie (Silginer et al., 2014).

Dans la littérature, il apparaît que certaines intégrines pourraient effectivement promouvoir la survie cellulaire via la coopération avec des facteurs de croissance spécifiques (Desgrosellier and Cheresch, 2009) et il serait intéressant d'étudier si cela s'applique à $\beta 8$. Par exemple, les couples $\alpha v\beta 3$ /FGFR ou $\alpha v\beta 5$ /VEGFR2 coopèrent pour protéger les cellules endothéliales de l'apoptose (Friedlander et al., 1995). Une étude récente a également montré dans des cellules de gliomes que l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, en association avec p53, participe à la régulation de deux protéines anti-apoptotiques (PEA-15 et survivine) et que l'inhibition de cette intégrine induit l'apoptose (Renner et al., 2016). Concernant $\alpha 6\beta 1$, il a été montré que cette intégrine pouvait inhiber les signaux pro-apoptotiques induits par la voie TNFR/TNF dans les cellules endothéliales associées aux GB (Huang et al., 2012). De plus, l'inhibition de $\beta 8$ dans un modèle de cancer hépatique résistant, potentialise l'apoptose induite par un inhibiteur de l'EGFR en diminuant notamment le TGF- β et la survivine (Wang et al., 2015). Il serait intéressant de contrôler si de telles coopérations favorisant la survie des GSC ont lieu dans notre modèle, où nous avons d'ores et déjà noté une diminution transcriptionnelle de la survivine en réponse à l'inhibition de $\beta 8$. Ainsi, ces différentes analyses permettraient de déterminer par quels mécanismes $\beta 8$, en contribuant à la survie des GSC, pourrait favoriser leur auto-renouvellement, comme mis en évidence, ainsi que, potentiellement, leur résistance aux traitements.

Il a par ailleurs été montré que l'induction **d'une différenciation** dans les GSC pouvait à la fois entraîner une perte de leur capacité d'auto-renouvellement et induire un processus de mort cellulaire (Cheng et al., 2010). En conséquence, nous avons porté notre attention sur le statut souche des GSC inhibées pour $\beta 8$. Nous avons ainsi remarqué une diminution de la population souche dans ces lignées déficientes en $\beta 8$ ainsi qu'une baisse notable de l'expression de nombreux marqueurs souches au dépend d'une augmentation des marqueurs de différenciation à court et à long terme (lignées stables). Ces observations témoignent d'un possible engagement en différenciation des cellules en réponse à l'invalidation de $\beta 8$. Dans leurs modèles, McCarty et son équipe ont également observé une diminution transcriptionnelle des marqueurs CD133 et Sox2 dans les cellules de GB différenciées et exprimant peu $\beta 8$ à leur surface (Guerrero et al., 2017). Finalement, nous avons étudié *in vivo* le potentiel tumorigène de ces GSC sh $\beta 8$ chez la souris *nude* xénotreffée, ce potentiel étant une caractéristique majeure des cellules souches cancéreuses. Nous avons alors mis en évidence un ralentissement de la croissance tumorale associée à une augmentation de la survie des souris du groupe sh $\beta 8$, confirmant des données *in vivo* récemment publiées avec des cellules de GB $\beta 8^{\text{LOW}}$ et des GSC inhibées pour cette intégrine (Guerrero et al., 2017). De façon intéressante, nous avons aussi montré que les tumeurs générées par les GSC sh $\beta 8$, d'apparition plus tardive, expriment également un très faible taux de Sox2 par rapport aux tumeurs contrôles, confirmant *in vivo* le fait que l'inhibition de $\beta 8$ dans les GSC entraîne bien une différenciation de ces cellules au sein des tumeurs xénotreffées.

Ainsi, nos données permettent d'affirmer que **la perte d'expression de $\beta 8$ se traduit effectivement par une différenciation cellulaire** et une perte des caractéristiques souches dans les GSC. Ce n'est pas la première fois qu'une intégrine a pu être associée au statut souche et aux CSC. Ainsi, en 2008, $\alpha v\beta 3$ a été retrouvée dans une population tumorigène de cancer du sein luminal (Vaillant et al., 2008), tandis qu'en 2014 l'intégrine $\beta 4$ a été caractérisée comme nouveau marqueur des CSC du cancer du poumon (Zheng et al., 2013). Même dans un contexte physiologique, différentes intégrines ont été identifiées dans la régulation de l'état souche : $\beta 1$ dans les cellules souches de divers organes, $\alpha v\beta 3$ dans les cellules souches mammaires et $\beta 8$ dans les cellules souches neurales (Seguin et al., 2015). Nos résultats permettent donc de penser que **$\beta 8$ serait également une intégrine associée aux CSC, et plus précisément aux GSC, et qu'elle pourrait participer à la persistance du**

phénotype souche dans cette sous-population de cellules tumorales. Les voies de signalisation impliquées dans le processus de différenciation sont désormais à explorer. Plusieurs études récentes nous amènent d'ailleurs à penser que le TGF β , qui peut être activé par l'interaction LAP-TGF β / α v β 8 (Cambier et al., 2005), pourrait intervenir dans cette balance entre état souche et différenciation (Guerrero et al., 2017; Reyes et al., 2013). Dans ce sens, des études ont pu montrer que le TGF β participe au maintien du phénotype souche des GSC (Ikushima et al., 2009) et que l'inhibition de ce récepteur permettrait de cibler cette population souche (Anido et al., 2010). Un autre ligand putatif de β 8, l'ostéopontine (OPN), pourrait aussi être associé au maintien du phénotype souche dans les GSC (Ozawa et al., 2016). Cette phosphoprotéine de la MEC a en effet été décrite comme ayant un rôle majeur dans les GSC, dans leur tumorigenèse ainsi que dans le processus de dédifférenciation des cellules de GB (Friedmann-Morvinski et al., 2016; Lamour et al., 2015; Pietras et al., 2014). Ainsi, certaines interactions entre des protéines matricielles sécrétées ou exposées à la surface des cellules environnantes et l'intégrine β 8 pourraient induire des voies de signalisation, demeurant à identifier, capables de promouvoir et de maintenir les caractéristiques souches dans les GSC.

D'autre part, nous avons analysé le rôle de β 8 dans l'adhérence et la migration des GSC, deux processus bien caractérisés dans ces cellules (Lathia et al., 2015) et nécessitant l'intervention des intégrines. Nous avons observé que l'inhibition de cette intégrine était capable de diminuer à la fois la capacité d'adhérence et le potentiel de migration des GSC sur laminine. β 8 participerait donc, d'une façon similaire à α 3 (Nakada et al., 2013), α 6 (Delamarre et al., 2009) et α 7 (Haas et al., 2017), au **phénotype d'adhérence et de migration des GSC**. De plus, il a également été mis en évidence dans la littérature un rôle potentiel de β 8 dans **l'invasion et l'angiogenèse** tumorale des cellules de GB (Reyes et al., 2013; Tchaicha et al., 2011). Les GSC étant fortement impliquées dans ces processus tumoraux (Cheng et al., 2010), il serait intéressant d'évaluer la participation de β 8 à la surface des GSC dans ces deux processus. Concernant les voies de signalisation activées par ces différentes intégrines, il a été montré que α 6 soutient la capacité invasive des GSC via notamment la N-Cadherine et ERK (Velpula et al., 2012), tandis qu' α 7 induit une augmentation de la phosphorylation des kinases FAK et Src (Haas et al., 2017) et α 3 promeut une invasion dépendante de pERK (Nakada et al., 2013). Pour β 8, les voies de signalisation en aval sont peu connues, mais il a été montré qu'elle peut activer les petites GTPases Cdc42 et rac1 pour favoriser l'invasion des cellules de GB (Reyes et al., 2013). L'ensemble de ces données met en lumière les fonctions essentielles d'intégrines spécifiques à la fois au niveau de l'adhérence, de la migration et de l'invasion des cellules de GB et des GSC, renforçant ainsi l'intérêt de cibler ces récepteurs membranaires dans le cadre d'une thérapie anticancéreuse.

Enfin, à l'opposé de l'invalidation de l'expression de β 8, nous avons initié une stratégie de **surexpression de l'intégrine β 8** (GSC transfectées de façon stable avec un plasmide codant pour β 8 ou un plasmide contrôle). Mes résultats préliminaires montrent que cette surexpression de β 8 dans les GSC entraîne cette fois une augmentation des marqueurs souches, les marqueurs de différenciation restant peu ou pas exprimés (données non montrées). Il serait intéressant de voir si cette surexpression de β 8 peut permettre également d'augmenter ou de potentialiser l'auto-renouvellement et la tumorigenèse des GSC, ainsi que d'identifier par analyse transcriptomique les voies de signalisation permettant ce renforcement des caractéristiques souches par β 8. Cette stratégie de surexpression viendrait asseoir solidement nos expériences d'invalidation de β 8 et démontrer définitivement le rôle de cette intégrine dans le maintien du statut souche de GSC.

Pour conclure sur cette seconde partie de thèse, mes travaux démontrent que **$\beta 8$ est associée à des fonctionnalités majeures des GSC**. Elle participe activement à **leur auto-renouvellement, à leur survie, au maintien de leur phénotype souche, à leur adhérence/migration ainsi qu'à leur tumorigenèse**. Cette intégrine représente donc non seulement un marqueur membranaire mais aussi **fonctionnel** des GSC. Dès lors, son inhibition dans les GB pourrait permettre de s'attaquer spécifiquement à cette sous-population cellulaire et d'améliorer le traitement de ces tumeurs. En effet, le ciblage de $\beta 8$ pourrait réduire les GSC à la fois en induisant **l'apoptose** d'une partie de cette population agressive mais aussi **la différenciation** d'une autre partie en cellules plus différenciées et probablement moins résistantes aux différentes thérapies, notamment à la radiothérapie (cf. troisième partie de la discussion). De plus, une thérapie anti- $\beta 8$ pourrait également, en diminuant la migration des GSC, limiter les récives. Nous apportons donc ici des éléments essentiels soutenant la preuve de concept identifiant l'intégrine $\beta 8$ comme **nouvelle cible thérapeutique potentielle des GSC**.

III. Identification de $\beta 8$ comme une cible radiosensibilisante potentielle des GSC

Dans l'optique de pleinement valider l'intérêt de $\beta 8$ comme **cible thérapeutique potentielle des GSC**, nous nous sommes finalement intéressés au rôle de $\beta 8$ dans la radiorésistance intrinsèque des GSC, ces dernières étant fortement radiorésistantes (Cheng et al., 2010). Pour cela, la mort cellulaire (fraction subG1) après irradiation de nos lignées de GSC exprimant de façon stable les sh $\beta 8$ a été analysée et a révélé que l'inhibition de l'intégrine $\beta 8$ potentialise les effets délétères des radiations ionisantes. D'autres approches expérimentales de la mort cellulaire ont par la suite confirmé ce résultat, telles que le marquage des populations apoptotiques et/ou nécrotiques et l'analyse de la mort post-mitotique, un processus de mort cellulaire majoritairement rencontré en réponse à la radiothérapie (Monferran et al., 2008). Ainsi, nous avons retrouvé après irradiation une augmentation de l'apoptose, de la nécrose et de la mort post-mitotique en réponse à l'inhibition de $\beta 8$ dans les GSC. De plus, nous avons également mené, sur ces lignées de GSC invalidées ou non pour $\beta 8$, des expériences de clonogénie en réponse à des doses croissantes de radiations ionisantes (Monferran et al., 2008) et avons démontré **un effet radiosensibilisant de l'inhibition de $\beta 8$ *in vitro***. Cette radiosensibilisation doit maintenant être confirmée *in vivo* par l'utilisation de souris xénotreffées en orthotopique avec nos lignées de GSC (invalidées ou non pour $\beta 8$), puis soumises, lorsque la tumeur aura atteint une taille définie, à une exposition aux rayonnements ionisants.

Une fois cet effet radiosensibilisant pleinement démontré, il conviendra d'explorer les mécanismes moléculaires en aval de $\beta 8$ conduisant à cette radiorésistance dans les GSC. Nous avons d'ores et déjà plusieurs hypothèses à vérifier impliquant, une nouvelle fois, le TGF- β d'une part, qui est activé par $\beta 8$, et la survivine d'autre part, dont nous avons montré la diminution d'expression après inhibition de $\beta 8$. En effet, le TGF- β est décrit pour contribuer à la radiorésistance des GB, tandis que la survivine, augmentée par l'irradiation, est aussi capable de moduler la réponse à la radiothérapie de cellules U87 (Malric et al., 2017). Nous privilégierons également l'exploration de la voie des RhoGTPases et des HIFs, notre équipe ayant déjà démontré un rôle majeur de ces protéines capables de fonctionner en association avec les intégrines $\alpha v\beta 3/\alpha v\beta 5$ pour promouvoir la radiorésistance des cellules de GB (Monferran et al., 2008; Skuli et al., 2009). Une autre piste de recherche, au sujet de la potentialisation d'un processus d'apoptose radio-induite après inhibition de $\beta 8$, concerne le rôle de la caspase 8, puisque nos travaux montrent une augmentation de son activité suite à l'inhibition de $\beta 8$. En effet, cette caspase initiateur a été impliquée dans des mécanismes apoptotiques consécutifs à l'irradiation des cellules de gliomes (Afshar et al., 2006). Il serait intéressant de voir si l'inhibition de $\beta 8$ peut favoriser la déstabilisation de systèmes anti-apoptotiques capables de bloquer l'activité de la caspase 8, comme cela a été démontré pour $\alpha 6$ et la protéine cFLIP dans les GSC (Huang et al., 2012). Enfin, nous avons montré que l'inhibition de $\beta 8$ favorisait la baisse d'expression du récepteur Notch-1 à la surface des GSC (données non publiées). Outre le rôle majeur de cette protéine dans le maintien du statut souche des GSC (Fan et al., 2010; Zhu et al., 2011), il a été décrit que Notch-1 exerçait une action cruciale vis-à-vis de la radiorésistance de ces cellules *in vitro* et *in vivo* (Chu et al., 2013; Wang et al., 2010a; Yahyanejad et al., 2016). De plus, une coopération de Notch-1 avec l'intégrine $\beta 1$ a déjà été démontrée dans des cellules souches neurales (Campos et al., 2006), il serait intéressant d'étudier si l'intégrine $\beta 8$ est capable elle aussi d'interagir, directement ou non, avec ce récepteur afin d'induire des voies de signalisation intracellulaires capables de bloquer les processus de mort radio-induite.

Enfin, notre équipe a mis en évidence en 2014 que l'irradiation, à la dose infratoxique de 3 Gy, est capable d'induire, via un mécanisme dépendant de la survivine, une dédifférenciation des cellules différenciées de GB vers un phénotype souche, apportant la preuve de concept d'une **plasticité radio-induite** dans les GB (Dahan et al., 2014). Ces résultats sont relatés dans la publication présentée en **Annexe 4**, publication dont je suis co-auteur. Le fait que $\beta 8$ soit impliquée dans l'auto-renouvellement, le maintien de l'état souche et la radiorésistance des GSC, ainsi que dans l'expression de la survivine, nous a conduit à explorer le rôle de $\beta 8$ dans cette dédifférenciation après irradiation. Nous avons alors observé une réexpression de l'intégrine $\beta 8$ au cours de ce processus de plasticité radio-induit. Des résultats préliminaires au laboratoire montrent en effet, au cours de cette dédifférenciation, aussi bien à long terme qu'à des temps précoces après irradiation (2-3 jours), que $\beta 8$, similairement à différents marqueurs souches, est fortement augmentée suite à l'irradiation de cellules de GB différenciées (données non publiées). Il serait donc intéressant d'étudier dans nos lignées de GSC invalidées pour $\beta 8$ si le ciblage de cette intégrine peut permettre de bloquer ce processus de dédifférenciation radio-induite et la potentialisation de la tumorigénicité associée. De plus, nous pourrions alors déterminer si cette intégrine est en amont ou en aval de la survivine pour induire cette plasticité après irradiation. La mise en évidence du rôle de $\beta 8$ dans ce processus constituerait un intérêt supplémentaire à cibler cette intégrine en clinique afin de réduire chez le patient la population des GSC après traitement.

Ainsi, cette troisième partie de ma thèse portant sur le potentiel radiosensibilisant de $\beta 8$, qui nécessite d'être approfondi et confirmé *in vivo*, démontre un rôle de $\beta 8$ dans la radiorésistance des GSC et nous permet d'identifier à terme, cette intégrine comme **une nouvelle cible radiosensibilisante potentielle**. Son inhibition dans les GB, en association avec la radiothérapie, pourrait permettre d'augmenter l'efficacité de cette dernière et donc d'améliorer le traitement de ces tumeurs cérébrales.

IV. Perspectives cliniques et thérapeutiques

L'ensemble de mes résultats sur le rôle majeur de l'intégrine $\beta 8$ dans les GSC, à la fois *in vitro* et *in vivo*, offrent des perspectives intéressantes pour établir des nouvelles stratégies thérapeutiques dans les GB et lutter contre l'agressivité de ces tumeurs cérébrales. En effet, l'intégrine $\beta 8$ présente, dans le contexte des GB, un intérêt à la fois **diagnostique et thérapeutique**.

D'un point de vue diagnostique, nos résultats permettent d'identifier **$\beta 8$ comme nouveau marqueur membranaire des GSC**. Le fait que nous ayons notamment retrouvé une plus forte expression de $\beta 8$ associée à un mauvais pronostic des patients atteints de GB, comme cela a été montré pour $\alpha \beta 3$ (Ducassou et al., 2013), $\alpha 5$ (Renner et al., 2016) et $\alpha 7$ (Haas et al., 2017), nous permet de proposer $\beta 8$ comme un **marqueur pronostique** additionnel dans les GB. Pour aller plus loin dans le diagnostic, il serait intéressant d'évaluer si cette intégrine peut être utilisée pour **le guidage par imagerie** des GB, comme cela est par exemple en cours d'évaluation pour $\alpha \beta 3$ (Ma et al., 2016). Cela pourrait permettre d'identifier les niches de GSC au sein des zones tumorales et de les cibler plus efficacement, notamment via l'utilisation de la radiothérapie stéréotaxique (Yanagihara et al., 2016). Enfin, il faudrait étudier si $\beta 8$, seule ou en association avec d'autres marqueurs, peut également servir à la **sélection de certains patients**, par exemple dans les GB du sous-type classique, pour lesquels $\beta 8$ apparaît être le plus fortement exprimée (Guerrero et al., 2017; Malric et al., 2017), patients qui répondraient le mieux à un traitement ciblé et adapté en vue d'une thérapie personnalisée.

Au niveau thérapeutique, la mise en évidence de $\beta 8$ dans des fonctionnalités spécifiques aux GSC (auto-renouvellement, viabilité, maintien de l'état souche, migration, tumorigenèse et radiorésistance) et les effets observés lors de son inhibition dans nos modèles nous permet également de proposer $\beta 8$ comme une possible **nouvelle cible thérapeutique radiosensibilisante**. **Le ciblage de $\beta 8$** présente un certain nombre d'avantages potentiels. Tout d'abord, cette protéine est localisée au niveau **membranaire**, ce qui facilite son blocage par des anticorps par exemple. **Sa structure**, différente de celles des autres intégrines, permettrait un ciblage spécifique (Hu and Luo, 2017; Moyle et al., 1991). De plus, elle n'a été retrouvée que dans **certains tissus adultes sains bien particuliers** (Cambier et al., 2000; Lakhe-Reddy et al., 2014; Mobley and McCarty, 2011), contrairement à $\alpha 6$ plus ubiquitaire (Lathia et al., 2010), et son inhibition pourrait être potentiellement peu toxique et bien tolérée. D'autre part, nos résultats mettent en évidence non pas un mais plusieurs effets bénéfiques de l'inhibition de $\beta 8$ dans nos modèles. En effet, nous avons observé suite à l'invalidation de $\beta 8$ une augmentation de la mort cellulaire par apoptose associée à une augmentation de la différenciation cellulaire. Nous avons également retrouvé une augmentation de la radiosensibilité des GSC suite à son inhibition et avons mis en évidence une diminution de la migration des GSC. Enfin, le ciblage de cette intégrine irait directement et sélectivement s'attaquer à la population de cellules cancéreuses les plus résistantes et tumorigènes, les GSC, responsables en grande partie des phénomènes de récurrence locale dans les GB après radio/chimiothérapie conventionnelle. Par conséquent cette intégrine représente **une cible intéressante potentiellement capable d'altérer plusieurs processus dans les GSC**, pour au final diminuer cette sous-population et leur agressivité. Cibler cette intégrine pourrait permettre d'améliorer le traitement des GB voire même de diminuer le risque de récurrence. En ce sens, nous avons déposé en 2016, avec Inserm Transfert, une demande de brevet portant sur le ciblage de cette intégrine dans les GB, en combinaison avec la radio- et la chimiothérapie (cf. **Annexe 2**). Consécutivement à cette

démarche, nous proposons donc, via des collaborations avec des sociétés de biotechnologies, le développement de molécules pharmacologiques anti- $\beta 8$ afin de valider ensuite par des essais précliniques son rôle potentiel comme marqueur pronostique et cible thérapeutique dans les GB. Si les résultats s'avèrent concluants, nos travaux pourraient contribuer *in fine* au développement d'une **nouvelle stratégie thérapeutique radiosensibilisante**, notamment par la mise en place d'un essai clinique de phase I/II au sein de notre équipe spécialisée en recherche translationnelle. Nous testerions donc ces inhibiteurs de $\beta 8$ en association à la radio/chimiothérapie, comme nous avons pu le faire récemment avec le Tipifarnib, un inhibiteur des Rho-GTPases (Ken et al., 2015; Moyal et al., 2007). Enfin, cette intégrine pourrait également servir de « **vecteur** » pour, en plus de ces effets intrinsèques, délivrer spécifiquement un agent anti-cancéreux, tel qu'une chimiothérapie, une immunothérapie, un radionucléotide, un agent de thérapie ciblée ou encore des nanoparticules, comme cela est actuellement étudié pour l'Abegrin, un anti- $\alpha v \beta 3$, dans le GB (Veeravagu et al., 2008). Cette approche permettrait potentiellement d'augmenter l'efficacité du traitement tout en limitant la toxicité, puisqu'une telle thérapie ciblerait spécifiquement les GSC, qui expriment fortement $\beta 8$, en épargnant les neurones et autres tissus sains qui ne l'expriment pas.

Il faut cependant garder à l'esprit la difficulté à cibler les GSC, en raison notamment d'une **forte hétérogénéité et plasticité de ces cellules**. En effet, cette population ne peut être définie par l'expression d'un unique marqueur (Cheng et al., 2010; Lathia et al., 2015). Il a même été avancé que différents pools de GSC existeraient au sein d'une même tumeur (Piccirillo et al., 2009), augmentant encore le degré de complexité d'un ciblage précis de cette population. Concernant $\beta 8$, l'équipe de Mc Carthy a notamment démontré que les cellules de GB issues de résections de patients contiennent deux populations cellulaires : $\beta 8^{\text{HIGH}}$, très tumorigène, et $\beta 8^{\text{LOW}}$, dépourvue en grande partie de capacité initiatrice de tumeur. Cependant, la majorité de cette population $\beta 8^{\text{HIGH}}$ n'exprime pas le marqueur souche classique CD133, confirmant la difficulté de caractériser ces cellules souches cancéreuses par l'emploi d'un seul marqueur (Guerrero et al., 2017). Pour répondre à ces contraintes liées à la forte hétérogénéité de cette population de GSC, nous proposons que cette thérapie anti- $\beta 8$ soit utilisée **en association** avec des traitements standards des GB, comme la radiothérapie, ainsi que d'autres thérapeutiques ciblant les GSC, au sein de **stratégies combinées**.

Enfin, il serait intéressant d'explorer le rôle de cette cible potentielle dans **d'autres types de cancers**, puisque de nombreuses tumeurs présentent, comme les GB, des sous-populations souches. En ce sens, des études récentes ont montré que $\beta 8$ pourrait être impliquée dans les CSC du cancer du poumon métastatique (Xu and Wu, 2012) ou encore dans celles du cancer colorectal (Chao et al., 2012). $\beta 8$ a notamment été mise en évidence dans une voie de signalisation favorisant la migration des CSC et impliquant l'axe CD133 / intégrin / SRC / Akt / GSK3 β / β catenin (Su et al., 2015). Plus largement, sans être restreinte aux cellules souches, $\beta 8$ a également été associée à la résistance au Gécitinib dans le cancer hépatique (Wang et al., 2015) et dans la motilité des cellules tumorales prostatiques (Mertens-Walker et al., 2015). Le ciblage de l'intégrine $\beta 8$ pourrait donc être intéressant, en plus des GB, dans d'autres cancers.

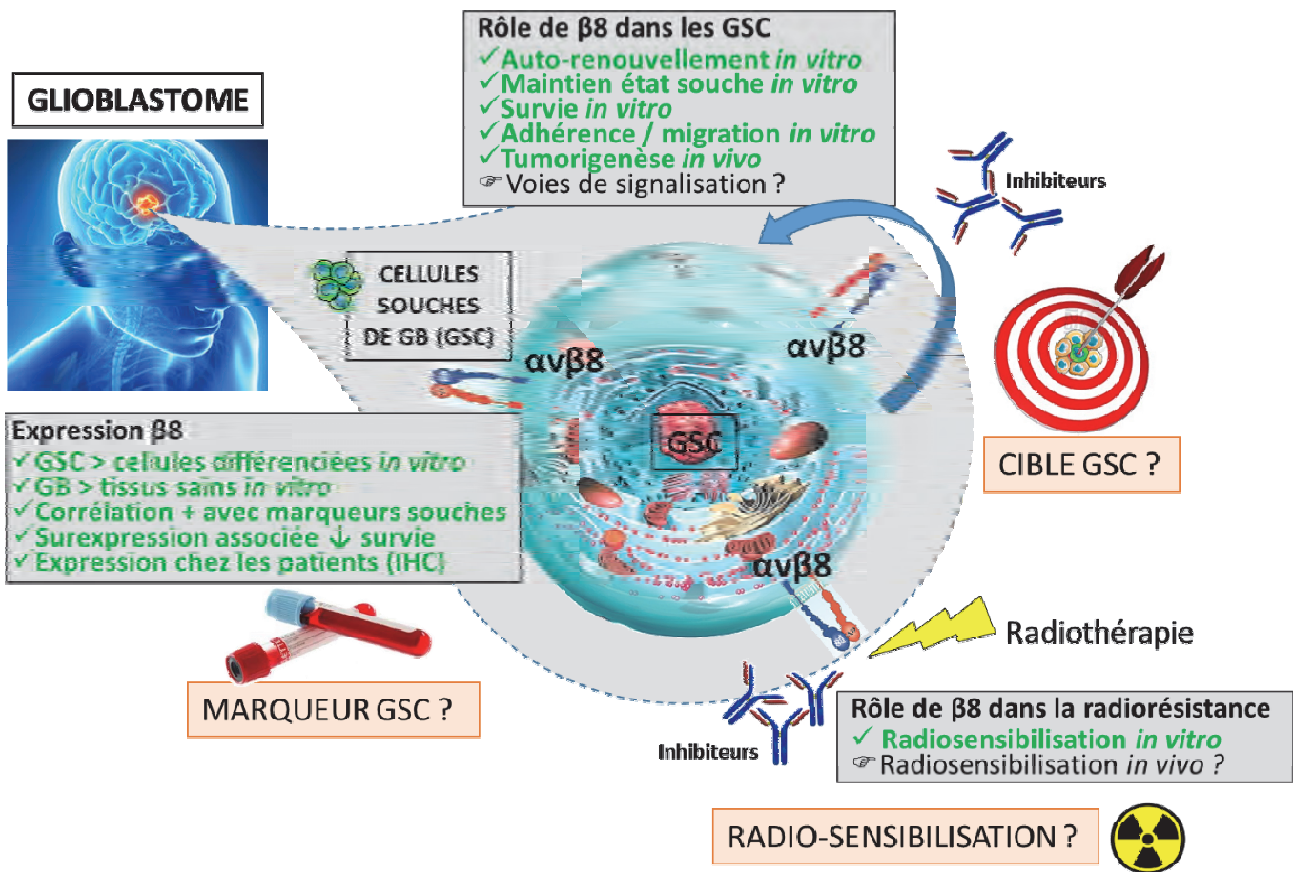


Figure bilan : Représentation schématique du bilan des données acquises au cours de cette thèse et des futures perspectives.

Au final, mes travaux de thèse ont permis de démontrer que l'intégrine $\beta 8$ est bien surexprimée dans les GSC (Figure bilan), ce qui est en faveur de son utilisation comme nouveau marqueur membranaire de ces cellules. Nous avons aussi mis en évidence que ce récepteur membranaire est associé à des caractéristiques et fonctionnalités propres aux GSC (Figure bilan) telles que leur auto-renouvellement, survie, état souche, adhérence/migration, et tumorigenèse, bien que les voies de signalisation impliquées restent à déterminer. Enfin, nous avons établi pour la première fois que son inhibition est associée à un effet radiosensibilisant. Les résultats de cette étude pourraient ainsi contribuer au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques radiosensibilisantes dans les GB afin d'obtenir un meilleur traitement de ces tumeurs cérébrales particulièrement agressives.

ANNEXES

Annexe 1 : Poster : “Role of $\beta 8$ integrin in stemness maintenance and radioresistance of glioblastoma stem like cells”.

Annexe 2 : Brevet scientifique : N° dépôt EP.14306644.7 (2014) et PCT/FR2016/050907 (2016) - New method for treating resistant glioblastoma. Lemarie A, **Malric L**, Toulas C, Cohen-Jonathan Moyal E.

Annexe 3 : Revue scientifique : Interest of integrins targeting in glioblastoma according to tumor heterogeneity and cancer stem cell paradigm: an update. **Malric L**, Monferran S, Gilhodes J, Boyrie S, Dahan P, Skuli N, Sesen J, Filleron T, Chauvel A, Toulas C, Cohen-Jonathan Moyal E, Lemarie A. *Oncotarget*. 2017

Annexe 4 : Publication en co-auteur : Ionizing radiations sustain glioblastoma cell dedifferentiation to a stem-like phenotype through survivin: possible involvement in radioresistance. Dahan P, Martinez Gala J, Delmas C, Monferran S, **Malric L**, Zentkowski D, Lubrano V, Toulas C, Cohen-Jonathan Moyal E, Lemarie A. *Cell Death Dis*. 2014 Nov 27;5:e1543.

Annexe 1 : Poster "Role of $\beta 8$ integrin in stemness maintenance and radioresistance of GB stem like cells"

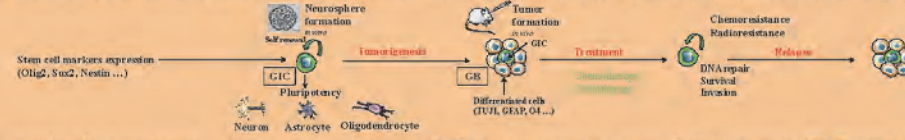


Role of $\beta 8$ markers in stemness maintenance and radioresistance of glioblastoma-initiating cells

Laure Malric¹, Perrine Dahan¹, Sylvie Monferran¹, Caroline Delmas¹, Vincent Lubrano¹, Aline Kowalski-Chauvel¹, Elizabeth Cohen-Jonathan-Moyal¹, Christine Toulas¹, Anthony Lemarié¹
¹INSERM U1037, Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse, IUC-Oncopole, Toulouse, France

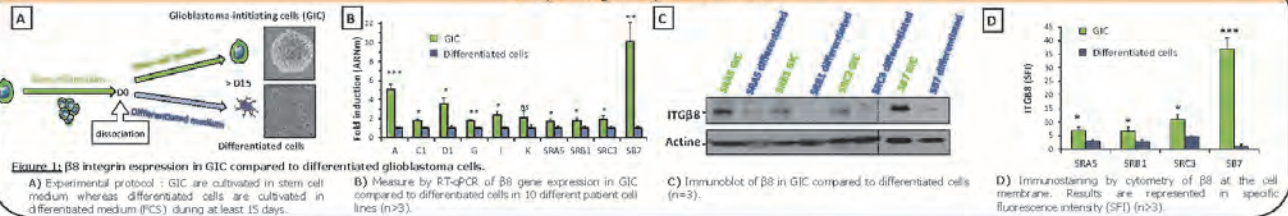
INTRODUCTION

Glioblastomas (GB) are malignant brain tumors with dismal prognosis and prompt relapses despite standard treatment which includes maximal surgical resection followed by fractionated radiotherapy with concomitant and adjuvant chemotherapy (Temozolomide). This severe outcome could partly be explained by the presence into the tumor of Glioblastoma-Initiating Cells (GIC), particularly chemo-radioresistant and involved in tumor recurrence. So, current research focuses on developing potential GIC targeted therapies in order to improve GB treatment.

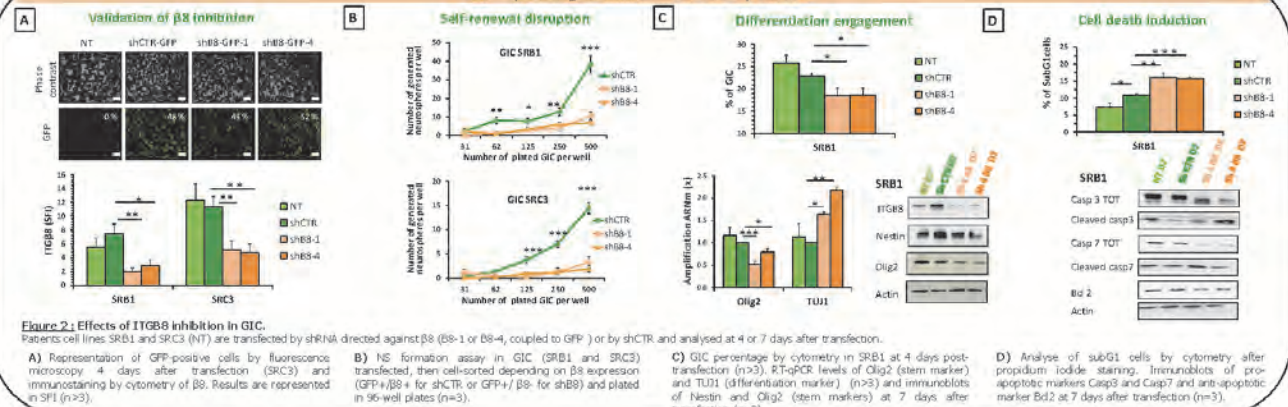


Regarding current literature but also transcriptomic results obtained in our lab, a specific $\beta 8$ integrin emerged as a potential selective target in GIC. This integrin has been described to play a major role in the survival and self-renewal of healthy neural stem cells and its overexpression has also been associated with decreased survival in GB patients. We then hypothesized that this integrin could be involved in stemness maintenance in GIC and, due to their high radioresistance, thereby contribute to the establishment of resistances mechanisms to ionizing radiations in GB.

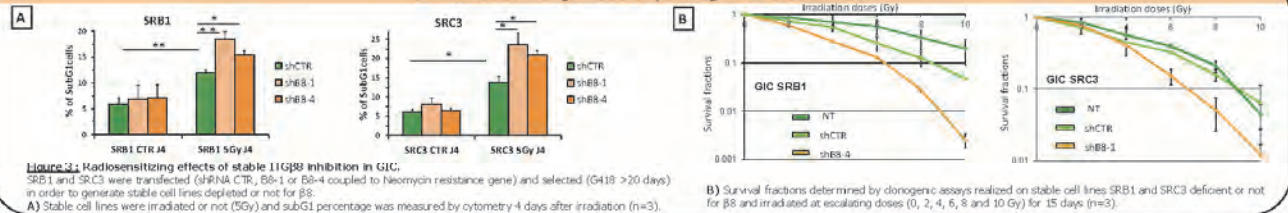
1. $\beta 8$ integrin expression in GIC



2. $\beta 8$ integrin inhibition in GIC by shRNA



3. Radiosensitizing effects of $\beta 8$ integrin inhibition in GIC



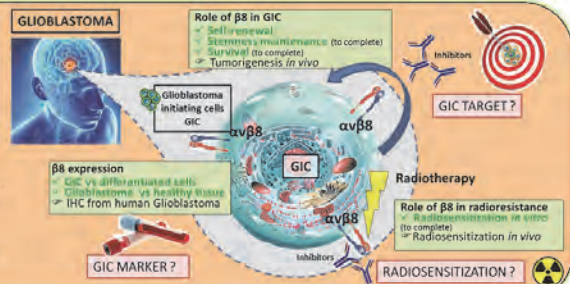
CONCLUSION

This study demonstrated with several primocultures from patients, that $\beta 8$ integrin is overexpressed in GIC in comparison to their differentiated progeny. Moreover, this integrin could be associated with characteristics and features unique to these cells:

- Self renewal *in vitro*
- Stemness status
- Viability
- Radioresistance

Indeed, the selective inhibition of this integrin in GIC by shRNA resulted in a decrease of their neurosphere formation ability associated with an increase of differentiation patterns and cell death, this one being potentiated after irradiation.

These results could eventually allow to identify this specific $\beta 8$ integrin as a new membrane marker of GIC but also to evaluate its targeting potential as a new therapeutic radiosensitizing strategy.



Annexe 2 : Brevet scientifique : N° dépôt EP.14306644.7 (2014) et PCT/FR2016/050907 (2016) - New method for treating resistant glioblastoma. Lemarie A, **Malric L**, Toulas C, Cohen-Jonathan Moyal E.



Europäisches
Patentamt

European
Patent Office

Office européen
des brevets

Acknowledgement of receipt

We hereby acknowledge receipt of your request for grant of a European patent as follows:

Submission number	1000260974	
Application number	EP14306644.7	
File No. to be used for priority declarations	EP14306644	
Date of receipt	16 October 2014	
Your reference	LEMARIE14256NC	
Applicant	INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale)	
Country	FR	
Title	NEW METHOD FOR TREATING RESISTANT GLIOBLASTOMA	
Documents submitted	package-data.xml application-body.xml SPECEPO-1.pdf\text_14256 EP.pdf (36 p.) SEQLTXT.txt\sequences_14256 EP.ST25.txt	ep-request.xml ep-request.pdf (5 p.) SPECEPO-2.pdf\drawings_14256 6 EP.pdf (8 p.)
Submitted by	EMAIL=propriete@inserm-transfert.fr,CN=Denise HIRSCH,O=INSERM TRANSFERT,C=FR	
Method of submission	Online	
Date and time receipt generated	16 October 2014, 14:37:17 (CEST)	
Official Digest of Submission	34:F1:82:3A:DC:8D:E4:AE:F8:0E:CF:72:2A:11:F8:5E:4F:10:65:CE	

/INPI, section dépôt/



Europäisches
Patentamt

European
Patent Office

Office européen
des brevets

Acknowledgement of receipt

We hereby acknowledge receipt of your request for the processing of an international application according to the Patent Cooperation Treaty as follows:

Submission number	1000343683	
PCT application number	PCT/FR2016/050907	
Date of receipt	19 April 2016	
Receiving Office	Institut National de la Propriété Industrielle	
Your reference	LEMAR14111NC	
Applicant	INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale)	
Number of applicants	2	
Country	FR	
Title	NEW METHOD FOR TREATING RESISTANT GLIOBLASTOMA	
Documents submitted	eolf-pkda.xml eolf-appb.xml eolf-fees.xml eolf-othd-000001.pdf (36 p.) eolf-appb-P000001.pdf (11 p.)	eolf-requ.xml eolf-seql.txt eolf-vlog.xml eolf-abst.txt
Submitted by	EMAIL=propriete@inserm-transfert.fr,CN=Denise HIRSCH,O=INSERM TRANSFERT,C=FR	
Method of submission	Online	
Date and time receipt generated	19 April 2016, 14:08:18 (CEST)	
Digest	30:DA:FD:8B:C9:F5:0E:2A:80:E3:4A:7D:94:03:03:2D:CE:BF:B9:99	

/INPI, section dépôt/



European Patent Office
80298 MUNICH
GERMANY

Questions about this communication ?
Contact Customer Services at www.epo.org/contact



MALRIC, Laure
INSERM U1037-CRCT
Oncopole Toulouse
2 Avenue Hubert Curien, CD 53717
31037 Toulouse cedex
FRANCE

Date	15.06.16
------	----------

Reference	Application No./Patent No. 14306644.7 - 1466 / 3009147
Applicant/Proprietor INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale), et al	

Designation as inventor - communication under Rule 19(3) EPC

You have been designated as inventor in the above-mentioned European patent application. Below you will find the data contained in the designation of inventor and further data mentioned in Rule 143(1) EPC:

DATE OF FILING : 16.10.14
 PRIORITY : //
 TITLE : Method for treating resistant glioblastoma
 DESIGNATED STATES : AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB
 GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO
 PL PT RO RS SE SI SK SM TR

INVENTOR (PUBLISHED = 1, NOT PUBLISHED = 0):

- 1/LEMARIE, Antony/INSERM U1037-CRCT Oncopole Toulouse 2 Avenue Hubert Curien, CD 53717/31037 Toulouse cedex/FR
- 1/MALRIC, Laure/INSERM U1037-CRCT Oncopole Toulouse 2 Avenue Hubert Curien, CD 53717/31037 Toulouse cedex/FR
- 1/TOULAS, Christine/INSERM U1037-CRCT Oncopole Toulouse 2 Avenue Hubert Curien, CD 53717/31037 Toulouse cedex/FR
- 1/MOYAL, Elisabeth/INSERM U1037-CRCT Oncopole Toulouse 2 Avenue Hubert Curien, CD 53717/31037 Toulouse cedex/FR

DECLARATION UNDER ARTICLE 81 EPC:
The applicant(s) has (have) acquired the right to the European patent as employer(s).

Receiving Section



NEW METHOD FOR TREATING RESISTANT GLIOBLASTOMA

FIELD OF THE INVENTION:

Thus, the present invention relates to a compound which is an antagonist of $\beta 8$ integrin or an inhibitor of the expression of $\beta 8$ integrin for use in the treatment of resistant glioblastoma.

BACKGROUND OF THE INVENTION:

Glioblastomas (GBM) are the most common and malignant primary brain tumors in adults, and account for more than 50% of malignant gliomas. Since 2005, the standard therapy for this tumor includes surgery followed by radiotherapy to 60 Gy in combination with temozolomide (TMZ), allowing an improved survival (Stupp R. et al., 2005). Nevertheless, the prognosis of the patients with a GBM remains very bad, with a median survival of 14.6 months, and a 2-year survival rate of 27.2%, because of a local recurrence mainly due to resistance of the GBM cells to radiotherapy.

Glioblastoma, some malignant, invasive and radio/chemoresistant brain tumors, are characterized by prompt relapse. These aggressive properties at least involve, among these heterogeneous tumors, a subpopulation of highly tumorigenic and radioresistant glioblastoma stem-like cells (GSC). Current research focuses therefore on a specific targeting of this population but there is a need in new therapeutic compounds to treat resistant glioblastoma.

SUMMARY OF THE INVENTION:

The inventors showed that $\beta 8$ integrin is overexpressed in glioblastoma stem cells (GSC) and appears to be associated with specific features and functionality to the GSC, including their radiation resistance.

Thus, the invention relates to a compound which is an antagonist of $\beta 8$ integrin or an inhibitor of the expression of $\beta 8$ integrin for use in the treatment of resistant glioblastoma.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION:

Therapeutic method

A first object of the invention relates to a compound which is an antagonist of $\beta 8$ integrin or an inhibitor of the expression of $\beta 8$ integrin for use in the treatment of resistant glioblastoma.

In one embodiment, the resistant glioblastoma is a radioresistant glioblastoma or a chemoresistant glioblastoma.

In another embodiment, said compound according to the invention is a $\beta 8$ integrin antagonist.

In another embodiment, the glioblastoma is resistant to treatment using chemotherapeutic compound like Tipifarnib, Temozolomide, Cilengitide (see Stupp R et al., 2014), Bevacizumab (Thomas AA et al., 2014) and EGFR inhibitors like Erlotinib, Gefitinib or Cetuximab.

In another embodiment, the invention relates to a compound which is an antagonist of $\beta 8$ integrin or an inhibitor of the expression of $\beta 8$ integrin for use in the treatment of glioblastoma which are characterized by the enrichment of stem cells (GSC) in glioblastoma.

According to the invention, the compound may also be an inhibitor of a molecular complex containing $\beta 8$ integrin or an inhibitor of $\beta 8$ integrin signaling pathway.

As used herein, the term “molecular complex containing $\beta 8$ integrin” denotes a macromolecular structure formed by the functional $\beta 8$ integrin present at the cellular membrane and any adaptors, effectors proteins and/or ligands at the extracellular and/or intracellular interface and which is required to mediate any effects or functions of $\beta 8$ integrin.

As used herein the term “Glioblastoma Stem Cells (GSC)” denotes a subpopulation of highly tumorigenic and radioresistant stem cells present in the brain tumor. These cells can express CD133 gene and/or a panel of other genes characteristic of neural stem cells (Nestin, A2B5, Olig2, Sox2, etc...) and possess the self-renewal potential (see Cheng L et al. 2010).

Thus as used herein, the term “enrichment of stem cells (GSC) in glioblastoma” denotes an over-presence of GSC in glioblastoma.

As used herein, the term “ $\beta 8$ integrin” has its general meaning in the art and refers to a member of the integrin’s family which are receptors that mediate attachment between a cell and the tissues surrounding it, which may be other cells or the extracellular matrix (ECM). They also play a role in cell signaling and thereby regulate cellular shape, motility, invasion, angiogenesis, survival and the cell cycle.

In one embodiment, the compound according to the invention may binds to $\beta 8$ integrin or $\beta 8$ integrin complex or inhibits $\beta 8$ integrin expression, and blocks the related physiological effects. To identify a compound able to block this molecule, cell adhesion assays on selective $\beta 8$ integrin substrates (fibronectin, vitronectin for example) will be performed as well as the measurement of extracellular TGF- β activation, a downstream selective event to $\beta 8$ integrin involvement (Cambier et al Am J Pathol 2005). Intracellular downstream events to $\beta 8$ integrin activation will also be analyzed (interaction with RhoGDI1, Reyes et al Mol Biol Cell 2013, or activation of the MAPK pathway) in response to its inhibition. Finally, $\beta 8$ integrin mRNA expression level and membrane expression of this protein will be assessed by qPCR and flow cytometry respectively to monitor the effect of inhibitors of $\beta 8$ integrin expression. Other validation systems could also be used to assess the inhibition/interaction of the

aforementioned $\beta 8$ integrin inhibitor with its target, notably through cell free methods. For example, ELISA techniques using purified $\beta 8$ integrin could also be used.

In a particular embodiment, the compound according to the invention may be used to improve the sensitivity of glioblastoma to different chemotherapeutic agents or to enhance the sensitivity of glioblastoma to radiotherapy, or to improve glioblastoma sensitivity to associated radio/chemotherapy.

Thus, the invention also relates to a compound which is an antagonist of $\beta 8$ integrin or an inhibitor of the expression of $\beta 8$ integrin for use to improve the sensitivity of glioblastoma to radiotherapy.

In another particular embodiment, the compound according to the invention is administrated in combination with radiotherapy.

Thus, the invention also relates to i) compound according to the invention, and ii) a radiotherapy, as a combined preparation for simultaneous, separate or sequential for use in the treatment of resistant glioblastoma.

In other word, the invention also relates to i) compound according to the invention, and ii) a radiotherapeutic agent, as a combined preparation for simultaneous, separate or sequential for use in the treatment of resistant glioblastoma.

In another embodiment, the invention also relates to i) compound according to the invention, and ii) a radiotherapeutic agent, as a combined preparation for simultaneous, separate or sequential to improve the sensitivity of resistant glioblastoma to radiotherapy.

In another particular embodiment, the compound according to the invention is administrated in combination with a chemotherapeutic agent.

Thus, the invention also relates to i) compound according to the invention, and ii) a chemotherapeutic agent, as a combined preparation for simultaneous, separate or sequential for use in the treatment of resistant glioblastoma.

In another embodiment, the invention also relates to i) compound according to the invention, and ii) chemotherapeutic agent, as a combined preparation for simultaneous, separate or sequential to improve the sensitivity of resistant glioblastoma to radiotherapy.

In another particular embodiment, the compound according to the invention is administrated in combination with radiotherapy and temozolomide (TMZ).

Thus, the invention also relates to i) compound according to the invention, and ii) a radiotherapy, and iii) TMZ as a combined preparation for simultaneous, separate or sequential use in the treatment of resistant glioblastoma.

In other word, the invention also relates to i) compound according to the invention, ii) a radiotherapeutic agent, and iii) TMZ as a combined preparation for simultaneous, separate or sequential for use in the treatment of resistant glioblastoma.

In another embodiment, the invention also relates to i) compound according to the invention, ii) a radiotherapeutic agent, and iii) TMZ as a combined preparation for simultaneous, separate or sequential to improve the sensitivity of resistant glioblastoma to radiotherapy.

As used herein, "radiotherapy" may consist of gamma-radiation, X-ray radiation, electrons or photons, external radiotherapy or curithrapy.

As used herein, the term "radiotherapeutic agent", is intended to refer to any radiotherapeutic agent known to one of skill in the art to be effective to treat or ameliorate cancer, without limitation. For instance, the radiotherapeutic agent can be an agent such as those administered in brachytherapy or radionuclide therapy. Such methods can optionally further comprise the administration of one or more additional cancer therapies, such as, but not limited to, chemotherapies, and/or another radiotherapy.

In another particular embodiment, the invention also relates to a compound which is an antagonist of $\beta 8$ integrin or an inhibitor of the expression of $\beta 8$ integrin for use in the treatment of glioblastoma.

In one embodiment, said $\beta 8$ integrin, antagonist may be a low molecular weight antagonist, e. g. a small organic molecule (natural or not).

The term "small organic molecule" refers to a molecule (natural or not) of a size comparable to those organic molecules generally used in pharmaceuticals. The term excludes biological macromolecules (e. g., proteins, nucleic acids, etc.). Preferred small organic molecules range in size up to about 10000 Da, more preferably up to 5000 Da, more preferably up to 2000 Da and most preferably up to about 1000 Da.

Antagonists of $\beta 8$ integrin are well known in the state of the art (see for example Minagawa S et al., 2014 or Sheldrake HM et al., 2014).

In another embodiment, $\beta 8$ integrin, antagonist of the invention may be an anti- $\beta 8$ integrin antibody which neutralizes $\beta 8$ integrin or an anti- $\beta 8$ integrin fragment thereof which neutralizes $\beta 8$ integrin, or an anti- $\beta 8$ integrin nanobody.

Antibodies directed against $\beta 8$ integrin can be raised according to known methods by administering the appropriate antigen or epitope to a host animal selected, e.g., from pigs, cows, horses, rabbits, goats, sheep, and mice, among others. Various adjuvants known in the art can be used to enhance antibody production. Although antibodies useful in practicing the invention can be polyclonal, monoclonal antibodies are preferred. Monoclonal antibodies against $\beta 8$ integrin can be prepared and isolated using any technique that provides for the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture. Techniques for production and isolation include but are not limited to the hybridoma technique originally described by Kohler and Milstein (1975); the human B-cell hybridoma technique (Cote et al., 1983); and the EBV-hybridoma technique (Cole et al. 1985). Alternatively, techniques described for the production of single chain antibodies (see e.g., U.S. Pat. No. 4,946,778) can be adapted to produce anti- $\beta 8$ integrin single chain antibodies. $\beta 8$ integrin antagonists useful in practicing the present invention also include antibody fragments including but not limited to F(ab')₂ fragments, which can be generated by pepsin digestion of an intact antibody molecule, and Fab fragments, which can be generated by reducing the disulfide bridges of the F(ab')₂ fragments. Alternatively, Fab and/or scFv expression libraries can be constructed to allow rapid identification of fragments having the desired specificity to $\beta 8$ integrin.

Humanized anti- $\beta 8$ integrin antibodies and antibody fragments therefrom can also be prepared according to known techniques. "Humanized antibodies" are forms of non-human (e.g., rodent) chimeric antibodies that contain minimal sequence derived from non-human immunoglobulin. For the most part, humanized antibodies are human immunoglobulins (recipient antibody) in which residues from a hypervariable region (CDRs) of the recipient are replaced by residues from a hypervariable region of a non-human species (donor antibody) such as mouse, rat, rabbit or nonhuman primate having the desired specificity, affinity and capacity. In some instances, framework region (FR) residues of the human immunoglobulin are replaced by corresponding non-human residues. Furthermore, humanized antibodies may comprise residues that are not found in the recipient antibody or in the donor antibody. These modifications are made to further refine antibody performance. In general, the humanized antibody will comprise substantially all of at least one, and typically two, variable domains, in which all or substantially all of the hypervariable loops correspond to those of a non-human immunoglobulin and all or substantially all of the FRs are those of a human immunoglobulin sequence. The humanized antibody optionally also will comprise at least a portion of an

immunoglobulin constant region (Fc), typically that of a human immunoglobulin. Methods for making humanized antibodies are described, for example, by Winter (U.S. Pat. No. 5,225,539) and Boss (Celltech, U.S. Pat. No. 4,816,397).

Then, for this invention, neutralizing antibodies of $\beta 8$ integrin are selected.

In a particular embodiment, the anti- $\beta 8$ integrin antibody according to the invention is an antibody selected in the patent application WO2013026004.

In a particular embodiment, the anti- $\beta 8$ integrin antibody according to the invention is an antibody selected in the patent application WO 2011103490

In a particular embodiment, the anti- $\beta 8$ integrin antibody according to the invention is an antibody selected in the patent applications US5635601 or CA2790488.

In a particular embodiment, the anti- $\beta 8$ integrin antibody according to the invention is an anti- $\alpha V\beta 8$ antibody selected in the patent application WO2011020529.

In a particular embodiment, the anti- $\beta 8$ integrin antibody according to the invention is the antibody MAB4775 obtained by the society R&D or the antibodies ab172007 & ab80673 obtained by the society Abcam or the antibody sc-25714 obtained by the society Santa Cruz.

In still another embodiment, $\beta 8$ integrin antagonists may be selected from aptamers. Aptamers are a class of molecule that represents an alternative to antibodies in term of molecular recognition. Aptamers are oligonucleotide or oligopeptide sequences with the capacity to recognize virtually any class of target molecules with high affinity and specificity. Such ligands may be isolated through Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment (SELEX) of a random sequence library, as described in Tuerk C. and Gold L. 1990. The random sequence library is obtainable by combinatorial chemical synthesis of DNA. In this library, each member is a linear oligomer, eventually chemically modified, of a unique sequence. Possible modifications, uses and advantages of this class of molecules have been reviewed in Jayasena S.D. 1999. Peptide aptamers consists of a conformationally constrained antibody variable region displayed by a platform protein, such as E. coli Thioredoxin A that are selected from combinatorial libraries by two hybrid methods (Colas et al., 1996).

Then, for this invention, neutralizing aptamers of $\beta 8$ integrin are selected.

In another embodiment, the compound according to the invention may be selected from peptides, peptides mimetic or RGD peptide mimetics (see Sheldrake HM et al., 2014).

In a preferred embodiment, the compound according to the invention is an inhibitor of the $\beta 8$ integrin gene expression.

Small inhibitory RNAs (siRNAs) can also function as inhibitors of $\beta 8$ integrin gene expression for use in the present invention. $\beta 8$ integrin gene expression can be reduced by contacting a subject or cell with a small double stranded RNA (dsRNA), or a vector or construct causing the production of a small double stranded RNA, such that $\beta 8$ integrin gene expression is specifically inhibited (i.e. RNA interference or RNAi). Methods for selecting an appropriate dsRNA or dsRNA-encoding vector are well known in the art for genes whose sequence is known (e.g. see for example Tuschl, T. et al. (1999); Elbashir, S. M. et al. (2001); Hannon, GJ. (2002); McManus, MT. et al. (2002); Brummelkamp, TR. et al. (2002); U.S. Pat. Nos. 6,573,099 and 6,506,559; and International Patent Publication Nos. WO 01/36646, WO 99/32619, and WO 01/68836).

Ribozymes can also function as inhibitors of $\beta 8$ integrin gene expression for use in the present invention. Ribozymes are enzymatic RNA molecules capable of catalyzing the specific cleavage of RNA. The mechanism of ribozyme action involves sequence specific hybridization of the ribozyme molecule to complementary target RNA, followed by endonucleolytic cleavage. Engineered hairpin or hammerhead motif ribozyme molecules that specifically and efficiently catalyze endonucleolytic cleavage of $\beta 8$ integrin mRNA sequences are thereby useful within the scope of the present invention. Specific ribozyme cleavage sites within any potential RNA target are initially identified by scanning the target molecule for ribozyme cleavage sites, which typically include the following sequences, GUA, GUU, and GUC. Once identified, short RNA sequences of between about 15 and 20 ribonucleotides corresponding to the region of the target gene containing the cleavage site can be evaluated for predicted structural features, such as secondary structure, that can render the oligonucleotide sequence unsuitable. The suitability of candidate targets can also be evaluated by testing their accessibility to hybridization with complementary oligonucleotides, using, e.g., ribonuclease protection assays.

Both antisense oligonucleotides and ribozymes useful as inhibitors of $\beta 8$ integrin gene expression can be prepared by known methods. These include techniques for chemical synthesis such as, e.g., by solid phase phosphoramidite chemical synthesis. Alternatively, anti-sense RNA molecules can be generated by *in vitro* or *in vivo* transcription of DNA sequences encoding the RNA molecule. Such DNA sequences can be incorporated into a wide variety of vectors that incorporate suitable RNA polymerase promoters such as the T7 or SP6 polymerase promoters. Various modifications to the oligonucleotides of the invention can be introduced as a means of increasing intracellular stability and half-life. Possible modifications include but are not limited to the addition of flanking sequences of ribonucleotides or deoxyribonucleotides to the 5' and/or 3' ends of the molecule, or the use of phosphorothioate or 2'-O-methyl rather than phosphodiesterase linkages within the oligonucleotide backbone.

Antisense oligonucleotides siRNAs and ribozymes of the invention may be delivered *in vivo* alone or in association with a vector. In its broadest sense, a "vector" is any vehicle capable of facilitating the transfer of the antisense oligonucleotide siRNA or ribozyme nucleic acid to the cells and preferably cells expressing $\beta 8$ integrin. Preferably, the vector transports the nucleic acid to cells with reduced degradation relative to the extent of degradation that would result in the absence of the vector. In general, the vectors useful in the invention include, but are not limited to, plasmids, phagemids, viruses, other vehicles derived from viral or bacterial sources that have been manipulated by the insertion or incorporation of the antisense oligonucleotide siRNA or ribozyme nucleic acid sequences. Viral vectors are a preferred type of vector and include, but are not limited to nucleic acid sequences from the following viruses: retrovirus, such as moloney murine leukemia virus, harvey murine sarcoma virus, murine mammary tumor virus, and rouse sarcoma virus; adenovirus, adeno-associated virus; SV40-type viruses; polyoma viruses; Epstein-Barr viruses; papilloma viruses; herpes virus; vaccinia virus; polio virus; and RNA virus such as a retrovirus. One can readily employ other vectors not named but known to the art.

Preferred viral vectors are based on non-cytopathic eukaryotic viruses in which non-essential genes have been replaced with the gene of interest. Non-cytopathic viruses include retroviruses (e.g., lentivirus), the life cycle of which involves reverse transcription of genomic viral RNA into DNA with subsequent proviral integration into host cellular DNA. Retroviruses have been approved for human gene therapy trials. Most useful are those retroviruses that are replication-deficient (i.e., capable of directing synthesis of the desired proteins, but incapable of manufacturing an infectious particle). Such genetically altered retroviral expression vectors have general utility for the high-efficiency transduction of genes *in vivo*. Standard protocols for producing replication-deficient retroviruses (including the steps of incorporation of exogenous genetic material into a plasmid, transfection of a

packaging cell lined with plasmid, production of recombinant retroviruses by the packaging cell line, collection of viral particles from tissue culture media, and infection of the target cells with viral particles) are provided in Kriegler, 1990 and in Murry, 1991).

Preferred viruses for certain applications are the adeno-viruses and adeno-associated viruses, which are double-stranded DNA viruses that have already been approved for human use in gene therapy. The adeno-associated virus can be engineered to be replication deficient and is capable of infecting a wide range of cell types and species. It further has advantages such as, heat and lipid solvent stability; high transduction frequencies in cells of diverse lineages, including hemopoietic cells; and lack of superinfection inhibition thus allowing multiple series of transductions. Reportedly, the adeno-associated virus can integrate into human cellular DNA in a site-specific manner, thereby minimizing the possibility of insertional mutagenesis and variability of inserted gene expression characteristic of retroviral infection. In addition, wild-type adeno-associated virus infections have been followed in tissue culture for greater than 100 passages in the absence of selective pressure, implying that the adeno-associated virus genomic integration is a relatively stable event. The adeno-associated virus can also function in an extrachromosomal fashion.

Other vectors include plasmid vectors. Plasmid vectors have been extensively described in the art and are well known to those of skill in the art. See e.g. Sambrook et al., 1989. In the last few years, plasmid vectors have been used as DNA vaccines for delivering antigen-encoding genes to cells in vivo. They are particularly advantageous for this because they do not have the same safety concerns as with many of the viral vectors. These plasmids, however, having a promoter compatible with the host cell, can express a peptide from a gene operatively encoded within the plasmid. Some commonly used plasmids include pBR322, pUC18, pUC19, pRC/CMV, SV40, and pBlueScript. Other plasmids are well known to those of ordinary skill in the art. Additionally, plasmids may be custom designed using restriction enzymes and ligation reactions to remove and add specific fragments of DNA. Plasmids may be delivered by a variety of parenteral, mucosal and topical routes. For example, the DNA plasmid can be injected by intramuscular, eye, intradermal, subcutaneous, or other routes. It may also be administered by intranasal sprays or drops, rectal suppository and orally. It may also be administered into the epidermis or a mucosal surface using a gene-gun. The plasmids may be given in an aqueous solution, dried onto gold particles or in association with another DNA delivery system including but not limited to liposomes, dendrimers, cochleate and microencapsulation.

In a preferred embodiment, the antisense oligonucleotide, siRNA, shRNA or ribozyme nucleic acid sequence is under the control of a heterologous regulatory region, e.g., a heterologous promoter. The promoter may be specific for Muller glial cells, microglia cells, endothelial cells, pericyte cells and astrocytes. For example, a specific expression in Muller glial cells may be obtained through the promoter of the glutamine synthetase gene is suitable. The promoter can also be, e.g., a viral promoter, such as CMV promoter or any synthetic promoters.

Another object of the invention relates to a method for treating resistant glioblastoma comprising administering to a subject in need thereof a therapeutically effective amount of a compound which is an antagonist of $\beta 8$ integrin or an inhibitor of the expression of $\beta 8$ integrin as described above.

Compounds of the invention may be administered in the form of a pharmaceutical composition, as defined below.

By a "therapeutically effective amount" is meant a sufficient amount of compound to treat resistant glioblastoma disorder.

It will be understood that the total daily usage of the compounds and compositions of the present invention will be decided by the attending physician within the scope of sound medical judgment and/or during phase 1 clinical trial. The specific therapeutically effective dose level for any particular patient will depend upon a variety of factors including the disorder being treated and the severity of the disorder; activity of the specific compound employed; the specific composition employed, the age, body weight, general health, sex and diet of the patient; the time of administration, route of administration, and rate of excretion of the specific compound employed; the duration of the treatment; drugs used in combination or coincidental with the specific polypeptide employed; and like factors well known in the medical arts. For example, it is well within the skill of the art to start doses of the compound at levels lower than those required to achieve the desired therapeutic effect and to gradually increase the dosage until the desired effect is achieved. However, the daily dosage of the products may be varied over a wide range from 0.01 to 1,000 mg per adult per day. Preferably, the compositions contain 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 25.0, 50.0, 100, 250 and 500 mg of the active ingredient for the symptomatic adjustment of the dosage to the patient to be treated. A medicament typically contains from about 0.01 mg to about 500 mg of the active ingredient, preferably from 1 mg to about 100 mg of the active ingredient. An effective amount of the drug is ordinarily supplied at a dosage level from 0.0002 mg/kg to about 20 mg/kg of body weight per day, especially from about 0.001 mg/kg to 7 mg/kg of body weight per day.

Compounds according to the invention may be used for the preparation of a pharmaceutical composition for the treatment of resistant glioblastoma.

Hence, the present invention also provides a pharmaceutical composition comprising an effective dose of an antagonist of $\beta 8$ integrin or an inhibitor of the $\beta 8$ integrin expression, particularly a $\beta 8$ integrin antagonist, according to the invention.

Any therapeutic agent of the invention may be combined with pharmaceutically acceptable excipients, and optionally sustained-release matrices, such as biodegradable polymers, to form therapeutic compositions.

"Pharmaceutically" or "pharmaceutically acceptable" refers to molecular entities and compositions that do not produce an adverse, allergic or other untoward reaction when administered to a mammal, especially a human, as appropriate. A pharmaceutically acceptable carrier or excipient refers to a non-toxic solid, semi-solid or liquid filler, diluent, encapsulating material or formulation auxiliary of any type.

The form of the pharmaceutical compositions, the route of administration, the dosage and the regimen naturally depend upon the condition to be treated, the severity of the illness, the age, weight, and sex of the patient, etc.

The pharmaceutical compositions of the invention can be formulated for a topical, oral, intranasal, parenteral, intraocular, intravenous, intramuscular, intratumoral or subcutaneous administration and the like.

Preferably, the pharmaceutical compositions contain vehicles which are pharmaceutically acceptable for a formulation capable of being injected. These may be in particular isotonic, sterile, saline solutions (monosodium or disodium phosphate, sodium, potassium, calcium or magnesium chloride and the like or mixtures of such salts), or dry, especially freeze-dried compositions which upon addition, depending on the case, of sterilized water or physiological saline, permit the constitution of injectable solutions.

