



HAL
open science

Hétérogénéité et plasticité de l'intégrine $\alpha 5$ dans les cellules souches de glioblastome

Mélissa Messé

► **To cite this version:**

Mélissa Messé. Hétérogénéité et plasticité de l'intégrine $\alpha 5$ dans les cellules souches de glioblastome. Cancer. Université de Strasbourg, 2023. Français. NNT : 2023STRAJ027 . tel-04547676

HAL Id: tel-04547676

<https://theses.hal.science/tel-04547676>

Submitted on 16 Apr 2024

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

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



École Doctorale
des Sciences de la Vie
et de la Santé
STRASBOURG



80/PRIME program

Laboratoire
de **bioimagerie et pathologies** | LBP
de l'Université de Strasbourg et du CNRS



UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

UMR7021 CNRS (LBP)

Équipe de recherche : Signalisation tumorale et cibles thérapeutiques

UMR7178 CNRS (IPHC)

Département de recherche : Radiologie, hadronthérapie et imagerie moléculaire

THÈSE

présentée par :

Mélissa MESSÉ

soutenue le 31 mars 2023

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

Discipline : Biologie cellulaire et cancérologie

Hétérogénéité et plasticité de l'intégrine $\alpha 5$ dans les cellules souches de glioblastome

Thèse dirigée par :

Mme Monique DONTENWILL

DR CNRS, UMR7021, Strasbourg

Thèse codirigée par :

Mr Patrice LAQUERRIERE

Pr Unistra, UMR7178, Strasbourg

Rapporteurs :

Mme Aurélie TCHOGHANDJIAN

CRCN CNRS, UMR7051, Marseille

Mr Samuel VALABLE

DR CNRS, UMR6301, Caen

Examineur interne :

Mme Dominique GUENOT

DR CNRS, INSERM U1113, Strasbourg

Examineur externe :

Mr Pierre-François CARTRON

CRCN INSERM, INSERM U1307, Nantes

*"La recherche est un long voyage,
et la persévérance est le moyen d'arriver à bon port."*

Robert Boyle

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier ma directrice de thèse, le Dr. Monique Dontenwill, pour sa rigueur et son expertise scientifique qui ont été une véritable source d'inspiration. Les questions "Qu'est-ce qu'on veut montrer ?" et "Quelle est la question qu'on se pose ?" que vous m'avez apprises à me poser, me guideront tout au long de ma carrière de chercheuse. Je vous suis également reconnaissante pour tout le temps que vous avez consacré à m'accompagner et à me guider, mais surtout pour la correction de ma thèse, malgré un programme bien chargé, vous avez toujours su vous rendre disponible. Enfin, je tiens à vous remercier pour les petites attentions déposées sur nos bureaux, qui ont égayé nos journées au labo.

Je remercie également mon co-directeur de thèse, le Pr. Patrice Laquerrière, de m'avoir accueillie au sein de la DRHIM Team et de m'avoir donné l'opportunité d'élargir mes connaissances scientifiques.

Je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse, le Dr. Aurélie Tchoghandjian, le Dr. Samuel Valable, le Dr. Pierre-François Cartron et le Dr. Dominique Guenot, pour avoir accepté de faire partie de mon jury et pour le temps que vous avez consacré à l'évaluation de mon travail.

Merci au CNRS d'avoir financé ma thèse *via* le programme 80/Prime. Merci également au Rotary Club pour leur soutien financier, ainsi qu'à la Ligue contre le Cancer et à l'Institut National du Cancer.

Merci à tous nos collaborateurs. Je remercie en particulier le Pr. Mohamed Elati pour sa collaboration et de m'avoir permise de participer à la caractérisation d'un réseau de régulateurs qui s'est avéré très prometteur pour l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

Un grand merci à Patrice Marchand, Lionel Thomas et Bruno Jessel pour leur aide précieuse lors des manip *in vivo* en imagerie TEP. Merci pour votre bonne humeur toujours au rendez-vous qui a rendu ces interminables journées d'imagerie TEP beaucoup plus agréables. Nos longues conversations sur notre passion commune pour la nourriture et nos envies culinaires du moment nous auront bien fait saliver.

Merci au Dr. Sophie Martin pour m'avoir écoutée râler quand mes manips ne fonctionnaient pas, la faute à des cellules souches capricieuses. Merci également de m'avoir écoutée, conseillée et surtout rassurée sur mes préoccupations concernant le monde de l'après-thèse.

Un énorme merci à toute l'équipe LBP pour tout le soutien apporté durant ma thèse. Merci au Dr. Nelly Etienne-Selloum pour m'avoir conseillée au sujet de mes marquages IF pour les cerveaux. Merci au Dr. Véronique Bruban d'avoir pris le temps de corriger mon « matériels et méthodes ». Merci au Pr. Natacha Entz-Werle pour son point de vue clinique sur la recherche qui apporte un nouveau regard. Merci au Dr. Damien Reita pour son aide dans les analyses transcriptomiques. Merci à Ingrid pour ta disponibilité face à mes demandes administratives ainsi que pour ton écoute. Merci à toi, Omblin, pour ta bonne humeur quotidienne au labo et pour nos très longues conversations existentielles entre deux manips. Merci aux nouveaux arrivants, Thibaut, Marlène, Clémence, Yuri et Ronan pour votre soutien en cette fin de thèse stressante et pour votre positivité qui fait du bien au moral.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude envers Sophie F. pour son soutien indéfectible tout au long de ma thèse. Merci pour ton écoute, pour m'avoir rassurée et pour m'avoir remonté le moral pendant les moments difficiles. Un énorme merci pour ton aide quotidienne au labo, pour tous les conseils que tu as pu me donner et pour toutes tes petites astuces techniques que j'utiliserai tout au long de ma carrière de chercheuse. Encore merci pour tout.

Je tiens également à remercier le Dr. Jérôme Terrand pour avoir répondu à mes nombreuses questions existentielles tout au long de ma thèse, ainsi que pour tes précieux conseils. Merci pour ces conversations et débats pendant la pause repas qui m'ont permis de me changer les idées le temps d'une pause.

Merci à toi Aude pour m'avoir fait revenir à la réalité quand il le fallait.

Merci à Lazare pour ton soutien et tes conseils qui m'ont beaucoup aidé pour finaliser la rédaction de ma thèse. Merci à Antoine pour ton soutien pendant cette fin de thèse.

Merci à Magalie et Candice pour nos petites sessions shopping et nos séances de cinéma qui m'ont permises de décompresser. Merci pour votre soutien et votre bonne humeur.

Merci à Tania, Emmanuel, Manon, Romain, Anne, Albane, Elisabete et Bastien pour notre petit tour du monde gastronomique qui fait toujours plaisir aux papilles. Merci pour ces bons moments, votre bonne humeur et surtout pour votre soutien.

Je remercie également Marion d'avoir été ma partenaire de galères que nous avons partagées durant cette thèse. Merci pour tous ces fous rires et moments passés ensemble, à me raconter toutes tes péripéties tellement improbables. Merci pour ton soutien et tes encouragements, tu as toujours su me rappeler que j'étais capable d'y arriver. Ta détermination à surmonter toutes les épreuves est une réelle source d'inspiration. Je suis très heureuse de t'avoir comme amie.

Un grand merci à mes deux anciens partenaires de thèse, Quentin et Marina, alias la Team HIFs. Vous êtes les premiers à m'avoir accueillie au labo. Vous avez été là et vous êtes toujours présents pour m'aiguiller et me conseiller. Merci à vous deux pour votre grand soutien durant ma thèse. Marina, merci d'être toujours présente pour moi. Tu es plus qu'une collègue, tu es une amie avec qui je peux parler de tout et de rien pendant des heures et sans aucun jugement.

Chloé, je ne t'ai pas oubliée, mon acolyte et partenaire de thèse. Tu as été d'un grand soutien pour moi, ma thèse ne serait pas la même sans toi. Merci de m'avoir supportée lors de mes moments de stress et de mes pétages de plombs pendant ma thèse. Tu as toujours su me redonner le sourire et me booster. Ta franchise et ton honnêteté font de toi quelqu'un que j'apprécie beaucoup. Merci pour tous ces délires et moments passés ensemble. Tu es devenue pour moi une amie. Ne t'inquiète pas pour la fin de ta thèse, tu vas y arriver et quoi qu'il arrive, tu n'es pas seule. Je serai toujours là pour te soutenir, même si je ne suis plus au labo.

Merci à l'INP, mon premier laboratoire d'accueil qui m'a fait découvrir la recherche. Merci au Dr. Ludovic Leloup, au Dr. Alessandra Pagano et au Dr. Françoise Garrouste de m'avoir appris les bases de la recherche, mais également d'avoir cru en moi. Un grand merci à Mathieu Chocry, qui m'a donné envie de faire de la recherche et qui m'a fait aimer la recherche. Tu as cru en moi dès le début et m'as pris sous ton aile. Je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu as fait pour moi. Pour tout ça, merci beaucoup.

Merci à Émilie, mon amie depuis toujours, qui, même de loin, me soutient et est toujours là pour moi.

Un énorme merci à Prescillia, Alex, Valentin, Jean-Yves et Corinne. Vous avoir à mes côtés a été un énorme soutien pour moi. Votre présence, vos encouragements et votre bienveillance ont été une véritable source de motivation. Merci beaucoup pour tous ces bons moments passés ensemble. Vous m'avez tellement apporté. Jean-Yves et Corinne, vous avez été bien plus que de simples propriétaires pendant ces années de thèse. Vous m'avez accueillie à bras ouverts, moi la petite Marseillaise qui débarquait à Strasbourg. Vous avez pris soin de moi et vous m'avez soutenue dans tous les aspects de ma vie. Vous êtes devenus une seconde famille pour moi et je ne pourrai jamais assez vous remercier pour votre soutien.

Enfin, je tiens à remercier mes très chers parents et mon petit frère. Merci pour votre soutien inconditionnel tout au long de mon parcours qui m'a mené jusqu'à la thèse. Votre écoute et vos encouragements ont été d'une grande aide dans les moments difficiles. Je n'aurais jamais pu imaginer arriver là où j'en suis aujourd'hui, sans votre soutien constant et votre amour infaillible. Vous avez été là pour moi à chaque étape, m'aidant à surmonter tous les obstacles (et punaise qu'il y en avait...) et à trouver la force de persévérer. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir accompagné tout au long de mes longues années d'études. Un infini merci pour tout.

Table des matières

Remerciements	- 6 -
Table des matières	- 12 -
Liste des figures	- 18 -
Liste des tableaux	- 20 -
Liste des abréviations	- 22 -
Introduction	- 26 -
I. Le glioblastome	- 28 -
1. Définition et épidémiologie.....	- 28 -
2. Diagnostic et suivi thérapeutique.....	- 30 -
a. Signes Cliniques.....	- 30 -
b. Imagerie.....	- 30 -
c. Biopsie.....	- 35 -
3. Facteurs de risque.....	- 36 -
a. Rayonnement ionisant.....	- 36 -
b. Croissance.....	- 36 -
c. Sommeil et mélatonine.....	- 37 -
4. Classification OMS.....	- 37 -
5. Classifications moléculaires.....	- 39 -
a. Classification de Verhaak.....	- 39 -
b. Classification de Nefitel.....	- 41 -
6. Altérations moléculaires du GBM.....	- 42 -
a. Statut IDH.....	- 42 -
b. Méthylation du promoteur du gène MGMT.....	- 43 -
c. Mutation du promoteur du gène pTERT.....	- 43 -
d. Altérations chromosomiques.....	- 43 -
e. Amplification de l'EGFR.....	- 44 -
f. Mutation du gène PTEN.....	- 44 -
g. Mutation du gène TP53.....	- 45 -
7. Traitement.....	- 45 -
a. Protocole de Stupp.....	- 45 -
b. Bévacicumab.....	- 46 -
c. TTFIELDS.....	- 47 -
d. Thérapies ciblées.....	- 49 -
e. Immunothérapies.....	- 50 -
8. Résistances thérapeutiques.....	- 51 -
II. Cellules souches de glioblastome	- 52 -
1. Cellules souches neurales.....	- 52 -

2.	Transformation des CSN en cellules souches cancéreuses	- 52 -
3.	Caractéristiques des CSG	- 53 -
a.	Auto-renouvellement	- 54 -
b.	Différenciation	- 54 -
c.	Tumorigenèse	- 55 -
d.	Expression de marqueurs de CSG	- 55 -
4.	Localisation préférentielle des CSG	- 56 -
a.	Niches périvasculaires	- 57 -
b.	Niches hypoxiques	- 59 -
5.	Plasticité et hétérogénéité	- 61 -
6.	CSG et résistance thérapeutique	- 64 -
a.	Chimiorésistance.....	- 64 -
b.	Radiorésistance	- 64 -
c.	L'hypoxie, un facteur clé de résistance pour les CSG.....	- 66 -
III. Cible thérapeutique, l'intégrine $\alpha 5\beta 1$.....		- 67 -
1.	Généralité.....	- 67 -
2.	Activation et changement conformationnel des intégrines.....	- 68 -
a.	Liaison des ligands aux intégrines	- 68 -
b.	Changement conformationnel des intégrines.....	- 69 -
3.	Fonctions biologiques et rôles des intégrines	- 71 -
a.	L'adhérence cellulaire.....	- 72 -
b.	La migration cellulaire et l'invasion tumorale.....	- 72 -
c.	La prolifération cellulaire	- 73 -
d.	La survie cellulaire.....	- 73 -
e.	L'angiogenèse.....	- 73 -
f.	Le métabolisme.....	- 74 -
g.	L'auto-renouvellement des cellules souches	- 74 -
4.	Intégrines et cancer.....	- 74 -
5.	L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans le GBM	- 77 -
a.	Intégrine $\alpha 5\beta 1$ et angiogenèse.....	- 80 -
b.	Intégrine $\alpha 5\beta 1$ et progression tumorale	- 80 -
c.	Intégrine $\alpha 5\beta 1$ et résistance thérapeutique.....	- 81 -
6.	Cible thérapeutique.....	- 81 -
a.	Peptides antagonistes des intégrines	- 82 -
b.	Petites molécules non peptidiques	- 83 -
Objectif de l'étude		- 86 -
Matériels et Méthodes		- 88 -
I. Culture cellulaire		- 90 -
1.	Culture des CSG	- 90 -

2.	Culture des cellules différenciées	- 91 -
3.	Culture des cellules en condition hypoxique	- 91 -
II. Étude du niveau d'expression de nos protéines d'intérêts et de la localisation de l'intégrine $\alpha 5$..... - 91 -		
1.	Western blot.....	- 91 -
2.	Cytométrie en flux (FACS)	- 93 -
3.	Fractionnement des compartiments cellulaires.....	- 94 -
III. Étude de l'inhibition spécifique des HIFs..... - 96 -		
1.	Préparation des drogues.....	- 96 -
2.	Transfection des cellules	- 96 -
IV. Analyses transcriptomiques..... - 97 -		
1.	RT-qPCR	- 97 -
2.	Analyse d'enrichissement des gènes.....	- 98 -
V. Étude phénotypique des cellules souches de GBM..... - 98 -		
1.	Étude de la prolifération cellulaire par la technologie Incucyte.....	- 98 -
2.	Évaluation de l'invasion cellulaire	- 99 -
VI. Étude de la croissance tumorale <i>in vivo</i>..... - 100 -		
1.	Xéno greffe hétérotopique.....	- 100 -
2.	Xéno greffe orthotopique.....	- 100 -
3.	Imagerie TEP	- 101 -
VII. Immunofluorescence		
1.	Immunomarquage cellulaire	- 102 -
2.	Immunomarquage sur tissu inclu en paraffine	- 103 -
VIII. Analyses statistiques		
Résultats..... - 106 -		
1^{ère} partie : Étude de l'intégrine $\alpha 5$ dans les cellules souches de glioblastome..... - 108 -		
I. Publication 1..... - 110 -		
1.	Résumé	- 110 -
II. Résultats supplémentaires (suite publication 1)		
1.	Introduction	- 144 -
2.	Un réseau de régulateurs spécifique des GBM.....	- 146 -
3.	Régulation de l'intégrine $\alpha 5$	- 148 -
4.	Étude après différenciation.....	- 152 -
5.	Études <i>in vivo</i> par TEP	- 154 -
6.	Discussion et perspectives.....	- 157 -

2^{ème} partie : Étude de l'intégrine $\alpha 5$ dans des lignées résistantes au témozolomide .	- 164 -
I. Publication 2.....	- 166 -
1. Résumé	- 166 -
II. Résultats supplémentaires (suite publication 2)	- 192 -
1. Introduction	- 192 -
2. Étude de la croissance tumorale <i>in vivo</i> des lignées U87MG sensibles et résistantes au TMZ par xénogreffes hétérotopiques.	- 194 -
3. Étude de la croissance tumorale <i>in vivo</i> des lignées U87MG sensibles et résistantes au TMZ par xénogreffe orthotopique.	- 198 -
4. Données transcriptomiques et réseau de régulateurs.....	- 200 -
5. Discussion et perspectives	- 201 -
Conclusion Générale	- 204 -
Bibliographie.....	- 206 -
Annexes	- 240 -
Annexe 1	- 242 -
Annexe 2	- 268 -
Annexe 3	- 284 -
Annexe 4	- 302 -

Liste des figures

Figure 1 : Les différentes caractéristiques des GBM participant à son importante agressivité tumorale [15].	- 29 -
Figure 2 : Schématisation des principaux radiotraceurs utilisés en imagerie nucléaire pour les gliomes selon leurs caractéristiques [22].	- 31 -
Figure 3 : Altération moléculaire principalement utilisée pour le diagnostic des gliomes selon la classification de l’OMS de 2021 [67].	- 39 -
Figure 4 : Classification de Verhaak selon différentes altérations génomiques.	- 40 -
Figure 5 : Combinaison des différents mécanismes d’action du TTFIELDS [123].	- 48 -
Figure 6 : Modèles hiérarchiques des CSN et des CSG [150].	- 53 -
Figure 7 : Caractéristiques fonctionnelles des CSG [79].	- 53 -
Figure 8 : Représentation schématique de la composition d’une tumeur de GBM.	- 57 -
Figure 9 : Voie de signalisation de l’hypoxie en fonction du taux en oxygène.	- 60 -
Figure 10 : Modèles d’hétérogénéité tumorale.	- 62 -
Figure 11 : Schématisation de la plasticité des cellules souches neurales et de GBM.	- 63 -
Figure 12 : Représentation des 24 associations possibles d’intégrines classées en fonction de leur ligand [250].	- 68 -
Figure 13 : Illustration des différentes conformations adoptées par les intégrines.	- 70 -
Figure 14 : Interaction des intégrines avec différentes voies de signalisation.	- 71 -
Figure 15 : Interconnexions entre les différentes voies de signalisation et les intégrines.	- 75 -
Figure 16 : Heatmap de l’expression des intégrines en comparant des tissus cérébraux normaux par rapport à des échantillons de gliomes.	- 78 -
Figure 17 : Représentation schématique des 3 sites de liaison entre l’intégrine $\alpha5\beta1$ et la fibronectine pour une activation et une stabilisation de la forme active de cette intégrine.	- 79 -
Figure 18 : Structure des deux antagonistes de haute affinité pour l’intégrine $\alpha5\beta1$ [344].	- 84 -
Figure 19 : Schématisation du protocole à suivre pour la compartimentation cellulaire par le kit de Qiagen, Qproteome (37502).	- 95 -
Figure 20 : Schématisation de la technique de la goutte inversée pour la formation des sphères.	- 99 -
Figure 21 : Représentation schématique du protocole suivi pour les xénogreffes hétérotopiques.	- 100 -

Figure 22 : Représentation schématique du protocole suivi pour les xénogreffes orthotopiques.	- 101 -
Figure 23 : Un réseau de régulateurs spécifique des GBM.....	- 145 -
Figure 24 : Compétition entre HIF-2 α et AhR pour la dimérisation à l'ARNT.	- 147 -
Figure 25 : Impact de la différenciation des cellules souches.....	- 151 -
Figure 26 : Évaluation de la croissance tumorale par imagerie TEP.	- 153 -
Figure 27 : Structure chimique du composé 2 [366].....	- 158 -
Figure 28 : Structure chimique du PT2385 et du PT2977 [365].....	- 159 -
Figure 29 : Évaluation de la croissance tumorale <i>in vivo</i> par xénogreffe hétérotopique. -	193 -
Figure 30 : Évaluation de la croissance tumorale <i>in vivo</i> par xénogreffe orthotopique....	- 197 -
Figure 31 : Application des lignées U87MG sensibles et résistantes au TMZ au réseau de régulateurs.	- 199 -

Liste des tableaux

Tableau 1 : Avantages et inconvénients de chaque radiotracteur [22].	- 33 -
Tableau 2 : Liste des anticorps utilisés pour les expériences de western blot, FACS et immunofluorescence.	- 93 -
Tableau 3 : Liste des composés utilisés dans les expériences pour étudier l'inhibition des HIFs et induire une hypoxie chimique.	- 96 -
Tableau 4 : Liste des primers utilisés pour les RT-qPCR.	- 98 -

Liste des abréviations

2D :	2 dimensions
3D-MIP :	3 dimensions - maximum intensity projection
ABC :	Adenosine triphosphate binding cassette
AC :	Astrocytes like
ADN :	Acide désoxyribonucléique
AhR :	Aryl hydrocarbon receptor
AKT :	Protein kinase B
AMPK :	Adénosine monophosphate activated protein kinase
ARN :	Acide ribonucléique
ARNT :	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
ATM :	Ataxia Telangiectasia mutated
ATR :	Ataxia Telangiectasia and RAD3-related
ATRX :	Alpha-thalassémie/retard mental lié à l'X
BDNF :	Brain-Derived Neurotrophic Factor
BHE :	Barrière hémato-encéphalique
BMAL1 :	Brain and muscle ARNT-Like 1
BMP :	Bone Morphogenetic protein
BRAF :	V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
Ca²⁺ :	Calcium
CDK4 :	Cyclin dependent kinase 4
CDKN2A/B :	Cyclin dependent kinase inhibitor 2A/B
Chk1 / 2 :	Checkpoint kinase 1 / 2
CLOCK :	Circadian locomotor output cycles kaput
[¹¹C]-MET :	[¹¹ C]-méthionine
c-Myc :	MYC Proto-Oncogene (Myelocytomatosis)
CoCl₂	Chlorure de cobalt
CSC :	Cellules souches cancéreuses
CSG :	Cellules souches de glioblastome
CSN :	Cellules souches neurales
CTC :	Cellules tumorales circulantes
D-2HG :	D-2-hydroxuglutarate
DDR :	DNA Damage Response
DFO	Desferrioxamine
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
DPBS :	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EGF :	Epidermal Growth Factor
EGFR :	Epidermal growth factor receptor
EGFRvIII :	Epidermal growth factor receptor variant III
EPAS1 :	Endothelial PAS domain-containing protein 1
ERK :	Extracellular Signal-regulated Kinase
FACS :	Fluorescence-activated cell sorting

FDA :	Food and Drug Administration
[¹⁸F]-FDG :	2-[¹⁸ F]-fluoro-2-déoxy-D-glucose
[¹⁸F]-FDOPA :	3,4-dihydroxy-6-[¹⁸ F]-fluoro-L-phenylalanine
[¹⁸F]-FET :	[¹⁸ F]-fluoro-éthyl-L-tyrosine
FGF :	Fibroblast growth factor
FGFR1 :	Fibroblast growth factor receptors 1
FAK :	Focal adhesion kinase
[¹⁸F]-FLT :	[¹⁸ F]-fluoro-thymidine
[¹⁸F]-FMISO :	[¹⁸ F]-fluoro-misonidazole
Galc :	Galactocérébroside-C
GBM :	Glioblastome
GFAP :	Glial fibrillary acidic protein
GLUT :	Glucose transporter
GSEA	Gene Set Enrichment Analysis
GTPase :	Guanosine triphosphate phosphatase
HH :	Hedgehog
HIF-1α / 2α :	Hypoxia Inducible Factor-1 α / 2 α
HRE :	Hypoxia Responsive Element
IGFBP-2 :	Insulin like growth factor binding protein 2
IDH 1 / 2 :	Isocitrate dehydrogenase 1 / 2
ILK :	Integrin-linked kinase
IRM :	Imagerie par résonance magnétique
JAK :	Janus kinase
KRAS :	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LAT :	L-type / Large neural amino acid transporter
LT :	Lymphocyte T
MAPK :	Mitogen-Activated Protein Kinase
MDM2 :	Murine double minute 2
MDR :	Multi Drug Resistance
MEC :	Matrice extracellulaire
MES :	Mésenchymateux like
MGMT :	O6-méthylguanine-DNA méthyltransférase
MIDAS :	Metal ion dependent adhesion site
MMP9 :	Métalloprotéinase matricielle 9
NADPH :	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NF1 :	Neurofibromatose de type 1
NF-κB :	Nuclear factor-kappa B
NOD-SCID :	Nonobese diabetic-severe combined immunodeficiency
Notch 1 / 2 :	Neurogenic locus notch homolog protein 1 / 2
NPC-like :	Progéniteurs neuraux like
NTRK2 :	Neurotrophic receptor tyrosine kinase 2
O₂ :	Oxygène
Oct4 :	Octamer-binding transcription factor

OLIG2 :	Oligodendrocyte Transcription Factor 2
OMS :	Organisation mondiale de la santé
OPC-like :	Progéniteurs oligodendrocytaires like
PD-1 :	Programmed cell death protein-1
PDGFRA :	Platelet derived growth factor receptor alpha
PD-L1 :	Programmed death-ligand 1
PFA :	Paraformaldéhyde
PFS :	Progression-free survival
PHD :	Prolyl-hydroxylase
PHSRN :	Proline-Histidine-Sérine-Arginine-Asparagine
PI3K :	Phosphoinositide 3-kinase
PTEN :	Homologue de la phosphatase et de la tensine
pTERT :	Promoter Télomérase reverse-transcriptase
Ras :	Rat sarcoma virus
RB :	Retinoblastoma
RGD :	Arginine-Glycine-Asparagine
RNAseq :	RNA sequencing
ROS :	Reactive oxygen species
RTK :	Récepteur à activité tyrosine-kinase
Sox2 :	Sex determining region Y HMG-box 2
STAT :	Signal Transducers and Activators of Transcription
SVF :	Sérum de veau fœtal
TAM :	Tumor-associated macrophage
TCGA :	The Cancer Genome Atlas
TEM :	Transition épithélio-mésenchymateuse
TEP :	Tomographie par émission de positrons
TERT :	Télomérase reverse-transcriptase
TGF-β :	Transforming growth factor- β
TMZ :	Témozolomide
TNFα :	Tumor Necrosis Factor α
TP53 :	Tumor protein 53
TFields :	Alternating electric fields therapy
TUBB3 :	Tubulin beta 3 class III
TWIST1 :	Twist Family BHLH Transcription Factor 1
VEGF :	Vascular endothelial growth factor
VGF :	VGF nerve growth factor inducible
VHL :	Von Hippel-Lindau

Introduction

I. Le glioblastome

1. Définition et épidémiologie

Les tumeurs cérébrales résultent d'une prolifération anormale de cellules causée par une instabilité du génome qui est le résultat d'aberrations mutagènes dues à des facteurs de risque tels que les rayonnements ionisants. Les tumeurs cérébrales primitives se propagent très rarement dans d'autres parties du corps mais peuvent se propager dans d'autres régions du cerveau. Elles représentent 1,6% des cancers diagnostiqués chaque année et sont une source importante de morbidité et de mortalité dans le monde [1]. Les gliomes sont les tumeurs du système nerveux central les plus fréquentes chez l'adulte, ils représentent 80% des tumeurs malignes cérébrales. Ces tumeurs se développent à partir de cellules gliales et se distinguent en plusieurs classes selon des critères histologiques : les astrocytomes, les oligodendriomes et les oligoastrocytomes [2].

Les glioblastomes (GBM) représentent 57,7% des gliomes et sont les plus mortels et les plus agressifs [3, 4]. On observe une incidence de 3 à 5 / 100 000 cas par an avec une survie relative à 5 ans de 5% et une survie médiane de 15 à 17 mois [5, 6]. L'incidence des gliomes de haut grade est impactée par l'âge avec une majorité des cas qui surviennent chez des personnes de plus de 55 ans (90% des cas) [7]. Il a également été observé que la majorité des cas survient chez les hommes par rapport aux femmes (66,2 % chez les hommes contre 33,8% chez les femmes) [8–10]. Histologiquement, les GBM sont considérés comme des astrocytomes car ils ont une morphologie similaire aux astrocytes. Ce sont des tumeurs infiltrantes et diffuses, hautement prolifératives entraînant une progression rapide aboutissant à des zones de nécrose avec des signes de pseudopalissades cellulaires et une hyperplasie microvasculaire. Les foyers nécrotiques entourés de pseudopalissades sont la conséquence d'une hypoxie progressive au sein de la tumeur causée par la prolifération accrue des GBM. Ces foyers nécrotiques sont le signe d'une tumeur agressive et invasive [11, 12]. De plus, cette hypoxie progressive sera la conséquence d'une néoangiogenèse en stimulant la production de facteurs proangiogéniques tel que le VEGF (vascular endothelial growth factor). Cela provoquera une importante infiltration cellulaire du parenchyme cérébral sain. Ces propriétés histopathologiques caractérisent les GBM et permettent leur diagnostic [13, 14]. Les GBM présentent différentes caractéristiques soulignant leur agressivité telles que la chimiorésistance, une prolifération accrue, différentes altérations génomiques, une angiogenèse aberrante et anormale, la présence de cellules souches ou encore une invasion cellulaire importante (Figure 1) [15].

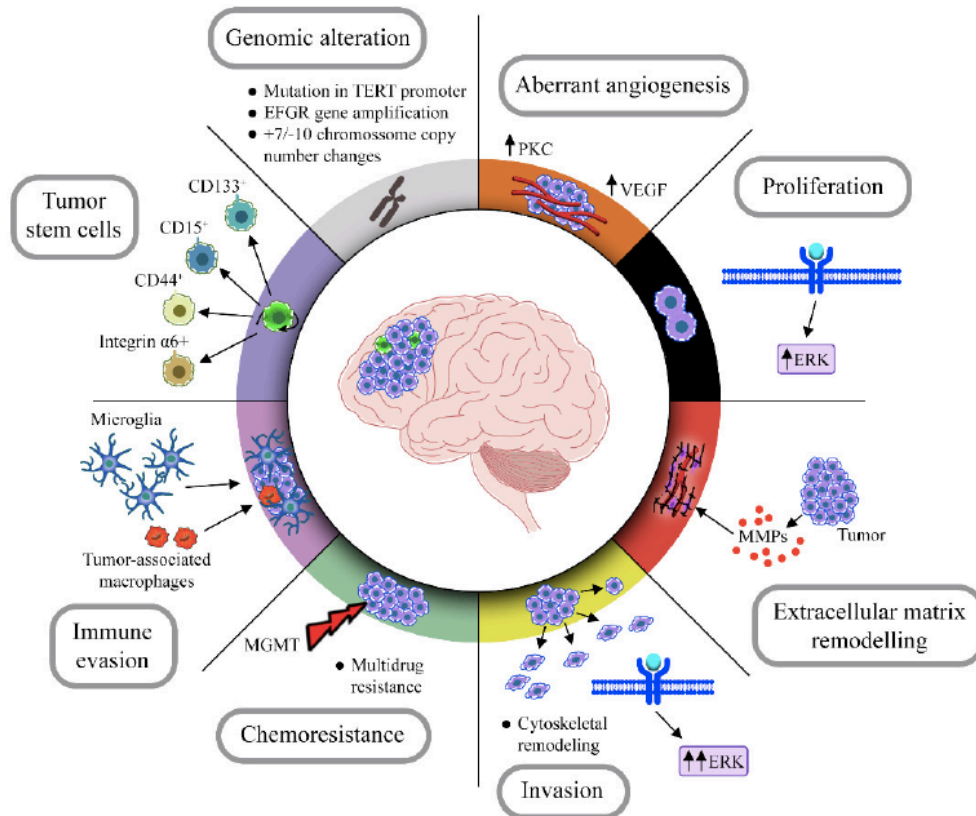


Figure 1 : Les différentes caractéristiques des GBM participant à son importante agressivité tumorale [15].

Toutes ces propriétés du GBM aboutissent à une des caractéristiques élémentaires des GBM qui est sa grande hétérogénéité que ce soit sur le plan cellulaire, génétique, moléculaire ou histologique. Cette hétérogénéité est observée entre deux tumeurs du même diagnostic (hétérogénéité intertumorale) mais également au sein d'une même tumeur (hétérogénéité intratumorale). Elle est responsable des résistances thérapeutiques et du mauvais pronostic des patients atteints de GBM. Elle est la conséquence des multiples combinaisons d'altérations moléculaires retrouvées dans les gliomes de haut grade. Par ailleurs, la présence de cellules souches cancéreuses (CSC) serait également responsable de l'hétérogénéité des tumeurs. Ces CSC sont dotées d'une grande plasticité cellulaire en plus de leurs capacités tumorigéniques. Elles sont capables d'auto-renouvellement et de différenciation en populations cellulaires cancéreuses distinctes et seraient ainsi responsable, entre autres, de l'hétérogénéité intratumorale. Ces différents aspects font du GBM une tumeur complexe à comprendre et difficile à traiter [16, 17].

2. Diagnostic et suivi thérapeutique

a. Signes Cliniques

Un GBM est souvent suspecté par l'apparition de différents signes cliniques et symptômes qui peuvent apparaître par trois mécanismes distincts. Le premier est un effet direct causé par la nécrose du tissu cérébral entraînant sa dégradation et par conséquent des troubles cognitifs et un déficit neural dans 40 à 60 % des cas. Les symptômes dépendent de la région du cerveau affectée par la tumeur et du grade de malignité. Une tumeur située au niveau du lobe frontal entraîne des troubles de la personnalité dans 20 à 40% des cas et altère les fonctions cognitives, tandis qu'une tumeur dans le lobe temporal entraîne des troubles auditifs et visuels. Un déséquilibre de la marche et une incontinence sont observés en présence d'une masse tumorale volumineuse [18]. Le second mécanisme est un effet indésirable due à une augmentation de la pression intracrânienne causée par l'augmentation progressive de la masse tumorale et de la présence d'œdème entourant la tumeur. Des maux de têtes sont observés dans 30 à 50% des cas. Leur intensité augmente à mesure que la taille de la tumeur augmente. Enfin, en fonction de la localisation de la tumeur, des crises d'épilepsie peuvent être retrouvées [19].

b. Imagerie

Lors de la suspicion d'une tumeur cérébrale celle-ci est confirmée par imagerie. Elle permet de poser le diagnostic de tumeur cérébrale et d'identifier la localisation de cette dernière de façon non invasive pour le patient. La technique de référence utilisée est l'imagerie par résonance magnétique (IRM). Elle utilise les propriétés magnétiques de l'atome d'hydrogène retrouvé à des degrés variables dans tous les tissus de l'organisme. Cette technique permet un bon contraste des tissus mous et permet de visualiser l'hétérogénéité de la masse tumorale. Cependant, la tomodensitométrie peut aussi être utilisée comme alternative pour les patients ne pouvant pas faire d'IRM, par exemple pour les patients portant un pacemaker. L'imagerie nucléaire a pu évoluer notamment grâce à la tomographie par émission de positons (TEP) qui est une autre méthode d'imagerie nucléaire non invasive qui s'applique parfaitement aux tumeurs cérébrales permettant un suivi des patients et ainsi d'évaluer les modifications et l'efficacité du traitement [20].

La TEP est une technique d'imagerie nucléaire non invasive. Contrairement à l'IRM, la TEP permet de faire la distinction entre les tumeurs récurrentes post-traitement et les modifications liées à la radiothérapie, tel que les radionécroses aussi appelées, les pseudo-progressions. Ces

est injecté par voie intraveineuse et est capté par les cellules *via* le transporteur du glucose, GLUT1 principalement. Il sera phosphorylé par l'hexokinase II, première enzyme de la glycolyse. L'absence de l'hydroxyle 2 va empêcher la dégradation du [¹⁸F]-FDG-6-phosphate par les voies glycolytiques et entraîner son accumulation dans les cellules cancéreuses. Après une bio-distribution complète, les premières images peuvent être obtenues. La consommation de glucose est corrélée au grade de malignité du gliome [25]. De ce fait, il apparaît intéressant d'utiliser ce radiotracer pour imager les gliomes. Cependant, le [¹⁸F]-FDG présente une limite dans son utilisation pour les tumeurs cérébrales car certaines zones du cerveau tel que le cortex cérébral, le thalamus ou encore les ganglions de la base ont un métabolisme physiologique glycolytique assez élevé, pouvant entraver le diagnostic [26].

- Transport des acides aminés

L'évaluation des tumeurs cérébrales primaires et récurrentes par imagerie TEP en utilisant le marquage des acides aminés est plus sensible par rapport à l'utilisation du métabolisme du glucose et permet de faire la distinction entre les changements induits par le traitement (pseudo-progressions) et les tumeurs récurrentes. Les acides aminés sont utilisés pour la synthèse des protéines. Dans les gliomes, on observe une augmentation des transporteurs des acides aminés, les LAT, permettant un transport accru des acides aminés au sein des cellules cancéreuses par rapport au tissu sain, ce qui confère un bon contraste entre les deux. Il a également été montré que le transport des acides aminés ne dépend pas de la perméabilité de la barrière hématoencéphalique (BHE) ni même du cycle cellulaire dans les tumeurs cérébrales [26]. Ainsi les radiotraceurs basés sur le marquage des acides aminés ont une meilleure précision pour le diagnostic par rapport au [¹⁸F]-FDG [21]. Il existe trois principaux radiotraceurs basés sur le marquage des acides aminés qui sont utilisés en clinique : la [¹¹C]-MET ([¹¹C]-méthionine), la [¹⁸F]-FET ([¹⁸F]-fluoro-éthyl-L-tyrosine) et la [¹⁸F]-FDOPA (3,4-dihydroxy-6-[¹⁸F]-fluoro-L-phenylalanine). L'utilisation du [¹¹C]-MET en routine clinique présente un défaut majeur en raison de la courte demi-vie du ¹¹C (20 min). C'est pourquoi d'autres radiotraceurs ont été développés, marqués cette fois-ci au ¹⁸F tels que la [¹⁸F]-FET et la [¹⁸F]-FDOPA. La [¹⁸F]-FET présente certains avantages comme son absorption accrue par les tissus tumoraux ou encore sa stabilité. C'est pourquoi ce radiotracer est le plus utilisé en Europe pour l'imagerie des gliomes. De plus, la [¹⁸F]-FET a démontré une meilleure absorption dans les radionécroses par rapport au [¹⁸F]-FDG. L'utilisation des radiotraceurs à acides aminés marqués est ainsi davantage approprié pour distinguer les tumeurs récurrentes des radionécroses [27].

Label	Physiopathology	Advantages	Drawbacks
[¹⁸ F]-FDG	Carbohydrate metabolism	<ul style="list-style-type: none"> - Help in guiding biopsy - Prognostic role - Predictive role 	<ul style="list-style-type: none"> - Physiological brain fixation (false negative) - Lack of specificity (false positive) - No differentiation between low- and high-grade lesion - Disappointing in recurrence from radiation necrosis differentiating - Disappointing in radiotherapy planning
[¹¹ C]-MET	Amino acid transport	<ul style="list-style-type: none"> - Grading gliomas - Help in guiding stereotactic biopsy - Radiotherapy planning - Predictive role 	<ul style="list-style-type: none"> - Limited use to on-site cyclotron - Controversial and results in differentiation between radiation necrosis and tumor recurrence
[¹⁸ F]-DOPA	Amino acid transport	<ul style="list-style-type: none"> - Logistical advantage thanks to its 18F radiolabel - Early acquisition - Grading gliomas - Guiding biopsy - Radiotherapy planning - Recurrence from radiation necrosis differentiation - Prognostic role - Predictive role 	<ul style="list-style-type: none"> - Disappointing in radiotherapy planning
[¹⁸ F]-FET	Amino acid transport	<ul style="list-style-type: none"> - Logistical advantage thanks to its 18F radiolabel - No striatum uptake - Dynamic acquisition - Grading gliomas - Guiding biopsy - Radiotherapy planning - Recurrence from radiation necrosis differentiation - Prognostic role - Predictive role 	<ul style="list-style-type: none"> - Availability
[¹⁸ F]-FLT	DNA synthesis	<ul style="list-style-type: none"> - Grading gliomas - Prognostic role - Predictive role 	<ul style="list-style-type: none"> - No distinction between non-tumor lesions and lowgrade tumors - Compared to [¹⁸F]-FDG no superiority in discriminating radiation necrosis from tumor recurrence
[¹⁸ F]-FMISO and [¹⁸ F]-FAZA	Hypoxia imaging	<ul style="list-style-type: none"> - Discriminating glioblastomas from other gliomas - Prognostic role - Radiotherapy planning: boost on small hypoxic tumor areas 	<ul style="list-style-type: none"> - 18F-FMISO: requires realization of early and delayed acquisition due to a high background activity

Tableau 1 : Avantages et inconvénients de chaque radiotracteur [22].

- Prolifération cellulaire

L'une des caractéristiques de la transformation maligne des tumeurs est la prolifération anormale des cellules tumorales. De ce fait, la [¹⁸F]-FLT ([¹⁸F]-fluoro-thymidine), analogue de la thymidine, apparaît comme un radiotracer intéressant pour la quantification de la prolifération des cellules tumorales. Cet analogue de la thymidine est transporté dans les cellules par le transporteur ENT1 et est phosphorylé par la thymidine kinase 1 puis s'accumule dans les cellules cancéreuses. La thymidine kinase 1 est une enzyme exprimée dans les cellules en cours de prolifération lors de la synthèse de l'ADN. L'accumulation du radiotracer permettra alors la détection des cellules tumorales qui ont une forte activité proliférative. Une corrélation entre l'expression du Ki-67 (marqueur de la prolifération) et l'absorption du [¹⁸F]-FLT a été montrée dans les gliomes [28]. De plus, il a également été démontré qu'une réponse au traitement entraîne une diminution de la prolifération cellulaire suivie d'un changement morphologique. La [¹⁸F]-FLT apparaît donc comme un radiotracer intéressant pour permettre une prédiction de la progression tumorale et le suivi de la réponse thérapeutique. Cependant, ce radiotracer présente quelques inconvénients pour son utilisation en routine clinique tel que sa bio-distribution qui dépend de sa capacité à traverser la BHE. Si elle n'est pas altérée la [¹⁸F]-FLT passe difficilement la BHE. Des études complémentaires doivent être encore réalisées pour son utilisation en clinique [26, 29].

- Quantification de l'hypoxie

Les gliomes de haut grade sont des tumeurs hautement hypoxiques. Cette hypoxie résulte d'une importante prolifération cellulaire associée à une oxygénation insuffisante des tissus tumoraux en raison d'un réseau vasculaire anormal, anarchique et peu fonctionnel. Dans de nombreuses études, l'hypoxie intra-tumorale a été associée à la progression tumorale et à une résistance thérapeutique [30, 31]. Le [¹⁸F]-FMISO ([¹⁸F]-fluoro-misonidazole) est un dérivé du nitroimidazole qui s'accumule dans les cellules uniquement hypoxiques, ce qui en fait un marqueur intéressant pour les GBM. Le [¹⁸F]-FMISO est réduit par les cellules cancéreuses hypoxiques et va s'accumuler dans ces cellules. A l'inverse, dans les cellules normales non hypoxiques, ce dernier va être ré-oxydé pour finalement être éliminé. Une corrélation a été mise en évidence entre l'absorption du [¹⁸F]-FMISO et l'expression du VEGF. Dans les GBM, ce radiotracer va s'accumuler en périphérie de la tumeur, le centre étant nécrosé, car celui-ci est capté uniquement par les cellules viables en hypoxie. Cependant l'absorption du [¹⁸F]-FMISO

est assez lente pour les gliomes malins et les données restent encore insuffisantes pour son utilisation en clinique [32].

- Peptides RGD

La néoangiogenèse est un phénomène important dans la tumorigenèse. Elle permet un apport en nutriments et en oxygène aux tumeurs, essentiel à leur croissance. Les cellules endothéliales qui tapissent ces néovaisseaux expriment en surface l'intégrine $\alpha v \beta 3$. Cette intégrine est également exprimée par les cellules tumorales. Les peptides contenant un motif RGD (Arginine-Glycine-Asparagine) peuvent se lier de manière spécifique à certaines intégrines dont l'intégrine $\alpha v \beta 3$ ou encore l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ de plus en plus étudiée ces dernières années. En effet, cette dernière a montré un grand intérêt dans le ciblage des tumeurs car celle-ci est fortement exprimée dans les cellules tumorales et participe à de nombreux événements tumorigéniques. Par exemple l'équipe d'Alessandria et *al.*, a développé le FR366, spécifique de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ ou le ligand c(phg- iso DGR-(N Me)k) développé par l'équipe de Kapp et *al.* [33–37]. Ainsi, l'utilisation de peptides radiomarqués (principalement au ^{68}Ga) contenant un motif RGD semble être une approche intéressante pour le diagnostic des tumeurs en imagerie TEP. De plus, l'utilisation de ces peptides RGD pourrait donner des informations complémentaires notamment pour prédire l'efficacité d'un traitement anti-angiogénique [38]. Une grande variété de peptides cycliques RGD ont été développés et étudiés dans l'optique d'une utilisation clinique en routine et se sont avérés assez prometteurs [33, 39, 40]. Les radiotraceurs RGD ne traversent pas la BHE saine, en revanche ils traversent facilement la BHE altérée par la tumeur. Ces derniers ont montré un bon contraste entre le tissu sain et le tissu tumoral ce qui conforte leur utilisation pour l'imagerie des tumeurs cérébrales notamment, contrairement aux tumeurs hépatiques en raison d'une forte absorption dû à une vascularisation importante de cet organe [41, 42]. Ces peptides RGD ont également montré un intérêt dans leur utilisation en nanomédecine afin de délivrer des thérapies en ciblant spécifiquement les tumeurs [43].

c. Biopsie

Après confirmation par l'imagerie de la présence d'une masse tumorale dans le cerveau, l'étape suivante dans le diagnostic est généralement une biopsie, c'est-à-dire un prélèvement d'un échantillon du tissu tumoral pour identifier le type de tumeur ainsi que son grade pour déterminer le pronostic du patient. Il existe deux techniques possibles pour effectuer une biopsie

en fonction de la localisation de la masse tumorale si celle-ci est opérable ou non. De ce fait, une biopsie peut se faire soit lors de l'intervention chirurgicale effectuée pour retirer au maximum la tumeur, appelée biopsie ouverte, soit si le patient n'est pas opérable par la technique du cadre stéréotaxique, appelée biopsie stéréotaxique. Cette dernière utilise un système de balayage tridimensionnel à l'aide d'un ordinateur pour guider le chirurgien lors de la résection. Une fois prélevée, la biopsie sera analysée par des anatomopathologistes pour une étude histologique et moléculaire afin d'aboutir au diagnostic définitif du patient [44].

Dans 20% des cas, des cellules tumorales circulantes (CTC) sont retrouvées chez les patients atteints de GBM. C'est pourquoi, il peut arriver qu'une biopsie liquide soit réalisée afin de suivre la progression tumorale ou la réponse à la thérapie [45]. Cette biopsie liquide consiste à prélever du liquide céphalo-rachidien par ponction lombaire pour identifier les CTC. Cette technique peu invasive permet un suivi personnalisé du patient et une analyse du profil moléculaire sans passer par un prélèvement du tissu tumoral beaucoup plus invasif [46].

3. Facteurs de risque

a. Rayonnement ionisant

Les rayonnements ionisants après une exposition médicale infantile correspondent au facteur de risque le plus avéré. Ils entraînent une augmentation de la survenue de mutations, favorisant l'instabilité génomique et donc la tumorigenèse, ce qui en fait un facteur de risque pour de nombreux cancers. Une étude en 2005, portant sur des personnes traitées pour des teignes sur le cuir chevelu aux rayons X dans les années 1950, a montré une augmentation significative du risque de développer un GBM. Une étude plus récente a également montré, que le risque de développer une tumeur du système nerveux central était 8 à 52 fois plus élevé après une radiothérapie crânienne chez l'enfant pour une tumeur antérieure par rapport à la population générale et cela est proportionnelle à la dose de radiation [47, 48].

b. Croissance

Il a été montré par des études de cas, que les personnes de grande taille (> 1,90m) avaient 2 fois plus de chance de développer un GBM par rapport aux personnes de petite taille (< 1,60). Il a été observé une expression plus importante de IGF (produit par l'hormone de croissance) et de IGFBP-2 chez les personnes de grande taille par rapport aux personnes de plus petite taille [49, 50]. En effet, dans plus de 80% des GBM on retrouve une surexpression de IGFBP-2 (insulin

like growth factor binding protein 2), protéine de liaison au facteur de croissance et analogue à l'insuline [51]. Cette protéine représente un des biomarqueurs de malignité des GBM [52] et un marqueur pronostic de la survie [53]. Elle est indétectable dans les gliomes de bas grade et augmente en fonction du grade de malignité et de la progression tumorale [54].

c. Sommeil et mélatonine

Aucun lien n'a été montré entre la durée du sommeil et la survenue de gliome, cependant il a été montré par une étude prospective qu'un trouble du sommeil avec pour conséquences un déphasage, une diminution des niveaux d'anti-oxydants, une immunosuppression, des modifications métaboliques, une carence en mélatonine, des troubles cognitifs ou des modifications épigénétiques, avait un effet pro-tumorigène [55]. Toutes ces modifications entraînent une progression tumorale plus importante et un pronostic des patients atteints de gliome plus sombre [56]. Il a été observé que la croissance, la prolifération et la migration des tumeurs cérébrales malignes sont influencées par l'expression de gènes « horloges », BMAL1 (brain and muscle ARNT-Like 1) et CLOCK (circadian locomotor output cycles kaput). Ces gènes « horloges » sont des gènes dont la transcription est influencée par le rythme circadien [57–59]. La durée de vie des patients atteints d'un GBM était augmentée lors de l'administration de mélatonine lorsqu'ils suivaient une radiothérapie et la chimiothérapie était mieux supportée par les patients [60]. Cela était notamment due à la suppression des propriétés des cellules souches de GBM par la voie Notch1 [61].

4. Classification OMS

La classification de l'organisation mondiale de la santé (OMS) représente la norme internationale pour la nomenclature et le diagnostic des tumeurs cérébrales. La première édition de la classification pour les tumeurs cérébrales est apparue en 1979 où il était pris en compte le typage histologique, basé sur les ressemblances observées au microscope entre les cellules tumorales et les cellules saines [62]. Ce typage permet de prédire le comportement biologique d'une tumeur et d'influencer sur le choix des thérapies. Cette classification des tumeurs du système nerveux est un classement sur une échelle de malignité selon la densité cellulaire et le degré de différenciation [63]. La quatrième édition de cette classification a été publiée en 2007 et répertorie de nouveaux variants histologiques en fonction de l'âge, de l'emplacement de la tumeur et du profil génétique [64]. Cette classification des gliomes par l'OMS ne cesse de s'améliorer et de s'affiner en incorporant de nouvelles données moléculaires grâce au

séquençage de l'ADN à haut débit et au séquençage de l'ARN total. Ainsi, c'est dans la classification de l'OMS de 2016 (une mise à jour de la quatrième édition), que pour la première fois des caractéristiques moléculaires sont prises en compte en plus des données histologiques pour le diagnostic des gliomes. Ainsi, elle distingue les différents gliomes en fonction du statut mutationnel des gènes IDH1 et IDH2, de la codélétion 1p/19q mais également pour le diagnostic des oligodendrogliomes qui se fait en fonction du statut mutationnel d'ATRX et du promoteur de TERT, en fonction de la mutation des gènes des histones H3 pour le diagnostic des gliomes pédiatriques, de la méthylation du promoteur MGMT qui est un marqueur prédictif et pronostique et enfin pour les GBM « IDH-non muté » en fonction de diverses altérations (amplification de l'EGFR, perte de PTEN...) [65, 66].

Une cinquième édition a été publiée en 2021, affinant le génotypage et le profil moléculaire des tumeurs cérébrales en intégrant l'étude du méthylome. Cela a permis une plus grande précision du pronostic et une meilleure approche de la prise en charge thérapeutique, notamment pour l'intégration des patients dans des essais cliniques afin de tester des thérapies ciblées. Ainsi, la classification de l'OMS de 2021 renforce le rôle de la génétique moléculaire dans le diagnostic des GBM avec de nouveaux marqueurs moléculaires tels que la délétion homozygote CDKN2A/B, les altérations de FGFR1 ou encore la mutation BRAF. Un effort de simplification et d'harmonisation a également été fait par rapport aux classifications des autres types de cancer, par exemple pour la gradation des gliomes qui ne se note plus en chiffre romain mais en chiffre arabe, on ne parle plus d'entité mais de type ou de sous-type. Cette nouvelle classification a également retiré certains sous-types et en a ajouté d'autres. Désormais, on parle d'astrocytome diffus pour les gliomes IDH muté et on parle de GBM uniquement pour les gliomes diffus et astrocytaires IDH non muté présentant certaines altérations moléculaires typiques. Ces derniers sont classés dans les gliomes de plus haut grade (grade 4). [67–69] (Figure 3). Les gliomes IDH muté sont généralement moins agressifs et ont un meilleur pronostic que les GBM. Histologiquement, il est difficile de différencier les GBM des astrocytomes diffus IDH muté. C'est par une analyse du profil génétique et plus précisément par la détection ou non de la mutation IDH qu'il est possible de distinguer ces deux sous-types. Par la suite, d'autres altérations distinctes entre ces deux groupes ont été notifiées. En effet, les GBM présentent fréquemment une amplification de l'EGFR, une mutation PTEN et une perte totale ou partielle du chromosome 10. En revanche les gliomes IDH muté, eux, sont souvent porteur d'une mutation du gène TP53 et d'une codélétion de 1p/19q. Malgré leurs

ressemblances histologiques, il s'agit donc bien de deux entités distinctes provenant de précurseurs différents [70, 71].

**Gènes clefs dans le diagnostic des GLIOMES DIFFUS DE L'ADULTE
et des GLIOMES DIFFUS PÉDIATRIQUES DE HAUT GRADE**

	TYPE ADULTE (> 25 ans)		Adolescents et Jeunes Adultes (AJA) (15-25 ans)		TYPE PÉDIATRIQUE (< 25 ans)		
Type	Astrocytome IDH-muté	Oligodendrogliome IDH-muté 1p/19q-codelété	Glioblastome, IDH non-muté	Gliome diffus de la ligne médiane H3 K27-altéré	Gliome diffus hémisphérique H3 G34-muté	Gliome diffus pédiatrique de haut grade, H3 et IDH non-mutés	Gliome hémisphérique infantile
Altérations moléculaires	IDH1 /IDH2	IDH1 /IDH2 Codéletion 1p/19q	IDH1/IDH2 Méthylation pTERT	Perte de H3K27Me3 ET H3K27 OU EZHIP OU EGFR	H3G34	IDH1/IDH2 H3	Famille des NTRK
	TP53 ATRX	Méthylation pTERT CIC FUBP1	OU +7 -10 OU Amplification de l'EGFR	TP53 ACVR1 PDGFR α	ATRX TP53	PDGFR α MYCN EGFR Profil de méthylation	ALK ROS MET
Grade 2	Pas de CDKN2A HD Pas de PMV Pas de nécrose	Pas de PMV Index mitotique faible	Pas de grade 2	Pas de grade 2	Pas de grade 2	Pas de grade 2	Pas de grade 2
Grade 3	Pas de CDKN2A HD Pas de PMV Pas de nécrose Index mitotique élevé	PMV +/- nécrose Index mitotique élevé (≥ 6)	Pas de grade 3	Pas de grade 3	Pas de grade 3	Pas de grade 3	Pas de grade 3
Grade 4	CDKN2A HD OU PMV +/- nécrose	Pas de grade 4	Grade 4 seulement	Grade 4 seulement	Grade 4 seulement	Grade 4 seulement	Pas de grade 4

Figure 3 : Altération moléculaire principalement utilisée pour le diagnostic des gliomes selon la classification de l'OMS de 2021 [67].

CIC : protéine Capicua ; PMV : prolifération microvasculaire ; HD : délétion homozygote. En rouge les altérations prises en compte pour déterminer le type de gliome.

5. Classifications moléculaires

a. Classification de Verhaak

En 2010, Verhaak *et al.* [72] ont défini une classification des GBM en parallèle de la classification de l'OMS à partir de données recueillies dans le TCGA en se basant sur la présence d'altérations génomiques typiques et récurrentes retrouvées au sein des tumeurs de patients. Cette classification divise les GBM en 4 classes : le sous-type proneural, neural, classique ou mésenchymal et chacune de ces classes intègre des altérations moléculaires particulières [72] (Figure 4).

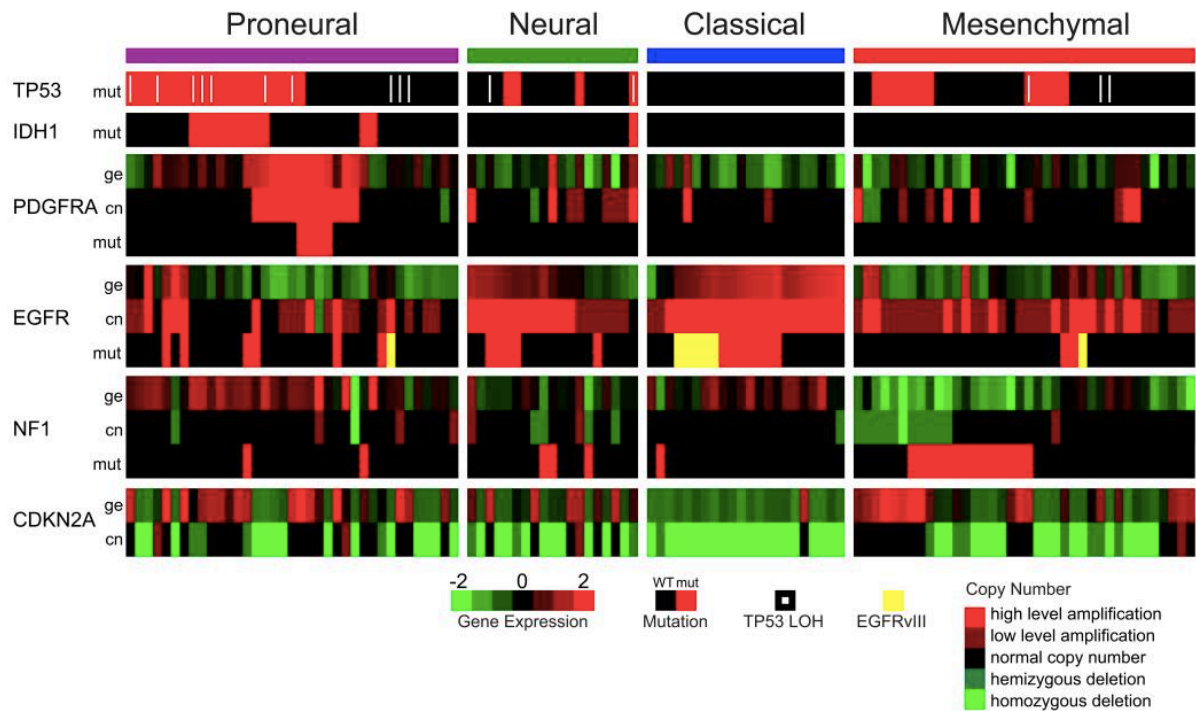


Figure 4 : Classification de Verhaak selon différentes altérations génomiques. Caractérisation des 4 sous-types de GBM selon la classification de Verhaak. Données de 116 échantillons avec le nombre de copie et les données de mutations [72].

Les différentes classes et les altérations typiques sont décrites ci-dessous :

- La classe classique : Ce sous-type présente une signature astrocytaire. L'amplification du chromosome 7 et la perte du chromosome 10 sont les deux altérations principalement retrouvées, dans quasiment 100% des GBM de cette classe. L'amplification de l'EGFR est également retrouvée dans 97% des cas. On retrouve également une délétion homozygote de CDKN2A qui affecte la voie RB et une surexpression de NES (précurseur neurale des cellules souches) et de l'activité de la voie Notch.
- La classe mésenchymal : Dans ce sous-type, il est principalement retrouvé une délétion hémizygote du gène NF1 (53%) ainsi que la mutation du gène PTEN. Des marqueurs mésenchymateux et astrocytaires sont également retrouvés tels que MET et CD44 respectivement, soulignant le caractère de la transition épithélio-mésenchymateuse et des cellules davantage différenciées. Des facteurs de nécroses de la voie NF- κ B sont aussi fortement exprimés dans cette classe. Récemment, il a été montré que la classe mésenchymal présente une forte expression du VEGF et une présence accrue de cellules immunitaires. Cette classe présente le pronostic le plus sombre avec une signature

génétique d'un ensemble de gènes liés au processus malin des tumeurs de GBM pouvant servir de facteur pronostique [73–76].

- La classe proneurale : Les altérations de PDGFRA et du gène IDH caractérisent la classe proneurale et sont retrouvées chez les patients les plus jeunes qui présentent un meilleur taux de survie [74]. La perte d'hétérozygotie (54%) et la mutation de TP53 sont aussi des altérations fréquemment retrouvées dans cette classe. Ce sous-type révèle un statut plutôt oligodendrocytaire du fait de la présence élevée du marqueur OLIG2.
- La classe neurale : Ce sous-type est caractérisé par la présence de différents marqueurs neuronaux tel que NEFL ou encore SYT1. Il a récemment été démontré que le sous-type neural était en réalité non spécifique des cellules cancéreuses et qu'il s'agissait de cellules non tumorales du microenvironnement [77].

b. Classification de Neftel

Grâce à la technique de séquençage de l'ARN de cellules uniques (scRNA-seq) il a été constaté qu'un groupe de cellules au sein d'une même tumeur peut récapituler chaque sous-type de GBM de la classification de Verhaak (sous-type proneural, classique et mésenchymal). Ces sous-types peuvent coexister au sein d'une même tumeur et varier au cours de l'évolution tumorale et de la thérapie. Cela confirme la notion de l'hétérogénéité intratumorale et de la plasticité cellulaire dans les GBM influencées par le microenvironnement tumoral [77, 78]. En plus de l'influence du microenvironnement qui engendre un premier niveau d'hétérogénéité, il existe également un sous-ensemble de cellules, les cellules souches de GBM (CSG) dotées d'une grande plasticité cellulaire participant ainsi à l'hétérogénéité des GBM [79, 80]. Ces différents niveaux d'hétérogénéités entraînent une grande résistance aux thérapies, c'est pourquoi il apparaît important de mieux comprendre et classer les différents états cellulaires d'une tumeur afin d'affiner la médecine personnalisée. L'équipe de Neftel et *al.* [81] a ainsi décrypté l'hétérogénéité des différents états cellulaires présents dans les GBM en combinant la technique de scRNA-seq sur 20 échantillons de GBM adultes (24 131 cellules), l'étude de modèles *in vivo* de GBM et l'analyse de 401 échantillons du TCGA. Différentes signatures moléculaires ont été retrouvées au sein d'une même tumeur à des niveaux variables avec une composante majoritaire définissant le sous-type moléculaire global de la tumeur. Quatre groupes principaux ont été caractérisés : les progéniteurs neuraux like avec une signature de cellules souches (NPC-like), les progéniteurs oligodendrocytaires like (OPC-like), les astrocytes like (AC) et les mésenchymateux like (MES). Ces groupes d'états cellulaires différents sont favorisés par des altérations génétiques distinctes, l'amplification de CDK4 est associée aux NPC,

l'amplification de PDGFRA associée aux OPC, l'amplification de l'EGFR associée aux AC et la mutation de NF1 associée aux MES. De plus, il a été observé que dans le groupe MES certaines tumeurs avaient un enrichissement de la voie hypoxique et glycolytique. Ce groupe a donc été subdivisé en deux sous-groupes, un groupe indépendant de la voie hypoxique (MES1) et un groupe dépendant de la voie hypoxique (MES2). Les groupes AC et MES reflètent des tumeurs agressives avec un profil de cellules très prolifératives et invasives, et peuvent être retrouvés en combinaison dans certaines tumeurs de GBM. Il a également été montré qu'une cellule donnée avait la capacité de passer d'un état à un autre. Lors des récurrences, par exemple, les tumeurs ont tendance à évoluer vers le sous-type mésenchymal. Ces travaux ont permis de mettre en évidence la plasticité cellulaire favorisant l'hétérogénéité des GBM [81, 82].

6. Altérations moléculaires du GBM

a. Statut IDH

La présence de la mutation du gène de l'isocitrate déshydrogénase (IDH) a été reconnue en 2008 par Parsons et al. [83] comme étant une étape importante dans la genèse des gliomes, apparaissant dans les étapes précoces de la formation tumorale. Cette IDH joue un rôle dans le métabolisme cellulaire, elle convertit l'isocitrate en α -cétoglutarate générant du NADPH [84]. Selon la classification de 2021, cette mutation du gène IDH apparaît au niveau des gliomes de bas grade et représente de ce fait, un facteur de bon pronostic pour les patients. Depuis la nouvelle classification de 2021, la présence de cette mutation exclut le diagnostic de GBM, ces derniers sont uniquement IDH non muté. Environ 60% des personnes porteuses d'un gliome de grade 2 ou 3 ont une mutation du gène IDH [85]. Les tumeurs IDH muté présentent souvent une codélétion 1p/19q ou une mutation du gène TP53. Les tumeurs IDH non muté se retrouvent souvent avec un taux plus élevé de méthylation du promoteur MGMT [86]. Les mutations du gène IDH ont pour conséquence la production de D-2-hydroxoglutarate (D-2HG), un oncométabolite, qui va s'accumuler dans les cellules tumorales et qui va entraîner des changements épigénétiques au niveau de la tumeur. Il est intéressant de noter que ce D-2HG peut être dosé dans la tumeur, que ce soit *via* les biopsies, les liquides biologiques mais aussi de manière non invasive par spectroscopie IRM, permettant d'aider au diagnostic des gliomes [87].

b. Méthylation du promoteur du gène MGMT

La MGMT (O6-méthylguanine-DNA methyltransférase) est une enzyme responsable de la réparation des lésions à l'ADN. Au niveau du promoteur du gène MGMT se trouve une région riche en îlot CpG, cette dernière jouant un rôle clé dans la régulation de son expression. La méthylation du promoteur de ce gène va entraîner une diminution de l'expression du gène MGMT, voir une disparition de son expression lorsque le gène est hyperméthylé. Ainsi, la perte d'expression du gène MGMT va empêcher la réparation des dommages à l'ADN causés par la chimiothérapie alkylante (le TMZ) et conduire à l'apoptose. La méthylation du promoteur MGMT est corrélée à une bonne réponse à la chimiothérapie et est donc un facteur prédictif [88, 89].

c. Mutation du promoteur du gène pTERT

Le gène TERT permet le maintien de la taille des télomères. En absence de TERT, les télomères se raccourcissent au fur et à mesure des divisions cellulaires, aboutissant à une sénescence lorsque la taille des télomères devient critique. La mutation du promoteur du gène pTERT (principalement sur les hotspots C228T et C250T) entraîne une augmentation de l'activité de la télomérase afin de rallonger les télomères et permet ainsi l'immortalisation des cellules et une oncogénèse [90, 91]. Cette mutation du gène pTERT a un rôle important dans la transformation maligne des gliomes. Elle est retrouvée dans 80% des GBM et 90% des oligodendrogliomes codélétés 1p/19q [87]. La mutation de ce gène est un événement précoce dans la tumorigénèse et permet l'activation de la télomérase en recrutant des facteurs de transcription qui vont réguler l'expression du gène TERT. En règle générale la télomérase est réduite au silence dans les tissus sains sauf pour les cellules nécessitant un auto-renouvellement tel que les cellules souches hématopoïétiques, l'épithélium intestinal ou encore les cellules de l'ovaire [92].

d. Altérations chromosomiques

Différentes altérations chromosomiques sont retrouvées dans les gliomes et sont associées à l'amplification d'oncogènes tel que l'EGFR mais aussi à des mutations de gènes suppresseurs de tumeurs tel que la mutation de TP53 ou de PTEN [93]. Dans les GBM, la perte d'hétérozygotie (LOH) totale ou partielle du chromosome 10 est l'altération chromosomique la plus fréquente, elle est retrouvée dans 35 à 60% des GBM. Cette altération entraîne une mutation au niveau du gène de PTEN, ce qui suggère que cette LOH du chromosome 10 joue un rôle important dans le développement des GBM [94, 95]. De plus, dans les GBM, la perte

du chromosome 10 est souvent associée à un gain du chromosome 7 (+7/-10). Cette signature est liée à une amplification de l'EGFR et à l>IDH non muté. Ainsi cette association d'altération chromosomique +7/-10 est l'une des caractéristiques du GBM et représente un bon marqueur moléculaire pour le diagnostic des GBM. Il a aussi été montré que la combinaison de cette signature (amplification de l'EGFR et +7/-10) avec présence de la mutation du gène TERT était assez fréquente et exclusivement retrouvée dans les GBM IDH non muté [96].

e. Amplification de l'EGFR

L'EGFR est un récepteur de la famille des ErbB à activité tyrosine kinase activé principalement par son ligand l'EGF. L'activation du récepteur entraîne sa dimérisation et l'activation de voies de signalisation telles que PI3K/AKT, Ras/MAPK et JAK/STAT. Ces dernières favorisent la prolifération cellulaire, la survie, l'angiogenèse et l'invasion tumorale. Dans 57,4% des GBM, on retrouve une amplification de l'EGFR, cette dernière représente une caractéristique typique du diagnostic des GBM selon la classification de l'OMS de 2021. De plus, une mutation oncogène de ce récepteur est fréquemment retrouvée dans les GBM, la mutation EGFRvIII. Cette dernière survient dans les étapes tardives de la progression tumorale. La mutation EGFRvIII correspond à une délétion de l'exon 2 à 7 de l'EGFR, représentant le domaine de fixation du ligand et entraîne la formation d'un récepteur EGFR constitutivement activé [97]. Cette altération est un facteur de mauvais pronostic [89].

f. Mutation du gène PTEN

PTEN (homologue de la phosphatase et de la tensine) est un gène suppresseur de tumeur responsable de la régulation négative de la voie PI3K/AKT. Cette voie joue un rôle important dans la régulation de la prolifération cellulaire et le développement tumoral [98]. La mutation du gène PTEN est retrouvée dans 60% des GBM et la suppression de son expression peut être causée par une LOH du chromosome 10. Elle va entraîner une perturbation de la voie PI3K/AKT ce qui entraînera une prolifération cellulaire accrue et donc une progression tumorale plus importante et une survie plus faible des patients atteints d'un GBM. La mutation du gène PTEN est donc un facteur de mauvais pronostic pour les patients atteints de GBM [99].

g. Mutation du gène TP53

Le gène TP53 joue un rôle clé dans le contrôle du cycle cellulaire, l'apoptose et l'intégrité du génome. En absence de stress cellulaire, la protéine P53 est très peu exprimée. Son expression est régulée par l'enzyme MDM2 qui va se fixer sur P53 et entraîner sa dégradation. Cependant, un stress cellulaire, causé par exemple lors de dommages infligés à l'ADN ou d'une anomalie au niveau du cycle cellulaire ou du métabolisme cellulaire, va entraîner une dissociation de MDM2 et de P53. Cela a pour conséquence l'activation de P53 par augmentation de son expression. Il pourra alors effectuer sa fonction de facteur de transcription et entraîner la transcription de différents gènes tels que p21. Cela entraîne un arrêt du cycle cellulaire ou la mise en place du processus d'apoptose. Il est ainsi appelé gardien du génome. TP53 est également considéré comme un gène suppresseur de tumeur et sa mutation est retrouvée dans 28% des GBM. Une dérégulation de P53 peut également survenir après la perte de l'expression de p14 causée par une délétion homozygote ou par une méthylation du promoteur retrouvé dans 50% des GBM [100, 101].

7. Traitement

a. Protocole de Stupp

Depuis 2005, le protocole de Stupp est utilisé pour le traitement des GBM. Ce traitement consiste dans un premier temps à retirer la tumeur par chirurgie dans la mesure du possible. Cette intervention vise à retirer le maximum de la masse tumorale pour éviter au mieux les récidives et permet également de poser de manière définitive le diagnostic par étude histologique, cytologique et moléculaire. Il a été montré qu'une résection complète de la tumeur et une amélioration de la survie sans progression étaient augmentées lorsque la chirurgie est réalisée sous lumière bleue, avec un marquage fluorescent de la tumeur par l'acide 5-amino-lévulinique (5-ALA, Gleolan®). Cet agent d'imagerie a obtenu l'approbation de la FDA (Food and Drug Administration) aux États-Unis en 2017 en tant qu'adjuvant pour le guidage de la chirurgie des gliomes de haut grade [102–104]. Dans un deuxième temps, une association de radiothérapie fractionnée (5 jours par semaine pendant 6 semaines) et de chimiothérapie par voie orale, le témozolomide (TMZ ou Témodal®) (5/7 jours du premier au dernier jour de radiothérapie) est réalisé et enfin du TMZ adjuvant (5 jours tous les 28 jours pendant minimum 6 mois) [105]. L'efficacité de la chimiothérapie peut être prédite en fonction de la présence de la méthylation du promoteur MGMT qui est un facteur prédictif. En effet, le TMZ est un agent de méthylation qui va induire des dommages au niveau des brins de l'ADN et entraîner

l'apoptose. Ainsi, la méthylation du promoteur du gène MGMT va inactiver ce gène, et par conséquent éviter les réparations des dommages de l'ADN au sein de la tumeur causés par la chimiothérapie [106].

Malgré ce traitement le GBM récidive dans la majorité des cas et il n'existe pas de traitement standard pour les récurrences. Les directives à suivre en cas de récurrences est de privilégier les essais cliniques [107]. Néanmoins il existe quelques options, pour les lésions symptomatiques par exemple une chirurgie en traitement palliatif peut être à nouveau réalisée, en traitement systémique la réutilisation du TMZ ou d'une radiothérapie sont une option, mais également l'utilisation de nitrosouré, tels que la lomustine, de bévécizumab ou du TTFIELDS sont également des options. Cependant cela reste des traitements palliatifs [108, 109].

b. Bévécizumab

Les GBM sont les tumeurs solides les plus vascularisées. La densité microvasculaire est un facteur pronostic chez les patients atteints de GBM. Ces derniers sont caractérisés par une néoangiogenèse importante (formation de nouveaux vaisseaux), c'est pourquoi, cette dernière représente une cible thérapeutique intéressante dans le traitement des GBM. Afin d'avoir l'apport en oxygène et en nutriments nécessaire à la croissance tumorale, l'angiogenèse est stimulée au sein des tumeurs. Cette stimulation de l'angiogenèse résulte d'une adaptation à un environnement hypoxique (faible taux en oxygène), entraînant l'augmentation de l'expression des HIFs (facteurs induit par l'hypoxie). Ces derniers entraînent une augmentation de l'expression du VEGF qui favorise la prolifération, la migration et la survie cellulaire. L'angiogenèse résulte également de la présence de certaines mutations génétiques (PTEN, EGFR et cMYC) activant des voies de transcription pro-angiogénique (VEGF) favorisées par un microenvironnement hypoxique. Ces phénomènes d'adaptation se produisent de façon différente entre deux tumeurs mais également au sein d'une même tumeur et contribuent à l'hétérogénéité tumorale. Par ailleurs, le phénomène néoangiogénique entraîne la formation de micro-vaisseaux tumoraux anormaux, sinueux, avec un débit et un apport en oxygène ralenti favorisant les thromboses et les microhémorragies. Étant donné que les GBM sont des tumeurs se développant rapidement, l'activité angiogénique n'est pas assez importante pour soutenir un apport en oxygène et en nutriments suffisant ce qui provoquera un décalage métabolique et une hypoxie progressive. De plus, la paroi de ces néovaisseaux étant très perméable va entraîner des fuites qui génèrent une pression interstitielle accrue et une distribution de la chimiothérapie moins efficace au sein de la tumeur [110, 111]. Cela aura pour finalité une nécrose tissulaire et

la mise en place d'un œdème interstitiel dû à une altération de la BHE. L'œdème étant l'une des principales comorbidité des GBM, de nombreuses recherches sont menées afin d'évaluer l'intérêt de traitements anti-angiogéniques chez les patients atteints de GBM [16].

Le bévacizumab est le premier traitement anti-angiogénique étudié et approuvé par la FDA en 2009 aux États-Unis pour le traitement de 2^{ème} ligne des GBM. C'est un anticorps monoclonal humanisé recombinant qui va se lier au VEGF et inhiber son activité. La diminution de l'activité du VEGF va inhiber la néoangiogenèse des vaisseaux anormaux et va normaliser la vascularisation tumorale. De manière paradoxale cette inhibition de la néoangiogenèse aboutissant à la normalisation des vaisseaux, va améliorer l'oxygénation des tissus et l'accès des médicaments à la tumeur mais également rétablir la BHE et ainsi diminuer la formation d'œdème [112–114]. Une amélioration de la survie sans progression (PFS) a été observée, cependant les effets sont transitoires et la plupart des tumeurs progressent à nouveau après un délai de 3 à 5 mois, probablement dû à une adaptation de la tumeur au traitement. Il a également été montré *in vivo* et en clinique que sur le long terme la normalisation des vaisseaux par le traitement au bevacizumab entraîne une augmentation de l'invasion tumorale [15, 115, 116]. Il a été montré que le bévacizumab sensibilise les cellules aux agents cytotoxiques, c'est pourquoi l'utiliser en combinaison avec des agents cytotoxiques pourrait permettre d'améliorer l'efficacité des thérapies dans les tumeurs solides [117]. Par exemple, une étude de phase II a été menée sur une association entre le bevacizumab et l'Irinotécan (agent cytotoxique) chez les patients atteints d'un GBM. L'Irinotécan est un inhibiteur de la topoisomérase I, utilisé comme agent thérapeutique dans les cancers colorectaux et du pancréas, et a pour avantage de traverser facilement la BHE. Cette étude a montré des résultats encourageants sur l'utilisation de cette combinaison par rapport à l'utilisation du bevacizumab seul. Il a été observé une amélioration de la survie sans progression avec un effet antitumoral significatif, cependant cette combinaison de traitement présenter également une toxicité significative [118–120].

c. TTFields

Le TTFields (alternating electric fields therapy) est une nouvelle approche thérapeutique du GBM, utilisant des champs électriques magnétiques de faible intensité et de fréquence intermédiaire. Il s'agit d'une technique antinéoplasique locorégionale qui a démontré une certaine efficacité et sécurité chez les patients atteints de gliomes de haut grade. Lorsque ce dispositif est utilisé en association avec la chimiothérapie adjuvante (TMZ), une augmentation de la survie globale est observée [121, 122]. Cette technique cible les cellules cancéreuses en

altérant la migration, l'invasion, la prolifération cellulaire, l'angiogenèse, les mécanismes de réparation de l'ADN et en induisant des effets apoptotiques et de mort cellulaire immunogène mais également des effets antimittotiques (Figure 5).