The doses used for the administration can be adapted as a function of various parameters, and in particular as a function of the mode of administration used, of the relevant pathology, or alternatively of the desired duration of treatment.

In addition, other pharmaceutically acceptable forms include, e.g. tablets or other solids for oral administration; time release capsules; and any other form currently can be used.

Compositions of the present invention may comprise a further therapeutic active agent. The present invention also relates to a kit comprising an antagonist or an inhibitor according to the invention and a further therapeutic active agent.

In one embodiment said therapeutic active agent is an anticancer agent. For example, said anticancer agents include but are not limited to fludarabine, gemcitabine, capecitabine, methotrexate, taxol, taxotere, mercaptopurine, thioguanine, hydroxyurea, cytarabine, cyclophosphamide, ifosfamide, nitrosoureas, platinum complexes such as cisplatin, carboplatin and oxaliplatin, mitomycin, dacarbazine, procarbazine, etoposide, teniposide, camptothecins, bleomycin, doxorubicin, idarubicin, daunorubicin, dactinomycin, plicamycin, mitoxantrone, L-asparaginase, doxorubicin, epirubicin, 5-fluorouracil, taxanes such as docetaxel and paclitaxel, leucovorin, levamisole, irinotecan, estramustine, etoposide, nitrogen mustards, BCNU, nitrosoureas such as carmustine and lomustine, vinca alkaloids such as vinblastine, vincristine and vinorelbine, imatinib mesylate, hexamethylmelamine, topotecan, kinase inhibitors, phosphatase inhibitors, ATPase inhibitors, tyrosine kinases, protease inhibitors, inhibitors herbimycin A, genistein, erstatin, temozolomide and lavendustin A. In one embodiment, additional anticancer agents may be selected from, but are not limited to, one or a combination of the following class of agents: alkylating agents, plant alkaloids, DNA topoisomerase inhibitors, anti-folates, pyrimidine analogs, purine analogs, DNA antimetabolites, taxanes, podophyllotoxin, hormonal therapies, retinoids, photosensitizers or photodynamic therapies, angiogenesis inhibitors, antimetabolic agents, isoprenylation inhibitors, cell cycle inhibitors, actinomycins, bleomycins, anthracyclines, MDR inhibitors and Ca²⁺ ATPase inhibitors.

Additional anticancer agents may be selected from, but are not limited to, cytokines, chemokines, growth factors, growth inhibitory factors, hormones, soluble receptors, decoy receptors, monoclonal or polyclonal antibodies, mono-specific, bi-specific or multi-specific antibodies, monobodies, polybodies.

Additional anticancer agent may be selected from, but are not limited to, growth or hematopoietic factors such as erythropoietin and thrombopoietin, and growth factor mimetics thereof.

In the present methods for treating cancer the further therapeutic active agent can be an antiemetic agent. Suitable antiemetic agents include, but are not limited to, metoclopramide, domperidone, prochlorperazine, promethazine, chlorpromazine, trimethobenzamide, ondansetron, granisetron, hydroxyzine, acetylleucine monoemolamine, alizapride, azasetron, benzquinamide, biantanautine, bromopride, buclizine, clebopride, cyclizine, dunehydrinate, diphenidol, dolasetron, meclizine, methallatal, metopimazine, nabilone, oxypemdyl, pipamazine, scopolamine, sulphiride, tetrahydrocannabinols, thienhydropazine, thioproperazine and tropisetron. In a preferred embodiment, the antiemetic agent is granisetron or ondansetron.

In another embodiment, the further therapeutic active agent can be an hematopoietic colony stimulating factor. Suitable hematopoietic colony stimulating factors include, but are not limited to, filgrastim, sargramostim, molgramostim and epoietin alpha.

In still another embodiment, the other therapeutic active agent can be an opioid or non-opioid analgesic agent. Suitable opioid analgesic agents include, but are not limited to, morphine, heroin, hydromorphone, hydrocodone, oxycodone, metopon, apomorphine, nomioipine, etoipbine, buprenorphine, mepedidine, lopermide, anileddine, ethoheptazine, piminidine, betaprodine, diphenoxylate, fentanil, sufentanil, alfentanil, remifentanil, levorphanol, dextromethorphan, phenazodone, pemazocine, cyclazocine, methadone, isomethadone and propoxyphene. Suitable non-opioid analgesic agents include, but are not limited to, aspirin, celecoxib, rofecoxib, diclofenac, diflusal, etodolac, fenoprofen, flurbiprofen, ibuprofen, ketoprofen, indomethacin, ketorolac, meclofenamate, mefanamic acid, nabumetone, naproxen, piroxicam and sulindac.

Diagnostic method

In another aspect, the invention relates to an *ex vivo* method for diagnosing resistant glioblastoma, comprising the step of determining the level expression of the marker $\beta 8$ integrin in a tumor sample obtained from a patient.

Typically, the tumor sample according to the invention may be a cancer biopsy or a cancer biopsy obtained during surgery.

The term "detecting" as used above includes qualitative and/or quantitative detection (measuring levels) with or without reference to a control. Typically $\beta 8$ integrin expression may be measured for example by enzyme-labeled and mediated immunoassays (such as ELISA) or by flow cytometry performed on the sample. Moreover, FACS sorting could additionally be performed on $\beta 8$ integrin positive tumoral cells.

Particularly, the invention relates to a method for diagnosis of resistant glioblastoma in a patient comprising a step a) consisting of measuring $\beta 8$ integrin expression level in a sample obtained from said patient. Preferably, the method of the invention further comprises a step of comparing the $\beta 8$ integrin expression level obtained in step a) to a threshold value.

The "control" may be a healthy subject, i.e. a subject who does not suffer from any resistant glioblastoma. The control may also be a subject suffering from resistant glioblastoma. Preferably, said control is a healthy subject.

Detection of $\beta 8$ integrin expression in the sample may be performed by measuring the level of $\beta 8$ integrin protein. In the present application, the "level of $\beta 8$ integrin protein" means the quantity or concentration of said $\beta 8$ integrin protein.

Such methods comprise contacting a sample with a binding partner capable of selectively interacting with $\beta 8$ integrin protein present in the sample. The binding partner is generally an antibody that may be polyclonal or monoclonal, preferably monoclonal.

The presence of the protein can be detected using standard electrophoretic and immunodiagnostic techniques, including immunoassays such as competition, direct reaction, or sandwich type assays. Such assays include, but are not limited to, Western blots; agglutination tests; enzyme-labeled and mediated immunoassays, such as ELISAs; biotin/avidin type assays; radioimmunoassays; immunoelectrophoresis; immunoprecipitation, immunohistochemistry, etc. The reactions generally include revealing labels such as fluorescent, chemiluminescent, radioactive, enzymatic labels or dye molecules, or other methods for detecting the formation of a complex between the antigen and the antibody or antibodies reacted therewith.

The aforementioned assays generally involve separation of unbound protein in a liquid phase from a solid phase support to which antigen-antibody complexes are bound. Solid supports which can be used in the practice of the invention include substrates such as nitrocellulose (e. g., in membrane or microtiter well form); polyvinylchloride (e. g., sheets or microtiter wells); polystyrene latex (e.g., beads or microtiter plates); polyvinylidene fluoride; diazotized paper; nylon membranes; activated beads, magnetically responsive beads, and the like.

More particularly, an ELISA method can be used, wherein the wells of a microtiter plate are coated with a set of antibodies against the proteins to be tested. A sample containing or suspected of containing the marker protein is then added to the coated wells. After a period of incubation sufficient to allow the formation of antibody-antigen complexes, the plate(s) can be washed to remove unbound moieties and a detectably labeled secondary binding molecule is added. The secondary binding molecule is allowed to react with any captured sample marker protein, the plate is washed and the presence of the secondary binding molecule is detected using methods well known in the art.

Various immunoenzymatic staining methods are known in the art for detecting a protein of interest. For example, immunoenzymatic interactions can be visualized using different

enzymes such as peroxidase, alkaline phosphatase, or different chromogens such as DAB, AEC, or Fast Red; or fluorescent labels such as FITC, Cy3, Cy5, Cy7, Alexafluors, APC, etc. Counterstains may include H&E, DAPI, Hoechst, so long as such stains are compatible with other detection reagents and the visualization strategy used. As known in the art, amplification reagents may be used to intensify staining signal. For example, tyramide reagents may be used. The staining methods of the present invention may be accomplished using any suitable method or system as would be apparent to one of skill in the art, including automated, semi-automated or manual systems.

The method of the invention may comprise a further step consisting of comparing $\beta 8$ integrin expression with a control reference.

The invention thus relates to a method for diagnosis resistant glioblastoma in a patient comprising determining the expression level of $\beta 8$ integrin in a sample obtained from said patient and comparing said expression level to a threshold value. As used herein, "expression level of $\beta 8$ integrin" refers to an amount of a translation product, for instance the protein $\beta 8$ integrin. Typically, a level of mRNA expression can be expressed in units such as transcripts per cell or nanograms per microgram of tissue. A level of a polypeptide can be expressed as nanograms per microgram of tissue or nanograms per milliliter of a culture medium, for example. Alternatively, relative units can be employed to describe an expression level.

Typically, a "threshold value", "threshold level" or "cut-off value" can be determined experimentally, empirically, or theoretically. A threshold value can also be arbitrarily selected based upon the existing experimental and/or clinical conditions, as would be recognized by a person of ordinary skill in the art. Preferably, the person skilled in the art may compare the expression levels of $\beta 8$ integrin obtained according to the method of the invention with a defined threshold value.

Preferably, said threshold value is the mean expression level of $\beta 8$ integrin of a population of healthy individuals. As used herein, the term "healthy individual" denotes a human which is known to be healthy, i.e. which does not suffer from resistant glioblastoma, has never been subjected to such resistant glioblastoma, and does not need any medical care.

Typically, the skilled person in the art may determine the expression level of $\beta 8$ integrin in a biological sample of 100 individuals known to be healthy. The mean value of the obtained expression levels is then determined, according to well known statistical analysis, so as to obtain the mean expression level of $\beta 8$ integrin. Said value is then considered as being normal and thus constitute a threshold value. By comparing the expression levels of $\beta 8$ integrin to this threshold value, the physician is then able to diagnose resistant glioblastoma. Indeed, by comparing the expression level of $\beta 8$ integrin obtained in a biological sample, of a given subject to a threshold value, one can easily determine whether said subject suffers from resistant glioblastoma or not.

Accordingly, the physician would be able to adapt and optimize appropriate medical care of a subject in a critical and life-threatening condition suffering from resistant glioblastoma. The determination of said prognosis is highly appropriate for follow-up care and clinical decision making.

Therefore, the invention is drawn to a method for diagnosis resistant glioblastoma in a patient comprising the following steps:

- a) determining the level of expression of $\beta 8$ integrin in a sample obtained from said patient;
- b) determining the mean expression level of $\beta 8$ integrin in a biological sample of a population of healthy individuals, preferably 100 healthy individuals; and
- c) a step of comparing the expression level of $\beta 8$ integrin obtained of a) to the mean expression level of $\beta 8$ integrin obtained in b).

The present invention also relates to kits for the diagnosis of resistant glioblastoma, comprising means for detecting $\beta 8$ integrin expression.

According to the invention, the kits of the invention may comprise an anti- $\beta 8$ integrin protein antibody; and another molecule coupled with a signalling system which binds to said $\beta 8$ integrin protein antibody.

Typically, the antibodies or combination of antibodies are in the form of solutions ready for use. In one embodiment, the kit comprises containers with the solutions ready for use. Any other forms are encompassed by the present invention and the man skilled in the art can routinely adapt the form to the use in immunohistochemistry.

In another embodiment, the expression level of the gene of $\beta 8$ integrin can be done. Measuring the expression level of a gene can be performed by a variety of techniques well known in the art.

Typically, the expression level of a gene may be determined by determining the quantity of mRNA. Methods for determining the quantity of mRNA are well known in the art. For example the nucleic acid contained in the samples (e.g., cell or tissue prepared from the patient) is first extracted according to standard methods, for example using lytic enzymes or chemical solutions or extracted by nucleic-acid-binding resins following the manufacturer's instructions. The extracted mRNA is then detected by hybridization (e. g., Northern blot analysis, in situ hybridization) and/or amplification (e.g., RT-PCR).

Other methods of Amplification include ligase chain reaction (LCR), transcription-mediated amplification (TMA), strand displacement amplification (SDA) and nucleic acid sequence based amplification (NASBA).

Nucleic acids having at least 10 nucleotides and exhibiting sequence complementarity or homology to the mRNA of interest herein find utility as hybridization probes or amplification primers. It is understood that such nucleic acids need not be identical, but are typically at least about 80% identical to the homologous region of comparable size, more preferably 85% identical and even more preferably 90-95% identical. In certain embodiments, it will be advantageous to use nucleic acids in combination with appropriate means, such as a detectable label, for detecting hybridization.

Typically, the nucleic acid probes include one or more labels, for example to permit detection of a target nucleic acid molecule using the disclosed probes. In various applications, such as in situ hybridization procedures, a nucleic acid probe includes a label (e.g., a detectable label). A "detectable label" is a molecule or material that can be used to produce a detectable signal that indicates the presence or concentration of the probe (particularly the bound or hybridized probe) in a sample. Thus, a labeled nucleic acid molecule provides an indicator of the presence or concentration of a target nucleic acid sequence (e.g., genomic target nucleic acid sequence) (to which the labeled uniquely specific nucleic acid molecule is bound or hybridized) in a sample. A label associated with one or more nucleic acid molecules (such as a probe generated by the disclosed methods) can be detected either directly or indirectly. A label can be detected by any known or yet to be discovered mechanism including absorption, emission and/ or scattering of a photon (including radio frequency, microwave frequency, infrared frequency, visible frequency and ultra-violet frequency photons). Detectable labels include colored, fluorescent, phosphorescent and luminescent molecules and materials, catalysts (such as enzymes) that convert one substance into another substance to provide a detectable difference (such as by converting a colorless substance into a colored substance or vice versa, or by producing a precipitate or increasing sample turbidity), haptens that can be detected by antibody binding interactions, and paramagnetic and magnetic molecules or materials.

Particular examples of detectable labels include fluorescent molecules (or fluorochromes). Numerous fluorochromes are known to those of skill in the art, and can be selected, for example from Life Technologies (formerly Invitrogen), e.g., see, *The Handbook—A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*). Examples of particular fluorophores that can

be attached (for example, chemically conjugated) to a nucleic acid molecule (such as a uniquely specific binding region) are provided in U.S. Pat. No. 5,866,366 to Nazarenko et al., such as 4-acetamido-4'-isothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid, acridine and derivatives such as acridine and acridine isothiocyanate, 5-(2'-aminoethyl) aminonaphthalene-1-sulfonic acid (EDANS), 4-amino-N-[3 vinylsulfonyl]phenyl]naphthalimide-3,5 disulfonate (Lucifer Yellow VS), N-(4-anilino-1-naphthyl)maleimide, antlranilamide, Brilliant Yellow, coumarin and derivatives such as coumarin, 7-amino-4-methylcoumarin (AMC, Coumarin 120), 7-amino-4-trifluoromethylcoumarin (Coumarin 151); cyanosine; 4',6-diarninidino-2-phenylindole (DAPI); 5',5''dibromopyrogallol-sulfonephthalein (Bromopyrogallol Red); 7-diethylamino-3-(4'-isothiocyanatophenyl)-4-methylcoumarin; diethylenetriamine pentaacetate; 4,4'-diisothiocyanatodihydro-stilbene-2,2'-disulfonic acid; 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid; 5-[dimethylamino] naphthalene-1-sulfonyl chloride (DNS, dansyl chloride); 4-(4'-dimethylaminophenylazo)benzoic acid (DABCYL); 4-dimethylaminophenylazophenyl-4'-isothiocyanate (DABITC); eosin and derivatives such as eosin and eosin isothiocyanate; erythrosin and derivatives such as erythrosin B and erythrosin isothiocyanate; ethidium; fluorescein and derivatives such as 5-carboxyfluorescein (FAM), 5-(4,6-dichloro-2-triazin-2-yl)aminofluorescein (DTAF), 2',7'-dimethoxy-4',5'-dichloro-6-carboxyfluorescein (JOE), fluorescein, fluorescein isothiocyanate (FITC), and QFITC (RITC); 2',7'-difluorofluorescein (OREGON GREEN®); fluorescamine; IR144; IR1446; Malachite Green isothiocyanate; 4-methylumbelliferone; ortho cresolphthalein; nitrotyrosine; pararosaniline; Phenol Red; B-phycoerythrin; o-phthalaldehyde; pyrene and derivatives such as pyrene, pyrene butyrate and succinimidyl 1-pyrene butyrate; Reactive Red 4 (Cibacron Brilliant Red 3B-A); rhodamine and derivatives such as 6-carboxy-X-rhodamine (ROX), 6-carboxyrhodamine (R6G), lissamine rhodamine B sulfonyl chloride, rhodamine (Rhod), rhodamine B, rhodamine 123, rhodamine X isothiocyanate, rhodamine green, sulforhodamine B, sulforhodamine 101 and sulfonyl chloride derivative of sulforhodamine 101 (Texas Red); N,N,N',N'-tetramethyl-6-carboxyrhodamine (TAMRA); tetramethyl rhodamine; tetramethyl rhodamine isothiocyanate (TRITC); riboflavin; rosolic acid and terbium chelate derivatives. Other suitable fluorophores include thiol-reactive europium chelates which emit at approximately 617 nm (Heyduk and Heyduk, *Analyt. Biochem.* 248:216-27, 1997; *J. Biol. Chem.* 274:3315-22, 1999), as well as GFP, LissamineTM, diethylaminocoumarin, fluorescein chlorotriazinyl, naphthofluorescein, 4,7-dichlororhodamine and xanthene (as described in U.S. Pat. No. 5,800,996 to Lee et al.) and derivatives thereof. Other fluorophores known to those skilled in the art can also be used, for example those available from Life Technologies (Invitrogen; Molecular Probes (Eugene, Oreg.)) and including the ALEXA FLUOR® series of dyes (for example, as described in U.S. Pat. Nos. 5,696,157, 6,130,101 and 6,716,979), the BODIPY series of dyes (dipyrometheneboron difluoride dyes, for example as described in U.S. Pat. Nos. 4,774,339, 5,187,288, 5,248,782, 5,274,113, 5,338,854, 5,451,663 and 5,433,896), Cascade Blue (an amine reactive derivative of the sulfonated pyrene described in U.S. Pat. No. 5,132,432) and Marina Blue (U.S. Pat. No. 5,830,912).

In addition to the fluorochromes described above, a fluorescent label can be a fluorescent nanoparticle, such as a semiconductor nanocrystal, e.g., a QUANTUM DOTTM (obtained, for example, from Life Technologies (QuantumDot Corp, Invitrogen Nanocrystal Technologies, Eugene, Oreg.); see also, U.S. Pat. Nos. 6,815,064; 6,682,596; and 6,649,138). Semiconductor nanocrystals are microscopic particles having size-dependent optical and/or electrical properties. When semiconductor nanocrystals are illuminated with a primary energy source, a secondary emission of energy occurs of a frequency that corresponds to the bandgap of the semiconductor material used in the semiconductor nanocrystal. This emission can be detected as colored light of a specific wavelength or fluorescence. Semiconductor nanocrystals with different spectral characteristics are described in e.g., U.S. Pat. No. 6,602,671. Semiconductor nanocrystals that can be coupled to a variety of biological molecules (including dNTPs and/or nucleic acids) or substrates by techniques described in, for example, Bruchez et

al., Science 281 :20132016, 1998; Chan et al., Science 281:2016-2018, 1998; and U.S. Pat. No. 6,274,323. Formation of semiconductor nanocrystals of various compositions are disclosed in, e.g., U.S. Pat. Nos. 6,927, 069; 6,914,256; 6,855,202; 6,709,929; 6,689,338; 6,500,622; 6,306,736; 6,225,198; 6,207,392; 6,114,038; 6,048,616; 5,990,479; 5,690,807; 5,571,018; 5,505,928; 5,262,357 and in U.S. Patent Publication No. 2003/0165951 as well as PCT Publication No. 99/26299 (published May 27, 1999). Separate populations of semiconductor nanocrystals can be produced that are identifiable based on their different spectral characteristics. For example, semiconductor nanocrystals can be produced that emit light of different colors based on their composition, size or size and composition. For example, quantum dots that emit light at different wavelengths based on size (565 nm, 655 nm, 705 nm, or 800 nm emission wavelengths), which are suitable as fluorescent labels in the probes disclosed herein are available from Life Technologies (Carlsbad, Calif.).

Additional labels include, for example, radioisotopes (such as ^3H), metal chelates such as DOTA and DPTA chelates of radioactive or paramagnetic metal ions like Gd^{3+} , and liposomes.

Detectable labels that can be used with nucleic acid molecules also include enzymes, for example horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, acid phosphatase, glucose oxidase, beta-galactosidase, beta-glucuronidase, or beta-lactamase.

Alternatively, an enzyme can be used in a metallographic detection scheme. For example, silver in situ hybridization (SISH) procedures involve metallographic detection schemes for identification and localization of a hybridized genomic target nucleic acid sequence. Metallographic detection methods include using an enzyme, such as alkaline phosphatase, in combination with a water-soluble metal ion and a redox-inactive substrate of the enzyme. The substrate is converted to a redox-active agent by the enzyme, and the redoxactive agent reduces the metal ion, causing it to form a detectable precipitate. (See, for example, U.S. Patent Application Publication No. 2005/0100976, PCT Publication No. 2005/ 003777 and U.S. Patent Application Publication No. 2004/ 0265922). Metallographic detection methods also include using an oxido-reductase enzyme (such as horseradish peroxidase) along with a water soluble metal ion, an oxidizing agent and a reducing agent, again to form a detectable precipitate. (See, for example, U.S. Pat. No. 6,670,113).

Probes made using the disclosed methods can be used for nucleic acid detection, such as ISH procedures (for example, fluorescence in situ hybridization (FISH), chromogenic in situ hybridization (CISH) and silver in situ hybridization (SISH)) or comparative genomic hybridization (CGH).

In situ hybridization (ISH) involves contacting a sample containing target nucleic acid sequence (e.g., genomic target nucleic acid sequence) in the context of a metaphase or interphase chromosome preparation (such as a cell or tissue sample mounted on a slide) with a labeled probe specifically hybridizable or specific for the target nucleic acid sequence (e.g., genomic target nucleic acid sequence). The slides are optionally pretreated, e.g., to remove paraffin or other materials that can interfere with uniform hybridization. The sample and the probe are both treated, for example by heating to denature the double stranded nucleic acids. The probe (formulated in a suitable hybridization buffer) and the sample are combined, under conditions and for sufficient time to permit hybridization to occur (typically to reach equilibrium). The chromosome preparation is washed to remove excess probe, and detection of specific labeling of the chromosome target is performed using standard techniques.

For example, a biotinylated probe can be detected using fluorescein-labeled avidin or avidin-alkaline phosphatase. For fluorochrome detection, the fluorochrome can be detected directly, or the samples can be incubated, for example, with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated avidin. Amplification of the FITC signal can be effected, if necessary, by incubation with biotin-conjugated goat antiavidin antibodies, washing and a second incubation with FITC-conjugated avidin. For detection by enzyme activity, samples can be incubated, for example,

with streptavidin, washed, incubated with biotin-conjugated alkaline phosphatase, washed again and pre-equilibrated (e.g., in alkaline phosphatase (AP) buffer). For a general description of in situ hybridization procedures, see, e.g., U.S. Pat. No. 4,888,278.

Numerous procedures for FISH, CISH, and SISH are known in the art. For example, procedures for performing FISH are described in U.S. Pat. Nos. 5,447,841; 5,472,842; and 5,427,932; and for example, in Pirlkel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 83:2934-2938, 1986; Pinkel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 85:9138-9142, 1988; and Lichter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 85:9664-9668, 1988. CISH is described in, e.g., Tanner et al., Am. J. Pathol. 157:1467-1472, 2000 and U.S. Pat. No. 6,942,970. Additional detection methods are provided in U.S. Pat. No. 6,280,929.

Numerous reagents and detection schemes can be employed in conjunction with FISH, CISH, and SISH procedures to improve sensitivity, resolution, or other desirable properties. As discussed above probes labeled with fluorophores (including fluorescent dyes and QUANTUM DOTS®) can be directly optically detected when performing FISH. Alternatively, the probe can be labeled with a nonfluorescent molecule, such as a hapten (such as the following non-limiting examples: biotin, digoxigenin, DNP, and various oxazoles, pyrrazoles, thiazoles, nitroaryls, benzofurazans, triterpenes, ureas, thioureas, rotenones, coumarin, coumarin-based compounds, Podophyllotoxin, Podophyllotoxin-based compounds, and combinations thereof), ligand or other indirectly detectable moiety. Probes labeled with such non-fluorescent molecules (and the target nucleic acid sequences to which they bind) can then be detected by contacting the sample (e.g., the cell or tissue sample to which the probe is bound) with a labeled detection reagent, such as an antibody (or receptor, or other specific binding partner) specific for the chosen hapten or ligand. The detection reagent can be labeled with a fluorophore (e.g., QUANTUM DOT®) or with another indirectly detectable moiety, or can be contacted with one or more additional specific binding agents (e.g., secondary or specific antibodies), which can be labeled with a fluorophore.

In other examples, the probe, or specific binding agent (such as an antibody, e.g., a primary antibody, receptor or other binding agent) is labeled with an enzyme that is capable of converting a fluorogenic or chromogenic composition into a detectable fluorescent, colored or otherwise detectable signal (e.g., as in deposition of detectable metal particles in SISH). As indicated above, the enzyme can be attached directly or indirectly via a linker to the relevant probe or detection reagent. Examples of suitable reagents (e.g., binding reagents) and chemistries (e.g., linker and attachment chemistries) are described in U.S. Patent Application Publication Nos. 2006/0246524; 2006/0246523, and 2007/01 17153.

It will be appreciated by those of skill in the art that by appropriately selecting labelled probe-specific binding agent pairs, multiplex detection schemes can be produced to facilitate detection of multiple target nucleic acid sequences (e.g., genomic target nucleic acid sequences) in a single assay (e.g., on a single cell or tissue sample or on more than one cell or tissue sample). For example, a first probe that corresponds to a first target sequence can be labelled with a first hapten, such as biotin, while a second probe that corresponds to a second target sequence can be labelled with a second hapten, such as DNP. Following exposure of the sample to the probes, the bound probes can be detected by contacting the sample with a first specific binding agent (in this case avidin labelled with a first fluorophore, for example, a first spectrally distinct QUANTUM DOT®, e.g., that emits at 585 nm) and a second specific binding agent (in this case an anti-DNP antibody, or antibody fragment, labelled with a second fluorophore (for example, a second spectrally distinct QUANTUM DOT®, e.g., that emits at 705 nm). Additional probes/binding agent pairs can be added to the multiplex detection scheme using other spectrally distinct fluorophores. Numerous variations of direct, and indirect (one step, two step or more) can be envisioned, all of which are suitable in the context of the disclosed probes and assays.

Probes typically comprise single-stranded nucleic acids of between 10 to 1000 nucleotides in length, for instance of between 10 and 800, more preferably of between 15 and 700, typically of between 20 and 500. Primers typically are shorter single-stranded nucleic acids, of between 10 to 25 nucleotides in length, designed to perfectly or almost perfectly match a nucleic acid of interest, to be amplified. The probes and primers are “specific” to the nucleic acids they hybridize to, i.e. they preferably hybridize under high stringency hybridization conditions (corresponding to the highest melting temperature T_m , e.g., 50 % formamide, 5x or 6x SCC. SCC is a 0.15 M NaCl, 0.015 M Na-citrate).

The nucleic acid primers or probes used in the above amplification and detection method may be assembled as a kit. Such a kit includes consensus primers and molecular probes. A preferred kit also includes the components necessary to determine if amplification has occurred. The kit may also include, for example, PCR buffers and enzymes; positive control sequences, reaction control primers; and instructions for amplifying and detecting the specific sequences.

In a particular embodiment, the methods of the invention comprise the steps of providing total RNAs extracted from cumulus cells and subjecting the RNAs to amplification and hybridization to specific probes, more particularly by means of a quantitative or semi-quantitative RT-PCR.

In another preferred embodiment, the expression level is determined by DNA chip analysis. Such DNA chip or nucleic acid microarray consists of different nucleic acid probes that are chemically attached to a substrate, which can be a microchip, a glass slide or a microsphere-sized bead. A microchip may be constituted of polymers, plastics, resins, polysaccharides, silica or silica-based materials, carbon, metals, inorganic glasses, or nitrocellulose. Probes comprise nucleic acids such as cDNAs or oligonucleotides that may be about 10 to about 60 base pairs. To determine the expression level, a sample from a test subject, optionally first subjected to a reverse transcription, is labelled and contacted with the microarray in hybridization conditions, leading to the formation of complexes between target nucleic acids that are complementary to probe sequences attached to the microarray surface. The labelled hybridized complexes are then detected and can be quantified or semi-quantified. Labelling may be achieved by various methods, e.g. by using radioactive or fluorescent labelling. Many variants of the microarray hybridization technology are available to the man skilled in the art (see e.g. the review by Hoheisel, *Nature Reviews, Genetics*, 2006, 7:200-210).

Expression level of a gene may be expressed as absolute expression level or normalized expression level. Typically, expression levels are normalized by correcting the absolute expression level of a gene by comparing its expression to the expression of a gene that is not a relevant for determining the cancer stage of the patient, e.g., a housekeeping gene that is constitutively expressed. Suitable genes for normalization include housekeeping genes such as the actin gene ACTB, ribosomal 18S gene, GUSB, PGK1 and TFRC. This normalization allows the comparison of the expression level in one sample, e.g., a patient sample, to another sample, or between samples from different sources.

In another embodiment, detection of mutations or gene copy-number amplification related to the $\beta 8$ integrin gene or RNA of patients can be performed. Several techniques can be used like PCR, sequencing methods (Sanger, pyrosequencing, next generation sequencing (NGS) of targeted regions or whole genome). These techniques can be used to find altered $\beta 8$ integrin in patient glioblastoma. Gene Copy Number can also be used to find amplifications or deletions of one or several exons of the $\beta 8$ integrin gene or of the total gene leading to protein inactivation or overexpression which may appear in glioblastoma. In this way, techniques like qPCR, MLPA, specific hybridization (FISH, CISH...) and NGS can be used.

The present invention also relates to $\beta 8$ integrin gene or protein as a biomarker for the diagnosis of resistant glioblastoma.

Another object of the invention relates to a method for treating resistant glioblastoma comprising the steps of i) determining the level expression of the marker $\beta 8$ integrin in a tumor sample obtained from a patient, ii) comparing the expression levels determined at step i) with predetermined reference values and iii) administering the subject a therapeutically effective amount of a compound which is an antagonist of $\beta 8$ integrin or an inhibitor of the expression of $\beta 8$ integrin as described above when the levels determined at step i) is higher than its predetermined reference value.

The invention will be further illustrated by the following figures and examples. However, these examples and figures should not be interpreted in any way as limiting the scope of the present invention.

FIGURES:

Figure 1: $\beta 8$ integrin (ITG $\beta 8$) is overexpressed in GSC compared to GBM differentiated cells. GSC-enriched neurosphere (NS) cell lines isolated from 10 patient tumors were maintained in stem cell medium or allowed to differentiate as adherent GBM cells for 15 days in FCS-enriched medium. (A) Real-time Quantitative PCR (qPCR) analysis of the ITG $\beta 8$ expression in NS cells and in FCS-differentiated GBM cells. Shown are the fold inductions expressed as means \pm SEM of at least four independent experiments. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ compared with the related FCS condition. (B) Western-blot analysis of the ITG $\beta 8$ expression in NS cells and in FCS-differentiated cells in comparison with the classic stem (Olig2, Sox2) and differentiation (TUJ1) markers. Equal gel loading and transfer efficiency were checked with anti-actin antibody. Blots were representative of at least three independent experiments in 3 patient cell lines (A, B and C). (C) Immunofluorescence analysis performed by FACS for membrane ITG $\beta 8$ expression. The SFI (Specific Fluorescence Index) allowed to evaluate the marker expression level (see Material and Methods). Results are expressed as the means \pm SEM of at least five independent experiments. * $P < 0.05$ compared with the related FCS condition. For each patient cell line (A, B and C), representative FACS plot overlays were depicted.

Figure 2: ITG $\beta 8$ is efficiently downregulated in GSC by specific shRNA targeting. GSC-enriched NS cells isolated from two patient tumors (B and C) were transfected or not (NT) for 4 days with two different ITG $\beta 8$ -targeting shRNA (shB8-1 and -4) or with a negative control shRNA (shCTR). ITG $\beta 8$ expression levels were then analyzed in NS cells at the mRNA or protein level either by (A) qPCR or (B) FACS immunofluorescence, respectively. Results are expressed as the means \pm SEM of at least four independent experiments. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ compared with the related shCTR condition.

Figure 3: shRNA-mediated ITG $\beta 8$ knock-down impairs GSC stemness and viability. GSC (B and C cell lines) were transfected or not (NT) with two different ITG $\beta 8$ -targeting shRNA (shB8-1 and -4) or with a negative control shRNA (shCTR). (A) 4 days after transfection, GSC were subjected to a FACS sorting of either GFP+/ITGB8+ or GFP+/ITGB8- GSC for the shCTR or the shB8 conditions, respectively. These sorted GSC were immediately plated in 96-well plates at different low cell densities to study their ability to generate primary NS through limiting dilution assays. (B) A similar limiting dilution assay was performed in B cell line to assess the secondary NS forming ability of transfected GSC after selection of the shRNA-positive cells by G418 during at least 20 days. Results (A-B) are expressed as the means \pm SEM of at least three independent experiments. * $P < 0.05$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with the related shCTR condition. (C-D) 7 days after transfection, GSC were subjected to subG1 analysis by FACS (C) or to Caspase 3-7 activity assay (D) in order to determine the percentage of non-viable cells or apoptosis, respectively. (E) mRNA of transfected GSC were extracted 4 days post-transfection to perform qPCR analysis of the expression of two stem (Olig2) and differentiation (TUJ1) markers. (F) These transfected cells were processed by FACS 4 days after transfection to analyze the percentage of the GSC population (see Material and Methods). Results (C-F) are expressed as the means \pm SEM of at least three independent experiments. * $P < 0.05$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 4: siRNA-mediated ITG $\beta 8$ knock-down impairs GSC stemness and induced apoptosis. GSC (B and C cell lines) were transfected or not (NT) with an ITG $\beta 8$ -targeting siRNA (siB8-6) or with a negative control siRNA (siCTR). (A) 4 days after transfection, ITG $\beta 8$ and Nestin expression levels were then analysed in NS cells at the mRNA level by qPCR. (B) 4 days after transfection, GSC were subjected to Caspase-8 activity assay in order

to analyse the pro-apoptotic process. Results (A-B) are expressed as the means \pm SEM of at least three independent experiments. *P < 0.05, ***P < 0.001.

Figure 5: shRNA-mediated ITG β 8 knock-down radiosensitizes the GSC population. GSC (B and C cell lines) were transfected with two different ITG β 8-targeting shRNA (shB8-1 and -4) or with a negative control shRNA (shCTR) and then selected by G418 during at least 20 days. These established stable NS cell lines were then dissociated and irradiated by the indicated dose of ionizing radiations. (A-B) 4 days after irradiation (5 Gy), cells were subjected to either subG1 analysis (A) or AnnexinV (AV) - Propidium Iodide (PI) double staining by FACS in order to determine the percentage of non-viable cells or apoptotic cells, respectively. (B) Prior to irradiation, parental (NT) or stably transfected NS were dissociated and plated in 96-well-plates (500 cells/well) in order to determine the surviving fraction by clonogenic assay. Cells were kept in culture during 10 days and the number of surviving NS clones were determined by microscopy. Results (A-B) are expressed as the means \pm SEM of at least three independent experiments. *P < 0.05. **P < 0.01 compared with the related shCTR condition.

EXAMPLE:

Material & Methods

Human tumor collection

The study was conducted on newly diagnosed GBM tumor samples isolated from 8 different patients to establish 10 primary neurosphere (NS) cell lines. These samples were all obtained after written informed consent from patients admitted to the Neurosurgery Department at Toulouse University Hospital and processed in accordance with the Institution's Human research Ethics Committee. Tumors used in this study were histologically diagnosed as grade IV astrocytoma according to the WHO criteria.

Cell culture

The GBM samples were processed as described by Dahan et al in order to obtain the corresponding primary neurosphere (NS) cell lines shown to be enriched in GSC. Neurosphere GSC lines were maintained in DMEM-F12 (Lonza) supplemented with B27 and N2 (Invitrogen), 25 ng/ml of FGF-2 and EGF (Peprotech) at 37°C in 5% CO₂ humidified incubators. All GSC lines were used for the experiments in this Stem Cell Medium between the 2nd and 12th passages in order to avoid any stem cell characteristic loss. Forced differentiation was performed according to previous published protocol adapted as follows. Briefly, the dissociated NS cells were cultured and plated as adherent monolayer (7.5×10^3 cells/cm²) in DMEM-F12 only supplemented with 10% FCS (FCS medium) for at least 15 days to insure an optimum differentiation.

Quantitative real-time RT-PCR

Total RNA was isolated either from primary NS, FCS-differentiated cells or from NS cells after transfection using RNeasy kit (Qiagen) and then reverse-transcribed using iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad). Real-time qPCR reactions were carried out using Evagreen dye and ABI-Stepone+ Detection System (Applied Biosystems). GAPDH was used as endogenous control in the $\Delta\Delta C_t$ analysis. Amplification folds were measured by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. Different primers (Eurogentec) were used in this study.

Western blotting

Cells were lysed in RIPA buffer complemented with cocktails of protease and phosphatase inhibitors (Sigma). 25µg of proteins were then separated on a 10% or 12.5% SDS-PAGE, electroblotted onto PVDF membranes (Amersham), which were blocked with 10% milk. The primary antibodies used for this study are listed in Table 1.

PROTEIN	Primary Antibody
Actin (<i>Human</i>)	Mouse anti-Actin (MAB1501, 1/10000, Millipore)
ITGβ8 (<i>Human</i>)	Rabbit anti-ITGβ8 (ab80673, 1/1000, Abcam)
Olig2 (<i>Human</i>)	Rabbit anti-Olig2 (AB9610, 1/2500, Millipore)
Sox2 (<i>Human</i>)	Rabbit anti-Sox2 (ab92494, 1/1000, Abcam)
TUJ1 (<i>Human</i>)	Mouse anti-TUJ1 (MAB1637, 1/1000, Millipore)

Table 1: Immunoblot antibodies.

Flow cytometry immunofluorescence assay

Direct immunofluorescence assay was performed by FACS as previously described. For all samples, 2×10^5 cells were incubated for 30 min in PBS with 10% BSA at 4°C to avoid nonspecific binding, and then incubated with appropriate APC-conjugated anti-ITGβ8

antibody (R&D, 1/20) for 40 min at 4°C. Fluorescence related to immunolabeling was measured using a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences). Each measurement was conducted on at least 7,000 events, acquired on CellQuest software (BD Biosciences) and analyzed with VenturiOne software (AppliedCytometry). To evaluate the marker expression, we determined the specific fluorescence index (SFI) using the mean fluorescence intensity (MFI). The SFI was calculated as previously described with the following formula $SFI = (MFI \text{ antibody} - MFI \text{ isotype control}) / MFI \text{ isotype control}$.

SubG1 and AnnexinV-PI double-staining analysis

Dead cells were quantified using FACS by determining the percentage of cells with subG1-DNA content. This subG1 population was analyzed after cell permeabilization and subsequent Propidium Iodide staining, as previously described. SubG1 measurements were conducted on at least 10,000 events, acquired on CellQuest software (BD Biosciences) and analyzed with VenturiOne software (Applied Cytometry). For AV/PI staining experiments, apoptosis and necrosis were quantified at the same time on non-permeabilised cells by flow cytometry with an Alexa Fluor 647-conjugated AV and PI kit, according to the manufacturer's protocol (Biovision).

shRNA and siRNA transfection

Neurospheres from 2 different patient cell lines (B and C) were dissociated and 7×10^5 cells per well were plated in 6 well-plates before being transfected using either Fugene HD (3/1 ratio, Promega) or RNAiMax (Invitrogen) for shRNA or siRNA, respectively. Two different shRNA sequences and one siRNA sequence targeting ITG β 8 (sh β 8-1 and -4 and si β 8-6, Qiagen) were used to specifically knock-down ITG β 8 expression in GSC (Table 2). Off-target shRNA (shCTR, Qiagen) or siRNA (siCTR, Qiagen) were used as negative controls. ShRNA were either coupled to a GFP-reporter gene or to a Neomycin-resistance gene for short-term transfection or stable selection in G418 (1 mg/mL, 20 days, Merck), respectively. Medium replacement was done 24h after transfection in order to avoid any unspecific toxicity.

Name	Target	Reporter or Resistance	Sequence	SEQ ID
shCTR	Off-target	GFP or Neomycin	GGAATCTCATTTCGATGCATAC	SEQ ID N°: 1
sh β 8-1	ITG β 8	GFP or Neomycin	CCAAGCTACTTGAGAATATTT	SEQ ID N°: 2
sh β 8-4	ITG β 8	GFP or Neomycin	TCTCGCTCTTGATAGCAAATT	SEQ ID N°: 3
Si β 8-5	ITG β 8		AACGTCTATGTCAAATCGACA	SEQ ID N°: 4
Si β 8-6	ITG β 8		CAGCCTGTTTGCAGTGGTCGA	SEQ ID N°: 5

Table 2: shRNA and siRNA sequences.

GSC gating and sorting by FACS

In order to discriminate by FACS the GSC population from the more differentiated population, both present among the NS cells, we adapted a previously published protocol. Briefly, NS cells were dissociated and 2×10^5 cells were analyzed by flow cytometry. The percentages of each population were subsequently quantified according to their specific FSC/SSC patterns. Prior to this, a pre-gating was performed to avoid cell debris in the analysis.

For the measurement of the NS formation capacity by limiting dilution assay, cells were transfected for 4 days with GFP-coupled shRNA (shB8-1/-4 or shCTR) before being sorted by FACS (Beckman MoFlo Astrios). This sorting was performed on the GSC population present within the NS cells and was designed to only sort the GFP-positive cells with normal (for shCTR condition) or negative (for shB8-1/-4 conditions) expression for ITG β 8. Cells were then collected and plated for limiting dilution assay.

Neurosphere formation assays

Cells obtained after GFP-coupled shRNA transfection were sorted by FACS as described above and immediately plated in 96-well plates at different low cellular densities (1 to 500 cells/well) in order to assess their ability to generate primary NS through limiting dilution assays. After 15 days, the generated NS were counted by microscopy in each well.

When cells were transfected by shRNA vectors carrying the Neomycin-resistance gene, cells were treated 4 days after transfection by G418 during at least 20 days in order to select the positive clones, capable of forming NS during the selection process. These NS cells were then dissociated and plated in 96-well plates to perform similar limiting dilution assays and measure their ability to generate secondary NS.

Caspase assays

Neurosphere cells obtained after transfection and indicated treatment were processed according to the manufacturer instructions to be analyzed through Caspase-Glo 8 or Caspase-Glo 3/7 assays (Promega) in order to measure respectively the activity of the extrinsic apoptotic pathway (initiative caspase-8) and the activity of effective caspases-3/7. The assays were read using a luminometer (FluoStar, Optima).

Irradiation

The stable NS clones selected in G418 (shB8-1/-4 or shCTR) were subjected or not to different doses of irradiation (Gamma-cell Exactor 40, Nordion) in order to evaluate the radiosensitizing effect of ITG β 8 knock-down in GSC through subG1 analysis and clonogenic assays.

Clonogenic assays

Prior to irradiation, parental or stably transfected NS (shB8 or shCTR clones) were dissociated and plated in 96-well-plates (500 cells/well) in order to determine the surviving fraction by clonogenic assay. Cells were then irradiated or not with increasing doses of ionizing radiations (0 to 10 Gy) and kept in culture during 10 days. Finally, the number of surviving NS clones was determined by microscopy.

Statistical analysis

The results are presented as means \pm SEM of at least three independent experiments. Significant differences (*P < 0.05, **P < 0.01 and ***P < 0.001) were evaluated with the Student t-test. Log. Western-blot and FACS plots are representative of at least three different experiments.

Results

1. ITGβ8 overexpression in GSC compared to GBM differentiated cells

We screened by RT-qPCR the expression level of ITGβ8 mRNA in 10 different patient GSC cell lines, cultured as neurospheres (NS) in stem medium, compared to their differentiated counterparts, kept in FCS-enriched differentiation medium (Figure 1A). We observed that this integrin was significantly overexpressed in all GSC cell lines (1.5 to 3.5 fold according to the patient). Moreover, we confirmed on 3 patient cell lines that the protein level of ITGβ8 was also overexpressed in GSC-enriched NS in comparison with their differentiated counterparts. This overexpression was demonstrated in whole cell lysates, as shown by western-blot (Figure 1B), and at the membrane cell surface, as observed by flow cytometry (Figure 1C). In order to fully establish the preferential expression of this particular integrin in GSC, we additionally performed western-blot analysis of several stem (Olig2, Sox2) and differentiation (TUJ1) markers and confirmed that NS cells specifically expressed these stem markers and failed to express the neuronal marker TUJ1 (Figure 1B). We can conclude that ITGβ8 is selectively expressed at the membrane of glioblastoma stem-like cells and barely present in differentiated GBM cells.

2. ITGβ8 inhibition by shRNA or siRNA greatly alter GSC viability and stemness

We subsequently designed a shRNA-based strategy to selectively downregulate ITGβ8 in GSC in order to assess its functions in this subpopulation of undifferentiated cells. We used two different ITGβ8-targeting shRNA sequences (shB8-1 and -4) or a negative control shRNA (shCTR) and transfected NS-dissociated cells for 4 days. We observed in two different patient NS cell lines (B and C) that shB8-1 and -4 sequences potently inhibited the expression of ITGβ8 mRNA level (Figure 2A) and the presence of this integrin at the cell membrane surface (Figure 2B) in comparison with both the non-transfected (NT) or shCTR conditions. One of the main characteristic of cancer stem cells is their self-renewal ability in limiting dilution condition. We assessed this stemness-associated parameter by measuring the NS forming capacity of GSC at low cell density after ITGβ8-targeting. We demonstrated that GFP-coupled shB8-1 and -4 dramatically abrogated the NS forming capacity of ITGβ8-/GFP+ GSC compared to the ITGβ8+/GFP+ shCTR GSC in FACS-sorted cells from the B and C patient NS cell lines (Figure 3A). Moreover, transfection of the same shB8-1 and -4 sequences coupled to the neomycin-resistance gene and subsequent selection by G418 induced a similar drop in the NS generation ability at low density compared to the shCTR condition (Figure 3B).

This major alteration of the GSC *in vitro* self-renewal ability in response to ITGβ8 inhibition can be mediated by several causes such as viability loss. We notably observed that ITGβ8-targeting by shB8-1 and -4 induced 7 days after transfection a significant increase of the subG1 cell population in NS compared to NT and shCTR conditions (Figure 3C), which may be associated with the induction of a pro-apoptotic mechanism in transfected ITGβ8-negative GSC. This apoptotic process in response to ITGβ8 downregulation was confirmed by the increase in caspase 3/7 activities in 3 different patient GSC cell lines (Figure 3D). In addition, a decrease of the GSC self-renewal ability could also be linked to a weakening of their stem phenotype due to ITGβ8 knock-down. In that way, we demonstrated that shRNAs against ITGβ8 induce 4 days after transfection a significant decrease of the stem factor Olig2 and an increase of the TUJ1 differentiation marker at the mRNA level (Figure 3E). These variations in stem and differentiation marker expression were associated to a noticeable decrease of the GSC subpopulation within the NS structures in response to ITGβ8, as defined by flow cytometry analysis in B and C patient cell lines (Figure 3F). We repeated some of these experiments

through ITGB8 downregulation by siRNA (siB8-6) and we also showed in B and C cell lines that the mRNA level of this integrin was potently decreased 4 days after transfection (compared to siCTR). This siB8 was also able to downregulate the expression of Nestin mRNA (Figure 4A), a well-known GSC stem marker and to induce an increase in caspase-8 activity (Figure 4B). Altogether, these observations suggest that ITGβ8 knock-down may induce a differentiation process in GSC associated to an alteration of their stemness characteristics, such as self-renewal ability and stem markers, and to the induction of apoptotic cell death.

3. ITGβ8 inhibition by shRNA radiosensitizes the GSC population

GSC are, among the GBM cellular heterogeneity, one of the most radioresistant tumoral subpopulation. They were shown to resist to the deleterious effects of ionizing radiations (IR) by several mechanisms such as a better efficiency of DNA damage repair systems or a higher level of anti-apoptotic or pro-survival factors. However, the selective expression of particular integrins in GSC and their roles on GSC radioresistance, which are largely unknown in the literature, appeared to us of potential interest as part of a combined therapeutic approach. As a consequence, we then studied the combined effect of ITGβ8 inhibition by shRNA on GSC radioresistance. For that purpose, we submitted G418-selected shB8-1 and -4 clones (B and C cell lines) to a toxic IR dose of 5 Gy for 4 days and measured that ITGβ8-targeting significantly increased the level of subG1-positive cells (Figure 5A) and apoptotic AnnexinV-positive cells (Figure 5B), compared to the shCTR condition in response to IR. Moreover, to fully demonstrate the radiosensitizing effect of ITGβ8 downregulation in GSC, we performed clonogenic assays at low density in 96 well plates and measured the NS generation potential of shCTR or shB8 stably-transfected GSC (B and C patients) in response to increasing doses of IR (up to 10 Gy). As depicted in Figure 5C, we observed that the shRNA-mediated invalidation of ITGβ8 induced a significant decrease in the NS surviving fraction in response to IR (6 to 10 Gy) in comparison with shCTR cells or non-transfected NT cells.

Altogether, these results demonstrate that (i) ITGβ8 is specifically expressed by GSC compared to more differentiated GBM cells, (ii) this integrin could mediate in GSC a pro-survival signal associated to the maintenance of a stem phenotype and (iii) the specific inhibition of this GSC-specific target could radiosensitize GBM-stem cells, known as a really radioresistant subpopulation in GBM able to favor the recurrence of these aggressive and invasive brain tumors.

REFERENCES:

Throughout this application, various references describe the state of the art to which this invention pertains. The disclosures of these references are hereby incorporated by reference into the present disclosure.

Cambier S, Gline S, Mu D, Collins R, Araya J, Dolganov G, Einheber S, Boudreau N, Nishimura SL. Integrin $\alpha(v)\beta_8$ -mediated activation of transforming growth factor- β by perivascular astrocytes: an angiogenic control switch. *Am J Pathol*. 2005 Jun;166(6):1883-94.

Cheng L, Bao S, Rich JN. Potential therapeutic implications of cancer stem cells in glioblastoma. *Biochem Pharmacol*. 2010 Sep 1;80(5):654-65. doi: 10.1016/j.bcp.2010.04.035. Epub 2010 May 10.

Dahan P et al. Ionizing radiations sustain glioblastoma cell dedifferentiation to a stem-like phenotype through survivin: possible involvement in Radioresistance. *Cell Death Disease*. 2014. 5, e1543.

Minagawa S et al. Selective targeting of TGF- β activation to treat fibroinflammatory airway disease. *Sci Transl Med*. 2014 Jun 18;6(241):241ra79. doi: 10.1126/scitranslmed.3008074.

Reyes SB1, Narayanan AS, Lee HS, Tchaicha JH, Aldape KD, Lang FF, Tolias KF, McCarty JH. $\alpha v\beta_8$ integrin interacts with RhoGDI1 to regulate Rac1 and Cdc42 activation and drive glioblastoma cell invasion. *Mol Biol Cell*. 2013 Feb;24(4):474-82. doi: 10.1091/mbc.E12-07-0521. Epub 2013 Jan 2.

Sheldrake HM1, Patterson LH. Strategies to inhibit tumor associated integrin receptors: rationale for dual and multi-antagonists. *J Med Chem*. 2014 Aug 14;57(15):6301-15.

Stupp R 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*. 2014 Sep;15(10):1100-8. doi: 10.1016/S1470-2045(14)70379-1. Epub 2014 Aug 19.

Thomas AA1, Omuro A. Current Role of Anti-Angiogenic Strategies for Glioblastoma. *Curr Treat Options Oncol*. 2014 Aug 31.

CLAIMS:

1. A compound which is an antagonist of $\beta 8$ integrin or an inhibitor of the expression of $\beta 8$ integrin for use in the treatment of resistant glioblastoma.
2. A i) compound according to claim 1 and ii) a radiotherapy, and iii) TMZ as a combined preparation for simultaneous, separate or sequential use in the treatment of resistant glioblastoma.
3. A i) compound according to claim 1 and ii) a chemotherapeutic agent, as a combined preparation for simultaneous, separate or sequential for use in the treatment of resistant glioblastoma.
4. A i) compound according to claim 1 and ii) a radiotherapy, and iii) a chemotherapeutic agent, as a combined preparation for simultaneous, separate or sequential for use in the treatment of resistant glioblastoma.
5. A i) compound according to claim 1 and ii) a radiotherapy, as a combined preparation for simultaneous, separate or sequential for use in the treatment of resistant glioblastoma.
6. A compound according to claim 1 or a combined preparation according to claims 2, 3, 4 or 5 wherein the compound is an antagonist of $\beta 8$ integrin.
7. A compound according to claim 6 or a combined preparation according to claim 6 wherein the antagonist is an antibody anti- $\beta 8$ integrin.
8. A pharmaceutical composition comprising an effective dose of an antagonist of $\beta 8$ integrin or an inhibitor of the $\beta 8$ integrin expression, for use in the treatment of resistant glioblastoma.
9. An ex vivo method for diagnosing resistant glioblastoma, comprising the step of determining the level expression of the marker $\beta 8$ integrin in a tumor sample obtained from a patient.

ABSTRACT OF THE INVENTION

NEW METHOD FOR TREATING RESISTANT GLIOBLASTOMA

The present invention relates to a compound which is an antagonist of $\beta 8$ integrin or an inhibitor of the expression of $\beta 8$ integrin for use in the treatment of resistant glioblastoma.

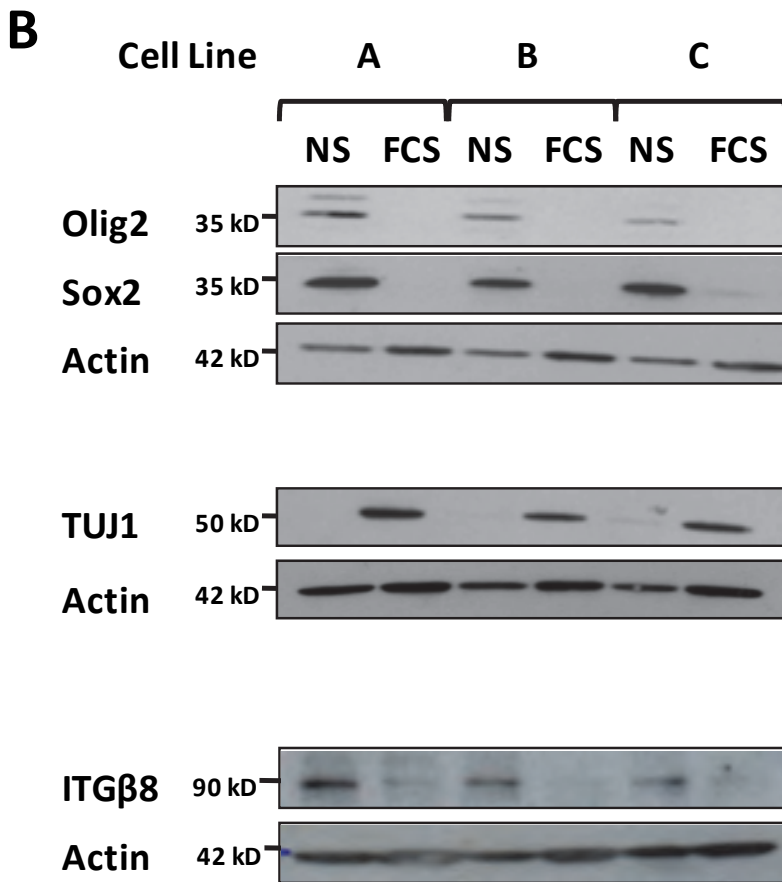
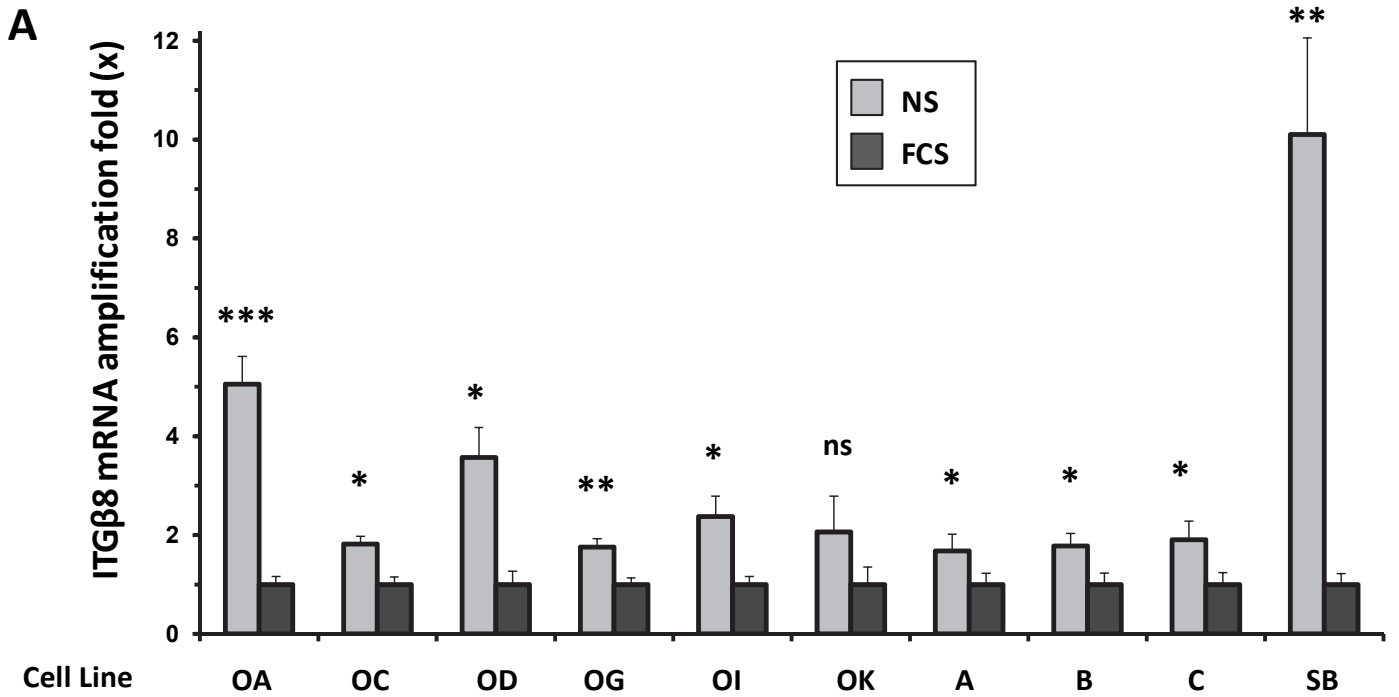


Figure 1 A and B

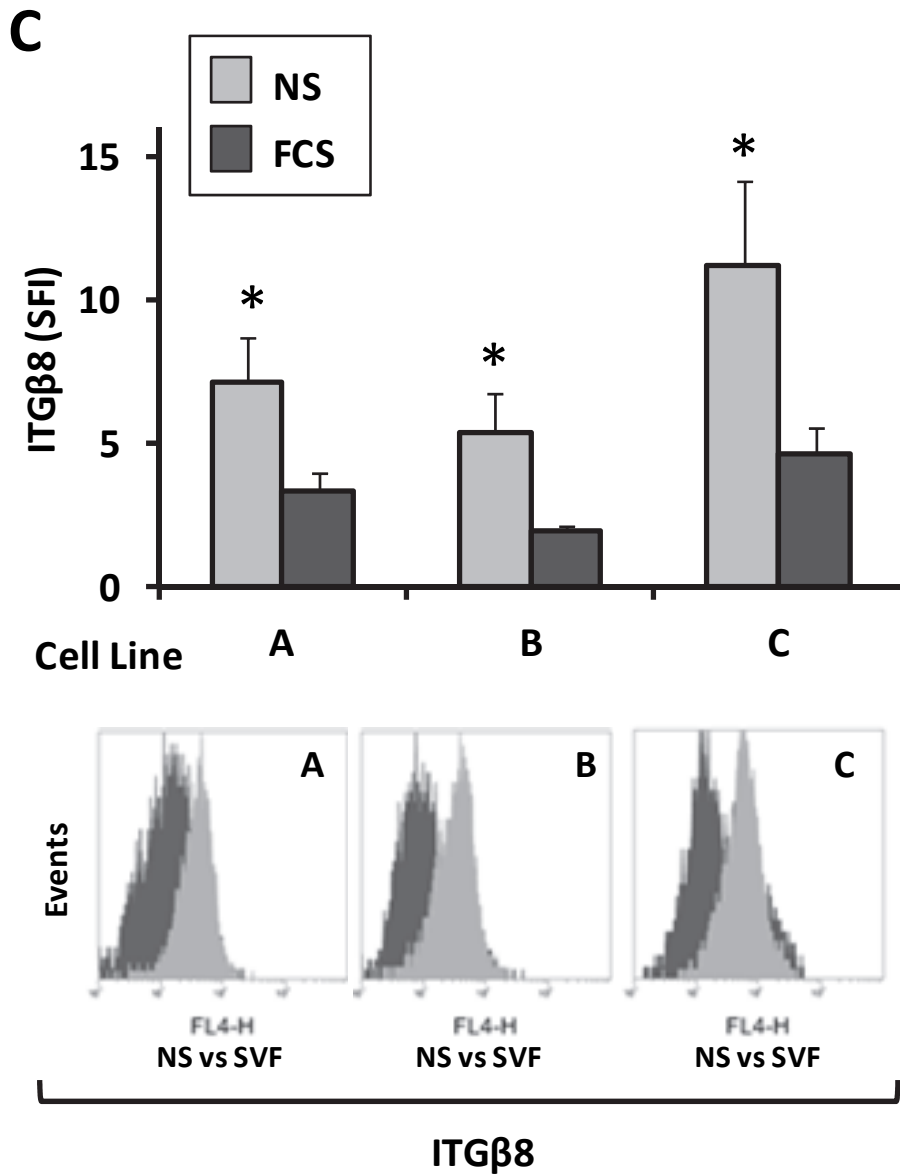


Figure 1 C

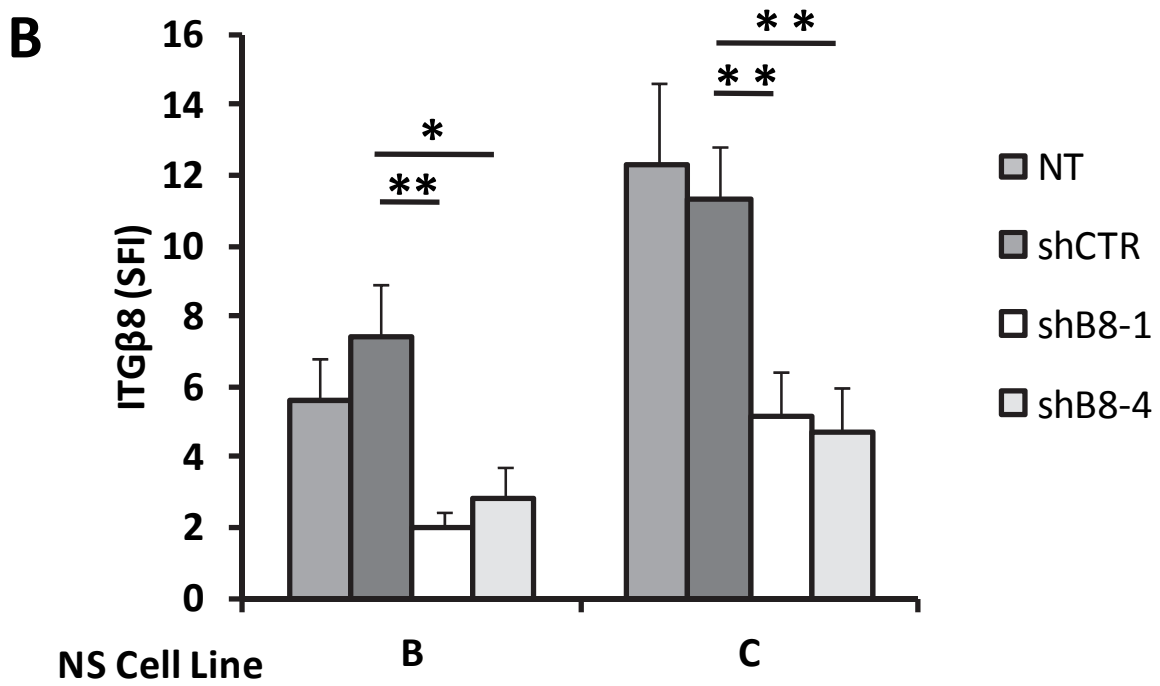
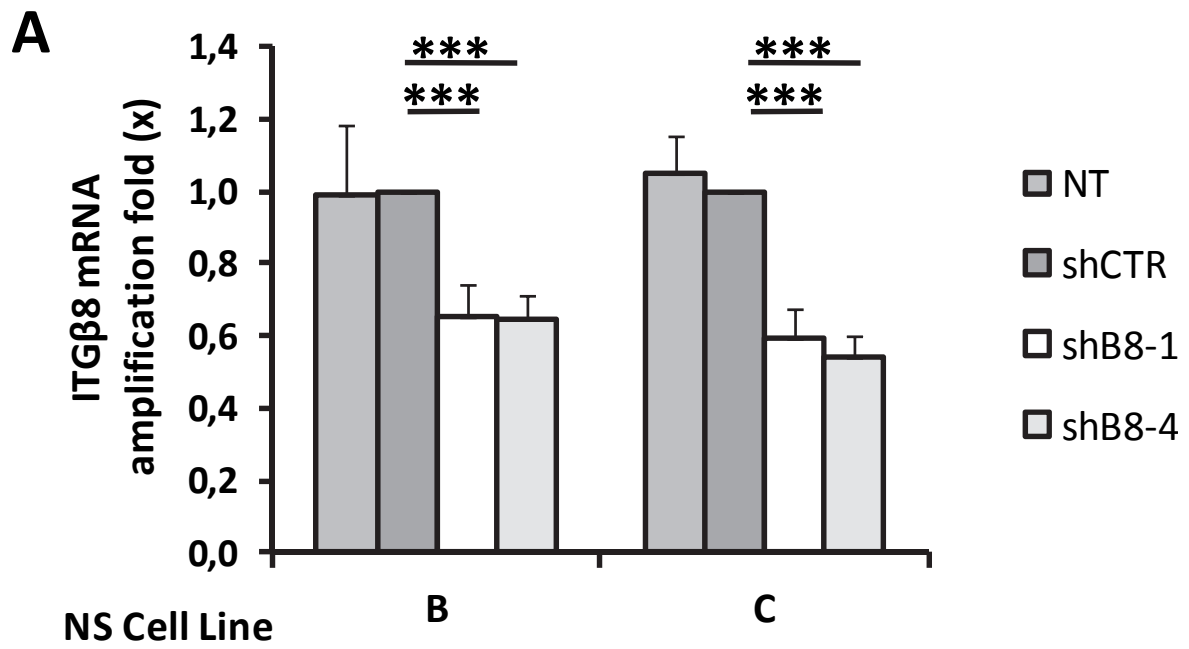