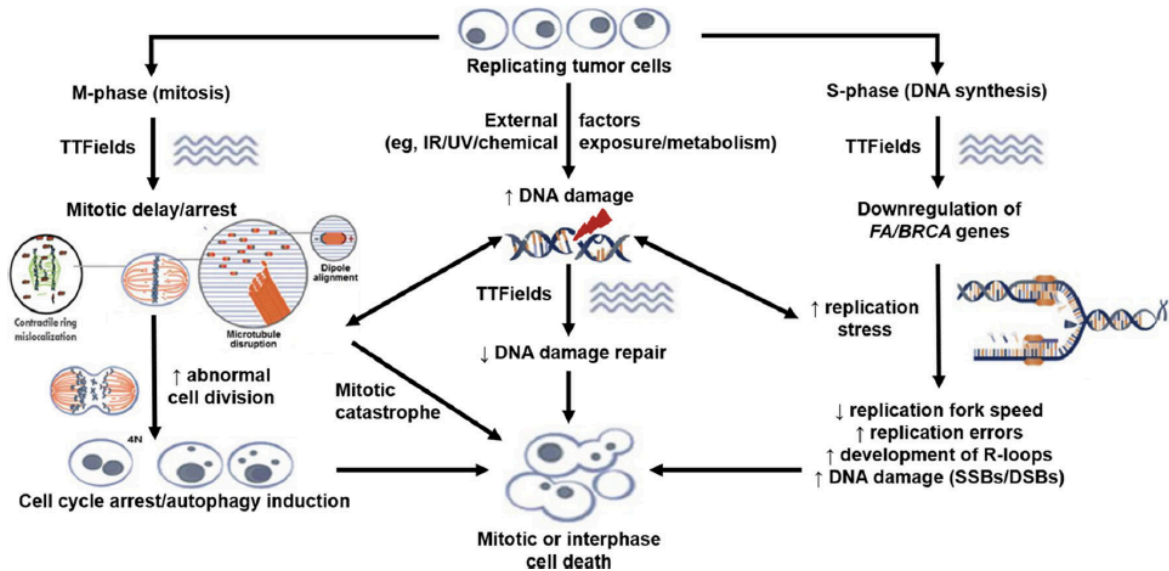


Figure 5 : Combinaison des différents mécanismes d'action du TTFIELDS [123].

Cette combinaison de mécanismes fait de cette technique une approche intéressante en complément de la chimiothérapie actuelle adjuvante pour le traitement des GBM permettant ainsi une synergie thérapeutique. Les champs électromagnétiques utilisés vont de manière sélective détruire les cellules cancéreuses et épargner au maximum les cellules saines. Par exemple pour l'effet antimittotique les champs électromagnétiques vont perturber les cellules en mitose en ciblant plusieurs phases du cycle et entrainer la mort cellulaire. En fonction du type de tumeur une certaine fréquence sera utilisée pour optimiser l'efficacité du TTFIELDS tandis que l'intensité dépend de la position de la tumeur et de l'impédance des tissus environnants. Le dispositif sera placé différemment d'un patient à l'autre sur la tête en fonction de la localisation de la tumeur. Pour déterminer le positionnement optimal du dispositif, un logiciel approuvé par la FDA est utilisé, Novocure Patient Transducer Array Layout (NovoTAL™), afin d'établir une cartographie à l'aide d'un algorithme bien défini selon l'emplacement et la taille de la tumeur déterminés par IRM. De plus, la fréquence utilisée est différente de celle retrouvée dans les nerfs ou les muscles ce qui permet de les épargner. Une amélioration de la survie globale médiane a été observée, 21 mois avec l'association du TMZ adjuvant et du TTFIELDS contre 16 mois avec le TMZ seul. De même pour la survie sans progression à 6 mois qui était de 56% avec l'association contre 37% avec le TMZ adjuvant seul. L'effet indésirable

le plus courant à l'utilisation du TTFields sont les irritations cutanées qui peuvent être traitées par des corticostéroïdes, par le déplacement d'un ou deux cm du dispositif ou bien en faisant une pause sur l'utilisation du TTFields. L'utilisation de cette nouvelle approche thérapeutique reste intéressante pour le traitement des GBM par son effet synergique avec le protocole utilisé actuellement tout en limitant la toxicité amenant à un rallongement de la vie des patients atteints de GBM [123].

d. Thérapies ciblées

De nombreuses recherches sont en cours afin d'identifier des cibles moléculaires pertinentes dans le traitement du GBM. De nombreuses altérations sont rencontrées au sein des GBM, un large panel de cibles thérapeutiques s'offre à la recherche pour le développement d'une éventuelle thérapie ciblée. Seul le bévacizumab décrit précédemment, ciblant la voie angiogénique *via* le VEGF, a été approuvé dans le traitement des GBM récurrent, utilisé seul ou en association afin d'améliorer la qualité de vie des patients [124, 125].

Les altérations moléculaires les plus fréquentes dans les GBM sont très étudiées telles que les altérations de l'EGFR, la mutation de PTEN ou encore la mutation ponctuelle de la voie PI3K/AKT [126, 127]. L'amplification de l'EGFR est l'altération la plus étudiée pour les thérapies ciblées dans le GBM. Un essai clinique de phase II a récemment été mené avec un inhibiteur de l'EGFR associé au TMZ. Les résultats obtenus étaient assez encourageant pour les GBM récurrents ; cependant lors de la phase III cette association a été abandonnée car il n'y avait aucune amélioration significative de la survie globale [128, 129]. Un inhibiteur de la voie PI3K (Buparlisib) a également été étudié en essai clinique de phase II. Une légère amélioration a été observée due à une inhibition incomplète de la voie PI3K limitant l'efficacité de cet inhibiteur malgré une bonne pénétration de la BHE. Cela est probablement dû à une spécificité de l'inhibiteur insuffisante [130]. Un essai clinique a été réalisé chez une patiente atteinte de GBM et porteuse d'une amplification du gène c-MET, un récepteur à tyrosine kinase. Cette patiente nouvellement diagnostiquée avait suivi le protocole thérapeutique habituel (protocole de Stupp) puis une thérapie anti-angiogénique. Malheureusement, la progression tumorale se poursuivait. En étudiant le profil moléculaire de la tumeur, la détection de l'amplification du gène c-MET a permis l'intégration de cette patiente dans un essai clinique évaluant l'intérêt d'un inhibiteur de MET, le crizotinib. Une amélioration clinique rapide et durable a été observée avec notamment une diminution de la taille tumorale. Cependant, le traitement a été stoppé au bout de 6 mois à cause du développement d'une thrombose veineuse. Cet essai clinique a mis

en lumière l'importance de la médecine personnalisée, nécessitant l'intégration d'une étude du profil moléculaire longitudinal des tumeurs de patients afin d'optimiser l'utilisation des thérapies ciblées [131].

e. Immunothérapies

Un autre type d'altération est observé dans les GBM se sont les altérations liées au système immunitaire. Il a été montré que les cellules des GBM portaient à leur membrane PD-L1, qui se fixera à la protéine PD-1 portée par les lymphocytes [132]. Cela va entraîner l'inhibition de ces lymphocytes et va ainsi permettre aux cellules tumorales d'échapper au système immunitaire. PD-L1 est exprimé dans 88% des GBM nouvellement diagnostiqués et dans 72% des GBM récurrents [133]. De ce fait, l'immunothérapie apparaît comme un axe de recherche intéressant pour les GBM. Il existe différents anticorps dirigés contre ces protéines du système immunitaire tels que le pembrolizumab ou encore le nivolumab qui ont déjà fait leur preuve dans d'autres cancers comme le cancer du poumon, du colon ou le mélanome [134]. Un essai clinique de phase III de Checkmate 143 a comparé l'utilisation du nivolumab et du bévacizumab en monothérapie chez des patients atteints de GBM (369 patients) après avoir été traités avec le protocole de Stupp. Il a été observé qu'il n'y avait pas d'amélioration notable de la survie globale par rapport à l'utilisation du bevacizumab c'est pourquoi il a été arrêté. Cependant un sous ensemble de patients (8%) a bien répondu au nivolumab avec une durée de réponse plus importante, 11 mois pour le nivolumab contre 5 mois pour le bévacizumab [135, 136]. Une raison envisageable à cet échec est une diminution des lymphocyte T (lymphopénie) exprimant PD-1 causée par la radiothérapie ce qui diminuerait l'efficacité du nivolumab [137].

Malgré les nombreuses études sur les thérapies ciblées celles-ci restent peu efficaces. L'hétérogénéité inter- et intratumorale des GBM ainsi que la capacité d'adaptation des cellules de passer d'un profil à un autre par remodelage moléculaire est probablement la cause de cette inefficacité des thérapies ciblées. L'inhibition d'une voie sera compensée par une autre voie. C'est pourquoi une combinaison de traitement serait plus efficace afin de cibler un groupe d'altérations moléculaires. Une autre approche de la thérapie ciblée serait de contrer la source de cette hétérogénéité, les cellules souches de GBM qui possèdent une grande capacité d'adaptation et d'initiation de tumeur favorisant l'hétérogénéité.

8. Résistances thérapeutiques

Le traitement des GBM reste un défi thérapeutique pour plusieurs raisons. La première est corrélée à sa localisation, le cerveau étant l'organe le plus délicat à traiter car il est protégé par la BHE qui limite les options de traitement [138]. De plus, une résection complète de la masse tumorale par chirurgie est très limitée étant donné le risque d'engendrer des troubles neurologiques ou cognitifs. Environ 35% des patients sont inopérables dû à la localisation de la tumeur. Dans ces cas, une simple biopsie est réalisée afin d'établir le diagnostic [139]. Enfin, la résistance thérapeutique des GBM résulte de leur importante hétérogénéité histologique et moléculaire inter- et intratumorale. De nombreuses altérations moléculaires (amplification de l'EGFR, mutation de PTEN...) sont retrouvées dans les GBM. Différentes combinaisons de ces altérations entraînent la présence de différents sous-types de GBM. Ces derniers ne répondent pas de la même façon aux thérapies employées, certaines cellules peuvent être sensibles, d'autres résistantes. Cette hétérogénéité est également le résultat d'une plasticité cellulaire. Cela est le cas notamment pour les CSC qui sont décrites comme étant très plastiques et hautement tumorigéniques. Grâce à leur capacité d'adaptation au microenvironnement et au traitement ces CSC peuvent passer du sous-type mésenchymal au proneural et inversement, d'un état souche à un état différencié et inversement, tout ceci entretient la caractéristique hétérogène du GBM, responsable de la résistance thérapeutique [17, 140]. Le GBM est également une tumeur hautement invasive et envahie le parenchyme cérébral sain. C'est ce caractère invasif qui rend difficile la résection complète de la tumeur [141–144].

II. Cellules souches de glioblastome

1. Cellules souches neurales

Les GBM peuvent se développer à partir de différents types de cellules initiatrices qui sont les astrocytes, les cellules précurseurs des oligodendrocytes ou les cellules souches neurales (CSN). Plusieurs arguments soutiennent que les CSN correspondent aux cellules à l'origine des cellules souches de GBM (CSG) par leurs similitudes : présence de marqueurs des CSN, capacité d'auto-renouvellement et différenciation en cellules gliales. De plus, il a été montré que la gliomagenèse était localisée dans 93% des cas au niveau de la zone sous-ventriculaire au sein de laquelle nichent les CSN [145–147]. Il a également été montré que ces CSN peuvent donner naissance à des cellules progénitrices d'oligodendrocytes et d'astrocytes qui par la suite peuvent générer des gliomes. Ces cellules initiatrices de tumeur ou CSG sont en minorité au sein de la tumeur (1 à 30%) mais suffisent à engendrer une récurrence en raison de leur capacité de résistance aux traitements et de leurs propriétés tumorigéniques [148, 149].

2. Transformation des CSN en cellules souches cancéreuses

De manière générale, les CSG suivent quasiment le même schéma de programmation hiérarchique que les cellules souches normales. Ces CSG peuvent résulter de différentes mutations survenant au sein des cellules souches normales qui entraînent l'oncogenèse de ces dernières, mais elles peuvent également résulter de la dédifférenciation de cellules tumorales (retour des cellules différenciées à des cellules à l'état souche) qui acquièrent des altérations moléculaires sous la pression du microenvironnement tumoral et donneront aux cellules des propriétés de cellules souches. Ces deux phénomènes de transformation des cellules en CSG co-existent et favorisent l'hétérogénéité tumorale. À la différence des CSN, les CSG se différencient directement en cellules plus matures sans passer par les étapes de progéniteurs. On se retrouve alors avec une différenciation cellulaire aberrante (Figure 6) [150, 151].

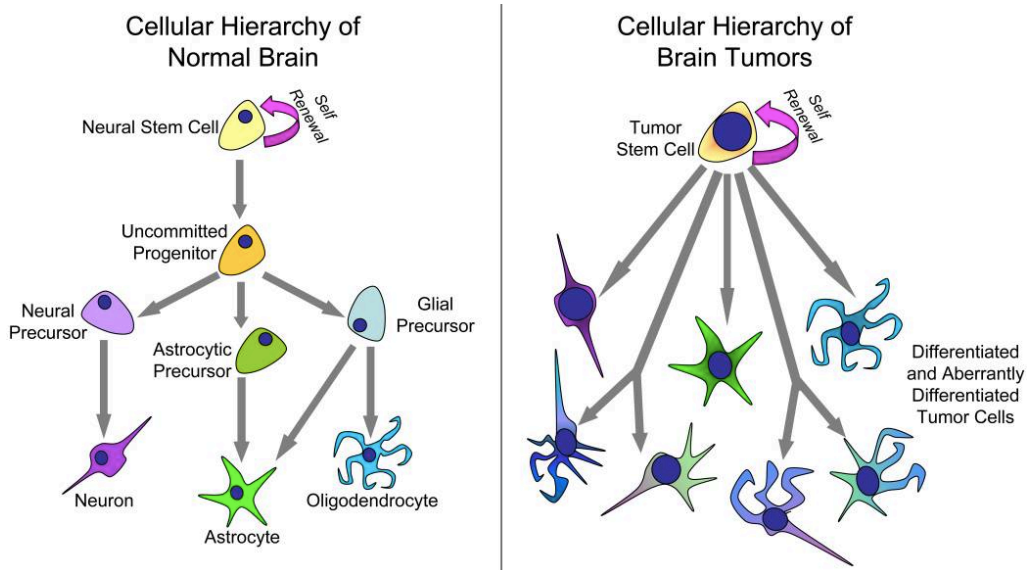


Figure 6 : Modèles hiérarchiques des CSN et des CSG [150].

3. Caractéristiques des CSG

Lors de la transformation tumorale les cellules souches vont subir une régulation dynamique et acquérir en plus de leurs caractéristiques de base, tels que l'auto-renouvellement, la capacité à se différencier en différentes populations de cellules cancéreuses et la capacité à initier une tumeur (propriété tumorigénique). Ces CSG ont une prolifération persistante et permettent d'entretenir la progression tumorale (Figure 7) [79, 152].

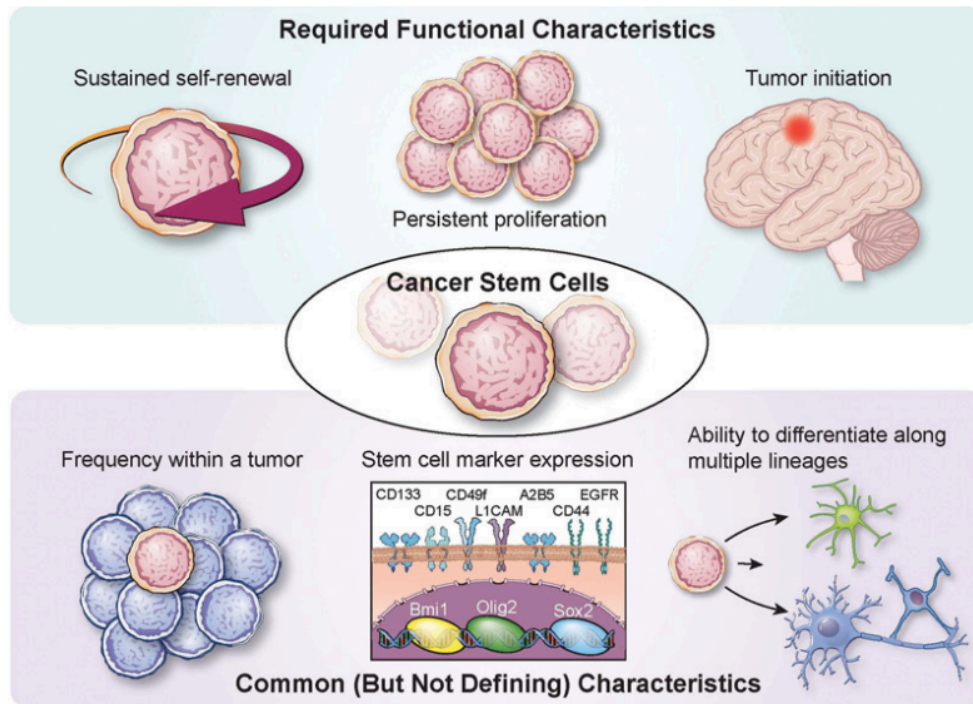


Figure 7 : Caractéristiques fonctionnelles des CSG [79].

a. Auto-renouvellement

L'auto-renouvellement des CSG est la capacité de se diviser complètement à l'identique par division asymétrique afin de conserver un stock de cellules souches [153, 154]. *In vitro*, cette caractéristique d'auto-renouvellement est démontrée par la capacité des CSG à reformer des neurosphères en suspension après leur dissociation en présence d'un milieu adéquat, c'est-à-dire dans un milieu de culture dépourvu de SVF et supplémenté de facteurs de croissance, l'EGF et le FGF qui favorisent leur prolifération cellulaire et empêche leur différenciation [155, 156]. Cette caractéristique est également démontrée par le test de dilution limite qui consiste à ensemercer une faible densité de cellules allant de 1 à 200 cellules, après dissociation de ces dernières, et d'évaluer leur capacité à reformer des neurosphères. L'activation constitutive des voies NOTCH, Wnt et Hedgehog (HH) dans les CSG permet le maintien de l'auto-renouvellement et la prolifération cellulaire [154, 157].

b. Différenciation

La différenciation des CSG correspond à un phénomène de division cellulaire asymétrique aboutissant à des cellules tumorales différenciées de type astrocytes ou oligodendrocytes. Ce sont les cellules différenciées qui formeront la masse tumorale. *In vitro*, la différenciation des CSG est permise *via* la culture des cellules dans un milieu supplémenté en SVF et sans facteurs de croissance. Les cellules différenciées se cultivent en monocouche adhérente et non sous forme de neurosphères en suspension. Elles présentent des marqueurs spécifiques en fonction du type de cellules considéré. Les cellules qui se différencient en cellules tumorales de type astrocytes exprimeront la GFAP (Glial fibrillary acidic protein), les cellules qui se différencient en oligodendrocytes exprimeront la galactocérébroside-C (Galc) ou OLIG2 et les cellules qui se différencient en cellules de type neuronale exprimeront TUBB3 (Tubulin beta 3 class III) [157, 158]. De plus, il a été montré que la différenciation des CSG serait régie par les protéines BMPs (Bone Morphogenetic protein), par exemple la protéine BMP7 qui favorise la différenciation astrocytaire et la migration des cellules de GBM [159–162].

Il a été montré par l'équipe de JN. Rich [163], qu'il existe une coopération entre les CSG et leurs congénères différenciés. Une co-implantation de CSG et de cellules différenciées *in vivo* a permis de former de plus grosses tumeurs et a réduit la survie des souris par rapport à l'implantation de CSG seules. Cette coopération est possible grâce à la voie de signalisation BDNF/NTRK2/VGF. Il a été montré que les cellules différenciées expriment le facteur neurotrophique dérivé du cerveau, le BDNF qui joue un rôle dans la neurogenèse, tandis que les

CSG expriment son récepteur, le NTRK2. L'activation du NTRK2 au niveau des CSG va entraîner une activation de la voie PI3K/AKT qui va induire une augmentation du facteur de croissance neural, le VGF. Cette expression du VGF résultant de la coopération des CSG et de leur congénères différenciés aura pour conséquence une augmentation de la croissance des CSG ainsi que leur auto-renouvellement par régulation autocrine mais également le maintien de la survie des cellules différenciées de GBM par une régulation paracrine [163].

c. Tumorigenèse

La tumorigenèse est la capacité des CSG à initier la formation d'une nouvelle tumeur qui ressemble à la tumeur initiale [164, 165]. Cette caractéristique tumorigénique des CSG est démontrée *in vivo* par transplantation de CSG en série chez l'animal immunodéprimé (souris NUDE ou NOD-SCID) par xélogreffe orthotopique. Une tumeur va se former et sera prélevée. Les cellules seront dissociées puis à nouveau injectées dans l'animal. Après chaque transplantation des CSG on observe la formation d'une nouvelle tumeur. De plus contrairement aux cellules différenciées, les CSG sont capables d'initier la formation d'une tumeur par injection d'une faible densité cellulaire [157].

d. Expression de marqueurs de CSG

Il existe différents types de marqueurs pour les cellules souches, tels que les facteurs de transcription Sox2, Nestin, Oligo2 ou encore c-Myc, mais également des marqueurs de surface plus faciles à détecter tels que CD133, CD44, l'intégrine $\alpha 6$ et A2B5 [166]. Ce dernier s'est avéré être un très bon marqueur des CSG. Un intérêt thérapeutique a été porté sur A2B5 pour cibler les CSG [167]. CD133 est le marqueur le plus utilisé, une glycoprotéine exprimée par les CSN et les CSG. Son expression diminue dans les cellules plus différenciées. CD133 est également utilisé comme marqueur pour isoler les CSN et les CSG par FACS [168]. Cependant, la présence de faux positifs est possible étant donné que les marqueurs ne sont pas spécifiques des CSG [169]. C'est pourquoi, afin de confirmer le caractère souche d'une cellule, il est important de combiner l'évaluation de la présence de plusieurs marqueurs et caractéristiques des CSG comme leur capacité à former des neurosphères *in vitro* ou leur capacité tumorigéniques *in vivo* [79]. De plus l'utilisation de CD133 pour l'isolement des CSG est controversée en raison de la présence d'une sous-population de cellules souches CD133 négatives soulignant l'hétérogénéité tumorale des GBM. Cette sous-population négative pour CD133 était retrouvée dans le sous-type mésenchymal tandis que les CD133 positives dans le

sous-type proneural [169–172]. Récemment il a été montré que ces marqueurs de surfaces des CSG ne représentent pas seulement un type de cellules capables d’initier une tumeur, mais plutôt un état cellulaire à un moment donné qui peut évoluer en fonction du microenvironnement. Cette capacité d’adaptation des CSG face au microenvironnement favorise l’hétérogénéité intra- et intertumorale de ces marqueurs ne permettant pas clairement de définir l’identité d’une cellule souche [173].

4. Localisation préférentielle des CSG

Les CSG sont essentiellement régulées par des mécanismes extrinsèques, en fonction de leur localisation et de leur besoin. En effet, les CSG vont développer des stratégies pour maintenir leur état souche et permettre une augmentation de leur prolifération qui a pour conséquence le maintien de la croissance tumorale. Pour cela, les voies préférentiellement sollicitées par les CSG sont les voies Wnt, Notch et NF- κ B. Les stratégies d’adaptations développées par les CSG se font en fonction du microenvironnement dans lequel elles se trouvent [174]. C’est pourquoi pour développer ces différentes stratégies en fonction de leurs besoins, les CSG vont résider au sein de différentes niches de la tumeur afin de favoriser l’activation de ces voies de signalisation et les caractéristiques des CSG. La voie Notch par exemple, qui favorise l’état souche des cellules en jouant un rôle important dans le développement neuronal en inhibant la différenciation cellulaire, a pour particularité de converger vers différentes voies tels que la voie hypoxique ou encore la voie des ROS (reactive oxygen species) dans les zones périvasculaires pour entraîner son activation [175, 176]. Par conséquent l’un des régulateurs extrinsèques clé des CSG est le microenvironnement tumoral dans lequel elles résident qui va aider les CSG à favoriser certaines voies ou caractéristiques grâce à leur capacité d’adaptation. Ainsi les CSG résident dans deux types de niches principalement : les niches périvasculaires et les niches hypoxiques (Figure 8).

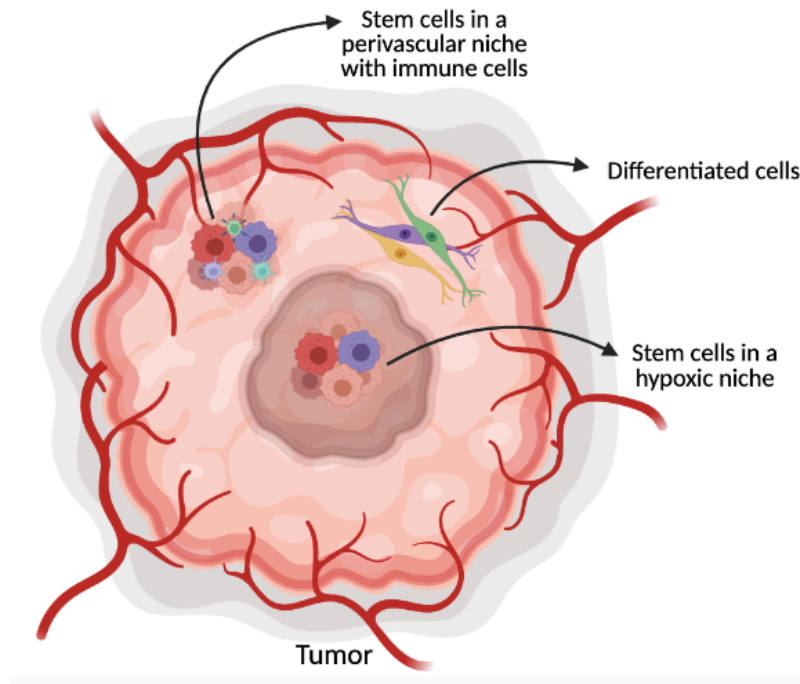


Figure 8 : Représentation schématique de la composition d'une tumeur de GBM.

Les CSG résident au sein de niches hypoxiques mais également au sein de niches péryvasculaires avec la coopération de cellules immunitaires, les TAM (recrutement des macrophages M2 et production de lymphocytes T régulateurs). Les CSG peuvent également se différencier et donner des cellules plus matures qui formeront le corps de la tumeur. Figure créée avec <https://biorender.com/>.

a. Niches péryvasculaires

Calabrese et *al.* ont montré en 2007 [177] que les CSG résident au sein de niches péryvasculaires pour entretenir une relation avec le système vasculaire par le biais d'une sécrétion de facteurs pro-angiogéniques notamment le VEGF, l'angiogenèse étant l'une des caractéristiques du GBM. Ces niches péryvasculaires, créées par la micro-vascularisation tumorale, aident au maintien des CSG en favorisant leur auto-renouvellement et la croissance tumorale [177]. Cela est possible notamment par l'expression et la forte activité des récepteurs Nocth1 et Notch2 présents à la surface des CSG résidant dans ces niches péryvasculaires. Ces derniers sont activés par les cellules endothéliales adjacentes qui expriment en surface leurs ligands, DLL4 et JAG-1, aboutissant à l'activation de la voie Notch [178]. On observe donc une coopération entre les cellules endothéliales et les CSG au sein des niches péryvasculaires pour le maintien de l'auto-renouvellement des CSG. De plus, il a été montré que l'inhibition de ces ligands en surface des cellules endothéliales entraîne une diminution de la croissance tumorale ce qui confirme le rôle important de la coopération des cellules endothéliales avec les CSG [178]. L'intégrine $\alpha 6$ joue également un rôle important dans la régulation des CSG dans les niches péryvasculaires. En effet, elle favorise l'ancrage des cellules au sein des niches péryvasculaires par le biais de la

laminine, protéine constituant la matrice extracellulaire, composant important de cette niche et de l'environnement tumoral [179]. Une importante expression du TGF- β a également été observé au sein de ces niches périvasculaires favorisant les voies de réparation de l'ADN [180]. Cette augmentation du TGF- β entraîne également une augmentation de l'expression de MMP9 (métalloprotéinase matricielle 9) qui favorise l'invasion tumorale par les CSG et accentue le caractère très invasif de cette niche vers le parenchyme cérébral sain et donne lieu à une tumeur infiltrante [181].

L'une des caractéristiques clé pour la progression tumorale des cancers est de manière générale l'immunosuppression pour permettre aux cellules tumorales de contourner le système immunitaire et ainsi favoriser le développement de la tumeur. Il a été montré que les CSG modulent le système immunitaire à leur avantage [182]. Celle-ci vont induire des lymphocytes T régulateurs afin d'éliminer les lymphocytes T cytotoxiques mais également inhiber leur production [183, 184]. Les CSG peuvent également échapper au système immunitaire par la sécrétion de vésicule extracellulaire possédant PD-L1 [185]. Elles vont également entraîner un phénotype immunosuppresseur par le biais du recrutement de macrophages M2 en sécrétant des facteurs tels que l'IL-10 ou le TNF- β . Cela va permettre de favoriser la croissance tumorale et donc un phénotype malin du GBM. Ce phénotype immunosuppresseur est favorisé par les CSG qui résident au sein des niches périvasculaires où est retrouvé un taux élevé de macrophages M2 [186]. Les macrophages associés aux tumeurs (TAM) (macrophages M2 et microglie) représentent la plus grande partie des cellules infiltrantes, 30% de la masse tumorale. Ces TAM vont infiltrer la tumeur lors de la rupture de la BHE et sont présents en grande majorité dans le GBM par rapport aux gliomes de bas grade. Cette accumulation est également facilitée grâce à la capacité immunomodulatrice des CSG qui vont sécréter du TGF- β . Ce dernier va désactiver et inhiber la prolifération des lymphocytes T cytotoxiques (LT CD4⁺). Cette accumulation des TAM est également facilitée par une expression élevée de MMP9 qui facilite le caractère invasive de la tumeur en modifiant la rigidité de la matrice extracellulaire [187–192]. Ce caractère inflammatoire ainsi que la présence des TAM va favoriser une signature mésenchymale des GBM le sous-type le plus agressif et infiltrant [193, 194].

b. Niches hypoxiques

Malgré la présence des niches vasculaires la prolifération importante de la tumeur va entraîner des zones dépourvues en oxygène formant des niches hypoxiques représentant 0,1 à 10% de la masse tumorale. On retrouve des zones à hypoxie modérée avec des taux en oxygène entre 2,5% et 0,5% et des zones à hypoxie sévère avec une concentration en oxygène entre 0,5% et 0,1% contre un taux en oxygène normal compris entre 12,5% et 2,5% d'O₂ dans le tissu cérébral sain. Ainsi, pour l'étude de l'hypoxie dans les GBM des taux en oxygène de 5% peuvent modéliser les taux physiologiques retrouvés dans le cerveau sain et des taux compris entre 2,5% et 0,5 % peuvent modéliser les concentrations retrouvées en grande majorité dans le GBM. De plus lors de l'étude histologique, les zones de nécrose (conséquence de l'hypoxie) sont des caractéristiques pour le diagnostic d'un GBM [195]. Les CSG qui résident au sein de ces niches auront alors une activation de la voie hypoxique par une induction de facteurs de transcription induit par l'hypoxie, HIF-1 α et HIF-2 α principalement. Ces HIFs sont sous forme hétérodimérique, composés d'une sous-unité β nucléaire, aussi appelée ARNT (Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator), qui n'est pas sensible à l'oxygène et d'une sous-unité α cytosolique qui est régulée en fonction du taux en oxygène. Ainsi, en fonction de la concentration en oxygène, cette dernière sera soit dégradée par le protéasome en condition normoxique soit transloquée dans le noyau en condition hypoxique (Figure 9) [196]. HIF-1 α et HIF-2 α présentent une homologie structurelle mais sont régulés différemment en fonction du temps d'exposition et du taux en oxygène rencontré. HIF-1 α est très rapidement dégradé lorsque le taux en oxygène augmente et est présent à des taux en oxygène plus restreint. A l'inverse, HIF-2 α est beaucoup plus stable et est présent à des taux en oxygène plus large [197, 198]. Il a été montré dans le neuroblastome qu'un sous ensemble de cellules souches présent dans la niche périvasculaire exprimaient HIF-2 α dans des conditions normoxiques (21% d'O₂) [199, 200]. Il a également été montré une localisation préférentielle de HIF-2 α dans le noyau des cellules contrairement à HIF-1 α qui serait localisé dans le noyau et dans le cytosol. Ce qui suggère une utilisation préférentielle de HIF-2 α par les CSG [201, 202]. Cette utilisation préférentielle de HIF-2 α par les CSG leurs permet de maintenir un état de cellule souche et favorise leur capacité tumorigénique [203, 204]. Il est intéressant de noter qu'une inhibition de l'expression de HIF-2 α entraîne une diminution du phénotype souche des cellules de GBM et resensibilise les cellules au TMZ [205].

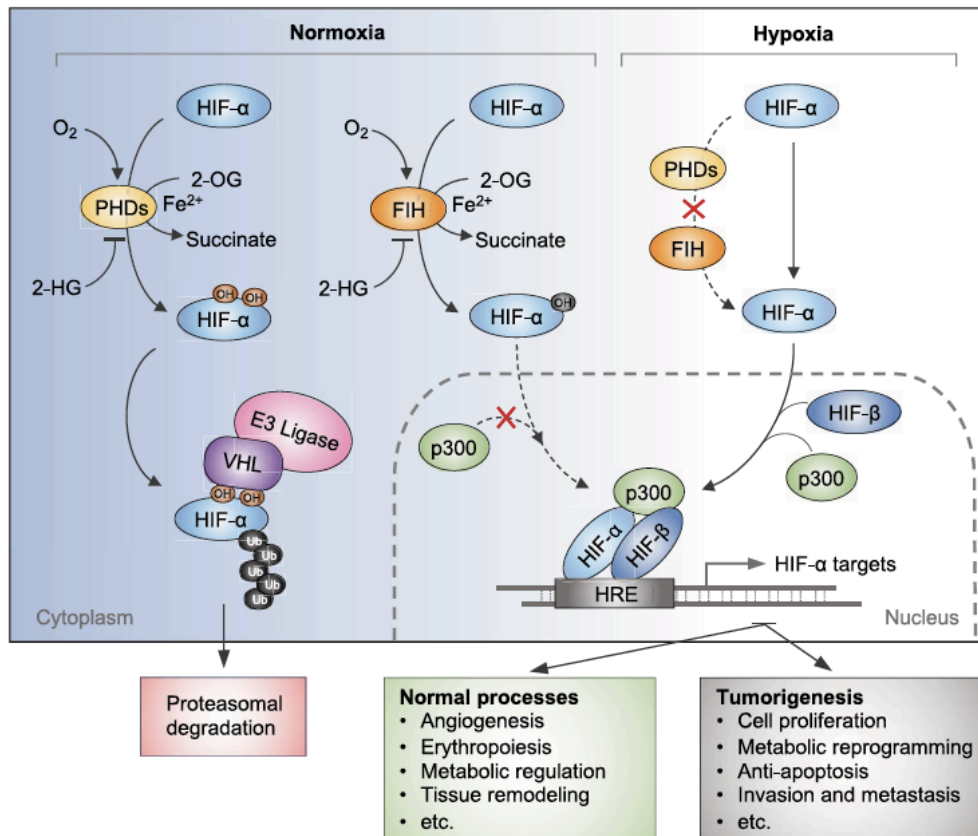


Figure 9 : Voie de signalisation de l'hypoxie en fonction du taux en oxygène.

En normoxie on observe une hydroxylation de HIF- α par la prolyl-hydroxylase (PHD) suivi d'une ubiquitinylation par le suppresseur de tumeur VHL (Von Hippel-Lindau) qui entraîne une dégradation de HIF- α par le protéasome. En hypoxie la PHD est inhibée, HIF- α n'étant plus hydroxylé il ne sera pas dégradé mais stabilisé. Ce dernier va s'accumuler dans le cytosol et sera transloqué dans le noyau pour se dimériser avec HIF- β (ou ARNT). Le dimère formé va s'associer à son cofacteur p300/CBP pour pouvoir se fixer aux éléments de réponse à l'hypoxie (HRE) et induire la transcription de certains gènes cibles tels que le VEGF ou GLUT1 [196].

L'activation de la voie hypoxique aura pour conséquence la transcription de certains gènes qui jouent un rôle important dans la biologie des cancers comme le maintien du phénotype souche des cellules par le biais d'une expression accrue de facteurs souches tels que SOX2, OCT4, MYC ou encore NANOG, mais également un rôle dans la reprogrammation du métabolisme, l'auto-renouvellement, la prolifération, la survie cellulaire ou encore l'angiogenèse par une augmentation de la transcription du VEGF [182]. La plasticité cellulaire et donc, la capacité d'adaptation des CSG en fonction de leur microenvironnement, leur permet de pallier les restrictions nutritives en glucose rencontrées dans ces niches hypoxiques, par une augmentation de l'expression des gènes de la glycolyse. Cela va entraîner une captation du glucose des cellules environnantes plus importante aboutissant à une accumulation de lactate responsable d'un phénotype plus agressif du GBM [206, 207]. Ce changement métabolique aura pour

conséquence la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui favorisera la progression tumorale et la synthèse d'acide nitrique dépendant de l'oxyde nitrique synthase 2 [208]. Ces différents phénomènes induits par l'hypoxie vont l'entretenir par une pseudo-hypoxie qui va stabiliser les HIFs. En effet comme vu dans le chapitre précédant, cette pseudo-hypoxie est la conséquence d'une formation de néovaisseaux anormaux et sinueux lors de la néoangiogenèse. Cette dernière va entraîner un débit en oxygène ralenti, et à mesure que la tumeur continue de proliférer, une hypoxie progressive va se former et entretenir les niches hypoxiques. Ce qui fait de ces dernières un lieu propice au développement des CSG pour le maintien de leur phénotype souche.

Il est intéressant de noter, que les niches périvasculaires et hypoxiques coopèrent pour favoriser la croissance tumorale. Par exemple, l'activation de la voie hypoxique va entraîner la transcription du gène pro-angiogénique le VEGF et favoriser la formation de néovaisseaux pour maintenir la croissance tumorale par un apport en nutriment via ces néovaisseaux [203, 204]. Les CSG sont donc capables de remodeler et de s'adapter au microenvironnement en fonction de leurs besoins pour faciliter leur prolifération et échapper aux thérapies. Tout ceci promeut l'hétérogénéité tumorale retrouvée dans les GBM.

5. Plasticité et hétérogénéité

Un premier modèle responsable de l'hétérogénéité tumorale a été proposé en considérant l'hypothèse de l'évolution clonale aussi appelé modèle stochastique. Il a été considéré que l'initiation tumorale se fait à partir d'une évolution monoclonale, c'est-à-dire à partir de n'importe quelle cellule qui, au fil des divisions, va acquérir des altérations génomiques et épigénétiques. Cela va favoriser la transformation tumorale par l'acquisition de ces différentes mutations « drivers » et entraîner une hétérogénéité moléculaire par la diversité génétique. De plus, cette évolution clonale subit des pressions de sélection en favorisant les clones résistants à la chimiothérapie ou à la radiothérapie. Dans cette hypothèse de l'évolution clonale toutes les cellules tumorales auraient le même potentiel tumorigène [209–211].

Un autre modèle a été proposé comme étant responsable de l'hétérogénéité tumorale des GBM, celui du modèle hiérarchique des CSG. Cette théorie conforte celle de la programmation hiérarchique à partir d'une sous-population de CSG capable d'autorenouveaulement, de tumorigenèse et de différenciation. Ce modèle hiérarchique est impacté par le

microenvironnement et les différents facteurs rencontrés donnant naissance à des cellules plus différenciées avec diverses altérations moléculaires caractéristiques qui formeront la tumeur. Récemment il a été montré grâce à la technique du single cell que les CSG se développent en suivant le programme de neurodéveloppement normal et que ce modèle hiérarchique contient des cellules progénitrices avec une division cellulaire rapide et une importante capacité tumorigénique [212].

Ces deux modèles responsables de l'hétérogénéité tumorale pourraient être complémentaires dans la croissance de la tumeur (Figure 10) [209].

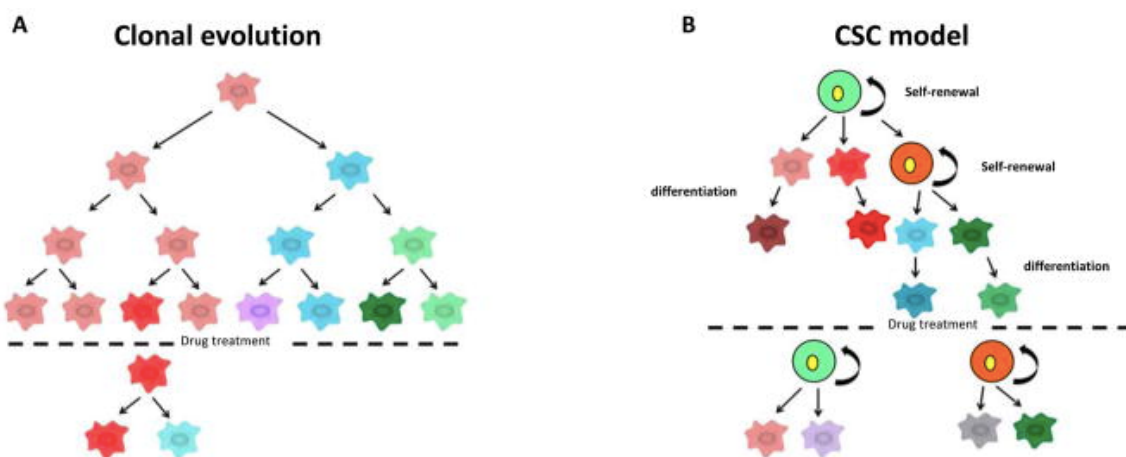


Figure 10 : Modèles d'hétérogénéité tumorale.

A. Représentation du modèle clonal responsable de l'hétérogénéité tumorale par le biais d'une pression de sélection avec acquisition d'altérations génomiques. B. Représentation du modèle hiérarchique des CSG capable d'autorenouveau, de tumorigenèse et de différenciation qui sera la cause d'une hétérogénéité moléculaire selon les facteurs rencontrés dans le microenvironnement pour pouvoir s'adapter [209].

Pendant longtemps il était considéré que les cellules souches une fois différenciées ne pouvaient plus revenir à un état souche. Cependant, il a été montré que les cellules cancéreuses de GBM étaient dotées d'une grande plasticité cellulaire et qu'en fonction des facteurs rencontrés dans le microenvironnement les cellules différenciées pouvaient se dédifférencier et repasser à l'état de cellule souche. C'est en conservant cette grande plasticité cellulaire que les CSG peuvent se différencier de manière bidirectionnelle afin de s'adapter au microenvironnement tumorale et passer d'un état de cellules souches à un état de cellules différenciées et inversement [213, 214]. Neftel *et al.* avaient également observé la capacité des cellules à passer d'un sous-type à un autre (mésenchymal/proneural/classique) appuyant cette caractéristique de plasticité des CSG récapitulant l'hétérogénéité des GBM [78, 81] (Figure 11). Un tel phénomène de

dédifférenciation est favorisé dans les niches hypoxiques notamment car comme vu plus haut les milieux restreints en oxygène favorisent l'expression de facteurs souches tels que les facteurs de transcriptions Sox2, Oct4, c-Myc ou encore Nanog qui favorisent l'état indifférencié des cellules [215–218]. Une différence a également été observée entre la biopsie des tumeurs de GBM primaires et les tumeurs de GBM récurrentes au niveau moléculaire. Cette différence serait dû à un phénomène d'hypermutation acquis lors du traitement [219, 220]. Il a été montré que les CSG ont la capacité de passer dans un état de quiescence lors du traitement puis de quitter cet état et entraîner une récurrence tumorale [221]. Cela soutient la capacité d'adaptation et de plasticité des CSG face à la thérapie et au microenvironnement tumoral. Cette plasticité cellulaire réversible est l'une des causes de la grande hétérogénéité retrouvée dans les GBM [78, 173, 203, 222].

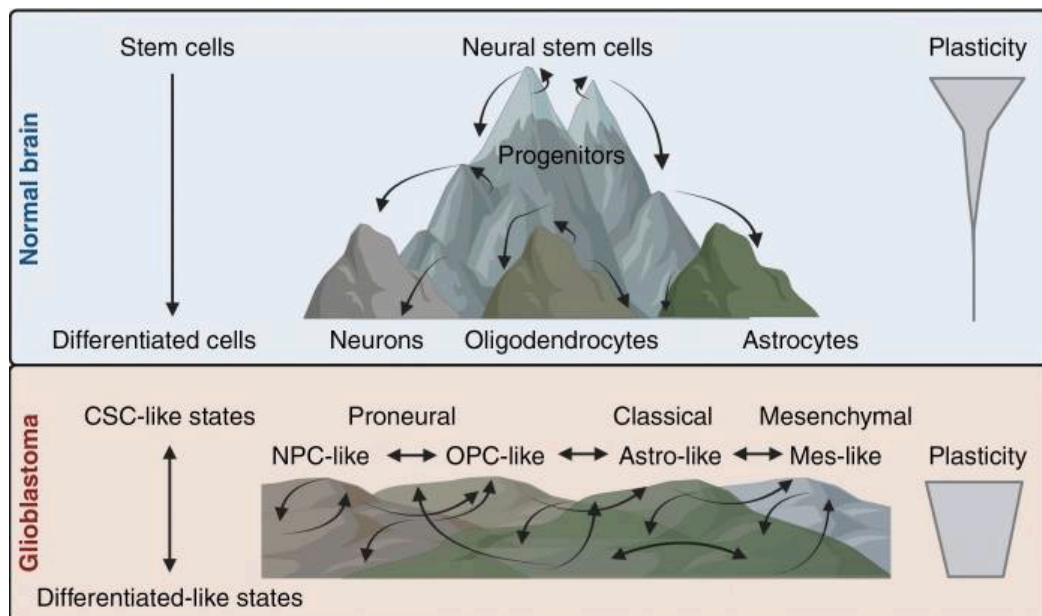


Figure 11 : Schématisation de la plasticité des cellules souches neurales et de GBM.

Dans le cerveau sain, les cellules souches neurales se différencient de manière unidirectionnelle et ont leur plasticité qui diminue au fur et mesure de la différenciation cellulaire. À l'inverse, les CSG se différencient de manière bidirectionnelle et conservent une grande plasticité cellulaire leur permettant de passer d'un état de cellules souches à un état de cellules différenciées et inversement ou de passer d'une sous-classe à une autre [214].

Toutes ces sources d'hétérogénéité, l'évolution clonale par la diversité génétique, le modèle hiérarchique des CSG, la plasticité des cellules cancéreuses à passer d'un état à un autre et l'impact du microenvironnement sur le développement tumoral, co-existent et favorisent la diversité histologique, moléculaire et phénotypique des GBM [140, 223, 224].

6. CSG et résistance thérapeutique

Comme nous venons de le voir, les CSG se trouvent au sommet du programme hiérarchique et contribuent à l'hétérogénéité moléculaire grâce à leurs différentes caractéristiques. Ces dernières ont la capacité d'être dans un état de quiescence leur permettant d'échapper à la thérapie et au système immunitaire. Les CSG qui ne sont pas éliminées lors du traitement suffisent à elles seules pour initier une nouvelle tumeur et entraîner une récurrence [221, 225, 226]. Elles vont favoriser certaines voies de signalisation, notamment les voies liées aux récepteurs à activité tyrosine kinase, qui vont initier le maintien de la croissance tumorale et rendre les cellules insensibles aux traitements. De plus, il a été montré que la résistance à la radiothérapie était conférée par les CSG qui accélèrent le processus de réparation des dommages causés à l'ADN [79].

a. Chimiorésistance

L'une des premières hypothèses concernant la résistance des cellules face à la chimiothérapie est en fonction du statut de méthylation de l'enzyme MGMT. Nous avons vu précédemment, que la méthylation de cette enzyme permet d'empêcher son action de réparation des dommages à l'ADN ce qui permet au TMZ d'éliminer les cellules cancéreuses. Cependant, cette hypothèse est souvent controversée. En effet, il a été montré que l'enzyme MGMT était présente au sein des CSG ce qui limite l'action du TMZ [227]. Mais il a également été montré, une diminution de l'activité de cette enzyme dans les CSG ainsi qu'une augmentation de la méthylation du promoteur MGMT [228]. D'autres mécanismes de résistance ont été démontrés comme le phénomène de Multi Drug Resistance (MDR) favorisé par l'augmentation d'expression des transporteurs ABC (ATP binding cassette) au niveau de la membrane qui va transporter les agents chimiothérapeutiques hors de la cellule. Cela est possible grâce à l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP, qui est amplifiée par l'augmentation de la voie Notch après traitement au TMZ [229]. De plus, il a été montré qu'une inhibition de la voie Notch couplée au TMZ entraîne une sensibilisation des cellules au traitement [230].

b. Radiorésistance

La radiothérapie est un traitement utilisé en oncologie pour détruire les cellules cancéreuses à l'aide de rayonnements ionisants. Ces derniers peuvent agir soit de manière directe sur les cellules par des cassures simples ou doubles brins au niveau de l'ADN, soit de manière indirecte par l'intermédiaire des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Cet effet indirect par les ROS

(radicaux hydroxyle ou les superoxydes) provient de la radiolyse de l'eau qui va entraîner un stress oxydatif au niveau des cellules, en plus de celui déjà engendré par l'effet direct [231].

L'efficacité de la radiothérapie est déterminée en fonctions des 4 R de la radiologie :

- La Réparation des dommages à l'ADN. Ces réparations de l'ADN sont réalisées de manière plus efficace par les CSG qui sont hautement résistantes aux rayonnements.
- La Redistribution des cellules dans le cycle cellulaire, c'est-à-dire qu'en fonction de la phase du cycle dans lequel les cellules se trouvent elles seront plus ou moins sensibles à la radiothérapie. Les cellules en phase G2/M sont plus sensibles par rapport aux cellules qui se trouvent en phase S qui présentent une importante radiorésistance.
- Le Repeuplement de la tumeur par les CSG grâce à leur capacité d'auto-renouvellement facilité par l'activation de la voie Notch et de prolifération importante en passant d'une division asymétrique à une division symétrique. Cette capacité de passer à une division symétrique permet de maintenir le stock de CSG contrairement à la division cellulaire asymétrique qui favorise l'hétérogénéité tumorale.
- La Réoxygénation des zones hypoxiques de la tumeur entre chaque séance de radiothérapie. En effet, la radiothérapie n'est pas réalisée en continu mais de façon fractionnée et la capacité de réoxygénation des zones hypoxiques permet d'améliorer les effets de la radiothérapie. Cette réoxygénation se fait grâce à la diminution de la pression tumorale et à la normalisation des vaisseaux suite au traitement [232].

Il a été montré que ces rayonnements ionisants entraînent un enrichissement de la sous-population de CSG en augmentant leur capacité de clonogénicité. Ces dernières mettent en œuvre des systèmes de résistances à ces rayonnements en s'adaptant et en mettant en place des mécanismes de réparation des dommages causés à l'ADN [233]. Ces mécanismes de réponses aux dommages à l'ADN (DDR) sont générés par les CSG *via* une cascade d'activation de protéines en fonction de l'altération engendrée. Dans un premier temps, elles vont activer des protéines senseurs qui vont détecter et se lier aux altérations radio-induites au niveau de l'ADN. Ces protéines vont envoyer un signal de réparation à des enzymes, les ATR (Ataxia Telangiectasia and RAD3-related) activées en cas de blocage de la réplication et/ou les ATM (Ataxia Telangiectasia mutated) activées en cas de cassures doubles brins de l'ADN. Ces enzymes vont à leur tour activer des protéines qui contrôlent le cycle cellulaire, les Chk1 et Chk2 (checkpoint kinase 1 et 2). Ces mécanismes de réparation mis en œuvre par les CSG sont

favorisés par l'augmentation de l'activité des ATM, Chk1 et Chk2 qui potentialisent les contrôles du cycle cellulaire par arrêt de celui-ci et permet une réparation plus efficace des lésions à l'ADN. La recombinaison homologue semble être le mécanisme préférentiellement sollicité par les CSG pour la réparation des lésions induites à l'ADN par les rayonnements ionisants. Cette préférence est notamment dû à une surexpression de RAD51 dans 50% des GBM [234].

c. L'hypoxie, un facteur clé de résistance pour les CSG

Le GBM est une tumeur très hypoxique avec la présence de CSG qui résident préférentiellement au sein des niches hypoxiques. Cette hypoxie va contribuer à la résistance thérapeutique en favorisant l'état souche des cellules, l'angiogenèse tumorale et l'expression de certains gènes de résistances tels que SOX2 ou MMP9 [235–237]. Il a également été montré que l'hypoxie favorise la résistance thérapeutique en privilégiant un état de quiescence des CSG qui leur permet d'échapper au traitement [80, 238, 239]. L'hypoxie favorise la tumorigenèse dans les GBM et est associée à une mauvaise survie des patients par le biais de HIF-2 α , qui favorise l'état souche des cellules grâce à une augmentation de facteurs souches (Oct4, Nanog, c-Myc, Sox2) [204, 218, 240, 241]. Nous avons vu précédemment que l'expression de HIF-2 α est également augmentée en condition normoxique dans les CSG grâce à une transcription de ce dernier favorisée. HIF-2 α favorise également l'angiogenèse par une augmentation de l'expression du VEGF et est présent au sein des CSG uniquement contrairement à HIF-1 α qui est également retrouvé dans les cellules progénitrices neuronales normales. Cela suggère une utilisation préférentielle de HIF-2 α par les CSG [204]. Une résistance à la chimiothérapie et à la radiothérapie des CSG est également observée et favorisée lorsque ces dernières sont cultivées en hypoxie [242]. Une stabilisation de HIF-1 α est observée notamment au centre de la tumeur où se situe le plus grand nombre de CSG avec un phénotype plus agressif. Cela entraîne une régulation à la hausse de MGMT et participe à la chimiorésistance [243]. On observe également une augmentation des transporteurs ABC dans les CSG résidant au sein des niches hypoxiques ce qui favorise le mécanisme de résistance MDR [244–246]. L'hypoxie dans les GBM joue également un rôle important dans l'invasion du tissu sain cérébral et propage ainsi la tumeur dans d'autres régions du cerveau [247].

III. Cible thérapeutique, l'intégrine $\alpha 5\beta 1$

1. Généralité

C'est en 1986 que les intégrines ont été caractérisées pour la première fois comme étant un complexe protéique membranaire allostérique liant la matrice extracellulaire (MEC) au cytosquelette, autrement dit des récepteurs d'adhésion cellulaire. Cette adhésion des cellules à la MEC s'effectue par un assemblage entre la taline et les intégrines, formant un point d'ancrage appelé adhésion focale [248, 249]. C'est l'importance de cette intégrité de la liaison entre la MEC et les cellules qui a donné naissance au nom d'intégrine. En effet, cette liaison donne lieu à de nombreux phénomènes biologiques importants comme la transduction d'un signal, le lien avec le microenvironnement ou encore la communication cellules-cellules [250]. La MEC est un élément majeur du microenvironnement tumoral et permet aux cellules tumorales d'interagir avec ce microenvironnement. Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, le microenvironnement joue un rôle important dans la progression tumorale. Il influence la migration, la prolifération et l'invasion des cellules cancéreuses en faveur du développement de la tumeur. De plus, il a été montré qu'une modification au cours du développement tumoral de l'intégrité et des propriétés de la MEC entraîne une agressivité plus importante du cancer, ce qui est de mauvais pronostic pour les patients. Ces modifications de la MEC entraînent des modifications de sa composition aboutissant à une dérégulation cellulaire. Par exemple, cela va entraîner une augmentation de l'activité des intégrines par une augmentation de la fibronectine aboutissant à une progression tumorale plus importante. L'ensemble des éléments qui composent la MEC (la fibronectine, le collagène, la laminine, les glycoprotéines...) forme le matrisome [251].

Les intégrines sont des protéines transmembranaires hétérodimériques constituées d'une sous-unité α et d'une sous-unité β liées entre elles par une liaison non-covalente. Il existe 18 isoformes de la sous-unités α et 8 isoformes de la sous-unités β . Celles-ci peuvent s'associer selon 24 combinaisons différentes, formant des récepteurs avec des localisations tissulaires et des affinités de liaisons très diverses [250]. Ces combinaisons forment quatre grands groupes d'intégrines se liant à des ligands spécifiques : les intégrines reconnaissant la laminine, celles reconnaissant le collagène, celles qui reconnaissent le motif RGD (arginine-glycine-acide aspartique) retrouvé en particulier dans le fibrinogène, la fibronectine, la vitronectine et enfin les intégrines leucocytaires [252] (Figure 12).

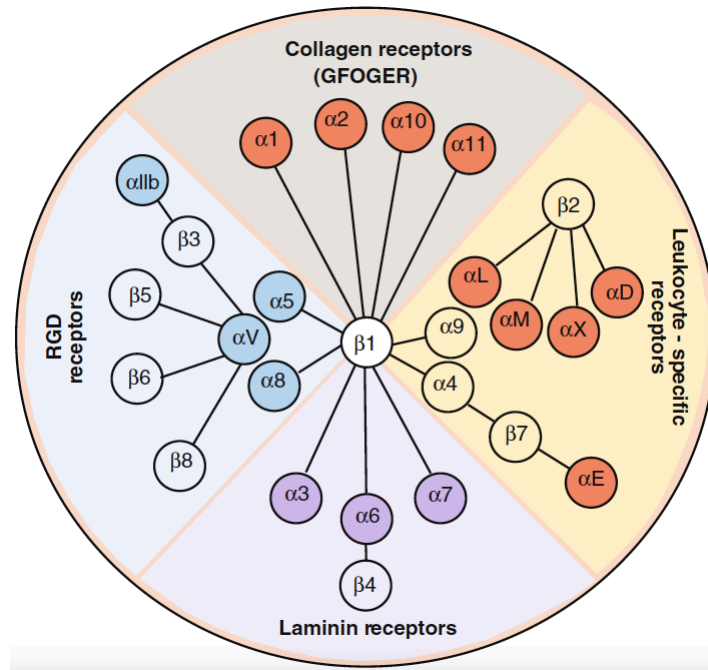


Figure 12 : Représentation des 24 associations possibles d'intégrines classées en fonction de leur ligand [250].

Ces récepteurs d'adhésion permettent la transduction d'un signal bidirectionnel, c'est-à-dire de l'extérieur vers l'intérieur et inversement. Pour permettre cette transduction, les intégrines sont composées de trois parties : une partie extracellulaire appelée tête globulaire, qui permet la liaison à un ligand extracellulaire, une partie transmembranaire et une partie intracellulaire appelée queue qui permet la communication avec les protéines cytosoliques. Les intégrines peuvent adopter au minimum trois états conformationnels qui déterminera l'affinité avec le ligand, à savoir l'état coudé (inactif de faible affinité), l'état étendu-fermé (actif de faible affinité) et enfin l'état étendu-ouvert (actif de forte affinité) [253].

2. Activation et changement conformationnel des intégrines

a. Liaison des ligands aux intégrines

L'activation des intégrines se fait soit par la liaison d'un ligand extracellulaire de la MEC, soit par la liaison intracellulaire à des éléments du cytosquelette. La fixation des ligands extracellulaires a lieu au niveau de l'intersection entre l'hélice β de la sous-unité α et le domaine β I de la sous-unité β . C'est la sous-unité α qui détermine la spécificité du ligand [250]. L'une des caractéristiques des intégrines est leur capacité à pouvoir se lier à une grande variété de ligands. Les intégrines sont des récepteurs d'adhésion très dynamiques et sans activité enzymatique. C'est pourquoi, pour permettre la fixation de leur ligand et la transduction du signal, leur mécanisme d'activation est très réactif et implique la formation d'un complexe

d'adhésion focal *via* la kinase d'adhésion focale (FAK) et un élément clé Src. Cet assemblage a lieu de deux façons différentes : i) par regroupement des récepteurs, ce qui augmente l'interaction modulaire et donc le taux de liaisons des molécules effectrices, ii) par un changement conformationnel des récepteurs qui expose les sites de liaisons effecteurs. Ce dernier est le principal mode de régulation de l'affinité aux ligands et d'activation utilisé par les intégrines [252].

b. Changement conformationnel des intégrines

Il existe trois états conformationnels différents qui déterminent l'affinité des intégrines avec le ligand (Figure 13) :

- L'état coudé ou courbé est l'état inactif de l'intégrine. Dans cet état, on observe une faible affinité de liaison au ligand. Les intégrines ont leur tête globulaire orientée vers la membrane plasmique, ce qui limite l'accès au site de liaison pour les ligands. Il est stipulé que l'état coudé est un état inactif sans liaison au ligand possible, or ce n'est pas totalement exact. Il a été montré que certaines intégrines telles que l'intégrine $\alpha v\beta 3$ ou $\alpha 5\beta 1$, peuvent lier un RGD en conformation coudé ou se lier à la fibronectine. Ces données ont été obtenues grâce à la technique de microscopie électronique qui a révélé des degrés de courbure différents donnant lieu à des conformations intermédiaires qui permettent la liaison de molécules favorisant le passage vers un état étendu-fermé de l'intégrine.
- L'état étendu-fermé s'effectue à la suite de la fixation d'un activateur des intégrines qui influence l'état conformationnel de celle-ci, pour les rendre dans un état actif de faible affinité. C'est un état intermédiaire de l'intégrine. Dans cette conformation, aucun mouvement n'est possible entre les domaines cytoplasmiques des deux sous-unités α et β de l'intégrine, c'est pourquoi il est qualifié de « fermé ».
- L'état étendu-ouvert est un état dans lequel un mouvement du domaine βI est observé par la rupture du pont salin entre la sous-unité α et β . Cela va créer une « ouverture » entre ces deux sous-unités au niveau des jambes du domaine cytoplasmique. Ce mouvement permet une activation complète des intégrines, de plus haute affinité pour la liaison d'un ligand. Cet état est provoqué par la liaison à la MEC ou par la liaison aux éléments du cytosquelette d'actine [252, 254].

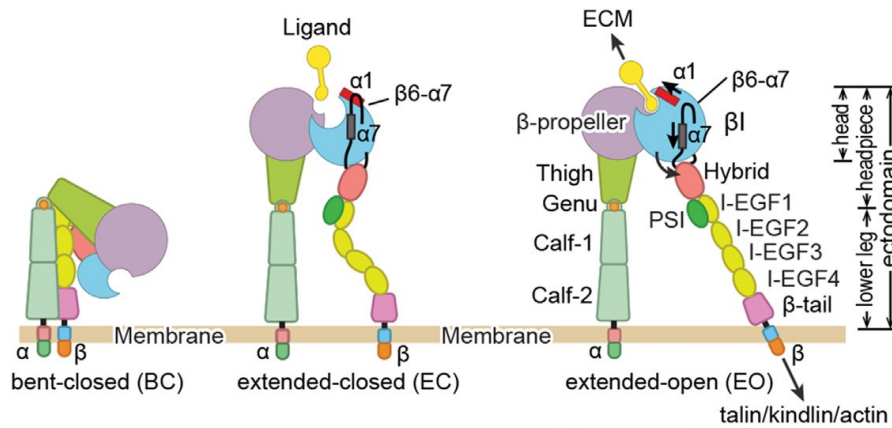


Figure 13 : Illustration des différentes conformations adoptées par les intégrines. L'état courbé (BC), inactif de faible affinité. L'état étendu-fermé (EC), actif de faible affinité, activé de l'extérieur par la fixation d'un ligand extracellulaire tel que la fibronectine *via* la reconnaissance d'un motif RGD. L'état étendu ouvert (EO), actif de forte affinité, avec séparation des deux jambes du domaine cytoplasmique des deux sous-unités α et β par rupture du pont salin [255].

Ces changements conformationnels sont permis par deux modes de signalisation :

- La signalisation inside-out (de l'intérieur vers l'extérieur) est permise par une interaction entre le domaine cytoplasmique (la queue) de la sous-unité β et différentes molécules du cytosquelette, telles que la taline qui coopère avec la kindline (co-activateur). Cette dernière se lie également à la vinculine, la filamine ou encore l' α -actinine. Cette interaction entraîne la séparation des deux sous-unités α et β au niveau du domaine des jambes cytoplasmiques pour aboutir à la forme « ouverte » de l'intégrine. On aura alors une activation complète de l'intégrine de l'intérieur vers l'extérieur qui entraîne une meilleure affinité pour les ligands extracellulaires. Une fois activée, des signaux seront transmis à travers la membrane plasmique grâce au domaine transmembranaire de l'intégrine [256, 257].
- La signalisation outside-in (de l'extérieur vers l'intérieur) permet l'activation des intégrines par la liaison d'un ligand extracellulaire *via* les motifs de fixation d'ions métalliques. Cette activation va permettre de transmettre le signal reçu par le microenvironnement à l'intérieur de la cellule et entraîner l'activation en cascade de voies de signalisation intracellulaire. Cette activation des intégrines va également entraîner un regroupement de ces dernières et former un « cluster » afin d'optimiser la transduction du signal en intracellulaire. Ce regroupement va alors entraîner l'activation des kinases de la famille des Src par l'intermédiaire de FAK (focal adhesion kinase) [253, 258].

3. Fonctions biologiques et rôles des intégrines

La première fonction décrite pour les intégrines est leur rôle principal de lien entre la MEC et le cytosquelette via le réseau cytosquelettique (filaments intermédiaires, filaments d'actines). Depuis, différents rôles leurs ont été attribués en plus de leur rôle d'adhésion cellulaire comme leur rôle dans la prolifération cellulaire, la migration cellulaire ou encore la survie cellulaire et ce en fonction du signal reçu par le microenvironnement. Cela est possible grâce à l'interaction des intégrines avec des molécules de la signalisation intracellulaire telles que la kinase liée à l'intégrine (ILK), le récepteur de la protéine kinase C activée (Rack 1) ou bien FAK principalement. Cette dernière subit une étape d'autophosphorylation qui permet une liaison à Src par son domaine SH2. Src va à son tour entraîner des phénomènes de phosphorylation supplémentaire au niveau de FAK, ce qui va amplifier le signal et permettre de créer des sites de liaison pour d'autres molécules de la signalisation intracellulaire. Cela va lier les intégrines aux effecteurs de la signalisation intracellulaire tels que PI3K/AKT, RAS, les petites GTPases (Rac 1, Rho) ou encore les protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK). Ceci aura pour conséquence des modifications du cytosquelette et l'activation de la transcription génique pour réguler les différentes fonctions des intégrines [259–263] (Figure 14).

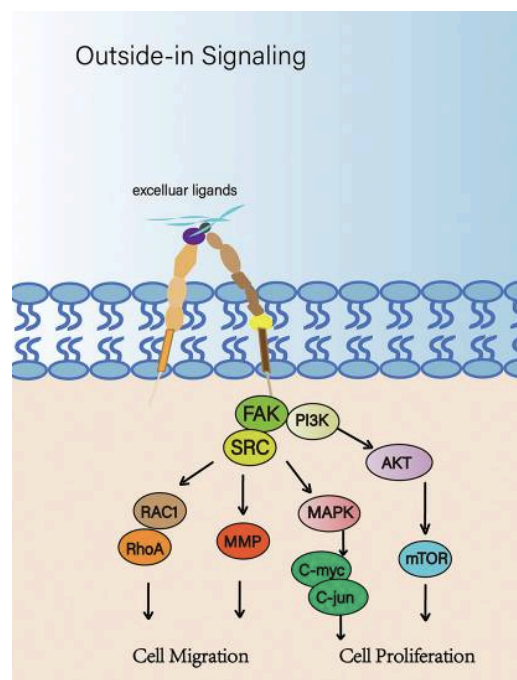


Figure 14 : Interaction des intégrines avec différentes voies de signalisation. Cela a pour conséquence divers processus biologiques tels que la migration cellulaire, la prolifération cellulaire ou la survie cellulaire [264].

a. L'adhérence cellulaire

L'adhésion cellulaire à la MEC est un des rôles clés des intégrines. Elle permet de maintenir une homéostasie et contribue à la réparation de certains tissus. Ce processus comporte plusieurs étapes comme la liaison à la MEC, le regroupement des récepteurs et le recrutement de molécules du cytosquelette. Cette dernière étape comprend le recrutement de l'ILK (pour la liaison au cytosquelette d'actine), la FAK (module l'activité de l'intégrine et augmente la phosphorylation de la tyrosine), la phospholipase C et l'activation de GTPase de la famille Rho (pour la propagation du signal). Cette adhésion cellulaire permet la transduction de différents signaux aboutissant à d'autres effets biologiques tels que la migration, la prolifération ou encore la survie cellulaire. C'est le cas notamment de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ qui, après fixation à la fibronectine, entraîne de nombreux événements comme la migration ou l'angiogenèse [259, 265, 266]. Il a aussi été montré que les intégrines $\alpha 5\beta 1$, $\alpha V\beta 1$ et $\alpha V\beta 6$ peuvent entraîner, après leur adhésion à la MEC, la translocation cellulaire lors de la migration des kératinocytes [267].

b. La migration cellulaire et l'invasion tumorale

La migration cellulaire est un processus physiologique important, en particulier pour la réparation des tissus ou lors du recrutement de différents facteurs pour le système immunitaire. C'est également un processus clé dans certaines pathologies comme le cancer. Les intégrines régulent l'activité et la localisation de certaines protéases responsables de la dégradation de la MEC, telles que les métalloprotéinases matricielles (MMP) ou l'urokinase (activateur du plasminogène), ce qui favorise la migration cellulaire. De plus, la signalisation des intégrines est également responsable de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) des cellules qui vont acquérir les caractéristiques des cellules mésenchymateuses invasives. Ce processus entraîne une perte d'adhésion cellules-cellules et augmente la motilité cellulaire ce qui favorise l'invasion tumorale [260]. Ce phénomène de migration entraîne l'activation de Rac par le biais des voies médiées par ILK et FAK. Cela va entraîner une activation focale et l'assemblage de certains éléments essentiels à la migration comme les lamellipodes. Le pH intracellulaire et le flux du Ca^{2+} jouent également un rôle dans la migration cellulaire médiée par les intégrines [268]. Il a été montré que les intégrines $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha v\beta 3$ sont capables d'activer la voie PI3K qui joue un rôle important dans la migration et l'invasion tumorale par modification du cytosquelette [259, 269, 270].

c. La prolifération cellulaire

La prolifération cellulaire est un processus médié par l'adhésion à la MEC. Une perte d'adhésion cellulaire peut induire de l'apoptose, phénomène appelé anoïkis. L'adhésion engendrée par les intégrines entraîne la libération de facteurs de croissance et active les voies de signalisation en aval favorisant la prolifération cellulaire. Il a été montré que les intégrines ont un rôle important dans la tumorigenèse intestinale par leur rôle dans le maintien de la différenciation et de la prolifération des cellules souches intestinales en réponse au microenvironnement [271]. Les intégrines interagissent aussi avec les récepteurs de croissance qui régulent les cyclines en phase G1 du cycle cellulaire par des voies de signalisation cytosoliques entraînant la prolifération cellulaire [272, 273]. La majorité des intégrines entraînent une activation des protéines FAK, ERK, les MAPK et les GTPase de la famille Rho pour engendrer la prolifération cellulaire. Cependant, l'intégrine $\alpha v \beta 3$ permet une activation de la prolifération en passant par les récepteurs à activité tyrosine kinase mais également par activation de la voie NF- κ B. Il a également été montré que les intégrines $\alpha 5 \beta 1$, $\alpha V \beta 3$ et $\alpha 1 \beta 1$ peuvent interagir avec la cavéoline qui entraîne la phosphorylation de Shc favorisant la synthèse de l'ADN [259, 274].

d. La survie cellulaire

La survie cellulaire médiée par les intégrines permet de protéger les cellules de l'apoptose par résistance à l'anoïkis. Cette survie cellulaire est possible par l'activation des voies PI3K/AKT et ERK qui entraînent l'inhibition de protéines pro-apoptotiques [259, 274, 275].

e. L'angiogenèse

L'angiogenèse est le processus de formation de nouveaux vaisseaux sanguins qui est cruciale pour de nombreux phénomènes physiologiques mais également pathologiques et notamment pour la progression tumorale. Certaines intégrines présentes sur les cellules endothéliales, telles que les intégrines $\alpha 1 \beta 1$, $\alpha 2 \beta 1$, $\alpha v \beta 3$, $\alpha 3 \beta 1$ et $\alpha 5 \beta 1$, jouent un rôle dans ce processus. Elles permettent la régulation de la migration et de la prolifération des cellules endothéliales pour la formation de nouveaux vaisseaux. Les GBM sont des tumeurs très vascularisées et il a été montré que les cellules endothéliales associées à la tumeur présentent une expression élevée des intégrines $\alpha v \beta 3$ et $\alpha v \beta 5$ par rapport à un endothélium au repos ou à un cerveau sain. L'induction de l'expression de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ au niveau des néovaisseaux a également été montrée et son interaction avec la fibronectine favorise l'angiogenèse [260, 276].

f. Le métabolisme

Récemment il a été montré que les signaux transmis par les intégrines peuvent influencer le métabolisme en modulant la production d'énergie. En effet, la protéine kinase activée par l'adénosine monophosphate (AMPK), régulateur du métabolisme, active les processus producteurs d'énergie et à l'inverse inhibe les processus consommateur d'énergie. Cela permet une homéostasie énergétique pour l'organisme lorsque l'apport en énergie devient insuffisant. Cette AMPK est un élément de l'adhésome (réseau de protéine impliquées dans la régulation de l'adhésion cellules-cellules et cellules-MEC) et se localise là où ont lieu les mécanismes de migration cellulaire. Lors de la migration, les cellules consomment de l'énergie pour pouvoir effectuer les mouvements de migration. Lorsque le niveau d'ATP diminue et devient trop faible, l'AMPK est recrutée et module de manière indirecte et directe les intégrines par le biais du cytosquelette d'actine pour la migration. Cela va augmenter le flux de mitochondries, le niveau en ATP et la dynamique du cytosquelette. De plus, l'AMPK est aussi capable d'inhiber l'activation des intégrines en modulant l'expression de la tensine pour augmenter l'adhérence fibrillaire. Ces deux phénomènes contradictoires médiés par l'AMPK sur les intégrines dépendent du contexte cellulaire et des signaux reçus par le microenvironnement [277, 278].

g. L'auto-renouvellement des cellules souches

Dans l'épithélium cutané, il a été montré que les intégrines $\beta 1$ régulent le cycle cellulaire pour favoriser une division symétrique et ainsi renouveler et maintenir les cellules souches [279]. Les intégrines $\alpha 6$ et $\beta 3$ sont présentes au sein des cellules souches normales et cancéreuses et sont utilisées comme marqueurs pour l'identification de ces cellules. Cela implique que les intégrines $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$ et $\alpha v\beta 3$ jouent un rôle important dans la régulation des cellules souches [280, 281]. De plus, il a été montré que l'intégrine $\alpha 6\beta 1$ était retrouvée à des niveaux d'expression élevée dans les CSG. Celle-ci se lie à la laminine et permet non seulement l'adhésion des cellules mais également la transmission d'un signal pour l'auto-renouvellement des CSG *via* l'activation de FAK [282, 283].

4. Intégrines et cancer

Grâce au lien créé par les intégrines entre le cytosquelette et l'environnement extracellulaire, elles permettent diverses fonctions et jouent un rôle clé dans la régulation et le développement de phénomènes physiologiques et pathologiques. Par exemple dans le cancer, les intégrines vont influencer différentes voies de signalisation intracellulaire interconnectées. De nombreux

récepteurs de croissance, tels que l'EGFR, se lient à la MEC et sont localisés proches des intégrines pour interagir ensemble et coopérer [284, 285]. Cependant, les intégrines peuvent subir différentes dérégulations entraînant leur activation aberrante. Les dérégulations peuvent avoir lieu soit par une augmentation de l'expression des intégrines, soit par une augmentation de leurs ligands, elles subissent très rarement des mutations. L'activation aberrante des intégrines va permettre de maintenir le phénotype invasif des cellules tumorales et la modulation du microenvironnement tumoral. Cela aura pour conséquence le maintien de l'angiogenèse, l'activation des enzymes de dégradation de la matrice, la stimulation des cellules immunitaires, et le maintien des niches pour le développement des CSC et favoriser la tumorigenèse (Figure 15) [282, 286, 287].

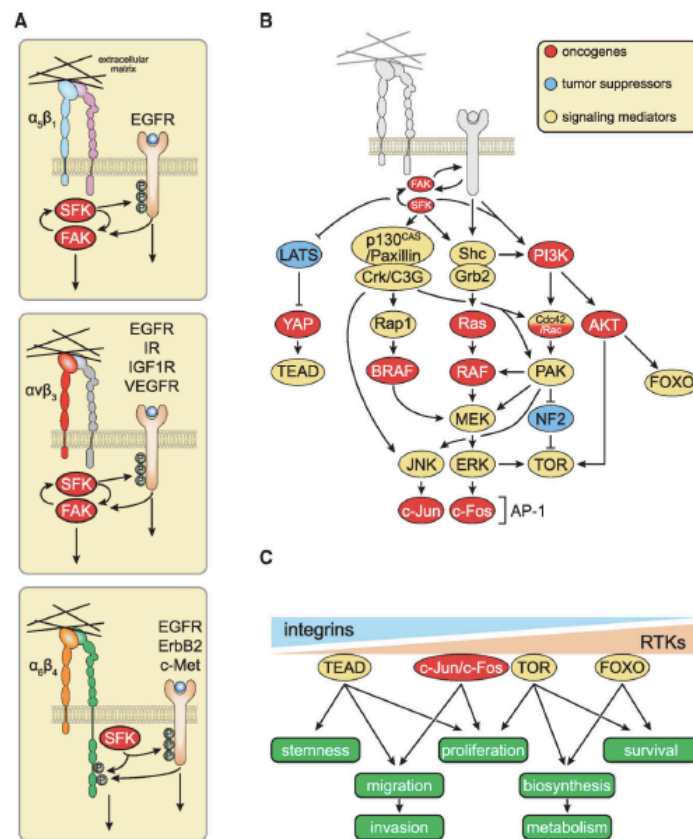


Figure 15 : Interconnections entre les différentes voies de signalisation et les intégrines. A – Coopération entre les intégrines et les récepteurs à tyrosine kinase (RTK). B – Interconnections avec les différentes voies de signalisation intracellulaire. C – Activation de différents processus biologiques par le biais de la coopération des intégrines et des RTK [282].