Figure 2 A and B

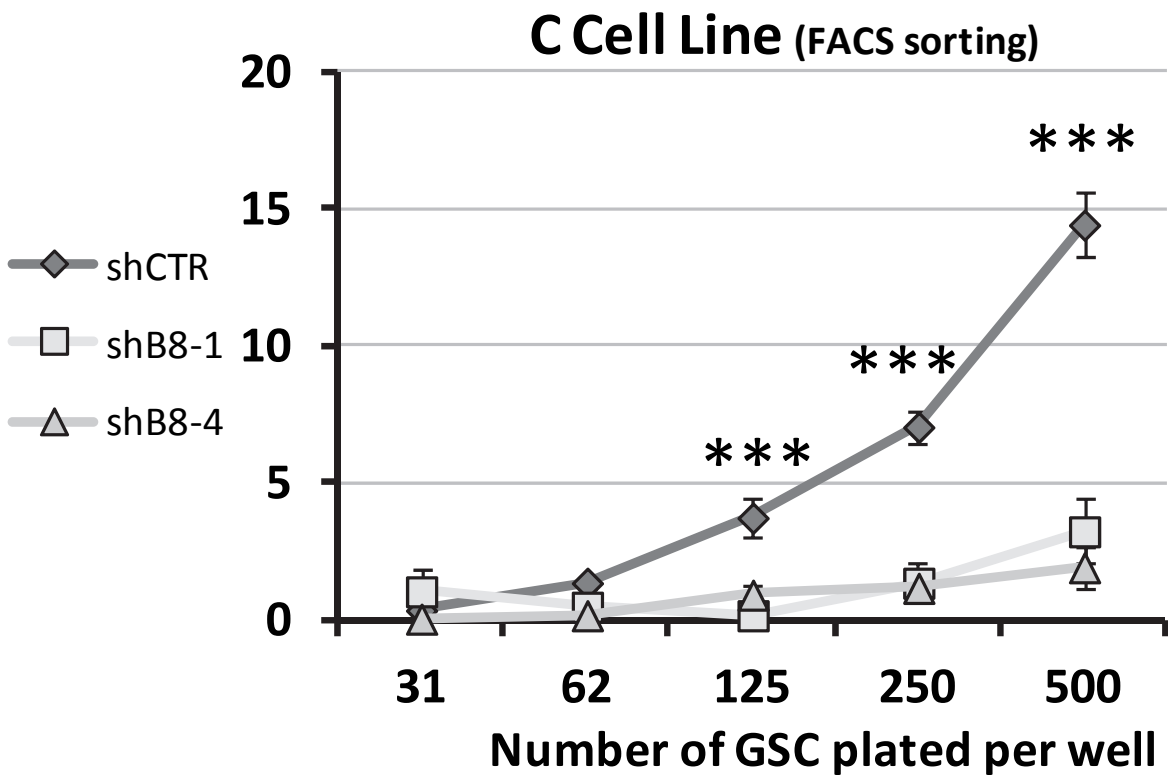
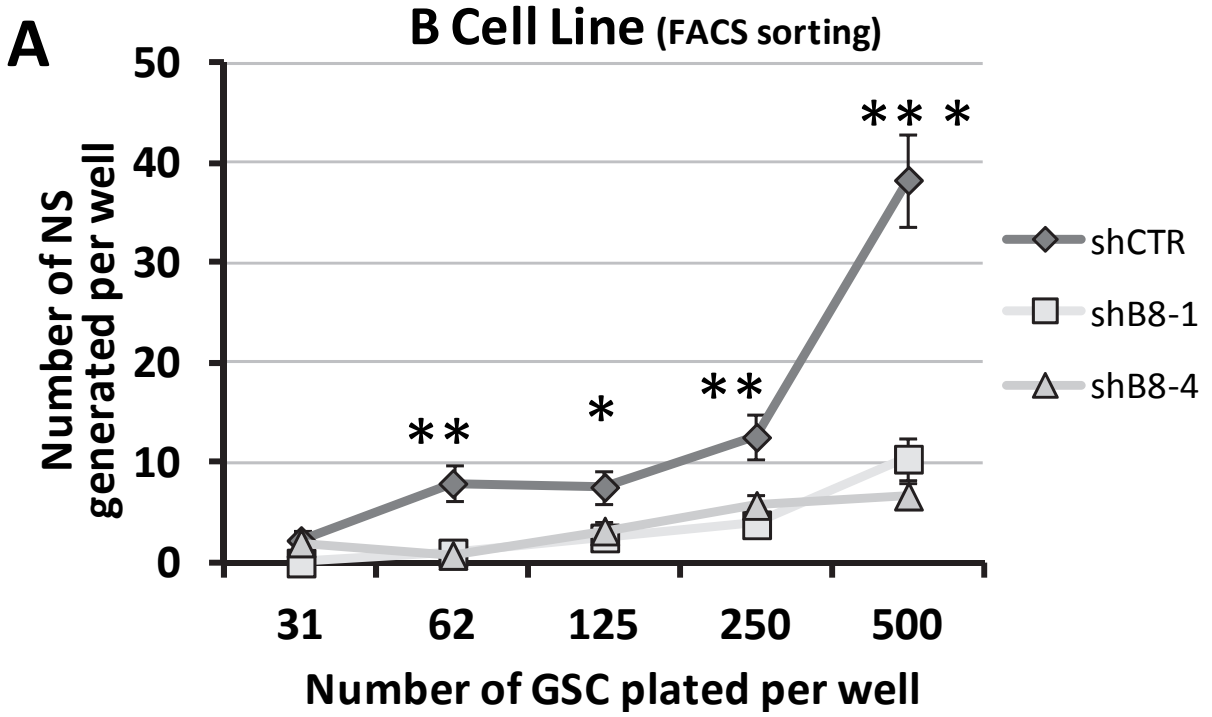


Figure 3 A

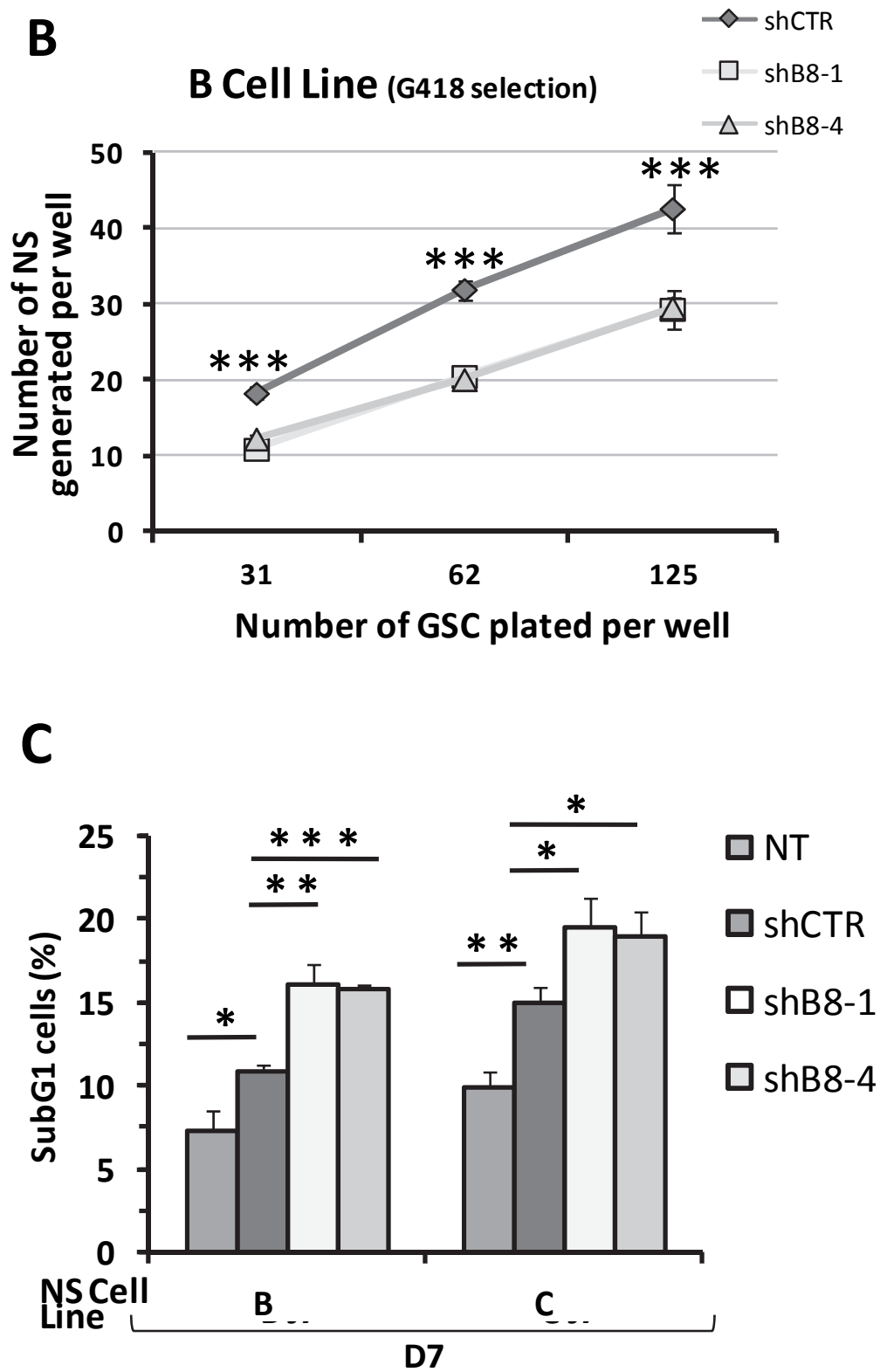


Figure 3 B and C

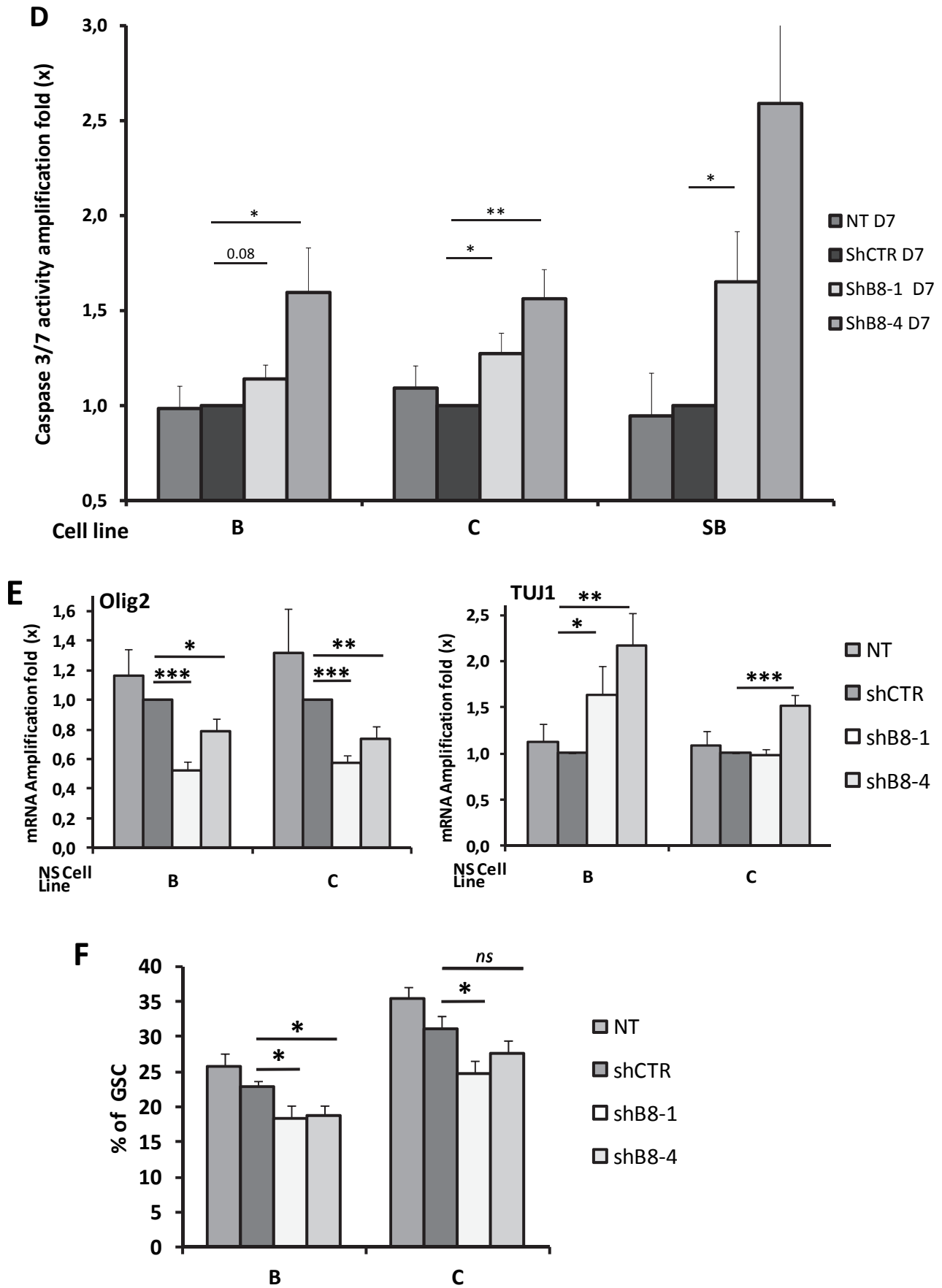


Figure 3 D, E and F

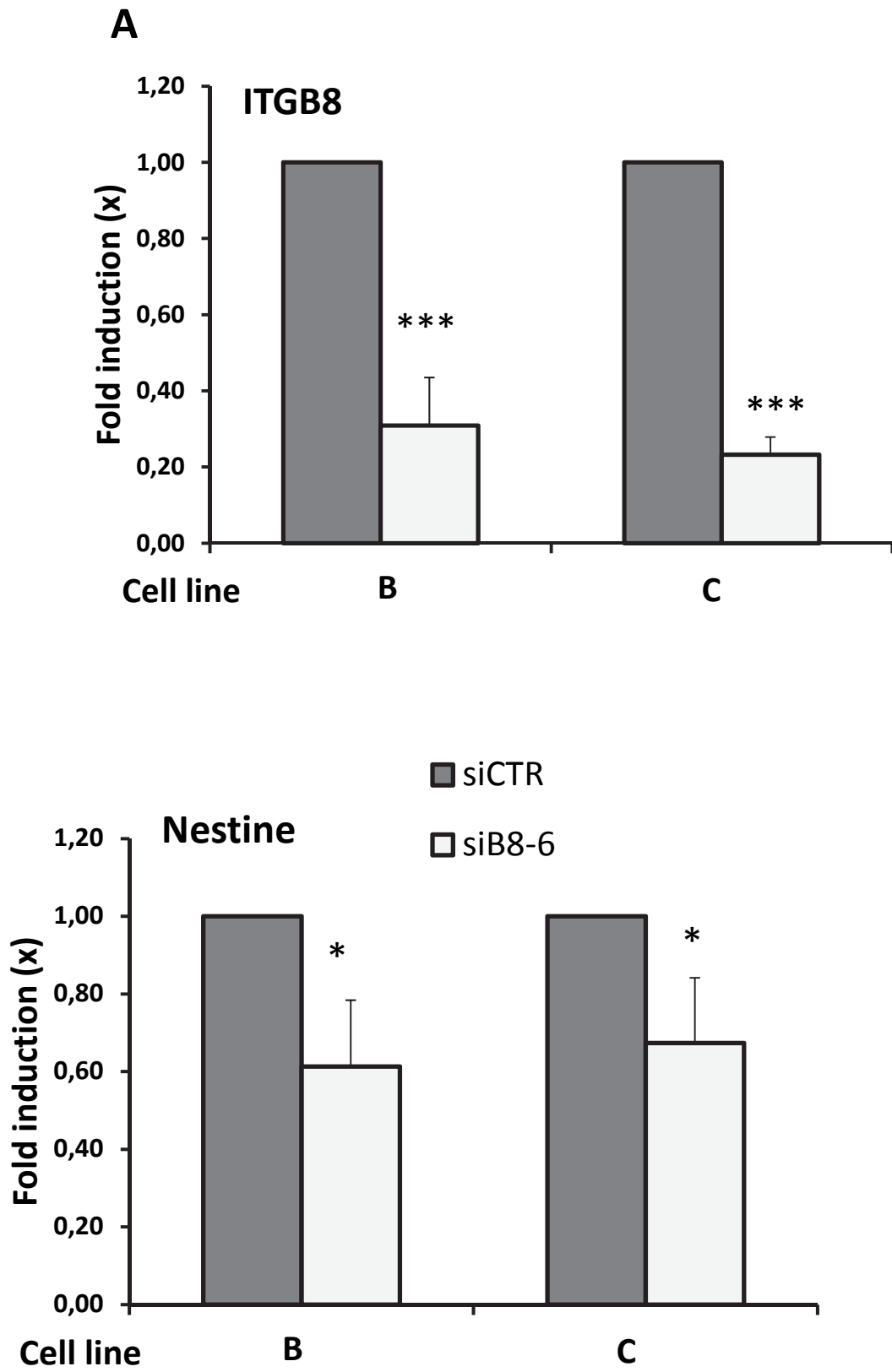


Figure 4A

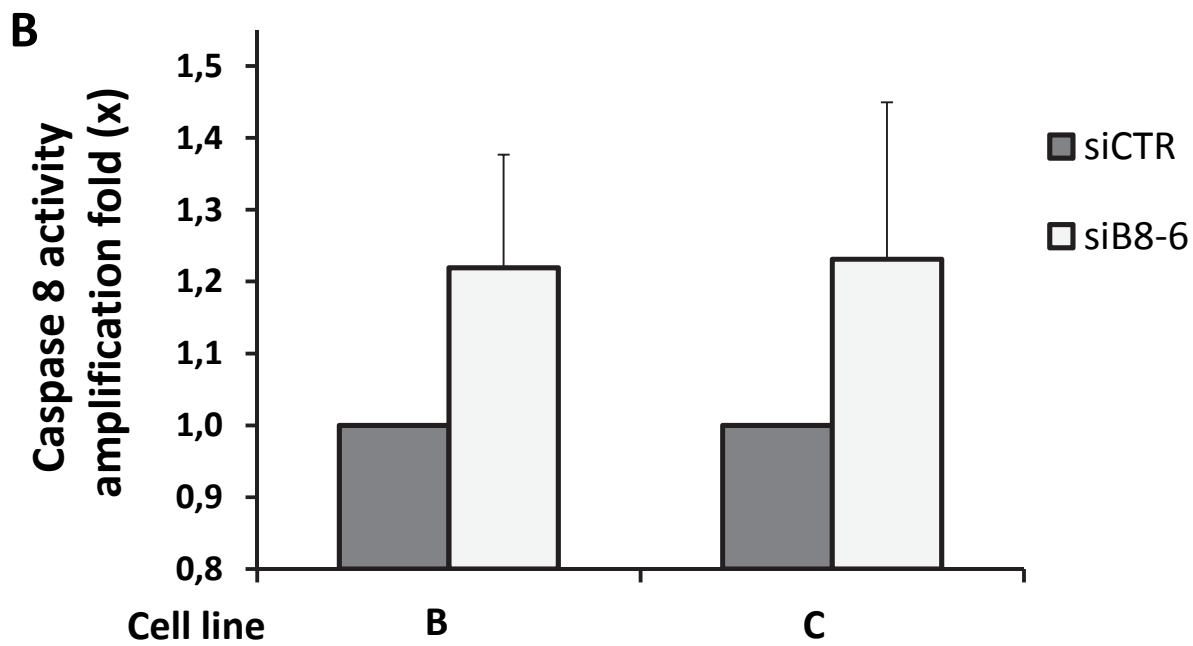


Figure 4B

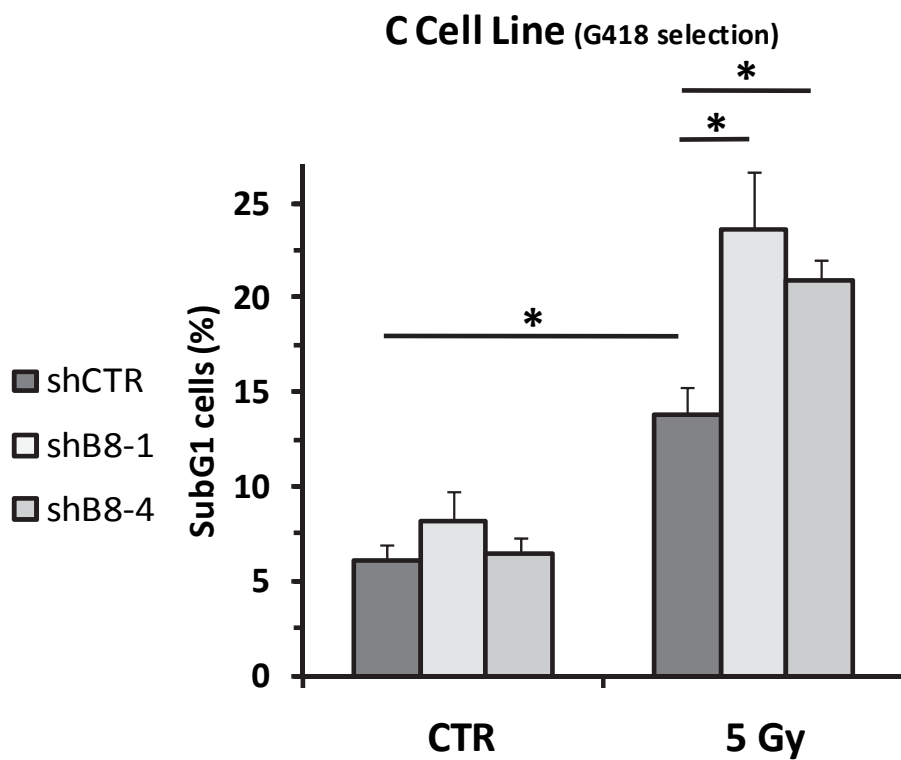
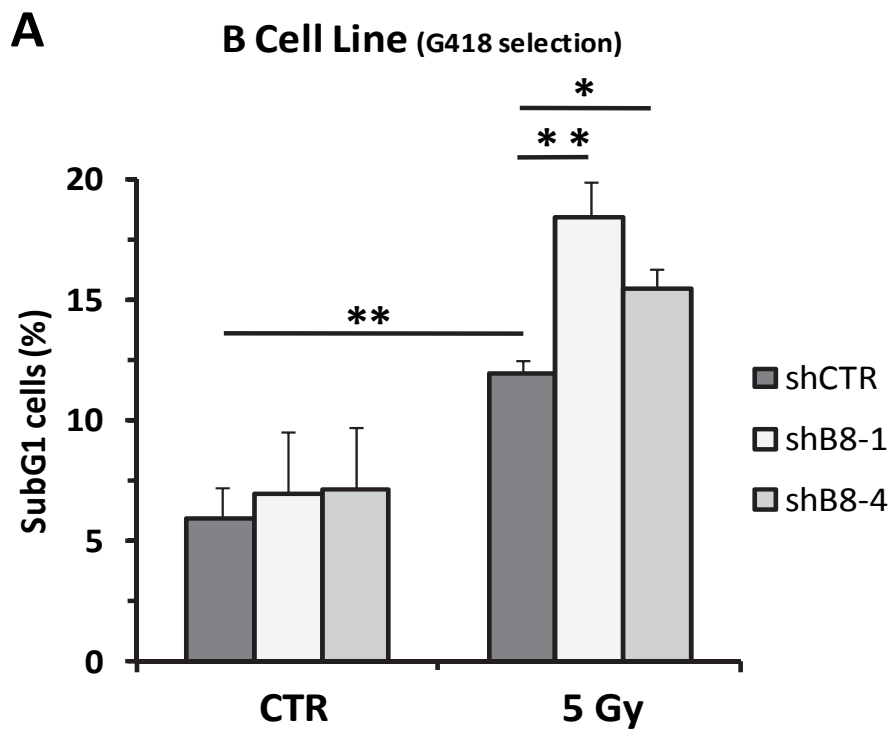


Figure 5 A

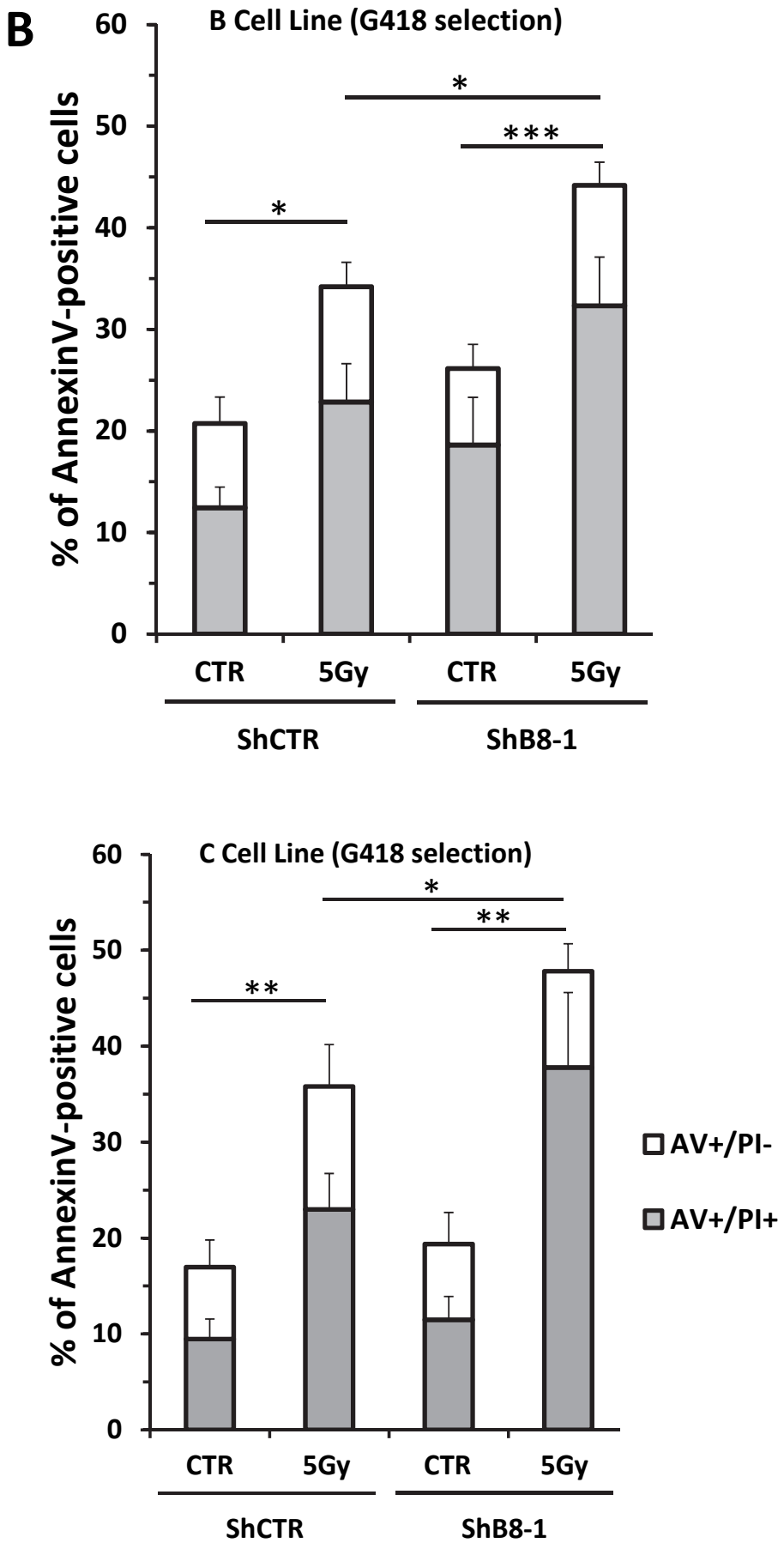


Figure 5 B

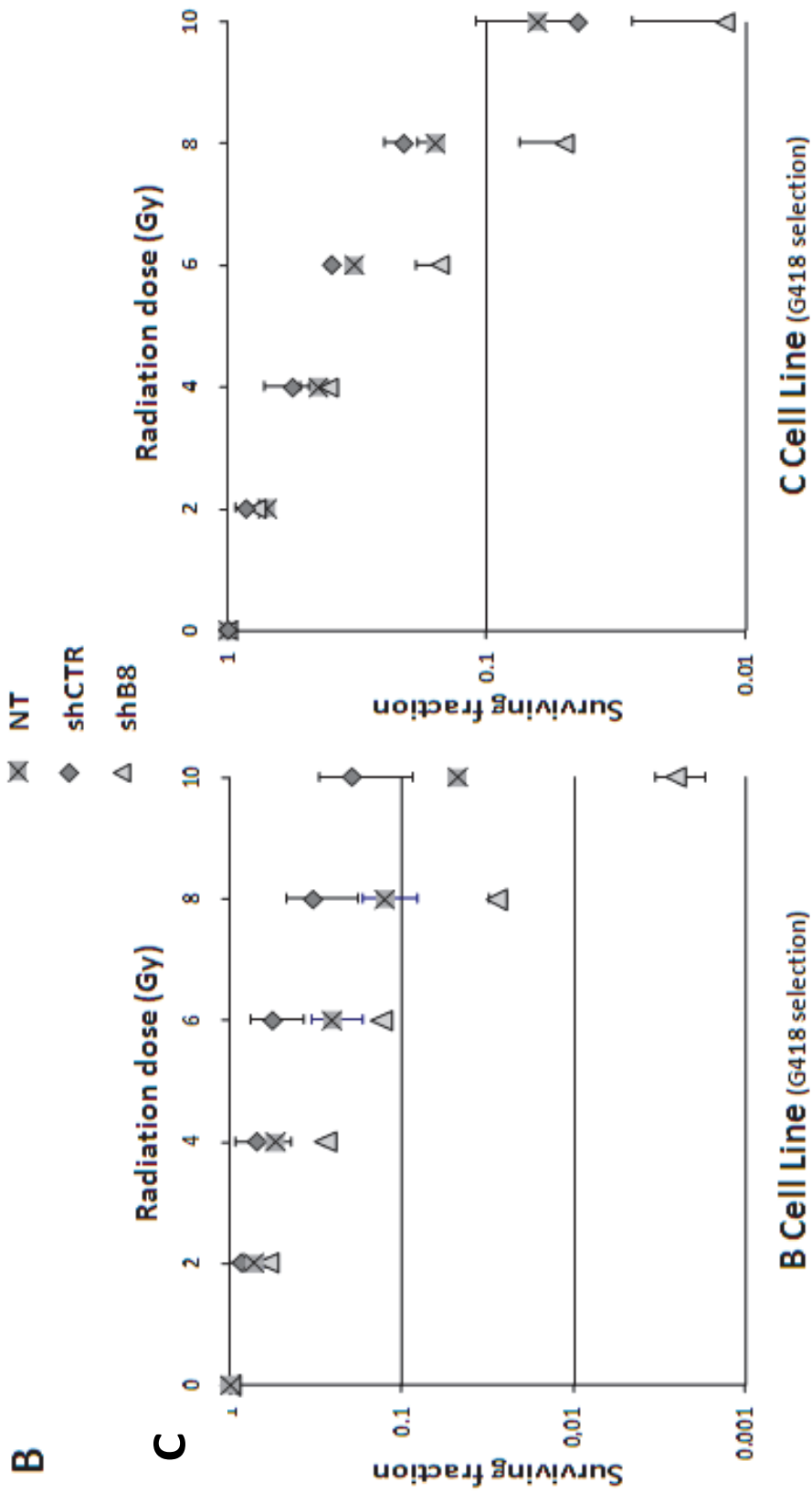


Figure 5C

Annexe 3 : Revue scientifique : Interest of integrins targeting in glioblastoma according to tumor heterogeneity and cancer stem cell paradigm: an update. **Malric L**, Monferran S, Gilhodes J, Boyrie S, Dahan P, Skuli N, Sesen J, Filleron T, Chauvel A, Toulas C, Cohen-Jonathan Moyal E, Lemarie A. *Oncotarget*. 2017.

**INTEREST OF INTEGRINS TARGETING IN GLIOBLASTOMA ACCORDING TO
TUMOR HETEROGENEITY AND CANCER STEM CELL PARADIGM: AN
UPDATE**

Laure Malric¹, Sylvie Monferran^{1,2}, Julia Gilhodes³, Sabrina Boyrie¹, Perrine Dahan¹, Nicolas Skuli^{1,4}, Julie Sesen¹, Thomas Filleron³, Aline Chauvel¹, Elizabeth Cohen-Jonathan Moyal^{1,5},
Christine Toulas^{1,6} and Anthony Lemarié^{1,2,*}.

¹ INSERM U1037, Center for Cancer Research of Toulouse, Toulouse, France.

² Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, France.

³ Department of Biostatistics, IUCT-Oncopole, Toulouse, France.

⁴ Department of Neurosurgery, Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland, USA.

⁵ Department of Radiotherapy, IUCT-Oncopole, Toulouse, France.

⁶ Laboratory of Oncogenetic, IUCT-Oncopole, Toulouse, France.

Interest of integrins targeting in glioblastoma according to tumor heterogeneity and cancer stem cell paradigm: an update

Laure Malric¹, Sylvie Monferran^{1,2}, Julia Gilhodes³, Sabrina Boyrie¹, Perrine Dahan¹, Nicolas Skuli^{1,4}, Julie Sesen¹, Thomas Filleron³, Aline Kowalski-Chauvel¹, Elizabeth Cohen-Jonathan Moyal^{1,5}, Christine Toulas^{1,6} and Anthony Lemarié^{1,2}

¹INSERM U1037, Center for Cancer Research of Toulouse, Toulouse, France

²Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, France

³Department of Biostatistics, IUCT-Oncopole, Toulouse, France

⁴Department of Neurosurgery, Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland, USA

⁵Department of Radiotherapy, IUCT-Oncopole, Toulouse, France

⁶Laboratory of Oncogenetic, IUCT-Oncopole, Toulouse, France

Correspondence to: Anthony Lemarié, **email:** anthony.lemarie@inserm.fr

Keywords: glioblastoma, integrins, cancer stem cells, targeted therapy, clinical trials

Received: May 30, 2017

Accepted: July 23, 2017

Published: August 21, 2017

Copyright: Malric et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 3.0 (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

Glioblastomas are malignant brain tumors with dismal prognosis despite standard treatment with surgery and radio/chemotherapy. These tumors are defined by an important cellular heterogeneity and notably contain a particular subpopulation of Glioblastoma-initiating cells, which recapitulate the heterogeneity of the original Glioblastoma. In order to classify these heterogeneous tumors, genomic profiling has also been undertaken to classify these heterogeneous tumors into several subtypes. Current research focuses on developing therapies, which could take into account this cellular and genomic heterogeneity. Among these targets, integrins are the subject of numerous studies since these extracellular matrix transmembrane receptors notably controls tumor invasion and progression. Moreover, some of these integrins are considered as membrane markers for the Glioblastoma-initiating cells subpopulation. We reviewed here integrin expression according to glioblastoma molecular subtypes and cell heterogeneity. We discussed their roles in glioblastoma invasion, angiogenesis, therapeutic resistance, stemness and microenvironment modulations, and provide an overview of clinical trials investigating integrins in glioblastomas. This review highlights that specific integrins could be identified as selective glioblastoma cells markers and that their targeting represents new diagnostic and/or therapeutic strategies.

INTRODUCTION

Glioblastoma

Glioblastomas (GB), classified by the World Health Organization as Grade IV-Diffuse Glioma [1], are the most frequent and lethal malignant primary adult brain tumor [2]. The current standard of care for newly diagnosed - or *de novo* - GB (~90–95% of GB) includes maximal surgical resection and fractionated radiotherapy

(30 × 2 Gy) with concomitant Temozolomide, also called the Stupp regimen [3]. However, prognosis remains extremely poor, with a median overall survival (OS) of 14–15 months [2]. A major molecular prognostic factor identified in GB is IDH1/2 mutations, a benefic prognosis factor that closely concerns secondary GB, which progress from low-grade diffuse astrocytoma or anaplastic astrocytoma (~5–10% of GB) [1]. Another well-identified prognosis factor is the methylation status of the O⁶-alkylguanine DNA methyltransferase (MGMT)

gene, encoding a DNA-repair enzyme for Temozolomide lesions. According to studies, ~35–45% of wild-type IDH GB present a *MGMT* promoter methylation, associated to a better prognosis [4]. Recent studies have also highlighted new prognosis factors in GB, such as *TERT* promoter mutations (~70–75% of *de novo* GB, worse prognosis factor), histone *H3F3A* K27 and G34 mutations (~5% of adult GB), *ATRX* mutations and a positive glioma-CpG island methylator phenotype (G-CIMP), a benefic prognosis factor closely associated to secondary IDH mutant GB [4, 5]. *TP53* mutations (observed in 27% and 81% of IDH-wild type and IDH-mutant GB, respectively [1]) and *EGFR* amplification (~40–50% of GB) and/or mutations, such as EGFR variant III, appear to be quite frequent in GB but do not seem to be associated to a worse outcome in GB patients [6]. Besides these molecular considerations, prompt relapses experienced by patients may be explained by the aggressiveness of GB, prone to invade surrounding brain tissue [2]. GB are also highly angiogenic, radio/chemoresistant and characterized by a strong cellular heterogeneity. Notably, a cancer cell subpopulation, called GB-initiating cells (GIC) or stem-like cells, appears to be particularly responsible for tumor maintenance and recurrence, as they can recapitulate the heterogeneity of the original brain tumor in orthotopically-xenografted nude mice [7].

GIC are characterized by their ability to self-renew *in vitro* (as neurosphere 3D structures) and *in vivo*, their marked expression of stem markers (CD133, Nestin, Olig2, Sox2, Nanog, BMI1, A2B5, ITGA6, L1CAM...), their multipotent aptitude to differentiate into neuronal, astrocytic or oligodendrocytic lineages, and a higher tumorigenic potential in orthotopically xenografted athymic nude mice [7]. Of note, it appears that the GIC subpopulation is strongly heterogeneous and could not be defined by the expression of an unique marker, but rather by a combination of markers. For example, it was previously shown that CD133-negative GB cells could also be identified as tumorigenic GIC [8]. Furthermore, GIC are particularly aggressive, invasive, radio/chemoresistant [7, 9] and display high autophagic capacities that may participate to these resistance processes [10]. GIC participate to angiogenesis via pro-angiogenic factor synthesis, cooperation with endothelial cells (EC), vasculogenesis by vasculogenic mimicry formation and transdifferentiation into pericytes or EC (for review [11]). GIC can also induce immunosuppression, notably via cytokines secretion [12]. Moreover, several signals and stresses, such as hypoxia [13], specific growth factors [14, 15], viral infections [16], chemotherapy [17] and ionizing radiations [9] contribute to the generation/amplification of GIC population from more differentiated GB cells, a process, which can evoke a possible cancer cell dedifferentiation or reprogramming [18]. Collectively these properties (Figure 1) suggest that targeting

GIC represents a therapeutic interest in GB. To this end, blockade of specific pathways identified in GIC maintenance and functions (Notch, Sonic Hedgehog/Wnt, Akt...) may be a valuable strategy [7], but could lack efficiency due to compensatory pathways. Another alternative to eradicate GIC could be the targeting of their niches. Actually, GIC preferentially reside in perivascular and necro/hypoxic niches where they closely interact with the microenvironment [19]. These interactions with microenvironment elements, like stromal cells or extracellular matrix (ECM) components, seem to be critical for GIC maintenance, notably through metabolic and/or epigenetic modifications [19, 20] and could constitute a putative target.

Integrins

Key components of the dialogue between cells and the microenvironment, integrins (ITG) are composed of two non-covalently associated α and β subunits, which are characterized by a large extracellular domain, a short transmembrane domain and a small intracellular non-catalytic cytoplasmic tail [21]. To date, 18 α and 8 β subunits have been identified in humans and form at least 24 unique heterodimers. Each α/β combination determines specific integrin binding ability and functions. Structural characteristics and ligands of these heterodimeric glycoproteins have already been reviewed [22] and are summarized in Figure 2. These receptors play a role in the regulation of cell adhesion to ECM proteins or cell surface proteins (immune cells, platelets...) [22]. They are central regulators, which act as transmembrane links between extracellular contacts and intracellular cytoskeleton via a bidirectional signalling. First, upon extracellular ligands binding, integrins cluster in the membrane and transduce intracellular signals through their cytoplasmic domain (mostly via β subunit) by activation of kinases (Focal Adhesion Kinase (FAK), Integrin-Linked Kinase (ILK)...) or Rho-GTPases. Integrins can then activate pathways leading to gene transcription to sustain proliferation, survival, differentiation and migration (outside-in signalling) [22, 23]. Second, cytoplasmic proteins can also modulate integrins extracellular affinity for their ligands (inside-out signalling). In addition, integrins also bind cytoskeleton proteins (α -actinin, tensin, vinculin, talin, paxillin, intermediate filaments...) and, then, are involved in structural cell functions. All these characteristics (Figure 2) may confer a high degree of complexity and flexibility in integrin-linked cell functions and signalling pathways, since several distinct integrins can be expressed on specific cells and, depending on context generate dramatically different responses. As a consequence, integrin-pathways alterations have also been linked to several pathologies, such as auto-immune and thrombotic diseases, ischemic brain injury, inflammation, fibrosis and cancer.

Integrins in cancer

Integrins are rarely mutated in tumors. They do not act as oncogenes but may cooperate with oncogenes to favor tumorigenesis, either by particular expression and/or localization in tumor cells compared to normal cells, by post-translational modifications or via integrin recycling. Indeed, in several cancers, modifications of the integrin pattern are often associated with tumor progression. For example, $\alpha 6\beta 4$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 6$, and $\alpha v\beta 3$ are upregulated in different tumor types, including GB [24, 25], and correlated with poor patient survival. However, integrin expression can also be decreased in tumors (e.g. $\alpha 2\beta 1$ in breast cancer, $\alpha 6\beta 4/\alpha 6\beta 1$ in esophageal carcinoma), but still in favor of cancer progression [23, 24]. Altered integrins expression has also been reported in different models of carcinogenesis induction [24]. Moreover, post-translational modifications (glycosylation/sialylation, citrullination and carbamylation) modulate integrin conformation, affinity and functions and play a role in cancer progression [26, 27]. Finally, increased integrin recycling is associated with invasive and metastatic processes in cancer cells [28].

All these modulations affect integrins functions. First they are involved in invasion (and metastasis) as they directly provide the traction necessary for cell migration (for review [24]). They also participate in ECM remodeling through protease regulation and localization at migration front. Subsequently, integrins regulate tumor cell proliferation and survival through ECM-direct binding and/or intracellular signalling [24]. Furthermore, integrins interact and crosstalk with other cell surface receptors, like growth factor receptors (for review [29]). Finally, integrins are expressed by various tumor microenvironment cells (EC, pericytes, fibroblasts, immune cells, platelets...) and allow cell interactions to promote tumorigenesis. Integrin involvement in angiogenesis is particularly well described [30], as well as their role in epithelial to mesenchymal transition (EMT) which often mediates the acquisition of a migratory and/or invasive phenotype in cancer cells. Even if GB cannot be considered as tumors of epithelial origin, EMT can occur in response to treatment [31]. For example, $\alpha 5\beta 1$ integrin was shown to mediate EMT in GB cells [32]. Consequently, integrins contribute to cancer progression and future studies have to identify the roles of these regulators precisely.

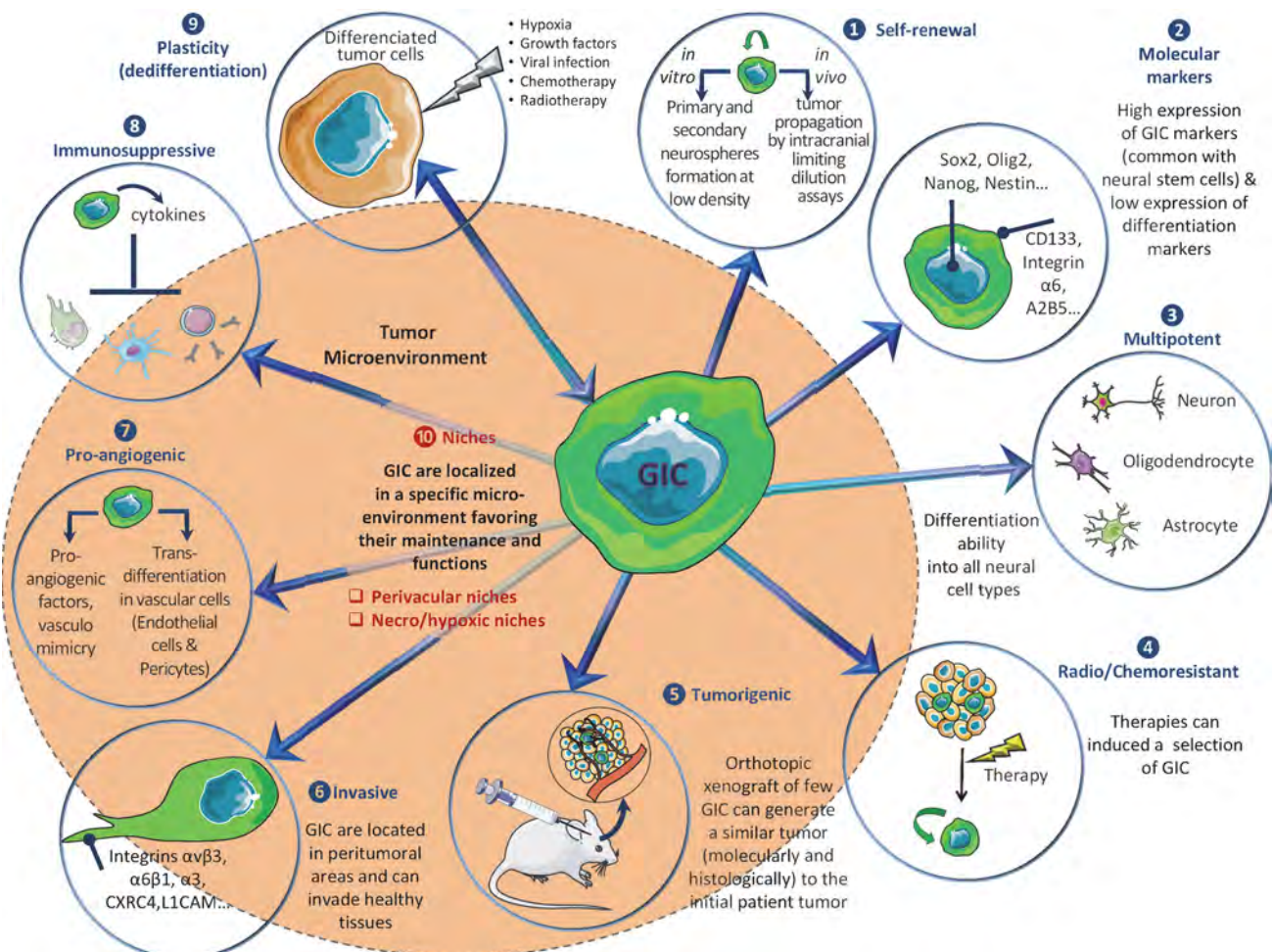


Figure 1: Overview of main GIC properties.

Due to their involvement in tumor cell functions, their crosstalk with numerous pathways and their localization at the cell membrane, integrins represent promising targets for cancer treatment. Consequently, different integrin inhibitors are under clinical investigations, notably in GB (detailed below). However, disappointing results in a phase III-study [33] forced researchers to reappraise the roles of the different integrins in GB, notably their specific expression according to tumor heterogeneity. In this review, we summarized integrin expression patterns and characteristics in GB and particularly concentrated on tumor molecular and cellular heterogeneity, notably regarding GIC. We chose to specifically focus on newly diagnosed GB and to not address here lower grades diffuse gliomas. We also discussed the roles of these adhesion molecules in GB progression and made an overview of therapeutic options.

ROLES OF INTEGRINS IN GLIOBLASTOMA

Integrins expression in glioblastoma

$\alpha\text{v}\beta\text{3}$ and $\alpha\text{v}\beta\text{5}$ were first identified as attractive therapeutic targets in GB [34, 35]. These integrins are not expressed on normal brain cells [35] but specifically on both

tumor-associated EC and GB cells [35]. Their ECM ligands, vitronectin [34] and fibronectin [36], are also upregulated in GB. Currently, $\alpha\text{v}\beta\text{3}/\alpha\text{v}\beta\text{5}$ and $\alpha\text{6}\beta\text{1}$, a laminin-interacting integrin also overexpressed in GB [37], are the most studied in GB but others may play major roles. Indeed, comparative immunohistochemistry (IHC) staining of integrins in GB versus control tissues reveal an overexpression of α2 , α3 , α4 , α5 , α6 and β1 [38], as well as of $\beta\text{3}/\alpha\text{v}\beta\text{3}$, $\alpha\text{v}\beta\text{5}$ and $\alpha\text{v}\beta\text{8}$ [39]. Of note, β8 and $\alpha\text{5}\beta\text{1}$ were particularly observed in peri-necrotic and perivascular areas [40].

Although several integrins are overexpressed in GB, links between integrin expression and patient overall survival (OS) were scarcely explored. α3 , α5 , α7 , $\alpha\text{v}\beta\text{3}$, $\alpha\text{v}\beta\text{5}$ and $\alpha\text{v}\beta\text{8}$ expression levels were positively associated with higher glioma grades [35, 39, 41–43]. $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ or $\alpha\text{3}\beta\text{1}$ overexpressions at the protein level were also correlated with poor GB prognosis [25, 43]. Consequently we conducted a statistical analysis (detailed in supplemental data) based on TCGA Affymetrix data [44] to determine GB patient OS according to major integrin expression. We focused on a group of 184 newly diagnosed primary GB solely treated with standard chemoradiotherapy [3]. In this particular population, overexpression (based on an upper threshold of the third

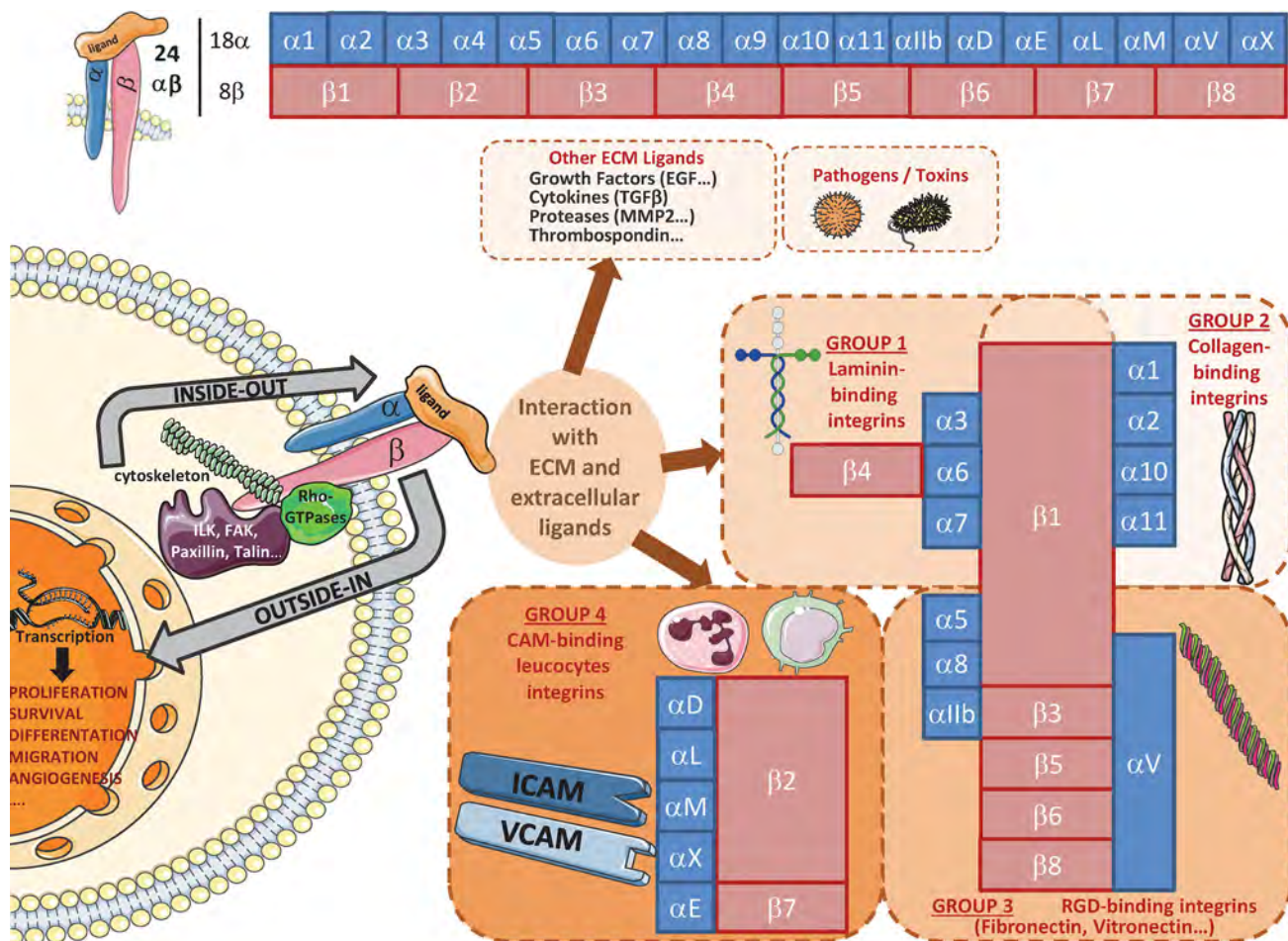


Figure 2: Overview of main integrin heterodimers and ligands.

quartile) of $\beta 1$, $\beta 3$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ and αv , but neither $\beta 5$, $\beta 4$, $\alpha 6$ nor $\alpha 7$, was significantly associated with OS decrease, whether through univariate or multivariate analysis (Figure 3). $\alpha 5$ and $\alpha 3$ overexpressions were previously associated to worse prognosis in GB ($n = 127$, TCGA dataset and high-grade glioma cohorts, for $\alpha 5$ [42, 45]) or grade III/IV glioma patients ($n = 68$, immunohistochemistry data, for $\alpha 3$ [43]). It was also recently showed that $\beta 1$ may be downregulated at both protein and RNA levels in GB

patients with OS > 23 months ($n = 14/26$) [46]. However, $\alpha 6$, hypothesized to be associated with decreased OS in all-grade glioma [47] and in three-fold (or more) overexpressing GB ($n = 7/193$ patients, REMBRANDT dataset [48]), fails to show a similar pattern in our analysis. Similarly, no difference could be highlighted for $\beta 4$, shown to be associated with GB worse prognosis ($n = 393$, TCGA dataset) [49]. Lower expression of $\alpha 7$ integrin, which was recently identified as a new functional

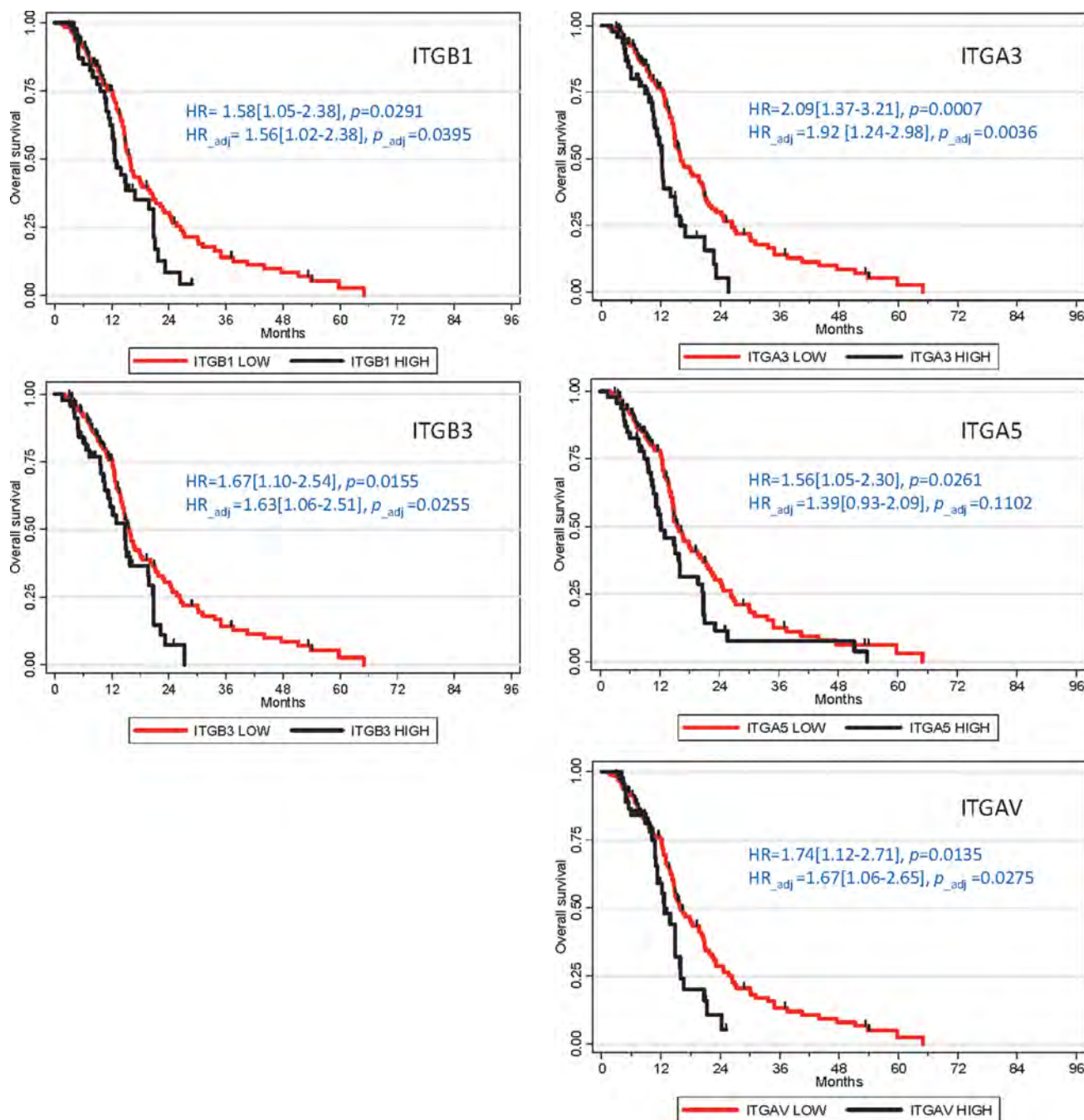


Figure 3: Integrins overexpression association with poor prognosis in GB patients. Kaplan-Meier survival plots were established using TCGA Affymetrix dataset ($n = 184$). Hazard ratios (HR) and p -values were given for univariate analyses. Adjusted HR and p -values were calculated for multivariate analyses, in relation to other prognostic clinical covariates (Age, G-CIMP status and Karnofsky score).

marker in GB (probably as a heterodimer with $\beta 1$), was also correlated with better prognosis outcomes in TCGA GB patients ($n = 595$) and in three additional independent GB cohorts [41]. However, our analysis failed to highlight such survival gain in $\alpha 7$ -low patients. These disparities for $\alpha 6$, $\alpha 7$ and $\beta 4$ could be linked to the fact that we restrained our analysis to a homogenous primary GB patients subgroup treated with standard chemoradiation.

Whereas several works studied the expression of integrins at the RNA level in GB patient cohorts, data of their expression at the protein level are scarce in such cohorts. CORE ($n = 224$) and CENTRIC ($n = 274$) clinical trial cohorts were explored for $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$ and $\alpha v\beta 8$ staining by IHC and showed that $\alpha v\beta 3$ is mainly expressed by GB endothelial cells, contrary to $\alpha v\beta 8$ which is expressed almost exclusively by GB tumor cells. Of note, $\alpha v\beta 5$ is expressed by both cell populations [50]. These results confirm those found in an independent cohort of 324 patients for which 147~160 GB samples were stained by IHC [39]. Proteomic analyses also demonstrated that αv integrins are overexpressed in GB endothelial cells compared to physiological endothelial cells (10 GB samples) [51] and that sialylated $\beta 8$ integrin is upregulated in GB samples in comparison with control adult astrocytes [27]. Using the Human Protein Atlas resource portal [52], we also noticed that $\alpha 3$, αv , $\beta 1$, $\beta 4$, $\beta 5$ and $\beta 8$ integrins may be overexpressed in high grade glioma patient samples compared to control cortex tissues (IHC data), confirming previous studies [38, 39, 43].

These data show that several integrins are overexpressed in GB and are associated with worse GB prognosis, indicating that they could play a role in GB progression and that specific targeting of overexpressed-integrins could be of therapeutic interest in GB.

Integrins and glioblastoma molecular subtypes

Several integrins are overexpressed in GB [35, 38–40, 42, 43, 49] but these results have to be analyzed in the light of GB molecular heterogeneity. Indeed, based on RNA and genomic profiling using TCGA databases, GB were classified by Verhaak et al. in four subtypes: Pro-Neural, Neural, Classical and Mesenchymal [53]. Philips et al. also classified GB of a different dataset in three subtypes (Pro-Neural, Proliferative and Mesenchymal), with Proliferative GB corresponding to TCGA Neural and Classic groups (40–50% of GB). In addition to this genomic heterogeneity between GB patients, it was also demonstrated that intratumoral heterogeneity, with all four subtypes being represented, can occur within a same GB tumor area, either between spatially distinct fragments [54] or even at the single-cell level [55]. Each subtype is characterized by specific genetic alterations. The Proliferative signature is characterized by EGFR amplification and stem marker overexpression (Nestin, Notch and Hedgehog). Within this group, it was originally

described that Neural GB overexpress neuronal markers (e.g. NEFL). Pro-Neural subtype (5–20%) is associated with TP53 mutation, PI3K-pathway overactivation, PDGFRa amplification and Olig2/Sox2 stem markers overexpression. A small IDH1-mutants subpopulation was also exclusively found in Pro-Neural GB. Mesenchymal subtype (35–50%) is characterized by several deregulated pathways (TNF/NF κ B, MET, YKL40, CXCR4, TGF- β , CD44...), a very invasive and angiogenic phenotype and a strong aggressiveness [56]. Interestingly, single-cell analysis demonstrated that a notable stemness signature was associated to Pro-Neural and Classic cell subtypes, and underrepresented in the Mesenchymal subtype [55]. In line with this, Mesenchymal GB were shown to contain a more progenitor type of GIC, contrary to Pro-Neural tumors containing a more stem GIC type [56, 57]. Of note, major studies recently classified GB by combining RNA, genomic and DNA methylation profiles [58, 59]. This new classification into six different clusters (LGM1 to LGM6) showed that primary GB (IDH wild type) can be classified into three subsets, with LGM4 being enriched in Classic-like GB, LGM5 in Mesenchymal-like GB and LGM6 in Pro-neural and Mesenchymal GB [59]. The Neural group, although represented in those three subsets, failed to show any specificity for any of these new subtypes. Finally, the newest study of the Verhaak group was designed to characterize the transcriptional heterogeneity of IDH wild-type GB by only using genes solely expressed by tumor cells and not by tumor-associated cells [60]. For this purpose, they combined RNA-sequencing data of (i) ~600 single cells isolated from 8 GB, (ii) 37 paired GB bulk tumors and their *in vitro* derived-neurospheres and (iii) matching microdissected tissues of both GB tumor cores and leading edges. They concluded that IDH wild-type GB can be classified into three subgroups (Pro-neural, Classic and Mesenchymal) and that the previously described Neural phenotype could be non-tumor specific [60].