En temps normal, toutes ces voies sont régulées et limitées par des mécanismes rétroactifs en fonction des signaux reçus par le microenvironnement qui permet de maintenir une homéostasie cellulaire. Cependant, lors de la progression tumorale des événements (changement de la MEC, altérations génétiques...) ont lieu perturbant cette homéostasie et favorisant la croissance

tumorale. Par rapport aux autres organes, le parenchyme cérébral a une composition unique et est caractérisé par une densité et une rigidité faible de la MEC. Mais lors de la transformation tumorale, des changements sont observés dans la composition, la structure et les propriétés mécaniques de la MEC, facilitant la croissance et l'invasion des tumeurs cérébrales dans le parenchyme sain [288–290]. De plus, il a été montré que HIF-1 α entraîne la production de lysyl oxydase (LOX) réticulant le collagène de type I et rigidifie la matrice tumorale [291]. Toutes ces modifications au niveau de la MEC favorisent la signalisation des intégrines. Cette rigidité matricielle va également entraîner la production de métalloprotéinases tel que MMP9 [188]. La MEC va également subir, lors de la transformation tumorale, une protéolyse matricielle responsable de ces différents changements et entraîner une augmentation de l'expression des intégrines. Cette protéolyse entraîne la libération de facteurs de croissance et de cytokines tels que le VEGF et le TGF- β respectivement responsables de l'angiogenèse et de l'invasion tumorale [292, 293]. Toutes ces modifications que subit la MEC sont probablement dues à des altérations épigénétiques lors de l'oncogenèse qui favorise un profil moins différencié des cellules ainsi que la transition épithéliale-mésenchymateuse (TEM) aboutissant à une dérégulation des intégrines [282, 294].

Lors de la tumorigenèse il est fréquemment observé des mutations de différents oncogènes et suppresseurs de tumeurs responsables d'une altération de l'expression des intégrines. Par exemple, une activation de la voie KRAS et BRAF entraîne l'expression des intégrines $\alpha 6$ et $\beta 3$, des intégrines pro-tumorigènes, par activation de ERK dans le cancer du pancréas et le mélanome [295]. De même pour la mutation du gène TP53 qui perturbe l'adhésion cellulaire par les intégrines en inhibant p63. Cette dernière entraîne l'augmentation de l'expression de Rab, une protéine de couplage, qui entraîne une augmentation du recyclage à la membrane de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et de l'EGFR favorisant l'invasion tumorale [296, 297]. De plus, il a été montré que le recyclage de cette intégrine dans le cancer de l'ovaire induit des facteurs de transcription tels que TWIST1 favorisant la TEM et augmente la formation d'amas cellulaires tumoraux. Ces derniers vont s'accumuler dans le mésothélium et se transformer en tumeurs péritonéales [298]. La mutation PTEN est également fréquemment retrouvée dans les cancers et est responsable d'une activation des intégrines en suractivant FAK [282, 299]. Le microenvironnement tumoral joue également un rôle dans l'expression aberrante des intégrines. Il a été montré que l'hypoxie augmente l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ dans le cancer du sein ce qui a pour conséquence de favoriser les métastases [300].

Les intégrines peuvent également servir de biomarqueurs prédictifs dans le cancer. Il a été montré que l'intégrine $\alpha v\beta 3$ était absente dans les adénocarcinomes de la prostate mais que le cancer de la prostate neuroendocrine primitif plus malin et ses lésions métastatiques dans le poumon présentaient une expression élevée de cette intégrine. Elle pourrait servir de biomarqueur pour la transition vers la transformation maligne dans le cancer de la prostate [301, 302]. L'intégrine $\alpha v\beta 6$ pourrait représenter un marqueur de mauvais pronostic dans le cancer du pancréas [303, 304]. Il a été montré que l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ joue un rôle important dans l'angiogenèse, la prolifération cellulaire et la formation de métastases [305–307]. De plus, il est intéressant de noter, que l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ pouvait être utilisée comme biomarqueur pronostic et prédictif pour l'utilisation du volociximab [307, 308], mais également de biomarqueur prédictif pour prédire la résistance au TMZ et au bévacizumab dans le GBM [309].

5. L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans le GBM

Il a été montré que les intégrines étaient régulées positivement dans les glioblastomes par rapport au tissu cérébral sain [310, 311]. De plus, leur expression augmente avec la malignité du gliome. En effet, en utilisant les données transcriptomiques de la banque de donnée TCGA, l'expression de différentes intégrines retrouvées dans les gliomes en fonction de leur grade a été comparée à l'expression des intégrines retrouvées dans des échantillons de tissu cérébral sain (Figure 16) [260].

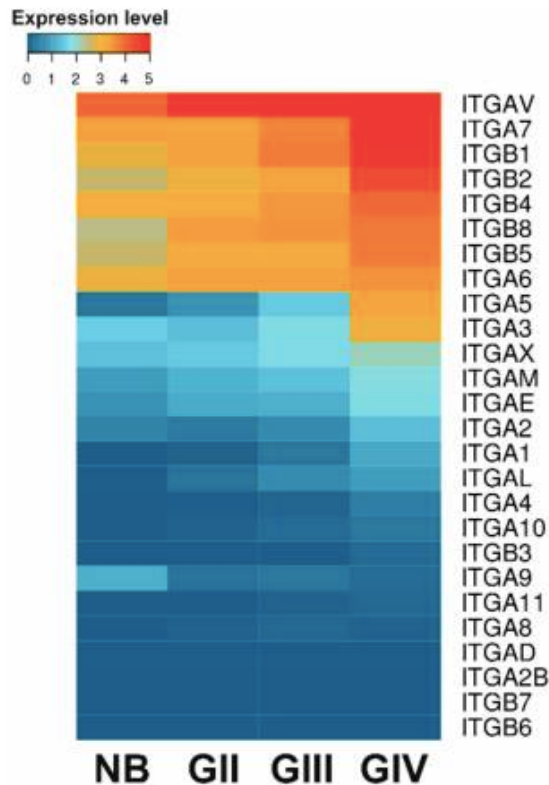


Figure 16 : Heatmap de l'expression des intégrines en comparant des tissus cérébraux normaux par rapport à des échantillons de gliomes.

NB = cerveau sain (5 échantillons) ; GII = gliomes de grade 2 (248 échantillons) ; GIII = gliomes de grade 3 (261 échantillons) et GIV = gliomes de grade 4 ou GBM (160 échantillons) selon l'OMS 2021 [260].

Grâce à cette heatmap nous pouvons constater qu'effectivement l'expression de certaines intégrines augmente dans les gliomes par rapport au tissu sain et certaines des intégrines sont surexprimées dans les GBM. Les intégrines $\alpha 5$ et $\alpha 3$ sont particulièrement intéressantes car elles sont surexprimées uniquement dans les GBM par rapport au tissu sain et aux gliomes de bas grade. De plus, l'immunodétection des intégrines sur des coupes de tissu tumoral a permis la localisation de ces dernières dans des compartiments définis. Par exemple, l'intégrine $\alpha \nu \beta 3$ a été localisée à la surface des cellules endothéliales, l'intégrine $\alpha \nu \beta 8$ est exprimée à la surface des cellules tumorales et l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ est localisée dans les zones péri-nécrotiques et périvasculaires [260]. Les données du TCGA sur les GBM confirment que les intégrines sont surexprimées dans les GBM et qu'elles sont globalement retrouvées dans le sous-type mésenchymal par rapport au sous-type pro-neural. De plus, il a été montré que la surexpression des intégrines $\beta 8$ et $\alpha 7$ était la signature d'un sous-type classique mais qu'une expression élevée de l'intégrine $\beta 1$ était la signature d'un sous-type mésenchymal [311]. De manière intéressante, nous observons également une expression de l'intégrine $\alpha 5$ et de l'intégrine $\alpha 3$ seulement dans

le GBM. Ces données suggèrent l'importance de ces intégrines dans la transformation maligne des gliomes et plus particulièrement de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ présente dans le sous-type le plus agressif, le sous-type mésenchymal [260, 311]. L'intégrine $\alpha 5$ fait partie intégrante de la signature des GBM de type mésenchymal de la classification de Verhaak [72].

L'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ fait partie de la famille des intégrines qui se lie à la MEC par une liaison au motif RGD (Arginine-Glycine-Aspartate) essentiellement de la fibronectine. C'est pourquoi, elle a également été appelée récepteur de la fibronectine. L'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ a pour particularité de se lier à un deuxième site sur la fibronectine appelé site synergique qui permet une liaison plus efficace par rapport aux autres intégrines reconnaissant la fibronectine. Ce site comprend 5 acides aminés, Proline-Histidine-Sérine-Arginine-Asparagine (PHSRN). Autre élément de ce dimère, la sous-unité $\alpha 5$ ne peut se dimériser qu'avec la sous-unité $\beta 1$. De fait, les études de variations de l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ sont un reflet de l'expression du dimère $\alpha 5 \beta 1$ (Figure 17) [255, 312–314]. Une fois activée, l'intégrine peut être soit ubiquitinyliée et dégradée par le lysosome, soit être recyclée à la membrane par la voie de l'endosome. L'intégrine peut également être internalisée par la voie des clathrines. De plus, il a été montré que la cavéoline 1 est capable d'internaliser l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ sans la fibronectine. Cela permet une régulation fine des récepteurs reconnaissant la fibronectine disponible à la membrane plasmique. Cette régulation de la quantité des récepteurs en surface a également été observée sur les cellules endothéliales [315].

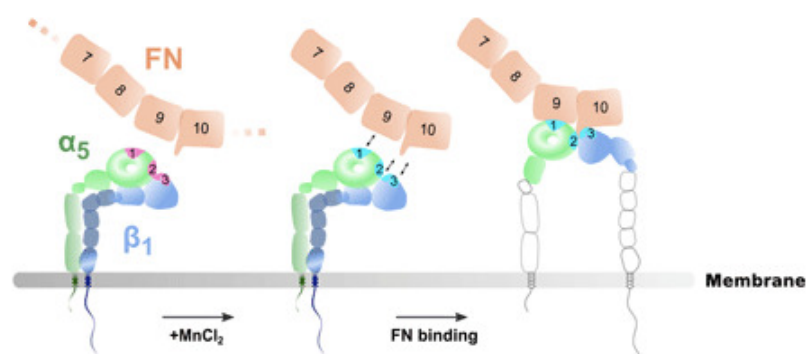


Figure 17 : Représentation schématique des 3 sites de liaison entre l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ et la fibronectine pour une activation et une stabilisation de la forme active de cette intégrine.

1 = site de liaison entre l'intégrine $\alpha 5$ et le site de synergie de la fibronectine. 2 = site de liaison entre l'intégrine $\alpha 5$ et le motif RGD de la fibronectine. 3 = site de liaison entre le motif MIDAS du domaine $\beta 1$ de l'intégrine $\beta 1$ et le motif RGD de la fibronectine [312].

L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ est responsable de différents phénomènes biologiques physiologiques et pathologiques. En plus de son importance dans la migration cellulaire ou dans la liaison entre la MEC et les cellules, elle joue également un rôle dans l'angiogenèse et la progression tumorale [255].

a. Intégrine $\alpha 5\beta 1$ et angiogenèse

Comme nous l'avons mentionné plus haut, la néo-angiogenèse est un processus de formation de nouveaux vaisseaux important lors de la progression tumorale. Parmi les intégrines, les sous-unités $\alpha 4$, $\alpha 5$, αv et $\beta 1$ semblent nécessaires pour la régulation de cette néo-angiogenèse. Il a été montré que la sous unité $\alpha 5$ plus particulièrement joue un rôle important dans ce phénomène [276, 316, 317]. Il a également été montré qu'il existait une compensation de la perte de la sous-unité $\alpha 5$ par la sous-unité αv au niveau des points focaux d'adhésion [318, 319]. Récemment il a été montré qu'il existe des cellules circulantes angiogéniques de GBM avec une forte capacité angiogénique présentant un profil génétique particulier où il est notamment retrouvé une forte expression de l'intégrine $\alpha 5$ [320]. La sous-unité $\alpha 5$ n'est pas exprimée sur les vaisseaux matures, mais plutôt au niveau de la néo-vascularisation tumorale [321]. L'expression de la sous-unité $\alpha 5$ est régulée par différents facteurs angiogéniques tels que le $TNF\alpha$, le FGF ou l'IL8. L'activation de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ au niveau des cellules endothéliales permet la transcription de divers facteurs angiogéniques, pour l'adhésion et la transduction du signal. Une inhibition de cette dernière entraîne des effets anti-angiogéniques et une réduction de la croissance tumorale [318, 322].

b. Intégrine $\alpha 5\beta 1$ et progression tumorale

Les données de la TCGA indiquent que l'intégrine $\alpha 5$ est exprimée préférentiellement dans les GBM au niveau des zones périnécrotiques et périvasculaires [260, 318, 323]. Une expression élevée de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ est corrélée à un mauvais pronostic et est sous le contrôle de la cavéoline 1 et du TGF- β [324]. Elle est associée au phénotype invasif des gliomes et favorise la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) dans les CSG [325]. Dans le GBM, l'intégrine $\alpha 5$ est retrouvée dans les cellules les plus invasives et son inhibition impacte la migration cellulaire *in vitro* [326, 327]. Mon équipe a pu démontrer qu'une augmentation de l'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ ainsi que son activation par la fibronectine était responsable d'une transactivation de la β -caténine, impliquée dans la TEM et aboutit à une augmentation de la

migration cellulaire. Ce processus est médié par la voie intégrine $\alpha 5\beta 1$ /AKT [328]. Un microenvironnement riche en fibronectine augmente la dispersion cellulaire à partir de neurosphères de GBM et favorise l'invasion tumorale par l'intermédiaire de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ [329]. De plus, l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ est un marqueur mésenchymateux corrélé à un phénotype plus agressif ainsi qu'à une résistance à la chimiothérapie [330].

c. Intégrine $\alpha 5\beta 1$ et résistance thérapeutique

Dans mon équipe, il a été mis en évidence que l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ module la réponse à la chimiothérapie par une action sur la signalisation de p53. En effet, une déplétion de l'intégrine $\alpha 5$ entraîne une sensibilisation des cellules au TMZ due à une augmentation de l'activité de p53. La nutlin-3a, un activateur de p53, dans un contexte de p53 fonctionnelle, provoque une diminution de l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ aboutissant à une augmentation de la cytotoxicité du TMZ. Une boucle de rétrocontrôle négatif entre l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et p53 faisant intervenir la survivine et PEA-15 a ainsi pu être mise en évidence [331, 332]. Une inhibition de cette intégrine par des antagonistes spécifiques associée au TMZ entraîne une diminution de la sénescence des cellules et facilite l'apoptose lorsque p53 est fonctionnelle [333]. L'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ est diminuée dans les cellules résistantes lors d'un traitement au TMZ mais réapparaît lors de l'arrêt du traitement [334]. Il est donc important de caractériser son expression de façon longitudinale au cours d'une thérapie et à récurrence des tumeurs. L'expression protéique de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ a été mesurée dans une cohorte de tumeurs de GBM d'une centaine de patients au diagnostic. L'analyse a été faite sur des patients traités par le protocole Stupp sans thérapie associée. Le groupe de patients à forte expression de l'intégrine montre une survie moindre par rapport au groupe de faible expression. Ces résultats confirment d'un point de vue clinique l'impact de cette intégrine dans la résistance à la thérapie standard des GBM et confortent son potentiel de cible thérapeutique pour une population déterminée de patients [335].

6. Cible thérapeutique

Les premières études portant sur les intégrines comme cibles thérapeutiques ont montré qu'une inhibition par un peptide RGD d'un sous-ensemble d'intégrines telles que $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ et $\alpha v\beta 5$ entraîne une diminution de l'invasion tumorale *in vitro* et la formation de métastases *in vivo*. Cette interférence avec un peptide RGD a également montré une diminution de l'angiogenèse

tumorale. De nombreux travaux ont été dédiés à la recherche d'antagonistes spécifiques d'une intégrine donnée [260].

a. Peptides antagonistes des intégrines

Le Cilengitide est un pentapeptide possédant un motif RGD qui va se lier au motif MIDAS des intégrines. C'est un antagoniste avec une haute affinité pour les intégrines $\alpha v\beta 3$ et $\alpha v\beta 5$. Il va bloquer la liaison de ces intégrines à leur ligand principal, la vitronectine. Dans des essais pré-cliniques, cet antagoniste a montré des effets sur les cellules tumorales cérébrales et les vaisseaux sanguins. Il entraîne la mort cellulaire des cellules endothéliales angiogéniques *in vitro*. *In vivo*, le cilengitide entraîne une diminution de la masse tumorale dans les tumeurs orthotopiques mais aucun effet n'a été observé dans les tumeurs hétérotopiques. Cela montre l'importance du microenvironnement cérébral pour l'effet du cilengitide. Les essais cliniques avec des antagonistes d'intégrine ont été surtout réalisés avec le cilengitide. Dans les essais cliniques de phases I/IIa, le cilengitide a montré une certaine efficacité sans induire de cytotoxicité chez des patients atteints de GBM que ce soit en monothérapie ou en association avec la radio-chimiothérapie. En essai clinique de phase II, des effets positifs ont été observés lors de l'association avec le TMZ chez des patients porteurs de la méthylation MGMT. Cependant, aucun effet notable n'a été observé dans l'essai clinique randomisé de phase III CENTRIC et de phase II CORE chez des patients nouvellement diagnostiqués pour un GBM [336–338]. Plusieurs raisons ont été évoquées pour cet échec : une demi-vie du cilengitide assez courte, sa faible accumulation cérébrale résultant d'une pénétration inefficace à travers la BHE et enfin une élimination trop rapide n'aboutissant pas à un effet thérapeutique. Récemment, pour contrer la faible accumulation du cilengitide par une mauvaise pénétration de la BHE, la technologie des nanoparticules a été exploitée. L'encapsulation du cilengitide à l'intérieur de nanoparticules a permis une pénétration et une accumulation de ce dernier plus efficace dans la tumeur dans un modèle de gliome chez le rat [339].

Comme nous l'avons indiqué plus haut, la liaison de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ à la fibronectine nécessite non seulement le motif RGD mais également un deuxième site de reconnaissance, le motif PHSRH, agissant en synergie avec le RGD pour renforcer la liaison. Un peptide antagoniste a été dérivé de cette séquence de synergie de la fibronectine, l'ATN-161 (Ac-PHSCN-NH₂). Ce dernier a démontré une diminution de la croissance tumorale, de l'angiogenèse et a prolongé la survie de différents modèles animaux. De plus, l'ATN-161 a montré une bonne cytotoxicité

dans un essai clinique de phase I. Cependant, les études ont été interrompues en 2016 en raison de la faible activité de l'ATN-161 en essai clinique de phase I/II [340].

Un nouvel antagoniste candidat pour le traitement des GBM a montré des résultats encourageants, le GLPG0187. C'est une petite molécule bloquant plusieurs intégrines RGD, $\alpha v \beta 1$, $\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 5$, $\alpha v \beta 6$, $\alpha v \beta 8$ et $\alpha 5 \beta 1$, et qui a montré des effets antitumoraux dans les gliomes [341]. Des résultats préliminaires ont été obtenus dans un essai clinique de phase I montrant une toxicité favorable et des signes précoces de réponse clinique chez des patients atteints d'un GBM [342].

b. Petites molécules non peptidiques

À la suite du développement de ces antagonistes peptidiques, des inhibiteurs non peptidiques ont été développés. La structure de ces molécules s'appuie également sur le motif RGD. Le défi consiste à trouver des molécules spécifiques d'une intégrine à RGD donnée. L'équipe du Pr. Kessler [343], est experte dans la synthèse d'inhibiteurs d'intégrines non peptidiques. Pour obtenir des ligands plus sélectifs d'une intégrine donnée, elle s'est concentrée sur les modifications d'orientation du motif RGD lors de sa liaison aux intégrines $\alpha 5 \beta 1$ et $\alpha v \beta 3$. Les principaux éléments qui modifient l'orientation de ce motif se trouvent au niveau de la sous-unité α dans un premier lieu. La sous-unité $\alpha 5$ comporte une alanine et une glutamine à la place d'un acide aspartique et d'une thréonine dans la sous-unité αv . Cette différence aboutit à une structure à pH plus basique pour l'intégrine $\alpha 5$. L'autre différence observée se trouve entre les sous-unités β de ces deux intégrines. La sous-unité $\beta 1$ comporte une leucine et une glycine à l'inverse de la sous-unité $\beta 3$ qui comporte deux arginines. C'est par ces différences que la spécificité pour chaque intégrine a pu être obtenue en modifiant l'écart de la partie acide du motif RGD (par l'aspartate) et la partie amine de ce motif (par l'arginine) ainsi qu'en modifiant l'encombrement stérique du motif RGD sur les intégrines [343]. Les premiers inhibiteurs de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ ont été décrits en 2008. Le K34c comprend une structure amide et un groupement aromatique méthylé qui confère une orientation particulière au ligand et aboutit à une importante sélectivité de liaison pour l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$. Par la suite, la tyrosine du K34c a été remplacée par une glycine pour une rigidification augmentée du ligand et une meilleure sélectivité pour l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$; ce composé a été nommé FR248 (Figure 18) [344]. Ces deux antagonistes ont été obtenus par une collaboration de longue date avec le Pr. Kessler et sont

largement utilisés dans mon équipe pour une inhibition sélective de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ [327, 331, 333, 334].

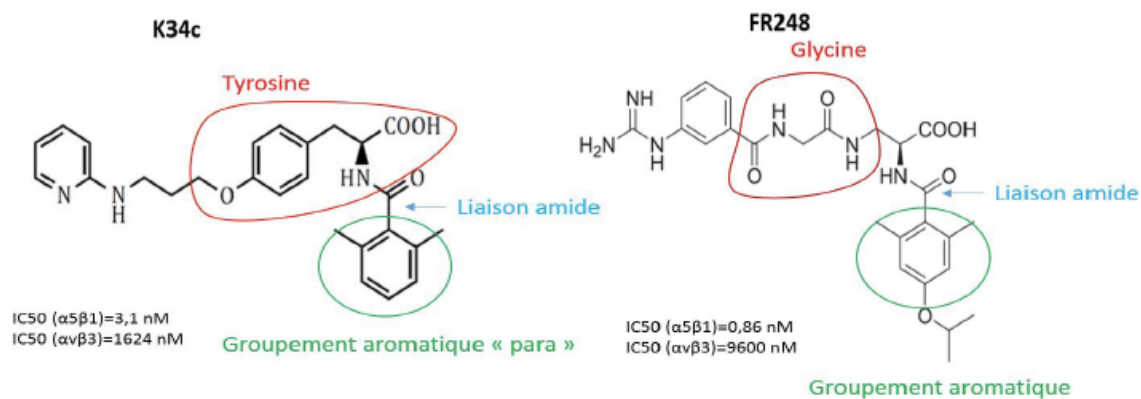


Figure 18 : Structure des deux antagonistes de haute affinité pour l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ [344].

Objectif de l'étude

Les travaux de l'équipe de recherche sont centrés sur la caractérisation de cibles thérapeutiques pour les gliomes de haut grade de type glioblastomes en prenant en compte la grande hétérogénéité moléculaire de ces tumeurs. Les études ont porté particulièrement sur l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ avec la démonstration préalable de son intérêt comme cible thérapeutique au moment où l'intégrine $\alpha v\beta 3/\beta 5$ était la plus étudiée. Les données obtenues sur des lignées cellulaires classiques cultivées sous forme de cellules tumorales différenciées montrent son implication essentielle dans la migration et dans la résistance à la chimiothérapie utilisée en clinique, le Témazolomide [328, 329, 331]. La confirmation que le taux de son expression en ARNm et en protéine dans des échantillons de patients est relié à la survie des patients montre l'intérêt d'inhiber cette intégrine dans une proposition de thérapie ciblée [335]. Malheureusement les rares essais cliniques avec des inhibiteurs de cette intégrine n'ont pas donné de résultats tangibles et se sont heurtés également à l'échec du cilengitide. Il apparaît évident que la grande hétérogénéité d'expression de cibles thérapeutiques dans le glioblastome entre deux tumeurs, au sein d'une même tumeur dans des foyers différents, au cours de l'évolution de la tumeur mais également sous l'effet de chimio- et radio-thérapies doit être prise en compte pour obtenir une efficacité thérapeutique de leurs inhibiteurs [333]. Le ciblage de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ doit se faire dans une tumeur qui l'exprime au moment de la thérapie soit au moment de sa détection soit après récurrence dans une démarche de médecine personnalisée.

Dans ce cadre, les objectifs de mon travail de thèse ont été :

- D'étudier la régulation de l'expression de l'intégrine dans des cellules souches de GBM soumises *in vitro* à des pressions d'hypoxie.
- De caractériser les tumeurs obtenues *in vivo* après xénotreffes de cellules souches en particulier par méthode non invasive de type TEP.
- D'étudier l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans un modèle de tumeur résistante à la chimiothérapie obtenu *in vitro*.

L'ensemble des résultats obtenus seront également mis à profit dans la validation d'un réseau de régulateurs hautement spécifique des GBM établi grâce à une collaboration avec des bio-informaticiens du laboratoire CANTHER de Lille.

Matériels et Méthodes

I. Culture cellulaire

1. Culture des CSG

Nous disposons de différentes lignées de CSG dérivées de patients. Les lignées NCH644 et NCH421k ont été fournies par le Dr. Herold-Mende (Département de neurochirurgie, Université de Heidelberg, Allemagne). Les lignées 3731 et 5706 ont été fournies par le Dr. Idbaih (Département de Neurologie des Hôpitaux Universitaires, Paris). Les lignées TC7 et TC22 proviennent de xénogreffes hétérotopiques dérivées de patients (PDX) et établies au laboratoire. Les lignées NCH421k, NCH644, 3731 et 5706 sont cultivées dans un milieu DMEM/F12+GlutaMAX™ (31331-028, Gibco™), complété par 20% de BIT-100 (204 3100, Provitro), 20ng/ml d'EGF et 20ng/ml β -FGF (Reliatech). Les lignées TC7 et TC22 sont quant à elles cultivées dans le même milieu à la différence du BIT-100 qui est remplacé par 2% de B27 (12587010, Gibco). Le milieu est toujours préparé au préalable. Toutes les lignées cellulaires sont maintenues dans un incubateur à 37°C et 5% de CO₂. Les neurosphères sont dissociées environ tous les 7 jours en fonction de l'acidification du milieu de culture (milieu jaune) et de la taille des neurosphères. Étant en suspension, ces dernières sont récupérées et transférées dans un tube de 15 ml pour une première centrifugation à 300g pendant 5min. Une fois le surnageant éliminé les sphères sont resuspendues avec 3 à 5ml d'Accutase (A6964, Sigma) selon la taille du culot, pour commencer la dissociation enzymatique des neurosphères. Ces dernières sont ensuite placées dans l'incubateur à 37°C pendant 5min. Une dissociation mécanique (aspiration/refoulement) avec une pipette de 10ml est effectuée dans le tube de 15 ml puis les neurosphères sont à nouveau placées dans l'incubateur à 37°C. Selon les lignées une nouvelle dissociation mécanique des neurosphères est nécessaire afin de bien les dissocier. Les sphères sont alors transférées dans une flasque et la dissociation se fait à l'aide d'une pipette de 10ml en réalisant des séries d'aspiration/refoulement des cellules contre la paroi de la flasque. Les cellules sont à nouveau centrifugées à 300g pendant 5min puis resuspendues dans du milieu de culture (1 à 3ml selon la taille du culot). Un échantillon de la suspension cellulaire de 10 μ l est prélevé pour le comptage des cellules. Ces dernières sont mélangées avec 10 μ l de bleu trypan (Biorad) puis les cellules sont comptées à l'aide d'un compteur automatisé (TC20, Biorad). Les cellules sont ensuite remises en culture dans une flasque T25 à une densité d'1 million de cellules dans 5ml de milieu.

2. Culture des cellules différenciées

Chaque lignée de cellule souche sont différenciées avec du milieu DMEM/F12+GlutaMAX™ supplémenté avec 10% de SVF. Les lignées cellulaires sont maintenues dans un incubateur à 37°C et 5% de CO₂. Le milieu cellulaire est changé au moins une fois par semaine afin d'éliminer les débris cellulaires et les cellules mortes lors de la différenciation. Les cellules différenciées prolifèrent en monocouche et lorsque ces dernières atteignent une confluence de 80 à 90%, un passage cellulaire est effectué. Les cellules sont décrochées de la flasque avec 3ml d'Accutase pendant 5 min à 37°C. Ces dernières sont transférées dans un tube de 15ml. Un rinçage de la flasque avec du DBPS 1X (Dutscher) est réalisé afin de récupérer au maximum les cellules décrochées. Elles sont ensuite centrifugées à 300g pendant 5min. Une fois le surnageant éliminé, les cellules sont resuspendues avec 1 à 2ml de milieu. Puis de la même manière que les cellules souches, un comptage des cellules au bleu trypan est réalisé à l'aide d'un compteur automatisé. Les cellules sont remises en culture à une densité de 0,5 à 1 million de cellules selon la lignée dans une flasque T25.

3. Culture des cellules en condition hypoxique

La culture des cellules en condition normoxique se fait dans un incubateur standard à 37°C, 5% de CO₂ et 20% d'O₂. Pour la culture des cellules en condition hypoxique ces dernières sont placées dans un incubateur tri-gaz qui permet de moduler le taux en oxygène par injection d'azote et cultiver les cellules à 1% d'O₂.

II. Étude du niveau d'expression de nos protéines d'intérêts et de la localisation de l'intégrine $\alpha 5$

1. Western blot

Après le comptage cellulaire une plaque 6 puits estensemencée à une densité de 500 000 cellules/puits dans 2ml de milieu. Selon les expériences les plaques sont soit directement placées en hypoxie 1% et dans un incubateur standard pour la condition normoxique au temps d'incubation correspondant en fonction de l'expérience (24h, 48h, 72h ou 6j) soit les cellules sont traitées (Irinotécan, PT2977, Composé 2 ou siRNA) avant d'être placées dans un incubateur tri-gaz à 1% d'O₂ au temps d'incubation correspondant en fonction de l'expérience (48h ou 72h). Après chaque condition (incubation en normoxie ou hypoxie, effet des différents traitements et inhibiteurs, Tableau 3), les neurosphères sont récupérées pour une première

centrifugation à 300g pendant 1min. Une fois le surnageant éliminé les neurosphères sont rincées dans du DPBS 1X et sont à nouveau centrifugées à 300g pendant 1min. Ces dernières sont directement lysées sur glace dans 100 à 150 µl de Laemmli 2X (60mM Tris-HCl pH 6.8 ; 20% glycérol ; 2% SDS ; 0.01% bleu de bromophénol) (Biorad) complété avec 5% de β-mercaptoéthanol (Biorad) puis les protéines sont dénaturées par chauffage à 95°C pendant 13 minutes. Cette extraction protéique doit être réalisée en moins de 5min afin d'éviter la dégradation des HIFs, notamment celle de HIF-1α qui n'est pas stable et se dégrade rapidement en condition de normoxie. Pour les cellules différenciées, afin de rester dans les mêmes conditions expérimentales, le même procédé d'extraction protéique est utilisé à la différence que les cellules ne sont pas centrifugées mais directement lysées dans le puit de la plaque et détachées à l'aide d'un grattoir puis transférées dans un Eppendorf de 1,5ml.

Une migration des protéines de chaque lysat est ensuite réalisée par électrophorèse. 15µl de lysat sont déposés sur des gels de polyacrylamide SDS-PAGE 4-20% (Biorad) de 18 puits. 6µl de marqueur de poids moléculaires sont également déposés dans certains puits. Les gels sont immergés au préalable dans un tampon de migration Tris-Glycine 1X (Euromedex) et 5% de SDS (Euromedex) préparé dans de l'eau MilliQ. La migration s'effectue à 130V pendant 1h05. Les protéines sont transférées sur une membrane PVDF (GE Healthcare, Velizy, France) préalablement activée pendant 15sec à l'éthanol absolu. Le transfert s'effectue à 100V pendant 30 min dans un tampon de transfert Tris-Glycine 1X et 20% d'éthanol absolu préparé dans de l'eau MilliQ.

Après le transfert, les sites non spécifiques sont bloqués par une incubation des membranes dans du tampon de blocage TBST/lait 4% (Tris-buffered saline 1X, 1% de Tween-20 (Euromedex) et 4% de lait (Santa Cruz, sc-2325)) préparé dans de l'eau MilliQ pendant 1 heure à température ambiante sous agitation. Les membranes sont ensuite incubées durant la nuit à 4°C, sous agitation, avec l'anticorps primaire (Tableau 2) correspondant dilué dans le tampon de blocage. Le lendemain, une série de 3 lavages de 10min sous agitation est réalisée avec du TBST (Tris-buffered saline 1X et 1% de Tween-20 (Euromedex)). Puis les membranes sont incubées 1h à température ambiante avec les anticorps secondaires correspondant conjugués à de la peroxydase de raifort (HRP), dilué dans du tampon de blocage. Après 3 nouveaux lavages de 10 min, les membranes sont visualisées par chimioluminescence à l'aide du kit Clarity™ Western ECL Substrate (BioRad) ou à l'aide du kit de chimioluminescence améliorée pour l'intégrine α5 (ECL™ Prime Western Blotting System, GE Healthcare Bioscience) avec un

analyseur ImageQuant™ LAS 4000 (GE Healthcare). La quantification de l'intensité des bandes a été réalisée à l'aide du logiciel ImageJ (v1.53). Pour chaque expérience, minimum 3 lysats provenant de différentes cultures cellulaires ont été utilisés. Les données ont été normalisées par rapport à l' α -tubuline ou la GAPDH, utilisées comme contrôle de charge.

Liste des anticorps			
Cible	Référence	Espèce	Dilution
Intégrine $\alpha 5$	Cell signaling (D7B7G)	Rabbit	1/1000 (WB)
Intégrine $\alpha 5$	BDBioscience IIaI (555614)	Mousse	1/100 (FACS) 1/100 (IF)
HIF-1α	Abcam (ab51608)	Rabbit	1/1000 (WB)
HIF-2α	Novus (Nb100-122)	Rabbit	1/1000 (WB)
CA9	Abcam (ab15086)	Rabbit	1/1000 (WB)
AhR	Cell signaling (D5S6H)	Rabbit	1/1000 (WB)
α-Tubuline	Sigma-Aldrich (T9026)	Mousse	1/1000 (WB)
Cadhérine	Proteintech (20874-1-20ul)	Rabbit	1/5000 (WB)
Vimentine	Proteintech (60330)	Mousse	1/5000 (WB)
Histone	Cell signaling (2595)	Rabbit	1/1000 (WB)
CD31	Novus (Nb100-2284)	Rabbit	1/500 (IF)
Anti-rabbit IgG-HRP	Promega (W4018)	Goat	1/10000 (WB)
Anti-mousse IgG-HRP	Promega (W4028)	Goat	1/10000 (WB)
Alexa fluor™ 568 rabbit IgG	Invitrogen (A11011)	Goat	1/500 (IF)
Alexa fluor™ 650 mousse IgG	Invitrogen (SA5-10174)	Goat	1/500 (IF)

Tableau 2 : Liste des anticorps utilisés pour les expériences de western blot, FACS et immunofluorescence.

2. Cytométrie en flux (FACS)

Après avoir compté les cellules souches dissociées, un culot de 100 000 cellules a été réalisé pour chaque condition (cellules non marquées, cellules marquées avec l'anticorps secondaire et cellules marquées avec l'anticorps anti-intégrine $\alpha 5$). Les culots sont lavés 3 fois avec du

DPBS 1X / BSA 1% puis ont été remis en suspension et incubés pendant 30min à 4°C avec les anticorps primaires correspondants (Tableau 2). Ces derniers ont été dilués dans du DPBS 1X / BSA 1%. Les cellules ont été centrifugées à 1300g pendant 1 min à 4°C puis lavées deux fois avec du DPBS 1X / BSA 1%. Après les lavages, les culots sont remis en suspension et incubés pendant 30 min à 4°C dans l'obscurité avec les anticorps secondaires correspondants (tableau 2) dilués dans du DPBS 1X / BSA 1%. Après l'incubation, les cellules sont lavées deux fois avec du DPBS 1X / BSA 1% et sont remises en suspension dans du DPBS 1X. Les échantillons ont ensuite été analysés sur un cytomètre en flux (Flow cytometry research MACSQuant®VYB, Miltenyi Biotec). Les résultats ont été analysés avec le logiciel FCSalyzer 0.9.22-alpha.

3. Fractionnement des compartiments cellulaires

Après comptage des cellules souches dissociées, un culot de cellules à 5M a été réalisé. Un kit de fractionnement subcellulaire a été utilisé pour séparer les compartiments cellulaires (compartiment cellulaire Qproteome (37502), kit Qiagen). Ce fractionnement consiste en l'ajout séquentiel de différents tampons d'extraction à un culot cellulaires suivi d'une succession de centrifugations. Les protéines des différents compartiments cellulaires sont sélectivement isolées (cytosol, membrane, noyau et cytosquelette) (Figure 19). La concentration en protéines est évaluée avec un spectrophotomètre UV-Visible NanoDrop™One (Thermo Fisher). 10 µg de protéines ont été lysées dans 200 µl de Laemmli 2X (Tris-HCl 60 mM pH 6,8 ; 20 % glycérol ; 2 % SDS ; 0,01 % bleu de bromophénol) (Biorad) additionné de 5 % β-mercaptoéthanol (Biorad) sur glace et dénaturé à 95°C pendant 13 min. Chaque compartiment a été identifié par western blot en utilisant des anticorps spécifiques. La membrane a été caractérisée par l'anticorps anti-cadhérine, le cytosol par l'anticorps anti-tubuline, le noyau par l'anticorps anti-histone et le cytosquelette par l'anticorps anti-vimentine (Tableau 2).

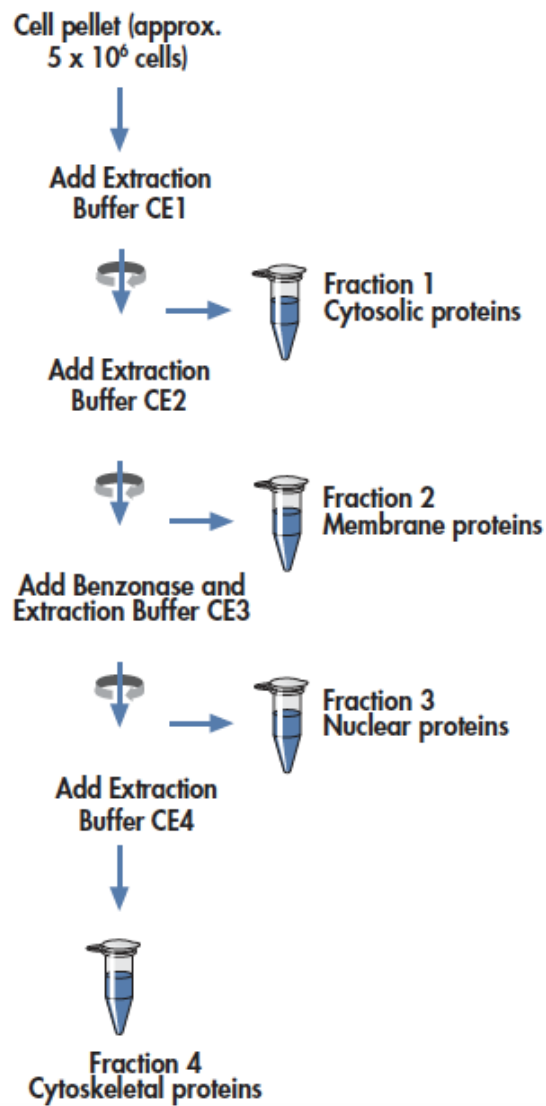


Figure 19 : Schématisation du protocole à suivre pour la compartimentation cellulaire par le kit de Qiagen, Qproteome (37502).

III. Étude de l'inhibition spécifique des HIFs

1. Préparation des drogues

L'Irinotécan (HY-16562) et le PT2977 (HY-125840) ont été achetés auprès de MedChemExpress. Le composé 2 (Dr. Tambar UK., Dallas, Texas) et le FR248 (Dr. Kessler H., Munich, Allemagne) ont été obtenus grâce à des collaborations (Tableau 3). Tous ces composés ont été dissous dans du DMSO puis aliquotés. Ils ont ensuite été dilués à la concentration souhaitée en respectant un maximum de 0,1% de DMSO en concentration finale.

Pour l'hypoxie chimique le chlorure de cobalt (CoCl_2 , 15862) et la desferroxiamine (DFO, D9533) viennent de chez Sigma (Tableau 3). Ils ont été dissous dans de l'eau milliQ puis aliquotés.

Liste des composés		
Composé	Référence	Concentration
Irinotécan	MedChemExpress (HY-16562)	2,5 μM
PT2977	MedChemExpress (HY-125840)	20 μM
Composé 2	Collaboration Dr. Tambar UK., Dallas	20 μM
FR248	Collaboration Dr. Kessler H., Munich	5 μM ; 10 μM ; 20 μM
CoCl_2	Sigma (15862)	50 μM ; 200 μM
DFO	Sigma (D9533)	50 μM ; 200 μM

Tableau 3 : Liste des composés utilisés dans les expériences pour étudier l'inhibition des HIFs et induire une hypoxie chimique.

2. Transfection des cellules

Après dissociation, les cellules ont étéensemencées à une densité de 500 000 cellules/puits dans une plaque 6 puits préalablement coatée de 20 $\mu\text{g/ml}$ de cell-tak (CorningTM). Les cellules ont ensuite été transfectées avec le siRNA correspondant (Qiagen) à 100nM pour HIF-1 α (FlexiTube 7, S103224781), 250nM pour HIF-2 α (FlexiTube 5, S102663038). Un siRNA négatif a également été utilisé en contrôle (1027281). Une solution de siRNA à la concentration correspondante a été préparée dans 250 μl d'optiMEM ainsi qu'une solution de 5 μl de lipofectamine 2000 (ThermoFisher) dans 250 μl d'optiMEM pour chaque condition. Les solutions sont ensuite incubées à température ambiante pendant 5 minutes. Après incubation, les 250 μl de solution de lipofectamine sont ajoutés à la solution de siRNA. Le mélange est

laissé à incuber à température ambiante pendant 25 minutes. Enfin, la solution lipofectamine/siRNA est ajoutée goutte à goutte aux cellules dans le milieu de culture. Les cellules sont alors placées en hypoxie à 1% d'O₂ pendant 48h. Après 48h, les cellules sont récupérées dans du Laemmli 2X (60mM Tris-HCl pH 6.8 ; 20% glycérol ; 2% SDS ; 0.01% bleu de bromophénol) (Biorad) complété avec 5% β-mercaptoéthanol (Biorad) sur glace et les protéines sont dénaturées à 95°C pendant 13 min.

IV. Analyses transcriptomiques

1. RT-qPCR

Les cellules sont ensemencées dans une plaque 6 puits à une densité de 1 million de cellules/puits dans le milieu seul ou en présence de 20μM PT2977 ou 20μM Composé 2 (tableau 3) pendant 24h en hypoxie à 1% d'O₂. Après 24 heures d'incubation, les cellules sont lavées avec du DPBS 1X puis lysées avec 600 μl de tampon RLT plus du kit d'extraction afin d'extraire l'ARN. L'étape d'extraction de l'ARN est réalisée à l'aide d'un kit Qiagen (RNEasy Plus Mini Kit) consistant en une succession de filtres cellulaires à travers différentes colonnes pour éliminer l'ADN génomique. La concentration en ARN est ensuite évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible NanoDrop™One (ThermoFisher). La transcription inverse est réalisée à l'aide du kit "iScript™ Reverse Transcription Supermix" (Biorad) avec 1μg d'ARN. Les échantillons sont placés dans un thermocycleur (T100, Biorad) pour réaliser la réaction de transcription inverse avec le programme iScript qui consiste en une étape de priming (5min à 25°C), activation de la reverse transcriptase (46 min à 46°C) et enfin une inactivation de la reverse transcriptase (1min à 95°C). Pour la RT-qPCR, un mélange réactionnel est réalisé pour chaque amorce (Tableau 4) en utilisant du SYBR Green™ comme réactif puis 15μl sont déposés dans une plaque de réaction optique MicroAmp™ 96 puits (Applied Biosystems™). L'ADNc obtenu par transcription inverse est dilué 5 fois avec de l'eau RNase free pour avoir une concentration finale de 50ng/puits. 5 μl d'ADNc sont ajoutés au mélange réactionnel dans la plaque 96 puits. La RT-qPCR est réalisée avec l'instrument de PCR en temps réel StepOnePlus™ (4376357, ThermoFisher) et exécutée sur le logiciel StepOne™ (v2.3). Les données sont analysées à l'aide de ce logiciel et l'ARN18S est utilisé comme contrôle endogène afin de normaliser les données.

Liste des Primers			
Gène cible	Référence	Séquence primer Forward	Séquence primer Reverse
Intégrine $\alpha 5$	Invitrogen	5'-TGCTGACTCCATTGGTTTCACAG-3'	5'-TCTCTCTGCAATCCTCTCGAGC-3'
ARN 18S	Invitrogen	5'-TGTGGTGTGAGGAAAGCAG-3'	5'-TCCAGACCATTGGCTAGGAC-3'

Liste des Primers		
Gène cible	Référence	Transcrit
VEGF	Giagen (PPH00251C-200)	NM_001025366 (3677pb)

Tableau 4 : Liste des primers utilisés pour les RT-qPCR.

2. Analyse d'enrichissement des gènes

Pour explorer l'enrichissement des voies de signalisation, une analyse d'enrichissement des ensembles de gènes (GSEA) [345] a été réalisée entre les groupes à faible et à forte expression d'intégrine $\alpha 5$ à l'aide du logiciel Java GSEA (<https://www.gsea-msigdb.org/gsea/index.jsp> version 4.2.3) avec les ensembles de gènes Hallmark de MSigDb [346]. Les données transcriptomiques proviennent de la cohorte GBM du TCGA. Les échantillons de GBM sont divisés selon l'expression médiane du gène intégrine $\alpha 5$ en groupes d'expression élevée et faible. Seuls les résultats des groupes à forte expression d'intégrine $\alpha 5$ sont présentés.

V. Étude phénotypique des cellules souches de GBM

1. Étude de la prolifération cellulaire par la technologie Incucyte

Une densité de 3 000 cellules souches/puits ou de 15 000 cellules différenciées/puits a été ensemencées dans une plaque 96 puits dans le milieu seul ou en présence des traitements correspondants (Tableau 3). Les cellules ont été placées dans un incubateur tri-gaz (qui permet de moduler les niveaux d'oxygène) contenant l'Incucyte pendant 6 jours à 37°C, 5% CO₂, en normoxie (20% O₂) ou en hypoxie (1% O₂). Le suivi de la prolifération cellulaire a été réalisée par analyse en temps réel en utilisant la technologie IncuCyte®. La confluence des cellules différenciées et la taille des neurosphères (μm^2) ont été surveillées à l'aide d'un système de microscopie automatisé sur cellules vivantes IncuCyte™ Zoom. Des images de chaque puits ont été prises toutes les 4 heures. La taille des sphères et la confluence des puits ont été normalisées au temps zéro (1^{ère} image prise par l'Incucyte) à l'aide du logiciel Prism.

2. Évaluation de l'invasion cellulaire

Les sphères sont générées par la méthode de la goutte suspendue [347]. Une suspension cellulaire de 2000 cellules/20 μ l de milieu de croissance complété par 1,2% de méthylcellulose (Sigma Aldrich, M0262) est déposée sur la surface interne d'une boîte de pétri de 5cm de diamètre (1 goutte de 20 μ l). La boîte de pétri est ensuite retournée puis placée dans une boîte de pétri de 15cm de diamètre. Du papier humidifié avec du DPBS 1X est placé au bord de la grande boîte de pétri pour maintenir une chambre humide (Figure 20). L'ensemble est alors placé dans un incubateur à 37°C, 5% de CO₂ et 21% d'O₂. Après 48h, chaque sphéroïde est transféré dans une plaque de 24 puits préalablement coatée de poly-L-lysine à 10 μ g/ml (Sigma Aldrich, P8920) ou de fibronectine à 10 μ g/ml (Promocell, C-43060) (1 sphère par puits) avec du milieu seul ou avec le traitement correspondant (Tableau 3). Les cellules ont ensuite été placées en normoxie à 20% d'O₂ ou en hypoxie à 1% d'O₂ dans un incubateur à tri-gaz. L'invasion cellulaire a été contrôlée à 24 heures, puis les sphéroïdes ont été fixés avec du glutaraldéhyde à 1% (vol/vol) (Thermo Fisher Scientific, 16400) pendant 30 minutes. Une série de 3 lavages au DPBS 1X est réalisée puis une coloration au DAPI (Sigma Aldrich, D9542) à 1 μ g/ml pendant 45 minutes est effectuée. Une seconde série de 3 lavages de 5min au DPBS 1X est réalisée puis une photo de chaque puits est prise à l'aide d'un microscope inversé à épifluorescence (Axio Zeiss NA 0.3 WD 73) à un grossissement 5X. Les images sont analysées par le logiciel ImageJ à l'aide d'une macro réalisée dans notre laboratoire. Cette dernière permet de déterminer le nombre de cellules migrantes, la surface du sphéroïde et la distance à laquelle les cellules ont migrées.

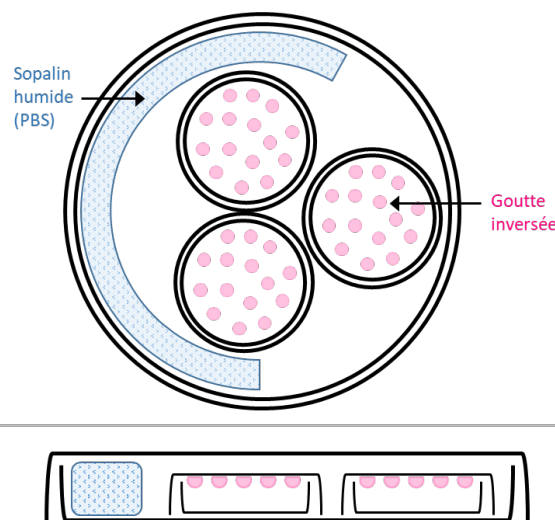


Figure 20 : Schématisation de la technique de la goutte inversée pour la formation des sphères.

VI. Étude de la croissance tumorale *in vivo*

1. Xénogreffe hétérotopique

Des souris Nude NMRI femelles ont été utilisées. Les lignées U87MG, U87MG R50 et U87MG OFF ont été injectées en sous-cutanée au niveau des flancs droit et gauche de la souris (2 millions de cellules/côté). Au total 6 souris par groupe ont été injectées (expérience réalisée 2 fois avec 2x3 souris par lignée). Un suivi des souris a été fait tous les 2 à 3 jours avec une mesure du poids de chaque souris et mesure de la taille de la tumeur si nécessaire avec un pied à coulisse. Les souris ont été sacrifiées lorsque celles-ci avaient une importante perte de poids (20%) ou lorsque la tumeur avait atteint la taille limite (2000 mm³) (Figure 21). Les tumeurs ont été récupérées après sacrifice des souris puis fixées dans de l'azote liquide et stockées à -80°C pour des analyses protéiques et transcriptomiques. Les expériences ont été réalisées conformément aux lois locales et à l'approbation du comité d'éthique (numéro d'approbation du protocole institutionnel 26600).



Figure 21 : Représentation schématique du protocole suivi pour les xénogreffes hétérotopiques. Figure créée avec <https://biorender.com/>.

2. Xénogreffe orthotopique

Les lignées U87MG, U87MG R50 et U87MG OFF ont été injectées en intracérébral à une densité de 200 000 cellules dans 2µl de milieu dans le striatum gauche de souris Nude-NMRI femelles. Pour les lignées de cellules souches (NCH421k, NCH644 et TC22) une densité de 25 000 cellules dans 2µl de milieu a été injectée. Les souris ont été placées dans un cadre stéréotaxique après avoir été anesthésiées dans une chambre à induction à l'isoflurane 2,5%. Durant l'opération les souris sont maintenues anesthésiées avec 2,5% d'isoflurane à l'aide d'un masque au niveau du museau de la souris. Les coordonnées utilisées sont X = -0,5 ; Y = +1,5 ; Z = -3 mm par rapport au bregma. Les cellules sont injectées à l'aide d'une seringue Hamilton à 1µl/min. À l'apparition de symptômes neurologiques et/ou de perte de poids (20% du poids de la souris), les animaux ont été sacrifiés avec un euthanasiant (Euthasol®) qui ont été préalablement anesthésiés. Les expériences ont été réalisées conformément aux lois locales et à l'approbation du comité d'éthique (numéro d'approbation du protocole institutionnel 26600).

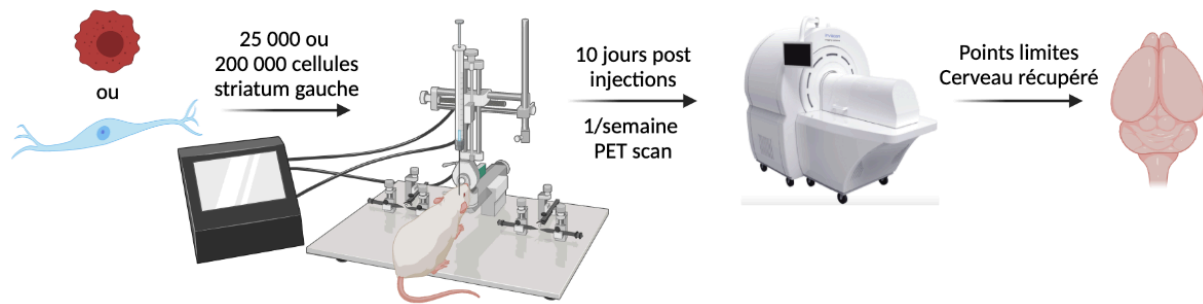


Figure 22 : Représentation schématique du protocole suivi pour les xenogreffes orthotopiques. Figure créée avec <https://biorender.com/>.

3. Imagerie TEP

Les tumeurs ont été évaluées à partir de 10 jours après l'injection des cellules correspondantes, avec des séances d'imagerie hebdomadaires par tomographie par émission de positons (TEP) pendant un mois. Les expérimentations ont été réalisées à l'Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien (IPHC, UMR 7178 CNRS, Strasbourg) à l'aide d'un PET/Scan Inviscan® dédié aux petits animaux. Différents radiotraceurs ont été utilisés : la [¹⁸F]-FET ([¹⁸F]-fluoro-éthyl-L-tyrosine) pour suivre la croissance tumorale, la [¹⁸F]-FLT ([¹⁸F]-fluoro-thymidine) pour évaluer la prolifération cellulaire et le [¹⁸F]-FMISO ([¹⁸F]-fluoro-misonidazole) pour quantifier l'hypoxie intratumorale. Chaque radiotraceur a été produit par la plateforme CYRCE (CYclotron for Research and Education) de l'IPHC et a été injecté par voie intraveineuse au niveau de la veine de la queue. Chaque souris a reçu une injection de 10 MBq en moyenne. Après injection du radiotraceur correspondant les souris ont été mises dans une boîte avec un peu de litière déposée au fond, le temps de la bio-distribution correspondante pour chaque radiotraceur ([¹⁸F]-FET = 45min ; [¹⁸F]-FLT = 90min ; [¹⁸F]-FMISO = 75min). Une fois la bio-distribution complète les souris ont été anesthésiées avec 2,5% d'isoflurane puis placées dans le PET/scan Inviscan®. Une acquisition de 10 min en statique a été lancée puis les images ont été reconstruites à l'aide de l'algorithme itératif de maximisation de sous-ensemble ordonné en 3D (volume de 201 × 201 × 120mm³). Tout au long de l'acquisition les souris sont maintenues sous anesthésie avec 2,5% d'isoflurane. Les images pour les figures ont été obtenues grâce au programme informatique HOROS®. Le volume de la tumeur a été calculée à l'aide du logiciel Amide® (<http://amide.sourceforge.net/index.html>). La tumeur est délimitée manuellement (ROI) puis le SUVmax (Standardized Uptake Value maximal) est calculé par le logiciel à l'aide de la formule suivante :

$$SUV = (\text{Activité volumique ROI}) \div (\text{Activité injectée}) \div (\text{Poids de la souris})$$

Le volume de la tumeur à 40% de la SUVmax est ensuite calculée ainsi que la SUVmean. Le seuillage à 40% permet d'exclure le biais expérimentateur lors de la délimitation de la tumeur. Lors de la quantification des résultats, l'hémisphère droit (tissu sain) a été utilisé en contrôle pour normaliser les résultats. L'index de l'activité tumoral a également été calculé par le produit de la SUVmean et de la taille de la tumeur.

VII. Immunofluorescence

1. Immunomarquage cellulaire

Pour les expériences nécessitant une hypoxie cellulaire, des incubateurs tri-gaz sont utilisés pour moduler le taux en O₂. Des lamelles en verre stérilisées de 12mm de diamètre sont placées au fond d'une plaque 24 puits. Un coating avec 10µg/ml de poly-L-lysine (Sigma Aldrich, P8920) est ensuite réalisé puis les cellules sontensemencées à une densité de 30 000 cellules/puits. Les plaques sont placées à incuber pendant 72h en normoxie 20% O₂ ou en hypoxie 1% O₂. Après 72h d'incubation, le milieu est retiré puis les cellules sont fixées avec du paraformaldéhyde à 4% (PFA, Electron Microscopy Sciences, Thermo Scientific) ou du méthanol à 100% froid pendant 10 minutes. Après 3 lavages avec du DPBS 1X, les cellules sont perméabilisées avec du tampon DPBS 1X / 0,2% Tween20 pendant 15 min. Une étape de saturation est ensuite réalisée pendant 1h avec un tampon contenant 1X DPBS / 1% BSA / 0,1% Triton™ X-100. Les cellules sont ensuite incubées pendant une nuit à 4°C avec les anticorps primaires correspondants (Tableau 2) préparés dans un tampon contenant 1X DPBS/1% BSA. Le lendemain une série de 3 lavages avec du DPBS 1X est réalisée puis les cellules sont incubées avec l'anticorps secondaire conjugué à un fluorochrome pendant 90min dans l'obscurité à température ambiante. La solution d'anticorps secondaire contient également du DAPI à 2µg/ml (Sigma Aldrich, D9542). Après un lavage avec du DPBS 1X, un montage lame/lamelle avec une colle de montage spécifique (FluoreGuard Mounting Medium HardSet, ScyTek) est réalisé. Les lames sont placées à 4°C dans le noir pendant 24 heures afin de bien laisser sécher le milieu de montage. Une fois sèches, les lames sont nettoyées avec de l'éthanol à 70% puis observées avec un microscope confocal à balayage (LEICA TCS SPE II, plateforme PIQ Quantum Efficiency, Strasbourg) à l'aide d'un objectif à immersion d'huile 63X. Les images obtenues sont analysées sur le logiciel ImageJ.

2. Immunomarquage sur tissu inclu en paraffine

Après avoir récupéré les cerveaux de chaque souris, ces derniers ont été fixés dans 4% de paraformaldéhyde durant la nuit. Le lendemain, après 3 lavages au DPBS 1X, un 1^{er} bain dans 15% de sucrose a été réalisé pendant 24h à 4°C. Puis un 2^{ème} bain dans 30% de sucrose pendant 24h à 4°C. Ces différents bains de sucrose permettent une meilleure conservation des cerveaux. Les cerveaux ont ensuite été inclus en paraffine. Les blocs de paraffine sont coupés au microtome avec une épaisseur de 5 µm. Les coupes sont déposées sur des lames SuperfrostTMPlus (J1800AMNZ, Epremedia) et déparaffinées dans du ROTIHistol pendant 6min puis 2 bains de 3min à l'éthanol 100% suivi de 2 bains de 3min à l'éthanol 95% et enfin 2 bains de 3min à l'éthanol 70% ont été effectués. Un dernier bain de réhydratation avec de l'eau milliQ de 3min a été réalisé puis un lavage au DPBS 1X pendant 5min. Les lames sont soumises à un démasquage des antigènes dans une solution de récupération DAKO (Tris / EDTA) pH9 (Agilent Technologies, Les Ulis, France) pendant 10min à 100°C suivi d'une étape d'incubation à température ambiante pendant 30min sous sorbonne.

Après un rinçage au DPBS 1X les lames sont incubées pendant 5min dans du DPBS 1X / 0,2% Triton X-100 (PBS-T). Les lames sont ensuite soigneusement égouttées sur du papier Kimteck en évitant de les laisser sécher. Une étape de blocage des sites non spécifiques a été réalisée pendant 1h à température ambiante en chambre humide, avec 150µl de tampon de blocage déposé sur la lame (5% de sérum de chèvre (NGS), 0,2 % de Triton, 3% de BSA dans du DPBS 1X). Après avoir égoutté les lames celles-ci sont incubées avec les anticorps primaires (Tableau 2) correspondants dilués dans du tampon de blocage durant la nuit à 4°C en chambre humide. Le lendemain 3 lavages au DPBS-T de 5min sont réalisés sous agitation. Les coupes de tissus ont été incubées pendant 1h30 à l'abri de la lumière avec l'anticorps secondaire approprié dilué dans du tampon de blocage supplémenté avec 2µg/ml de DAPI (Sigma Aldrich, D9542). Après deux lavages de 5min avec du DPBS-T puis deux lavages de 5min au DPBS 1X, un montage lame/lamelle avec une colle de montage spécifique (FluoreGuard Mounting Medium HardSet, ScyTek) est réalisé. Les lames sont placées à 4°C dans le noir pendant 24 heures afin de bien laisser sécher le milieu de montage. Une fois sèches, elles sont nettoyées avec de l'éthanol 70% puis observées avec un microscope confocal à balayage (LEICA TCS SPE II, plateforme PIQ Quantum Efficiency, Strasbourg) à l'aide d'un objectif 20X ou à immersion d'huile 63X. Les images obtenues sont analysées sur le logiciel ImageJ.

VIII. Analyses statistiques

Lorsque deux conditions ont été comparées, les analyses statistiques ont été effectuées par des t-tests paramétrique ou non paramétrique suivant les données, si elles suivaient une loi Normale. Une valeur de $p < 0,05$ a été considérée comme significative avec un intervalle de confiance à 95% avec : * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$ et ns = non-significatif. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne et la barre d'erreur représente l'erreur standard de la moyenne (SEM). Le logiciel Graphpad Prism V8 a été utilisé pour toutes les analyses statistiques.

Résultats

1^{ère} partie : Étude de l'intégrine $\alpha 5$ dans les cellules souches de glioblastome

I. Publication 1

1. Résumé

Le GBM est la tumeur cérébrale la plus agressive caractérisée par une importante invasion et hétérogénéité tumorale. Il existe une sous-population, les CSG considérées comme étant à l'origine des tumeurs cérébrales et de l'importante hétérogénéité des GBM. Elles sont également résistantes à la chimiothérapie et à la radiothérapie. Il a été montré que les intégrines jouent un rôle dans la plupart des caractéristiques du cancer telles que la migration cellulaire ou l'angiogenèse. Au sein de mon laboratoire, l'équipe s'est concentrée sur l'intégrine $\alpha5\beta1$ où il a été montré que cette intégrine joue un rôle important dans la migration tumorale et dans la résistance au traitement [329, 332]. Il a également été montré qu'une expression élevée de l'intégrine $\alpha5$ chez les patients atteints d'un GBM était de mauvais pronostic [335]. Dans cette première publication (en cours de finalisation) nous avons étudié la modulation de l'intégrine $\alpha5$ dans les CSG. Pour cela une cohorte de 6 lignées de CSG a été étudiée. Une importante hétérogénéité de l'expression de l'intégrine $\alpha5$ a été mise en évidence au sein de nos différentes lignées de CSG. Dans cette étude nous montrons que l'expression de l'intégrine $\alpha5$ augmente en conditions hypoxiques et que cette augmentation est corrélée à HIF-2 α . Nous montrons également que des inhibiteurs de HIF-2 α associés à des antagonistes d'intégrine $\alpha5$ représentent de nouvelles options thérapeutiques pour traiter les glioblastomes exprimant l'intégrine $\alpha5$.

Hypoxia through HIF-2 α drives heterogeneous expression of α 5 β 1 integrin in glioblastoma stem cells.

Mélissa MESSÉ^{1,2}, Chloé BERNHARD¹, Sophie FOPPOLO¹, Fanny NOULET¹, Sophie MARTIN¹, Christel HEROLD-MENDE³, Ahmed IDBAIH⁴, Horst KESSLER⁵, Jean MOSSER⁶, Mohamed ELATI⁷, Nelly ETIENNE-SELLOUM¹, Uttam K TAMBAR⁸, Natacha ENTZ-WERLE¹, Damien REITA^{1,9}, Patrice LAQUERRIERE² and Monique DONTENWILL^{1*}.

1. UMR7021 CNRS, Tumoral Signaling and Therapeutic Targets, Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, Illkirch, France
2. UMR7178 CNRS, Hubert Curien Multidisciplinary Institute, Université de Strasbourg, Campus Cronenbourg, Strasbourg, France.
3. Division of Neurosurgical Research, Department of Neurosurgery, Heidelberg University Hospital, 69120 Heidelberg, Germany.
4. Sorbonne University, AP-HP, Institut du Cerveau - Paris Brain Institute - ICM, Inserm, CNRS, Hôpitaux Universitaires La Pitié Salpêtrière - Charles Foix, F-75013, Paris, France.
5. Institute for Advanced Study, Department Chemie, Technical University Munich (TUM), Lichtenbergstr. 4, 85747, Garching, Germany.
6. Rennes University, Inserm U1242, Centre de Lutte contre le Cancer Eugène Marquis, F- 35000 Rennes, France.
7. CANTHER, University of Lille, CNRS UMR 1277, Inserm U9020, 59045 Lille cedex, France.
8. Department of Biochemistry, The University of Texas Southwestern Medical Center at Dallas, 5323 Harry Hines Boulevard, Dallas, Texas 75390-9038, United States.
9. Department of Molecular Biology and Oncobiology, University Hospital of Strasbourg, 67098, Cedex, France.

* **Corresponding author** : Dr Monique DONTENWILL, UMR 7021 CNRS, LBP, Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, 67401 Illkirch, France. Tel. (0033)368854267; Fax (0033)368854313; Email: monique.dontenwill@unistra.fr

Introduction

Although clinically characterized by common histological features, accumulating data report that glioblastoma (GBM), the most aggressive brain tumors, correspond to a family of molecularly distinct entities. Integrated genomic, transcriptomic, epigenomic and proteomic analysis allowed the definition of core biological pathways and clinically relevant subtypes of GBM [1–4]. A robust gene expression-based molecular classification of GBM into four subgroups (proneural, neural, classical and mesenchymal) has been proposed in 2010 by the Cancer Genome Atlas Network [5] but neural subclass was since assigned to non tumoral cells [6]. Other layers of complexity have been characterized including the GBM stem cell (GSC) subsets and their high plasticity [7–11]. As these stem-like cells are considered to initiate brain tumors upon orthotopic implantation, to sustain tumor growth, and to escape chemo-radiotherapy-induced cell death [12], it is essential to understand their biology. Tumor cells with stem-like properties are classically cultured from glioblastoma tumor bulk biopsies by using conditions selecting for neural stem cells. They are able to form neurospheres in vitro that recapitulate the histopathology of human GBM tumors when xenotransplanted in nude mice, such as pseudopalisading necrosis, nuclear pleomorphism and extensive neoangiogenesis [13]. They also maintain the clonal and genomic complexity of the corresponding patient tumors [9, 14, 15].

Integrins are involved in most of the hallmarks of cancer [16, 17] and their implications in brain tumor aggressiveness have been highlighted [18]. Some data exist on integrins in brain cancer stem cells [19]. Among them, the $\alpha 6$ integrin (ITGA6 receptor for laminin) enriches for GSC and has been involved in their self-renewal, proliferation and tumor formation capacity [20]. The $\alpha 6$ integrin mRNA level also negatively correlated with glioma patient survival in the REMBRANDT database [21]. Similarly, $\alpha 3$ integrin (ITGA3) was proposed to be overexpressed in GSC and to promote invasion [22]. More recently, $\alpha 7$ integrin (ITGA7) was shown to be specifically expressed in GSC compared to differentiated cells and to be a marker for aggressive and invasive tumors [23]. Finally, $\beta 8$ integrin (ITGB8) similarly appeared as a marker of GSC involved in tumor initiation, progression and resistance to radiotherapy [24, 25]. We [26] and others [21, 27] have shown that patient bulk tumors express varying levels of $\alpha 5$ integrin (ITGA5) mRNA, negatively correlated with glioma patient survival. Our recent data confirm that ITGA5 protein expression is effectively correlated to Stupp protocol treatment resistance [28]. No data currently support its potential role in GSC as a biomarker of

aggressiveness. Starting from patient transcriptomic data (TCGA data), we show by GSEA analysis that overexpression of ITGA5 was linked to different pathways including hypoxia. We therefore investigated the expression of ITGA5 (at the protein level) in GSC maintained in stem cell medium either in normoxia or in hypoxia as it is already known that GSC localize in hypoxic niches. In contrast with data on other integrins (see above), we found that only a subpopulation of GSC is programmed to express it in normoxia and that hypoxic conditions rather increase this expression in a timely manner. Moreover, we demonstrate that among hypoxia-induced factors, HIF-2 α predominantly modulate the expression of ITGA5. Specific HIF-2 α inhibitors in addition with integrin antagonists thus represent new therapeutic options to treat ITGA5 expressing GBM.

Results

Integrin $\alpha 5$ expression is linked to hypoxia and EMT in glioblastoma patients.

The subgrouping of glioblastoma as high and low ITGA5 mRNA- or protein-expressing tumors already showed a clear impact of this integrin on patient survival [19, 21, 26–28]. We used publically available TCGA datasets to investigate the distribution of ITGA5 mRNA in the glioblastoma molecular subtypes and confirmed that it was mainly associated with the mesenchymal subgroup already shown to be the most aggressive and resistant to therapies (Fig. 1A). Concerning intra-tumoral heterogeneity we looked for ITGA5 mRNA expression in spatially defined regions of GBM recorded from a small cohort of 10 patients from the tumor core to the margin (necrotic, core, infiltrating and normal zones [29]). In this dataset, ITGA5 is significantly overexpressed in GBM versus normal brain and interestingly more expressed in the tumor core and in the necrotic zone than in infiltrative area. We confirmed these results using the IVY database showing that perinecrotic zones and perivascular zones are enriched in ITGA5 (Fig. 1B). Gene set enrichment analysis (GSEA) was then used to investigate the relationship of ITGA5 overexpression with biological processes in glioblastoma. Transcriptomic data of 538 patients obtained from GBM cohort of TCGA were divided into ‘high’ and ‘low’ groups based on their ITGA5 expression according to the median expression of this gene. Using the Hallmark gene set, 5 pathways were highlighted with TGF β signaling at the top which we already described in GBM as associated with ITGA5 [30]. Hypoxia (NES = 1.82, FDR q = 0.039) and Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT - NES = 1.76, FDR q = 0.031) (Fig. 1C) were also highlighted in this analysis. At the protein level, ITGA5 expression

appeared heterogeneous between patients [28] but remarkably also in an intratumoral fashion (Fig. 1D). Interestingly high level of ITGA5 is present in pseudopalisades known to outline necrotic regions. As perinecrotic and perivascular zones are proposed as GSC niches [31], we aimed to evaluate the putative expression of ITGA5 in these cells.

Heterogeneity of ITGA5 expression in GSC.

ITGA5 protein expression was evaluated in 6 stem cell lines. Few cell lines expressed it under normoxia conditions after neurosphere dissociation (Fig. 2 left). Interestingly, hypoxia is induced in neurospheres even if the microenvironment was normoxic, as shown by increased CA9, HIF-1 α and HIF-2 α expression, well-known hypoxia markers (Fig. 2 middle). Although CA9 and HIF-1 α required the formation of neurospheres for their expression, HIF-2 α is constitutively present in almost all lineages, even in normoxia. These results confirm those observed in the literature for neuroblastoma [32, 33]. These markers appeared similarly expressed after 6 days under hypoxic conditions (Fig. 2, right). In this case, ITGA5 expression increased significantly in the two already positive cell lines (3731 and TC22), but the hypoxic microenvironment also leads to ITGA5 expression in the GSC line TC7 (Fig. 2, right). Interestingly, we observe a strong expression of HIF-1 α in ITGA5-negative lines compared to ITGA5-positive lines (Fig. 2). Inhibition of HIF-1 α seems necessary to let HIF-2 α play its role as a transcription factor. Integrin expression occurs as expected at the cell membrane as shown by FACS analysis and subcellular fractionation (Fig. S1A and B). The results are in agreement with the heterogeneous expression of ITGA5 in the patient tumors. They also suggest that ITGA5 expression heterogeneity depends on molecular characteristics of specific GSC. In addition, hypoxia triggers an increase of this therapeutic target which may participate to the tumor aggressiveness.

Impact of hypoxia on ITGA5 expression.

Hypoxia appeared to modulate the expression of the integrin subunit. It is already known that the stability of HIFs is finely regulated by different oxygen levels. HIF-1 α is expressed at lower levels of hypoxia compared to HIF-2 α already present in normoxic conditions which is also more stable than HIF-1 α [33, 34]. Therefore, we evaluated the potential relationship between HIFs and ITGA5 expression at shorter time points (24, 48, and 72 hours) (Fig. 3A). HIF-1 α and HIF-2 α behave differently in these conditions. HIF-1 α increased up to 48h of hypoxia followed by a marked decrease at 72h while HIF-2 α increased gradually from 24 to 72h for all

cell lines. Interestingly, the temporal ITGA5 expression followed that of HIF-2 α in the positive cell lines (3731 and TC22). It should also be noted that in both cell lines, HIF-2 α reached a level 2.5 times higher (at 72h) than that observed in normoxia, which is not the case for ITGA5 negative cells (NCH421k and NCH644) suggesting that an HIF-2 α threshold may be involved in the sustained modulation of ITGA5 expression (Fig. 3A). The results obtained with hypoxia 1% O₂ were verified by chemically inducing hypoxia with cobalt chloride (CoCl₂) and desferrioxamine (DFO). This allows for greater and more stable hypoxia. The data obtained confirm the modulation of the expression of ITGA5 by chemical hypoxia. The integrin negative line (NCH421k) remains negative and the ITGA5 positive line (TC22) has increased integrin expression in chemical hypoxia. These results also show a significant increase in HIF-1 α from 24 hours of chemical hypoxia. However, this is not enough to increase the expression of ITGA5. Its expression increases in parallel with the expression of HIF-2 α from 48 hours (Fig. S2). We also observed a sharp and rapid decrease of HIF-1 α in TC22 neurospheres cultured in normoxic conditions after 3 days of hypoxia, although the level of HIF-2 α remained high as well as ITGA5 expression. Here also, HIF-1 α appeared unstable and finely controlled by oxygen level in contrast with HIF-2 α and ITGA5 (Fig. S3).

Taken together, these results suggest a potential impact of HIF-2 α on the expression of ITGA5 in GSC under hypoxia. We confirmed this hypothesis by linear regression analysis between HIF-1 α or HIF-2 α and ITGA5 expressions. HIF-2 α and ITGA5 levels significantly correlated in TC22 and 3731 cell lines in hypoxic conditions whereas it was not the case with HIF-1 α . (Fig. 3B). HIF-2 α and ITGA5 expressions appeared thus linked in hypoxic conditions.

Impact of HIFs inhibition on ITGA5 expression.

We then aimed to clarify the role of HIF-1 α and HIF-2 α on ITGA5 expression in hypoxia. As a first attempt to selectively inhibit expression of HIF-1 α , we used irinotecan, a topoisomerase 1 inhibitor, which was shown to alter the expression of HIF-1 α by inhibiting its mRNA translation [35–37]. Integrin-positive line TC22 cells were treated with 2.5 μ M irinotecan for 72h in hypoxia 1% O₂. In our GSC model, irinotecan not only inhibited HIF-1 α but also HIF-2 α expression associated with a disappearance of ITGA5 expression (Fig. 4A). To address more specifically the impact of each transcription factor, we used specific siRNA depletion. As shown in Fig. 4B, HIF-1 α -siRNA specifically depleted their target gene but had no effect on

ITGA5. Inversely, HIF-2 α -siRNA decreased HIF-2 α expression (20%) and concomitantly ITGA5 by 30% (Fig. 4B).

Finally, we checked specific HIF-2 α inhibitors : PT2977 [38] and compound 2 [39]. These molecules recognize the PAS-B domain of HIF-2 α and prevents its dimerization with the nuclear subunit HIF1- β also called ARNT thus inhibiting HIF-2 α transcriptional activity. As PAS-B domain present a specific pocket on HIF-2 α and these compounds bind to this pocket, they are highly specific for the inhibition of HIF-2 α function [39, 40]. As a control we verified the effect of compound 2 on VEGF mRNA level which is a target gene of HIF-2 α (Fig. S4). Both compounds (20 μ M) proved able to decrease ITGA5 mRNA after 24h and ITGA5 protein after 72h treatment. Compound 2 also decreased HIF-2 α expression perhaps explaining its better effect on ITGA5 (44% decrease with compound 2 *versus* 19% with PT2977) (Fig. 4C). Results suggest that HIF-2 α is preferentially involved in the control of ITGA5 modulation particularly under hypoxia in GSC.

HIF-2 α and ITGA5 may be therapeutic targets in specific GSC.