Regarding integrin, very little was known, to our knowledge, about their differential expression among the different GB subtypes, neither in the different subsets defined by RNA profiling nor in the new LGM clusters. We then used publically available TCGA data [44] to performed a statistical analysis (see supplemental data) of the major integrins expression in all primary GB ($n=500$) and showed that most of them ($\beta 1$, $\beta 4$, $\beta 5$, $\beta 8$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, αv) are significantly overexpressed in GB compared to normal brain (Figure 4, Supplementary Figure 1 and Supplementary Table 1A). However, contrary to numerous studies showing $\beta 3$ transcript overexpression in GB [35, 39], this particular integrin did not appear to be overexpressed in GB for this specific dataset. We then analyzed an additional TCGA dataset, based on RNA-seq profiling of $n = 149$ primary GB and found that $\beta 3$ is indeed overexpressed in GB (Supplementary Table 1B), as in the REMBRANDT dataset [39]. In addition, all these integrins but three ($\beta 8$, $\alpha 6$ and $\alpha 7$) show a stronger

overexpression in Mesenchymal GB compared to other subtypes and a lower overexpression in Pro-Neural GB ($\beta 3$ excepted) (Figure 4 and Supplementary Figure 2). However, $\beta 8$, $\alpha 6$ and $\alpha 7$ display a distinct pattern, with a higher overexpression in Classic GB compared to Mesenchymal and Pro-Neural GB (Figure 4), confirming some recent data on $\alpha 7$ [41]. In line with this, $\alpha 7$ overexpression was shown to especially correlate with poor prognosis outcome in Pro-neural GB patients (TCGA dataset) [41]. In support to our analysis, *ITGB8* and *ITGA7* were previously described as genes related to the Classic subtype signature [55]. Moreover, *ITGB1* was defined as a top gene of the Mesenchymal subtype signature [60]. Of note, the last study by Verhaak's group highlighted that Mesenchymal GB are enriched in tumor associated microglial cells, as the macrophage marker *ITGAM* (CD11b) appeared, among others, to be specifically overexpressed in this subtype [60].

According to our analyses, two different integrin expression patterns were then highlighted according to GB subtypes: Mesenchymal GB show a global integrin overexpression compared to other subtypes, apart from

$\beta 8$ and $\alpha 6$, mainly overexpressed in Classic GB. These specificities could be of interest in clinic to target selective integrins according to their overexpression in particular GB subtypes.

As an additional and relevant critical aspect of GB heterogeneity in clinic, it would be of major interest to decipher whether or not integrin expression profile could vary over time between primary GB and the associated recurrent tumors. Several studies were recently undertaken to assess this longitudinal transcriptomic heterogeneity in GB [60, 61]. It is noteworthy that the genomic and transcriptomic analyses of recurrent tumors revealed in these GB the presence of some exclusive LTBP4 (latent TGF- β binding protein 4) mutations associated to its overexpression [61]. As further highlighted in the present review, LTBP4, some key components of the latent TGF β complex, appeared to be required for TGF β activation in response to the binding of specific αv integrins (mainly $\alpha v\beta 6$ and $\alpha v\beta 8$) to the latent TGF β complex. So, recurrent GB may present a deregulation of the TGF β pathway, known to sustain GB aggressiveness, and it would be of interest to explore the role of the related αv integrins in this deregulation.

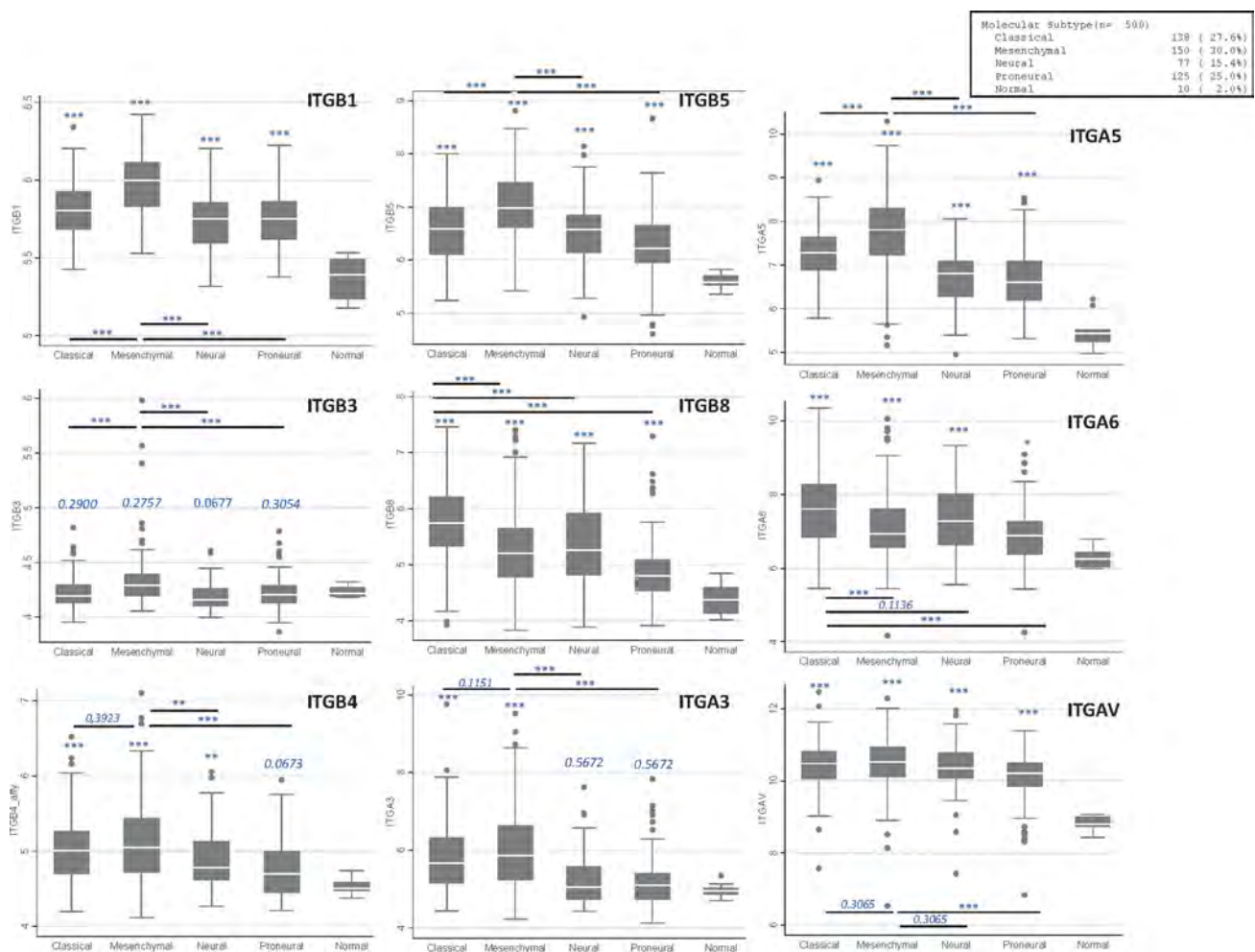


Figure 4: Main integrins expression in GB samples according to molecular subtypes. Plots were established using TCGA Affymetrix dataset ($n = 500$). * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$. When not stated, values are compared to the “normal” subgroup.

Integrins in glioblastoma proliferation, migration and invasion

Integrins sustain tumor cells proliferation, notably via their association with ECM components and maintenance of cell adhesion to substrate [24]. Few studies were conducted in GB. $\alpha 5\beta 1$, which reduces GB cell proliferation when inhibited [62], acts through its interaction with Anosmin-1 [63] or Rap1A Rho-GTPase [64]. $\beta 4$ interaction with its extracellular ligand netrin-4 also sustained GB cell proliferation [49].

However, integrins contribution to adhesive, migratory and invasive behaviors has been extensively studied in GB. First, $\alpha \nu \beta 3 / \alpha \nu \beta 5$ encourage GB cell migration/invasion by direct adhesion to ECM (via fibronectin, vitronectin, osteopontin or periostin) [36, 65, 66] and then activate intracellular signalling pathways. For example, they trigger FAK, which controls cytoskeletal organization, force generation and survival, or activate additional pathways (Shc/MAP-Kinases, Rho-GTPases, Src Family Kinases) [23, 24, 67]. $\alpha \nu \beta 3$ promotes GB invasion via the activation of MMP-2 at the plasma membrane and the subsequent degradation of complex ECM [24]. Finally, $\alpha \nu \beta 3 / \alpha \nu \beta 5$ inhibition in murine models reduces GB cell migration/invasion [68]. Besides $\alpha \nu \beta 3 / \alpha \nu \beta 5$, $\alpha 6\beta 1$ was also associated with a stronger invasive phenotype. Its expression in U87 GB cell line enhances cells invasion *in vitro* and *in vivo* [37], as well as in GIC (our unpublished data). $\alpha 6\beta 1$ cooperation with ERK and N-cadherin could support this effect [69]. Recently, $\beta 1$ (associated with $\alpha 3$, $\alpha 5$ or $\alpha 9$) [45, 62, 70–72] and $\beta 8$ [73, 74] have also been involved in GB cells migration/invasion, even if mechanisms are not well known yet. $\alpha 5\beta 1$ could act through its interaction with MMP-2 [75] and $\alpha \nu \beta 8$ through the modulation of Rho-GTPases activities (via RhoGDI1) [73].

Consequently, targeting specific integrins in GB could reduce tumor invasion and aggressiveness.

Integrins in glioblastoma angiogenesis

Knockout-strategies demonstrated the role of integrins in tumor angiogenesis [30]. In GB, characterized by a high vascularization and an overactive angiogenesis depending on VEGF and bFGF [76], this process is notably mediated by $\alpha \nu \beta 3$, $\alpha \nu \beta 5$, $\beta 1$ and $\alpha \nu \beta 8$. EC-expressed $\alpha \nu \beta 3 / \alpha \nu \beta 5$ can provide survival signals and traction for invading cells, two mechanisms necessary to angiogenesis [34, 35]. $\alpha \nu \beta 3$ - and $\alpha \nu \beta 5$ -associated angiogenesis are respectively dependent on tumor cell-secreted bFGF/TNF α and VEGF through an amplification loop leading to $\alpha \nu \beta 3 / \alpha \nu \beta 5$ overexpression on EC [77]. Overexpressed $\alpha \nu \beta 3 / \alpha \nu \beta 5$ mediate in turn adhesive interactions with ECM proteins (vitronectin, fibronectin, fibrinogen, osteopontin, von Willebrand factor). In cooperation with bFGF/VEGF, $\alpha \nu \beta 3 / \alpha \nu \beta 5$

also activate signalling pathways (FAK/ILK, PI3K/Akt and SDF1-CXCR4 [78]) that promote EC proliferation, survival and migration [30]. Regarding PI3K/Akt, a recent study associates this pathway with Plexin-B1/Rho/ $\alpha \nu \beta 3$ and Serine/arginine Protein Kinase-1 [79]. Moreover, migration can be improved by $\alpha \nu \beta 3$ interaction with pleiotrophin (a secreted heparin-binding cytokine) on GB cells and EC [80] and with the cell adhesion molecule L1CAM on GIC [81]. Besides $\alpha \nu \beta 3 / \alpha \nu \beta 5$, $\beta 1$ is also involved in GB angiogenesis [76]. $\alpha 5\beta 1$, similarly to $\alpha \nu \beta 3$, is also upregulated by FGF on tumor endothelium during angiogenesis and promotes EC survival and migration [82]. $\beta 1$ can be associated with other α -subunits, like $\alpha 9$, to support EC-mediated angiogenesis in GB [83]. $\alpha 4\beta 1$ is also involved in pericyte-dependent angiogenesis to favor blood vessel maturation/stabilization [30]. Finally, $\alpha \nu \beta 8$, overexpressed on GB cells [35, 40, 74], is involved in vessel formation/remodeling in GB through an autocrine TGF- β -dependent differential control of angiogenesis [74].

To summarize, several integrins, notably the $\alpha \nu$ and $\beta 1$ families, appear to be interesting targets in GB to reduce angiogenesis in these highly vascularized brain tumors.

Integrins in glioblastoma survival and resistance to therapy

Depending on the context, integrins can either enhance cell survival or apoptosis, as they constantly challenge their microenvironment to regulate the death/survival balance. However, cancer cells deregulate this balance to promote survival. These different mechanisms, i.e. integrin ligation-related activation of pro-survival signals and unligated-integrin effects on both Integrin Mediated cell Death (IMD) or Anoikis (cell detachment-induced apoptotic death) were previously reviewed [24]. Briefly, IMD, a Caspase 8-dependent apoptotic process activated by unligated-integrins [24], can be deficient in tumor cells to promote survival [84]. In glioma, integrin inhibition can also induce a TGF β -dependent anoikis [85]. Finally, in GB, both $\alpha \nu \beta 3$ and the cytoskeleton regulatory kinase PAK4 were recently highlighted to mediate evasion of a p21-dependent senescence [86].

Moreover, chemo/radiotherapy exposure was associated with alterations of integrin-linked pathways in GB. First, irradiation up-regulated $\alpha \nu \beta 3$ in U87 cells [87]. Second, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$ and $\alpha 5\beta 1$ were overexpressed in multi-drug resistant human glioma cells [88]. These results suggest, as for other cancers, an important role of integrins in GB resistance after chemo/radiotherapy. Cell adhesion to ECM, particularly through integrin ligation, is known to confer resistance in tumors, either to chemotherapy (cell-adhesion-mediated drug resistance, CAM-DR), or to irradiation (cell-adhesion-mediated radioresistance, CAM-RR).

Regarding CAM-DR, $\beta 1$ and $\beta 4$ integrins can confer Temozolomide-resistance in GB cells [89, 90].

An $\alpha 5\beta 1$ /p53 interconnection was notably demonstrated to modulate two anti-apoptotic proteins: Phosphoprotein enriched in astrocytes 15 (PEA-15) and Survivin. $\alpha 5\beta 1$ -overexpressing GB may then benefit from targeted-therapies associating integrin antagonists and survivin repressors [91]. Another putative and more general mechanism could be through integrin interaction with Periostin, an ECM protein recently highlighted in anti-angiogenic therapy resistance in glioma models [92]. Finally, as the high GB intratumoral heterogeneity (depicted above and in [54, 55]) could have major clinical implications in resistance to treatments, it is noteworthy that a recent single-cell clonal analysis of a GB patient sample by RNA-sequencing highlighted that TMZ-resistant clones displayed an up-regulation of αv integrin and a downregulation of $\alpha 7$ integrin compared to TMZ-sensitive clones [93].

CAM-RR is more documented in GB. U87 and SF763 GB cells, which express $\alpha v\beta 3$ and $\alpha v\beta 5$, respectively, were shown to be radioresistant through an ILK/RhoB pathway. Specific $\alpha v\beta 3/\alpha v\beta 5$ inhibition by Cilengitide or ILK blockade led to a significant *in vitro* radiosensitization [94]. *In vivo*, U251 cells-xenografted rats treated with Cilengitide and radiotherapy displayed a survival advantage compared to radiotherapy alone [95]. This radiosensitization was associated with an increase of radiation-induced apoptosis [95]. Furthermore, EC radiosensitization can also induce GB cell radiosensitization *in vitro* and *in vivo* [95]. So $\alpha v\beta 3/\alpha v\beta 5$ blockade could lead to radiosensitization potentiation by targeting both endothelial and tumor cells. Another integrin involved in GB CAM-RR is $\beta 1$, through the activation of a pro-survival pathway transduced by Akt, paxillin, p130Cas and JNK [96]. $\beta 1$ and JNK co-inhibition was recently shown to potently radiosensitize GB-initiating cells *in vitro* and *in vivo* [97]. ERK may also be involved since this MAP-kinase participates to chemoresistance in glioma cells [89]. Then, several studies imply integrins in GB radioresistance. Growing evidence demonstrated that induction of survival pathways (PI3K/Akt, NF κ B, Bcl2, JNK...) or inhibition of pro-apoptotic pathways (p53), most often through FAK activation, could be involved [23, 98, 99]. The anti-apoptotic survivin, induced by irradiation [100], can also modulate the radiotherapy-induced mitotic U87 cell death through an ILK/HIF-1 α /survivin pathway [101]. Besides ILK/FAK, other focal adhesion proteins such as PINCH1 and ILKAP contribute to GB radioresistance [102]. Among potential mechanisms in GB, integrins could also act by cell cycle modulation [103], since irradiation-induced cell cycle arrest is potentiated by $\alpha 6\beta 4$ /laminin-5 adhesion in prostate cancer [104]. Moreover, IMD resistance might also occur after radiotherapy. Indeed, as irradiation induces adhesion of breast cancer cells to laminin, fibronectin and collagen [105], it could be hypothesized that such process impairs IMD. Finally, integrins cooperation with growth

factor pathways could also mediate CAM-RR in GB, as concurrent inhibition of $\beta 1$ /EGFR can radiosensitize tumor cells [106].

Altogether, these observations suggest that several integrins, particularly $\alpha v\beta 3/\alpha v\beta 5/\beta 1/\beta 4$, are interesting candidates in GB to be combined to ionizing radiations for radiosensitizing strategies. However, most of these studies were conducted on adherent GB cell lines and this could limit the significance of these resistance pathways in clinic. To better recapitulate the behavior of GB cells *in vivo*, other *in vitro* GB models could be more appropriate, and notably the GIC-enriched neurosphere 3D cell model.

Integrins in glioblastoma-initiating cells

Integrins were recently highlighted in cancer stem cell (CSC) biology, as they could represent specific CSC biomarkers and/or participate to CSC phenotype and functions [107]. In GB, $\alpha 6$ was shown to be preferentially and strongly expressed by GIC compared to differentiated cells [48]. Furthermore, $\alpha 6^{\text{High}}$ -expressing GIC present higher proliferation, stronger neurospheres-forming ability *in vitro* and tumorigenesis *in vivo* compared to $\alpha 6^{\text{Low}}$ GIC [48]. $\alpha 6$ also regulates GIC invasion process by cooperation with N-cadherin and ERK pathway [69]. $\alpha 3$ integrin was also shown to be overexpressed in GIC and to promote invasion [71]. Of note, the cell surface tetraspanin family member CD151 was recently found as a novel regulator of GIC by interacting with $\alpha 6$ and $\alpha 3$ [108]. Recently, a monoclonal antibody screening identified $\alpha 7$ integrin as a functional GIC marker. Indeed, $\alpha 7$ appeared to sustain the stem characteristics, the laminin-linked invasion ability and the tumorigenic capacity of this GIC subpopulation [41]. Besides these three α integrins, $\beta 1$ integrin, even if not specifically expressed by GIC, can form a complex at the GIC membrane with astrocytes-secreted Connective Tissue Growth Factor and tyrosine kinase receptor type A and activate NF κ B-driven invasion [109]. Another argument linking integrins with GIC biology is that particular integrins, belonging notably to the αv -family, can activate TGF- β pathway [110]. Indeed, TGF- β was described as a stemness gatekeeper in glioma [111] and TGF- β receptor antagonists target GIC and reduce tumorigenesis and radioresistance [112]. Finally, besides integrins, the junctional adhesion molecule-A may also promote GIC self-renewal [47].

In addition, recent studies also highlighted the differential expression of integrins in GIC according to their molecular subtypes. Indeed, even if molecular classifications were originally set up on GB whole tissues, GIC can also be classified according to their transcriptional subtypes. In that way, it was shown that GIC can be clustered in two major subgroups with distinct functional and molecular properties [56, 57, 113, 114]. The first one corresponds to a more stem-like GIC group, characterized by CD133 overexpression, an increased

rate of asymmetric division, a higher invasive phenotype in xenografted-mice and a significant enrichment in Pro-Neural genes. The second group matches with a progenitor-like GIC type, corresponding to more adherent cells/neurospheres, a decrease in stem marker expression (Olig2, CD133), a trend toward a decreased tumorigenic ability in orthotopically-xenografted mice and an enrichment in Mesenchymal genes. These two subgroups were confirmed in two studies realized either in 48 different patient-derived GIC cell lines [115] or at the intratumoral level in a spectrum of GIC clones derived from the same tumor [116]. In the study by Xie and colleagues, an additional GIC cluster, corresponding to the Classic subtype, was highlighted, the Neural subtype being underrepresented ($n = 3/48$) [115]. Pro-Neural GIC clones or cell lines were found to be more sensitive to chemo- and radiotherapies, to have a higher proliferation rate and to give a higher rate of macroscopic tumors in xenografted mice [115, 116]. Regarding the correlation of GIC subtypes with survival prognosis in GB patients or in xenografted-mice, no clear trend could be defined since opposite results were obtained according to the studies, with a worse survival either for Mesenchymal GIC [56, 117] or for Pro-Neural GIC [115, 116].

This molecular and functional heterogeneity between GIC clones/cell lines was shown to be associated with differential integrin expression between GIC subgroups. Indeed, integrin $\alpha 4$ appeared to be downregulated in Pro-Neural stem-like GIC [114]. Integrins $\beta 1$ and $\alpha 5$ were demonstrated to be overexpressed in Mesenchymal progenitor-like GIC at the transcriptional level [116, 117]. $\beta 1$ overexpression was also confirmed at the protein level in Mesenchymal GIC clones [116], as well as the Mesenchymal marker CD44, known to bind and activate $\alpha 5\beta 1$ in cancer cells [118]. This suggests an important role for $\alpha 5\beta 1$ integrin in Mesenchymal GIC. Of note, this Mesenchymal GIC subtype is characterized by a down-regulation of miR-9-3p compared to Pro-Neural GIC [119]. As *ITGB1* is a known target inhibited by miR-9-3p in cancer cells [120], this could contribute to the overexpression of $\beta 1$ in Mesenchymal GIC. Finally, we used the Human Glioblastoma Cell Culture (HGCC) resource portal (www.hgcc.se, detailed in [115]) to compare the expression of the main integrins in the 48 GIC cell lines according to their molecular subtypes. We noticed, as we observed in the TCGA dataset analysis detailed above, that integrins $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, αv , $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 4$ and $\beta 5$ were overexpressed in the Mesenchymal GIC compared to the Pro-Neural GIC cell lines. All these integrins, except $\beta 5$, were also downregulated in the Classic GIC in comparison with Mesenchymal GIC. On the contrary, $\alpha 6$ failed to show any significant variations between the different subgroups. $\beta 8$, as observed in the TCGA Affymetrix dataset, is overexpressed in the Classic GIC subtype compared to Pro-Neural/Mesenchymal GIC cell lines. Altogether, it can be postulated that most of the

integrins with a role in GB are preferentially expressed in Mesenchymal GB cells and GIC compared to Classic/Pro-Neural subtypes, with the notable exception of $\alpha 6$ and $\beta 8$, preferentially expressed in the Classic GB cells.

Besides this molecular heterogeneity between GIC populations, it was also shown that anatomical location of the biopsy has an impact on integrin expression in GIC. Indeed, GIC generated from the GB peritumoral area displayed a higher migratory and invasive phenotype compared to GIC from the tumor mass. This invasive capacity was correlated to the overexpression of integrin $\beta 3$ in peritumoral GIC and inhibition of $\alpha v\beta 3$ blocked this invasive phenotype [121].

To conclude, specific integrins, such as $\alpha 6$, seem to contribute to GIC identification and/or functions. Moreover, the GIC heterogeneity, either at the molecular or anatomical levels, between GB patients or even between GIC clones of a same patient, is associated with a differential integrin expression. Notably, $\beta 1$ integrin displayed an important overexpression in Mesenchymal GIC subtypes. Consequently, targeting these specific integrins preferentially expressed in GIC or in certain GIC subtypes might represent a potent way to alter GIC stemness and tumorigenicity in order to improve GB treatment.

Integrins in glioblastoma microenvironment and niches

Tumor microenvironment modifications contribute to cancer aggressiveness and recurrence. GB, characterized by a specific and tightly regulated microenvironment, are among the most vascularized and hypoxic tumors [19]. Cell membrane-expressed integrins can interact and modulate GB specific microenvironment via pro-migratory and pro-invasive properties (previously reviewed [24] and described above), hypoxic signalling/conditions, growth factor pathways, immune system and GIC maintenance within their niches. These mechanisms are detailed below and Figure 5.

Hypoxia occurs in growing tumors when distant or abnormal tumor vasculature cannot provide blood supply. In GB, oxygen concentration decreases to 0.1–2% (2–10% in healthy brain). Hypoxia-signalling pathway, via hypoxia inducible factors (HIF-1/HIF-2), is then activated to promote, among others, angiogenesis. In different tumor types, hypoxia could up-regulate integrins ($\alpha 6$, $\alpha v\beta 3$), which contribute to hypoxia cell adaptation [122, 123]. In GB, integrins are part of this hypoxia-signalling pathway and strongly support GB angiogenesis. For instance, $\alpha 6$ -overexpressing U87 cells form bigger tumors than wild-type U87 in immunodeficient mice due to improved vascularisation [37]. Moreover, EGFRvIII/ $\beta 3$ integrin complexes were identified as promoter of GB progression in hypoxic environment [124]. Additionally, our laboratory demonstrated that $\alpha v\beta 3/\alpha v\beta 5$ were overexpressed in hypoxic U87 and SF763 GB cells,

leading to FAK activation and subsequent RhoB/GSK-3-dependent HIF-1 stabilization [125]. In this study, the $\alpha\text{v}\beta3/\alpha\text{v}\beta5$ -inhibitor Cilengitide, known to induce tumor regression via angiogenesis blockade and tumor growth inhibition [68], significantly decreased *in vitro* HIF-1 expression under hypoxia. Additionally, siRNA-mediated $\beta3$ inhibition led *in vivo* to an oxygenation of U87 xenografts [125]. It was also demonstrated in U87 that the T3 thyroid hormone, through iodothyronine receptor domains on $\alpha\text{v}\beta3$ and a Src/PI3K/ERK pathway, could enhance cell proliferation and HIF-1 expression [126]. Finally, in U251 cells, melatonin, a potent antioxidant, was shown to reduce cell migration/invasion in hypoxia through oxidative stress modulation and inhibition of the $\alpha\text{v}\beta3$ /FAK/Proline-rich tyrosine Kinase 2 pathway [127]. Concerning integrin-mediated downstream pathways, and particularly ILK, two small-molecule ILK inhibitors (QLT0254/QLT0267) led *in vitro* to U87 cell cycle arrest and apoptosis, associated with AKT inhibition and VEGF secretion. *In vivo*, QLT0267 reduced U87 tumor growth by downregulating HIF-1 and VEGF, suggesting that ILK contribute to GB angiogenic process [128]. Consequently, specific integrins and associated-downstream pathways

participate to hypoxia signalling in GB and then could impact on tumor aggressiveness.

As previously described, integrins cooperate with growth factors and/or their receptors and these pathways extensively cross talk. We focus here on TGF- β , involved in multiple cancer processes (for review [111]). TGF- β is secreted in a latent form consisting of a complex of three proteins: TGF- β (isoforms 1/2/3), inhibitor LAPs (latency-associated protein) and ECM-binding protein LTBPs (latent TGF- β binding proteins). To be activated, TGF- β needs to be liberated from latent complex, e.g. via conformational change or proteolysis. Interestingly, LAPs of TGF- β 1 and TGF- β 3 contain an integrin-binding site (RGD, arginine-glycine-aspartic acid sequence) and RGD-binding integrins (αv family, particularly $\alpha\text{v}\beta6/\alpha\text{v}\beta8$) can activate latent TGF- β through direct binding [110]. TGF- β is often overexpressed in GB and associated with tumor initiation and progression, as it promotes proliferation, invasion, angiogenesis, stemness, resistance and immune suppression [111]. Notably, inhibition of TGF- β pathway, up-regulated in glioma after irradiation [129], radiosensitizes GB cells [130]. Regarding the specific signalling, TGF- β binds to its receptors TGF- β -R-I/II/III

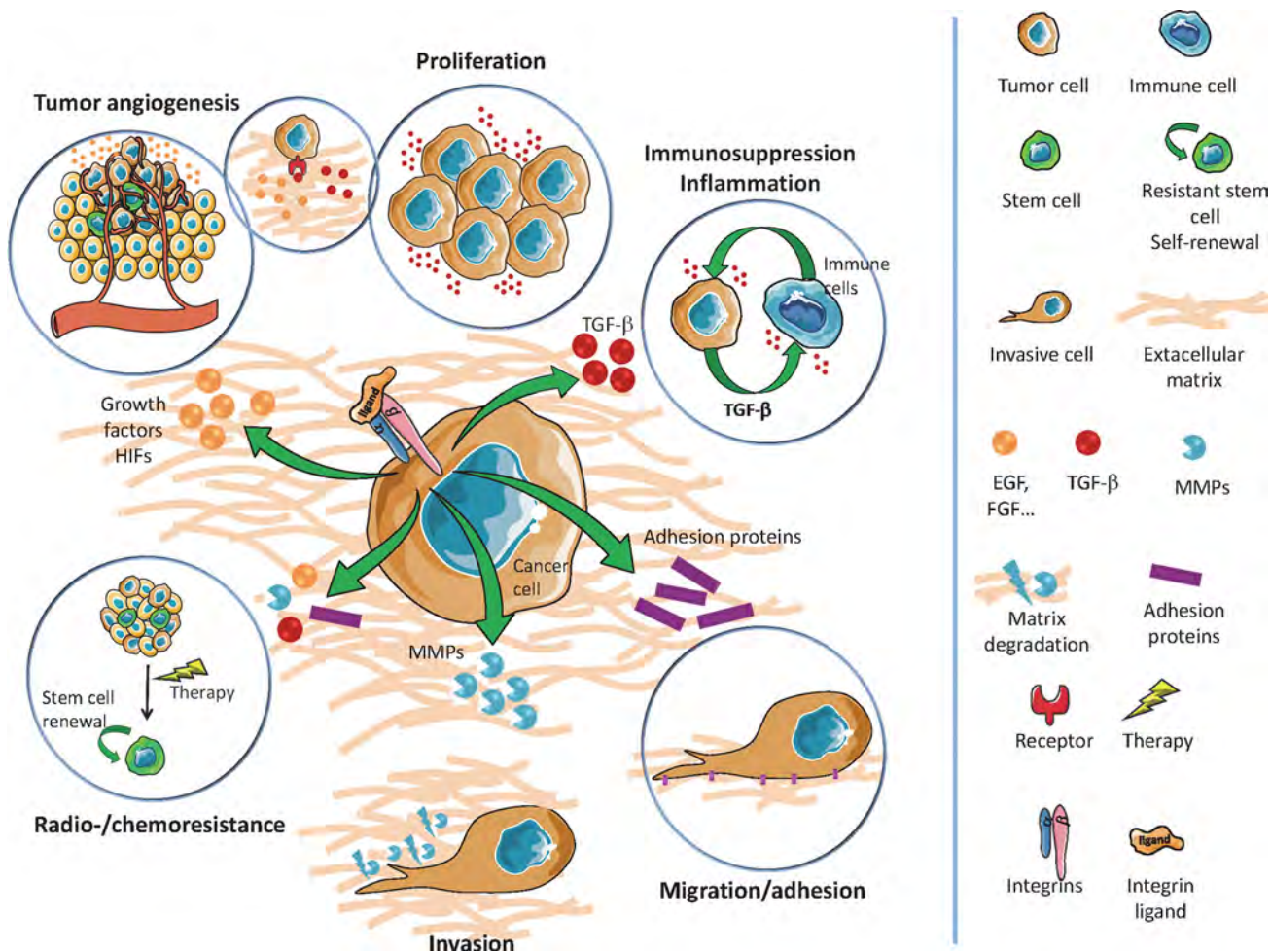


Figure 5: Overview of integrin interactions with glioblastoma microenvironment and niches

Table 1: Integrins targeting agents in cancer, including GB

MOLECULE	COMMERCIAL NAME	COMPANY	TYPE	TARGET	DISEASE	TRIAL STATUS	REFERENCES
GLPG0187	x	Galapagos SASU (France)	Integrin receptor antagonist	Broad spectrum integrins ($\alpha\beta1$, $\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$, $\alpha\beta6$, $\alpha\beta8$ and $\alpha5\beta1$)	Advanced solid tumours	Phase I	[141]
EMD121974	Cilengitide	EMD pharm. Merck KGaA (Germany)	Cyclicized RGD- containing pentapeptide peptidomimetic	$\alpha\beta3$ and $\alpha\beta5$	Renal cell carcinoma, colon cancer, GB, melanoma, refractory advanced solid tumours, AML	Phase III	[142]
MEDI-522	Etaracizumab Abegrin	Medimmune Inc. (USA)	IgG1 humanized monoclonal antibody	$\alpha\beta3$	Melanoma, prostate/colon/ thyroid cancer	Phase II	[143]
M200	Volociximab	Protein design labs (USA)	Chimeric monoclonal antibody	$\alpha5\beta1$	Renal cell carcinoma, melanoma, NSCLC, pancreatic cancer	Phase II	[144]
PF0460541	x	Pfizer (USA)	IgG1 humanized monoclonal antibody	$\alpha5\beta1$	Solid tumours	Phase I	[145]
ATN-161	x	Attenuon, LLC (USA)	Fibronectin like pentapeptide peptidomimetic	$\alpha5\beta1$	Advanced solid tumours	Phases I/II	[146]
CNTO 95	Intetumumab	Centocor (USA)	Humanized monoclonal antibody	αv	Refractory advanced solid tumours	Phase II	[147]
EMD525797 DI-17E6	x	Merk (Germany)	Humanized monoclonal antibody	αv	Colorectal carcinoma and prostate	Phase II	[148]
E7820	x	Eisai medical research (USA)	Aromatic sulfonamide derivative	$\alpha2$	Colorectal carcinoma	Phase II	[149]
OS2966	x	Oncosynergy (USA)	monoclonal antibody	$\beta1$	GB Ovarian cancer	Phase I	Planned in 2017 [150]

and activates the canonical (SMAD proteins) and non-canonical (MAPK, PI3K/Akt, NF- κ B, RhoGTPases...) pathways [111]. A recent study also demonstrates a network between integrins, aryl hydrocarbon receptor and TGF- β [131]. So αv integrins, through TGF- β activation, can promote GB progression.

Finally, integrin involvement in microenvironment may also depend on immune response modulation. Indeed, integrins regulate the recruitment of myeloid cells [22] and lead to immunosuppression or inflammation in favor of tumor progression, as exemplified for $\alpha4\beta1$ [132]. In GB, a proteomic secretome analysis highlighted that osteopontin (interacting with $\alpha\beta3/\alpha\beta5/\alpha\beta6/\alpha\beta1$) and lactadherin (interacting with $\alpha\beta3/\alpha\beta5$) are able to induce M2 microglia reprogramming via an integrin/FAK/PI3K pathway [133]. M2 tumor-associated macrophages are recruited through association of their $\alpha\beta3$ integrins with Periostin to favor tumor growth [134]. Another mechanism of integrin-mediated immunosuppression could involve TGF- β activation [110]. Depending on tumor context, GB or microglial cells-secreted TGF- β mediates immunosuppression either via the inhibition of natural killer cells, the IL-2R-mediated downregulation of proliferative signals in human T cells or the generation of immunosuppressive regulatory T cells [111].

Furthermore, all these microenvironment-related mechanisms can be transposed to GIC niches. GIC subpopulation is enriched in perivascular and hypoxic niches, which support their stemness and protect them from chemo/radiotherapies (for reviews [7, 19]).

Moreover, hypoxia, HIFs and HIF-regulated genes play key role in GIC self-renewal and differentiation capacities compared to normal neural progenitors but also in GB cell dedifferentiation into GIC [9, 135]. Consequently, by modulating hypoxia and HIFs, integrins might regulate GIC characteristics, GIC differentiation and GB cell dedifferentiation. Additionally, integrins were previously described as key regulators to maintain stemness (see above) [48, 71]. Stem cell niches are indeed critical to preserve stemness, and integrins, by interacting with this particular local microenvironment, may provide signals allowing stem cells maintenance, depending or not on ECM interactions. Additionally, integrins could also enhance GIC properties via cooperation with growth factor receptors [24] and modulation of tumor immunity [12].

Integrin-targeting in glioblastoma

Integrins, localized at the cell surface, represent attractive targets for GB treatment. Some integrins, like $\alpha\beta5$, seems also quite selective to tumor cells, then limiting toxicity on healthy tissues. Diverse integrin-targeting agents (antibodies, peptidic/peptidomimetic antagonists and other small molecules) were therefore placed into clinical development and clinical trials, previously reviewed [23, 30] and updated in Table 1, were then set-up in different tumor types, including GB.

$\alpha\beta3/\alpha\beta5$, the most studied integrins in GB, are involved in tumor progression and angiogenesis. The main developed molecule to target $\alpha\beta3/\alpha\beta5$ is Cilengitide

Table 2: Summary of clinical trials using cilengitide in GB

TRIAL NAME	PHASE	PATIENTS	TUMOR TYPE	CILENGITIDE DOSE + TREATMENTS	OUTCOMES (OS in months, PFS at 6 months)	REFERENCES
NABTT9911 NCT00006093	I	51	Recurrent malignant glioma	Single agent 120 to 2400 mg/m ² 2×/week	OS: 5.6	[151]
PBTC-012 NCT00063973	I	31	Recurrent pediatric brain tumours	Single agent 120 to 2400 mg/m ² 2×/week	Complete response: 1 Stable disease: 2	[152]
NCT00979862	I	45	Recurrent GB	Cilengitide 2000 mg/m ² 2×/week + Cediranib 30 mg daily	OS : 6.5 PFS-6 : 4.4 %	[153]
CILENT-0902 NCT01165333	I	40	Children With Diffuse Intrinsic Pontine Glioma	Radiotherapy + Cilengitide 240 to 1800 mg/m ²	Completed	No published results
EMD-009 NCT00093964	II	81	Recurrent GB	Single agent 500 or 2000 mg/m ² 2×/week	500mg: OS: 6.5; PFS-6: 10% 2000mg: OS: 9.9; PFS-6: 15%	[154]
EMD-010	I/IIa	52	Newly diagnosed GB	Standard treatment + 500 mg/m ² 2×/week	OS : 16.1 PFS-6 : 69%	[155]
NABTC03-02 NCT00112866	II	30	Recurrent GB	Single agent 500 vs 2000 mg/m ² 3 days before surgery and then 2000 mg/m ² 2×/week	PFS-6: 12%	[156]
NABTT0306 NCT00085254	II	112	Newly diagnosed GB	Standard treatment + 500 vs 2000 mg/m ² 2×/week	500mg: OS: 17.4 2000mg: OS : 20.8	[157]
ACNS0621 NCT00679354	II	30	Recurrent or refractory pediatric brain tumours	Single agent 1800 mg/m ² 2×/week	Stable disease: 1	[158]
CORE NCT00813943	II	264	Newly diagnosed GB (unmethylated MGMT)	Standard treatment + 2000 mg/m ² 2 or 5×/week vs standard treatment	Cilengitide 2x/wk : OS : 16.3 Cilengitide 5x/wk : OS : 14.5	[50, 159]
EXCENTRIC NCT01124240	II	48	Newly diagnosed GB (unmethylated MGMT)	Standard treatment + Cilengitide 2000 mg/m ² 2×/week + Procarbazine 50 or 100 mg daily for 6 weeks (+ adjuvant treatment)	OS : 14.5 Median PFS : 7.4 months	[160]
CENTRIC NCT00689221	III	504	Newly diagnosed GB (methylated MGMT)	Standard treatment + 2000 mg/m ² 2×/week vs standard treatment	OS : 26.3	[33]
NCT01517776	II		Recurrent High-grade Gliomas (children and adolescents)	TMZ 75 mg/m ² /d + Cilengitide 1800 mg/m ² 2×/week	Terminated. (due to an altered benefit/risk assessment)	
NCT01044225	II		Newly Diagnosed GB (unmethylated MGMT)	Standard treatment + Cilengitide 2000 mg/m ² 2×/week vs Standard treatment + Cetuximab (initial dose of 400 mg/m ² and then 250 mg/m ² per week)	Terminated. (due to results of the phase III RTOG0525/NCT00304031 trial)	

(EMD121974). This cyclized RGD pentapeptide potently blocks $\alpha v\beta 3/\alpha v\beta 5$ activation and preclinical studies demonstrated its efficacy *in vitro* and *in vivo* in GB (for review [68]). Consequently, this molecule entered into phase I/II clinical trials in GB, in association with radio/chemotherapies, first in recurrent and then in newly diagnosed GB. These trials, previously reviewed [68] and updated in Table 2, showed interesting clinical responses with a good tolerance and clinical benefit on progression free survival (PFS) as well as on OS (Table 2). The CENTRIC (phase III) and CORE (phase II) clinical trials were then designed to evaluate Cilengitide efficacy in GB patients with methylated or unmethylated MGMT gene promoter, respectively. However, these studies failed to achieve expected results, with no OS improvement

(Table 2). Several reasons were evoked and notably the fact that Cilengitide short half-life could lead to a weak systemic concentration and an additional difficulty to reach its targets [136]. The absence of an adapted biomarker to identify responding GB patients was also mentioned. A retrospective study showed that $\alpha v\beta 3/\alpha v\beta 5$ expression did not correlate with an improved OS in CENTRIC patients and that only an overexpressed $\alpha v\beta 3$ in tumor cells, but not endothelial cells, of CORE cohort patients may be associated to a better outcome in Cilengitide-treated arm (Table 2). Moreover, GIC, the most resistant cells within the tumoral mass, express low $\alpha v\beta 3/\alpha v\beta 5$ levels [35]. So, it could be hypothesized that Cilengitide could not conveniently target GIC, one of the major reservoirs for GB recurrence. However, even if Cilengitide did

Table 3: Summary of integrins involved in GB

INTEGRINS	ROLES IN GB	REFERENCES
$\alpha v\beta 3$	Migration Invasion Angiogenesis Survival Therapy resistance Prognostic marker	[36, 65–67] [24, 79] [77, 80, 81] [86] [78, 94, 95] [25]
$\alpha v\beta 4$	Proliferation Therapy resistance	[49] [90]
$\alpha v\beta 5$	Migration, Invasion Angiogenesis Therapy resistance	[65, 66] [77] [94, 95]
$\alpha v\beta 8$	Invasion Angiogenesis	[73] [74]
$\alpha 3\beta 1$	Migration, Invasion Stemness Prognostic marker	[70, 71] [71] [43]
$\alpha 5\beta 1$	Proliferation Migration Invasion Survival Therapy resistance	[62–64] [82] [45, 75] [75, 91] [42]
$\alpha 6\beta 1$	Invasion Stemness	[37, 69] [48]
$\alpha 9\beta 1$	Migration Angiogenesis	[72] [83]

not improve OS and will not be further developed as an anticancer drug, integrins still remains under consideration in GB and other solid tumors (Table 1).

Besides being attractive therapeutic targets, integrins may offer several other clinical perspectives. First, they represent interesting prognosis biomarkers. For example, $\alpha v\beta 3$ and $\alpha 3\beta 1$ high expression was associated with poor prognosis in GB patients [25, 43]. Second, their extracellular part could be recognized using non-invasive imaging systems. Such tools may be useful for diagnosis, for selection of responding patients and for the follow-up of anti-integrin treatment efficacy. Interestingly, 18F-fluciclatide-labeled $\alpha v\beta 3/\alpha v\beta 5$ integrins are able to provide clinical information and guide patient care in GB [137]. Other examples are DA364, a RGD-cyclic probe allowing GB detection by near-infrared fluorescence imaging [138], or a new ^{131}I -labeled RGD-cyclic peptide dimer for $\alpha v\beta 3$ imaging [139]. Third, considering a specific integrins pattern on tumor cells compared to normal cells, integrins targeting to deliver therapeutics seems another promising application in GB treatment. Indeed, they could serve as delivering target to specifically supply tumor cells with chemotherapy,

immunotherapy, radionucleotide, gene therapy agents or even nanoparticles. This could improve treatment efficacy but also reduce toxicity. For example, an anti- $\alpha v\beta 3$ monoclonal antibody (Abegrin) associated with a radioimmunotherapeutic agent reduce tumor volume of orthotopic GB cells [140].

CONCLUSIONS

Due to their involvement in GB radio/chemoresistance and progression (Table 3), integrins appear of great interest in GB treatment, either as targeted therapies, drug-delivering vectors or diagnostic tools for tumor imaging. Considering the strong GB heterogeneity, future preclinical and clinical studies have to focus on the particular integrins expression pattern within GB microenvironment. It is indeed crucial to identify the integrin profiles of specific subpopulations, notably GIC, and to correlate them to cell radio/chemosensitivity. Another challenge is to establish specific integrin signatures for each molecular GB subtype. These research axes represent key steps towards treatment personalization in GB and outcome improvement.

ACKNOWLEDGMENTS AND FUNDING

We want to acknowledge the Institut Claudius Regaud and GRICR, INSERM, the Canceropôle Grand Sud-Ouest (A.L), the Association pour la Recherche sur les Tumeurs Cérébrales (A.L) and the THE program from Plan Cancer 2016 (MoGlimaging). L.M and S.B were supported by a PhD fellowship from Plan Cancer/ITMO, P.D by a government PhD fellowship and J.S by a PhD fellowship from Ligue Nationale Contre le Cancer.

CONFLICTS OF INTEREST

None.

REFERENCES

1. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016; 131:803–20.
2. Brandes AA, Tosoni A, Franceschi E, Reni M, Gatta G, Vecht C. Glioblastoma in adults. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2008; 67:139–52.
3. Weller M, van den Bent M, Hopkins K, Tonn JC, Stupp R, Falini A, Cohen-Jonathan-Moyal E, Frappaz D, Henriksson R, Balana C, Chinot O, Ram Z, Reifenberger G, et al. EANO guideline for the diagnosis and treatment of anaplastic gliomas and glioblastoma. *Lancet Oncology.* 2014; 15:e395–403.
4. Karsy M, Guan J, Cohen AL, Jensen RL, Colman H. New Molecular Considerations for Glioma: IDH, ATRX, BRAF, TERT, H3 K27M. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2017; 17:19.
5. Aldape K, Zadeh G, Mansouri S, Reifenberger G, von Deimling A. Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol.* 2015; 129:829–48.
6. van den Bent MJ, Weller M, Wen PY, Kros JM, Aldape K, Chang S. A clinical perspective on the 2016 WHO brain tumor classification and routine molecular diagnostics. *Neuro Oncol.* 2017.
7. Lathia JD, Mack SC, Mulkearns-Hubert EE, Valentim CL, Rich JN. Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes Dev.* 2015; 29:1203–17.
8. Clement V, Dutoit V, Marino D, Dietrich PY, Radovanovic I. Limits of CD133 as a marker of glioma self-renewing cells. *Int J Cancer.* 2009; 125:244–8.
9. Dahan P, Martinez Gala J, Delmas C, Monferran S, Malric L, Zentkowski D, Lubrano V, Toulas C, Cohen-Jonathan Moyal E, Lemarie A. Ionizing radiations sustain glioblastoma cell dedifferentiation to a stem-like phenotype through survivin: possible involvement in radioresistance. *Cell Death Dis.* 2014; 5:e1543.
10. Koukourakis MI, Mitrakas AG, Giatromanolaki A. Therapeutic interactions of autophagy with radiation and temozolomide in glioblastoma: evidence and issues to resolve. *Br J Cancer.* 2016; 114:485–96.
11. Guelfi S, Duffau H, Bauchet L, Rothhut B, Hugnot JP. Vascular Transdifferentiation in the CNS: A Focus on Neural and Glioblastoma Stem-Like Cells. *Stem Cells Int.* 2016; 2016:2759403.
12. Wu A, Wei J, Kong LY, Wang Y, Priebe W, Qiao W, Sawaya R, Heimberger AB. Glioma cancer stem cells induce immunosuppressive macrophages/microglia. *Neuro Oncol.* 2010; 12:1113–25.
13. 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.* 2009; 8:3274–84.
14. Fessler E, Borovski T, Medema JP. Endothelial cells induce cancer stem cell features in differentiated glioblastoma cells via bFGF. *Mol Cancer.* 2015; 14:157.
15. Li Y, Li A, Glas M, Lal B, Ying M, Sang Y, Xia S, Trageser D, Guerrero-Cazares H, Eberhart CG, Quinones-Hinojosa A, Scheffler B, Lathia J. c-Met signaling induces a reprogramming network and supports the glioblastoma stem-like phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011; 108:9951–6.
16. Fornara O, Bartek J, Jr., Rahbar A, Odeberg J, Khan Z, Peredo I, Hamerlik P, Bartek J, Stragliotto G, Landazuri N, Soderberg-Naucler C. Cytomegalovirus infection induces a stem cell phenotype in human primary glioblastoma cells: prognostic significance and biological impact. *Cell Death Differ.* 2016.
17. Auffinger B, Tobias AL, Han Y, Lee G, Guo D, Dey M, Lesniak MS, Ahmed AU. Conversion of differentiated cancer cells into cancer stem-like cells in a glioblastoma model after primary chemotherapy. *Cell Death Differ.* 2014; 21:1119–31.
18. Safa AR, Saadatzadeh MR, Cohen-Gadol AA, Pollok KE, Bijangi-Vishehsaraei K. Glioblastoma stem cells (GSCs) epigenetic plasticity and interconversion between differentiated non-GSCs and GSCs. *Genes Dis.* 2015; 2:152–63.
19. Lathia JD, Heddleston JM, Venere M, Rich JN. Deadly teamwork: neural cancer stem cells and the tumor microenvironment. *Cell Stem Cell.* 2011; 8:482–5.
20. Mack SC, Hubert CG, Miller TE, Taylor MD, Rich JN. An epigenetic gateway to brain tumor cell identity. *Nat Neurosci.* 2016; 19:10–9.
21. Humphries MJ. Integrin structure. *Biochem Soc Trans.* 2000; 28:311–39.
22. Takada Y, Ye X, Simon S. The integrins. *Genome Biol.* 2007; 8:215.
23. Hehlhans S, Haase M, Cordes N. Signalling via integrins: implications for cell survival and anticancer strategies. *Biochim Biophys Acta.* 2007; 1775:163–80.

24. Desgrosellier JS, Cheresh DA. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer*. 2010; 10:9–22.
25. Ducassou A, Uro-Coste E, Verrelle P, Filleron T, Benouaich-Amiel A, Lubrano V, Sol JC, Delisle MB, Favre G, Ken S, Laprie A, De Porre P, Toulas C, et al. α 3 Integrin and Fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1): Prognostic factors in a phase I-II clinical trial associating continuous administration of Tipifarnib with radiotherapy for patients with newly diagnosed glioblastoma. *Eur J Cancer*. 2013; 49:2161–9.
26. Ata R, Antonescu CN. Integrins and Cell Metabolism: An Intimate Relationship Impacting Cancer. *Int J Mol Sci*. 2017; 18.
27. Autelitano F, Loyaux D, Roudieres S, Deon C, Guette F, Fabre P, Ping Q, Wang S, Auvergne R, Badarinarayana V, Smith M, Guillemot JC, Goldman SA, et al. Identification of novel tumor-associated cell surface sialoglycoproteins in human glioblastoma tumors using quantitative proteomics. *PLoS One*. 2014; 9:e110316.
28. Onodera Y, Nam JM, Sabe H. Intracellular trafficking of integrins in cancer cells. *Pharmacol Ther*. 2013; 140:1–9.
29. Streuli CH, Akhtar N. Signal co-operation between integrins and other receptor systems. *Biochem J*. 2009; 418:491–506.
30. Avraamides CJ, Garmy-Susini B, Varner JA. Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2008; 8:604–17.
31. Kast RE, Skuli N, Karpel-Massler G, Frosina G, Ryken T, Halatsch ME. Blocking epithelial-to-mesenchymal transition in glioblastoma with a sextet of repurposed drugs: the EIS regimen. *Oncotarget*. 2017.
32. Renner G, Noulet F, Mercier MC, Choulier L, Etienne-Selloum N, Gies JP, Lehmann M, Lelong-Rebel I, Martin S, Dontenwill M. Expression/activation of α 5beta1 integrin is linked to the beta-catenin signaling pathway to drive migration in glioma cells. *Oncotarget*. 2016; 7:62194–62207. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11552>.
33. Stupp R, Hegi ME, Gorlia T, Erridge SC, Perry J, Hong YK, Aldape KD, Lhermitte B, Pietsch T, Grujicic D, Steinbach JP, Wick W, Tarnawski R, 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*. 2014.
34. Gladson CL, Wilcox JN, Sanders L, Gillespie GY, Cheresh DA. Cerebral microenvironment influences expression of the vitronectin gene in astrocytic tumors. *J Cell Sci*. 1995; 108:947–56.
35. Roth P, Silginer M, Goodman SL, Hasenbach K, Thies S, Maurer G, Schraml P, Tabatabai G, Moch H, Tritschler I, Weller M. Integrin control of the transforming growth factor-beta pathway in glioblastoma. *Brain*. 2013; 136:564–76.
36. Serres E, Debarbieux F, Stanchi F, Maggiorella L, Grall D, Turchi L, Burel-Vandenbos F, Figarella-Branger D, Virolle T, Rougon G, Van Obberghen-Schilling E. Fibronectin expression in glioblastomas promotes cell cohesion, collective invasion of basement membrane *in vitro* and orthotopic tumor growth in mice. *Oncogene*. 2014; 33:3451–62.
37. Delamarre E, Taboubi S, Mathieu S, Berenguer C, Rigot V, Lissitzky JC, Figarella-Branger D, Ouafik L, Luis J. Expression of integrin α 6beta1 enhances tumorigenesis in glioma cells. *Am J Pathol*. 2009; 175:844–55.
38. Gingras MC, Roussel E, Bruner JM, Branch CD, Moser RP. Comparison of cell adhesion molecule expression between glioblastoma multiforme and autologous normal brain tissue. *J Neuroimmunol*. 1995; 57:143–53.
39. Schittenhelm J, Schwab EI, Sperveslage J, Tatagiba M, Meyermann R, Fend F, Goodman SL, Sipos B. Longitudinal expression analysis of α 3 integrins in human gliomas reveals upregulation of integrin α 3beta3 as a negative prognostic factor. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2013; 72:194–210.
40. Riemenschneider MJ, Mueller W, Betensky RA, Mohapatra G, Louis DN. *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*. 2005; 167:1379–87.
41. Haas TL, Sciuto MR, Brunetto L, Valvo C, Signore M, Fiori ME, di Martino S, Giannetti S, Morgante L, Boe A, Patrizii M, Warnken U, Scholzer M, et al. Integrin α 7 Is a Functional Marker and Potential Therapeutic Target in Glioblastoma. *Cell Stem Cell*. 2017; 21:35–50 e9.
42. 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 α 5beta1 plays a critical role in resistance to temozolomide by interfering with the p53 pathway in high-grade glioma. *Cancer Res*. 2012; 72:3463–70.
43. Zhou P, Erfani S, Liu Z, Jia C, Chen Y, Xu B, Deng X, Alfaro JE, Chen L, Napier D, Lu M, Huang JA, Liu C, et al. CD151- α 3beta1 integrin complexes are prognostic markers of glioblastoma and cooperate with EGFR to drive tumor cell motility and invasion. *Oncotarget*. 2015; 6:29675–93. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4896>.
44. Cancer Genome Atlas Research N. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*. 2008; 455:1061–8.
45. Mallawaarachy DM, Buckland ME, McDonald KL, Li CC, Ly L, Sykes EK, Christopherson RI, Kaufman KL. Membrane proteome analysis of glioblastoma cell invasion. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2015; 74:425–41.
46. Virga J, Bognar L, Hortobagyi T, Zahuczky G, Csoz E, Kallo G, Toth J, Hutoczi G, Remenyi-Puskar J, Steiner L, Klekner A. Prognostic Role of the Expression of Invasion-Related Molecules in Glioblastoma. *J Neurol Surg A Cent Eur Neurosurg*. 2017; 78:12–9.
47. Lathia JD, Li M, Sinyuk M, Alvarado AG, Flavahan WA, Stoltz K, Rosager AM, Hale J, Hitomi M, Gallagher J,

- Wu Q, Martin J, Vidal JG, et al. High-throughput flow cytometry screening reveals a role for junctional adhesion molecule a as a cancer stem cell maintenance factor. *Cell Rep*. 2014; 6:117–29.
48. Lathia JD, Gallagher J, Heddleston JM, Wang J, Eyler CE, Macswords J, Wu Q, Vasanji A, McLendon RE, Hjelmeland AB, Rich JN. Integrin alpha 6 regulates glioblastoma stem cells. *Cell Stem Cell*. 2010; 6:421–32.
 49. Hu Y, Ylivinkka I, Chen P, Li L, Hautaniemi S, Nyman TA, Keski-Oja J, Hyytiainen M. Netrin-4 promotes glioblastoma cell proliferation through integrin beta4 signaling. *Neoplasia*. 2012; 14:219–27.
 50. Weller M, Nabors LB, Gorlia T, Leske H, Rushing E, Bady P, Hicking C, Perry J, Hong YK, Roth P, Wick W, Goodman SL, Hegi ME, et al. Cilengitide in newly diagnosed glioblastoma: biomarker expression and outcome. *Oncotarget*. 2016; 7:15018–32. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7588>.
 51. Mustafa DA, Dekker LJ, Stingl C, Kremer A, Stoop M, Sillevius Smitt PA, Kros JM, Luidert TM. A proteome comparison between physiological angiogenesis and angiogenesis in glioblastoma. *Mol Cell Proteomics*. 2012; 11:M111 008466.
 52. Uhlen M, Fagerberg L, Hallstrom BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, Sivertsson A, Kampf C, Sjostedt E, Asplund A, Olsson I, Edlund K, Lundberg E, et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science*. 2015; 347:1260419.
 53. Verhaak RG, 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.
 54. Sottoriva A, Spiteri I, Piccirillo SG, Touloumis A, Collins VP, Marioni JC, Curtis C, Watts C, Tavaré S. Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013; 110:4009–14.
 55. Patel AP, Tirosh I, Trombetta JJ, Shalek AK, Gillespie SM, Wakimoto H, Cahill DP, Nahed BV, Curry WT, Martuza RL, Louis DN, Rozenblatt-Rosen O, Suva ML, et al. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science*. 2014; 344:1396–401.
 56. Cusulin C, Chesnelong C, Bose P, Bilenky M, Kopciuk K, Chan JA, Cairncross JG, Jones SJ, Marra MA, Luchman HA, Weiss S. Precursor States of Brain Tumor Initiating Cell Lines Are Predictive of Survival in Xenografts and Associated with Glioblastoma Subtypes. *Stem Cell Reports*. 2015; 5:1–9.
 57. Gunther HS, Schmidt NO, Phillips HS, Kemming D, Kharbanda S, Soriano R, Modrusan Z, Meissner H, Westphal M, Lamszus K. Glioblastoma-derived stem cell-enriched cultures form distinct subgroups according to molecular and phenotypic criteria. *Oncogene*. 2008; 27:2897–909.
 58. Brennan CW, Verhaak RG, McKenna A, Campos B, Nounshmehr H, Salama SR, Zheng S, Chakravarty D, Sanborn JZ, Berman SH, Beroukheim R, Bernard B, Wu CJ, et al. The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell*. 2013; 155:462–77.
 59. Ceccarelli M, Barthel FP, Malta TM, Sabedot TS, Salama SR, Murray BA, Morozova O, Newton Y, Radenbaugh A, Pagnotta SM, Anjum S, Wang J, Manyam G, et al. Molecular Profiling Reveals Biologically Discrete Subsets and Pathways of Progression in Diffuse Glioma. *Cell*. 2016; 164:550–63.
 60. Wang Q, Hu B, Hu X, Kim H, Squatrito M, Scarpace L, deCarvalho AC, Lyu S, Li P, Li Y, Barthel F, Cho HJ, Lin YH, et al. Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment. *Cancer Cell*. 2017; 32:42–56 e6.
 61. Wang J, Cazzato E, Ladewig E, Frattini V, Rosenbloom DI, Zairis S, Abate F, Liu Z, Elliott O, Shin YJ, Lee JK, Lee IH, Park WY, et al. Clonal evolution of glioblastoma under therapy. *Nat Genet*. 2016; 48:768–76.
 62. Maglott A, Bartik P, Cosgun S, Klotz P, Ronde P, Fuhrmann G, Takeda K, Martin S, Dontenwill M. The small alpha5beta1 integrin antagonist, SJ749, reduces proliferation and clonogenicity of human astrocytoma cells. *Cancer Res*. 2006; 66:6002–7.
 63. Choy CT, Kim H, Lee JY, Williams DM, Palethorpe D, Fellows G, Wright AJ, Laing K, Bridges LR, Howe FA, Kim SH. Anosmin-1 contributes to brain tumor malignancy through integrin signal pathways. *Endocr Relat Cancer*. 2014; 21:85–99.
 64. Sayyah J, Bartakova A, Nogal N, Quilliam LA, Stupack DG, Brown JH. The Ras-related protein, Rap1A, mediates thrombin-stimulated, integrin-dependent glioblastoma cell proliferation and tumor growth. *J Biol Chem*. 2014; 289:17689–98.
 65. Ding Q, Stewart J, Jr., Prince CW, Chang PL, Trikha M, Han X, Grammer JR, Gladson CL. Promotion of malignant astrocytoma cell migration by osteopontin expressed in the normal brain: differences in integrin signaling during cell adhesion to osteopontin versus vitronectin. *Cancer Res*. 2002; 62:5336–43.
 66. Mikheev AM, Mikheeva SA, Trister AD, Tokita MJ, Emerson SN, Parada CA, Born DE, Carnemolla B, Frankel S, Kim DH, Oxford RG, Kosai Y, Tozer-Fink KR, et al. Periostin is a novel therapeutic target that predicts and regulates glioma malignancy. *Neuro Oncol*. 2015; 17:372–82.
 67. Lawson CD, Burridge K. The on-off relationship of Rho and Rac during integrin-mediated adhesion and cell migration. *Small GTPases*. 2014; 5:e27958.
 68. Scaringi C, Minniti G, Caporello P, Enrici RM. Integrin inhibitor cilengitide for the treatment of glioblastoma: a brief overview of current clinical results. *Anticancer Res*. 2012; 32:4213–23.