Based on our previous results, we hypothesized that hypoxia may affect phenotypically GSC in particular through ITGA5-dependent pathways. We already have shown that this integrin is involved in migration and therapy resistance of differentiated GBM cells [16, 41, 42]. We now investigated if hypoxia-driven expression of the integrin may affect proliferation and/or migration of GSC. First, we assessed cell proliferation, with measure of the neurosphere size as a readout, using Incucyte[®] technology. As shown in Figure 5A, neurosphere sizes are not linked to enhanced expression of ITGA5. As for example TC22 (α 5+) and NCH644 (α 5-) cells have a larger sphere size after 6 days in normoxia compared to the other lines. Hypoxia only affected the neurosphere sizes of two cell lines, namely 3731 and NCH644 which respectively express or not the integrin as shown before (Fig. 5A). These data suggest that ITGA5 expression does not influence stem cell proliferation either in normoxia or in hypoxia.

As a confirmation, FR248, a specific antagonist of ITGA5, does not alter neurosphere sizes either in integrin-expressing (TC22) or in non-expressing cells (NCH421k) (Fig. 5B). We then combined FR248 with compound 2 (20 μ M) which is devoid of effect when used alone. Interestingly, the combination of 20 μ M of FR248 and 20 μ M of compound 2 triggers an effect on the size of the neurospheres in the positive line for integrin only (TC22) (58% decrease)

(Fig. 5B). Thus, there appears to be a synergistic effect with the combined inhibition of ITGA5 and HIF-2 α on the proliferation of ITGA5-positive GSC.

We then investigated the impact of hypoxia on stem cell migration. Spheres formed by the inverted drop technique were deposited on poly-L-lysine (a neutral substrate for adhesion) or fibronectin (the ligand of ITGA5). No cell evasion from spheres deposited on poly-L-lysine was detectable. However, when the spheres are deposited on fibronectin, cell evasion was clear for the TC22 ($\alpha 5^+$) line but not detectable for the NCH421k ($\alpha 5^-$) line. Moreover, hypoxia increased cell evasion in the former line presumably in relationship with the increase of ITGA5 expression. (fig. 5C). To confirm this hypothesis, the spheres were treated with FR248 (20 μ M) which inhibited completely the cell capacity to evade from spheres and to migrate on fibronectin either in normoxia or in hypoxia. Data confirm the impact of this integrin on cell migration out of GSC spheres.

Compound 2 decreased ITGA5 expression by more than 40% in TC22 cell line. We then evaluated the effect of HIF-2 α inhibition on stem cell migration. Interestingly, compound 2 proved able to inhibit the cell evasion and migration by 89% in normoxia and 92% in hypoxia suggesting here again the interconnection between HIF-2 α and ITGA5 (Fig. 5D).

Together, these data show for the first time that stem cell migration on fibronectin is dependent on ITGA5 expression as was shown previously on differentiated tumoral cells. This migration is enhanced by hypoxia and HIF-2 α expression specifically. These results suggest that some GSC in hypoxic niches would acquire a migratory phenotype through modulation of the integrin expression.

Discussion

Integrins are implicated in different hallmarks of cancer as reviewed recently [16, 43–45]. Blocking their functions or inhibiting their expressions have been extensively studied in preclinical studies with encouraging results. Clinical trials however failed to demonstrate integrin inhibitors efficacy in different solid tumors including GBM [46]. Among others, lack of knowledge on the heterogeneity of integrin expressions in the tumor of patients may be involved in these clinical failures.

Concerning more particularly the ITGA5, its role in human cancer has been reviewed in [47]. Data confirm its role as a prognostic biomarker in solid tumors as for examples in laryngeal [48], head and neck [49], or oesophageal [50] squamous cell carcinoma. ITGA5 mediates tumor-stroma crosstalk to promote dissemination, metastasis and angiogenesis in liver, gastric, breast or pancreatic cancers [51–55]. In GBM, ITGA5 has been included in the mesenchymal subtype signature provided in the Verhaak classification [5]. Interestingly, its prognostic and therapeutic value has been confirmed in a recent publication which also demonstrated an impact of a high integrin expression on the tumor immune microenvironment [56]. Despite all the preclinical and clinical evidence that ITGA5 may be considered as a therapeutic target, clinical trials with Volociximab (a humanized anti- $\alpha 5$ antibody) failed [57]. We have shown previously that TMZ chemotherapy greatly affected the integrin repertoire in glioblastoma cells [41] suggesting that anti-integrin therapies must be adjusted to the right tumor progression time and to the right patient.

To better understand the pattern of ITGA5 expression in GBM, we analyzed patient data and found that high integrin expressing tumors were correlated with exacerbated hypoxia pathway. Hypoxia is already known to maintain a GSC phenotype, to regulate their tumorigenic capacity and to initiate a mesenchymal switch [58–60]. We therefore focused on ITGA5 expression in GSC assuming that they are at the apex of tumor development and presumably at the origin of integrin expression heterogeneity. Our data confirm that not all GSC express ITGA5 and that hypoxia enhances it in selected cell lines. Results are in line with data showing a selective impact of hypoxia on the modulation of ITGA5 expression in breast cancer [61]. The hypoxic pathway is regulated by an induction of hypoxia-induced transcription factors, HIF-1 α and HIF-2 α . Both HIFs bind to a consensus HIF-binding site on the ITGA5 gene promoter in breast cancer cells and both are involved in ITGA5 mRNA and protein expression in these tumors [61]. However, HIF-2 α plays specific oncogenic roles in tumors [62] and particularly in GBM where it appears as a key regulator in the hypoxic niche to maintain GSC stemness [63]. Our results are in line with HIF-2 α controlling ECM-GSC interactions through modulation of ITGA5 expression and ITGA5-dependent cell migration. Targeting hypoxia became an interesting way to fight hypoxic tumors and specific HIFs inhibitors were developed. We focused on HIF-2 α selective inhibitors in our study : PT2977 and compound 2. This later molecule was one of the first small molecule designed in the field [39]. It binds only to the

PAS-B domain (Per-ARNT-Sim-B) of HIF-2 α thanks to the existence of a specific druggable pocket [39]. It prevents the HIF-2 α / ARNT dimerization and transcription of HIF-2 α target genes. PT2977 (Belzutifan) is a second-generation inhibitor that [38, 64, 65] was approved by the Food and Drug Administration (FDA) in 2021 for the treatment of Von Hippel-Lindau disease (VHL) in patients with renal cell carcinoma, central nervous system hemangioblastoma and pancreatic neuroendocrine tumors [66] HIF-2 α inhibitors were able to decrease ITGA5 expression and to inhibit GSC migration without affecting cell proliferation. Interestingly, combination of HIF-2 α inhibitor with ITGA5 antagonist results in a strong anti-proliferative effect. These results suggest that other pathways are implicated in the modulation of ITGA5 expression in GSC that remain to be explored.

In conclusion, we demonstrated for the first time a link between HIF-2 α and ITGA5 in GSC under hypoxic conditions. A combination of treatment with HIF-2 α and ITGA5 inhibitors could be more effective in developing therapies targeting ITGA5 in GBM. Prescreening patients who express ITGA5 would optimize treatment efficacy to improve patient survival.

Materials and methods

Gene Set Enrichment Analysis

To explore signaling pathways enrichment, Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) [67] was performed between low and high ITGA5 expression groups using GSEA Java software (<https://www.gsea-msigdb.org/gsea/index.jsp> version 4.2.3) with MSigDb Hallmark gene sets [68]. Transcriptomic data are obtained from Glioblastoma (GBM) cohort of TCGA. GBM samples are divided according to the median expression of ITGA5 gene into high and low expression groups. Only results from high ITGA5 expression groups are shown.

Immunohistochemistry

The tissues were provided by the pathology department of the University Hospital of Amiens in the form of tumor sections fixed in formalin and embedded in paraffin (FFPE) (thickness 5 μ m). Human tumors were deparaffinized, rehydrated, and subjected to an antigen unmasking protocol using Dako (Tris/EDTA) pH9 retrieval solution (Agilent Technologies, Les Ulis, France). Blocking buffer (5% goat serum, 0.1% Tween-20, PBS) was applied for 1 h at room temperature. The ITGA5 protein (Table 1) was labeled with a rabbit antibody directed against

the cytoplasmic tail of ITGA5 by overnight incubation at 4°C. After washing in 0.1% PBS-Tween, the tissue sections were incubated for 1h with the corresponding secondary antibody. Nuclei were counterstained with DAPI (10 mg/mL, Sigma-Aldrich) and coverslips were mounted on a tissue section using Permafluor aqueous mounting medium (Fisher Scientific). Images were acquired using a Leica TCS SPEII confocal laser scanning microscope at 40X magnification from the PIQ Quantum Efficiency Strasbourg platform (<http://quest.igbmc.fr/>, accessed 2 July 2021). The following settings were applied for DAPI and Alexa Fluor™ 647, respectively: DAPI: excitation wavelengths = 405 nm, laser power 15%, emission spectrum = 430–480 nm, gain = 630 volts, offset = -0.36; Alexa Fluor® 647: Excitation wavelengths = 635 nm, laser power 19.5%, emission spectrum = 647–740 nm, gain = 830 volts, offset = -0.53. All confocal microscope settings were kept constant between each staining experiment. The quantification of ITGA5 protein was estimated as the mean red fluorescence intensity (MFI) per field using ImageJ software version 1.50 [69], and the mean MFI (MMFI) was calculated for each tumor.

Cell line and cell culture for neurosphere

Patient-derived GBM stem cell lines were obtained. NCH644 and NCH421k glioma stem cells were provided by Dr. Herold-Mende (Department of Neurosurgery, University of Heidelberg, Germany). Glioma stem cells 3731 and 5706 were provided by Dr. Idbaih (Department of Neurologie 2-Mazarin in Hôpitaux Universitaires, Paris). TC7 and TC22 glioma stem cells are from patient-derived heterotopic xenografts (PDX) established in the laboratory. Cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle medium with nutrient Mixture F-12 and GlutaMAX™ (DMEMF12+GlutaMAX™, Gibco™), supplemented with 20% of BSA Insulin Transferrin (BIT-100, Provitro), 20ng/mL of EGF and 20ng/mL β -FGF (Reliatech). All cell lines were maintained in a 37°C incubator, humidified with 5% CO₂. Neurospheres are dissociated every 7 days with accutase (A6964, Sigma) and then put back into culture.

Western Blot analysis

Cells were directly lysed with 2X Laemmli (60mM Tris-HCl pH 6.8; 20% glycerol; 2% SDS; 0.01% bromophenol blue) (Biorad) supplemented with 5% β -mercaptoethanol (Biorad) on ice and denatured at 95°C for 13 minutes. Lysates are electrophoresed using 4-20% SDS-PAGE polyacrylamide gels (Biorad) and then transferred to PVDF membrane (GE Healthcare, Velizy, France). PVDF membranes were blocked in Tris-buffered saline 0.1% Tween-20 (TBST) containing 5% nonfat milk for 1 h at room temperature and incubated overnight with

corresponding primary antibody (Table 1) diluted in TBST containing 5% nonfat milk at 4 °C. Membranes were washed with TBST and incubated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies (table 1) diluted in TBST containing 5% nonfat milk at room temperature for 1 h. After washing, the blots were visualized using the enhanced chemiluminescence (ECL) system (ECL™ Prime Western Blotting System, GE Healthcare Bioscience) with a ImageQuant™ LAS 4000 analyser (GE Healthcare). Quantification of non-saturated images was done using ImageJ software (National institutes of Health, Bethesda, MD, USA). For each experiment, 3 lysates from different cell cultures were used. Tubulin was used as the loading control for all samples.

RT-qPCR analysis

Cells are plated in a 6-well plate at a density of 1M cells/well in medium alone or in the presence of 20µM PT2977 or 20µM compound 2 for 24h in 1% O₂ hypoxia. After 24 hours of incubation, the cells are washed with 1X PBS and then lysed with 600 µL of RLT plus buffer (Qiagen kit) in order to extract the RNA. The RNA extraction step is performed using a Qiagen kit (RNEasy Plus Mini Kit) consisting of a succession of cell filters through different columns to remove genomic DNA. The RNA concentration is then evaluated with a UV-Visible spectrophotometer NanoDrop™ One (ThermoFisher). Reverse transcription is performed using the "iScript™ Reverse Transcription Supermix" kit (Biorad). The samples are then placed in a thermal cycler (T100, Biorad) to perform the reverse transcription reaction with the iScript program. For RT-qPCR, a reaction mixture is made for each primer (Table 3) using SYBR Green™ as reagent and 15 µL are deposited in a MicroAmp™ 96-well optical reaction plate (Applied Biosystems™). The cDNA obtained from the reverse transcription is diluted 5 times and 5 µL of DNA is added to this mixture in the 96-well plate. RT-qPCR is performed with the StepOnePlus™ real-time PCR instrument (4376357, ThermoFisher) and run on StepOne™ software (v2.3). The data is then analyzed using this software and RNA18S is used as an endogenous control.

Transfection of siRNA

Cells were seeded at a density of 500,000 cells/well in a 6-well plate previously coated with 20 µg/ml cell-tak (Corning™). The cells were then transfected with the corresponding siRNA (Qiagen) at 100nM for HIF-1α and 250nM for HIF-2α according to the following steps. A solution of siRNA at the corresponding concentration was prepared in 250µl of optiMEM as well as a solution of 5µl of lipofectamine 2000 (ThermoFisher) in 250µl of optiMEM. The

solutions are then incubated at room temperature for 5 min. After incubation, the 250 μ l of lipofectamine solution is mixed with the siRNA solution. The mixture is then left to incubate at room temperature for 25min. Finally, the lipofectamine/siRNA mixture is added to the cells in the culture medium. The cells are then placed in 1% O₂ hypoxia for 48h. After 48h, cells are recovered in 2X Laemmli (60mM Tris-HCl pH 6.8; 20% glycerol; 2% SDS; 0.01% bromophenol blue) (Biorad) supplemented with 5% β -mercaptoethanol (Biorad) on ice and denatured at 95°C for 13 min.

Proliferation assays (Incucyte[®])

A density of 3,000 stem cells/well or 15,000 differentiated cells/well was placed in a 96-well plate in the medium alone or with the corresponding treatments (Table 2). The cells were then placed in a trigaz incubator, to modulate oxygen levels, containing the incucyte for 6 days at 37°C, 5% CO₂ in normoxia (20% O₂) or hypoxia (1% O₂). Cell proliferation assays were performed by real-time analysis using IncuCyte technology. Adherent cell confluence and neurosphere size (μ m²) were monitored using an IncuCyteTM Zoom live cell analysis system. The IncuCyte[®] technology took images every 4 hours, cell area and confluence were measured and then normalized to time zero.

Invasion assay

Neurospheres are generated by the hanging drop method [70]. A cell suspension of 2000 cells/20 μ L of growth medium supplemented with 20% methylcellulose (Sigma Aldrich, M0262) is deposited on the inner surface of a Petri dish. After 48 h, each spheroid was transferred to a 24-well plate coated with poly-L-lysine (Sigma Aldrich, P8920) or fibronectin (Promocell, C-43060) (1 sphere per well) with medium alone or with the corresponding treatment (Table 2). The cells were then placed in 20% O₂ normoxia or 1% O₂ hypoxia in a trigaz incubator. Invasion was monitored for 24 hours and then spheroids were fixed with 1% (vol/vol) glutaraldehyde (Thermo Fisher Scientific, 16400) for 30 minutes, followed by DAPI staining (Sigma Aldrich, D9542) at 1 μ g/mL for 45 minutes. An epifluorescence microscope is used to take pictures. Using ImageJ software and a macro made in our laboratory, the number of migrating cells, the surface area of the spheroid and the distance to which the cells have migrated are determined.

FACS analysis

After counting the dissociated stem cells, a pellet of 100 000 cells was made. 3 washes with PBS 1X / BSA 1% were performed and then the cell pellets were resuspended and incubated for 30min at 4°C with the corresponding primary antibodies. the cells were then centrifuged at 2500 rpm for 1 min at 4°C and then washed twice with PBS 1X / BSA 1%. After the washes, the pellets were resuspended and incubated for 30 min at 4°C in the dark with the corresponding secondary antibodies. 2 washes with 1X PBS / 1% BSA were performed and then the cells were resuspended in 1X PBS. The samples were then run on a flow cytometer. The results were analyzed with the FCSalyzer 0.9.22-alpha software.

Subcellular fractionation

After counting the dissociated stem cells, a pellet of 5M cells was made. A cell compartment kit for subcellular fractionation of cells was used (Qproteome cell compartment, Qiagen kit). It consists of the sequential addition of different extraction buffers to a cell pellet followed by a succession of centrifugations. Proteins from different cellular compartments are selectively isolated (cytosol, membrane, nucleus and cytoskeleton). The protein concentration is evaluated with a UV-Visible NanoDrop™ One spectrophotometer (Thermo Fisher). 10µg of proteins were lysed in 200µl of 2X Laemmli (60 mM Tris-HCl pH 6.8; 20% glycerol; 2% SDS; 0.01% bromophenol blue) (Biorad) supplemented with 5% β-mercaptoethanol (Biorad) on ice and denatured at 95°C for 13 min. Each compartment was checked by Western blot with the corresponding antibodies (Table 1).

Statistics

Statistical significance for the tumour growth from day 0 to day 6 was analysed by paired t-tests. Statistical significance between the normoxic and hypoxic conditions was performed using unpaired t-tests. $P < 0.05$ was considered to be significant, and * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Results are shown as mean and the error bar represents the standard error of mean (SEM). Technical or biological replicates as indicated in the figure legend. Graphpad Prism Version 8 was used to analyze the data.

References

1. Nutt CL, Mani DR, Betensky RA, et al (2003) Gene expression-based classification of malignant gliomas correlates better with survival than histological classification. *Cancer Res* 63:1602–1607
2. Cancer Genome Atlas Research Network (2008) Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 455:1061–1068. <https://doi.org/10.1038/nature07385>
3. Brennan CW, Verhaak RGW, McKenna A, et al (2013) The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma. *Cell* 155:462–477. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.034>
4. Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, 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. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.02.019>
5. Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, 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. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.020>
6. Wang Q, Hu B, Hu X, et al (2017) Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment. *Cancer Cell* 32:42-56.e6. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.06.003>
7. Neftel C, Laffy J, Filbin MG, et al (2019) An Integrative Model of Cellular States, Plasticity, and Genetics for Glioblastoma. *Cell* 178:835-849.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.06.024>
8. Patel AP, Tirosh I, Trombetta JJ, et al (2014) Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science* 344:1396–1401. <https://doi.org/10.1126/science.1254257>
9. Dirkse A, Golebiewska A, Buder T, et al (2019) Stem cell-associated heterogeneity in Glioblastoma results from intrinsic tumor plasticity shaped by the microenvironment. *Nat Commun* 10:1787. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09853-z>
10. Mitchell K, Troike K, Silver DJ, Lathia JD (2021) The evolution of the cancer stem cell state in glioblastoma: emerging insights into the next generation of functional interactions. *Neuro Oncol* 23:199–213. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noaa259>
11. Innes JA, Lowe AS, Fonseca R, et al (2022) Phenotyping clonal populations of glioma stem cell reveals a high degree of plasticity in response to changes of microenvironment. *Lab Invest* 102:172–184. <https://doi.org/10.1038/s41374-021-00695-2>
12. Jackson M, Hassiotou F, Nowak A (2015) Glioblastoma stem-like cells: at the root of tumor recurrence and a therapeutic target. *Carcinogenesis* 36:177–185. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgu243>
13. Bhat KPL, Balasubramanian V, Vaillant B, et al (2013) Mesenchymal differentiation mediated by NF-κB promotes radiation resistance in glioblastoma. *Cancer Cell* 24:331–346. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.08.001>
14. Stieber D, Golebiewska A, Evers L, et al (2014) Glioblastomas are composed of genetically divergent clones with distinct tumorigenic potential and variable stem cell-associated phenotypes. *Acta Neuropathol* 127:203–219. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1196-4>
15. Idbaih A (2017) Structural and functional intratumor heterogeneities in glioblastoma: a

spacetime odyssey at single-cell level. *Ann Oncol* 28:1415–1417.
<https://doi.org/10.1093/annonc/mdx217>

16. Blandin A-F, Noulet F, Renner G, et al (2016) Glioma cell dispersion is driven by $\alpha 5$ integrin-mediated cell-matrix and cell-cell interactions. *Cancer Lett* 376:328–338.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.04.007>
17. Seguin L, Desgrosellier JS, Weis SM, Cheresch DA (2015) Integrins and cancer: regulators of cancer stemness, metastasis, and drug resistance. *Trends Cell Biol* 25:234–240.
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.12.006>
18. Schaffner F, Ray AM, Dontenwill M (2013) Integrin $\alpha 5\beta 1$, the Fibronectin Receptor, as a Pertinent Therapeutic Target in Solid Tumors. *Cancers (Basel)* 5:27–47.
<https://doi.org/10.3390/cancers5010027>
19. Malric L, Monferran S, Gilhodes J, et al (2017) Interest of integrins targeting in glioblastoma according to tumor heterogeneity and cancer stem cell paradigm: an update. *Oncotarget* 8:86947–86968. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20372>
20. Lathia JD, Gallagher J, Heddleston JM, et al (2010) Integrin alpha 6 regulates glioblastoma stem cells. *Cell Stem Cell* 6:421–432. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.02.018>
21. Lathia JD, Li M, Sinyuk M, et al (2014) High-throughput flow cytometry screening reveals a role for junctional adhesion molecule a as a cancer stem cell maintenance factor. *Cell Rep* 6:117–129. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.11.043>
22. Nakada M, Nambu E, Furuyama N, et al (2013) Integrin $\alpha 3$ is overexpressed in glioma stem-like cells and promotes invasion. *Br J Cancer* 108:2516–2524. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.218>
23. Haas TL, Sciuto MR, Brunetto L, et al (2017) Integrin $\alpha 7$ Is a Functional Marker and Potential Therapeutic Target in Glioblastoma. *Cell Stem Cell* 21:35–50.e9.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.04.009>
24. Guerrero PA, Tchaicha JH, Chen Z, et al (2017) Glioblastoma stem cells exploit the $\alpha v\beta 8$ integrin-TGF $\beta 1$ signaling axis to drive tumor initiation and progression. *Oncogene* 36:6568–6580. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.248>
25. Malric L, Monferran S, Delmas C, et al (2019) Inhibiting Integrin $\beta 8$ to Differentiate and Radiosensitize Glioblastoma-Initiating Cells. *Mol Cancer Res* 17:384–397.
<https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-18-0386>
26. Janouskova H, Maglott A, Leger DY, et al (2012) Integrin $\alpha 5\beta 1$ plays a critical role in resistance to temozolomide by interfering with the p53 pathway in high-grade glioma. *Cancer Res* 72:3463–3470. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-4199>
27. Holmes RS, Rout UK (2011) Comparative studies of vertebrate Beta integrin genes and proteins: ancient genes in vertebrate evolution. *Biomolecules* 1:3–31.
<https://doi.org/10.3390/biom1010003>
28. Etienne-Selloum N, Prades J, Bello-Roufai D, et al (2021) Expression Analysis of $\alpha 5$ Integrin Subunit Reveals Its Upregulation as a Negative Prognostic Biomarker for Glioblastoma. *Pharmaceuticals (Basel)* 14:882. <https://doi.org/10.3390/ph14090882>
29. Lemée J-M, Clavreul A, Aubry M, et al (2015) Characterizing the peritumoral brain zone in glioblastoma: a multidisciplinary analysis. *J Neurooncol* 122:53–61.
<https://doi.org/10.1007/s11060-014-1695-8>

30. Cosset EC, Godet J, Entz-Werlé N, et al (2012) Involvement of the TGF β pathway in the regulation of $\alpha 5 \beta 1$ integrins by caveolin-1 in human glioblastoma. *Int J Cancer* 131:601–611. <https://doi.org/10.1002/ijc.26415>
31. Lathia JD, Heddleston JM, Venere M, Rich JN (2011) Deadly teamwork: neural cancer stem cells and the tumor microenvironment. *Cell Stem Cell* 8:482–485. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.04.013>
32. Mohlin S, Hamidian A, von Stedingk K, et al (2015) PI3K-mTORC2 but not PI3K-mTORC1 regulates transcription of HIF2A/EPAS1 and vascularization in neuroblastoma. *Cancer Res* 75:4617–4628. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0708>
33. Holmquist-Mengelbier L, Fredlund E, Löfstedt T, et al (2006) Recruitment of HIF-1 α and HIF-2 α to common target genes is differentially regulated in neuroblastoma: HIF-2 α promotes an aggressive phenotype. *Cancer Cell* 10:413–423. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.08.026>
34. Pietras A, Gisselsson D, Ora I, et al (2008) High levels of HIF-2 α highlight an immature neural crest-like neuroblastoma cell cohort located in a perivascular niche. *J Pathol* 214:482–488. <https://doi.org/10.1002/path.2304>
35. Kummar S, Raffeld M, Juwara L, et al (2011) Multihistology, target-driven pilot trial of oral topotecan as an inhibitor of hypoxia-inducible factor-1 α in advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* 17:5123–5131. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-0682>
36. Nguyen A, Moussalieh FM, Mackay A, et al (2017) Characterization of the transcriptional and metabolic responses of pediatric high grade gliomas to mTOR-HIF-1 α axis inhibition. *Oncotarget* 8:71597–71617. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16500>
37. Guérin E, Raffelsberger W, Pencreach E, et al (2012) In vivo topoisomerase I inhibition attenuates the expression of hypoxia-inducible factor 1 α target genes and decreases tumor angiogenesis. *Mol Med* 18:83–94. <https://doi.org/10.2119/molmed.2011.00120>
38. Xu R, Wang K, Rizzi JP, et al (2019) 3-[(1S,2S,3R)-2,3-Difluoro-1-hydroxy-7-methylsulfonylindan-4-yl]oxy-5-fluorobenzonitrile (PT2977), a Hypoxia-Inducible Factor 2 α (HIF-2 α) Inhibitor for the Treatment of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *J Med Chem* 62:6876–6893. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00719>
39. Scheuermann TH, Li Q, Ma H-W, et al (2013) Allosteric inhibition of hypoxia inducible factor-2 with small molecules. *Nat Chem Biol* 9:271–276. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1185>
40. Scheuermann TH, Stroud D, Sleet CE, et al (2015) Isoform-Selective and Stereoselective Inhibition of Hypoxia Inducible Factor-2. *J Med Chem* 58:5930–5941. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00529>
41. Sani S, Pallaoro N, Messe M, et al (2022) Temozolomide-Acquired Resistance Is Associated with Modulation of the Integrin Repertoire in Glioblastoma, Impact of $\alpha 5 \beta 1$ Integrin. *Cancers (Basel)* 14:369. <https://doi.org/10.3390/cancers14020369>
42. Renner G, Noulet F, Mercier M-C, et al (2016) Expression/activation of $\alpha 5 \beta 1$ integrin is linked to the β -catenin signaling pathway to drive migration in glioma cells. *Oncotarget* 7:62194–62207. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11552>
43. Hamidi H, Ivaska J (2018) Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* 18:533–548. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0038-z>

44. Bergonzini C, Kroese K, Zweemer AJM, Danen EHJ (2022) Targeting Integrins for Cancer Therapy - Disappointments and Opportunities. *Front Cell Dev Biol* 10:863850. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.863850>
45. Hanahan D (2022) Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov* 12:31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
46. Cruz Da Silva E, Mercier M-C, Etienne-Selloum N, et al (2021) A Systematic Review of Glioblastoma-Targeted Therapies in Phases II, III, IV Clinical Trials. *Cancers (Basel)* 13:1795. <https://doi.org/10.3390/cancers13081795>
47. Hou J, Yan D, Liu Y, et al (2020) The Roles of Integrin $\alpha 5\beta 1$ in Human Cancer. *Onco Targets Ther* 13:13329–13344. <https://doi.org/10.2147/OTT.S273803>
48. Zhou C, Shen Y, Wei Z, et al (2022) ITGA5 is an independent prognostic biomarker and potential therapeutic target for laryngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Lab Anal* 36:e24228. <https://doi.org/10.1002/jcla.24228>
49. Zou B, Wang D, Xu K, et al (2019) Integrin $\alpha 5$ as a potential biomarker of head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Lett* 18:4048–4055. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10773>
50. Xie J-J, Guo J-C, Wu Z-Y, et al (2016) Integrin $\alpha 5$ promotes tumor progression and is an independent unfavorable prognostic factor in esophageal squamous cell carcinoma. *Hum Pathol* 48:69–75. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2015.09.029>
51. Miyamoto S, Nagano Y, Miyazaki M, et al (2022) Integrin $\alpha 5$ mediates cancer cell-fibroblast adhesion and peritoneal dissemination of diffuse-type gastric carcinoma. *Cancer Lett* 526:335–345. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2021.11.008>
52. Peng Z, Hao M, Tong H, et al (2022) The interactions between integrin $\alpha 5\beta 1$ of liver cancer cells and fibronectin of fibroblasts promote tumor growth and angiogenesis. *Int J Biol Sci* 18:5019–5037. <https://doi.org/10.7150/ijbs.72367>
53. Pantano F, Croset M, Driouch K, et al (2021) Integrin $\alpha 5$ in human breast cancer is a mediator of bone metastasis and a therapeutic target for the treatment of osteolytic lesions. *Oncogene* 40:1284–1299. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-01603-6>
54. Kuninty PR, Bansal R, De Geus SWL, et al (2019) ITGA5 inhibition in pancreatic stellate cells attenuates desmoplasia and potentiates efficacy of chemotherapy in pancreatic cancer. *Sci Adv* 5:eaax2770. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax2770>
55. Wang T, Yang J, Mao J, et al (2022) ITGA5 inhibition in pancreatic stellate cells re-educates the in vitro tumor-stromal crosstalk. *Med Oncol* 40:39. <https://doi.org/10.1007/s12032-022-01902-w>
56. Li S, Zhang N, Liu S, et al (2022) ITGA5 Is a Novel Oncogenic Biomarker and Correlates With Tumor Immune Microenvironment in Gliomas. *Front Oncol* 12:844144. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.844144>
57. Bell-McGuinn KM, Matthews CM, Ho SN, et al (2011) A phase II, single-arm study of the anti- $\alpha 5\beta 1$ integrin antibody volociximab as monotherapy in patients with platinum-resistant advanced epithelial ovarian or primary peritoneal cancer. *Gynecol Oncol* 121:273–279. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2010.12.362>
58. Li Z, Bao S, Wu Q, et al (2009) Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Cancer Cell* 15:501–513. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.03.018>

59. Boyd NH, Tran AN, Bernstock JD, et al (2021) Glioma stem cells and their roles within the hypoxic tumor microenvironment. *Theranostics* 11:665–683. <https://doi.org/10.7150/thno.41692>
60. Cooper LAD, Gutman DA, Chisolm C, et al (2012) The tumor microenvironment strongly impacts master transcriptional regulators and gene expression class of glioblastoma. *Am J Pathol* 180:2108–2119. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.01.040>
61. Ju JA, Godet I, Ye IC, et al (2017) Hypoxia Selectively Enhances Integrin $\alpha 5\beta 1$ Receptor Expression in Breast Cancer to Promote Metastasis. *Mol Cancer Res* 15:723–734. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-16-0338>
62. Franovic A, Holterman CE, Payette J, Lee S (2009) Human cancers converge at the HIF-2alpha oncogenic axis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:21306–21311. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906432106>
63. Seidel S, Garvalov BK, Wirta V, et al (2010) A hypoxic niche regulates glioblastoma stem cells through hypoxia inducible factor 2 α . *Brain* 133:983–995. <https://doi.org/10.1093/brain/awq042>
64. Jonasch E, Plimack ER, Bauer T, et al (2019) 911PD - A first-in-human phase I/II trial of the oral HIF-2a inhibitor PT2977 in patients with advanced RCC. *Annals of Oncology* 30:v361–v362. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz249.010>
65. Choi WW, Boland JL, Kalola A, Lin J (2023) Belzutifan (MK-6482): Biology and Clinical Development in Solid Tumors. *Curr Oncol Rep*. <https://doi.org/10.1007/s11912-022-01354-5>
66. Deeks ED (2021) Belzutifan: First Approval. *Drugs* 81:1921–1927. <https://doi.org/10.1007/s40265-021-01606-x>
67. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, et al (2005) Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:15545–15550. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506580102>
68. Liberzon A, Birger C, Thorvaldsdóttir H, et al (2015) The Molecular Signatures Database (MSigDB) hallmark gene set collection. *Cell Syst* 1:417–425. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2015.12.004>
69. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9:671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
70. Foty R (2011) A simple hanging drop cell culture protocol for generation of 3D spheroids. *J Vis Exp* 2720. <https://doi.org/10.3791/2720>

Figure legends

Figure 1 : Integrin $\alpha 5$ expression is linked to hypoxia and EMT in glioblastoma patients.

Hypoxia and epithelial mesenchymal transition pathways were significantly enriched in samples with elevated ITGA5 expression. A - Analysis of the mRNA level of ITGA5 according to the TCGA database (collaboration with Pr. Elati, Lille). B - ITGA5 mRNA level analysis according to IVY database. C - Top 5 positively enriched biological pathways from GSEA (Gene set enrichment analysis) hallmark gene sets. Enrichment plots generated by the GSEA tool of two most enriched gene sets of the MSigDb “hallmark gene set” : Hypoxia and EMT pathways. Normalized enrichment score (NES) is a relative value of enrichment which indicates how positive the enrichment of gene set is, compared to other gene sets. GSEA of Hallmark Hypoxia and Epithelial to Mesenchymal transition gene sets to high expression of ITGA5 in TCGA GBM cohorts, along with normalized enrichment score (NES) and false discovery rate (FDR). Each vertical line of the barcode represents a gene. Most genes on the left positively correlate with high expression of ITGA5 samples, most genes on the right correlate negatively with ITGA5 samples. As vertical lines of the barcode are overrepresented at the left side of the graph, this means many of the genes within the Hypoxia and Epithelial to Mesenchymal Transition gene set are positively correlated/enriched within samples with high expression of ITGA5. The score relating to this enrichment (enrichment score or ES) is indicated by the green line. D - Quantification ITGA5 protein expression level in GBM. Representative cases of immunostaining of ITGA5 intratumoral heterogeneity (magnification 40X).

Figure 2 : ITGA5 expression in GBM stem cells in hypoxic conditions.

Western blot analysis of ITGA5 expression and hypoxia markers in different GBM stem cell lines. The analysis of the expression of the proteins of interest is represented : in light grey for the cells after dissociation of the neurospheres ; in dark gray for neurospheres cultivated in normoxia 20% O₂ for 6 days ; in red for neurospheres cultivated in 1% O₂ hypoxia for 6 days. Relative quantifications of ITGA5 expression and hypoxia markers expression (HIF-1 α and HIF-2 α) were performed according to the expression of tubulin. Data represent the mean \pm S.E.M of 3 independent experiments with *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,005.

Figure 3 : Impact of hypoxia in ITGA5 expression.

Hypoxia induces a progressive increase of ITGA5 expression in parallel with a gradual increase of HIF-2 α . A - Western blot analysis of ITGA5 expression and hypoxia-induced factors, HIF-1 α and HIF-2 α . The expression of these proteins of interest was observed kinetically in hypoxic conditions within the neurospheres. The relative quantifications of each protein were performed according to the expression of tubulin. The analysis of the expression of the proteins of interest is represented : in grey for the cells after dissociation of the neurospheres ; in red for neurospheres cultivated in 1% O₂ hypoxia for 24h, 48h and 72h. Data represent the mean \pm

S.E.M of 3 independent experiments with * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; ns = non-significant. B - Linear regression analysis was performed using Prism software based on the relationship between HIF-1 α or HIF-2 α expression with ITGA5 expression using Western blot data of GBM stem cell lines.

Figure 4 : Involvement of HIF-2 α in increased expression of ITGA5 in GBM stem cells in hypoxic conditions.

The results show a link between ITGA5 expression and HIF-2 α . A - Western blot analysis of the effect of irinotecan treatment on the expression of hypoxia-induced factors and ITGA5. Stem cells were treated with 2,5 μ M irinotecan for 72 h in 1% O₂ hypoxia. The relative quantifications of each protein were performed according to the expression of tubulin. B - Western blot analysis of the impact of siRNAs directed against HIF-1 α or HIF-2 α on ITGA5 expression. Stem cells were treated with 100 nM siRNAHIF-1 α or 250 nM siRNAHIF-2 α for 48 h in 1% O₂ hypoxia. Relative quantifications of ITGA5 expression were performed according to the expression of tubulin. C - Analysis of the effect of treatment with specific HIF-2 α antagonists on ITGA5 expression in GBM stem cells. Cells were treated with 20 μ M PT2977 or 20 μ M Compound 2 for 24h (RT-qPCR analysis) or 72h (WB analysis) in 1% O₂ hypoxia. Relative quantifications of the different expressions were performed based on the expression of RNA18S (RT-qPCR) or tubulin (WB). The analysis of the expression of the proteins of interest is represented : in grey for the cells after dissociation of the neurospheres ; in red for neurospheres cultivated in 1% O₂ hypoxia. Data represent the mean \pm S.E.M of 3 independent experiments with * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; ns = non-significant.

Figure 5 : Phenotypic study, integrin $\alpha 5$ involved in tumor migration and aggressiveness.

We have 6 different stem cell lines in the laboratory. A - Stem cell proliferation monitoring using incucyte technology. The graph represents the fold increase in the size of the spheres at 144h (D6) in normoxia 20% O₂ vs in hypoxia 1% O₂. Cells cultured in normoxia are represented in gray. The red represents the $\alpha 5^+$ integrin lines cultured in hypoxia and blue the $\alpha 5^-$ integrin lines cultured in hypoxia. Results were reported at t₀. B - Evaluation of the inhibition of ITGA5 and HIF-2 α expression on cell proliferation by Incucyte technology. The graph represents the size of the spheres at 144h (D6) relative to t₀. A concentration range with FR248 (ITGA5 antagonist) was first performed. This was then combined with 20 μ M of Compound 2 (HIF-2 α antagonist). C - Study of the impact of ITGA5 expression on cell migration. A sphere was formed for 48 hours then deposited either on poly-L-lysine or on fibrinectin. After 24 hours of migration in normoxia or hypoxia, marking with DAPI was carried out. D - Evaluation of the inhibition of HIF-2 α on stem cell migration. The same experiment as above was performed but with deposition of the spheres on fibronectin only. The spheres were treated with 20 μ M of PT2977 or Compound 2 following deposition.

Supplemental figure 1 : Heterogeneity and membrane localisation of ITGA5 expression in GBM stem cells.

Intertumoral heterogeneity of ITGA5 expression on the cell surface. A - FACS analysis of ITGA5 expression in different GBM stem cell lines. In blue the ITGA5-negative stem cells and in red the ITGA5-positive stem cells. B - Fractionation of stem cells and western blot analysis of fractions. Evaluation of ITGA5 expression and markers of each cell compartment.

Supplemental figure 2 : Increased ITGA5 expression in chemically induced hypoxia.