69. Velpula KK, Rehman AA, Chelluboina B, Dasari VR, Gondi CS, Rao JS, Veeravalli KK. Glioma stem cell invasion through regulation of the interconnected ERK, integrin alpha6 and N-cadherin signaling pathway. *Cell Signal*. 2012; 24:2076–84.
70. Kawataki T, Yamane T, Naganuma H, Rousselle P, Anduren I, Tryggvason K, Patarroyo M. Laminin isoforms and their integrin receptors in glioma cell migration and invasiveness: Evidence for a role of alpha5-laminin(s) and alpha3beta1 integrin. *Exp Cell Res*. 2007; 313:3819–31.
71. Nakada M, Nambu E, Furuyama N, Yoshida Y, Takino T, Hayashi Y, Sato H, Sai Y, Tsuji T, Miyamoto KI, Hirao A, Hamada JI. Integrin alpha3 is overexpressed in glioma stem-like cells and promotes invasion. *Br J Cancer*. 2013; 108:2516–24.
72. Veeravalli KK, Ponnala S, Chetty C, Tsung AJ, Gujrati M, Rao JS. Integrin alpha9beta1-mediated cell migration in glioblastoma via SSAT and Kir4.2 potassium channel pathway. *Cell Signal*. 2012; 24:272–81.
73. Reyes SB, Narayanan AS, Lee HS, Tchaicha JH, Aldape KD, Lang FF, Toliaf KF, McCarty JH. alphavbeta8 integrin interacts with RhoGDI1 to regulate Rac1 and Cdc42 activation and drive glioblastoma cell invasion. *Mol Biol Cell*. 2013; 24:474–82.
74. Tchaicha JH, Reyes SB, Shin J, Hossain MG, Lang FF, McCarty JH. Glioblastoma angiogenesis and tumor cell invasiveness are differentially regulated by beta8 integrin. *Cancer Res*. 2011; 71:6371–81.
75. Kesanakurti D, Chetty C, Dinh DH, Gujrati M, Rao JS. Role of MMP-2 in the regulation of IL-6/Stat3 survival signaling via interaction with alpha5beta1 integrin in glioma. *Oncogene*. 2013; 32:327–40.
76. Zhang M, Ye G, Li J, Wang Y. Recent advance in molecular angiogenesis in glioblastoma: the challenge and hope for anti-angiogenic therapy. *Brain Tumor Pathol*. 2015; 32:229–36.
77. Friedlander M, Brooks PC, Shaffer RW, Kincaid CM, Varner JA, Cheresch DA. Definition of two angiogenic pathways by distinct alpha v integrins. *Science*. 1995; 270:1500–2.
78. Maddirela DR, Kesanakurti D, Gujrati M, Rao JS. MMP-2 suppression abrogates irradiation-induced microtubule formation in endothelial cells by inhibiting alphavbeta3-mediated SDF-1/CXCR4 signaling. *Int J Oncol*. 2013; 42:1279–88.
79. Chang Y, Li L, Zhang L, Guo X, Feng Z, Zhou J, Zhou S, Feng G, Han F, Huang W, Yang J, Huang F. Plexin-B1 indirectly affects glioma invasiveness and angiogenesis by regulating the RhoA/alphavbeta3 signaling pathway and SRPK1. *Tumour Biol*. 2016; 37:11225–36.
80. Mikelis C, Sfaelou E, Koutsoumpa M, Kieffer N, Papadimitriou E. Integrin alpha(v)beta(3) is a pleiotrophin receptor required for pleiotrophin-induced endothelial cell migration through receptor protein tyrosine phosphatase beta/zeta. *FASEB J*. 2009; 23:1459–69.
81. Burgett ME, Lathia JD, Roth P, Nowacki AS, Galileo DS, Pugacheva E, Huang P, Vasanji A, Li M, Byzova T, Mikkelsen T, Bao S, Rich JN, et al. Direct contact with perivascular tumor cells enhances integrin alphavbeta3 signaling and migration of endothelial cells. *Oncotarget*. 2016; 7:43852–67. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9700>.
82. Lee HS, Oh SJ, Lee KH, Lee YS, Ko E, Kim KE, Kim HC, Kim S, Song PH, Kim YI, Kim C, Han S. Gln-362 of angiotensin-2 mediates migration of tumor and endothelial cells through association with alpha5beta1 integrin. *J Biol Chem*. 2014; 289:31330–40.
83. Walsh EM, Kim R, Del Valle L, Weaver M, Sheffield J, Lazarovici P, Marcinkiewicz C. Importance of interaction between nerve growth factor and alpha9beta1 integrin in glial tumor angiogenesis. *Neuro Oncol*. 2012; 14:890–901.
84. Stupack DG, Teitz T, Potter MD, Mikolon D, Houghton PJ, Kidd VJ, Lahti JM, Cheresch DA. Potentiation of neuroblastoma metastasis by loss of caspase-8. *Nature*. 2006; 439:95–9.
85. Silgner M, Weller M, Ziegler U, Roth P. Integrin inhibition promotes atypical anoikis in glioma cells. *Cell Death Dis*. 2014; 5:e1012.
86. Franovic A, Elliott KC, Seguin L, Camargo MF, Weis SM, Cheresch DA. Glioblastomas require integrin alphavbeta3/PAK4 signaling to escape senescence. *Cancer Res*. 2015; 75:4466–73.
87. Wild-Bode C, Weller M, Rimmer A, Dichgans J, Wick W. Sublethal irradiation promotes migration and invasiveness of glioma cells: implications for radiotherapy of human glioblastoma. *Cancer Res*. 2001; 61:2744–50.
88. Hikawa T, Mori T, Abe T, Hori S. The ability in adhesion and invasion of drug-resistant human glioma cells. *J Exp Clin Cancer Res*. 2000; 19:357–62.
89. Han S, Li Z, Master LM, Master ZW, Wu A. Exogenous IGFBP-2 promotes proliferation, invasion, and chemoresistance to temozolomide in glioma cells via the integrin beta1-ERK pathway. *Br J Cancer*. 2014; 111:1400–9.
90. Li L, Hu Y, Ylivinkka I, Li H, Chen P, Keski-Oja J, Hyytiainen M. NETRIN-4 protects glioblastoma cells FROM temozolomide induced senescence. *PLoS One*. 2013; 8:e80363.
91. Renner G, Janouskova H, Noulet F, Koenig V, Guerin E, Bar S, Nuesch J, Rechenmacher F, Neubauer S, Kessler H, Blandin AF, Choulier L, Etienne-Selloum N, et al. Integrin alpha5beta1 and p53 convergent pathways in the control of anti-apoptotic proteins PEA-15 and survivin in high-grade glioma. *Cell Death Differ*. 2016; 23:640–53.
92. Park SY, Piao Y, Jeong KJ, Dong J, de Groot JF. Periostin (POSTN) Regulates Tumor Resistance to Antiangiogenic Therapy in Glioma Models. *Mol Cancer Ther*. 2016; 15:2187–97.
93. Meyer M, Reimand J, Lan X, Head R, Zhu X, Kushida M, Bayani J, Pressey JC, Lionel AC, Clarke ID, Cusimano M,

- Squire JA, Scherer SW, et al. Single cell-derived clonal analysis of human glioblastoma links functional and genomic heterogeneity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015; 112:851–6.
94. Monferran S, Skuli N, Delmas C, Favre G, Bonnet J, Cohen-Jonathan-Moyal E, Toulas C. Alphasbeta3 and alphasbeta5 integrins control glioma cell response to ionising radiation through ILK and RhoB. *Int J Cancer*. 2008; 123:357–64.
 95. Mikkelsen T, Brodie C, Finniss S, Berens ME, Rennert JL, Nelson K, Lemke N, Brown SL, Hahn D, Neuteboom B, Goodman SL. Radiation sensitization of glioblastoma by cilengitide has unanticipated schedule-dependency. *Int J Cancer*. 2009; 124:2719–27.
 96. Cordes N, Seidler J, Durzok R, Geinitz H, Brakebusch C. beta1-integrin-mediated signaling essentially contributes to cell survival after radiation-induced genotoxic injury. *Oncogene*. 2006; 25:1378–90.
 97. Vehlow A, Klapproth E, Storch K, Dickreuter E, Seifert M, Dietrich A, Butof R, Temme A, Cordes N. Adhesion- and stress-related adaptation of glioma radiochemoresistance is circumvented by beta1 integrin/JNK co-targeting. *Oncotarget*. 2017; 8:49224–49237. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17480>.
 98. Lim ST, Chen XL, Lim Y, Hanson DA, Vo TT, Howerton K, Larocque N, Fisher SJ, Schlaepfer DD, Ilic D. Nuclear FAK promotes cell proliferation and survival through FERM-enhanced p53 degradation. *Mol Cell*. 2008; 29:9–22.
 99. Matter ML, Ruoslahti E. A signaling pathway from the alpha5beta1 and alpha(v)beta3 integrins that elevates bcl-2 transcription. *J Biol Chem*. 2001; 276:27757–63.
 100. Guvenc H, Pavlyukov MS, Joshi K, Kurt H, Banasavadi-Siddegowda YK, Mao P, Hong C, Yamada R, Kwon CH, Bhasin D, Chettiar S, Kitange G, Park IH, et al. Impairment of glioma stem cell survival and growth by a novel inhibitor for Survivin-Ran protein complex. *Clin Cancer Res*. 2013; 19:631–42.
 101. Lanvin O, Monferran S, Delmas C, Couderc B, Toulas C, Cohen-Jonathan-Moyal E. Radiation-induced mitotic cell death and glioblastoma radioresistance: a new regulating pathway controlled by integrin-linked kinase, hypoxia-inducible factor 1 alpha and survivin in U87 cells. *Eur J Cancer*. 2013; 49:2884–91.
 102. Hausmann C, Temme A, Cordes N, Eke I. ILKAP, ILK and PINCH1 control cell survival of p53-wildtype glioblastoma cells after irradiation. *Oncotarget*. 2015; 6:34592–605. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5423>.
 103. Wang P, Ballestrem C, Streuli CH. The C terminus of talin links integrins to cell cycle progression. *J Cell Biol*. 2011; 195:499–513.
 104. Kremer CL, Schmelz M, Cress AE. Integrin-dependent amplification of the G2 arrest induced by ionizing radiation. *Prostate*. 2006; 66:88–96.
 105. Lee SH, Cheng H, Yuan Y, Wu S. Regulation of ionizing radiation-induced adhesion of breast cancer cells to fibronectin by alpha5beta1 integrin. *Radiat Res*. 2014; 181:650–8.
 106. Eke I, Zscheppang K, Dickreuter E, Hickmann L, Mazzeo E, Unger K, Krause M, Cordes N. Simultaneous beta1 integrin-EGFR targeting and radiosensitization of human head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2015; 107.
 107. Seguin L, Desgrosellier JS, Weis SM, Cheresch DA. Integrins and cancer: regulators of cancer stemness, metastasis, and drug resistance. *Trends Cell Biol*. 2015; 25: 234–40.
 108. Tilghman J, Schiapparelli P, Lal B, Ying M, Quinones-Hinojosa A, Xia S, Laterra J. Regulation of Glioblastoma Tumor-Propagating Cells by the Integrin Partner Tetraspanin CD151. *Neoplasia*. 2016; 18:185–98.
 109. Edwards LA, Woolard K, Son MJ, Li A, Lee J, Ene C, Mantey SA, Maric D, Song H, Belova G, Jensen RT, Zhang W, Fine HA. Effect of brain- and tumor-derived connective tissue growth factor on glioma invasion. *J Natl Cancer Inst*. 2011; 103:1162–78.
 110. Munger JS, Sheppard D. Cross talk among TGF-beta signaling pathways, integrins, and the extracellular matrix. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011; 3:a005017.
 111. Joseph JV, Balasubramaniyan V, Walenkamp A, Kruyt FA. TGF-beta as a therapeutic target in high grade gliomas - promises and challenges. *Biochem Pharmacol*. 2013; 85:478–85.
 112. Hardee ME, Marciscano AE, Medina-Ramirez CM, Zagzag D, Narayana A, Lonning SM, Barcellos-Hoff MH. Resistance of glioblastoma-initiating cells to radiation mediated by the tumor microenvironment can be abolished by inhibiting transforming growth factor-beta. *Cancer Res*. 2012; 72:4119–29.
 113. Chen R, Nishimura MC, Bumbaca SM, Kharbanda S, Forrest WF, Kasman IM, Greve JM, Soriano RH, Gilmour LL, Rivers CS, Modrusan Z, Nacu S, Guerrero S, et al. A hierarchy of self-renewing tumor-initiating cell types in glioblastoma. *Cancer Cell*. 2010; 17:362–75.
 114. Schulte A, Gunther HS, Phillips HS, Kemming D, Martens T, Kharbanda S, Soriano RH, Modrusan Z, Zapf S, Westphal M, Lamszus K. A distinct subset of glioma cell lines with stem cell-like properties reflects the transcriptional phenotype of glioblastomas and overexpresses CXCR4 as therapeutic target. *Glia*. 2011; 59:590–602.
 115. Xie Y, Bergstrom T, Jiang Y, Johansson P, Marinescu VD, Lindberg N, Segerman A, Wicher G, Niklasson M, Baskaran S, Sreedharan S, Everlien I, Kastemar M, et al. The Human Glioblastoma Cell Culture Resource: Validated Cell Models Representing All Molecular Subtypes. *EBioMedicine*. 2015; 2:1351–63.
 116. Segerman A, Niklasson M, Haglund C, Bergstrom T, Jarvius M, Xie Y, Westermark A, Sonmez D, Hermansson A, Kastemar M, Naimaie-Ali Z, Nyberg F, Berglund M, et al. Clonal Variation in Drug and Radiation Response among Glioma-Initiating Cells Is Linked to Proneural-Mesenchymal Transition. *Cell Rep*. 2016; 17:2994–3009.
 117. Marziali G, Signore M, Buccarelli M, Grande S, Palma A, Biffoni M, Rosi A, D'Alessandris QG, Martini M, Larocca LM, De Maria R, Pallini R, Ricci-Vitiani L. Metabolic/Proteomic Signature Defines Two Glioblastoma Subtypes With Different Clinical Outcome. *Sci Rep*. 2016; 6: 21557.

118. McFarlane S, McFarlane C, Montgomery N, Hill A, Waugh DJ. CD44-mediated activation of alpha5beta1-integrin, cortactin and paxillin signaling underpins adhesion of basal-like breast cancer cells to endothelium and fibronectin-enriched matrices. *Oncotarget*. 2015; 6:36762–73. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5461>.
119. Marziali G, Buccarelli M, Giuliani A, Ilari R, Grande S, Palma A, D'Alessandris QG, Martini M, Biffoni M, Pallini R, Ricci-Vitiani L. A three-microRNA signature identifies two subtypes of glioblastoma patients with different clinical outcomes. *Mol Oncol*. 2017.
120. Zawistowski JS, Nakamura K, Parker JS, Granger DA, Golitz BT, Johnson GL. MicroRNA 9-3p targets beta1 integrin to sensitize claudin-low breast cancer cells to MEK inhibition. *Mol Cell Biol*. 2013; 33:2260–74.
121. Ruiz-Ontanon P, Orgaz JL, Aldaz B, Elosegui-Artola A, Martino J, Berciano MT, Montero JA, Grande L, Nogueira L, Diaz-Moralli S, Esparis-Ogando A, Vazquez-Barquero A, Lafarga M, et al. Cellular plasticity confers migratory and invasive advantages to a population of glioblastoma-initiating cells that infiltrate peritumoral tissue. *Stem Cells*. 2013; 31:1075–85.
122. Brooks DL, Schwab LP, Krutilina R, Parke DN, Sethuraman A, Hoogewijs D, Schorg A, Gotwald L, Fan M, Wenger RH, Seagroves TN. ITGA6 is directly regulated by hypoxia-inducible factors and enriches for cancer stem cell activity and invasion in metastatic breast cancer models. *Mol Cancer*. 2016; 15:26.
123. Cowden Dahl KD, Robertson SE, Weaver VM, Simon MC. Hypoxia-inducible factor regulates alpha5beta3 integrin cell surface expression. *Mol Biol Cell*. 2005; 16:1901–12.
124. Liu Z, Han L, Dong Y, Tan Y, Li Y, Zhao M, Xie H, Ju H, Wang H, Zhao Y, Zheng Q, Wang Q, Su J, et al. EGFRvIII/integrin beta3 interaction in hypoxic and vitronectin-enriching microenvironment promote GBM progression and metastasis. *Oncotarget*. 2016; 7:4680–94. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6730>.
125. Skuli N, Monferran S, Delmas C, Favre G, Bonnet J, Toulas C, Cohen-Jonathan Moyal E. Alpha5beta3/alpha5beta5 integrins-FAK-RhoB: a novel pathway for hypoxia regulation in glioblastoma. *Cancer Res*. 2009; 69:3308–16.
126. Lin HY, Sun M, Tang HY, Lin C, Luidens MK, Mousa SA, Incerpi S, Drusano GL, Davis FB, Davis PJ. L-Thyroxine vs. 3,5,3'-triiodo-L-thyronine and cell proliferation: activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2009; 296:C980–91.
127. Xu CS, Wang ZF, Huang XD, Dai LM, Cao CJ, Li ZQ. Involvement of ROS-alpha v beta 3 integrin-FAK/Pyk2 in the inhibitory effect of melatonin on U251 glioma cell migration and invasion under hypoxia. *J Transl Med*. 2015; 13:95.
128. Edwards LA, Woo J, Huxham LA, Verreault M, Dragowska WH, Chiu G, Rajput A, Kyle AH, Kalra J, Yapp D, Yan H, Minchinton AI, Huntsman D, et al. Suppression of VEGF secretion and changes in glioblastoma multiforme microenvironment by inhibition of integrin-linked kinase (ILK). *Mol Cancer Ther*. 2008; 7:59–70.
129. Satoh E, Naganuma H, Sasaki A, Nagasaka M, Ogata H, Nukui H. Effect of irradiation on transforming growth factor-beta secretion by malignant glioma cells. *J Neurooncol*. 1997; 33:195–200.
130. Zhang M, Kleber S, Rohrich M, Timke C, Han N, Tuettenberg J, Martin-Villalba A, Debus J, Peschke P, Wirkner U, Lahn M, Huber PE. Blockade of TGF-beta signaling by the TGFbetaR-I kinase inhibitor LY2109761 enhances radiation response and prolongs survival in glioblastoma. *Cancer Res*. 2011; 71:7155–67.
131. Silginer M, Burghardt I, Gramatzki D, Bunse L, Leske H, Rushing EJ, Hao N, Platten M, Weller M, Roth P. The aryl hydrocarbon receptor links integrin signaling to the TGF-beta pathway. *Oncogene*. 2016; 35:3260–71.
132. Schmid MC, Franco I, Kang SW, Hirsch E, Quilliam LA, Varner JA. PI3-kinase gamma promotes Rap1a-mediated activation of myeloid cell integrin alpha4beta1, leading to tumor inflammation and growth. *PLoS One*. 2013; 8:e60226.
133. Ellert-Miklaszewska A, Wisniewski P, Kijewska M, Gajdanowicz P, Psczolkowska D, Przanowski P, Dabrowski M, Maleszewska M, Kaminska B. Tumour-processed osteopontin and lactadherin drive the protumorigenic reprogramming of microglia and glioma progression. *Oncogene*. 2016; 35:6366–77.
134. Zhou W, Ke SQ, Huang Z, Flavahan W, Fang X, Paul J, Wu L, Sloan AE, McLendon RE, Li X, Rich JN, Bao S. Periostin secreted by glioblastoma stem cells recruits M2 tumour-associated macrophages and promotes malignant growth. *Nat Cell Biol*. 2015; 17:170–82.
135. Qiang L, Wu T, Zhang HW, Lu N, Hu R, Wang YJ, Zhao L, Chen FH, Wang XT, You QD, Guo QL. HIF-1 alpha is critical for hypoxia-mediated maintenance of glioblastoma stem cells by activating Notch signaling pathway. *Cell Death Differ*. 2012; 19:284–94.
136. Tucci M, Stucci S, Silvestris F. Does cilengitide deserve another chance? *Lancet Oncology*. 2014; 15:E584–E5.
137. Battle MR, Goggi JL, Allen L, Barnett J, Morrison MS. Monitoring tumor response to antiangiogenic sunitinib therapy with 18F-fluciclatide, an 18F-labeled alphaVbeta3-integrin and alphaV beta5-integrin imaging agent. *J Nucl Med*. 2011; 52:424–30.
138. Lanzardo S, Conti L, Brioschi C, Bartolomeo MP, Arosio D, Belvisi L, Manzoni L, Maiocchi A, Maisano F, Forni G. A new optical imaging probe targeting alphaVbeta3 integrin in glioblastoma xenografts. *Contrast Media Mol Imaging*. 2011; 6:449–58.
139. Ma H, Hao P, Zhang L, Ma C, Yan P, Wang RF, Zhang CL. A new cyclic RGD peptide dimer for integrin alpha5beta3 imaging. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016; 20:613–9.
140. Veeravagu A, Liu Z, Niu G, Chen K, Jia B, Cai W, Jin C, Hsu AR, Connolly AJ, Tse V, Wang F, Chen X. Integrin

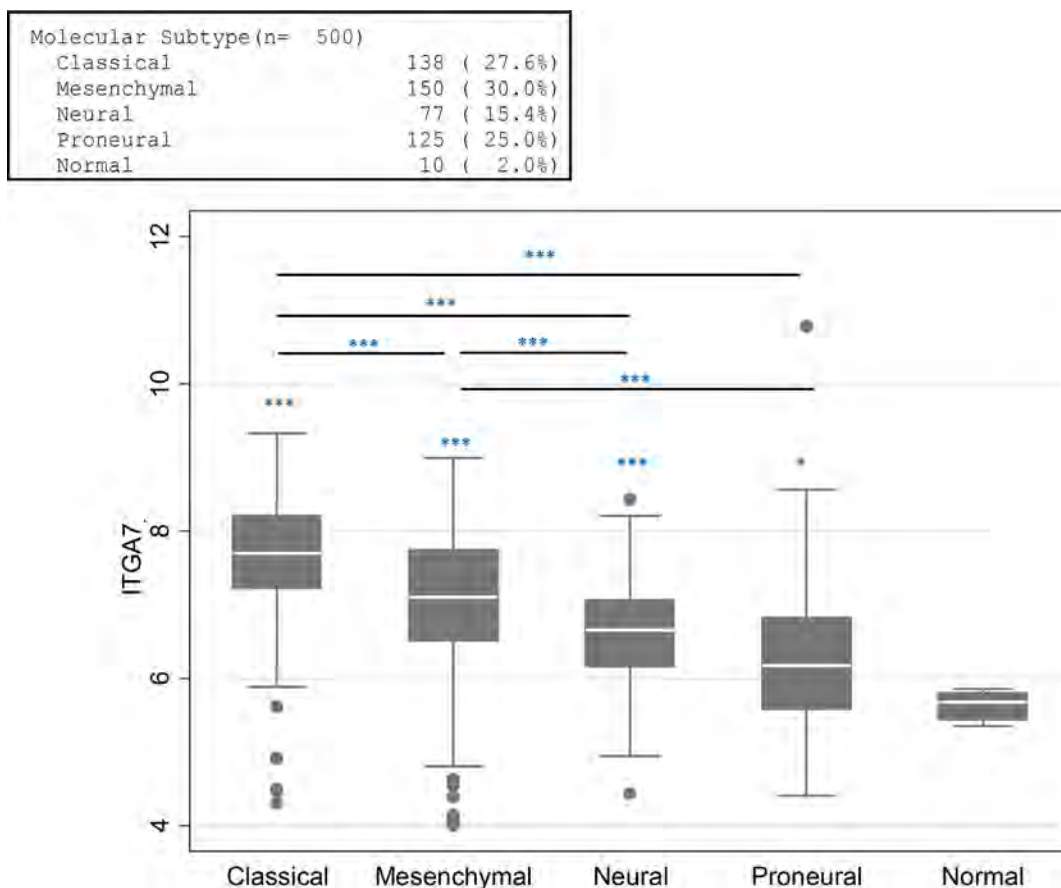
- alphavbeta3-targeted radioimmunotherapy of glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res.* 2008; 14:7330–9.
141. Cirkel GA, Kerklaan BM, Vanhoutte F, Van der Aa A, Lorenzon G, Namour F, Pujuguet P, Darquenne S, de Vos FY, Snijders TJ, Voest EE, Schellens JH, Lolkema MP. A dose escalating phase I study of GLPG0187, a broad spectrum integrin receptor antagonist, in adult patients with progressive high-grade glioma and other advanced solid malignancies. *Invest New Drugs.* 2016; 34:184–92.
 142. Reardon DA, Neyns B, Weller M, Tonn JC, Nabors LB, Stupp R. Cilengitide: an RGD pentapeptide alphanubeta3 and alphanubeta5 integrin inhibitor in development for glioblastoma and other malignancies. *Future Oncol.* 2011; 7:339–54.
 143. Hersey P, Sosman J, O'Day S, Richards J, Bedikian A, Gonzalez R, Sharfman W, Weber R, Logan T, Kirkwood JM. A phase II, randomized, open-label study evaluating the antitumor activity of MEDI-522, a humanized monoclonal antibody directed against the human alpha v beta 3 (avb3) integrin, ± dacarbazine (DTIC) in patients with metastatic melanoma (MM) ASCO Annual Meeting. 2005; 23:Abstract 16S.
 144. Almokadem S, Belani CP. Volociximab in cancer. *Expert Opin Biol Ther.* 2012; 12:251–7.
 145. Mateo J, Berlin J, de Bono JS, Cohen RB, Keedy V, Mugundu G, Zhang L, Abbattista A, Davis C, Gallo Stampino C, Borghaei H. A first-in-human study of the anti-alpha5beta1 integrin monoclonal antibody PF-04605412 administered intravenously to patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2014; 74:1039–46.
 146. Donate F, Parry GC, Shaked Y, Hensley H, Guan X, Beck I, Tel-Tsur Z, Plunkett ML, Manuia M, Shaw DE, Kerbel RS, Mazar AP. 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.* 2008; 14:2137–44.
 147. O'Day S, Pavlick A, Loquai C, Lawson D, Gutzmer R, Richards J, Schadendorf D, Thompson JA, Gonzalez R, Trefzer U, Mohr P, Ottensmeier C, Chao D, et al. A randomised, phase II study of intetumumab, an anti-alphav-integrin mAb, alone and with dacarbazine in stage IV melanoma. *Br J Cancer.* 2011; 105:346–52.
 148. Wirth M, Heidenreich A, Gschwend JE, Gil T, Zastrow S, Laniado M, Gerloff J, Zuhlsdorf M, Mordenti G, Uhl W, Lannert H. A multicenter phase I study of EMD 525797 (DI17E6), a novel humanized monoclonal antibody targeting alphav integrins, in progressive castration-resistant prostate cancer with bone metastases after chemotherapy. *Eur Urol.* 2014; 65:897–904.
 149. Semba T, Funahashi Y, Ono N, Yamamoto Y, Sugi NH, Asada M, Yoshimatsu K, Wakabayashi T. An angiogenesis inhibitor E7820 shows broad-spectrum tumor growth inhibition in a xenograft model: possible value of integrin alpha2 on platelets as a biological marker. *Clin Cancer Res.* 2004; 10:1430–8.
 150. Carbonell WS, DeLay M, Jahangiri A, Park CC, Aghi MK. beta1 integrin targeting potentiates antiangiogenic therapy and inhibits the growth of bevacizumab-resistant glioblastoma. *Cancer Res.* 2013; 73:3145–54.
 151. Nabors LB, Mikkelsen T, Rosenfeld SS, Hochberg F, Akella NS, Fisher JD, Cloud GA, Zhang Y, Carson K, Wittemer SM, Colevas AD, Grossman SA. Phase I and correlative biology study of cilengitide in patients with recurrent malignant glioma. *J Clin Oncol.* 2007; 25:1651–7.
 152. MacDonald TJ, Stewart CF, Kocak M, Goldman S, Ellenbogen RG, Phillips P, Lafond D, Poussaint TY, Kieran MW, Boyett JM, Kun LE. Phase I clinical trial of cilengitide in children with refractory brain tumors: Pediatric Brain Tumor Consortium Study PBTC-012. *J Clin Oncol.* 2008; 26:919–24.
 153. Gerstner ER, Ye X, Duda DG, Levine MA, Mikkelsen T, Kaley TJ, Olson JJ, Nabors BL, Ahluwalia MS, Wen PY, Jain RK, Batchelor TT, Grossman S. A phase I study of cediranib in combination with cilengitide in patients with recurrent glioblastoma. *Neuro Oncol.* 2015; 17:1386–92.
 154. Reardon DA, Fink KL, Mikkelsen T, Cloughesy TF, O'Neill A, Plotkin S, Glantz M, Ravin P, Raizer JJ, Rich KM, Schiff D, Shapiro WR, Burdette-Radoux S, et al. Randomized phase II study of cilengitide, an integrin-targeting arginine-glycine-aspartic acid peptide, in recurrent glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol.* 2008; 26:5610–7.
 155. Stupp R, Hegi ME, Neyns B, Goldbrunner R, Schlegel U, Clement PM, Grabenbauer GG, Ochsenbein AF, Simon M, Dietrich PY, Pietsch T, Hicking C, Tonn JC, 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.* 2010; 28:2712–8.
 156. Gilbert MR, Kuhn J, Lamborn KR, Lieberman F, Wen PY, Mehta M, Cloughesy T, Lassman AB, Deangelis LM, Chang S, Prados M. Cilengitide in patients with recurrent glioblastoma: the results of NABTC 03–02, a phase II trial with measures of treatment delivery. *J Neurooncol.* 2012; 106:147–53.
 157. Nabors LB, Mikkelsen T, Hegi ME, Ye X, Batchelor T, Lesser G, Peereboom D, Rosenfeld MR, Olsen J, Brem S, Fisher JD, Grossman SA. A safety run-in and randomized phase 2 study of cilengitide combined with chemoradiation for newly diagnosed glioblastoma (NABTT 0306). *Cancer.* 2012; 118:5601–7.
 158. MacDonald TJ, Vezina G, Stewart CF, Turner D, Pierson CR, Chen L, Pollack IF, Gajjar A, Kieran MW. 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 Oncol.* 2013; 15:1438–44.
 159. Nabors LB, Fink KL, Mikkelsen T, Grujicic D, Tarnawski R, Nam do H, Mazurkiewicz M, Salacz M,

Ashby L, Zagonel V, Depenni R, Perry JR, Hicking C, 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 Oncol.* 2015; 17:708–17.

160. Khasraw M, Lee A, McCowatt S, Kerestes Z, Buyse ME, Back M, Kichenadasse G, Ackland S, Wheeler H. Cilengitide with metronomic temozolomide, procarbazine, and standard radiotherapy in patients with glioblastoma and unmethylated MGMT gene promoter in ExCentric, an open-label phase II trial. *J Neurooncol.* 2016; 128:163–71.

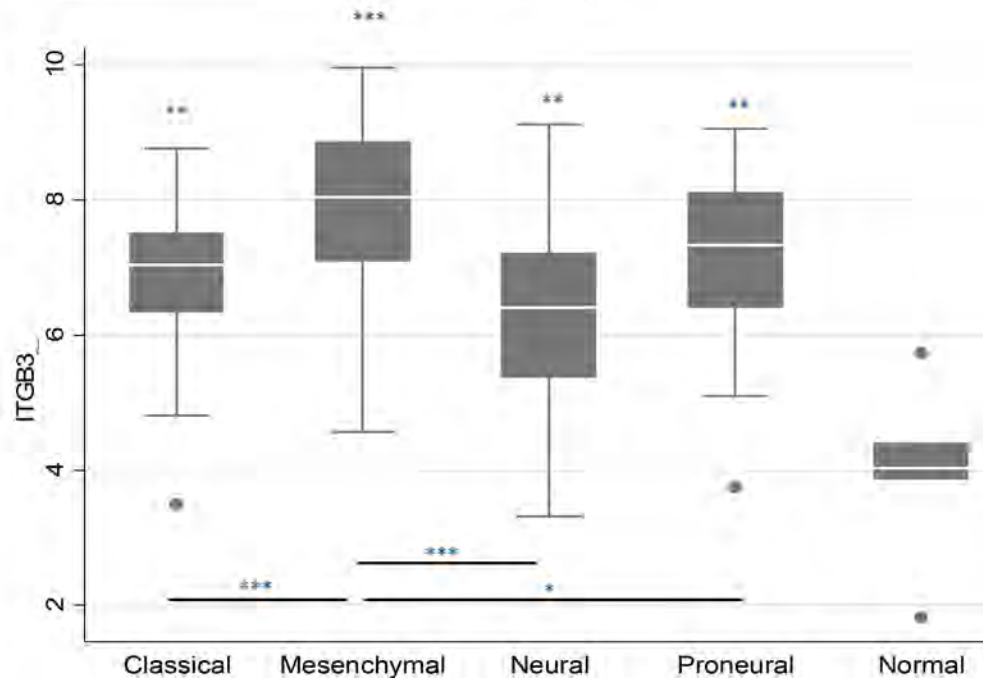
Interest of integrins targeting in glioblastoma according to tumor heterogeneity and cancer stem cell paradigm: an update

SUPPLEMENTARY MATERIALS



Supplementary Figure 1: Expression of *ITGA7* in TCGA GB samples according to their molecular subtypes. Plots were established using TCGA Affymetrix dataset ($n = 500$). $*p \leq 0.05$; $**p \leq 0.01$; $***p \leq 0.001$. When not stated, values are compared to the “normal” subgroup.

Molecular Subtype (n= 149)	
Classical	37 (24.8%)
Mesenchymal	47 (31.5%)
Neural	26 (17.4%)
Proneural	34 (22.8%)
Normal	5 (3.4%)



Supplementary Figure 2: Expression of *ITGB3* in TCGA GB samples according to their molecular subtypes. Expression plots were established using TCGA Illumina dataset, $n = 149$. $*p \leq 0.05$; $**p \leq 0.01$; $***p \leq 0.001$. When not stated, values are compared to the “normal” subgroup.

Supplementary Table 1: Expression of main integrins in TCGA GB samples in comparison with control brain tissues

A

	Solid Tissue Normal <i>N</i> = 10	Primary Tumor <i>N</i> = 490	
ITGB1 (<i>n</i> = 500)			<i>p</i> < 0.0001
Median	5.4	5.8	
(Range)	(5.2: 5.5)	(5.3: 6.4)	
ITGB3 (<i>n</i> = 500)			<i>p</i> = 0.5835
Median	4.2	4.2	
(Range)	(4.2: 4.3)	(3.9: 6.0)	
ITGB5 (<i>n</i> = 500)			<i>p</i> < 0.0001
Median	5.6	6.6	
(Range)	(5.4: 5.8)	(4.6: 8.8)	
ITGB8 (<i>n</i> = 500)			<i>p</i> < 0.0001
Median	4.4	5.3	
(Range)	(4.0: 4.8)	(3.8: 7.5)	
ITGA5 (<i>n</i> = 500)			<i>p</i> < 0.0001
Median	5.4	7.1	
(Range)	(5.0: 6.2)	(4.9: 10.3)	
ITGA6 (<i>n</i> = 500)			<i>p</i> = 0.0004
Median	6.3	7.1	
(Range)	(6.0: 6.8)	(4.2: 10.4)	
ITGA3 (<i>n</i> = 500)			<i>p</i> = 0.0097
Median	5.0	5.4	
(Range)	(4.7: 5.4)	(4.1: 9.8)	
ITGAV (<i>n</i> = 500)			<i>p</i> < 0.0001
Median	8.8	10.4	
(Range)	(8.4: 9.1)	(6.5: 12.5)	
ITGB4 (<i>n</i> = 500)			<i>p</i> = 0.0008
Median	4.5	4.9	
(Range)	(4.4: 4.7)	(4.1: 7.1)	
ITGA7 (<i>n</i> = 500)			<i>p</i> < 0.0001
Median	5.7	7.0	
(Range)	(5.4: 5.9)	(4.0: 10.8)	

B

	Solid Tissue Normal N= 5	Primary Tumor N= 144	
ITGB1 (<i>n</i> = 149)			<i>p</i> = 0.0006
Median	10.2	12.2	
(Range)	(9.8: 11.8)	(10.8: 14.3)	
ITGB3 (<i>n</i> = 149)			<i>p</i> = 0.0005
Median	4.0	7.3	
(Range)	(1.8: 5.7)	(3.3: 10.0)	
ITGB5 (<i>n</i> = 149)			<i>p</i> = 0.0029
Median	9.5	10.7	
(Range)	(9.3: 9.7)	(8.5: 12.5)	
ITGB8 (<i>n</i> = 149)			<i>p</i> = 0.0030
Median	10.7	12.2	
(Range)	(10.3: 11.6)	(7.7: 14.2)	
ITGA5 (<i>n</i> = 149)			<i>p</i> = 0.0002
Median	7.6	10.6	
(Range)	(6.9: 8.7)	(7.9: 13.2)	
ITGA6 (<i>n</i> = 149)			<i>p</i> = 0.0551
Median	9.8	10.6	
(Range)	(9.5: 10.7)	(8.7: 12.5)	
ITGA3 (<i>n</i> = 149)			<i>p</i> = 0.0592
Median	9.5	10.3	
(Range)	(8.1: 9.7)	(5.6: 14.1)	
ITGAV (<i>n</i> = 149)			<i>p</i> = 0.0019
Median	11.4	12.4	
(Range)	(11.1: 12.1)	(10.7: 14.2)	
ITGB4 (<i>n</i> = 149)			<i>p</i> = 0.2295
Median	10.3	10.9	
(Range)	(9.4: 11.2)	(6.5: 13.8)	
ITGA7 (<i>n</i> = 149)			<i>p</i> = 0.0044
Median	10.3	11.6	
(Range)	(10.2: 10.4)	(8.0: 14.5)	

Median were established using TCGA Affymetrix (1A) and Illumina (1B) datasets, *n* = 500 and *n* = 149, respectively. *p*-values are given between all GB samples and to the “normal” subgroup.

SUPPLEMENTARY MATERIALS AND METHODS

TCGA databanks and related statistical analyses

We used The Cancer Genome Atlas (TCGA) datasets to analyze integrins gene expression in newly diagnosed primary GB patients [39, 49]. For gene expression, two datasets (processed data : version 2015-02-24, downloaded from <https://genome-cancer.ucsc.edu>) were used based either on microarray data (Affymetrix HT Human Genome U133a microarray platform by the Broad Institute of MIT and Harvard University, $n = 500$) or RNA-seq data (Illumina HiSeq 2000 RNA Sequencing platform by the University of North Carolina TCGA genome characterization center, $n = 149$). We also assessed OS using the TCGA Affymetrix dataset among a subgroup of newly diagnosed primary GB patients treated

by standard chemo-radiotherapy ($n = 184$). For this OS analyses, gene expression levels were dichotomized based on a high expression cutoff (within the 75% quartile).

Multiple comparisons between groups were performed using Mann–Whitney U test. The Benjamini-Hochberg procedure was applied for multiple comparisons (Figure 4; Supplementary Figures 1 and 2). All survival rates were estimated by the Kaplan-Meier method with 95% confidence intervals (CI). Univariate analyses were performed using Cox proportional hazard model. Multivariate analyses were then performed using Cox proportional hazard model, including prognostic clinical covariates with a p -value < 0.10 in univariate analysis (Age, G-CIMP status and Karnofsky score). All reported p -values were two-sided. For all statistical tests, differences were considered significant at the 5% level. Statistical analysis was performed using STATA 12 software.

Annexe 4 : Publication en co-auteur : Ionizing radiations sustain glioblastoma cell dedifferentiation to a stem-like phenotype through survivin: possible involvement in radioresistance. Dahan P, Martinez Gala J, Delmas C, Monferran S, **Malric L**, Zentkowski D, Lubrano V, Toulas C, Cohen-Jonathan Moyal E, Lemarie A. *Cell Death Dis.* 2014 Nov 27;5:e1543.

**IONIZING RADIATIONS SUSTAIN GLIOBLASTOMA CELL
DEDIFFERENTIATION
TO A STEM-LIKE PHENOTYPE THROUGH SURVIVIN: POSSIBLE
INVOLVEMENT IN RADIORESISTANCE**

Perrine Dahan¹, Judith Martinez Gala¹, Caroline Delmas^{1,3}, Sylvie Monferran^{1,2}, Laure Malric¹, David Zentkowski², Vincent Lubrano^{4,5}, Christine Toulas^{1,3‡}, Elizabeth Cohen-Jonathan Moyal^{1,6‡*} and Anthony Lemarie^{1,2‡*}

¹ INSERM UMR 1037, Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse (CRCT), Université Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, France

² Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Université Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, France

³ Laboratoire d'Oncogénétique, Institut Claudius Regaud, Toulouse, France

⁴ INSERM UMR 825, Université Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, France

⁵ Service de Neurochirurgie, Centre Hospitalier Universitaire de Rangueil, Université Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, France

⁶ Département de Radiothérapie et Oncologie, Institut Claudius Regaud, Toulouse, France

Ionizing radiations sustain glioblastoma cell dedifferentiation to a stem-like phenotype through survivin: possible involvement in radioresistance

P Dahan¹, J Martinez Gala¹, C Delmas^{1,2}, S Monferran^{1,3}, L Malric¹, D Zentkowski³, V Lubrano^{4,5}, C Toulas^{1,2,7}, E Cohen-Jonathan Moyal^{*,1,6,7} and A Lemarie^{*,1,3,7}

Glioblastomas (GBM) are some bad prognosis brain tumors despite a conventional treatment associating surgical resection and subsequent radio-chemotherapy. Among these heterogeneous tumors, a subpopulation of chemo- and radioresistant GBM stem-like cells appears to be involved in the systematic GBM recurrence. Moreover, recent studies showed that differentiated tumor cells may have the ability to dedifferentiate and acquire a stem-like phenotype, a phenomenon also called plasticity, in response to microenvironment stresses such as hypoxia. We hypothesized that GBM cells could be subjected to a similar dedifferentiation process after ionizing radiations (IRs), then supporting the GBM rapid recurrence after radiotherapy. In the present study we demonstrated that subtoxic IR exposure of differentiated GBM cells isolated from patient resections potentiated the long-term reacquisition of stem-associated properties such as the ability to generate primary and secondary neurospheres, the expression of stemness markers and an increased tumorigenicity. We also identified during this process an upregulation of the anti-apoptotic protein survivin and we showed that its specific downregulation led to the blockade of the IR-induced plasticity. Altogether, these results demonstrated that irradiation could regulate GBM cell dedifferentiation via a survivin-dependent pathway. Targeting the mechanisms associated with IR-induced plasticity will likely contribute to the development of some innovating pharmacological strategies for an improved radiosensitization of these aggressive brain cancers.

Cell Death and Disease (2014) 5, e1543; doi:10.1038/cddis.2014.509; published online 27 November 2014

Radiotherapy is, following surgical resection and associated with Temozolomide, the gold standard treatment for glioblastoma (GBM). However, even after the association of surgery and combined chemo/radiotherapy, these invasive and resistant tumors almost systematically recur, with a median overall survival of 14 months.¹ It is now established that GBM are some very heterogeneous tumors similar to most of the solid cancers.² Recent studies highlighted the presence of a subpopulation of self-renewing and pluripotent GBM stem-like cells (GSCs), also called GBM-initiating cells, among the tumor. These GSC are characterized by their ability to self-renew *in vitro* (neurospheres (NS) formation) and *in vivo*, their higher expression of neural stem cell (NSC) markers (i.e., Olig2, Nestin or A2B5) and stem cell transcription factors (SCTF, i.e., Sox2, Nanog, Gli1 or Oct4), their pluripotent aptitude to differentiate into neurons, astrocytes or oligodendrocytes and their high tumorigenic potential *in vivo* in mice.^{3,4} In addition, the presence of these GSC may explain the high GBM recurrence rate, as they were shown to be extremely tumorigenic and radioresistant.^{3,5,6}

Several radioresistance mechanisms have been identified in these GSC. Most of them are in favor of a clonal selection process through the GSC intrinsic resistance to ionizing radiation (IR)-induced cell death,^{7,8} supported by a better efficiency of DNA-damage repair systems,^{6,9,10} a higher level of anti-apoptotic^{11,12} or pro-survival factors^{13–15} and a sustained expression of pluripotency maintenance factors such as Notch1,¹⁶ TGF β ,^{17,18} Sonic hedgehog (SonicHH),¹⁹ STAT3²⁰ or Wnt.²¹ Besides this, the influence of the microenvironment could also participate in radioresistance,^{17,22} as hypoxia, which is a well-known factor of radioresistance,^{23,24} acidic extracellular pH²⁵ and nitric oxide^{26,27} were shown to be involved in GSC stemness preservation.

However, several studies have put forward the hypothesis that GBM-differentiated cells may be able to dedifferentiate toward a stem-like state when submitted to appropriate stimuli⁷ and then contribute to increase the tumor stem cell pool. This assumption was supported by studies showing that hypoxic conditions, hepatocyte growth factor or Temozolomide could induce such a phenomenon in GBM cells.^{23,28,29} Of note, hypoxia was previously shown to induce a similar

¹INSERM UMR 1037, Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse (CRCT), Université Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, France; ²Laboratoire d'Oncogénétique, Institut Universitaire du Cancer Toulouse-Oncopole, Toulouse, France; ³Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Université Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, France; ⁴INSERM UMR 825, Université Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, France; ⁵Service de Neurochirurgie, Centre Hospitalier Universitaire de Rangueil, Université Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, France and ⁶Département de Radiothérapie et Oncologie, Institut Universitaire du Cancer Toulouse-Oncopole, Toulouse, France

*Corresponding authors: A Lemarie or E Cohen-Jonathan Moyal, Experimental Therapeutics, Inserm UMR1037, Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse, Oncopole de Toulouse, 2 avenue Hubert Curien, 31037 Toulouse, France. Tel: +33 582 741 606; Fax: +33 531 155 224; E-mail: anthony.lemarie@inserm.fr or moyal.elizabeth@iuct-oncopole.fr

⁷These authors contributed equally to this work.

Abbreviations: CSC, cancer stem cell; GBM, glioblastoma; GFAP, glial fibrillary acidic protein; GSC, GBM stem-like cell; HIF, hypoxia-inducible factor; IAP, inhibitor of apoptosis protein; IR, ionizing radiation; NS, neurosphere; NSC, neural stem cell; SCM, stem cell medium; SCTF, stem cell transcription factor; SonicHH, Sonic hedgehog
Received 18.9.14; accepted 13.10.14; Edited by G Raschella

reprogramming in breast cancer³⁰ and neuroblastoma cells,³¹ and our group showed that IR can stabilize HIF1 α (hypoxia-inducible factor 1 α) and activate the associated hypoxic pathways in GBM.^{32,33} This dedifferentiation process was also demonstrated *in vivo* in murine neurons and astrocytes through the expression of GBM-associated oncogenes.³⁴ In line with this, recent works showed that IRs were able to induce at short term the expression of stem markers (such as Sox2, Nestin and CD133) in GBM,³⁵ without studying the presence of a potential dedifferentiation process. In consequence, we hypothesized that plasticity may occur after radiotherapy in resistant remaining GBM cells. The present study was designed to analyze the long-term effects of radiotherapy on the phenotypic and molecular status of GBM cells isolated from several patient resections and to find out whether or not these cells can dedifferentiate toward a stem-like phenotype in response to IR.

Our present data show in human primary GBM patient cell lines that a subtoxic IR dose can induce at long term the overexpression of a large panel of stem markers in GBM cells, a potentiation of their NS-forming capacity and an exacerbated tumorigenesis in nude mice, indicating an IR-induced dedifferentiation process. We have also identified the inhibitor of apoptosis protein (IAP) survivin as an important regulator of this IR-induced plasticity. In conclusion, we showed here for the first time that radiotherapy is able to sustain a phenotype shift toward stemness in GBM, which may participate in the expansion of the cancer stem-like compartment in GBM after treatment and finally favor a fast recurrence of these aggressive and invasive brain cancers.

Results

Characterization of the human primary GBM cells subjected to the IR-induced dedifferentiation protocol. To study the hypothesis of an IR-induced plasticity, four GSC cell lines (C, D, G and I) previously established in our group from patient surgical GBM samples and cultured as GSC-enriched NS²⁹ were forced to differentiate in fetal calf serum (FCS) medium for at least 15 days, leading to a dramatic change in their cellular morphology and adhesion properties, and to the loss of their ability to generate NS by self-renewal (Figure 1a). These differentiated GBM cells were then subjected or not to a 3-Gy irradiation and placed 2 days after in either FCS or stem cell medium (SCM), in order to maintain a differentiated status or to favor a possible reversion to a stem phenotype, respectively (Figure 2a). These culture conditions were maintained until the generation of NS in the medium, testifying of the reappearance of the *in vitro* self-renewal ability. The long-term effects of irradiation were then analyzed at a molecular level by RT-qPCR, western blotting or FACS analysis, and *in vivo* by the tumorigenicity of the treated cells in orthotopically xenografted nude mice.

In order to fully characterize the differentiated GBM cells subjected to this dedifferentiation protocol, we first checked by RT-qPCR the expression of several stem and differentiation markers in NS-derived cells and their differentiated counterparts. We observed that in all NS cell lines, the expression of the largely described stem markers CD133, Notch1, Nanog,

Gli1, Sox2, Nestin, SonicHH, EZH2 and Olig1/Olig2,^{3,36,37} was markedly and significantly repressed after a 15-day forced differentiation (Figure 1b). On the contrary, the expression of several differentiation markers such as GFAP (glial fibrillary acidic protein) or connective tissue growth factor (CTGF)^{3,38} was potently upregulated in FCS-differentiated cells but almost undetectable in NS (Figure 1b). We confirmed by FACS that the cell surface stem markers CD133, Notch1 and A2B5⁴ were totally abrogated in the differentiated cells, as well the SCTF Nanog and Sox2 (Figure 1c). The NSC protein Nestin, highly expressed in glioma and particularly in GSC,^{39,40} also appeared markedly decreased. Finally, we observed the appearance in these differentiated cells of the three lineage-specific differentiation markers GFAP, O4 and TUJ1 (β 3-Tubulin),²⁹ pointing the ability of this differentiation process to exploit the GSC pluripotency to generate, respectively, tumor astrocytes, oligodendrocytes and neurons (Figure 1c). Of note, these differentiation markers were not expressed in the NS cells. The results were reproduced in all cell lines (data not shown).

Absence of alteration of both cell viability and proliferation in response to a 3-Gy irradiation. As previously mentioned, it appeared necessary in this study to avoid any clonal selection after irradiation in order to only study the potential dedifferentiation process induced by IR. As a consequence, our protocol required a non-toxic IR dose. In that way, we performed some clonogenic NS formation assays at different IR doses (0–10 Gy) and we observed that no significant toxicity can be detected at 3 Gy or lower (data not shown). Next, we checked whether or not this 3-Gy subtoxic dose was able to alter cellular viability or proliferation during the dedifferentiation process. We also used a 12-Gy dose as a positive control for toxicity. Using annexin V (AV)/propidium iodide (PI) double staining and SubG1 detection to assess necrosis and apoptosis after a 3-Gy irradiation, we failed to observe any viability impairment 7 days post IR (Figures 2b and c) or along the whole dedifferentiation process (Figure 2e). Similarly, we did not see, using WST1 assay, any alteration in cell proliferation at 7 days post IR (Figure 2d). A similar statement was made during the whole dedifferentiation protocol, as we could not observe any change in the cell count between the control and the 3-Gy-irradiated groups (Figure 2f). As expected, the 12-Gy dose induced a decrease in cell proliferation and an increase of apoptotic and necrotic cell death as soon as 7 days post IR (Figures 2b, c and d).

Potentiation of the long-term acquisition of a stem-like phenotype by IR in GBM differentiated cells. Using these characterized GBM differentiated cells irradiated by a 3-Gy subtoxic dose, we subjected or not the cells to a medium change and place them either in FCS medium to preserve their differentiated status or in SCM medium to favor the potential appearance of a stem phenotype in a permissive environment (Figure 2a). NS did not appear in cells kept in FCS medium, even after IR (Figure 3a). However, we observed after at least 4 weeks of culture post IR (25 cm² culture flasks) the generation of NS in SCM medium (Figure 3a). This was noticed at a basal level in non-

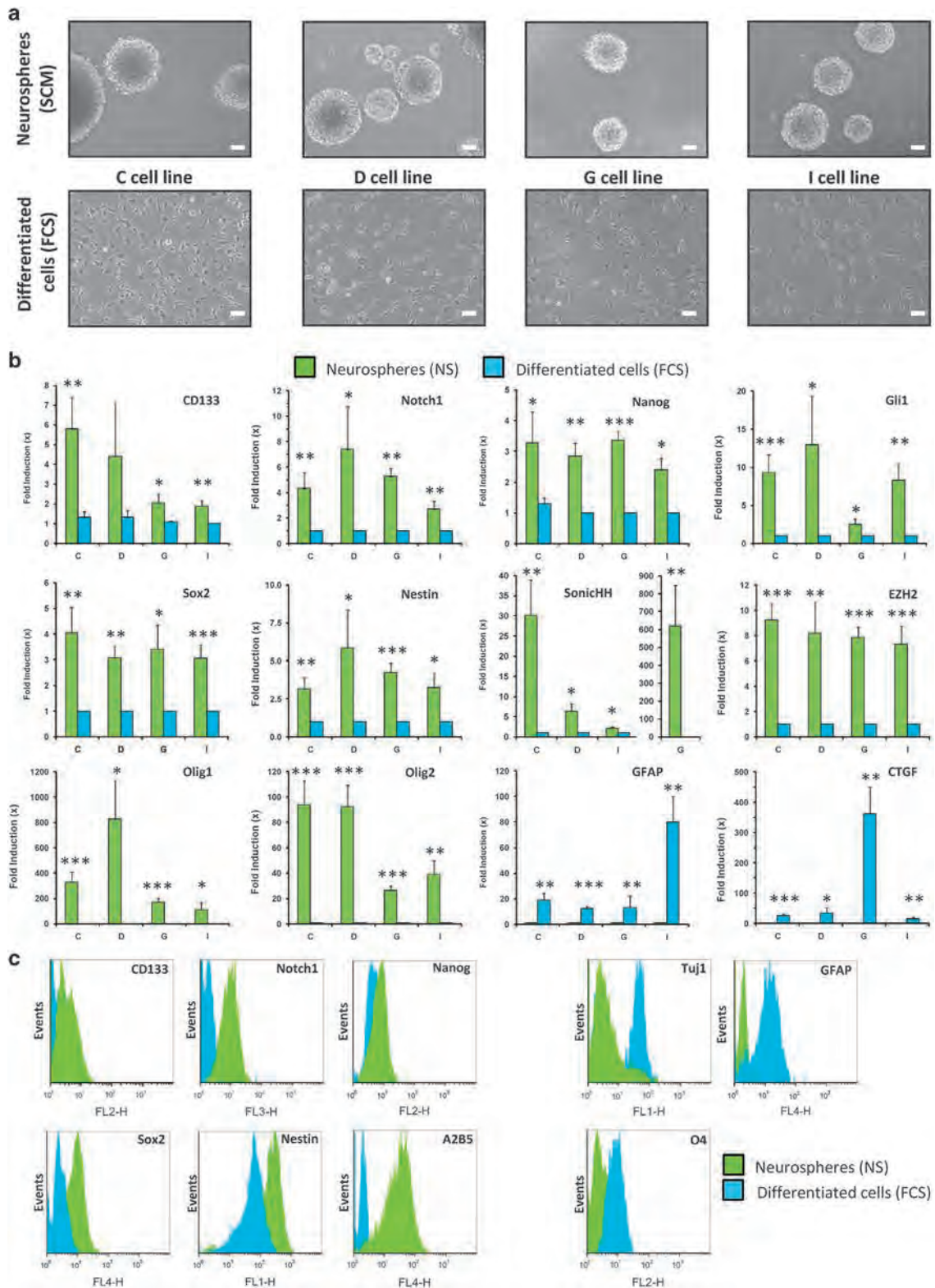


Figure 1 Characterization of the stem and differentiated phenotypes in GSC-enriched NS and FCS-differentiated GBM cultures. (a–c) GSC-enriched NS cell lines isolated from four patient tumors (C, D, G and I) were kept in SCM medium or allowed to differentiate as adherent GBM cells for at least 15 days in FCS medium. (a) Phase-contrast photomicrographs of NS or GBM-differentiated cells. Original magnification: $\times 10$, scale bar: $6 \mu\text{m}$. (b) Real-time quantitative PCR analysis of the stem (CD133, Notch1, Nanog, Gli1, Sox2, Nestin, SonicHH, EZH2, Olig1 and Olig2) and differentiation (GFAP and CTGF) markers in NS or GBM-differentiated cells for the C, D, G and I cell lines. Shown are the fold inductions expressed as means \pm S.E.M. of at least three independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with the related control. (c) Immunofluorescence FACS analysis of stem (CD133, Notch1, Nanog, Sox2, Nestin and A2B5) and differentiation (GFAP, TuJ1 and O4) markers in NS or GBM-differentiated cells. The results depicted were representative of three independent experiments (G cell line) and were reproduced in all the cell lines

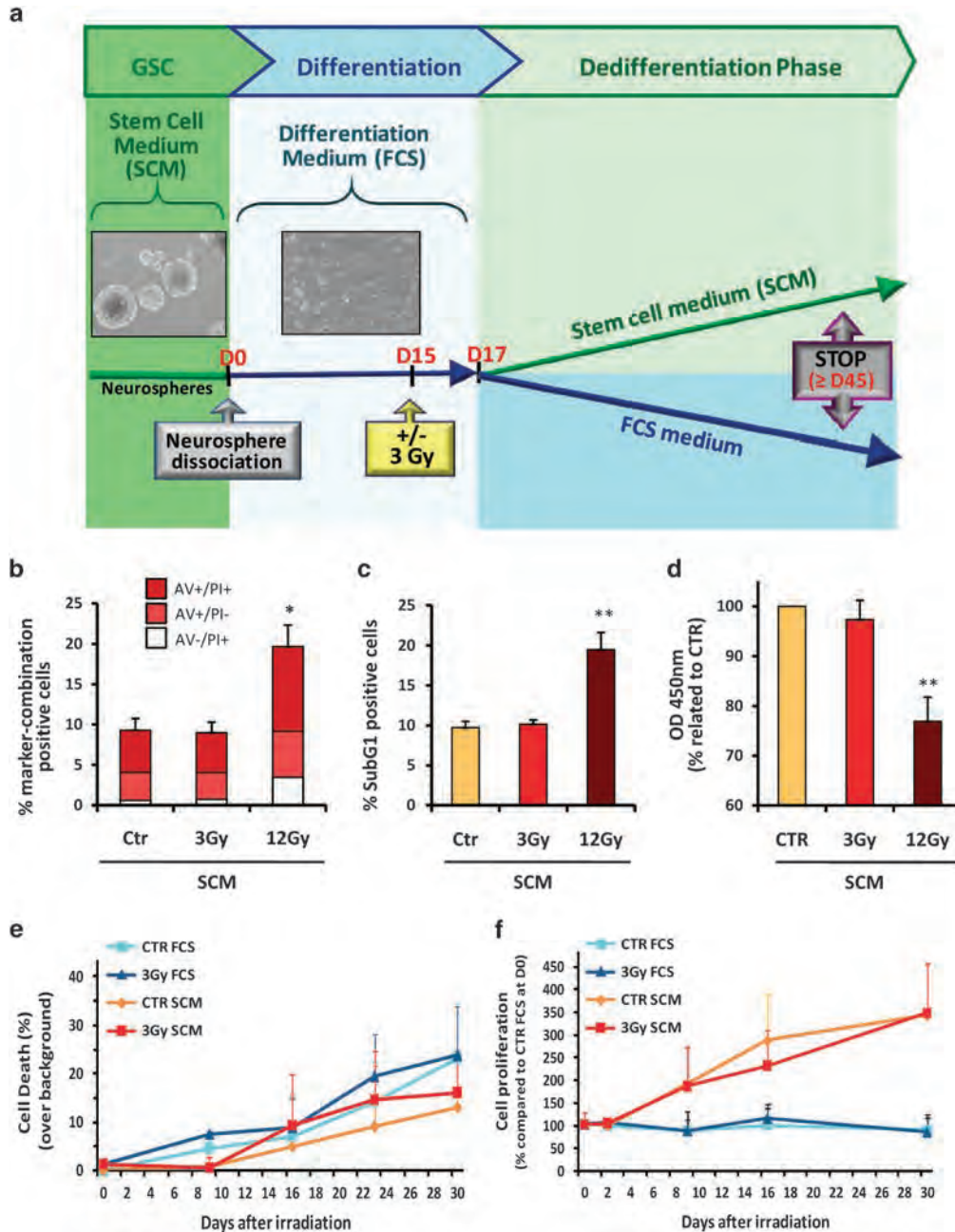


Figure 2 Overview of the long-term dedifferentiation protocol and assessment of the irradiation dose. (a) As described in the Materials and Methods section, GSC-enriched NS were isolated from patient samples and cultured in a specific SCM medium. NS cells were then dissociated and placed into a differentiating medium with FCS (FCS medium) for at least 15 days, to allow an optimum differentiation. Adherent differentiated GBM cells were then subjected or not to a 3-Gy irradiation and were placed 2 days after in fresh FCS medium, to keep them fully differentiated, or in SCM medium to favor a possible dedifferentiation process. The totality of the cells was finally collected at the end of the protocol, which coincided to the apparition of NS in the culture supernatant, in order to be analyzed. (b–f) Absence of effects of a 3-Gy irradiation on viability and proliferation of GBM cells during the dedifferentiation protocol. Differentiated GBM cells were subjected or not (Control, CTR) to a 3-Gy irradiation and placed 2 days after in SCM medium for 5 additional days, according to the dedifferentiation protocol (b–d) or for different time points during this dedifferentiation protocol (e and f). The dose of 12 Gy was chosen as a positive control for cell death induction. At 7 days post IR, cells were analyzed either by FACS for AV/PI double staining of both apoptotic and necrotic cells (b) and PI staining of the Sub-G1 population (c), or through WST-1 staining using a spectrophotometric determination of the dye absorbance at 450 nm for the quantification of cell viability and proliferation (d). For kinetic studies, cell death was assessed by FACS, by AV/PI staining and expressed as percentages over background (e), and cell count was performed to estimate the cell proliferation rate in the indicated culture condition (f). Shown are the means \pm S.E.M. of at least three independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with the related control

irradiated control cells (CTR) and was greatly potentiated by IR by two- to six fold according the cell line (Figures 3a and b). We also plated GBM-differentiated cells at low densities in 24-well plates in order to perform a NS generation assay

adapted from the classic limiting dilution assay used generally for GSC.⁴¹ Using this protocol, we were able to confirm that FCS-maintained cells, with or without IR, failed to generate NS. On the contrary, SCM-cultured cells gave rise

to NS at long term and this generation was greatly potentiated after irradiation (Figure 3c). We also performed this NS generation assay after sorting the differentiated GBM cells (negative for A2B5; Tchoghandjian *et al.*⁴) by FACS analysis in order to discard some eventual remaining GSC in our differentiated cell cultures and we observed the same increase in NS generation in response to irradiation (Figure 3d). Finally, we also established through the use of a classic limiting dilution assay⁴¹ that these primary NS generated in SCM medium were able to give rise to secondary NS, with a marked increased ability for primary NS-derived cells obtained after a 3-Gy irradiation. This was observed whether the differentiated cells were sorted or not before irradiation (Figures 3e and f).

We then analyzed the expression of a large panel of stem markers at the end of the dedifferentiation protocol. We demonstrated by RT-qPCR that the mRNA expression levels of several well-established stem markers, such as Nanog, Olig2, SonicHH and EZH2, were markedly increased in 3-Gy-treated cells grown in SCM medium compared with untreated cells kept in the same medium (Figure 4a). We did not observe this IR-induced potentiation in FCS condition. Similar results were obtained for all the cell lines (data not shown). We analyzed in parallel the expression of several differentiation markers and showed that the astrocytic marker GFAP and the oligodendrocytic marker oligodendrocyte-myelin glycoprotein⁴² were accordingly downregulated in SCM medium and that this decrease was amplified after irradiation (Figure 4b).

To confirm these data at the protein level, we demonstrated by western blotting in all the cell lines that long-term culture in SCM medium of irradiated differentiated GBM cells greatly enhanced the expression of Olig2, Sox2 and Nestin compared with untreated cells kept in SCM medium, which nevertheless showed a slight increase of these stem markers compared with FCS-differentiated cells (Figure 5a), as observed at the RNA level (Figure 4a). However, short-term analyses (2–7 days post IR) demonstrated that this stem markers overexpression can exclusively be observed after IR in SCM medium, without any effect in FCS-cultured cells or in SCM-control cells, pointing out the predominant role of irradiation for stem markers induction (Supplementary Figure 1a). In order to measure more accurately the overexpression of different stem (Nestin, A2B5, Nanog and Notch1) and differentiation (GFAP) markers, we demonstrated by FACS analysis in all the cell lines that 3-Gy-irradiated cells cultured in SCM medium either markedly upregulated these stem markers or downregulated GFAP compared with the control SCM condition (Figure 5b). In addition, we were able to show that this phenomenon was generalized to the whole cell population and did not seem to be due to the expansion of some particular cell clones within the cellular population.

Increased tumorigenic potential *in vivo* in IR-dedifferentiated GBM cells. One of the most important characteristics of GSC is their high tumorigenicity in orthotopically xenografted nude mice compared with non-stem cells.⁴³ We analyzed accordingly the tumorigenic potential of long-term irradiated GBM cells cultured either in SCM or FCS medium at the end of the dedifferentiation

protocol. We observed that GSC-enriched NS cells show the highest tumorigenic potential when compared with all differentiated conditions (Figure 6a). Three-Gray-irradiated cells kept in FCS medium failed to show a significant tumorigenicity increase compared with untreated cells. As control cells maintained in SCM medium showed a slight increase in their tumorigenic potential, we observed that only the 3-Gy-treated cells placed in SCM medium were able to display a markedly increased tumorigenicity, with survival curves relatively close to those of the corresponding NS cell line (Figure 6a). We next performed an immunolabeling of the stem factor Nanog in the brain of these xenografted mice and we showed that Nanog is expressed by small cell clusters, as already described for several stem markers in human tumor tissues,^{44,45} and is significantly increased in the 3-Gy SCM group compared with the related control (Figure 6b and Supplementary Figure 2). Although these first elements need to be further confirmed in larger *in vivo* studies, they seem to support our observations establishing that IR could potentiate the dedifferentiation of GBM cells *in vitro* and lead to an upregulation of GSC number and an increased tumorigenicity *in vivo*.

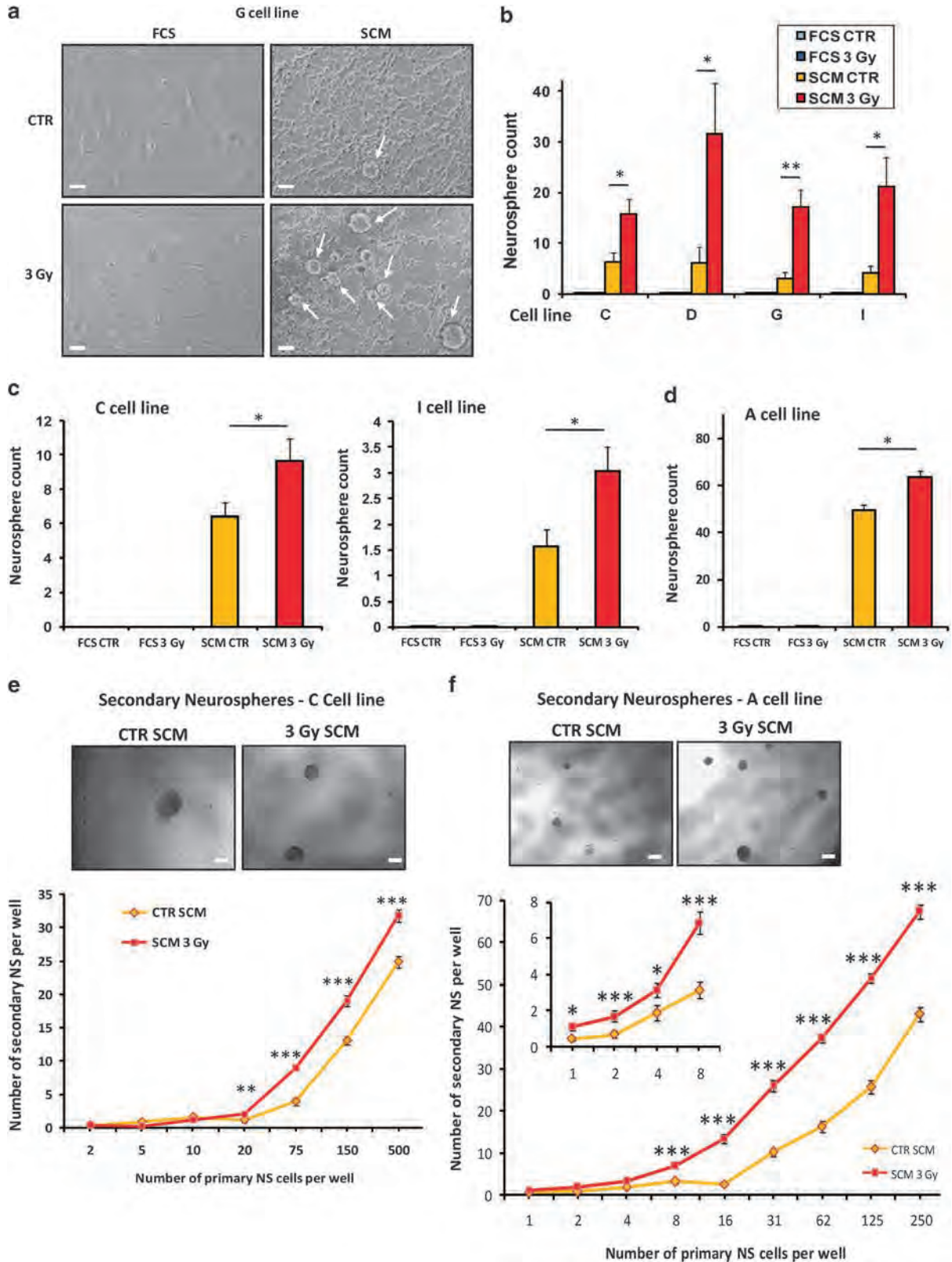
Requirement of a survivin-dependent pathway for IR-induced dedifferentiation in GBM cells.

Our group and others previously showed that survivin (BIRC5), an anti-apoptotic IAP, is involved in GBM cell radioresistance, notably in relation with hypoxia pathway.^{32,46} Moreover, it appears that survivin has a major functional role in neural progenitor cells and during neurogenesis⁴⁷ and is closely associated with the SonicHH/Gli1 pathway in GSC.⁴⁸ In line with this, survivin was recently shown to be upregulated in GSC, to contribute to their cell death resistance and to be increased by IR.⁴⁹ We then hypothesized that survivin may be involved in the IR-induced dedifferentiation process described above. We first checked the survivin expression in GSC-enriched NS, in differentiated cells and during the IR-induced dedifferentiation, by qPCR (Figure 7a) and western blotting (Figure 7b). We observed that in all the cell lines, this IAP was dramatically downregulated in FCS-differentiated cells compared with NS, independently of their irradiation status. Interestingly, a slight overexpression of survivin was seen in untreated SCM condition but only the 3-Gy condition allowed to overexpress survivin at a level approaching the one displayed in NS (Figures 7a and b). This increase was also observed at short term after irradiation (Supplementary Figure 1b). In consequence, these variations appeared to be very similar to those seen for the different stem markers analyzed above (Figures 4a and 5a, and Supplementary Figure 1a).

We then investigated whether this survivin overexpression during the IR-induced dedifferentiation was a consequence of this reprogramming or could be an essential step supporting IR-induced GBM plasticity to a stem-like phenotype. To this end, we treated GBM cells during the dedifferentiation process with 7 nM YM-155, a selective inhibitor of survivin used in anti-cancer clinical trials.⁵⁰ As an additional control, we used MK-2206 (250 nM), a selective AKT inhibitor,⁵¹ as we and others⁵² showed that AKT can control the expression of survivin in GBM cells (Figure 8a). We first checked the

efficiency of these inhibitors used at non-toxic concentrations (data not shown) on survivin expression by western blotting during the IR-promoted dedifferentiation (Figure 8a). Next, we

observed their effect at the end of the dedifferentiation protocol and showed that both inhibitors induced a potent blockade of the 3-Gy-induced NS generation in SCM medium (Figures 8b



and c). Moreover, YM-155 and MK-2206 markedly inhibited at the protein level the overexpression of the stem markers Olig2, Sox2 and Nestin in response to IR in SCM medium (Figure 8d). Altogether, these results strongly suggest that the IR-induced reprogramming in GBM cells was associated and supported by the upregulation of the anti-apoptotic protein survivin.

Discussion

Radiotherapy is undoubtedly a key component for GBM treatment. The standard protocol defined by Stupp *et al.*^{53,54} associates concomitant chemotherapy with Temozolomide and radiotherapy at a total dose of 60 Gy (30 daily fractions of 2 Gy), followed by adjuvant TMZ chemotherapy. This combined chemo/radiotherapy following surgical tumor resection, when possible, leads to a median overall survival of 14.6 months in the EORTC-NCIC trial^{53,54} and the relapse, almost inevitable, mainly occurs at the initial tumor location exposed to radiotherapy.⁵⁵ Consequently, it appeared essential to identify the possible origins of this high relapse rate and to increase the efficacy of radiotherapy in GBM to improve their clinical prognosis.

Growing number of studies deciphered the resistance pathways occurring in GBM cells in response to IR and notably focused on the radioresistant GSC subpopulation, much more resistant to IR compared with differentiated GBM cells.^{6,13,16} These GSC then may be selected by the treatment to favor the subsequent tumor regrowth and relapse. Different targeted strategies have been already tested to radiosensitize GSC in order to suppress either their survival ability or their tumorigenic competency.^{6,12,13,16} Forced differentiation was also used to sensitize GSC to radiotherapy.^{56,57} Nevertheless, none of these radiosensitizing strategies got interested to target a putative dedifferentiation mechanism occurring in resistant differentiated cells remaining in the tumor site after combined surgery/radiochemotherapy and to analyze the effects of IR with regard to the cellular plasticity processes.

For the first time, we demonstrated here that IR at a subtoxic 3-Gy dose close to the daily used dose in clinic are responsible for favoring at long term a major dedifferentiation process in GBM cells, with the gain of an *in vitro* self-renewal ability, the overexpression of a large panel of stem markers, the dramatic decrease of several well-established neural differentiation markers and finally the acquisition of a potentiated tumorigenic potential *in vivo* in orthotopically xenografted nude mice. Moreover, we showed that this cellular plasticity to a cancer

stem cell (CSC) phenotype occurred independently of any clonal selection, as we did not observe any impairment of either the proliferation rate or the cell viability after a 3-Gy irradiation along the whole dedifferentiation process. Altogether, our data highlight the existence of a new mechanism of radioresistance in GBM cells through a cellular adaptation of the surviving cancer cells after treatment, leading to their reprogramming to a stem-like state much more tumorigenic. This work supports some recent observations in breast cancer cells showing the re-acquisition of several stem characters in response to IR, highlighting in some ways their reprogramming toward a stem-like phenotype.⁵⁸

This new process of cell adaptation to radiotherapy, which allows remaining differentiated cancer cells to acquire stemness, may probably contribute, together with clonal selection, to the stem cell compartment expansion inside the tumor after treatment⁴¹ and to the fast and almost inevitable recurrence of these tumors. In consequence, it could be of great interest to specifically inhibit this particular IR-induced plasticity in order to setup new clinical strategies, in the aim to optimize radiotherapy in GBM patients. For this purpose, we analyzed several genes known to participate to a cellular adaptation process in response to IR and notably the anti-apoptotic protein survivin, recently highlighted by our group in irradiated GBM cells.³² We showed in the present study that survivin was markedly enhanced in GSC compared with their differentiated counterparts, and that its expression was potentiated during the dedifferentiation process in a similar way to the stem markers. Moreover, we and others previously showed that this IAP is involved in GBM radioresistance,^{32,46} is increased by IR in GBM cells,^{46,49} is upregulated in GSC compared with differentiated GBM cells,⁴⁹ is associated with faster GBM recurrence⁴⁹ and is overexpressed in GBM recurrence tumor samples compared with newly diagnosed ones.⁴⁹ In addition, survivin was also shown to be tightly associated with different stem-promoting pathways in CSC/NSC, notably SonicHH/Gli1,⁴⁸ Notch,⁵⁹ Oct4/Stat3⁶⁰ and Sox2.⁶¹ In consequence, we investigated its role in the IR-induced GBM cell dedifferentiation. Through the use of the selective inhibitor of survivin YM-155, actually used in phase II clinical trials for advanced non-small cell lung carcinoma, melanoma, breast and prostate cancer,⁶² we established that survivin is essential to the occurrence of the IR-induced plasticity process and sustains both the NS-forming ability and the stem markers overexpression in response to IR. It would be of interest to further study the precise role of this IAP in the dedifferentiation process, as it appears that survivin has, in addition to its

Figure 3 Increased ability to generate NS in GBM-differentiated cells subjected to a 3-Gy subtoxic irradiation. Cells treated or not by a 3-Gy irradiation and placed 2 days after in either FCS or SCM medium for long-term culture were analyzed in order to evaluate the number of NS generated in the culture supernatant. (a) Phase-contrast photomicrographs of GBM cells at the end of the dedifferentiation protocol. Arrows indicate the presence of NS. Original magnification: $\times 10$, scale bar: 6 μm . (b–d) Quantification of the number of generated NS at the end of the dedifferentiation protocol for the four cell lines C, D, G and I in irradiated (3 Gy) or untreated (CTR) GBM cells kept in SCM medium. (b) NS were counted and results are expressed per 25-cm² flasks. Results are expressed as the means \pm S.E.M. of at least three independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with the related control. (c) NS were also generated from differentiated cells through the use of a dilution assay at low density and were counted at different dilutions in each well of a 24-well plate. The results are shown for the C and I cell lines (20 000 cells/well). * $P < 0.05$. (d) Before the NS generation assay, A2B5-negative differentiated cells were sorted as described in the Materials and Methods section (A cell line). The generated primary NS were then counted at the end of the dedifferentiation protocol. Results are expressed as the means \pm S.E.M. of three independent experiments. * $P < 0.05$ (e and f) Primary NS were generated from differentiated cells with (f) or without (e) an optional FACS sorting of the A2B5-negative differentiated cells. These primary NS were subsequently dissociated and plated in 96-well plates at different low cell densities, to study their ability to generate secondary NS through limiting dilution assays. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with the related CTR SCM condition. Representative phase-contrast photomicrographs were shown for each conditions (original magnification: $\times 4$, scale bar: 17 μm)

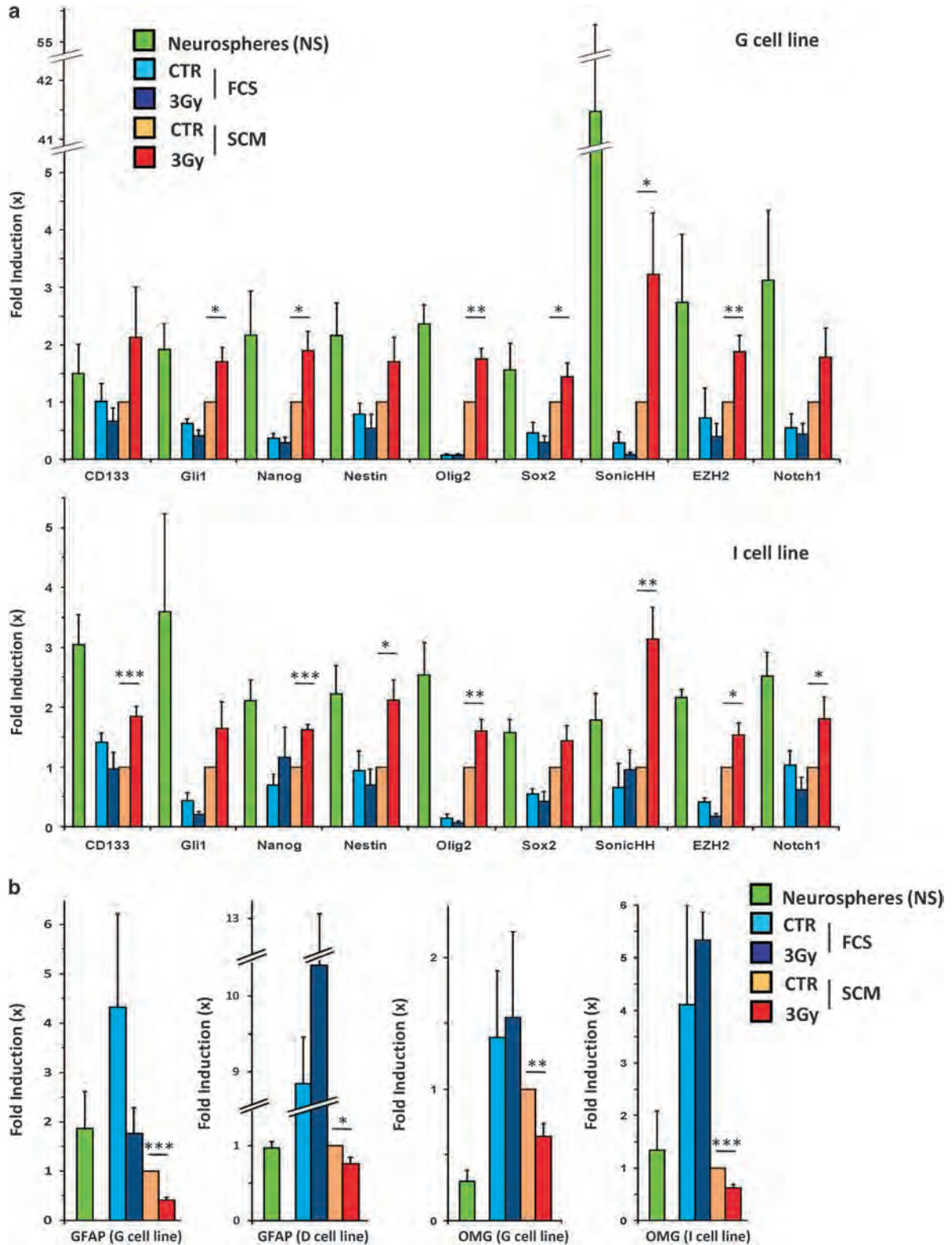


Figure 4 Overexpression of stemness markers and downregulation of differentiation markers at the RNA level in GBM cells after a 3-Gy irradiation. Differentiated GBM cells treated or not by a 3-Gy irradiation and placed 2 days after in either FCS or SCM medium for long-term culture were analyzed by real-time quantitative PCR (see Materials and Methods) at the end of the dedifferentiation protocol. RNA expression level of the indicated stem (a) or differentiation markers (b) in GBM-differentiated cells subjected to the dedifferentiation process for the indicated cell lines. The RNA expression levels of these different markers were also shown for NS cells as a control, as these NS are enriched in GSC. Shown are the fold inductions relative to the CTR SCM condition expressed as means \pm S.E.M. of at least three independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with the related CTR SCM condition

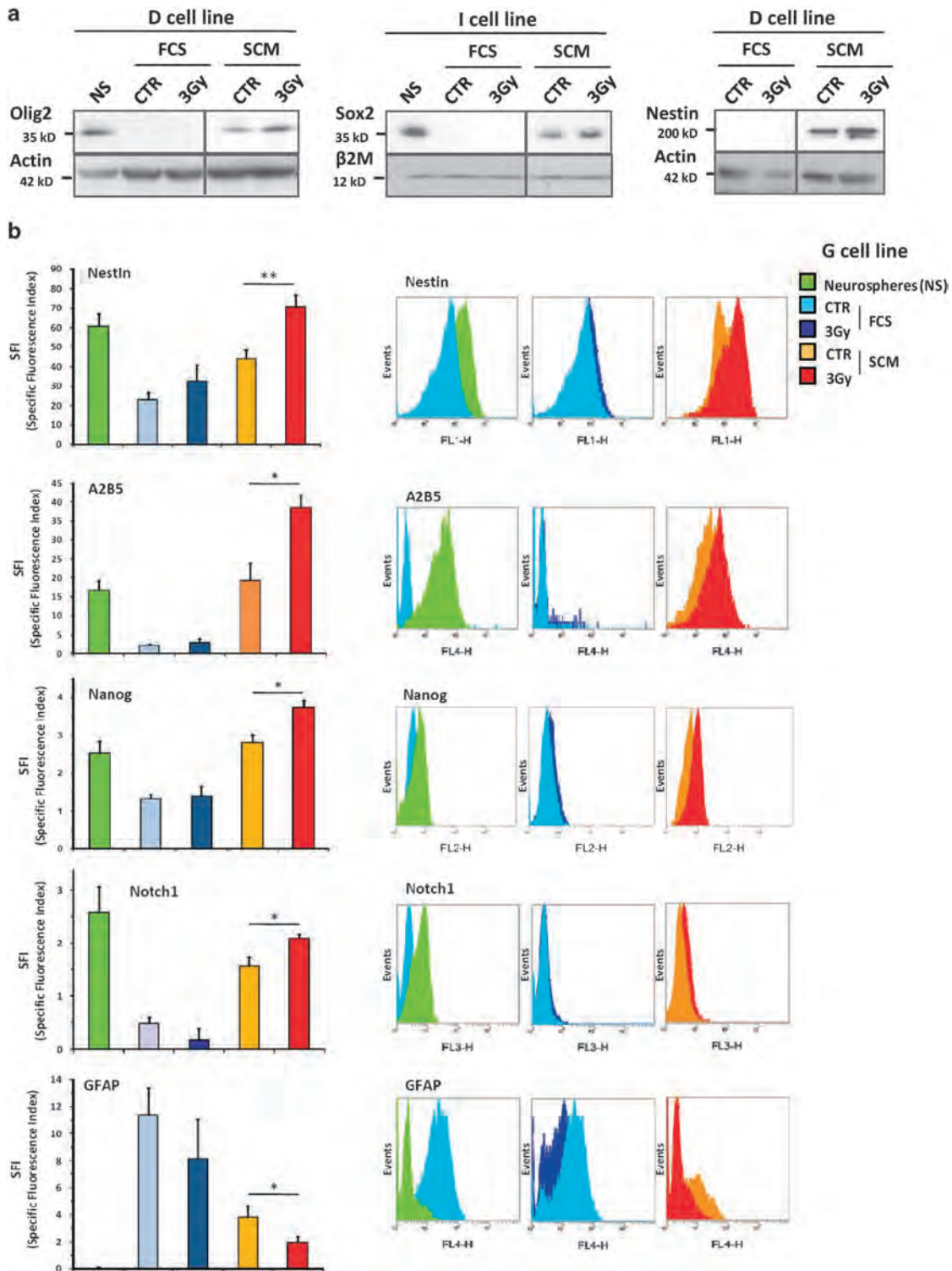


Figure 5 Overexpression of stemness markers and downregulation of differentiation marker at the protein level in GBM cells after a 3-Gy irradiation. Differentiated GBM cells treated or not by a 3-Gy irradiation and placed 2 days after in either FCS or SCM medium for long-term culture were analyzed either by western blotting (a) or FACS immunofluorescence (b) at the end of the dedifferentiation protocol. Protein expression levels in NS cells were shown as a control for the stem condition. (a) Western blotting analysis of the stem markers Olig2, Sox2 and Nestin. Equal gel loading and transfer efficiency were checked with anti-actin or β 2-microglobulin (β 2M) antibodies. Blots were representative of at least three independent experiments in the indicated cell line and were reproduced in all the cell lines. (b) Immunofluorescence analysis performed by FACS of the stem (Nestin, A2B5, Nanog and Notch1) and differentiation (GFAP) markers in the G cell line. The SFI allowed to evaluate the marker expression level (see Materials and Methods). Results are expressed as the means \pm S.E.M. of at least three independent experiments in the G cell line and were reproduced in all the cell lines. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with the related CTR SCM condition. For each marker, some representative FACS plot overlays (NS versus CTR FCS, CTR FCS versus 3 Gy FCS and CTR SCM versus 3 Gy SCM) were depicted

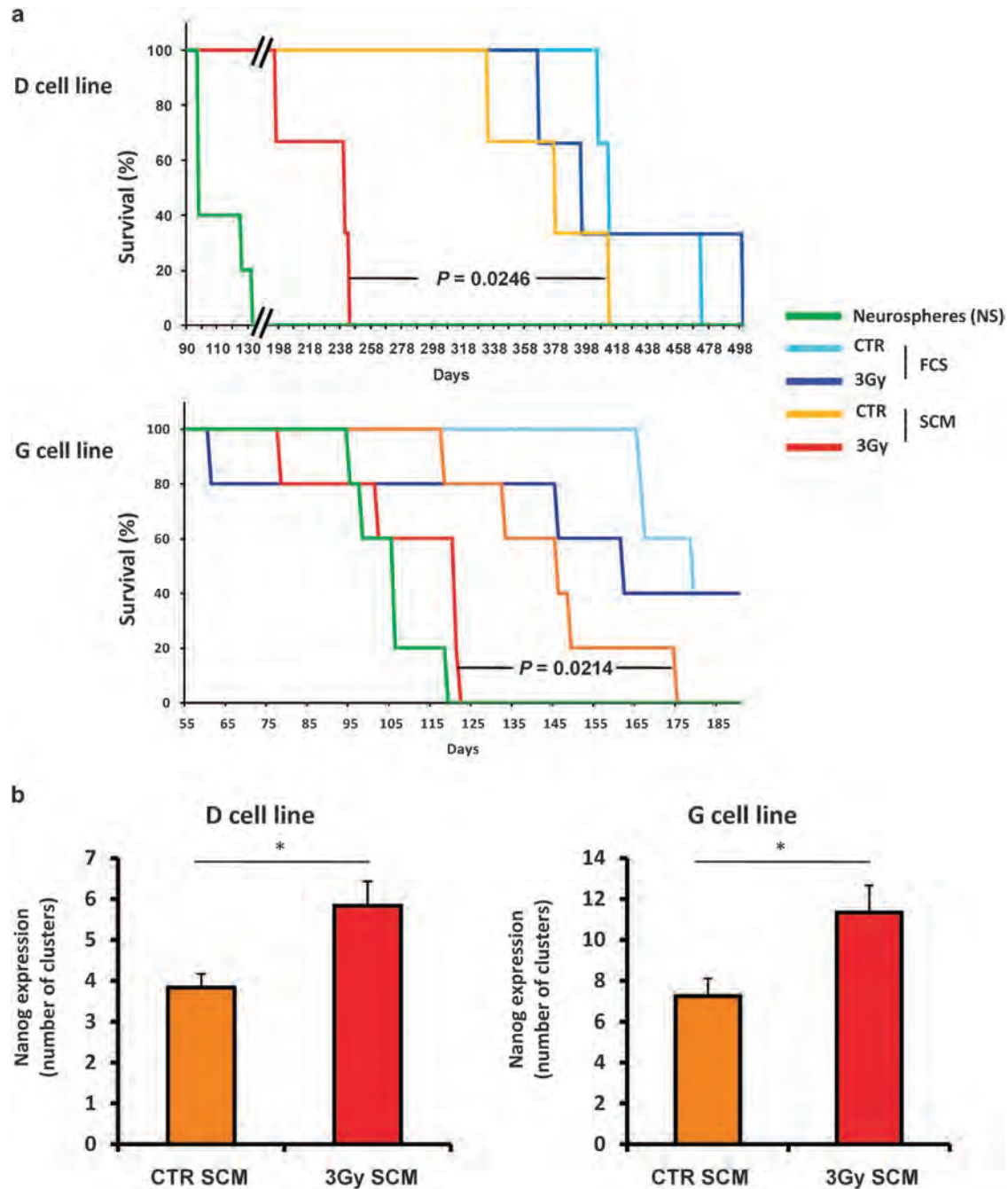


Figure 6 Increased *in vivo* tumorigenicity of 3-Gy-irradiated GBM cells placed in SCM for long-term culture. Differentiated GBM cells treated or not by a 3-Gy irradiation and placed 2 days after in either FCS or SCM medium for long-term culture were subsequently orthotopically xenografted in nude mice to evaluate their tumorigenic potential. NS cells were also injected as a control for the stem condition, as they are enriched in GSC. (a) Survival curves established in xenografted mice for the indicated injected cell line (three mice per group for the D cell line and five mice per group for the G cell line). Exact *P*-values between the 3-Gy SCM group and the related CTR SCM group are indicated in the figure, after log-rank analysis. (b) Immunohistochemistry (IHC) analysis of Nanog-positive cell clusters in the brain tumors of killed, xenografted mice for the CTR SCM and the 3-Gy SCM groups (D and G cell lines, three mice per group). Shown are means \pm S.E.M. **P* < 0.05

inhibitory role of the executioner caspases during apoptosis,⁶³ several other roles in the cell machinery such as the mitosis process⁶³ or the DNA-damage repair system.⁶⁴ Finally, survivin was also shown to be a major target of different pro-survival signaling pathways such as the PI3K/AKT axis and the HIF factors.⁶⁵ As AKT and HIFs were shown to sustain the stem-like GSC phenotype,^{23,24,66,67} this warrants future

studies to discover the interplay between IR, hypoxic signaling and AKT/survivin to install the GBM dedifferentiation process.

Altogether, our data demonstrate that a clinically relevant radiation dose, a key component of the conventional GBM treatment, can potentiate in differentiated GBM cells the acquisition of a stem-like phenotype associated with increased *in vitro* self-renewal capacity and *in vivo*

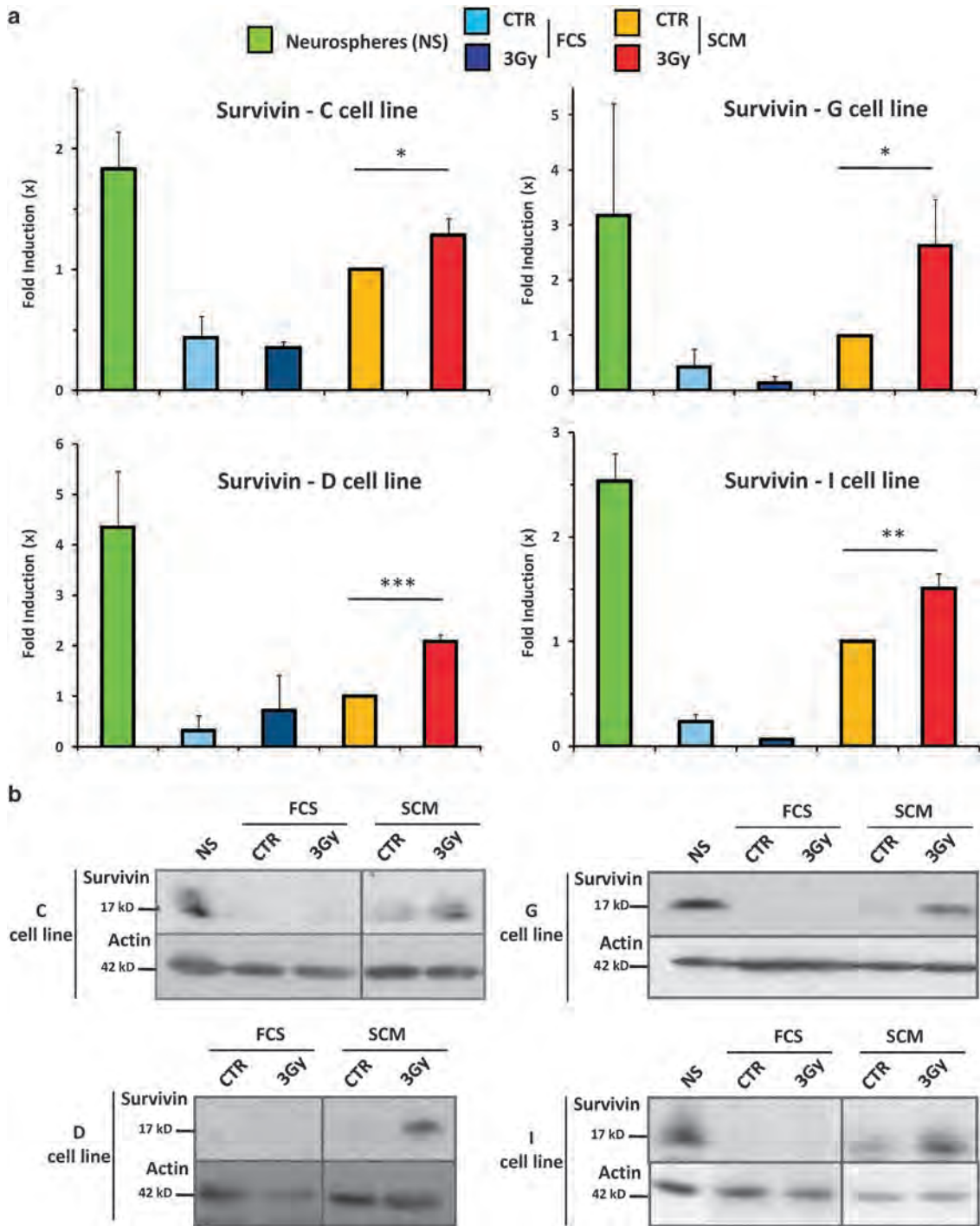
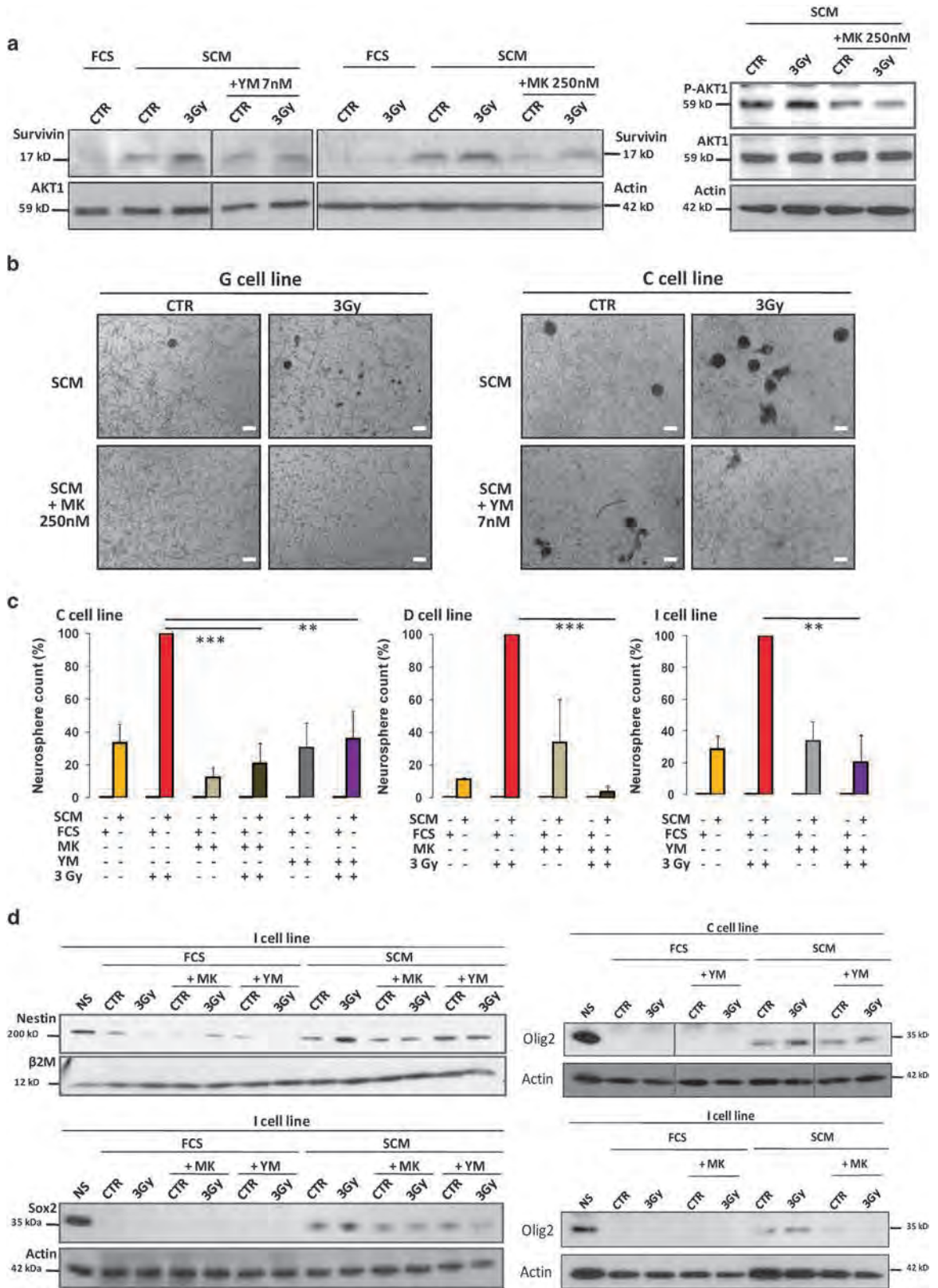


Figure 7 Overexpression of the anti-apoptotic protein survivin in 3-Gy-irradiated GBM-differentiated cells placed in SCM for long-term culture. Differentiated GBM cells treated or not by a 3-Gy irradiation and placed 2 days after in either FCS or SCM medium for long-term culture were analyzed for survivin expression either by real-time quantitative PCR (a) or western blotting (b) at the end of the dedifferentiation protocol and for the four different patient cell lines. RNA and protein expression levels for Survivin were also analyzed in NS cells as a control for the stem condition. (a) PCR results were expressed as fold inductions relative to the CTR SCM condition and shown as means \pm S.E.M. of at least three independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. (b) Western blotting results were representative of at least three independent experiments for each cell line. Equal gel loading and transfer efficiency were checked with an anti-actin antibody

tumorigenesis. This plasticity process in response to IR appeared to be supported by survivin, known to be tightly associated with several stem-maintaining pathways. This survivin-mediated reprogramming to stemness could probably

contribute to the expansion of the GSC compartment after treatment and may favor the fast recurrence of these aggressive brain tumors. Setting up new clinical strategies to restrain this IR-induced dedifferentiation should be considered



for forthcoming trials, and on this basis the specific targeting of survivin may be an interesting approach.

Materials and methods

Human tumor collection. The study was conducted on newly diagnosed GBM tumor samples isolated from four different patients to establish four primary GSC cell lines (C, D, G and I). For FACS sorting experiments, a fifth GSC patient cell line was also used (A). These samples were all obtained after written informed consent from patients admitted to the Neurosurgery Department at Toulouse University Hospital and were processed in accordance with the Institution's Human Research Ethics Committee. Tumors used in this study were histologically diagnosed as grade IV astrocytoma according to the WHO criteria. All the results depicted in this study were obtained from at least three different independent experiments in the same cell line and were reproduced in all the other cell lines.

Cell culture. The GBM samples were processed as described by Avril *et al.*,⁶⁸ in order to obtain the corresponding primary NS cell lines shown by other groups to be enriched in GSC.²⁹ NS GSC lines were maintained in DMEM-F12 (Lonza, Levallois-Perret, France) supplemented with B27 and N2 (Invitrogen, Life Technologies, Saint Aubin, France), 25 ng/ml of FGF-2 and EGF (Peprotech, Neuilly sur Seine, France) at 37 °C in 5% CO₂ humidified incubators. All GSC lines were used for the experiments in this SCM medium between the second and twelfth passages, in order to avoid any stem cell characteristic loss. Forced differentiation was performed according to previous published protocol⁶⁹ adapted as follows. Briefly, the dissociated NS cells were cultured and plated as adherent monolayer (7.5×10^3 cells/cm²) in DMEM-F12 supplemented only with 10% FCS (FCS medium) on laminin (1.5 μg/cm², Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) for at least 15 days to ensure an optimum differentiation.

Irradiation-induced dedifferentiation protocol and NS generation assays. The differentiated cells were subjected or not to 3 (subtoxic dose) or 12 Gy (positive control for cell death and proliferation assays) (Gamma-cell Extractor 40, Nordion, Ottawa, ON, Canada). Two days post IR, cells were placed either in FCS or SCM medium to keep them differentiated or to favor the dedifferentiation process in a permissive stem medium, respectively (Figure 2a). Unless stated, cells were cultured until the appearance of a sufficient number of NS in the medium, corresponding to an average of 30 days after irradiation. For the experiments using the selective chemical inhibitors of survivin or AKT, 7 nM YM-155 (SelleckChem, Houston, TX, USA) or 250 nM MK-2206 (SelleckChem) were respectively added as a pretreatment 2 days before irradiation and then renewed with the cell medium every week. At the end of the protocol, cultures were observed by microscopy (Nikon Diaphot, Nikon, Champigny sur Marne, France) under a $\times 4$ or $\times 10$ objective and the primary NS were counted for each condition in the entire 25-cm² flask (Figures 3a and b). Next, the totality of the cells was collected after trypsinization for subsequent experiments. For adaptation of the limiting dilution NS generation assay, we plated differentiated cells in 24-cell plates at different low cell densities (2500–30 000 cells/well) before subjecting them to the long-term protocol. Generated primary NS were then counted by microscopy in each well (Figure 3c). When stated, differentiated cells could also be sorted by FACS analysis to select the A2B5-negative cell population before running the primary NS generation assay (Figure 3d).

Primary NS obtained at the end of the dedifferentiation protocol, with or without a preliminary FACS sorting of the differentiated cells, were dissociated and plated in 96-well plates (24 wells per condition) at different cellular densities (1–500 cells/well), in order to assess their ability to generate secondary NS through limiting dilution assays. After 15 days, secondary NS were counted by microscopy in each well.

Quantitative real-time RT-PCR. Total RNA was isolated either from primary NS, FCS-differentiated cells or from cells at the end of the dedifferentiation protocol using RNeasy kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and then reverse-transcribed using iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France). Real-time qPCR reactions were carried out using the Fluidigm 96.96 dynamic array integrated fluidic circuits and the Biomark HD System (Fluidigm, Les Ulis, France) according Advanced Development Protocol no. 37 (Toulouse GeT Platform). β 2-Microglobulin was used as endogenous control in the Δ Ct analysis. The different primers (Eurogentec, Angers, France) used in this study are described in Supplementary Table 1.

Immunohistochemistry. Immunohistochemistry was performed on the excised brains on paraffin-embedded sections (5 μm). For Nanog detection, only the brain samples displaying an equivalent tumor area of 70–80% of the total brain were selected, as determined by Hemalun–Eosin staining (Supplementary Figure 2a). Briefly, the sections were incubated for 90 min with an anti-Nanog antibody (Ab62734, Abcam, Paris, France). Slides were counterstained with hematoxylin and viewed on a Nikon microscope. Nanog-positive cell clusters were then counted in the tumor area.

Flow cytometry analyses. Direct immunofluorescence assay was performed by FACS as previously described.^{70,71} When required, collected cells were first subjected to a step of permeabilization using the cytofix/cytoperm kit (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). For all samples, 2×10^5 cells were then incubated for 30 min in PBS with 10% BSA at 4 °C to avoid nonspecific binding, and then incubated with appropriate conjugated primary antibodies for 40 min at 4 °C. Fluorescence related to immunolabeling was measured using a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences). The antibodies used are depicted in Supplementary Table 2. Each measurement was conducted on at least 7000 events, acquired on CellQuest software (BD Biosciences) and analyzed with VenturiOne software (Applied Cytometry, Sheffield, UK). To evaluate the marker expression, we determined the specific fluorescence index (SFI) using the mean fluorescence intensity (MFI). The SFI was calculated as previously described, with the following formula $SFI = (MFI_{\text{antibody}} - MFI_{\text{isotype control}}) / MFI_{\text{isotype control}}$.⁷¹ The gating strategy used in these analyses is described in Supplementary Figure 3 and is based on a previously published protocol.⁷² For NS generation assay, a FACS sorting (Beckman MoFlo Astrios, Beckman Coulter, Villepinte, France) was performed when mentioned on GBM-differentiated cells (A cell line) before the assay, in order to only sort the differentiated population, which was characterized by (i) its specific FSC-H/SSC-H pattern (Gate C, see Supplementary Figure 3) and (ii) its negative expression of the stem marker A2B5, as previously described.^{4,73}

Western blotting. Cells were lysed in RIPA buffer complemented with cocktails of protease and phosphatase inhibitors (Sigma-Aldrich). Twenty-five micrograms of proteins were then separated on a 10 or 12.5% SDS-PAGE, electroblotted onto PVDF membranes (Amersham, GE Healthcare, Velizy-Villacoublay, France), which were blocked with 10% milk. The primary antibodies used for this study are listed in Supplementary Table 3.

Cell death and proliferation assays. Apoptotic cells were quantified using FACS analysis by determining the percentage of cells with subG1-DNA content. This subG1 population was analysed after cell permeabilization and subsequent PI staining, as previously described.⁷⁴ Apoptosis and necrosis were also quantified at the same time on non-permeabilized cells by flow cytometry, with an Alexa Fluor 488-conjugated AV and PI kit, according to the manufacturer's protocol (Invitrogen, Life Technologies). SubG1 and AV measurements were conducted on at least 10 000 events, acquired on CellQuest software (BD Biosciences) and analyzed with

Figure 8 Requirement of the IR-induced survivin overexpression for the dedifferentiation process in GBM cells. (a–d) Differentiated GBM cells were pre-treated for 24 h with either a survivin inhibitor (YM-155 7 nM) or an AKT inhibitor (MK-2206 250 nM) and then irradiated or not at 3 Gy before being placed 2 days after in either FCS or SCM medium, complemented or not with fresh YM-155 or MK-2206 inhibitors. (a) Western blot analysis of the effect of YM-155 and MK-2206 treatment on Survivin expression in GBM cells (I cell line) irradiated or not and kept in SCM medium for 1 additional week. Efficiency of MK-2206 toward AKT was also checked as a control by the blotting of phospho-AKT1 (pAKT1). (b and c) At the end of the dedifferentiation protocol, the effects of YM-155 and MK-2206 were measured on the NS generation potential in response to IR by NS counting in phase-contrast microscopy (original magnification: $\times 4$, scale bar: 17 μm) (b) and subsequent quantification in the indicated cell lines (c). Results are expressed as the means \pm S.E.M. of three independent experiments. $***P < 0.01$, $****P < 0.001$ compared with the 3-Gy SCM condition. (d) The involvement of Survivin in the IR-induced GBM reprogramming was checked by western blotting by analyzing the expression of the stem markers Nestin, Sox2 and Olig2 at the end of the dedifferentiation protocol in the presence or absence of YM-155 and MK-2206. Concerning western blottings, equal gel loading and transfer efficiency were checked with an anti-actin, AKT1 or β 2-microglobulin (β 2M) antibody, and results were representative of at least three independent experiments on the indicated cell line and reproduced in all the cell lines

VenturiOne software (Applied Cytometry). The proliferation rate was finally analyzed using the WST-1 assay (Roche Diagnostics, Meylan, France) in 96-well microplates, as previously described.⁷⁰ The yellow formazan product formed by viable adherent cells was quantified by detection of its absorbance at 450 nm using a Multiskan Multisoft Labsystem spectrophotometer (ThermoFisher, Illkirch, France). For these cell death and proliferation assays, differentiated cells were treated or not with a 3- or 12-Gy irradiation, placed 2 days after either in FCS or SCM medium and collected for analysis 1 week after irradiation.

Orthotopic xenograft generation. Nude mice were housed in the Claudius Regaud Institute Animal Care-accredited facility and the Institution animal ethics committee approval was obtained for the use of the animal model and the study protocols. Orthotopic human GBM xenografts were established in 4- to 6-week-old female nude mice (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) as previously described.⁶⁸ Briefly, mice received a stereotaxically guided injection of either 1.75×10^5 (G cell line) or 2.5×10^5 cells (D cell line) collected at the end of the dedifferentiation protocol and resuspended in DMEM-F12. The injection was precisely located into the right forebrain (2 mm lateral and 1 mm anterior to the bregma at a 5-mm depth from the skull surface). In order to check the cell tumorigenicity, survival curves were established and mice were killed at the appearance of neurological signs. Excised brains were then collected for subsequent immunohistochemistry analysis.

Statistical analysis. The results are presented as means \pm S.E.M. of at least three independent experiments. Significant differences ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$ and $***P < 0.001$) were evaluated with the Student *t*-test. Log-rank analysis of Kaplan-Meier survival curves was used to evaluate the tumorigenesis of injected cells, with $P < 0.05$ considered as significantly different (Graphpad Prism v5, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Western blottings and FACS plots are representative of at least three different experiments in the same cell line and were reproduced in all the other cell lines.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements. We thank the Claudius Regaud Institute Anatomopathology service, Jean-José Maoret and Frédéric Martins at the Toulouse GeT Platform and Anne-Laure Iscache for her technical assistance on the FACS sorting. We also thank Laurence Huc and Nicolas Skuli for critically reading this manuscript. PD was supported by a PhD fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and LM by a PhD fellowship from ITMO Cancer - Plan Cancer 2014. This research was funded by la Ligue Régionale Contre le Cancer (Hautes-Pyrénées, Lot and Haute-Garonne committees) (to AL), by the Groupe de Recherche de l'Institut Claudius Regaud (GRICR, to CT and ECJM) and by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM).

- Park DM, Sathornsumetee S, Rich JN. Medical oncology: treatment and management of malignant gliomas. *Nat Rev Clin Oncol* 2010; **7**: 75–77.
- Tang DG. Understanding cancer stem cell heterogeneity and plasticity. *Cell Res* 2012; **22**: 457–472.
- Cheng L, Bao S, Rich JN. Potential therapeutic implications of cancer stem cells in glioblastoma. *Biochem Pharmacol* 2010; **80**: 654–665.
- Tchoghadjian A, Baeza N, Colin C, Cayre M, Metellus P, Beclin C et al. A2B5 cells from human glioblastoma have cancer stem cell properties. *Brain Pathol* 2010; **20**: 211–221.
- Altaner C. Glioblastoma and stem cells. *Neoplasia* 2008; **55**: 369–374.
- 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* 2006; **444**: 756–760.
- Charles N, Holland EC. Brain tumor treatment increases the number of cancer stem-like cells. *Expert Rev Neurother* 2009; **9**: 1447–1449.
- Mannino M, Chalmers AJ. Radioresistance of glioma stem cells: intrinsic characteristic or property of the 'microenvironment-stem cell unit'? *Mol Oncol* 2011; **5**: 374–386.
- Facchino S, Abdouh M, Chatoou W, Bernier G. BMI1 confers radioresistance to normal and cancerous neural stem cells through recruitment of the DNA damage response machinery. *J Neurosci* 2010; **30**: 10096–10111.
- Lim YC, Roberts TL, Day BW, Harding A, Kozlov S, Kijas AW et al. A role for homologous recombination and abnormal cell-cycle progression in radioresistance of glioma-initiating cells. *Mol Cancer Ther* 2012; **11**: 1863–1872.

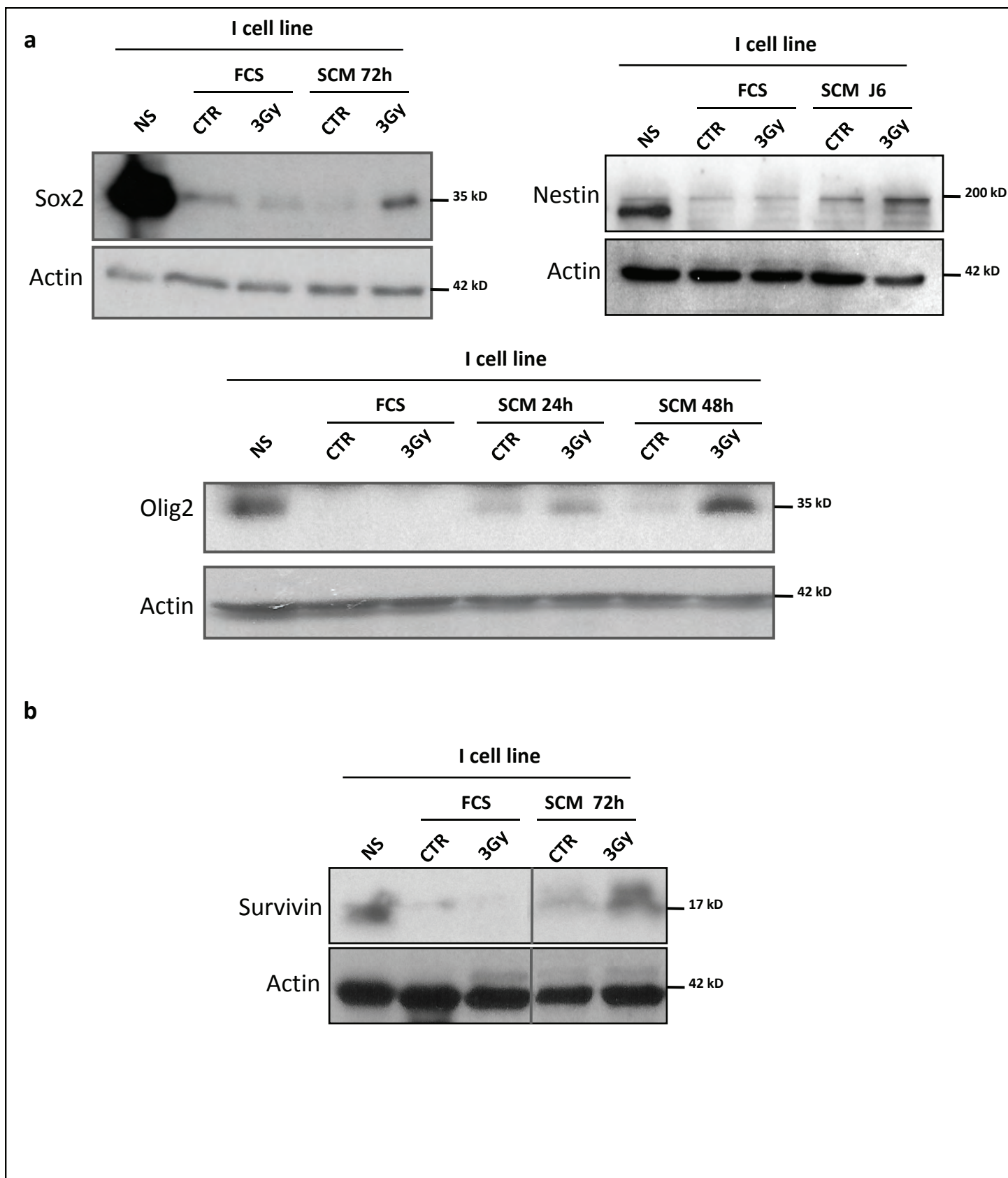
- Liu G, Yuan X, Zeng Z, Tunici P, Ng H, Abdulkadir IR et al. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer* 2006; **5**: 67.
- Vellanki SH, Grabrucker A, Liebau S, Proepper C, Eramo A, Braun V et al. Small-molecule XIAP inhibitors enhance gamma-irradiation-induced apoptosis in glioblastoma. *Neoplasia* 2009; **11**: 743–752.
- Kang KB, Zhu C, Wong YL, Gao Q, Ty A, Wong MC. Gefitinib radiosensitizes stem-like glioma cells: inhibition of epidermal growth factor receptor-Akt-DNA-PK signaling, accompanied by inhibition of DNA double-strand break repair. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2012; **83**: e43–e52.
- Osuka S, Sampetean O, Shimizu T, Saga I, Onishi N, Sugihara E et al. IGF1 receptor signaling regulates adaptive radioprotection in glioma stem cells. *Stem Cells* 2012; **31**: 627–640.
- Yoon CH, Kim MJ, Kim RK, Lim EJ, Choi KS, An S et al. c-Jun N-terminal kinase has a pivotal role in the maintenance of self-renewal and tumorigenicity in glioma stem-like cells. *Oncogene* 2012; **31**: 4655–4666.
- Wang J, Wakeman TP, Lathia JD, Hjelmeland AB, Wang XF, White RR et al. Notch promotes radioresistance of glioma stem cells. *Stem Cells* 2010; **28**: 17–28.
- Hardee ME, Marciscano AE, Medina-Ramirez CM, Zagzag D, Narayana A, Lonning SM et al. Resistance of glioblastoma-initiating cells to radiation mediated by the tumor microenvironment can be abolished by inhibiting transforming growth factor-beta. *Cancer Res* 2012; **72**: 4119–4129.
- Zhang M, Kleber S, Rohrich M, Timke C, Han N, Tuettenberg J et al. Blockade of TGF-beta signaling by the TGFbetaR-I kinase inhibitor LY2109761 enhances radiation response and prolongs survival in glioblastoma. *Cancer Res* 2011; **71**: 7155–7167.
- 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* 2007; **25**: 2524–2533.
- Yang YP, Chang YL, Huang PI, Chiou GY, Tseng LM, Chiou SH et al. Resveratrol suppresses tumorigenicity and enhances radiosensitivity in primary glioblastoma tumor initiating cells by inhibiting the STAT3 axis. *J Cell Physiol* 2012; **227**: 976–993.
- Kim Y, Kim KH, Lee J, Lee YA, Kim M, Lee SJ et al. Wnt activation is implicated in glioblastoma radioresistance. *Lab Invest* 2012; **92**: 466–473.
- Jamal M, Rath BH, Tsang PS, Camphausen K, Tofilon PJ. The brain microenvironment preferentially enhances the radioresistance of CD133(+) glioblastoma stem-like cells. *Neoplasia* 2012; **14**: 150–158.
- 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* 2009; **8**: 3274–3284.
- 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* 2009; **15**: 501–513.
- Hjelmeland AB, Wu Q, Heddleston JM, Choudhary GS, MacSwords J, Lathia JD et al. Acidic stress promotes a glioma stem cell phenotype. *Cell Death Differ* 2011; **18**: 829–840.
- Charles N, Ozawa T, Squatrito M, Bleau AG, Brennan CW, Hambarzumyan D et al. Perivascular nitric oxide activates notch signaling and promotes stem-like character in PDGF-induced glioma cells. *Cell Stem Cell* 2010; **6**: 141–152.
- Eyler CE, Wu Q, Yan K, MacSwords JM, Chandler-Miitello D, Misuraca KL et al. Glioma stem cell proliferation and tumor growth are promoted by nitric oxide synthase-2. *Cell* 2011; **146**: 53–66.
- 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* 2014; **21**: 1119–1131.
- Li Y, Li A, Glas M, Lal B, Ying M, Sang Y et al. c-Met signaling induces a reprogramming network and supports the glioblastoma stem-like phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; **108**: 9951–9956.
- Helczynska K, Kronblad A, Jogi A, Nilsson E, Beckman S, Landberg G et al. Hypoxia promotes a dedifferentiated phenotype in ductal breast carcinoma in situ. *Cancer Res* 2003; **63**: 1441–1444.
- Jogi A, Ora I, Nilsson H, Poellinger L, Axelson H, Pahlman S. Hypoxia-induced dedifferentiation in neuroblastoma cells. *Cancer Lett* 2003; **197**: 145–150.
- Larvin O, Monferran S, Delmas C, Couderc B, Toulas C, Cohen-Jonathan-Moyal E. Radiation-induced mitotic cell death and glioblastoma radioresistance: a new regulating pathway controlled by integrin-linked kinase, hypoxia-inducible factor 1alpha and survivin in U87 cells. *Eur J Cancer* 2013; **49**: 2884–2891.
- Tabatabai G, Frank B, Mohle R, Weller M, Wick W. Irradiation and hypoxia promote homing of haematopoietic progenitor cells towards gliomas by TGF-beta-dependent HIF-1alpha-mediated induction of CXCL12. *Brain* 2006; **129**: 2426–2435.
- 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* 2012; **338**: 1080–1084.
- Kim MJ, Kim RK, Yoon CH, An S, Hwang SG, Suh Y et al. Importance of PKCdelta signaling in fractionated-radiation-induced expansion of glioma-initiating cells and resistance to cancer treatment. *J Cell Sci* 2011; **124**: 3084–3094.
- Suva ML, Riggi N, Janiszewska M, Radovanovic I, Provero P, Stehle JC et al. EZH2 is essential for glioblastoma cancer stem cell maintenance. *Cancer Res* 2009; **69**: 9211–9218.

37. Wu Y, Richard JP, Wang SD, Rath P, Laterra J, Xia S. Regulation of glioblastoma multiforme stem-like cells by inhibitor of DNA binding proteins and oligodendroglial lineage-associated transcription factors. *Cancer Sci* 2012; **103**: 1028–1037.
38. Ernst A, Campos B, Meier J, Devens F, Liesenberg F, Wolter M et al. De-repression of CTGF via the miR-17-92 cluster upon differentiation of human glioblastoma spheroid cultures. *Oncogene* 2010; **29**: 3411–3422.
39. Mangiola A, Lama G, Giannitelli C, De Bonis P, Anile C, Lauriola L et al. Stem cell marker nestin and c-Jun NH2-terminal kinases in tumor and peritumor areas of glioblastoma multiforme: possible prognostic implications. *Clin Cancer Res* 2007; **13**: 6970–6977.
40. Shih AH, Holland EC. Notch signaling enhances nestin expression in gliomas. *Neoplasia* 2006; **8**: 1072–1082.
41. Venere M, Hamerlik P, Wu Q, Rasmussen RD, Song LA, Vasani A et al. Therapeutic targeting of constitutive PARP activation compromises stem cell phenotype and survival of glioblastoma-initiating cells. *Cell Death Differ* 2014; **21**: 258–269.
42. Nielsen JA, Maric D, Lau P, Barker JL, Hudson LD. Identification of a novel oligodendrocyte cell adhesion protein using gene expression profiling. *J Neurosci* 2006; **26**: 9881–9891.
43. Dirks PB. Brain tumour stem cells: the undercurrents of human brain cancer and their relationship to neural stem cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2008; **363**: 139–152.
44. 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* 2008; **14**: 123–129.
45. Zhou X, Zhou YP, Huang GR, Gong BL, Yang B, Zhang DX et al. Expression of the stem cell marker, Nanog, in human endometrial adenocarcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 2011; **30**: 262–270.
46. Chakravarti A, Zhai GG, Zhang M, Malhotra R, Latham DE, Delaney MA et al. Survivin enhances radiation resistance in primary human glioblastoma cells via caspase-independent mechanisms. *Oncogene* 2004; **23**: 7494–7506.
47. Iscrú E, Ahmed T, Coremans V, Bozzi Y, Caleo M, Conway EM et al. Loss of survivin in neural precursor cells results in impaired long-term potentiation in the dentate gyrus and CA1-region. *Neuroscience* 2013; **231**: 413–419.
48. Cui D, Xu Q, Wang K, Che X. Gli1 is a potential target for alleviating multidrug resistance of gliomas. *J Neurol Sci* 2010; **288**: 156–166.
49. Guvenc H, Pavlyukov MS, Joshi K, Kurt H, Banasavadi-Siddegowda YK, Mao P et al. Impairment of glioma stem cell survival and growth by a novel inhibitor for Survivin-Ran protein complex. *Clin Cancer Res* 2013; **19**: 631–642.
50. Ryan BM, O'Donovan N, Duffy MJ. Survivin: a new target for anti-cancer therapy. *Cancer Treat Rev* 2009; **35**: 553–562.
51. Pal SK, Reckamp K, Yu H, Figlin RA. Akt inhibitors in clinical development for the treatment of cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 2010; **19**: 1355–1366.
52. Jeong JC, Kim MS, Kim TH, Kim YK. Kaempferol induces cell death through ERK and Akt-dependent down-regulation of XIAP and survivin in human glioma cells. *Neurochem Res* 2009; **34**: 991–1001.
53. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, 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* 2009; **10**: 459–466.
54. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; **352**: 987–996.
55. Sherriff J, Tamangani J, Senthil L, Cruickshank G, Spooner D, Jones B et al. Patterns of relapse in glioblastoma multiforme following concomitant chemoradiotherapy with temozolomide. *Br J Radiol* 2013; **86**: 20120414.
56. Campos B, Wan F, Farhadi M, Ernst A, Zeppernick F, Tagscherer KE et al. Differentiation therapy exerts antitumor effects on stem-like glioma cells. *Clin Cancer Res* 2010; **16**: 2715–2728.
57. Zhuang W, Li B, Long L, Chen L, Huang Q, Liang Z. Induction of autophagy promotes differentiation of glioma-initiating cells and their radiosensitivity. *Int J Cancer* 2011; **129**: 2720–2731.
58. Lagadec C, Vlashi E, Della Donna L, Dekmezian C, Pajonk F. Radiation-induced reprogramming of breast cancer cells. *Stem Cells* 2012; **30**: 833–844.
59. Ju JH, Yang W, Oh S, Nam K, Lee KM, Noh DY et al. HER2 stabilizes survivin while concomitantly down-regulating survivin gene transcription by suppressing Notch cleavage. *Biochem J* 2013; **451**: 123–134.
60. Wen K, Fu Z, Wu X, Feng J, Chen W, Qian J. Oct-4 is required for an antiapoptotic behavior of chemoresistant colorectal cancer cells enriched for cancer stem cells: effects associated with STAT3/Survivin. *Cancer Lett* 2013; **333**: 56–65.
61. Feng R, Zhou S, Liu Y, Song D, Luan Z, Dai X et al. Sox2 protects neural stem cells from apoptosis via up-regulating survivin expression. *Biochem J* 2013; **450**: 459–468.
62. Church DN, Talbot DC. Survivin in solid tumors: rationale for development of inhibitors. *Curr Oncol Rep* 2012; **14**: 120–128.
63. Coumar MS, Tsai FY, Kanwar JR, Sarvagalla S, Cheung CH. Treat cancers by targeting survivin: Just a dream or future reality? *Cancer Treat Rev* 2013; **39**: 802–811.
64. Reichert S, Rodel C, Mirsch J, Harter PN, Tomicic MT, Mittelbronn M et al. Survivin inhibition and DNA double-strand break repair: a molecular mechanism to overcome radioresistance in glioblastoma. *Radiother Oncol* 2011; **101**: 51–58.
65. Kanwar JR, Kamalapuram SK, Kanwar RK. Targeting survivin in cancer: the cell-signalling perspective. *Drug Discov Today* 2011; **16**: 485–494.
66. Eyller CE, Foo WC, LaFiura KM, McLendon RE, Hjelmeland AB, Rich JN. Brain cancer stem cells display preferential sensitivity to Akt inhibition. *Stem Cells* 2008; **26**: 3027–3036.
67. Wei Y, Jiang Y, Zou F, Liu Y, Wang S, Xu N et al. Activation of PI3K/Akt pathway by CD133-p85 interaction promotes tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; **110**: 6829–6834.
68. Avril T, Vauleon E, Hamlat A, Saikali S, Etcheverry A, Delmas C et al. Human glioblastoma stem-like cells are more sensitive to allogeneic NK and T cell-mediated killing compared with serum-cultured glioblastoma cells. *Brain Pathol* 2011; **22**: 159–174.
69. Vlashi E, Lagadec C, Vergnes L, Matsutani T, Masui K, Poulou M et al. Metabolic state of glioma stem cells and nontumorigenic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; **108**: 16062–16067.
70. Lemarie A, Morzadec C, Bourdonnay E, Fardel O, Vernhet L. Human macrophages constitute targets for immunotoxic inorganic arsenic. *J Immunol* 2006; **177**: 3019–3027.
71. Monferran S, Skuli N, Delmas C, Favre G, Bonnet J, Cohen-Jonathan-Moyal E et al. Alpha5beta3 and alpha5beta5 integrins control glioma cell response to ionising radiation through ILK and RhoB. *Int J Cancer* 2008; **123**: 357–364.
72. Mlynarik V, Cudalbu C, Clement V, Marino D, Radovanovic I, Gruetter R. In vivo metabolic profiling of glioma-initiating cells using proton magnetic resonance spectroscopy at 14.1 Tesla. *NMR Biomed* 2012; **25**: 506–513.
73. Auvergne RM, Sim FJ, Wang S, Chandler-Milletello D, Burch J, Al Fanek Y et al. Transcriptional differences between normal and glioma-derived glial progenitor cells identify a core set of dysregulated genes. *Cell Rep* 2013; **3**: 2127–2141.
74. Lemarie A, Huc L, Pazarentzos E, Mahul-Mellier AL, Grimm S. Specific disintegration of complex II succinate:ubiquinone oxidoreductase links pH changes to oxidative stress for apoptosis induction. *Cell Death Differ* 2011; **18**: 338–349.

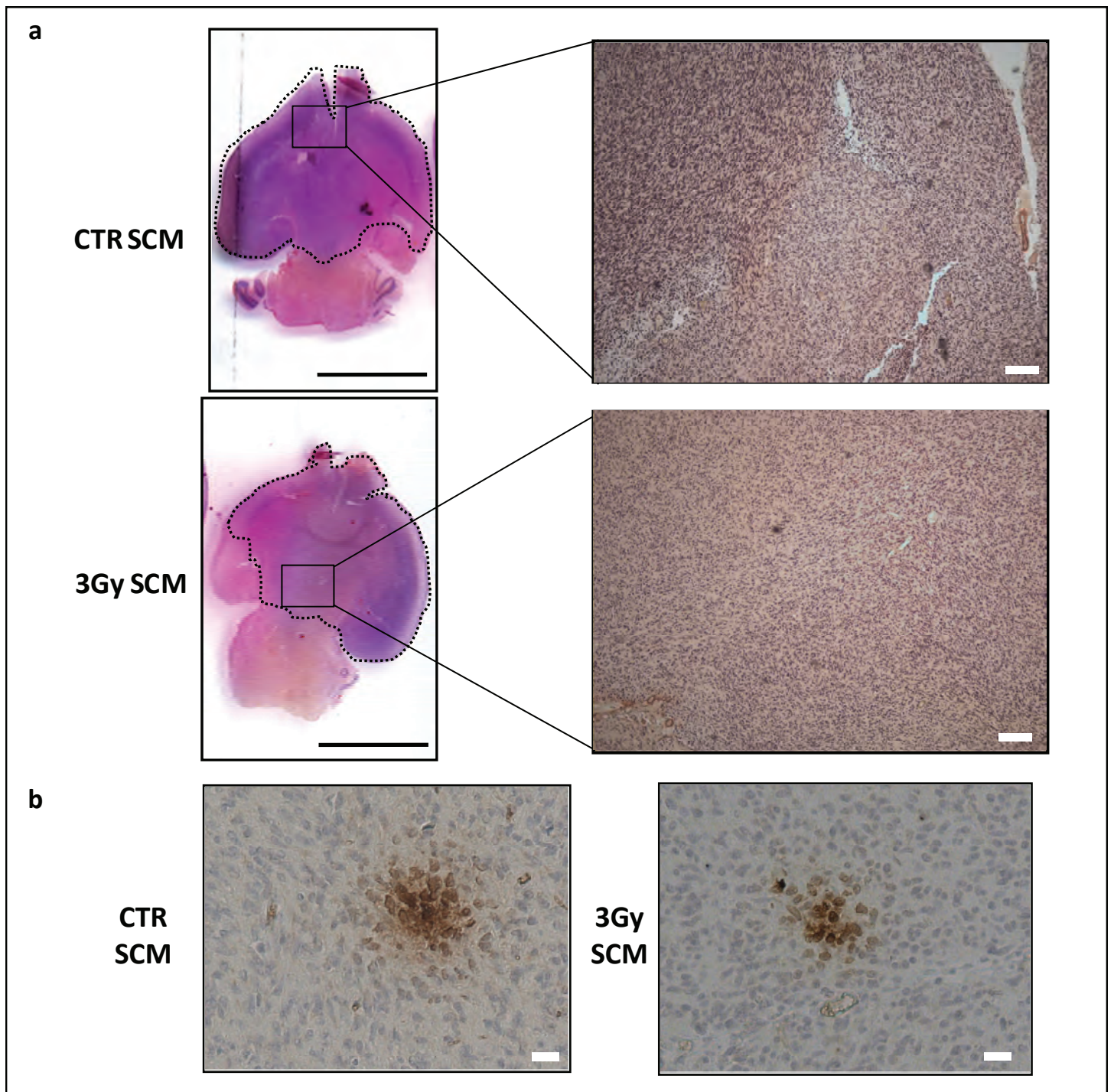


Cell Death and Disease is an open-access journal published by Nature Publishing Group. This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons licence, users will need to obtain permission from the licence holder to reproduce the material. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>

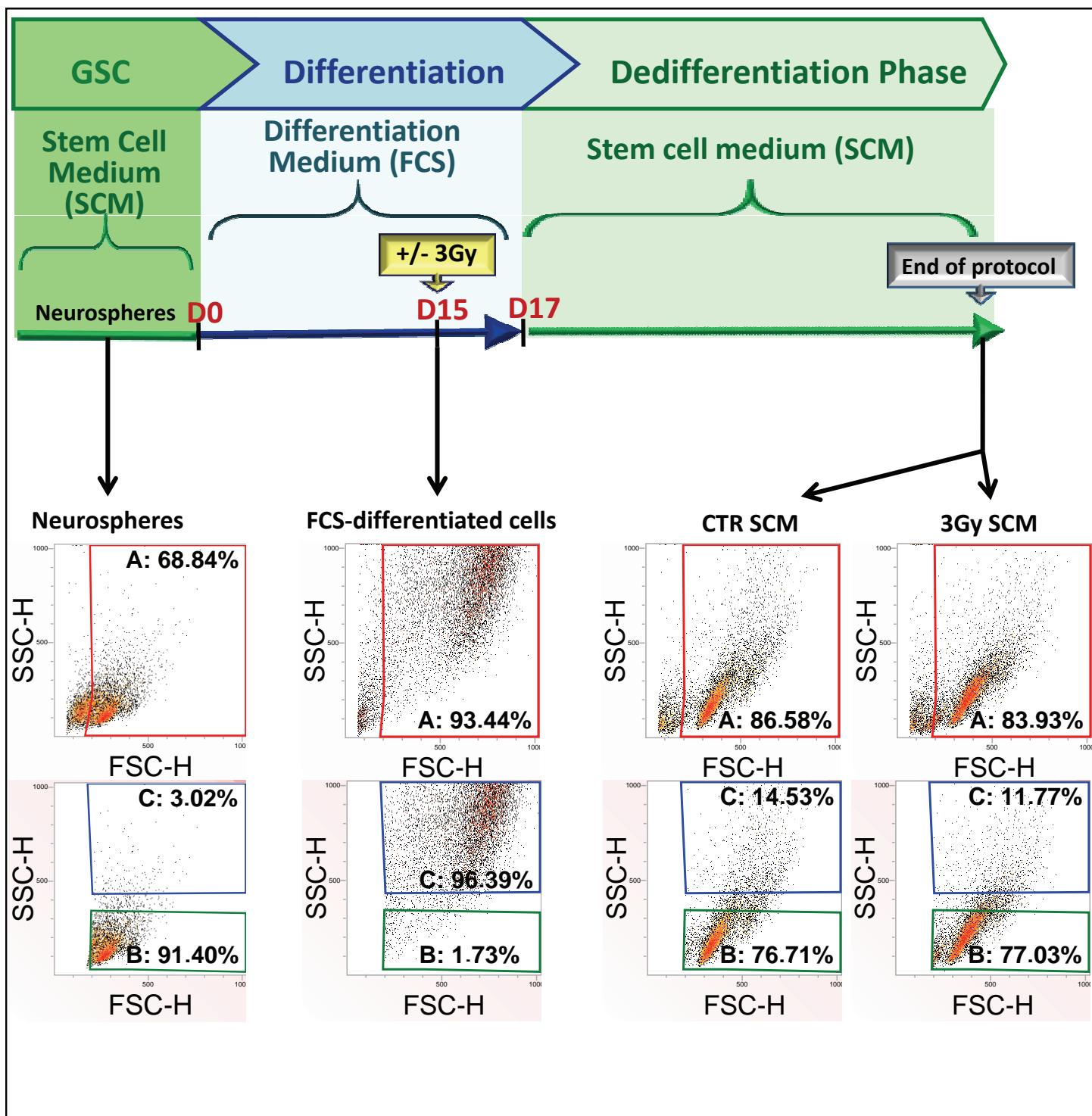
Supplementary Information accompanies this paper on Cell Death and Disease website (<http://www.nature.com/cddis>)



Supplementary Figure 1: Overexpression of stem markers Sox2, Olig2 and Nestin (a) and survivin (b) at short term in GBM cells after a 3 Gy-irradiation. Differentiated GBM cells treated or not by a 3 Gy-irradiation and placed 24h after in either FCS or SCM medium for 1 to 6 supplemental days were analyzed by Western-blot. Protein expression levels in neurosphere cells were shown as a control for the stem condition. Equal gel loading and transfer efficiency were checked with anti-actin.



Supplementary Figure 2: Hemalun-Eosin staining of orthotopically xenografted GBM tumor cells in nude mice brain. Differentiated GBM cells (G cell line) treated or not with a 3Gy-irradiation and placed 2 days after in SCM medium for long-term culture were subsequently orthotopically xenografted in nude mice to evaluate their tumorigenic potential. At the appearance of neurological signs, mice were sacrificed and their brain were collected to perform paraffin-embedded sections. **(a)** Prior to IHC, a Hemalun-Eosin staining was done to estimate the area of the tumor (delineated borders) and only the samples comprised between 70-80% of the total brain were selected for IHC in order to compare the different conditions. A representative staining photomicrograph was shown for the whole brain section (right panel, scale bar : 0.5 cm) and a HE-positive tumoral area (right panel, magnification: x4, scale bar: 12.5 μm). **(b)** Nanog expression pattern by IHC in orthotopically xenografted tumors obtained after injection of GBM cells (G cell line) subjected to the dedifferentiation process in SCM with or without a 3Gy irradiation. A representative IHC photomicrograph was shown for each condition. Magnification: x10, scale bar: 5 μm .



Supplementary Figure 3: Gating strategy used for the direct immunofluorescence assay by FACS. GBM cells were gated and then analyzed by FACS according to the protocol previously described (Mlynarik et al., 2012) in order to discriminate the less-differentiated population (Gate B) from the well-differentiated population (Gate C). Prior to this, a pre-gating was performed to avoid cell debris in the analysis (Gate A). In the neurosphere cells used for this study, the percentage of cells in Gate B was always comprised between 70 to 100%, as they are enriched in GSC. The 15 days-differentiation process in FCS medium led to a well-differentiated cell population superior to 90% (Gate C). At the end of the dedifferentiation process in SCM medium, the harvested cells irradiated or not were mostly located in Gate B (70 to 100%). As a consequence, immunofluorescence analyses were performed on cells located in Gate B for Neurospheres and SCM-dedifferentiated cells and on Gate C for the FCS-differentiated cells.

SUPPLEMENTARY TABLES

Supplementary Table 1. Forward and reverse primer sequences used for quantitative PCR detection.

Quantitative PCR primer sequences	
β2-microglobulin (human)	forward 5'-ACCCCCACTGAAAAAGATGA-3' reverse 5'- ATCTTCAAACCTCCATGATG-3'
Cd133 (human)	forward 5'-GCATTGGCATCTTCTATGGTT-3' reverse 5'- CGCCTTGTCTTGGTAGTGT-3'
CTGF (human)	forward 5'-CATCTCCACCCGGGTTACC-3' reverse 5'-CAGGCGGCTCTGCTTCTCTA-3'
EZH2 (human)	forward 5'-GGACCACAGTGTTACCAGCAT-3' reverse 5'-GTGGGGTCTTTATCCGCTCAG-3'
GFAP (human)	forward 5'-GGCAAAGCACCAAAGACGG-3' reverse 5'-GGCGGCGTTCCATTTACAAT-3'
Gli1 (human)	forward 5'-AATGCTGCCATGGATGCTAGA-3' reverse 5'-GAGTATCAGTAGGTGGGAAGTCCATAT-3'
Nanog (human)	forward 5'-GTCCCGGTCAAGAAACAGAA-3' reverse 5'-TGCCTCACACCATTGCTATT-3'
Nestin (human)	forward 5'-ATCGCTCAGGTCCTGGAAGG-3' reverse 5'-AAGCTGAGGGAAGTCTTGGAG-3'
Notch1 (human)	forward 5'-TGGACCAGATTGGGGAGTTC-3' reverse 5'-GCACACTCGTCTGTGTTGAC-3'
Olig1 (human)	forward 5'-AGGTAACCAGGCGTCTCACAGT-3' reverse 5'-CGGTACTCCTGCGTGTTAATGA-3'
Olig2 (human)	forward 5'-CAGAAGCGCTGATGGTCATA-3' reverse 5'-TCGGCAGTTTTGGGTTATTC-3'
OMG (human)	forward 5'-TAGGGACTCCATGTTCTACCCA-3' reverse 5'- TCTGCATCCCCTTACAGTGA-3'
SonicHH (human)	forward 5'-GCGGAAGGTATGAAGGGAAG-3' reverse 5'-GCCAAAGCGTTCAACTTGTC-3'
Sox2 (human)	forward 5'-GCACATGAACGGCTGGAGCAACG-3' reverse 5'-TGCTGCGAGTAGGACATGCTGTAGG-3'
Survivin (human)	forward 5'-CGAGGCTGGCTTCATCCA-3' reverse 5'-AGAAGAAACTGGGCCAAGTC-3'

Supplementary Table 2. Primary antibodies used for flow cytometry.

Marker	Antibodies and fluorochromes	Suppliers	FACS channel
A2B5 (human)	Mouse monoclonal antibody : A2B5 - APC Isotype control : IgM - APC	Miltenyi	FL4-H
Cd133 (human)	Mouse monoclonal antibody : Cd133/2 - PE Isotype control : Igg2B -PE	Miltenyi	FL2-H
GFAP (human)	Mouse monoclonal antibody : GFAP - AF647 Isotype control : Igg2B - AF647	BD Biosciences	FL4-H
Nanog (human)	Goat polyclonal antibody : Nanog - PE Isotype control : IgG - PE	R&D Systems	FL2-H
Nestin (human)	Mouse monoclonal antibody : Nestin - Fluorescein Isotype control : Igg1 - Fluorescein	R&D Systems	FL1-H
Notch1 (human)	Mouse monoclonal antibody : Notch1 - PerCP Isotype control : Igg1 - PerCP	R&D Systems	FL3-H
O4 (human)	Mouse monoclonal antibody : O4 - PE Isotype control : IgM - PE	R&D Systems	FL2-H
TUJ1 (human)	Mouse monoclonal antibody : Tuj1 - AF488 Isotype control : Igg2A - AF488	BD Biosciences	FL1-H
Sox2 (human)	Mouse monoclonal antibody : Sox2 - APC Isotype control : Igg2A - APC	R&D Systems	FL4-H

Supplementary Table 3. Primary antibodies used for western blotting.

Marker	Antibodies	Suppliers
Actin (human)	Mouse monoclonal antibody (MAB1501)	Millipore
β2-microglobulin (human)	Rabbit monoclonal antibody (Ab75853)	Abcam
AKT1 (human)	Rabbit monoclonal antibody (Ab32505)	Abcam
AKT1 (phospho S473) (human)	Rabbit polyclonal antibody (Ab66138)	Abcam
Nestin (human)	Mouse monoclonal antibody (MAB5326)	Millipore
Olig2 (human)	Rabbit polyclonal antibody (AB9610)	Millipore
Sox2 (human)	Mouse monoclonal antibody (MAB4343)	Millipore
Survivin (human)	Rabbit monoclonal antibody (Ab76424)	Abcam

BIBLIOGRAPHIE

- Abadjian, M. Z., Edwards, W. B., and Anderson, C. J. (2017). Imaging the Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol* 2017, 229-257.
- Abdollahi, A., Griggs, D. W., Zieher, H., Roth, A., Lipson, K. E., Saffrich, R., Grone, H. J., Hallahan, D. E., Reisfeld, R. A., Debus, J., *et al.* (2005). Inhibition of alpha(v)beta3 integrin survival signaling enhances antiangiogenic and antitumor effects of radiotherapy. *Clin Cancer Res* 11, 6270-6279.
- Ader, I., Delmas, C., Skuli, N., Bonnet, J., Schaeffer, P., Bono, F., Cohen-Jonathan-Moyal, E., and Toulas, C. (2014). Preclinical evidence that SSR128129E--a novel small-molecule multi-fibroblast growth factor receptor blocker--radiosensitises human glioblastoma. *Eur J Cancer* 50, 2351-2359.
- Afshar, G., Jelluma, N., Yang, X., Basila, D., Arvold, N. D., Karlsson, A., Yount, G. L., Dansen, T. B., Koller, E., and Haas-Kogan, D. A. (2006). Radiation-induced caspase-8 mediates p53-independent apoptosis in glioma cells. *Cancer Res* 66, 4223-4232.
- Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., and Clarke, M. F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 3983-3988.
- Alcantara Llaguno, S. R., and Parada, L. F. (2016). Cell of origin of glioma: biological and clinical implications. *Br J Cancer* 115, 1445-1450.
- Alcantara Llaguno, S. R., Wang, Z., Sun, D., Chen, J., Xu, J., Kim, E., Hatanpaa, K. J., Raisanen, J. M., Burns, D. K., Johnson, J. E., and Parada, L. F. (2015). Adult Lineage-Restricted CNS Progenitors Specify Distinct Glioblastoma Subtypes. *Cancer Cell* 28, 429-440.
- Aldape, K., Zadeh, G., Mansouri, S., Reifenberger, G., and von Deimling, A. (2015). Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta neuropathologica* 129, 829-848.
- Almokadem, S., and Belani, C. P. (2012). Volociximab in cancer. *Expert Opin Biol Ther* 12, 251-257.
- Anido, J., Saez-Borderias, A., Gonzalez-Junca, A., Rodon, L., Folch, G., Carmona, M. A., Prieto-Sanchez, R. M., Barba, I., Martinez-Saez, E., Prudkin, L., *et al.* (2010). TGF-beta Receptor Inhibitors Target the CD44(high)/Id1(high) Glioma-Initiating Cell Population in Human Glioblastoma. *Cancer Cell* 18, 655-668.
- Annes, J. P., Munger, J. S., and Rifkin, D. B. (2003). Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci* 116, 217-224.
- Araya, J., Cambier, S., Markovics, J. A., Wolters, P., Jablons, D., Hill, A., Finkbeiner, W., Jones, K., Broaddus, V. C., Sheppard, D., *et al.* (2007). Squamous metaplasia amplifies pathologic epithelial-mesenchymal interactions in COPD patients. *J Clin Invest* 117, 3551-3562.
- Argollo, M., Fiorino, G., Peyrin-Biroulet, L., and Danese, S. (2018). Vedolizumab for the treatment of Crohn's disease. *Expert Rev Clin Immunol* 2018, 1438189.
- Ashby, L. S., Smith, K. A., and Stea, B. (2016). Gliadel wafer implantation combined with standard radiotherapy and concurrent followed by adjuvant temozolomide for treatment of newly diagnosed high-grade glioma: a systematic literature review. *World J Surg Oncol* 14, 016-0975.
- Assanah, M., Lochhead, R., Ogden, A., Bruce, J., Goldman, J., and Canoll, P. (2006). Glial progenitors in adult white matter are driven to form malignant gliomas by platelet-derived growth factor-expressing retroviruses. *J Neurosci* 26, 6781-6790.

- Attal, J., Chaltiel, L., Lubrano, V., Sol, J. C., Lanaspese, C., Vieilleveigne, L., Latorzeff, I., and Cohen-Jonathan Moyal, E. (2018). Subventricular zone involvement at recurrence is a strong predictive factor of outcome following high grade glioma reirradiation. *J Neurooncol* *136*, 413-419.
- Auffinger, B., Tobias, A. L., Han, Y., Lee, G., Guo, D., Dey, M., Lesniak, M. S., and Ahmed, A. U. (2014). Conversion of differentiated cancer cells into cancer stem-like cells in a glioblastoma model after primary chemotherapy. *Cell Death Differ* *21*, 1119-1131.
- Autelitano, F., Loyaux, D., Roudieres, S., Deon, C., Guette, F., Fabre, P., Ping, Q., Wang, S., Auvergne, R., Badarinarayana, V., *et al.* (2014). Identification of novel tumor-associated cell surface sialoglycoproteins in human glioblastoma tumors using quantitative proteomics. *PLoS One* *9*, e110316.
- Avraamides, C. J., Garmy-Susini, B., and Varner, J. A. (2008). Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Cancer* *8*, 604-617.
- Axelsson, R., Bach-Gansmo, T., Castell-Conesa, J., and McParland, B. J. (2010). An open-label, multicenter, phase 2a study to assess the feasibility of imaging metastases in late-stage cancer patients with the alpha v beta 3-selective angiogenesis imaging agent 99mTc-NC100692. *Acta Radiol* *51*, 40-46.
- Bader, B. L., Rayburn, H., Crowley, D., and Hynes, R. O. (1998). Extensive vasculogenesis, angiogenesis, and organogenesis precede lethality in mice lacking all alpha v integrins. *Cell* *95*, 507-519.
- Bao, S., Cheng, L., Huang, Z., Zhou, W., Wu, Q., and Rich, J. N. (2014). Glioblastoma stem cell-derived pericytes and tumor angiogenesis. *Neuro Oncol* *16 Suppl 3*, iii14.
- Bao, S., Wu, Q., McLendon, R. E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A. B., Dewhirst, M. W., Bigner, D. D., and Rich, J. N. (2006a). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* *444*, 756-760.
- Bao, S., Wu, Q., Sathornsumetee, S., Hao, Y., Li, Z., Hjelmeland, A. B., Shi, Q., McLendon, R. E., Bigner, D. D., and Rich, J. N. (2006b). Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor. *Cancer Res* *66*, 7843-7848.
- Barczyk, M., Carracedo, S., and Gullberg, D. (2010). Integrins. *Cell and tissue research* *339*, 269-280.
- Barker, H. E., Paget, J. T., Khan, A. A., and Harrington, K. J. (2015). The tumour microenvironment after radiotherapy: mechanisms of resistance and recurrence. *Nat Rev Cancer* *15*, 409-425.
- Barkho, B. Z., and Zhao, X. (2011). Adult neural stem cells: response to stroke injury and potential for therapeutic applications. *Curr Stem Cell Res Ther* *6*, 327-338.
- Bastien, J. I., McNeill, K. A., and Fine, H. A. (2015). Molecular characterizations of glioblastoma, targeted therapy, and clinical results to date. *Cancer* *121*, 502-516.
- Batchelor, T. T., Mulholland, P., Neyns, B., Nabors, L. B., Campone, M., Wick, A., Mason, W., Mikkelsen, T., Phuphanich, S., Ashby, L. S., *et al.* (2013). Phase III randomized trial comparing the efficacy of cediranib as monotherapy, and in combination with lomustine, versus lomustine alone in patients with recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol* *31*, 3212-3218.
- Batchelor, T. T., Sorensen, A. G., di Tomaso, E., Zhang, W. T., Duda, D. G., Cohen, K. S., Kozak, K. R., Cahill, D. P., Chen, P. J., Zhu, M., *et al.* (2007). AZD2171, a pan-VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, normalizes tumor vasculature and alleviates edema in glioblastoma patients. *Cancer Cell* *11*, 83-95.
- Battle, M. R., Goggi, J. L., Allen, L., Barnett, J., and Morrison, M. S. (2011). Monitoring tumor response to antiangiogenic sunitinib therapy with 18F-fluciclatide, an 18F-labeled alphaVbeta3-integrin and alphaV beta5-integrin imaging agent. *J Nucl Med* *52*, 424-430.
- Beer, A. J., and Schwaiger, M. (2011). PET imaging of alphavbeta3 expression in cancer patients. *Methods Mol Biol* *680*, 183-200.

- Bellahcene, A., Castronovo, V., Ogbureke, K. U., Fisher, L. W., and Fedarko, N. S. (2008). Small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs): multifunctional proteins in cancer. *Nat Rev Cancer* 8, 212-226.
- Bellail, A. C., Hunter, S. B., Brat, D. J., Tan, C., and Van Meir, E. G. (2004). Microregional extracellular matrix heterogeneity in brain modulates glioma cell invasion. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 1046-1069.
- Bello, L., Francolini, M., Marthyn, P., Zhang, J., Carroll, R. S., Nikas, D. C., Strasser, J. F., Villani, R., Cheresch, D. A., and Black, P. M. (2001). Alpha(v)beta3 and alpha(v)beta5 integrin expression in glioma periphery. *Neurosurgery* 49, 380-389; discussion 390.
- Benouaich-Amiel, A., Simon, J. M., and Delattre, J. Y. (2005). [Concomitant radiotherapy with chemotherapy in patients with glioblastoma]. *Bull Cancer* 92, 1065-1072.
- Bezecny, P. (2014). Histone deacetylase inhibitors in glioblastoma: pre-clinical and clinical experience. *Med Oncol* 31, 985.
- Bhaskar, V., Zhang, D., Fox, M., Seto, P., Wong, M. H., Wales, P. E., Powers, D., Chao, D. T., Dubridge, R. B., and Ramakrishnan, V. (2007). A function blocking anti-mouse integrin alpha5beta1 antibody inhibits angiogenesis and impedes tumor growth in vivo. *J Transl Med* 5, 61.
- Bischof, J., Westhoff, M. A., Wagner, J. E., Halatsch, M. E., Trentmann, S., Knippschild, U., Wirtz, C. R., and Burster, T. (2017). Cancer stem cells: The potential role of autophagy, proteolysis, and cathepsins in glioblastoma stem cells. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 39, 1010428317692227.
- Blandin, A. F., Noulet, F., Renner, G., Mercier, M. C., Choulier, L., Vauchelles, R., Ronde, P., Carreiras, F., Etienne-Selloum, N., Vereb, G., *et al.* (2016). Glioma cell dispersion is driven by alpha5 integrin-mediated cell-matrix and cell-cell interactions. *Cancer Lett* 376, 328-338.
- Bonnet, D., and Dick, J. E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 3, 730-737.
- Borok, Z. (2009). Role for alpha3 integrin in EMT and pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 119, 7-10.
- Boucard-Jourdin, M., Kugler, D., Endale Ahanda, M. L., This, S., De Calisto, J., Zhang, A., Mora, J. R., Stuart, L. M., Savill, J., Lacy-Hulbert, A., and Paidassi, H. (2016). beta8 Integrin Expression and Activation of TGF-beta by Intestinal Dendritic Cells Are Determined by Both Tissue Microenvironment and Cell Lineage. *Journal of immunology* 197, 1968-1978.
- Bouzeghrane, F., Mercure, C., Reudelhuber, T. L., and Thibault, G. (2004). Alpha8beta1 integrin is upregulated in myofibroblasts of fibrotic and scarring myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 36, 343-353.
- Brandes, A. A., Tosoni, A., Franceschi, E., Reni, M., Gatta, G., and Vecht, C. (2008). Glioblastoma in adults. *Crit Rev Oncol Hematol* 67, 139-152.
- Brandstadter, R., and Katz Sand, I. (2017). The use of natalizumab for multiple sclerosis. *Neuropsychiatr Dis Treat* 13, 1691-1702.
- Brennan, C. W., Verhaak, R. G., McKenna, A., Campos, B., Nounshmehr, H., Salama, S. R., Zheng, S., Chakravarty, D., Sanborn, J. Z., Berman, S. H., *et al.* (2013). The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* 155, 462-477.
- Brown, C. K., Khodarev, N. N., Yu, J., Moo-Young, T., Labay, E., Darga, T. E., Posner, M. C., Weichselbaum, R. R., and Mauceri, H. J. (2004). Glioblastoma cells block radiation-induced programmed cell death of endothelial cells. *FEBS Lett* 565, 167-170.
- Bunting, M., Harris, E. S., McIntyre, T. M., Prescott, S. M., and Zimmerman, G. A. (2002). Leukocyte adhesion deficiency syndromes: adhesion and tethering defects involving beta 2 integrins and selectin ligands. *Curr Opin Hematol* 9, 30-35.
- Burger, P. C., and Green, S. B. (1987). Patient age, histologic features, and length of survival in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer* 59, 1617-1625.

- Burgett, M. E., Lathia, J. D., Roth, P., Nowacki, A. S., Galileo, D. S., Pugacheva, E., Huang, P., Vasanji, A., Li, M., Byzova, T., *et al.* (2016). Direct contact with perivascular tumor cells enhances integrin alphavbeta3 signaling and migration of endothelial cells. *Oncotarget*.
- Burkhardt, J. K., Riina, H. A., Shin, B. J., Moliterno, J. A., Hofstetter, C. P., and Boockvar, J. A. (2011). Intra-arterial chemotherapy for malignant gliomas: a critical analysis. *Interv Neuroradiol* *17*, 286-295.
- Cadioux, B., Ching, T. T., VandenBerg, S. R., and Costello, J. F. (2006). Genome-wide hypomethylation in human glioblastomas associated with specific copy number alteration, methylenetetrahydrofolate reductase allele status, and increased proliferation. *Cancer Res* *66*, 8469-8476.
- Calabrese, C., Poppleton, H., Kocak, M., Hogg, T. L., Fuller, C., Hamner, B., Oh, E. Y., Gaber, M. W., Finklestein, D., Allen, M., *et al.* (2007). A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell* *11*, 69-82.
- Cambier, S., Gline, S., Mu, D., Collins, R., Araya, J., Dolganov, G., Einheber, S., Boudreau, N., and Nishimura, S. L. (2005). Integrin alpha(v)beta8-mediated activation of transforming growth factor-beta by perivascular astrocytes: an angiogenic control switch. *Am J Pathol* *166*, 1883-1894.
- Cambier, S., Mu, D. Z., O'Connell, D., Boylen, K., Travis, W., Liu, W. H., Broaddus, V. C., and Nishimura, S. L. (2000). A role for the integrin alphavbeta8 in the negative regulation of epithelial cell growth. *Cancer Res* *60*, 7084-7093.
- Campos, L. S., Decker, L., Taylor, V., and Skarnes, W. (2006). Notch, epidermal growth factor receptor, and beta1-integrin pathways are coordinated in neural stem cells. *The Journal of biological chemistry* *281*, 5300-5309.
- Candolfi, M., Kroeger, K. M., Xiong, W., Liu, C., Puntel, M., Yagiz, K., Muhammad, A. G., Mineharu, Y., Foulad, D., Wibowo, M., *et al.* (2011). Targeted toxins for glioblastoma multiforme: pre-clinical studies and clinical implementation. *Anticancer Agents Med Chem* *11*, 729-738.
- Cantor, D., Slapetova, I., Kan, A., McQuade, L. R., and Baker, M. S. (2013). Overexpression of alphavbeta6 integrin alters the colorectal cancer cell proteome in favor of elevated proliferation and a switching in cellular adhesion that increases invasion. *J Proteome Res* *12*, 2477-2490.
- Carson, M. J., Doose, J. M., Melchior, B., Schmid, C. D., and Ploix, C. C. (2006). CNS immune privilege: hiding in plain sight. *Immunological reviews* *213*, 48-65.
- 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.* (2016). Molecular Profiling Reveals Biologically Discrete Subsets and Pathways of Progression in Diffuse Glioma. *Cell* *164*, 550-563.
- Cesarini, M., and Fiorino, G. (2013). Leukocyte traffic control: a novel therapeutic strategy for inflammatory bowel disease--an update. *Expert Rev Clin Immunol* *9*, 301-306.
- Chakrabarti, I., Cockburn, M., Cozen, W., Wang, Y. P., and Preston-Martin, S. (2005). A population-based description of glioblastoma multiforme in Los Angeles County, 1974-1999. *Cancer* *104*, 2798-2806.
- Chakravarti, A., Erkkinen, M. G., Nestler, U., Stupp, R., Mehta, M., Aldape, K., Gilbert, M. R., Black, P. M., and Loeffler, J. S. (2006). Temozolomide-mediated radiation enhancement in glioblastoma: a report on underlying mechanisms. *Clin Cancer Res* *12*, 4738-4746.
- Chalmers, A. J., Ruff, E. M., Martindale, C., Lovegrove, N., and Short, S. C. (2009). Cytotoxic effects of temozolomide and radiation are additive- and schedule-dependent. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* *75*, 1511-1519.
- Chao, C., Carmical, J. R., Ives, K. L., Wood, T. G., Aronson, J. F., Gomez, G. A., Djukom, C. D., and Hellmich, M. R. (2012). CD133+ colon cancer cells are more interactive with the tumor microenvironment than CD133- cells. *Lab Invest* *92*, 420-436.

- Charles, N., Ozawa, T., Squatrito, M., Bleau, A. M., Brennan, C. W., Hambardzumyan, D., and Holland, E. C. (2010). Perivascular nitric oxide activates notch signaling and promotes stem-like character in PDGF-induced glioma cells. *Cell Stem Cell* 6, 141-152.
- Cheerathodi, M., Avci, N. G., Guerrero, P. A., Tang, L. K., Popp, J., Morales, J. E., Chen, Z., Carnero, A., Lang, F. F., Ballif, B. A., *et al.* (2016). The Cytoskeletal Adapter Protein Spinophilin Regulates Invadopodia Dynamics and Tumor Cell Invasion in Glioblastoma. *Mol Cancer Res* 14, 1277-1287.
- Chen, X., Chen, L., Chen, J., Hu, W., Gao, H., Xie, B., Wang, X., Yin, Z., Li, S., and Wang, X. (2013). ADAM17 promotes U87 glioblastoma stem cell migration and invasion. *Brain research* 1538, 151-158.
- Cheng, L., Bao, S., and Rich, J. N. (2010). Potential therapeutic implications of cancer stem cells in glioblastoma. *Biochem Pharmacol* 80, 654-665.
- Cheng, L., Huang, Z., Zhou, W., Wu, Q., Donnola, S., Liu, J. K., Fang, X., Sloan, A. E., Mao, Y., Lathia, J. D., *et al.* (2013). Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth. *Cell* 153, 139-152.
- Chinot, O. L., Wick, W., Mason, W., Henriksson, R., Saran, F., Nishikawa, R., Carpentier, A. F., Hoang-Xuan, K., Kavan, P., Cernea, D., *et al.* (2014). Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med* 370, 709-722.
- Chintala, S. K., Sawaya, R., Gokaslan, Z. L., and Rao, J. S. (1996). Modulation of matrix metalloprotease-2 and invasion in human glioma cells by alpha 3 beta 1 integrin. *Cancer Lett* 103, 201-208.
- Choy, C. T., Kim, H., Lee, J. Y., Williams, D. M., Palethorpe, D., Fellows, G., Wright, A. J., Laing, K., Bridges, L. R., Howe, F. A., and Kim, S. H. (2013). Anosmin-1 contributes to brain tumor malignancy through integrin signal pathways. *Endocr Relat Cancer* 21, 85-99.
- Chu, Q., Orr, B. A., Semenkow, S., Bar, E. E., and Eberhart, C. G. (2013). Prolonged inhibition of glioblastoma xenograft initiation and clonogenic growth following in vivo Notch blockade. *Clin Cancer Res* 19, 3224-3233.
- Cianfrocca, M. E., Kimmel, K. A., Gallo, J., Cardoso, T., Brown, M. M., Hudes, G., Lewis, N., Weiner, L., Lam, G. N., Brown, S. C., *et al.* (2006). Phase 1 trial of the antiangiogenic peptide ATN-161 (Ac-PHSCN-NH(2)), a beta integrin antagonist, in patients with solid tumours. *Br J Cancer* 94, 1621-1626.
- Clement, V., Dutoit, V., Marino, D., Dietrich, P. Y., and Radovanovic, I. (2009). Limits of CD133 as a marker of glioma self-renewing cells. *Int J Cancer* 125, 244-248.
- Codrici, E., Enciu, A. M., Popescu, I. D., Mihai, S., and Tanase, C. (2016). Glioma Stem Cells and Their Microenvironments: Providers of Challenging Therapeutic Targets. *Stem cells international* 2016, 5728438.
- Combs, S. E., Heeger, S., Haselmann, R., Edler, L., Debus, J., and Schulz-Ertner, D. (2006). Treatment of primary glioblastoma multiforme with cetuximab, radiotherapy and temozolomide (GERT)--phase I/II trial: study protocol. *BMC Cancer* 6, 133.
- Cordes, N. (2006). Integrin-mediated cell-matrix interactions for prosurvival and antiapoptotic signaling after genotoxic injury. *Cancer Lett* 242, 11-19.
- Cordes, N., and Park, C. C. (2007). beta1 integrin as a molecular therapeutic target. *Int J Radiat Biol* 83, 753-760.
- Cordes, N., Seidler, J., Durzok, R., Geinitz, H., and Brakebusch, C. (2006). beta1-integrin-mediated signaling essentially contributes to cell survival after radiation-induced genotoxic injury. *Oncogene* 25, 1378-1390.
- Corwin, D., Holdsworth, C., Rockne, R. C., Trister, A. D., Mrugala, M. M., Rockhill, J. K., Stewart, R. D., Phillips, M., and Swanson, K. R. (2013). Toward patient-specific, biologically optimized radiation therapy plans for the treatment of glioblastoma. *PLoS One* 8, e79115.

- Cruet-Hennequart, S., Maubant, S., Luis, J., Gauduchon, P., Staedel, C., and Dedhar, S. (2003). $\alpha(v)$ integrins regulate cell proliferation through integrin-linked kinase (ILK) in ovarian cancer cells. *Oncogene* 22, 1688-1702.
- Culhane, A. C., and Quackenbush, J. (2009). Confounding effects in "A six-gene signature predicting breast cancer lung metastasis". *Cancer Res* 69, 7480-7485.
- Cusulin, C., Chesnelong, C., Bose, P., Bilenky, M., Kopciuk, K., Chan, J. A., Cairncross, J. G., Jones, S. J., Marra, M. A., Luchman, H. A., and Weiss, S. (2015). Precursor States of Brain Tumor Initiating Cell Lines Are Predictive of Survival in Xenografts and Associated with Glioblastoma Subtypes. *Stem Cell Reports* 5, 1-9.
- D'Alessandris, Q. G., Montano, N., Cenci, T., Martini, M., Lauretti, L., Bianchi, F., Larocca, L. M., Maira, G., Fernandez, E., and Pallini, R. (2013). Targeted therapy with bevacizumab and erlotinib tailored to the molecular profile of patients with recurrent glioblastoma. Preliminary experience. *Acta Neurochir (Wien)* 155, 33-40.
- Dahan, P., Martinez Gala, J., Delmas, C., Monferran, S., Malric, L., Zentkowski, D., Lubrano, V., Toulas, C., Cohen-Jonathan Moyal, E., and Lemarie, A. (2014). Ionizing radiations sustain glioblastoma cell dedifferentiation to a stem-like phenotype through survivin: possible involvement in radioresistance. *Cell Death Dis* 5, e1543.
- Dahlman, T., Grimelius, L., Wallin, G., Rubin, K., and Westermarck, K. (1998). Integrins in thyroid tissue: upregulation of $\alpha2\beta1$ in anaplastic thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol* 138, 104-112.
- Dai, C., Zhang, B., Liu, X., Ma, S., Yang, Y., Yao, Y., Feng, M., Bao, X., Li, G., Wang, J., *et al.* (2013). Inhibition of PI3K/AKT/mTOR pathway enhances temozolomide-induced cytotoxicity in pituitary adenoma cell lines in vitro and xenografted pituitary adenoma in female nude mice. *Endocrinology* 154, 1247-1259.
- Damiano, J. S., Cress, A. E., Hazlehurst, L. A., Shtil, A. A., and Dalton, W. S. (1999). Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines. *Blood* 93, 1658-1667.
- Danen, E. H., Sonneveld, P., Sonnenberg, A., and Yamada, K. M. (2000). Dual stimulation of Ras/mitogen-activated protein kinase and RhoA by cell adhesion to fibronectin supports growth factor-stimulated cell cycle progression. *J Cell Biol* 151, 1413-1422.
- Dardiotis, E., Siokas, V., Zafeiridis, T., Paterakis, K., Tsivgoulis, G., Dardioti, M., Grigoriadis, S., Simeonidou, C., Deretzi, G., Zintzaras, E., *et al.* (2017). Integrins AV and B8 Gene Polymorphisms and Risk for Intracerebral Hemorrhage in Greek and Polish Populations. *Neuromolecular Med* 19, 69-80.
- De Arcangelis, A., and Georges-Labouesse, E. (2000). Integrin and ECM functions: roles in vertebrate development. *Trends Genet* 16, 389-395.
- De Franceschi, N., Hamidi, H., Alanko, J., Sahgal, P., and Ivaska, J. (2015). Integrin traffic - the update. *J Cell Sci* 128, 839-852.
- de Vries, N. A., Buckle, T., Zhao, J., Beijnen, J. H., Schellens, J. H., and van Tellingen, O. (2012). Restricted brain penetration of the tyrosine kinase inhibitor erlotinib due to the drug transporters P-gp and BCRP. *Invest New Drugs* 30, 443-449.
- DeAngelis, L. M. (2001). Brain tumors. *N Engl J Med* 344, 114-123.
- Deeken, J. F., and Loscher, W. (2007). The blood-brain barrier and cancer: transporters, treatment, and Trojan horses. *Clin Cancer Res* 13, 1663-1674.
- Delamarre, E., Taboubi, S., Mathieu, S., Berenguer, C., Rigot, V., Lissitzky, J. C., Figarella-Branger, D., Ouafik, L., and Luis, J. (2009). Expression of integrin $\alpha6\beta1$ enhances tumorigenesis in glioma cells. *Am J Pathol* 175, 844-855.
- Denny, B. J., Wheelhouse, R. T., Stevens, M. F., Tsang, L. L., and Slack, J. A. (1994). NMR and molecular modeling investigation of the mechanism of activation of the antitumor drug temozolomide and its interaction with DNA. *Biochemistry* 33, 9045-9051.

- Desgrosellier, J. S., and Cheresch, D. A. (2009). Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* *10*, 9-22.
- Deviers, A., Ken, S., Filleron, T., Rowland, B., Laruelo, A., Catalaa, I., Lubrano, V., Celsis, P., Berry, I., Mogicato, G., *et al.* (2014). Evaluation of the lactate-to-N-acetyl-aspartate ratio defined with magnetic resonance spectroscopic imaging before radiation therapy as a new predictive marker of the site of relapse in patients with glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* *90*, 385-393.
- Di Tomaso, T., Mazzoleni, S., Wang, E., Sovena, G., Clavenna, D., Franzin, A., Mortini, P., Ferrone, S., Doglioni, C., Marincola, F. M., *et al.* (2010). Immunobiological characterization of cancer stem cells isolated from glioblastoma patients. *Clin Cancer Res* *16*, 800-813.
- Dong, F., Eibach, M., Bartsch, J. W., Dolga, A. M., Schlomann, U., Conrad, C., Schieber, S., Schilling, O., Biniossek, M. L., Culmsee, C., *et al.* (2015). The metalloprotease-disintegrin ADAM8 contributes to temozolomide chemoresistance and enhanced invasiveness of human glioblastoma cells. *Neuro Oncol* *17*, 1474-1485.
- Ducassou, A., Uro-Coste, E., Verrelle, P., Filleron, T., Benouaich-Amiel, A., Lubrano, V., Sol, J. C., Delisle, M. B., Favre, G., Ken, S., *et al.* (2013). α v β 3 Integrin and Fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1): Prognostic factors in a phase I-II clinical trial associating continuous administration of Tipifarnib with radiotherapy for patients with newly diagnosed glioblastoma. *Eur J Cancer* *49*, 2161-2169.
- Eberlein, C., Kendrew, J., McDaid, K., Alfred, A., Kang, J. S., Jacobs, V. N., Ross, S. J., Rooney, C., Smith, N. R., Rinkenberger, J., *et al.* (2013). A human monoclonal antibody 264RAD targeting α v β 6 integrin reduces tumour growth and metastasis, and modulates key biomarkers in vivo. *Oncogene* *32*, 4406-4416.
- Eder, K., and Kalman, B. (2014). Molecular heterogeneity of glioblastoma and its clinical relevance. *Pathology oncology research : POR* *20*, 777-787.
- Edwards, J. P., Thornton, A. M., and Shevach, E. M. (2014). Release of active TGF- β 1 from the latent TGF- β 1/GARP complex on T regulatory cells is mediated by integrin β 8. *Journal of immunology* *193*, 2843-2849.
- Eich, M., Roos, W. P., Nikolova, T., and Kaina, B. (2013). Contribution of ATM and ATR to the resistance of glioblastoma and malignant melanoma cells to the methylating anticancer drug temozolomide. *Mol Cancer Ther* *12*, 2529-2540.
- Eke, I., and Cordes, N. (2014). Focal adhesion signaling and therapy resistance in cancer. *Semin Cancer Biol*.
- Elstner, A., Holtkamp, N., and von Deimling, A. (2007). Involvement of Hif-1 in desferrioxamine-induced invasion of glioblastoma cells. *Clinical & experimental metastasis* *24*, 57-66.
- Erasimus, H., Gobin, M., Niclou, S., and Van Dyck, E. (2016). DNA repair mechanisms and their clinical impact in glioblastoma. *Mutation research Reviews in mutation research* *769*, 19-35.
- Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A. M., Nordborg, C., Peterson, D. A., and Gage, F. H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* *4*, 1313-1317.
- Eyler, C. E., Wu, Q., Yan, K., MacSwords, J. M., Chandler-Militello, D., Misuraca, K. L., Lathia, J. D., Forrester, M. T., Lee, J., Stamler, J. S., *et al.* (2011). Glioma stem cell proliferation and tumor growth are promoted by nitric oxide synthase-2. *Cell* *146*, 53-66.
- Falcioni, R., Antonini, A., Nistico, P., Di Stefano, S., Crescenzi, M., Natali, P. G., and Sacchi, A. (1997). α 6 β 4 and α 6 β 1 integrins associate with ErbB-2 in human carcinoma cell lines. *Exp Cell Res* *236*, 76-85.
- Fan, X., Khaki, L., Zhu, T. S., Soules, M. E., Talsma, C. E., Gul, N., Koh, C., Zhang, J., Li, Y. M., Maciaczyk, J., *et al.* (2010). NOTCH pathway blockade depletes CD133-positive

- glioblastoma cells and inhibits growth of tumor neurospheres and xenografts. *Stem cells* 28, 5-16.
- Fang, L., Deng, Z., Shatseva, T., Yang, J., Peng, C., Du, W. W., Yee, A. J., Ang, L. C., He, C., Shan, S. W., and Yang, B. B. (2011). MicroRNA miR-93 promotes tumor growth and angiogenesis by targeting integrin-beta8. *Oncogene* 30, 806-821.
- Fessler, E., Borovski, T., and Medema, J. P. (2015). Endothelial cells induce cancer stem cell features in differentiated glioblastoma cells via bFGF. *Mol Cancer* 14, 157.
- Field, K. M., Jordan, J. T., Wen, P. Y., Rosenthal, M. A., and Reardon, D. A. (2015). Bevacizumab and glioblastoma: scientific review, newly reported updates, and ongoing controversies. *Cancer* 121, 997-1007.
- Figarella-Branger, D., and Bouvier, C. (2005). [Histological classification of human gliomas: state of art and controversies]. *Bull Cancer* 92, 301-309.
- Finocchiaro, G., and Pellegatta, S. (2016). Immunotherapy with dendritic cells loaded with glioblastoma stem cells: from preclinical to clinical studies. *Cancer Immunol Immunother* 65, 101-109.
- Folgiero, V., Bachelder, R. E., Bon, G., Sacchi, A., Falcioni, R., and Mercurio, A. M. (2007). The alpha6beta4 integrin can regulate ErbB-3 expression: implications for alpha6beta4 signaling and function. *Cancer Res* 67, 1645-1652.
- Folkins, C., Shaked, Y., Man, S., Tang, T., Lee, C. R., Zhu, Z., Hoffman, R. M., and Kerbel, R. S. (2009). Glioma tumor stem-like cells promote tumor angiogenesis and vasculogenesis via vascular endothelial growth factor and stromal-derived factor 1. *Cancer Res* 69, 7243-7251.
- Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285, 1182-1186.
- Fornara, O., Bartek, J., Jr., Rahbar, A., Odeberg, J., Khan, Z., Peredo, I., Hamerlik, P., Bartek, J., Stragliotto, G., Landazuri, N., and Soderberg-Naucler, C. (2016). Cytomegalovirus infection induces a stem cell phenotype in human primary glioblastoma cells: prognostic significance and biological impact. *Cell Death Differ* 23, 261-269.
- Franceschi, E., Stupp, R., van den Bent, M. J., van Herpen, C., Laigle Donadey, F., Gorlia, T., Hegi, M., Lhermitte, B., Strauss, L. C., Allgeier, A., *et al.* (2012). EORTC 26083 phase I/II trial of dasatinib in combination with CCNU in patients with recurrent glioblastoma. *Neuro Oncol* 14, 1503-1510.
- Friedlander, M., Brooks, P. C., Shaffer, R. W., Kincaid, C. M., Varner, J. A., and Cheresch, D. A. (1995). Definition of two angiogenic pathways by distinct alpha v integrins. *Science* 270, 1500-1502.
- Friedman, H. S., Prados, M. D., Wen, P. Y., Mikkelsen, T., Schiff, D., Abrey, L. E., Yung, W. K., Paleologos, N., Nicholas, M. K., Jensen, R., *et al.* (2009). Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol* 27, 4733-4740.
- Friedmann-Morvinski, D., Bhargava, V., Gupta, S., Verma, I. M., and Subramaniam, S. (2016). Identification of therapeutic targets for glioblastoma by network analysis. *Oncogene* 35, 608-620.
- Frisch, S. M., and Screaton, R. A. (2001). Anoikis mechanisms. *Curr Opin Cell Biol* 13, 555-562.
- Furnari, F. B., Fenton, T., Bachoo, R. M., Mukasa, A., Stommel, J. M., Stegh, A., Hahn, W. C., Ligon, K. L., Louis, D. N., Brennan, C., *et al.* (2007). Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev* 21, 2683-2710.
- Ganguly, K. K., Pal, S., Moulik, S., and Chatterjee, A. (2013). Integrins and metastasis. *Cell Adh Migr* 7, 251-261.
- Garcia-Barros, M., Paris, F., Cordon-Cardo, C., Lyden, D., Rafii, S., Haimovitz-Friedman, A., Fuks, Z., and Kolesnick, R. (2003). Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. *Science* 300, 1155-1159.

- Garmy-Susini, B., Jin, H., Zhu, Y., Sung, R. J., Hwang, R., and Varner, J. (2005). Integrin $\alpha 4\beta 1$ -VCAM-1-mediated adhesion between endothelial and mural cells is required for blood vessel maturation. *J Clin Invest* *115*, 1542-1551.
- Gilbert, M. R., Dignam, J. J., Armstrong, T. S., Wefel, J. S., Blumenthal, D. T., Vogelbaum, M. A., Colman, H., Chakravarti, A., Pugh, S., Won, M., *et al.* (2014). A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med* *370*, 699-708.
- Gill, B. J., Pisapia, D. J., Malone, H. R., Goldstein, H., Lei, L., Sonabend, A., Yun, J., Samanamud, J., Sims, J. S., Banu, M., *et al.* (2014). MRI-localized biopsies reveal subtype-specific differences in molecular and cellular composition at the margins of glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* *111*, 12550-12555.
- Gingras, M. C., Roussel, E., Bruner, J. M., Branch, C. D., and Moser, R. P. (1995). Comparison of cell adhesion molecule expression between glioblastoma multiforme and autologous normal brain tissue. *J Neuroimmunol* *57*, 143-153.
- Giusti, B., Margheri, F., Rossi, L., Lapini, I., Magi, A., Serrati, S., Chilla, A., Laurenzana, A., Magnelli, L., Calorini, L., *et al.* (2013). Desmoglein-2-integrin $\beta 8$ interaction regulates actin assembly in endothelial cells: deregulation in systemic sclerosis. *PLoS One* *8*, e68117.
- Gladson, C. L., Wilcox, J. N., Sanders, L., Gillespie, G. Y., and Cheresch, D. A. (1995). Cerebral microenvironment influences expression of the vitronectin gene in astrocytic tumors. *J Cell Sci* *108 (Pt 3)*, 947-956.
- Goel, H. L., Gritsko, T., Pursell, B., Chang, C., Shultz, L. D., Greiner, D. L., Norum, J. H., Toftgard, R., Shaw, L. M., and Mercurio, A. M. (2014). Regulated splicing of the $\alpha 6$ integrin cytoplasmic domain determines the fate of breast cancer stem cells. *Cell Rep* *7*, 747-761.
- Goffart, N., Kroonen, J., Di Valentin, E., Dedobbeleer, M., Denne, A., Martinive, P., and Rogister, B. (2015). Adult mouse subventricular zones stimulate glioblastoma stem cells specific invasion through CXCL12/CXCR4 signaling. *Neuro Oncol* *17*, 81-94.
- Goffart, N., Kroonen, J., and Rogister, B. (2013). Glioblastoma-initiating cells: relationship with neural stem cells and the micro-environment. *Cancers (Basel)* *5*, 1049-1071.
- Goldwirt, L., Beccaria, K., Carpentier, A., Farinotti, R., and Fernandez, C. (2014). Irinotecan and temozolomide brain distribution: a focus on ABCB1. *Cancer Chemother Pharmacol*.
- Goodman, S. L., and Picard, M. (2012). Integrins as therapeutic targets. *Trends Pharmacol Sci* *33*, 405-412.
- Gouaze-Andersson, V., Delmas, C., Taurand, M., Martinez-Gala, J., Evrard, S., Mazoyer, S., Toulas, C., and Cohen-Jonathan-Moyal, E. (2016). FGFR1 Induces Glioblastoma Radioresistance through the PLC γ /Hif1 α Pathway. *Cancer Res* *76*, 3036-3044.
- Gu, J., Isaji, T., Xu, Q., Kariya, Y., Gu, W., Fukuda, T., and Du, Y. (2012). Potential roles of N-glycosylation in cell adhesion. *Glycoconj J* *29*, 599-607.
- Guerrero, P. A., Tchaicha, J. H., Chen, Z., Morales, J. E., McCarty, N., Wang, Q., Sulman, E. P., Fuller, G., Lang, F. F., Rao, G., and McCarty, J. H. (2017). Glioblastoma stem cells exploit the $\alpha 8\beta 1$ integrin-TGF $\beta 1$ signaling axis to drive tumor initiation and progression. *Oncogene*.
- Guichet, P. O., Guelfi, S., Teigell, M., Hoppe, L., Bakalara, N., Bauchet, L., Duffau, H., Lamszus, K., Rothhut, B., and Hugnot, J. P. (2015). Notch1 stimulation induces a vascularization switch with pericyte-like cell differentiation of glioblastoma stem cells. *Stem Cells* *33*, 21-34.
- Gulbahar, O., Aricioglu, A., Akmansu, M., and Turkozer, Z. (2009). Effects of radiation on protein oxidation and lipid peroxidation in the brain tissue. *Transplant Proc* *41*, 4394-4396.
- Gunther, H. S., Schmidt, N. O., Phillips, H. S., Kemming, D., Kharbanda, S., Soriano, R., Modrusan, Z., Meissner, H., Westphal, M., and Lamszus, K. (2008). Glioblastoma-derived stem cell-enriched cultures form distinct subgroups according to molecular and phenotypic criteria. *Oncogene* *27*, 2897-2909.

- Guo, W., and Giancotti, F. G. (2004). Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 816-826.
- Gursel, D. B., Shin, B. J., Burkhardt, J. K., Kesavabhotla, K., Schlaff, C. D., and Boockvar, J. A. (2011). Glioblastoma stem-like cells-biology and therapeutic implications. *Cancers (Basel)* 3, 2655-2666.
- Haas, T. L., Sciuto, M. R., Brunetto, L., Valvo, C., Signore, M., Fiori, M. E., di Martino, S., Giannetti, S., Morgante, L., Boe, A., *et al.* (2017). Integrin alpha7 Is a Functional Marker and Potential Therapeutic Target in Glioblastoma. *Cell Stem Cell* 21, 35-50 e39.
- Haddad, T., Qin, R., Lupu, R., Satele, D., Eadens, M., Goetz, M. P., Erlichman, C., and Molina, J. (2017). A phase I study of cilengitide and paclitaxel in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 79, 1221-1227.
- Haimovitz-Friedman, A., Kan, C. C., Ehleiter, D., Persaud, R. S., McLoughlin, M., Fuks, Z., and Kolesnick, R. N. (1994). Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. *J Exp Med* 180, 525-535.
- Haley, E. M., and Kim, Y. (2014). The role of basic fibroblast growth factor in glioblastoma multiforme and glioblastoma stem cells and in their in vitro culture. *Cancer Lett* 346, 1-5.
- Hamerlik, P., Rich, J. N., and Lathia, J. D. (2013). News and views basic science: glioblastoma stem cells. *Eur Assoc Neurooncol Mag* 2, 49-54.
- Han, S., Li, Z., Master, L. M., Master, Z. W., and Wu, A. (2014). Exogenous IGFBP-2 promotes proliferation, invasion, and chemoresistance to temozolomide in glioma cells via the integrin beta1-ERK pathway. *Br J Cancer*.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hardee, M. E., Marciscano, A. E., Medina-Ramirez, C. M., Zagzag, D., Narayana, A., Lonning, S. M., and Barcellos-Hoff, M. H. (2012). Resistance of glioblastoma-initiating cells to radiation mediated by the tumor microenvironment can be abolished by inhibiting transforming growth factor-beta. *Cancer Res* 72, 4119-4129.
- Hau, E., Shen, H., Clark, C., Graham, P. H., Koh, E. S., and K, L. M. (2016). The evolving roles and controversies of radiotherapy in the treatment of glioblastoma. *Journal of medical radiation sciences* 63, 114-123.
- Haubner, R., Maschauer, S., and Prante, O. (2014). PET radiopharmaceuticals for imaging integrin expression: tracers in clinical studies and recent developments. *Biomed Res Int* 2014, 11.
- Heddleston, J. M., Li, Z., McLendon, R. E., Hjelmeland, A. B., and Rich, J. N. (2009). The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stem cell phenotype. *Cell Cycle* 8, 3274-3284.
- Hegi, M. E., Diserens, A. C., Gorlia, T., Hamou, M. F., de Tribolet, N., Weller, M., Kros, J. M., Hainfellner, J. A., Mason, W., Mariani, L., *et al.* (2005). MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 352, 997-1003.
- Hehlhans, S., Haase, M., and Cordes, N. (2006). Signalling via integrins: implications for cell survival and anticancer strategies. *Biochim Biophys Acta* 1775, 163-180.
- Henry, A., Nokin, M. J., Leroi, N., Lallemand, F., Lambert, J., Goffart, N., Roncarati, P., Bianchi, E., Peixoto, P., Blomme, A., *et al.* (2016). New role of osteopontin in DNA repair and impact on human glioblastoma radiosensitivity. *Oncotarget* 7, 63708-63721.
- Hersey, P., Sosman, J., O'Day, S., Richards, J., Bedikian, A., Gonzalez, R., Sharfman, W., Weber, R., Logan, T., and Kirkwood, J. M. (2005). A phase II, randomized, open-label study evaluating the antitumor activity of MEDI-522, a humanized monoclonal antibody directed against the human alpha v beta 3 (avb3) integrin, ± dacarbazine (DTIC) in patients with metastatic melanoma (MM) ASCO Annual Meeting 23, Abstract 16S.
- Hess, K. R. (1999). Extent of resection as a prognostic variable in the treatment of gliomas. *J Neurooncol* 42, 227-231.

- Hinz, B. (2013). It has to be the alphav: myofibroblast integrins activate latent TGF-beta1. *Nature medicine* 19, 1567-1568.
- Hirota, S., Clements, T. P., Tang, L. K., Morales, J. E., Lee, H. S., Oh, S. P., Rivera, G. M., Wagner, D. S., and McCarty, J. H. (2015). Neuropilin 1 balances beta8 integrin-activated TGFbeta signaling to control sprouting angiogenesis in the brain. *Development* 142, 4363-4373.
- Hirschmann-Jax, C., Foster, A. E., Wulf, G. G., Nuchtern, J. G., Jax, T. W., Gobel, U., Goodell, M. A., and Brenner, M. K. (2004). A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 14228-14233.
- Hjelmeland, A. B., Wu, Q., Heddleston, J. M., Choudhary, G. S., MacSwords, J., Lathia, J. D., McLendon, R., Lindner, D., Sloan, A., and Rich, J. N. (2011). Acidic stress promotes a glioma stem cell phenotype. *Cell Death Differ* 18, 829-840.
- Hoelzinger, D. B., Demuth, T., and Berens, M. E. (2007). Autocrine factors that sustain glioma invasion and paracrine biology in the brain microenvironment. *J Natl Cancer Inst* 99, 1583-1593.
- Holland, E. C. (2001). Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models. *Nature reviews Genetics* 2, 120-129.
- Hood, J. D., Bednarski, M., Frausto, R., Guccione, S., Reisfeld, R. A., Xiang, R., and Cheresch, D. A. (2002). Tumor regression by targeted gene delivery to the neovasculature. *Science* 296, 2404-2407.
- Hsieh, J. C., and Lesniak, M. S. (2005). Surgical management of high-grade gliomas. *Expert Rev Neurother* 5, S33-39.
- Hu, P., and Luo, B. H. (2017). Integrin alphav beta8 Adopts a High Affinity State for Soluble Ligands Under Physiological Conditions. *Journal of cellular biochemistry* 118, 2044-2052.
- Hu, Y., Ylivinkka, I., Chen, P., Li, L., Hautaniemi, S., Nyman, T. A., Keski-Oja, J., and Hyytiainen, M. (2012). Netrin-4 promotes glioblastoma cell proliferation through integrin beta4 signaling. *Neoplasia* 14, 219-227.
- Huang, L., Cai, J. L., Huang, P. Z., Kang, L., Huang, M. J., Wang, L., and Wang, J. P. (2017). miR19b-3p promotes the growth and metastasis of colorectal cancer via directly targeting ITGB8. *Am J Cancer Res* 7, 1996-2008.
- Huang, P., Rani, M. R., Ahluwalia, M. S., Bae, E., Prayson, R. A., Weil, R. J., Nowacki, A. S., Hedayat, H., Sloan, A. E., Lathia, J. D., *et al.* (2012). Endothelial expression of TNF receptor-1 generates a proapoptotic signal inhibited by integrin alpha6beta1 in glioblastoma. *Cancer Res* 72, 1428-1437.
- Humphries, J. D., Byron, A., and Humphries, M. J. (2006). Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci* 119, 3901-3903.
- Humphries, M. J. (2000). Integrin structure. *Biochem Soc Trans* 28, 311-339.
- Hynes, R. O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110, 673-687.
- Ikushima, H., Todo, T., Ino, Y., Takahashi, M., Miyazawa, K., and Miyazono, K. (2009). Autocrine TGF-beta signaling maintains tumorigenicity of glioma-initiating cells through Sry-related HMG-box factors. *Cell Stem Cell* 5, 504-514.
- Infanger, D. W., Cho, Y., Lopez, B. S., Mohanan, S., Liu, S. C., Gursel, D., Boockvar, J. A., and Fischbach, C. (2013). Glioblastoma stem cells are regulated by interleukin-8 signaling in a tumoral perivascular niche. *Cancer Res* 73, 7079-7089.
- Inoue, A., Takahashi, H., Harada, H., Kohno, S., Ohue, S., Kobayashi, K., Yano, H., Tanaka, J., and Ohnishi, T. (2010). Cancer stem-like cells of glioblastoma characteristically express MMP-13 and display highly invasive activity. *Int J Oncol* 37, 1121-1131.
- Interphone-study-group (2010). Brain tumour risk in relation to mobile telephone use: results of the INTERPHONE international case-control study. *Int J Epidemiol* 39, 675-694.

- Iordanskaia, T., Koeck, E., Rossi, C., Mohan, P., Schwarz, K., Anders, R., and Nadler, E. P. (2014). Integrin beta-8, but not beta-5 or -6, protein expression is increased in livers of children with biliary atresia. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* *59*, 679-683.
- Jafri, N. F., Clarke, J. L., Weinberg, V., Barani, I. J., and Cha, S. (2013). Relationship of glioblastoma multiforme to the subventricular zone is associated with survival. *Neuro Oncol* *15*, 91-96.
- Jain, R. K., di Tomaso, E., Duda, D. G., Loeffler, J. S., Sorensen, A. G., and Batchelor, T. T. (2007). Angiogenesis in brain tumours. *Nat Rev Neurosci* *8*, 610-622.
- Jamal, M., Rath, B. H., Williams, E. S., Camphausen, K., and Tofilon, P. J. (2010). Microenvironmental regulation of glioblastoma radioresponse. *Clin Cancer Res* *16*, 6049-6059.
- Janouskova, H., Maglott, A., Leger, D. Y., Bossert, C., Noulet, F., Guerin, E., Guenot, D., Pinel, S., Chastagner, P., Plenat, F., *et al.* (2012). Integrin alpha5beta1 plays a critical role in resistance to temozolomide by interfering with the p53 pathway in high-grade glioma. *Cancer Res* *72*, 3463-3470.
- Jarad, G., Wang, B., Khan, S., DeVore, J., Miao, H., Wu, K., Nishimura, S. L., Wible, B. A., Konieczkowski, M., Sedor, J. R., and Schelling, J. R. (2002). Fas activation induces renal tubular epithelial cell beta 8 integrin expression and function in the absence of apoptosis. *J Biol Chem* *277*, 47826-47833.
- Jeck, J., Kassubek, R., Coburger, J., Edenhofer, S., Schonsteiner, S. S., Ludolph, A. C., Schmitz, B., Engelke, J., Mayer-Steinacker, R., Lewerenz, J., and Bullinger, L. (2018). Bevacizumab in temozolomide refractory high-grade gliomas: single-centre experience and review of the literature. *Ther Adv Neurol Disord* *11*, 2018.
- Jhaveri, N., Chen, T. C., and Hofman, F. M. (2016). Tumor vasculature and glioma stem cells: Contributions to glioma progression. *Cancer Lett* *380*, 545-551.
- Jiang, Y., Marinescu, V. D., Xie, Y., Jarvius, M., Maturi, N. P., Haglund, C., Olofsson, S., Lindberg, N., Olofsson, T., Leijonmarck, C., *et al.* (2017). Glioblastoma Cell Malignancy and Drug Sensitivity Are Affected by the Cell of Origin: *Cell Rep.* 2017 May 2;19(5):1080-1081. doi: 10.1016/j.celrep.2017.04.053).
- Jiang, Y., and Uhrbom, L. (2012). On the origin of glioma. *Ups J Med Sci* *117*, 113-121.
- Jiang, Z., Pore, N., Cerniglia, G. J., Mick, R., Georgescu, M. M., Bernhard, E. J., Hahn, S. M., Gupta, A. K., and Maity, A. (2007). Phosphatase and tensin homologue deficiency in glioblastoma confers resistance to radiation and temozolomide that is reversed by the protease inhibitor nelfinavir. *Cancer Res* *67*, 4467-4473.
- Joseph, J. V., Balasubramaniyan, V., Walenkamp, A., and Kruyt, F. A. (2012). TGF-beta as a therapeutic target in high grade gliomas - promises and challenges. *Biochem Pharmacol* *85*, 478-485.
- Joseph, J. V., Balasubramaniyan, V., Walenkamp, A., and Kruyt, F. A. (2013). TGF-beta as a therapeutic target in high grade gliomas - promises and challenges. *Biochem Pharmacol* *85*, 478-485.
- Kahlert, U. D., Suwala, A. K., Raabe, E. H., Siebzehnruhl, F. A., Suarez, M. J., Orr, B. A., Bar, E. E., Maciaczyk, J., and Eberhart, C. G. (2015). ZEB1 Promotes Invasion in Human Fetal Neural Stem Cells and Hypoxic Glioma Neurospheres. *Brain Pathol* *25*, 724-732.
- Kalman, B., Szep, E., Garzuly, F., and Post, D. E. (2013). Epidermal growth factor receptor as a therapeutic target in glioblastoma. *Neuromolecular Med* *15*, 420-434.
- Kalokhe, G., Grimm, S. A., Chandler, J. P., Helenowski, I., Rademaker, A., and Raizer, J. J. (2012). Metastatic glioblastoma: case presentations and a review of the literature. *J Neurooncol* *107*, 21-27.
- Kamran, N., Calinescu, A., Candolfi, M., Chandran, M., Mineharu, Y., Asad, A. S., Koschmann, C., Nunez, F. J., Lowenstein, P. R., and Castro, M. G. (2016). Recent advances and future of immunotherapy for glioblastoma. *Expert Opin Biol Ther*, 1-20.

- Kane, J. R., Miska, J., Young, J. S., Kanojia, D., Kim, J. W., and Lesniak, M. S. (2015). Sui generis: gene therapy and delivery systems for the treatment of glioblastoma. *Neuro Oncol* *17 Suppl 2*, ii24-ii36.
- Kannan, N., Nguyen, L. V., and Eaves, C. J. (2014). Integrin beta3 links therapy resistance and cancer stem cell properties. *Nat Cell Biol* *16*, 397-399.
- Karsy, M., Guan, J., Cohen, A. L., Jensen, R. L., and Colman, H. (2017). New Molecular Considerations for Glioma: IDH, ATRX, BRAF, TERT, H3 K27M. *Current neurology and neuroscience reports* *17*, 19.
- Kawataki, T., Yamane, T., Naganuma, H., Rousselle, P., Anduren, I., Tryggvason, K., and Patarroyo, M. (2007). Laminin isoforms and their integrin receptors in glioma cell migration and invasiveness: Evidence for a role of alpha5-laminin(s) and alpha3beta1 integrin. *Exp Cell Res* *313*, 3819-3831.
- Keles, G. E., Lamborn, K. R., Chang, S. M., Prados, M. D., and Berger, M. S. (2004). Volume of residual disease as a predictor of outcome in adult patients with recurrent supratentorial glioblastomas multiforme who are undergoing chemotherapy. *J Neurosurg* *100*, 41-46.
- Ken, S., Deviers, A., Filleron, T., Catalaa, I., Lotterie, J. A., Khalifa, J., Lubrano, V., Berry, I., Peran, P., Celsis, P., *et al.* (2015). Voxel-based evidence of perfusion normalization in glioblastoma patients included in a phase I-II trial of radiotherapy/tipifarnib combination. *Journal of neuro-oncology* *124*, 465-473.
- Khalifa, J., Tensaouti, F., Chaltiel, L., Lotterie, J. A., Catalaa, I., Sunyach, M. P., Ibarrola, D., Noel, G., Truc, G., Walker, P., *et al.* (2017). Identification of a candidate biomarker from perfusion MRI to anticipate glioblastoma progression after chemoradiation. *Eur Radiol* *26*, 4194-4203.
- Khan, S., Lakhe-Reddy, S., McCarty, J. H., Sorenson, C. M., Sheibani, N., Reichardt, L. F., Kim, J. H., Wang, B., Sedor, J. R., and Schelling, J. R. (2011). Mesangial cell integrin alphavbeta8 provides glomerular endothelial cell cytoprotection by sequestering TGF-beta and regulating PECAM-1. *Am J Pathol* *178*, 609-620.
- Khyrul, W. A., LaLonde, D. P., Brown, M. C., Levinson, H., and Turner, C. E. (2004). The integrin-linked kinase regulates cell morphology and motility in a rho-associated kinase-dependent manner. *J Biol Chem* *279*, 54131-54139.
- Kim, E. J., Kim, S. O., Jin, X., Ham, S. W., Kim, J., Park, J. B., Lee, J. Y., Kim, S. C., and Kim, H. (2015). Epidermal growth factor receptor variant III renders glioma cancer cells less differentiated by JAGGED1. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* *36*, 2921-2928.
- Kim, S., Bell, K., Mousa, S. A., and Varner, J. A. (2000). Regulation of angiogenesis in vivo by ligation of integrin alpha5beta1 with the central cell-binding domain of fibronectin. *Am J Pathol* *156*, 1345-1362.
- Knizetova, P., Ehrmann, J., Hlobilkova, A., Vancova, I., Kalita, O., Kolar, Z., and Bartek, J. (2008). Autocrine regulation of glioblastoma cell cycle progression, viability and radioresistance through the VEGF-VEGFR2 (KDR) interplay. *Cell Cycle* *7*, 2553-2561.
- Kokubo, T., Uchida, H., and Choi, E. T. (2007). Integrin alpha(v)beta(3) as a target in the prevention of neointimal hyperplasia. *J Vasc Surg* *45 Suppl A*, A33-38.
- Kumar, V., Maurya, V. K., Joshi, A., Meeran, S. M., and Jha, R. K. (2015). Integrin beta 8 (ITGB8) regulates embryo implantation potentially via controlling the activity of TGF-B1 in mice. *Biol Reprod* *92*, 109.
- Kumar, V., Soni, U. K., Maurya, V. K., Singh, K., and Jha, R. K. (2017). Integrin beta8 (ITGB8) activates VAV-RAC1 signaling via FAK in the acquisition of endometrial epithelial cell receptivity for blastocyst implantation. *Scientific reports* *7*, 1885.
- Kuwada, S. K. (2007). Drug evaluation: Volociximab, an angiogenesis-inhibiting chimeric monoclonal antibody. *Curr Opin Mol Ther* *9*, 92-98.

- Kwiatkowska, A., and Symons, M. (2013). Signaling determinants of glioma cell invasion. *Adv Exp Med Biol* 986, 121-141.
- Kyritsis, A. P., Bondy, M. L., Rao, J. S., and Sioka, C. (2010). Inherited predisposition to glioma. *Neuro Oncol* 12, 104-113.
- Lakhe-Reddy, S., Khan, S., Konieczkowski, M., Jarad, G., Wu, K. L., Reichardt, L. F., Takai, Y., Bruggeman, L. A., Wang, B., Sedor, J. R., and Schelling, J. R. (2006). Beta8 integrin binds Rho GDP dissociation inhibitor-1 and activates Rac1 to inhibit mesangial cell myofibroblast differentiation. *J Biol Chem* 281, 19688-19699.
- Lakhe-Reddy, S., Li, V., Arnold, T. D., Khan, S., and Schelling, J. R. (2014). Mesangial cell alpha5beta8-integrin regulates glomerular capillary integrity and repair. *Am J Physiol Renal Physiol* 306, F1400-1409.
- Lamour, V., Henry, A., Kroonen, J., Nokin, M. J., von Marschall, Z., Fisher, L. W., Chau, T. L., Chariot, A., Sanson, M., Delattre, J. Y., *et al.* (2015). Targeting osteopontin suppresses glioblastoma stem-like cell character and tumorigenicity in vivo. *Int J Cancer* 137, 1047-1057.
- Lathia, J. D., Gallagher, J., Heddleston, J. M., Wang, J., Eyler, C. E., Macsworlds, J., Wu, Q., Vasanji, A., McLendon, R. E., Hjelmeland, A. B., and Rich, J. N. (2010). Integrin alpha 6 regulates glioblastoma stem cells. *Cell Stem Cell* 6, 421-432.
- Lathia, J. D., Heddleston, J. M., Venere, M., and Rich, J. N. (2011). Deadly teamwork: neural cancer stem cells and the tumor microenvironment. *Cell Stem Cell* 8, 482-485.
- Lathia, J. D., Li, M., Hall, P. E., Gallagher, J., Hale, J. S., Wu, Q., Venere, M., Levy, E., Rani, M. R., Huang, P., *et al.* (2012). Laminin alpha 2 enables glioblastoma stem cell growth. *Ann Neurol* 72, 766-778.
- Lathia, J. D., Mack, S. C., Mulkearns-Hubert, E. E., Valentim, C. L., and Rich, J. N. (2015). Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes Dev* 29, 1203-1217.
- Lebelt, A., Dzieciol, J., Guzinska-Ustymowicz, K., Lemancewicz, D., Zimnoch, L., and Czykier, E. (2008). Angiogenesis in gliomas. *Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society* 46, 69-72.
- Lee, E. Q., Kuhn, J., Lamborn, K. R., Abrey, L., DeAngelis, L. M., Lieberman, F., Robins, H. I., Chang, S. M., Yung, W. K., Drappatz, J., *et al.* (2012). Phase I/II study of sorafenib in combination with temsirolimus for recurrent glioblastoma or gliosarcoma: North American Brain Tumor Consortium study 05-02. *Neuro Oncol* 14, 1511-1518.
- Lee, H. S., Cheerathodi, M., Chaki, S. P., Reyes, S. B., Zheng, Y., Lu, Z., Paidassi, H., DerMardirossian, C., Lacy-Hulbert, A., Rivera, G. M., and McCarty, J. H. (2015). Protein tyrosine phosphatase-PEST and beta8 integrin regulate spatiotemporal patterns of RhoGDI1 activation in migrating cells. *Mol Cell Biol* 35, 1401-1413.
- Lee, J., Kotliarova, S., Kotliarov, Y., Li, A., Su, Q., Donin, N. M., Pastorino, S., Purow, B. W., Christopher, N., Zhang, W., *et al.* (2006). Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell* 9, 391-403.
- Lee, M., Lee, H. J., Seo, W. D., Park, K. H., and Lee, Y. S. (2010). Sialylation of integrin beta1 is involved in radiation-induced adhesion and migration in human colon cancer cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 76, 1528-1536.
- Lei, L., Sonabend, A. M., Guarnieri, P., Soderquist, C., Ludwig, T., Rosenfeld, S., Bruce, J. N., and Canoll, P. (2011). Glioblastoma models reveal the connection between adult glial progenitors and the proneural phenotype. *PLoS One* 6, e20041.
- Li, C., Heidt, D. G., Dalerba, P., Burant, C. F., Zhang, L., Adsay, V., Wicha, M., Clarke, M. F., and Simeone, D. M. (2007). Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* 67, 1030-1037.

- Li, F., Liang, X., Chen, Y., Li, S., and Liu, J. (2014). Role of microRNA-93 in regulation of angiogenesis. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 35, 10609-10613.
- Li, G., Yang, H., Han, K., Zhu, D., Lun, P., and Zhao, Y. (2018). A novel circular RNA, hsa_circ_0046701, promotes carcinogenesis by increasing the expression of miR-142-3p target ITGB8 in glioma. *Biochem Biophys Res Commun* 2018, 30088-30083.
- Li, J., Qu, Y., Li, X., Li, D., Zhao, F., Mao, M., Ferriero, D., and Mu, D. (2010). The role of integrin alpha(v)beta (8) in neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Neurotox Res* 17, 406-417.
- Li, L., Hu, Y., Ylivinkka, I., Li, H., Chen, P., Keski-Oja, J., and Hyytiainen, M. (2013). NETRIN-4 protects glioblastoma cells FROM temozolomide induced senescence. *PLoS One* 8, e80363.
- Li, Y., Li, A., Glas, M., Lal, B., Ying, M., Sang, Y., Xia, S., Trageser, D., Guerrero-Cazares, H., Eberhart, C. G., *et al.* (2011). c-Met signaling induces a reprogramming network and supports the glioblastoma stem-like phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 9951-9956.
- Li, Z., Bao, S., Wu, Q., Wang, H., Eyler, C., Sathornsumetee, S., Shi, Q., Cao, Y., Lathia, J., McLendon, R. E., *et al.* (2009). Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Cancer Cell* 15, 501-513.
- Lim, S. T., Chen, X. L., Lim, Y., Hanson, D. A., Vo, T. T., Howerton, K., Larocque, N., Fisher, S. J., Schlaepfer, D. D., and Ilic, D. (2008). Nuclear FAK promotes cell proliferation and survival through FERM-enhanced p53 degradation. *Mol Cell* 29, 9-22.
- Lim, Y. C., Roberts, T. L., Day, B. W., Harding, A., Kozlov, S., Kijas, A. W., Ensbey, K. S., Walker, D. G., and Lavin, M. F. (2012). A role for homologous recombination and abnormal cell-cycle progression in radioresistance of glioma-initiating cells. *Mol Cancer Ther* 11, 1863-1872.
- Lindberg, N., Kastemar, M., Olofsson, T., Smits, A., and Uhrbom, L. (2009). Oligodendrocyte progenitor cells can act as cell of origin for experimental glioma. *Oncogene* 28, 2266-2275.
- Liu, G., Yuan, X., Zeng, Z., Tunici, P., Ng, H., Abdulkadir, I. R., Lu, L., Irvin, D., Black, K. L., and Yu, J. S. (2006). Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer* 5, 67.
- Liu, J., Zeng, L., Kennedy, R. M., Gruenig, N. M., and Childs, S. J. (2012). betaPix plays a dual role in cerebral vascular stability and angiogenesis, and interacts with integrin alphavbeta8. *Dev Biol* 363, 95-105.
- Liu, S., Wang, J., Niu, W., Liu, E., Peng, C., Lin, P., Wang, B., Khan, A. Q., Gao, H., Liang, B., *et al.* (2013). The beta6-integrin-ERK/MAP kinase pathway contributes to chemo resistance in colon cancer. *Cancer Lett* 328, 325-334.
- Lomonaco, S. L., Finnis, S., Xiang, C., Decarvalho, A., Umansky, F., Kalkanis, S. N., Mikkelsen, T., and Brodie, C. (2009). The induction of autophagy by gamma-radiation contributes to the radioresistance of glioma stem cells. *Int J Cancer* 125, 717-722.
- Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvet, A., Scheithauer, B. W., and Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114, 97-109.
- Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Kleihues, P., and Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta neuropathologica* 131, 803-820.
- Luo, B. H., Carman, C. V., and Springer, T. A. (2007). Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annual review of immunology* 25, 619-647.
- Ma, H., Hao, P., Zhang, L., Ma, C., Yan, P., Wang, R. F., and Zhang, C. L. (2016). A new cyclic RGD peptide dimer for integrin alphavbeta3 imaging. *European review for medical and pharmacological sciences* 20, 613-619.

- Maachani, U. B., Shankavaram, U., Kramp, T., Tofilon, P. J., Camphausen, K., and Tandle, A. T. (2016). FOXM1 and STAT3 interaction confers radioresistance in glioblastoma cells. *Oncotarget* 7, 77365-77377.
- MacDonald, T. J., Taga, T., Shimada, H., Tabrizi, P., Zlokovic, B. V., Cheresch, D. A., and Laug, W. E. (2001). Preferential susceptibility of brain tumors to the antiangiogenic effects of an alpha(v) integrin antagonist. *Neurosurgery* 48, 151-157.
- Magee, J. A., Piskounova, E., and Morrison, S. J. (2012). Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty. *Cancer Cell* 21, 283-296.
- Maglott, A., Bartik, P., Cosgun, S., Klotz, P., Ronde, P., Fuhrmann, G., Takeda, K., Martin, S., and Dontenwill, M. (2006). The small alpha5beta1 integrin antagonist, SJ749, reduces proliferation and clonogenicity of human astrocytoma cells. *Cancer Res* 66, 6002-6007.
- Malmer, B., Adatto, P., Armstrong, G., Barnholtz-Sloan, J., Bernstein, J. L., Claus, E., Davis, F., Houlston, R., Il'yasova, D., Jenkins, R., *et al.* (2007). GLIOGENE an International Consortium to Understand Familial Glioma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16, 1730-1734.
- Malric, L., Monferran, S., Gilhodes, J., Boyrie, S., Dahan, P., Skuli, N., Sesen, J., Filleron, T., Kowalski-Chauvel, A., Cohen-Jonathan Moyal, E., *et al.* (2017). Interest of integrins targeting in glioblastoma according to tumor heterogeneity and cancer stem cell paradigm: an update. *Oncotarget* 8, 86947-86968.
- Mannino, M., and Chalmers, A. J. (2011). Radioresistance of glioma stem cells: intrinsic characteristic or property of the 'microenvironment-stem cell unit'? *Molecular oncology* 5, 374-386.
- Markovics, J. A., Araya, J., Cambier, S., Jablons, D., Hill, A., Wolters, P. J., and Nishimura, S. L. (2010). Transcription of the transforming growth factor beta activating integrin beta8 subunit is regulated by SP3, AP-1, and the p38 pathway. *The Journal of biological chemistry* 285, 24695-24706.
- Markovics, J. A., Araya, J., Cambier, S., Somanath, S., Gline, S., Jablons, D., Hill, A., Wolters, P. J., and Nishimura, S. L. (2011). Interleukin-1beta induces increased transcriptional activation of the transforming growth factor-beta-activating integrin subunit beta8 through altering chromatin architecture. *J Biol Chem* 286, 36864-36874.
- Martinez, R., Rohde, V., and Schackert, G. (2010). Different molecular patterns in glioblastoma multiforme subtypes upon recurrence. *J Neurooncol* 96, 321-329.
- Mas-Moruno, C., Rechenmacher, F., and Kessler, H. (2011). Cilengitide: the first anti-angiogenic small molecule drug candidate design, synthesis and clinical evaluation. *Anticancer Agents Med Chem* 10, 753-768.
- Matter, M. L., and Ruoslahti, E. (2001). A signaling pathway from the alpha5beta1 and alpha(v)beta3 integrins that elevates bcl-2 transcription. *The Journal of biological chemistry* 276, 27757-27763.
- Mazaheri, N., Peymani, M., Galehdari, H., Ghaedi, K., Ghoochani, A., Kiani-Esfahani, A., and Nasr-Esfahani, M. H. (2017). Ameliorating Effect of Osteopontin on H2O2-Induced Apoptosis of Human Oligodendrocyte Progenitor Cells. *Cellular and molecular neurobiology*.
- McCarty, J. H., Cook, A. A., and Hynes, R. O. (2005a). An interaction between {alpha}v{beta}8 integrin and Band 4.1B via a highly conserved region of the Band 4.1 C-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 13479-13483.
- McCarty, J. H., Lacy-Hulbert, A., Charest, A., Bronson, R. T., Crowley, D., Housman, D., Savill, J., Roes, J., and Hynes, R. O. (2004). Selective ablation of alphav integrins in the central nervous system leads to cerebral hemorrhage, seizures, axonal degeneration and premature death. *Development* 132, 165-176.
- McCarty, J. H., Lacy-Hulbert, A., Charest, A., Bronson, R. T., Crowley, D., Housman, D., Savill, J., Roes, J., and Hynes, R. O. (2005b). Selective ablation of alphav integrins in the

- central nervous system leads to cerebral hemorrhage, seizures, axonal degeneration and premature death. *Development* 132, 165-176.
- Mehta, S., and Lo Cascio, C. (2017). Developmentally regulated signaling pathways in glioma invasion. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*.
- Mertens-Walker, I., Fernandini, B. C., Maharaj, M. S., Rockstroh, A., Nelson, C. C., Herington, A. C., and Stephenson, S. A. (2015). The tumour-promoting receptor tyrosine kinase, EphB4, regulates expression of Integrin-beta8 in prostate cancer cells. *BMC cancer* 15, 164.
- Miao, H., Gale, N. W., Guo, H., Qian, J., Petty, A., Kaspar, J., Murphy, A. J., Valenzuela, D. M., Yancopoulos, G., Hambardzumyan, D., *et al.* (2015). EphA2 promotes infiltrative invasion of glioma stem cells in vivo through cross-talk with Akt and regulates stem cell properties. *Oncogene* 34, 558-567.
- Miranti, C. K., and Brugge, J. S. (2002). Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. *Nat Cell Biol* 4, E83-90.
- Missan, D. S., and DiPersio, M. (2012). Integrin control of tumor invasion. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 22, 309-324.
- Mobley, A. K., and McCarty, J. H. (2011). beta8 integrin is essential for neuroblast migration in the rostral migratory stream. *Glia* 59, 1579-1587.
- Mobley, A. K., Tchaicha, J. H., Shin, J., Hossain, M. G., and McCarty, J. H. (2009). Beta8 integrin regulates neurogenesis and neurovascular homeostasis in the adult brain. *J Cell Sci* 122, 1842-1851.
- Mohyeldin, A., Garzon-Muvdi, T., and Quinones-Hinojosa, A. (2010). Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell* 7, 150-161.
- Monferran, S., Skuli, N., Delmas, C., Favre, G., Bonnet, J., Cohen-Jonathan-Moyal, E., and Toulas, C. (2008). Alphavbeta3 and alphavbeta5 integrins control glioma cell response to ionising radiation through ILK and RhoB. *Int J Cancer* 123, 357-364.
- Moorthy, N. S., Sousa, S. F., Ramos, M. J., and Fernandes, P. A. (2013). Farnesyltransferase inhibitors: a comprehensive review based on quantitative structural analysis. *Curr Med Chem* 20, 4888-4923.
- Morris, P. G., and Abrey, L. E. (2010). Novel targeted agents for platelet-derived growth factor receptor and c-KIT in malignant gliomas. *Target Oncol* 5, 193-200.
- Moyal, E. C., Laprie, A., Delannes, M., Poublanc, M., Catalaa, I., Dalenc, F., Berchery, D., Sabatier, J., Bousquet, P., De Porre, P., *et al.* (2007). Phase I trial of tipifarnib (R115777) concurrent with radiotherapy in patients with glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 68, 1396-1401.
- Moyle, M., Napier, M. A., and McLean, J. W. (1991). Cloning and expression of a divergent integrin subunit beta 8. *The Journal of biological chemistry* 266, 19650-19658.
- MRCBTWP (2001). Randomized trial of procarbazine, lomustine, and vincristine in the adjuvant treatment of high-grade astrocytoma: a Medical Research Council trial (Medical Research Council Brain Tumor Working Party). *J Clin Oncol* 19, 509-518.
- Mukherjee, B., McEllin, B., Camacho, C. V., Tomimatsu, N., Sirasanagandala, S., Nannepaga, S., Hatanpaa, K. J., Mickey, B., Madden, C., Maher, E., *et al.* (2009). EGFRvIII and DNA double-strand break repair: a molecular mechanism for radioresistance in glioblastoma. *Cancer Res* 69, 4252-4259.
- Munger, J. S., and Sheppard, D. (2011). Cross talk among TGF-beta signaling pathways, integrins, and the extracellular matrix. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3, a005017.
- Murphy, A. M., and Rabkin, S. D. (2013). Current status of gene therapy for brain tumors. *Transl Res* 161, 339-354.
- Nabors, L. B., Fink, K. L., Mikkelsen, T., Grujicic, D., Tarnawski, R., Nam, D. H., Perry, J. R., Markivskyy, A., Picard, M., and Reardon, D. A. (2013). A randomized phase II study investigating cilengitide added to standard chemoradiotherapy in patients with newly diagnosed glioblastoma with unmethylated 06-methylguanine-DNA methyltransferase

- (MGMT) gene promoter: Initial report of the CORE study. European Cancer Congress, Abstract 40.
- Nabors, L. B., Mikkelsen, T., Hegi, M. E., Ye, X., Batchelor, T., Lesser, G., Peereboom, D., Rosenfeld, M. R., Olsen, J., Brem, S., *et al.* (2012). A safety run-in and randomized phase 2 study of cilengitide combined with chemoradiation for newly diagnosed glioblastoma (NABTT 0306). *Cancer* 118, 5601-5607.
- Nabors, L. B., Mikkelsen, T., Rosenfeld, S. S., Hochberg, F., Akella, N. S., Fisher, J. D., Cloud, G. A., Zhang, Y., Carson, K., Wittemer, S. M., *et al.* (2007). Phase I and correlative biology study of cilengitide in patients with recurrent malignant glioma. *J Clin Oncol* 25, 1651-1657.
- Nagpal, S. (2012). The role of BCNU polymer wafers (Gliadel) in the treatment of malignant glioma. *Neurosurg Clin N Am* 23, 289-295, ix.
- Nakada, M., Nambu, E., Furuyama, N., Yoshida, Y., Takino, T., Hayashi, Y., Sato, H., Sai, Y., Tsuji, T., Miyamoto, K. I., *et al.* (2013). Integrin alpha3 is overexpressed in glioma stem-like cells and promotes invasion. *Br J Cancer* 108, 2516-2524.
- Nakamura, M., Watanabe, T., Klangby, U., Asker, C., Wiman, K., Yonekawa, Y., Kleihues, P., and Ohgaki, H. (2001). p14ARF deletion and methylation in genetic pathways to glioblastomas. *Brain Pathol* 11, 159-168.
- Nguyen, M. L., Willows, B., Khan, R., Chi, A., Kim, L., Nour, S. G., Sroka, T., Kerr, C., Godinez, J., Mills, M., *et al.* (2014). The potential role of magnetic resonance spectroscopy in image-guided radiotherapy. *Front Oncol* 4, 91.
- Nisato, R. E., Tille, J. C., Jonczyk, A., Goodman, S. L., and Pepper, M. S. (2003). alphav beta 3 and alphav beta 5 integrin antagonists inhibit angiogenesis in vitro. *Angiogenesis* 6, 105-119.
- Nishimura, S. L., Sheppard, D., and Pytela, R. (1994). Integrin alpha v beta 8. Interaction with vitronectin and functional divergence of the beta 8 cytoplasmic domain. *The Journal of biological chemistry* 269, 28708-28715.
- Niyazi, M., Siefert, A., Schwarz, S. B., Ganswindt, U., Kreth, F. W., Tonn, J. C., and Belka, C. (2010). Therapeutic options for recurrent malignant glioma. *Radiother Oncol* 98, 1-14.
- Nobusawa, S., Lachuer, J., Wierinckx, A., Kim, Y. H., Huang, J., Legras, C., Kleihues, P., and Ohgaki, H. (2010). Intratumoral patterns of genomic imbalance in glioblastomas. *Brain Pathol* 20, 936-944.
- Nurden, A. T., and Nurden, P. (2014). [Glycoproteins, inherited diseases of platelets, and the role of platelets in wound healing]. *Bull Acad Natl Med* 197, 349-358; discussion 358-349.
- O'Day, S., Pavlick, A., Loquai, C., Lawson, D., Gutzmer, R., Richards, J., Schadendorf, D., Thompson, J. A., Gonzalez, R., Trefzer, U., *et al.* (2011). A randomised, phase II study of intetumumab, an anti-alphav-integrin mAb, alone and with dacarbazine in stage IV melanoma. *Br J Cancer* 105, 346-352.
- Oh, S., Ohlfest, J. R., Todhunter, D. A., Vallera, V. D., Hall, W. A., Chen, H., and Vallera, D. A. (2009). Intracranial elimination of human glioblastoma brain tumors in nude rats using the bispecific ligand-directed toxin, DTEGF13 and convection enhanced delivery. *J Neurooncol* 95, 331-342.
- Ohgaki, H., and Kleihues, P. (2005). Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol* 109, 93-108.
- Ohgaki, H., and Kleihues, P. (2013). The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res* 19, 764-772.
- Oliveira-Ferrer, L., Hauschild, J., Fiedler, W., Bokemeyer, C., Nippgen, J., Celik, I., and Schuch, G. (2008). Cilengitide induces cellular detachment and apoptosis in endothelial and glioma cells mediated by inhibition of FAK/src/AKT pathway. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* 27, 86.
- Olson, J. J., Nayak, L., Ormond, D. R., Wen, P. Y., Kalkanis, S. N., and Committee, A. C. J. G. (2014). The role of cytotoxic chemotherapy in the management of progressive glioblastoma :

- a systematic review and evidence-based clinical practice guideline. *J Neurooncol* 118, 501-555.
- Onishi, M., Ichikawa, T., Kurozumi, K., and Date, I. (2011). Angiogenesis and invasion in glioma. *Brain Tumor Pathol* 28, 13-24.
- Ortensi, B., Setti, M., Osti, D., and Pelicci, G. (2013). Cancer stem cell contribution to glioblastoma invasiveness. *Stem cell research & therapy* 4, 18.
- Ostrom, Q. T., Bauchet, L., Davis, F. G., Deltour, I., Fisher, J. L., Langer, C. E., Pekmezci, M., Schwartzbaum, J. A., Turner, M. C., Walsh, K. M., *et al.* (2014). The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review. *Neuro Oncol* 16, 896-913.
- Ozawa, A., Sato, Y., Imabayashi, T., Uemura, T., Takagi, J., and Sekiguchi, K. (2016). Molecular Basis of the Ligand Binding Specificity of α 5 β 1 Integrin. *The Journal of biological chemistry* 291, 11551-11565.
- Paek, S. L., Chung, Y. S., Paek, S. H., Hwang, J. H., Sohn, C. H., Choi, S. H., Son, Y. D., Kim, Y. B., Kim, D. G., Lee, K. H., and Cho, Z. H. (2013). Early experience of pre- and post-contrast 7.0T MRI in brain tumors. *J Korean Med Sci* 28, 1362-1372.
- Pallini, R., Ricci-Vitiani, L., Banna, G. L., Signore, M., Lombardi, D., Todaro, M., Stassi, G., Martini, M., Maira, G., Larocca, L. M., and De Maria, R. (2008). Cancer stem cell analysis and clinical outcome in patients with glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res* 14, 8205-8212.
- Paoli, P., Giannoni, E., and Chiarugi, P. (2013). Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. *Biochim Biophys Acta* 1833, 3481-3498.
- Paolillo, M., Boselli, C., and Schinelli, S. (2018). Glioblastoma under Siege: An Overview of Current Therapeutic Strategies. *Brain Sci* 8.
- Park, D. M., Sathornsumetee, S., and Rich, J. N. (2010). Medical oncology: treatment and management of malignant gliomas. *Nat Rev Clin Oncol* 7, 75-77.
- Patel, A. P., Tirosh, I., Trombetta, J. J., Shalek, A. K., Gillespie, S. M., Wakimoto, H., Cahill, D. P., Nahed, B. V., Curry, W. T., Martuza, R. L., *et al.* (2014). Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science* 344, 1396-1401.
- Paw, I., Carpenter, R. C., Watabe, K., Debinski, W., and Lo, H. W. (2015). Mechanisms regulating glioma invasion. *Cancer Lett* 362, 1-7.
- Peereboom, D. M., Shepard, D. R., Ahluwalia, M. S., Brewer, C. J., Agarwal, N., Stevens, G. H., Suh, J. H., Toms, S. A., Vogelbaum, M. A., Weil, R. J., *et al.* (2010). Phase II trial of erlotinib with temozolomide and radiation in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme. *J Neurooncol* 98, 93-99.
- Pellegatta, S., Poliani, P. L., Corno, D., Menghi, F., Ghielmetti, F., Suarez-Merino, B., Caldera, V., Nava, S., Ravanini, M., Facchetti, F., *et al.* (2006). Neurospheres enriched in cancer stem-like cells are highly effective in eliciting a dendritic cell-mediated immune response against malignant gliomas. *Cancer Res* 66, 10247-10252.
- Pellinen, T., and Ivaska, J. (2006). Integrin traffic. *J Cell Sci* 119, 3723-3731.
- Phillips, H. S., Kharbanda, S., Chen, R., Forrester, W. F., Soriano, R. H., Wu, T. D., Misra, A., Nigro, J. M., Colman, H., Soroceanu, L., *et al.* (2006). Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* 9, 157-173.
- Piccirillo, S. G., Combi, R., Cajola, L., Patrizi, A., Redaelli, S., Bentivegna, A., Baronchelli, S., Maira, G., Pollo, B., Mangiola, A., *et al.* (2009). Distinct pools of cancer stem-like cells coexist within human glioblastomas and display different tumorigenicity and independent genomic evolution. *Oncogene* 28, 1807-1811.
- Piccirillo, S. G., Dietz, S., Madhu, B., Griffiths, J., Price, S. J., Collins, V. P., and Watts, C. (2012). Fluorescence-guided surgical sampling of glioblastoma identifies phenotypically distinct tumour-initiating cell populations in the tumour mass and margin. *Br J Cancer* 107, 462-468.

- Pietras, A., Katz, A. M., Ekstrom, E. J., Wee, B., Halliday, J. J., Pitter, K. L., Werbeck, J. L., Amankolor, N. M., Huse, J. T., and Holland, E. C. (2014). Osteopontin-CD44 signaling in the glioma perivascular niche enhances cancer stem cell phenotypes and promotes aggressive tumor growth. *Cell Stem Cell* *14*, 357-369.
- Prins, R. M., Soto, H., Konkankit, V., Odesa, S. K., Eskin, A., Yong, W. H., Nelson, S. F., and Liao, L. M. (2011). Gene expression profile correlates with T-cell infiltration and relative survival in glioblastoma patients vaccinated with dendritic cell immunotherapy. *Clin Cancer Res* *17*, 1603-1615.
- Proctor, J. M., Zang, K., Wang, D., Wang, R., and Reichardt, L. F. (2005). Vascular development of the brain requires beta8 integrin expression in the neuroepithelium. *J Neurosci* *25*, 9940-9948.
- Qiu, B., Zhang, D., Wang, Y., Ou, S., Wang, J., Tao, J., and Wang, Y. (2013). Interleukin-6 is overexpressed and augments invasiveness of human glioma stem cells in vitro. *Clinical & experimental metastasis* *30*, 1009-1018.
- Quiros, S., Roos, W. P., and Kaina, B. (2011). Rad51 and BRCA2--New molecular targets for sensitizing glioma cells to alkylating anticancer drugs. *PLoS One* *6*, e27183.
- Radford, I. R. (1986). Evidence for a general relationship between the induced level of DNA double-strand breakage and cell-killing after X-irradiation of mammalian cells. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* *49*, 611-620.
- Rampling, R., Sanson, M., Gorlia, T., Lacombe, D., Lai, C., Gharib, M., Taal, W., Stoffregen, C., Decker, R., and van den Bent, M. J. (2012). A phase I study of LY317615 (enzastaurin) and temozolomide in patients with gliomas (EORTC trial 26054). *Neuro Oncol* *14*, 344-350.
- Rasheed, B. K., McLendon, R. E., Friedman, H. S., Friedman, A. H., Fuchs, H. E., Bigner, D. D., and Bigner, S. H. (1995). Chromosome 10 deletion mapping in human gliomas: a common deletion region in 10q25. *Oncogene* *10*, 2243-2246.
- Ray, K. (2013). Connective tissue diseases: Integrins crucial for the onset of fibrosis in systemic sclerosis--a new therapeutic target? *Nat Rev Rheumatol* *9*, 637.
- Razavi, S. M., Lee, K. E., Jin, B. E., Auja, P. S., Gholamin, S., and Li, G. (2016). Immune Evasion Strategies of Glioblastoma. *Frontiers in surgery* *3*, 11.
- Redzic, J. S., Ung, T. H., and Graner, M. W. (2014). Glioblastoma extracellular vesicles: reservoirs of potential biomarkers. *Pharmgenomics Pers Med* *7*, 65-77.
- Renner, G., Janouskova, H., Noulet, F., Koenig, V., Guerin, E., Bar, S., Nuesch, J., Rechenmacher, F., Neubauer, S., Kessler, H., *et al.* (2016). Integrin alpha5beta1 and p53 convergent pathways in the control of anti-apoptotic proteins PEA-15 and survivin in high-grade glioma. *Cell Death Differ* *23*, 640-653.
- Reyes, S. B., Narayanan, A. S., Lee, H. S., Tchaicha, J. H., Aldape, K. D., Lang, F. F., Tolias, K. F., and McCarty, J. H. (2013). alpha5beta8 integrin interacts with RhoGDI1 to regulate Rac1 and Cdc42 activation and drive glioblastoma cell invasion. *Mol Biol Cell* *24*, 474-482.
- Ricci-Vitiani, L., Lombardi, D. G., Pilozzi, E., Biffoni, M., Todaro, M., Peschle, C., and De Maria, R. (2007). Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* *445*, 111-115.
- Ricci-Vitiani, L., Pallini, R., Biffoni, M., Todaro, M., Invernici, G., Cenci, T., Maira, G., Parati, E. A., Stassi, G., Larocca, L. M., and De Maria, R. (2010). Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature* *468*, 824-828.
- Riemenschneider, M. J., Mueller, W., Betensky, R. A., Mohapatra, G., and Louis, D. N. (2005). In situ analysis of integrin and growth factor receptor signaling pathways in human glioblastomas suggests overlapping relationships with focal adhesion kinase activation. *Am J Pathol* *167*, 1379-1387.
- Roesler, R. (2014). Stem cells and the origin of different glioma subtypes. *J Neurosurg* *120*, 1009-1010.

- Roos, A., Ding, Z., Loftus, J. C., and Tran, N. L. (2017). Molecular and Microenvironmental Determinants of Glioma Stem-Like Cell Survival and Invasion. *Front Oncol* 7, 120.
- Ross, G. M. (1999). Induction of cell death by radiotherapy. *Endocr Relat Cancer* 6, 41-44.
- Roth, P., Silginer, M., Goodman, S. L., Hasenbach, K., Thies, S., Maurer, G., Schraml, P., Tabatabai, G., Moch, H., Tritschler, I., and Weller, M. (2013). Integrin control of the transforming growth factor-beta pathway in glioblastoma. *Brain* 136, 564-576.
- Rycaj, K., and Tang, D. G. (2014). Cancer stem cells and radioresistance. *Int J Radiat Biol* 90, 615-621.
- Sadok, A., Bourgarel-Rey, V., Gattacceca, F., Penel, C., Lehmann, M., and Kovacic, H. (2008). Nox1-dependent superoxide production controls colon adenocarcinoma cell migration. *Biochim Biophys Acta* 1783, 23-33.
- Sadri-Ardekani, H., Mizrak, S. C., van Daalen, S. K., Korver, C. M., Roepers-Gajadien, H. L., Koruji, M., Hovingh, S., de Reijke, T. M., de la Rosette, J. J., van der Veen, F., *et al.* (2009). Propagation of human spermatogonial stem cells in vitro. *JAMA* 302, 2127-2134.
- Salcman, M. (1980). Survival in glioblastoma: historical perspective. *Neurosurgery* 7, 435-439.
- Sayeed, A., Fedele, C., Trerotola, M., Ganguly, K. K., and Languino, L. R. (2013). IGF-IR promotes prostate cancer growth by stabilizing alpha5beta1 integrin protein levels. *PLoS One* 8, e76513.
- Scalici, J. M., Harrer, C., Allen, A., Jazaeri, A., Atkins, K. A., McLachlan, K. R., and Slack-Davis, J. K. (2014). Inhibition of alpha4beta1 integrin increases ovarian cancer response to carboplatin. *Gynecol Oncol* 132, 455-461.
- Scaringi, C., Minniti, G., Caporello, P., and Enrici, R. M. (2012). Integrin inhibitor cilengitide for the treatment of glioblastoma: a brief overview of current clinical results. *Anticancer Res* 32, 4213-4223.
- Schittenhelm, J., Klein, A., Tatagiba, M. S., Meyermann, R., Fend, F., Goodman, S. L., and Sipsos, B. (2013). Comparing the expression of integrins alphavbeta3, alphavbeta5, alphavbeta6, alphavbeta8, fibronectin and fibrinogen in human brain metastases and their corresponding primary tumors. *Int J Clin Exp Pathol* 6, 2719-2732.
- Schmid, M. C., Franco, I., Kang, S. W., Hirsch, E., Quilliam, L. A., and Varner, J. A. (2013). PI3-kinase gamma promotes Rap1a-mediated activation of myeloid cell integrin alpha4beta1, leading to tumor inflammation and growth. *PLoS One* 8, e60226.
- Schumann, H., Kiritsi, D., Pigors, M., Hausser, I., Kohlhase, J., Peters, J., Ott, H., Hyla-Klekot, L., Gacka, E., Sieron, A. L., *et al.* (2013). Phenotypic spectrum of epidermolysis bullosa associated with alpha6beta4 integrin mutations. *Br J Dermatol* 169, 115-124.
- Seguin, L., Desgrosellier, J. S., Weis, S. M., and Cheresch, D. A. (2015). Integrins and cancer: regulators of cancer stemness, metastasis, and drug resistance. *Trends in cell biology* 25, 234-240.
- Seidel, S., Garvalov, B. K., Wirta, V., von Stechow, L., Schanzer, A., Meletis, K., Wolter, M., Sommerlad, D., Henze, A. T., Nister, M., *et al.* (2010). A hypoxic niche regulates glioblastoma stem cells through hypoxia inducible factor 2 alpha. *Brain* 133, 983-995.
- Serres, E., Debarbieux, F., Stanchi, F., Maggiorrella, L., Grall, D., Turchi, L., Burel-Vandenbos, F., Figarella-Branger, D., Virolle, T., Rougon, G., and Van Obberghen-Schilling, E. (2014). Fibronectin expression in glioblastomas promotes cell cohesion, collective invasion of basement membrane in vitro and orthotopic tumor growth in mice. *Oncogene* 33, 3451-3462.
- Sesen, J., Dahan, P., Scotland, S. J., Saland, E., Dang, V. T., Lemarie, A., Tyler, B. M., Brem, H., Toulas, C., Cohen-Jonathan Moyal, E., *et al.* (2015). Metformin inhibits growth of human glioblastoma cells and enhances therapeutic response. *PLoS One* 10, e0123721.
- Silginer, M., Weller, M., Ziegler, U., and Roth, P. (2014). Integrin inhibition promotes atypical anoikis in glioma cells. *Cell Death Dis* 5, e1012.

- Simon, J. M., Toubiana, T., Lang, P., Taillibert, S., and Mazon, J. J. (2005). [Radiotherapy for glioblastomas: from radiobiology to concomitant chemotherapy]. *Cancer Radiother* 9, 322-331.
- Simpson, J. R., Horton, J., Scott, C., Curran, W. J., Rubin, P., Fischbach, J., Isaacson, S., Rotman, M., Asbell, S. O., Nelson, J. S., and et al. (1993). Influence of location and extent of surgical resection on survival of patients with glioblastoma multiforme: results of three consecutive Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) clinical trials. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 26, 239-244.
- Singh, S. K., Clarke, I. D., Terasaki, M., Bonn, V. E., Hawkins, C., Squire, J., and Dirks, P. B. (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 63, 5821-5828.
- Skuli, N., Monferran, S., Delmas, C., Favre, G., Bonnet, J., Toulas, C., and Cohen-Jonathan Moyal, E. (2009). $\alpha 3 \beta 5$ integrins-FAK-RhoB: a novel pathway for hypoxia regulation in glioblastoma. *Cancer Res* 69, 3308-3316.
- Sottoriva, A., Spiteri, I., Piccirillo, S. G., Touloumis, A., Collins, V. P., Marioni, J. C., Curtis, C., Watts, C., and Tavare, S. (2013). Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 4009-4014.
- Stockis, J., Lienart, S., Colau, D., Collignon, A., Nishimura, S. L., Sheppard, D., Coulie, P. G., and Lucas, S. (2017). Blocking immunosuppression by human Tregs in vivo with antibodies targeting integrin $\alpha V \beta 8$. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, E10161-E10168.
- Streuli, C. H., and Akhtar, N. (2009). Signal co-operation between integrins and other receptor systems. *The Biochemical journal* 418, 491-506.
- Stupack, D. G., Puente, X. S., Boutsaboualoy, S., Storgard, C. M., and Cheresch, D. A. (2001). Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins. *J Cell Biol* 155, 459-470.
- Stupack, D. G., Teitz, T., Potter, M. D., Mikolon, D., Houghton, P. J., Kidd, V. J., Lahti, J. M., and Cheresch, D. A. (2006). Potentiation of neuroblastoma metastasis by loss of caspase-8. *Nature* 439, 95-99.
- Stupp, R., Hegi, M. E., Gorlia, T., Erridge, S. C., Perry, J., Hong, Y. K., Aldape, K. D., Lhermitte, B., Pietsch, T., Grujicic, D., et al. (2014). Cilengitide combined with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CENTRIC EORTC 26071-22072 study): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*.
- Stupp, R., Hegi, M. E., Neyns, B., Goldbrunner, R., Schlegel, U., Clement, P. M., Grabenbauer, G. G., Ochsenbein, A. F., Simon, M., Dietrich, P. Y., et al. (2010). Phase I/IIa study of cilengitide and temozolomide with concomitant radiotherapy followed by cilengitide and temozolomide maintenance therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma. *J Clin Oncol* 28, 2712-2718.
- Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J., Belanger, K., Brandes, A. A., Marosi, C., Bogdahn, U., et al. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352, 987-996.
- Sturm, D., Witt, H., Hovestadt, V., Khuong-Quang, D. A., Jones, D. T., Konermann, C., Pfaff, E., Tonjes, M., Sill, M., Bender, S., et al. (2012). Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma. *Cancer Cell* 22, 425-437.
- Su, H., Kim, H., Pawlikowska, L., Kitamura, H., Shen, F., Cambier, S., Markovics, J., Lawton, M. T., Sidney, S., Bollen, A. W., et al. (2010). Reduced expression of integrin $\alpha V \beta 8$ is associated with brain arteriovenous malformation pathogenesis. *Am J Pathol* 176, 1018-1027.
- Su, Y. J., Lin, W. H., Chang, Y. W., Wei, K. C., Liang, C. L., Chen, S. C., and Lee, J. L. (2015). Polarized cell migration induces cancer type-specific CD133/integrin/Src/Akt/GSK3 β /beta-catenin signaling required for maintenance of cancer stem cell properties. *Oncotarget* 6, 38029-38045.

- Sullivan, B. P., Weinreb, P. H., Violette, S. M., and Luyendyk, J. P. (2010). The coagulation system contributes to alphaVbeta6 integrin expression and liver fibrosis induced by cholestasis. *Am J Pathol* 177, 2837-2849.
- Tabatabai, G., Weller, M., Nabors, B., Picard, M., Reardon, D., Mikkelsen, T., Ruegg, C., and Stupp, R. (2010). Targeting integrins in malignant glioma. *Target Oncol* 5, 175-181.
- Taddei, M. L., Giannoni, E., Fiaschi, T., and Chiarugi, P. (2012). Anoikis: an emerging hallmark in health and diseases. *J Pathol* 226, 380-393.
- Taga, T., Suzuki, A., Gonzalez-Gomez, I., Gilles, F. H., Stins, M., Shimada, H., Barsky, L., Weinberg, K. I., and Laug, W. E. (2002). alpha v-Integrin antagonist EMD 121974 induces apoptosis in brain tumor cells growing on vitronectin and tenascin. *Int J Cancer* 98, 690-697.
- Takada, Y., Ye, X., and Simon, S. (2007). The integrins. *Genome Biol* 8, 215.
- Tamura, K., Aoyagi, M., Ando, N., Ogishima, T., Wakimoto, H., Yamamoto, M., and Ohno, K. (2013). Expansion of CD133-positive glioma cells in recurrent de novo glioblastomas after radiotherapy and chemotherapy. *J Neurosurg* 119, 1145-1155.
- Tang, D. G. (2012). Understanding cancer stem cell heterogeneity and plasticity. *Cell Res* 22, 457-472.
- TCGA, C. G. A. R. N. (2008). Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 455, 1061-1068.
- Tchaicha, J. H., Reyes, S. B., Shin, J., Hossain, M. G., Lang, F. F., and McCarty, J. H. (2011). Glioblastoma angiogenesis and tumor cell invasiveness are differentially regulated by beta8 integrin. *Cancer Res* 71, 6371-6381.
- Thakkar, J. P., Dolecek, T. A., Horbinski, C., Ostrom, Q. T., Lightner, D. D., Barnholtz-Sloan, J. S., and Villano, J. L. (2014). Epidemiologic and Molecular Prognostic Review of Glioblastoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*.
- Thomas, T. M., and Yu, J. S. (2017). Metabolic regulation of glioma stem-like cells in the tumor micro-environment. *Cancer Lett* 408, 174-181.
- Tohma, Y., Gratas, C., Biernat, W., Peraud, A., Fukuda, M., Yonekawa, Y., Kleihues, P., and Ohgaki, H. (1998). PTEN (MMAC1) mutations are frequent in primary glioblastomas (de novo) but not in secondary glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 57, 684-689.
- Touat, M., Idbaih, A., Sanson, M., and Ligon, K. L. (2017). Glioblastoma targeted therapy: updated approaches from recent biological insights. *Ann Oncol* 28, 1457-1472.
- Trajkovic-Arsic, M., Mohajerani, P., Sarantopoulos, A., Kalideris, E., Steiger, K., Esposito, I., Ma, X., Themelis, G., Burton, N., Michalski, C. W., *et al.* (2014). Multimodal molecular imaging of integrin alphavbeta3 for in vivo detection of pancreatic cancer. *J Nucl Med* 55, 446-451.
- Travis, M. A., Reizis, B., Melton, A. C., Masteller, E., Tang, Q., Proctor, J. M., Wang, Y., Bernstein, X., Huang, X., Reichardt, L. F., *et al.* (2007). Loss of integrin alpha(v)beta8 on dendritic cells causes autoimmunity and colitis in mice. *Nature* 449, 361-365.
- Turpin, A., Sharif, A., Stoven, L., Blond, S., Maurage, C. A., and Le Rhun, E. (2015). [The stem cell niche in glioblastoma: from fundamental aspects to targeted therapies]. *Bulletin du cancer* 102, 24-33.
- Uhlen, M., Fagerberg, L., Hallstrom, B. M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, A., Kampf, C., Sjostedt, E., Asplund, A., *et al.* (2015). Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* 347, 1260419.
- Ulasov, I. V., Nandi, S., Dey, M., Sonabend, A. M., and Lesniak, M. S. (2011). Inhibition of Sonic hedgehog and Notch pathways enhances sensitivity of CD133(+) glioma stem cells to temozolomide therapy. *Molecular medicine* 17, 103-112.
- Vaillant, F., Asselin-Labat, M. L., Shackleton, M., Forrest, N. C., Lindeman, G. J., and Visvader, J. E. (2008). The mammary progenitor marker CD61/beta3 integrin identifies cancer stem cells in mouse models of mammary tumorigenesis. *Cancer Res* 68, 7711-7717.

- van der Flier, A., and Sonnenberg, A. (2001). Function and interactions of integrins. *Cell and tissue research* 305, 285-298.
- Vansteenkiste, J., Barlesi, F., Waller, C. F., Bennouna, J., Gridelli, C., Goekkurt, E., Verhoeven, D., Szczesna, A., Feurer, M., Milanowski, J., *et al.* (2015). 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* 26, 1734-1740.
- Vartanian, A., Singh, S. K., Agnihotri, S., Jalali, S., Burrell, K., Aldape, K. D., and Zadeh, G. (2014). GBM's multifaceted landscape: highlighting regional and microenvironmental heterogeneity. *Neuro Oncol* 16, 1167-1175.
- Veeravagu, A., Liu, Z., Niu, G., Chen, K., Jia, B., Cai, W., Jin, C., Hsu, A. R., Connolly, A. J., Tse, V., *et al.* (2008). Integrin alphavbeta3-targeted radioimmunotherapy of glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res* 14, 7330-7339.
- Veeravalli, K. K., Ponnala, S., Chetty, C., Tsung, A. J., Gujrati, M., and Rao, J. S. (2012). Integrin alpha9beta1-mediated cell migration in glioblastoma via SSAT and Kir4.2 potassium channel pathway. *Cell Signal* 24, 272-281.
- Vehlow, A., and Cordes, N. (2013). Invasion as target for therapy of glioblastoma multiforme. *Biochim Biophys Acta* 1836, 236-244.
- Vehlow, A., Klapproth, E., Storch, K., Dickreuter, E., Seifert, M., Dietrich, A., Butof, R., Temme, A., and Cordes, N. (2017). Adhesion- and stress-related adaptation of glioma radiochemoresistance is circumvented by beta1 integrin/JNK co-targeting. *Oncotarget*.
- Velpula, K. K., Rehman, A. A., Chelluboina, B., Dasari, V. R., Gondi, C. S., Rao, J. S., and Veeravalli, K. K. (2012). Glioma stem cell invasion through regulation of the interconnected ERK, integrin alpha6 and N-cadherin signaling pathway. *Cell Signal* 24, 2076-2084.
- Venere, M., Hamerlik, P., Wu, Q., Rasmussen, R. D., Song, L. A., Vasanji, A., Tenley, N., Flavahan, W. A., Hjelmeland, A. B., Bartek, J., and Rich, J. N. (2013). Therapeutic targeting of constitutive PARP activation compromises stem cell phenotype and survival of glioblastoma-initiating cells. *Cell Death Differ* 21, 258-269.
- Verhaak, R. G., Hoadley, K. A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M. D., Miller, C. R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J. P., *et al.* (2010). Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 17, 98-110.
- Veringa, S. J., Biesmans, D., van Vuurden, D. G., Jansen, M. H., Wedekind, L. E., Horsman, I., Wesseling, P., Vandertop, W. P., Noske, D. P., Kaspers, G. J., and Hulleman, E. (2013). In vitro drug response and efflux transporters associated with drug resistance in pediatric high grade glioma and diffuse intrinsic pontine glioma. *PLoS One* 8, e61512.
- Virga, J., Bogнар, L., Hortobagyi, T., Zahuczky, G., Csosz, E., Kallo, G., Toth, J., Hutoczki, G., Remenyi-Puskar, J., Steiner, L., and Klekner, A. (2017). Prognostic Role of the Expression of Invasion-Related Molecules in Glioblastoma. *Journal of neurological surgery Part A, Central European neurosurgery* 78, 12-19.
- Visvader, J. E. (2011). Cells of origin in cancer. *Nature* 469, 314-322.
- Vizkeleti, L., Kiss, T., Koroknai, V., Ecsedi, S., Papp, O., Szasz, I., Adany, R., and Balazs, M. (2017). Altered integrin expression patterns shown by microarray in human cutaneous melanoma. *Melanoma Res* 27, 180-188.
- Vlashi, E., Lagadec, C., Vergnes, L., Matsutani, T., Masui, K., Poulou, M., Popescu, R., Della Donna, L., Evers, P., Dekmezian, C., *et al.* (2011). Metabolic state of glioma stem cells and nontumorigenic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 16062-16067.
- von Lampe, B., Stallmach, A., and Riecken, E. O. (1993). Altered glycosylation of integrin adhesion molecules in colorectal cancer cells and decreased adhesion to the extracellular matrix. *Gut* 34, 829-836.

- Wachsberger, P., Burd, R., and Dicker, A. P. (2004). Improving tumor response to radiotherapy by targeting angiogenesis signaling pathways. *Hematol Oncol Clin North Am* 18, 1039-1057, viii.
- Walker, M. D., Alexander, E., Jr., Hunt, W. E., MacCarty, C. S., Mahaley, M. S., Jr., Mealey, J., Jr., Norrell, H. A., Owens, G., Ransohoff, J., Wilson, C. B., *et al.* (1978). Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial. *J Neurosurg* 49, 333-343.
- Wang, J., Wakeman, T. P., Lathia, J. D., Hjelmeland, A. B., Wang, X. F., White, R. R., Rich, J. N., and Sullenger, B. A. (2010a). Notch promotes radioresistance of glioma stem cells. *Stem cells* 28, 17-28.
- Wang, P., Ballestrem, C., and Streuli, C. H. (2011). The C terminus of talin links integrins to cell cycle progression. *J Cell Biol* 195, 499-513.
- Wang, Q., Hu, B., Hu, X., Kim, H., Squatrito, M., Scarpace, L., deCarvalho, A. C., Lyu, S., Li, P., Li, Y., *et al.* (2017). Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment. *Cancer Cell* 32, 42-56 e46.
- Wang, R., Chadalavada, K., Wilshire, J., Kowalik, U., Hovinga, K. E., Geber, A., Fligelman, B., Leversha, M., Brennan, C., and Tabar, V. (2010b). Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. *Nature* 468, 829-833.
- Wang, W. W., Wang, Y. B., Wang, D. Q., Lin, Z., and Sun, R. J. (2015). Integrin beta-8 (ITGB8) silencing reverses gefitinib resistance of human hepatic cancer HepG2/G cell line. *International journal of clinical and experimental medicine* 8, 3063-3071.
- Watanabe, K., Tachibana, O., Sata, K., Yonekawa, Y., Kleihues, P., and Ohgaki, H. (1996). Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol* 6, 217-223; discussion 223-214.
- Wee, B., Pietras, A., Ozawa, T., Bazzoli, E., Podlaha, O., Antczak, C., Westermarck, B., Nelander, S., Uhrbom, L., Forsberg-Nilsson, K., *et al.* (2016). ABCG2 regulates self-renewal and stem cell marker expression but not tumorigenicity or radiation resistance of glioma cells. *Scientific reports* 6, 25956.
- Wegener, K. L., Partridge, A. W., Han, J., Pickford, A. R., Liddington, R. C., Ginsberg, M. H., and Campbell, I. D. (2007). Structural basis of integrin activation by talin. *Cell* 128, 171-182.
- Wei, J., Barr, J., Kong, L. Y., Wang, Y., Wu, A., Sharma, A. K., Gumin, J., Henry, V., Colman, H., Priebe, W., *et al.* (2010). Glioblastoma cancer-initiating cells inhibit T-cell proliferation and effector responses by the signal transducers and activators of transcription 3 pathway. *Mol Cancer Ther* 9, 67-78.
- Weller, M., Nabors, L. B., Gorlia, T., Leske, H., Rushing, E., Bady, P., Hicking, C., Perry, J., Hong, Y. K., Roth, P., *et al.* (2016). Cilengitide in newly diagnosed glioblastoma: biomarker expression and outcome. *Oncotarget* 7, 15018-15032.
- Weller, M., van den Bent, M., Hopkins, K., Tonn, J. C., Stupp, R., Falini, A., Cohen-Jonathan-Moyal, E., Frappaz, D., Henriksson, R., Balana, C., *et al.* (2014). EANO guideline for the diagnosis and treatment of anaplastic gliomas and glioblastoma. *Lancet Oncol* 15, e395-e403.
- Wen, P. Y., and Kesari, S. (2008). Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med* 359, 492-507.
- Westphal, M., Hilt, D. C., Bortey, E., Delavault, P., Olivares, R., Warnke, P. C., Whittle, I. R., Jaaskelainen, J., and Ram, Z. (2003). A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. *Neuro Oncol* 5, 79-88.
- Wick, W., Gorlia, T., Bady, P., Platten, M., van den Bent, M. J., Taphoorn, M. J., Steuve, J., Brandes, A. A., Hamou, M. F., Wick, A., *et al.* (2016). Phase II Study of Radiotherapy and Temozolomide versus Radiochemotherapy with Temozolomide in Patients with Newly

- Diagnosed Glioblastoma without MGMT Promoter Hypermethylation (EORTC 26082). *Clin Cancer Res* 22, 4797-4806.
- Wick, W., Weller, M., Weiler, M., Batchelor, T., Yung, A. W., and Platten, M. (2011). Pathway inhibition: emerging molecular targets for treating glioblastoma. *Neuro Oncol* 13, 566-579.
- Wild-Bode, C., Weller, M., Rimmer, A., Dichgans, J., and Wick, W. (2001). Sublethal irradiation promotes migration and invasiveness of glioma cells: implications for radiotherapy of human glioblastoma. *Cancer Res* 61, 2744-2750.
- Wolbers, J. G. (2014). Novel strategies in glioblastoma surgery aim at safe, supra-maximum resection in conjunction with local therapies. *Chin J Cancer* 33, 8-15.
- Woodworth, G. F., Dunn, G. P., Nance, E. A., Hanes, J., and Brem, H. (2014). Emerging insights into barriers to effective brain tumor therapeutics. *Front Oncol* 4, 126.
- Worthington, J. J., Kelly, A., Smedley, C., Bauche, D., Campbell, S., Marie, J. C., and Travis, M. A. (2015). Integrin alphavbeta8-Mediated TGF-beta Activation by Effector Regulatory T Cells Is Essential for Suppression of T-Cell-Mediated Inflammation. *Immunity* 42, 903-915.
- Wrensch, M., Minn, Y., Chew, T., Bondy, M., and Berger, M. S. (2002). Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. *Neuro Oncol* 4, 278-299.
- Wu, A., Wei, J., Kong, L. Y., Wang, Y., Priebe, W., Qiao, W., Sawaya, R., and Heimberger, A. B. (2010). Glioma cancer stem cells induce immunosuppressive macrophages/microglia. *Neuro Oncol* 12, 1113-1125.
- Wu, L., Yang, L., Xiong, Y., Guo, H., Shen, X., Cheng, Z., Zhang, Y., Gao, Z., and Zhu, X. (2014). Annexin A5 promotes invasion and chemoresistance to temozolomide in glioblastoma multiforme cells. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 35, 12327-12337.
- Wurth, R., Bajetto, A., Harrison, J. K., Barbieri, F., and Florio, T. (2014). CXCL12 modulation of CXCR4 and CXCR7 activity in human glioblastoma stem-like cells and regulation of the tumor microenvironment. *Front Cell Neurosci* 8, 144.
- Xu, Z., and Wu, R. (2012). Alteration in metastasis potential and gene expression in human lung cancer cell lines by ITGB8 silencing. *Anat Rec (Hoboken)* 295, 1446-1454.
- Yahyanejad, S., King, H., Iglesias, V. S., Granton, P. V., Barbeau, L. M., van Hoof, S. J., Groot, A. J., Habets, R., Prickaerts, J., Chalmers, A. J., *et al.* (2016). NOTCH blockade combined with radiation therapy and temozolomide prolongs survival of orthotopic glioblastoma. *Oncotarget* 7, 41251-41264.
- Yan, G. N., Yang, L., Lv, Y. F., Shi, Y., Shen, L. L., Yao, X. H., Guo, Q. N., Zhang, P., Cui, Y. H., Zhang, X., *et al.* (2014). Endothelial cells promote stem-like phenotype of glioma cells through activating the Hedgehog pathway. *J Pathol* 234, 11-22.
- Yanagihara, T. K., Saadatmand, H. J., and Wang, T. J. (2016). Reevaluating stereotactic radiosurgery for glioblastoma: new potential for targeted dose-escalation. *Journal of neuro-oncology* 130, 397-411.
- Yang, L., Lin, C., Wang, L., Guo, H., and Wang, X. (2012). Hypoxia and hypoxia-inducible factors in glioblastoma multiforme progression and therapeutic implications. *Exp Cell Res* 318, 2417-2426.
- Yao, K. C., Komata, T., Kondo, Y., Kanzawa, T., Kondo, S., and Germano, I. M. (2003). Molecular response of human glioblastoma multiforme cells to ionizing radiation: cell cycle arrest, modulation of the expression of cyclin-dependent kinase inhibitors, and autophagy. *J Neurosurg* 98, 378-384.
- Yao, X., Ping, Y., Liu, Y., Chen, K., Yoshimura, T., Liu, M., Gong, W., Chen, C., Niu, Q., Guo, D., *et al.* (2013). Vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2) plays a key role in vasculogenic mimicry formation, neovascularization and tumor initiation by Glioma stem-like cells. *PLoS One* 8, e57188.

- Yu, S. P., Yang, X. J., Zhang, B., Ming, H. L., Chen, C., Ren, B. C., Liu, Z. F., and Liu, B. (2011). Enhanced invasion in vitro and the distribution patterns in vivo of CD133+ glioma stem cells. *Chin Med J (Engl)* *124*, 2599-2604.
- Yuan, X., Curtin, J., Xiong, Y., Liu, G., Waschmann-Hogiu, S., Farkas, D. L., Black, K. L., and Yu, J. S. (2004). Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene* *23*, 9392-9400.
- Yung, W. K., Vredenburgh, J. J., Cloughesy, T. F., Nghiemphu, P., Klencke, B., Gilbert, M. R., Reardon, D. A., and Prados, M. D. (2010). Safety and efficacy of erlotinib in first-relapse glioblastoma: a phase II open-label study. *Neuro Oncol* *12*, 1061-1070.
- Zhang, C., and Zhu, Q. X. (2017). Allergy is associated with reduced risk of glioma: A meta-analysis. *Allergologia et immunopathologia* *45*, 553-559.
- Zhang, L., and Ten Hagen, K. G. (2011). The cellular microenvironment and cell adhesion: a role for O-glycosylation. *Biochem Soc Trans* *39*, 378-382.
- Zhang, M., and Chakravarti, A. (2006). Novel radiation-enhancing agents in malignant gliomas. *Semin Radiat Oncol* *16*, 29-37.
- Zhang, M., Ye, G., Li, J., and Wang, Y. (2015). Recent advance in molecular angiogenesis in glioblastoma: the challenge and hope for anti-angiogenic therapy. *Brain tumor pathology* *32*, 229-236.
- Zheng, Y., de la Cruz, C. C., Sayles, L. C., Alleyne-Chin, C., Vaka, D., Knaak, T. D., Bigos, M., Xu, Y., Hoang, C. D., Shrager, J. B., *et al.* (2013). A rare population of CD24(+)ITGB4(+)Notch(hi) cells drives tumor propagation in NSCLC and requires Notch3 for self-renewal. *Cancer Cell* *24*, 59-74.
- Zhou, J., Yi, L., Ouyang, Q., Xu, L., Cui, H., and Xu, M. (2014). Neurotensin signaling regulates stem-like traits of glioblastoma stem cells through activation of IL-8/CXCR1/STAT3 pathway. *Cell Signal* *26*, 2896-2902.
- Zhu, C. Q., Popova, S. N., Brown, E. R., Barsyte-Lovejoy, D., Navab, R., Shih, W., Li, M., Lu, M., Jurisica, I., Penn, L. Z., *et al.* (2007). Integrin alpha 11 regulates IGF2 expression in fibroblasts to enhance tumorigenicity of human non-small-cell lung cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 11754-11759.
- Zhu, J., Motejlek, K., Wang, D., Zang, K., Schmidt, A., and Reichardt, L. F. (2002). beta8 integrins are required for vascular morphogenesis in mouse embryos. *Development* *129*, 2891-2903.
- Zhu, T. S., Costello, M. A., Talsma, C. E., Flack, C. G., Crowley, J. G., Hamm, L. L., He, X., Hervey-Jumper, S. L., Heth, J. A., Muraszko, K. M., *et al.* (2011). Endothelial cells create a stem cell niche in glioblastoma by providing NOTCH ligands that nurture self-renewal of cancer stem-like cells. *Cancer Res* *71*, 6061-6072.
- Zussman, B. M., and Engh, J. A. (2015). Outcomes of the ACT III Study: Rindopepimut (CDX-110) Therapy for Glioblastoma. *Neurosurgery* *76*, N17.