The NCH421k ($\alpha 5^-$) and TC22 ($\alpha 5^+$) lines were subjected to 1% O₂ hypoxia for 24h, 48h and 72h. These two lines were then treated with 50 μ M or 200 μ M CoCl₂ (cobalt chloride) and DFO (desferrioxamine) for 24h, 48h and 72h to mimic hypoxia chemically. Relative quantifications of ITGA5, HIF-1 α and HIF-2 α expression were performed in relation to tubulin expression. The analysis of the expression of proteins of interest is presented: in gray for cells after dissociation of neurospheres; in red for neurospheres cultured in 1% O₂ hypoxia; in orange for neurospheres treated with 50 μ M CoCl₂ or DFO and in light red for neurospheres treated with 200 μ M CoCl₂ or DFO.

Supplemental figure 3 : ITGA5 persists in normoxic conditions.

Hypoxia induces a progressive increase of ITGA5 expression in parallel with a gradual increase of HIF-2 α . Western blot analysis of ITGA5 expression and hypoxia-induced factors after neurospheres were placed back into normoxic conditions. Neurospheres were cultured under kinetic hypoxia conditions (24h, 48h, and 72h), and then after 72 hours of hypoxia, neurospheres were placed under normoxic conditions. Relative quantifications of ITGA5 expression were performed in relation to tubulin expression. The analysis of the expression of proteins of interest is presented: in gray for cells after dissociation of neurospheres; in red for neurospheres cultured in hypoxia at 1% O₂ then in normoxia at 21% O₂. Data represent the mean \pm S.E.M of 3 independent experiments with *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,005; ns = non-significant.

Supplemental figure 4 : Decrease in the expression level of HIF-2 α after treatment with compound 2.

The results show a better efficiency of Compound 2 for the inhibition of HIF-2 α . RT-qPCR analysis of HIF-2 α specific inhibition on VEGF. The cells were treated with 20 μ M PT2977 or 20 μ M Compound 2 for 24h in hypoxia at 1% O₂. The relative quantifications of the expression VEGF were carried out according to the expression of ARN18S. The analysis of the expression of mRNA of interest is represented: in grey for cells after dissociation of neurospheres; in red for neurospheres cultivated in hypoxia at 1% O₂. The data represent the SEM average of 3 independent experiments with *p < 0.05; ns = non-significative.

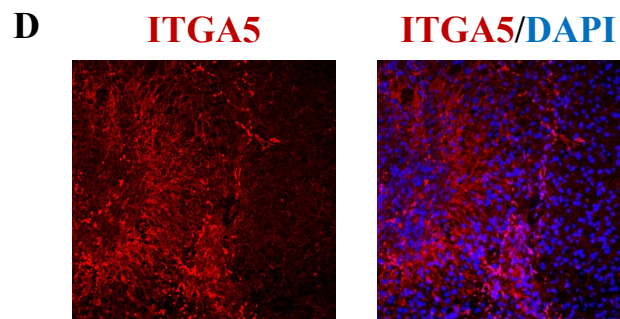
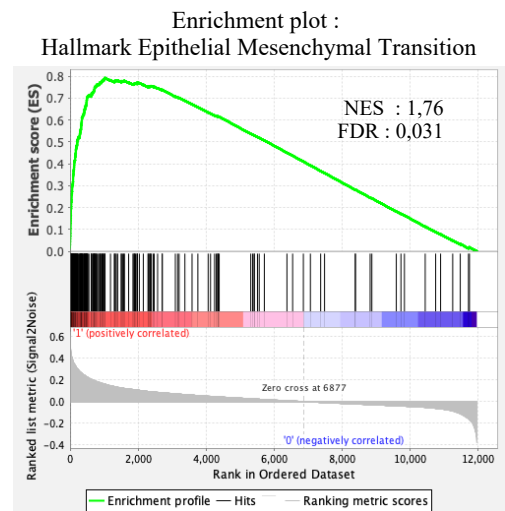
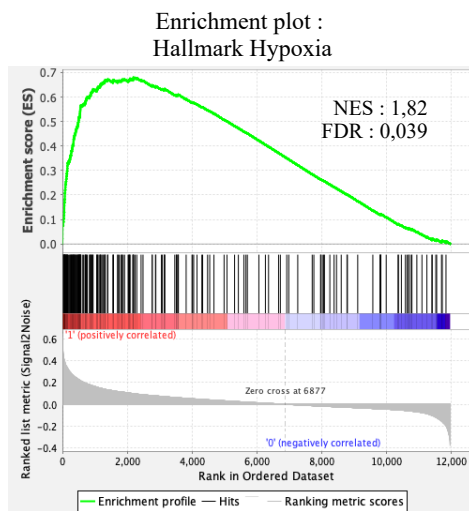
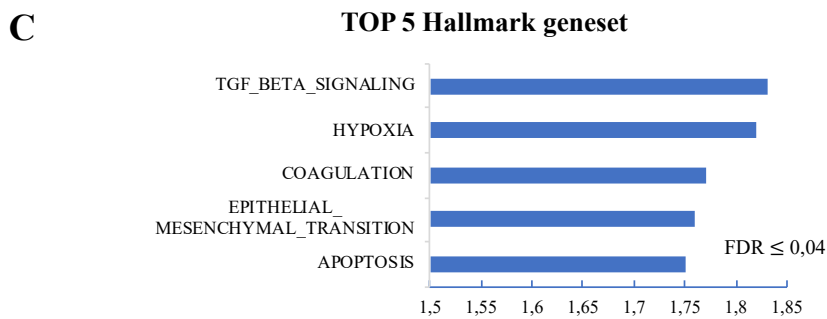
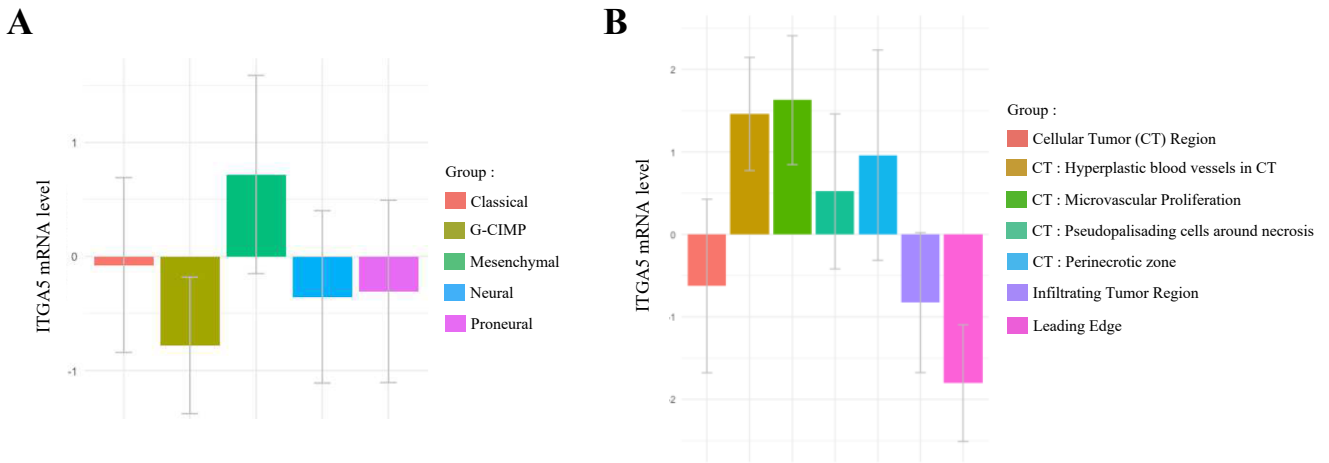
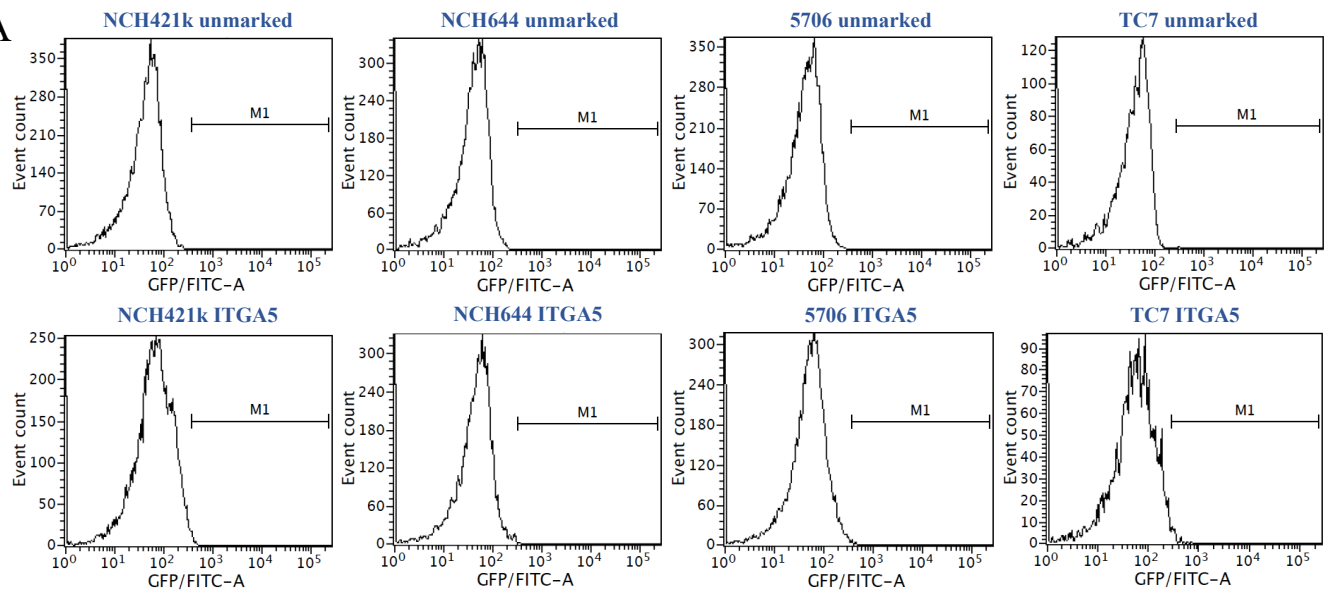


Figure 1 : ITGA5 expression is linked to hypoxia and EMT in glioblastoma patients.

A

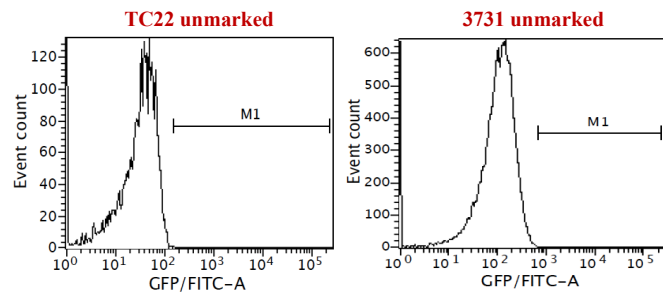


	Label	Event	Pourcent gate
Unmarked	All	12334	100
	M1	1	0,01
ITGA5	All	10490	100
	M1	56	0,52

	Label	Event	Pourcent gate
Unmarked	All	11283	100
	M1	1	0,01
ITGA5	All	10342	100
	M1	12	0,12

	Label	Event	Pourcent gate
Unmarked	All	13065	100
	M1	0	0
ITGA5	All	11191	100
	M1	26	0,23

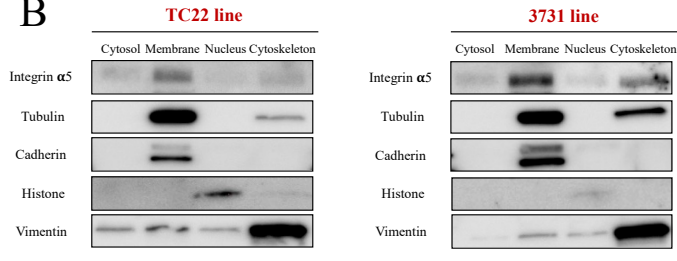
	Label	Event	Pourcent gate
Unmarked	All	3916	100
	M1	1	0,03
ITGA5	All	3801	100
	M1	36	0,95



	Label	Event	Pourcent gate
Unmarked	All	4596	100
	M1	1	0,02
ITGA5	All	5665	100
	M1	494	8,72

	Label	Event	Pourcent gate
Unmarked	All	21029	100
	M1	1	0
ITGA5	All	28368	100
	M1	3339	11,77

B



Supplemental figure 1 : Heterogeneity and membrane localisation of ITGA5 expression in GBM stem cells.

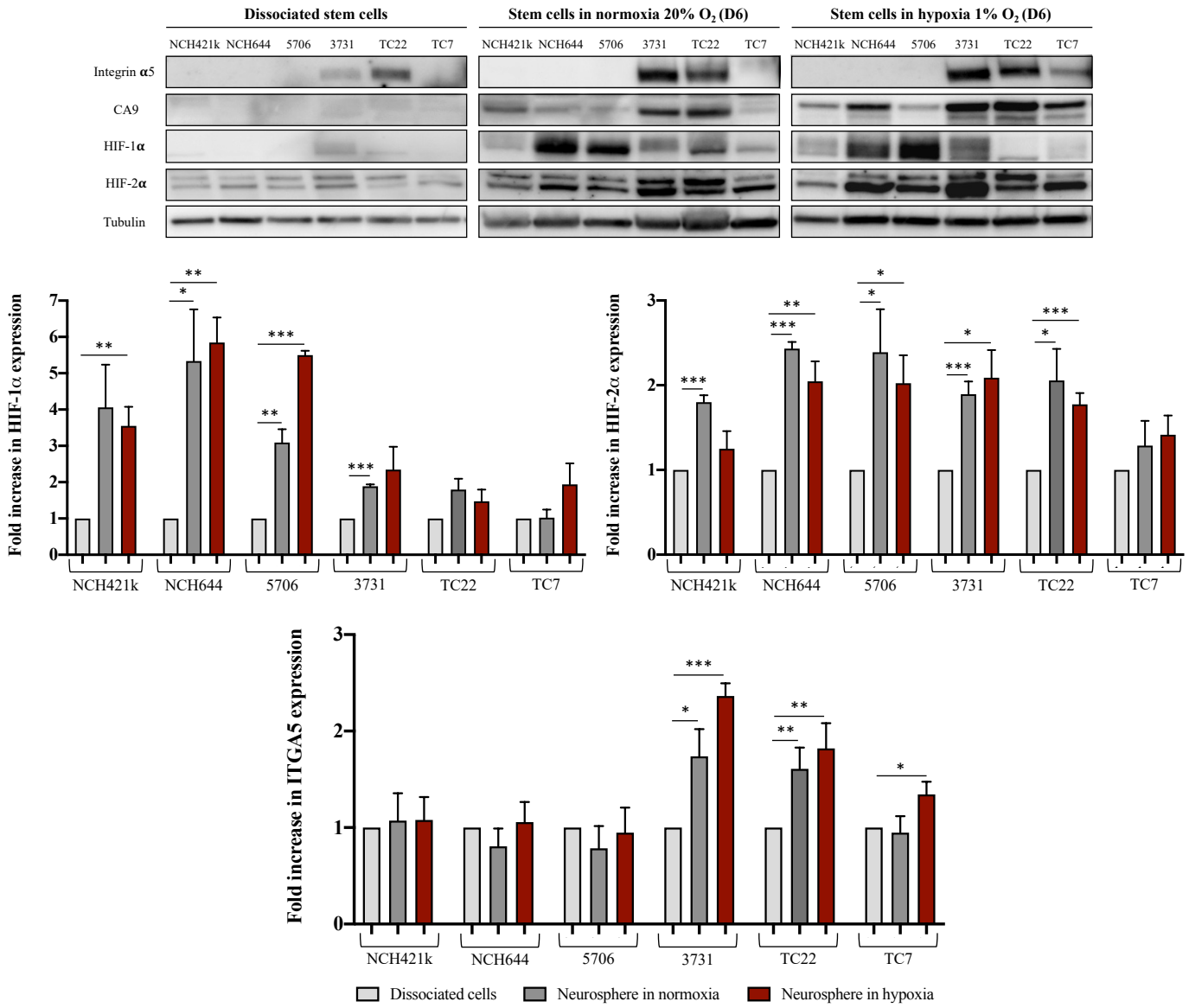
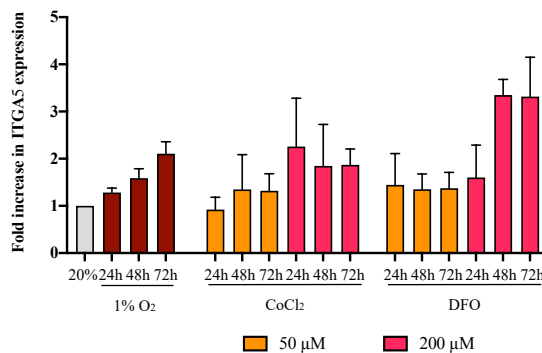
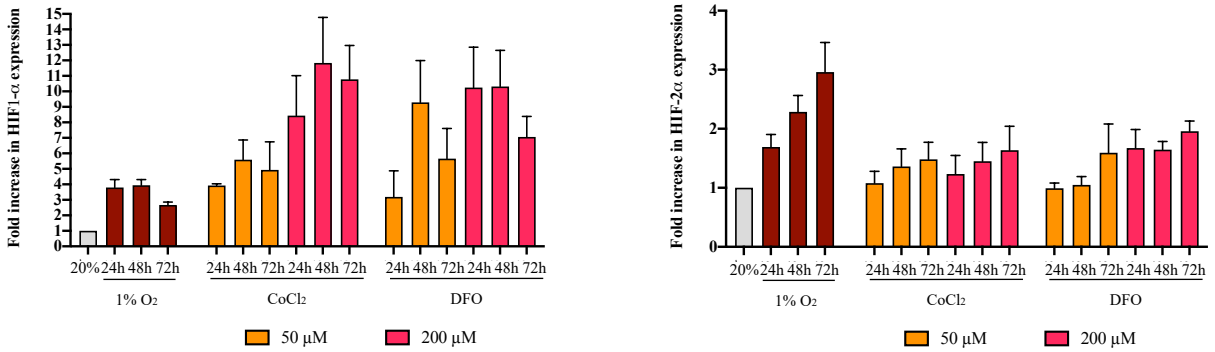
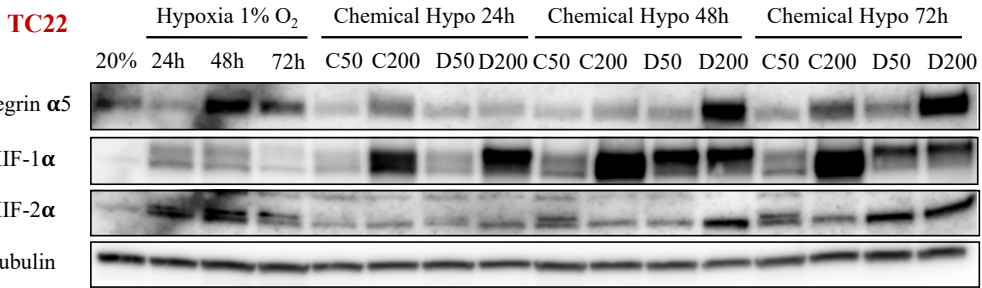
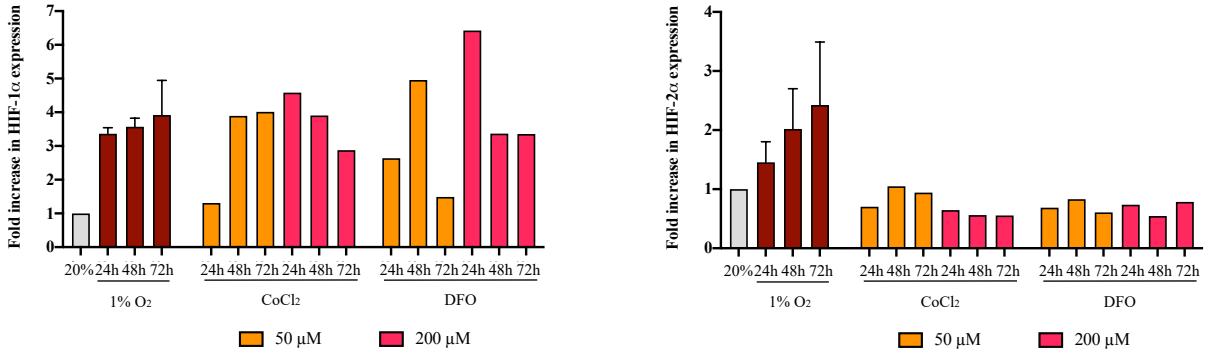
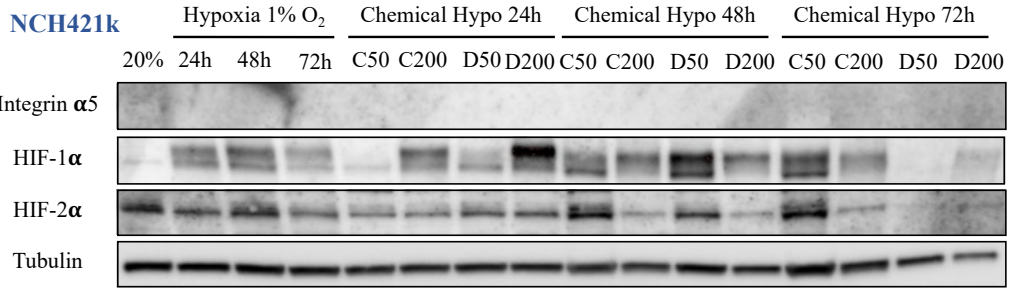


Figure 2 : ITGA5 expression in GBM stem cells in hypoxic conditions.



Supplemental figure 2 : Increased ITGA5 expression in chemically induced hypoxia.

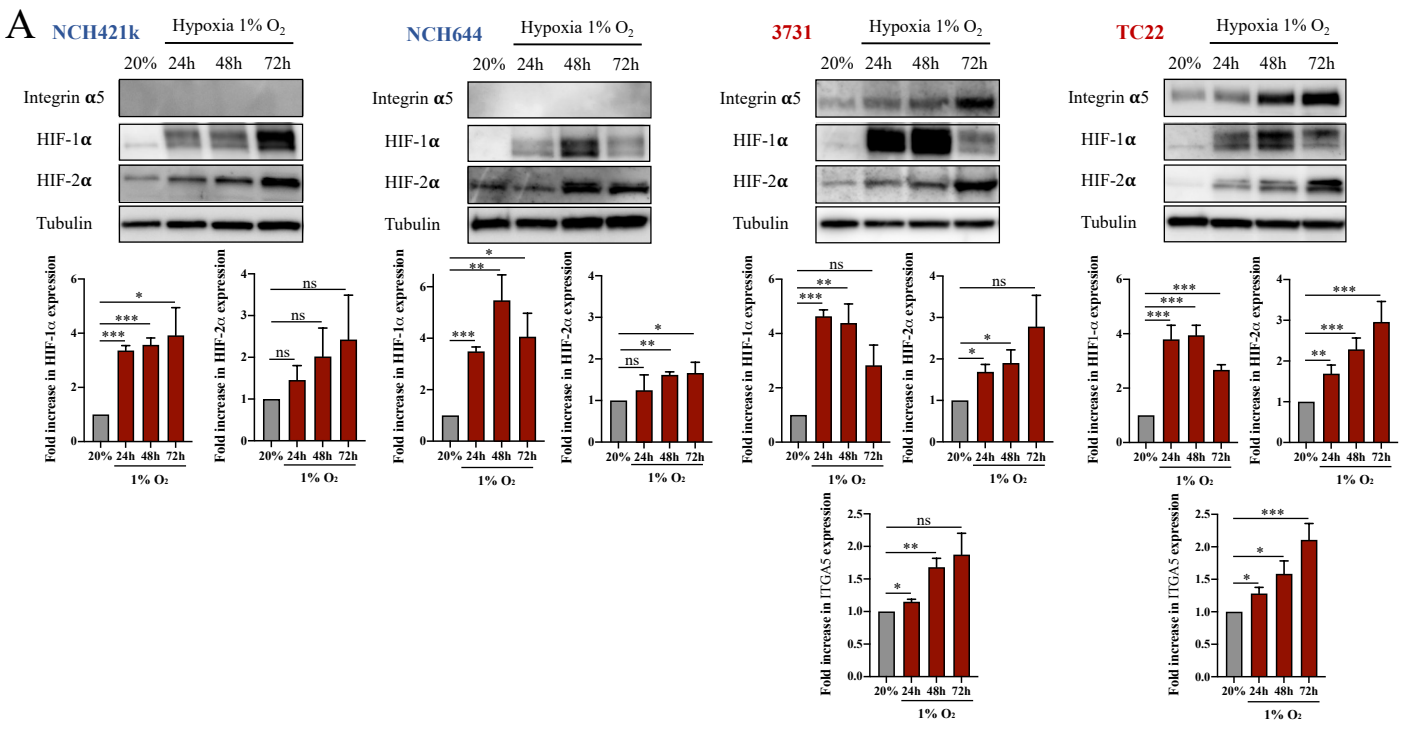
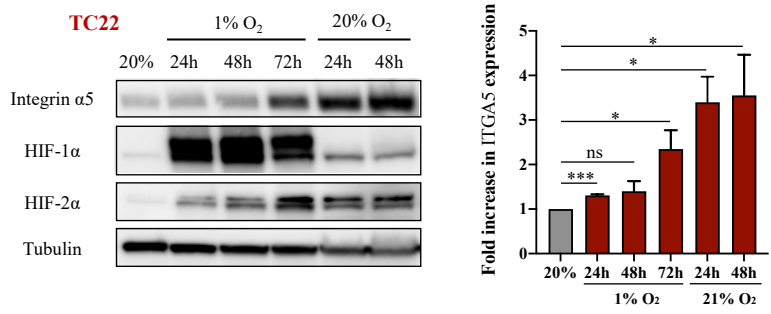
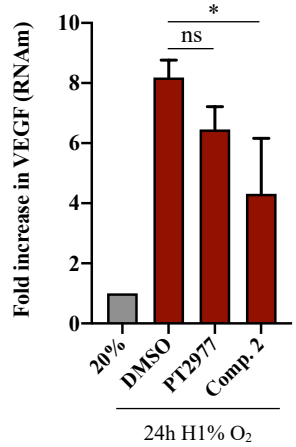


Figure 3 : Impact of hypoxia in ITGA5 expression.



Supplemental figure 3 : ITGA5 persists in normoxic conditions.



Supplemental figure 4 : Decrease in the expression level of HIF-2α after treatment with compound 2.

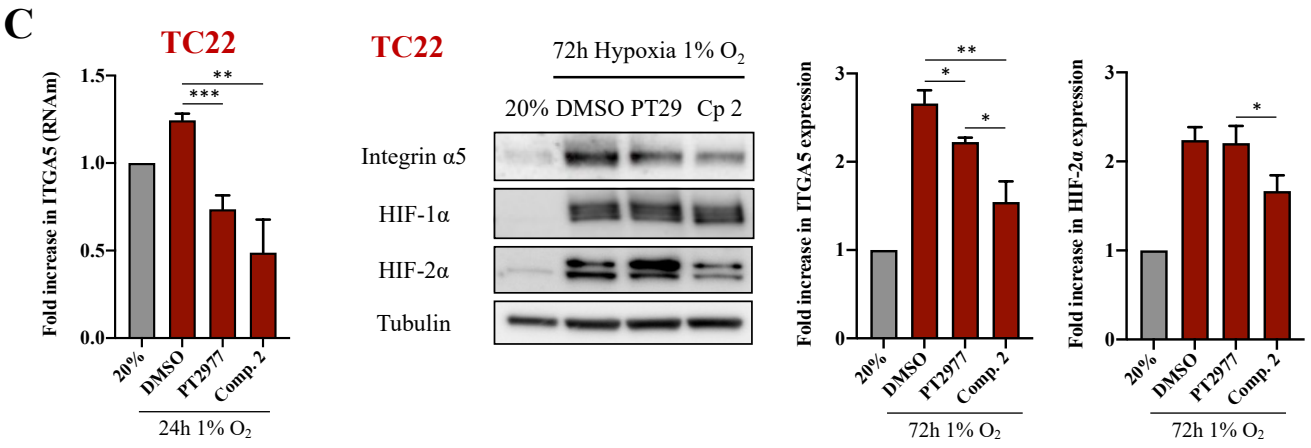
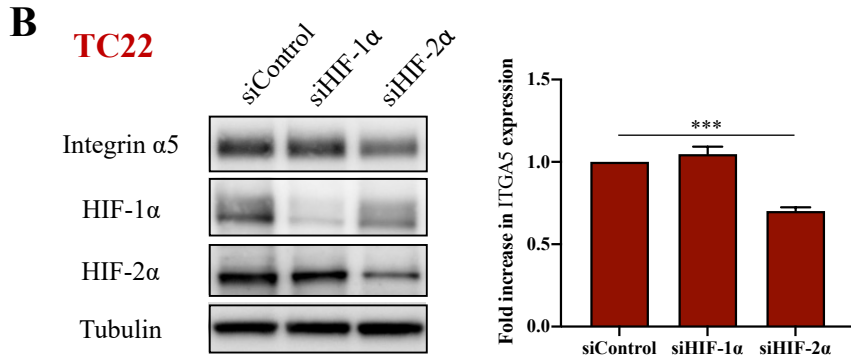
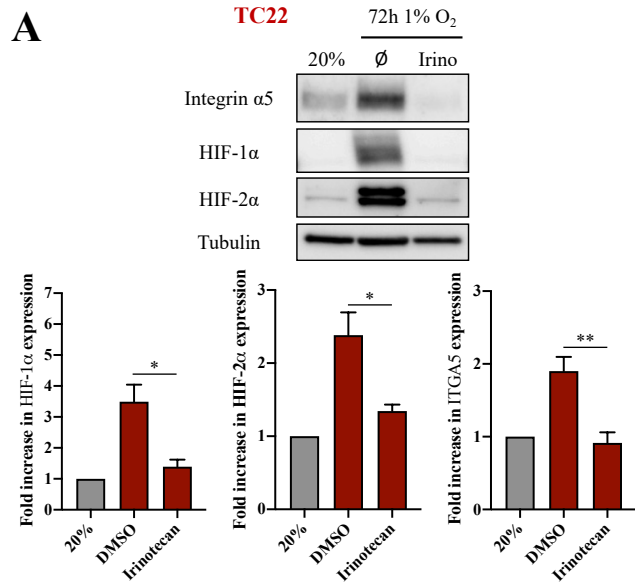


Figure 4 : Involvement of HIF-2α in increased expression of ITGA5 in GBM stem cells in hypoxic conditions.

Antibodies list			
Label	Reference	Species	Dilution
ITGA5	Cell signaling (D7B7G)	Rabbit	1/1000 (WB)
ITGA5	BDBioscience IIaI (555614)	Mousse	1/100 (FACS)
ITGA5	Millipore (AB1928)	Rabbit	1/300 (IF)
HIF-1α	Abcam (ab51608)	Rabbit	1/1000 (WB)
HIF-2α	Novus (Nb100-122)	Rabbit	1/1000 (WB)
CA9	Abcam (ab15086)	Rabbit	1/1000 (WB)
α-Tubulin	Sigma-Aldrich (T9026)	Mousse	1/1000 (WB)
Cadhérine	Proteintech (20874-1-20ul)	Rabbit	1/5000 (WB)
Vimentine	Proteintech (60330)	Mousse	1/5000 (WB)
Histone	Cell signaling (2595)	Rabbit	1/1000 (WB)
Anti-rabbit IgG-HRP	Promega (W4018)	Goat	1/10000 (WB)
Anti-mousse IgG-HRP	Promega (W4028)	Goat	1/10000 (WB)
Alexa fluorTM 647 rabbit IgG	Invitrogen (A32733)	Goat	1/200 (IF)

Table 1 : List of antibodies used during the different experiments.

Drugs list		
Label	Reference	Concentration
Irinotecan	MedChemExpress (HY-16562)	2,5 μ M
PT2977	MedChemExpress (HY-125840)	20 μ M
Compound 2	Collaboration Dr. Tambar UK., Dallas	20 μ M
FR248	Collaboration Dr. Kessler H., Munich	5 μ M ; 10 μ M ; 20 μ M

Table 2 : List of drugs used during the different experiments.

Primers list			
Label	Reference	Primer sequence Forward	Primer sequence Reverse
ITGA5	Invitrogen	5'-TGCTGACTCCATTGGTTTCAC	5'-TCTCTCTGCAATCCTCTCGAGC-
		AG-3'	3'
RNA18S	Invitrogen	5'-TGTGGTGTGAGGAAAGCAG-	5'-TCCAGACCATTGGCTAGGAC-
		3'	3'

Primers list		
Label	Reference	Transcrit
VEGF	Giagen (PPH00251C-200)	NM_001025366 (3677pb)

Table 3 : List of primers used during the different experiments.

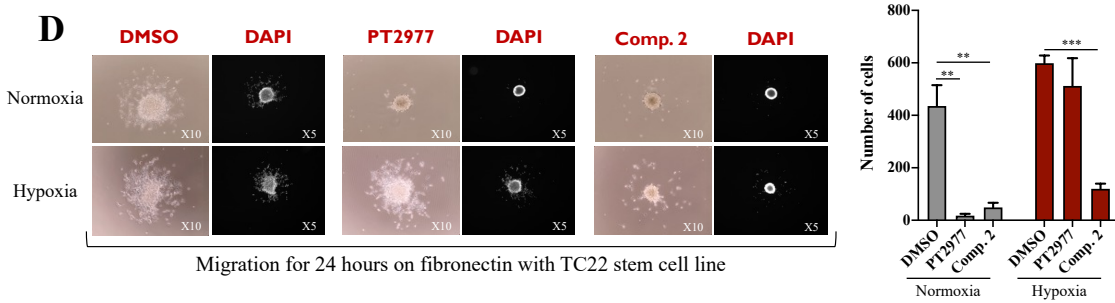
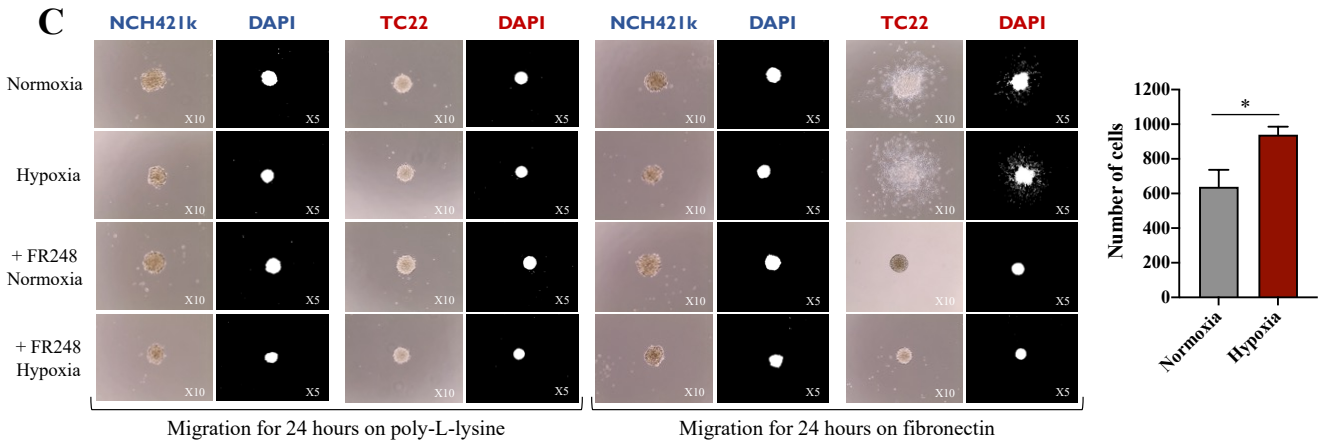
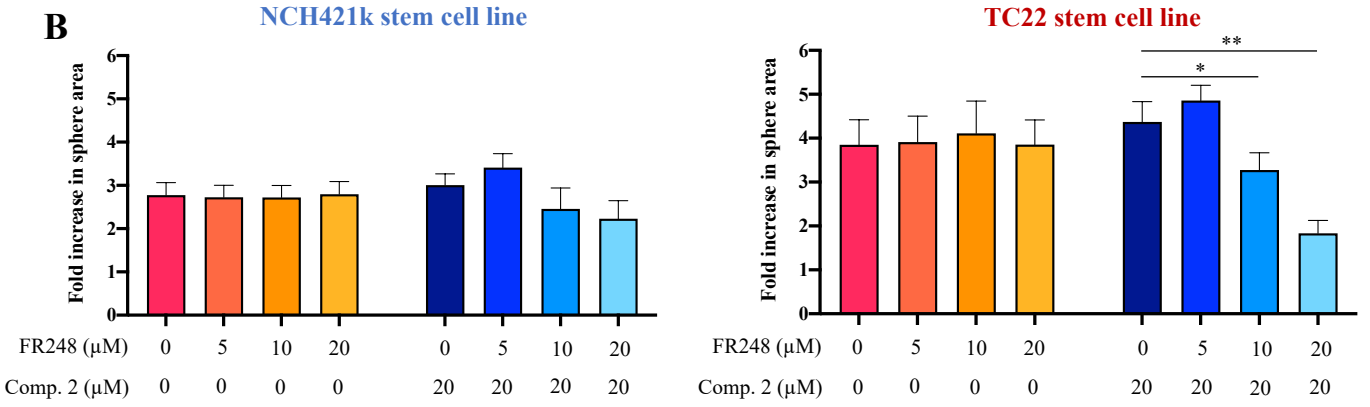
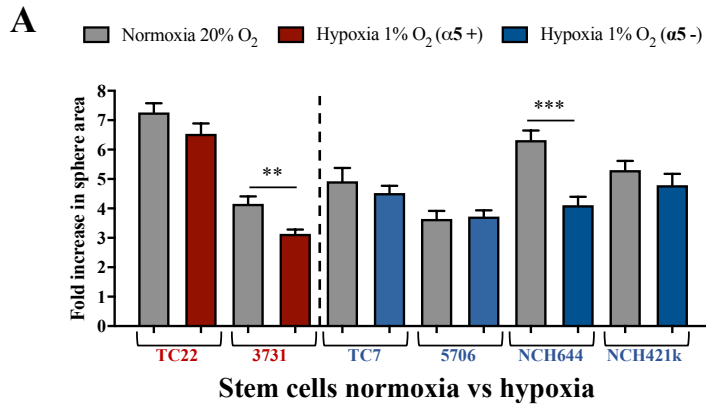


Figure 5 : Phenotypic study, ITGA5 involved in tumor migration and aggressiveness.

II. Résultats supplémentaires (suite publication 1)

1. Introduction

Nous avons montré dans l'article précédent que les expressions de HIF-2 α et de l'intégrine α 5 étaient en relation dans des conditions hypoxiques. Cependant l'inhibition de l'expression de l'intégrine α 5 par l'inhibition spécifique de HIF-2 α n'est pas totale et ne concerne que la portion surexprimée par l'hypoxie. De plus, HIF-2 α est également exprimé (mais plus faiblement) dans les lignées de cellules souches de GBM sans permettre une expression de l'intégrine α 5. Les expériences décrites ont été faites sur des lignées de cellules souches *in vitro* et demandent confirmation *in vivo*. Dans cette partie, les résultats préliminaires (en cours de finalisation) sont décrits pour d'une part appréhender de façon plus générale l'hétérogénéité moléculaire des cellules souches de GBM et en particulier pour l'expression de l'intégrine α 5 et d'autre part pour évaluer la capacité des différentes lignées à former des tumeurs *in vivo* par l'imagerie TEP dans la souris Nude.

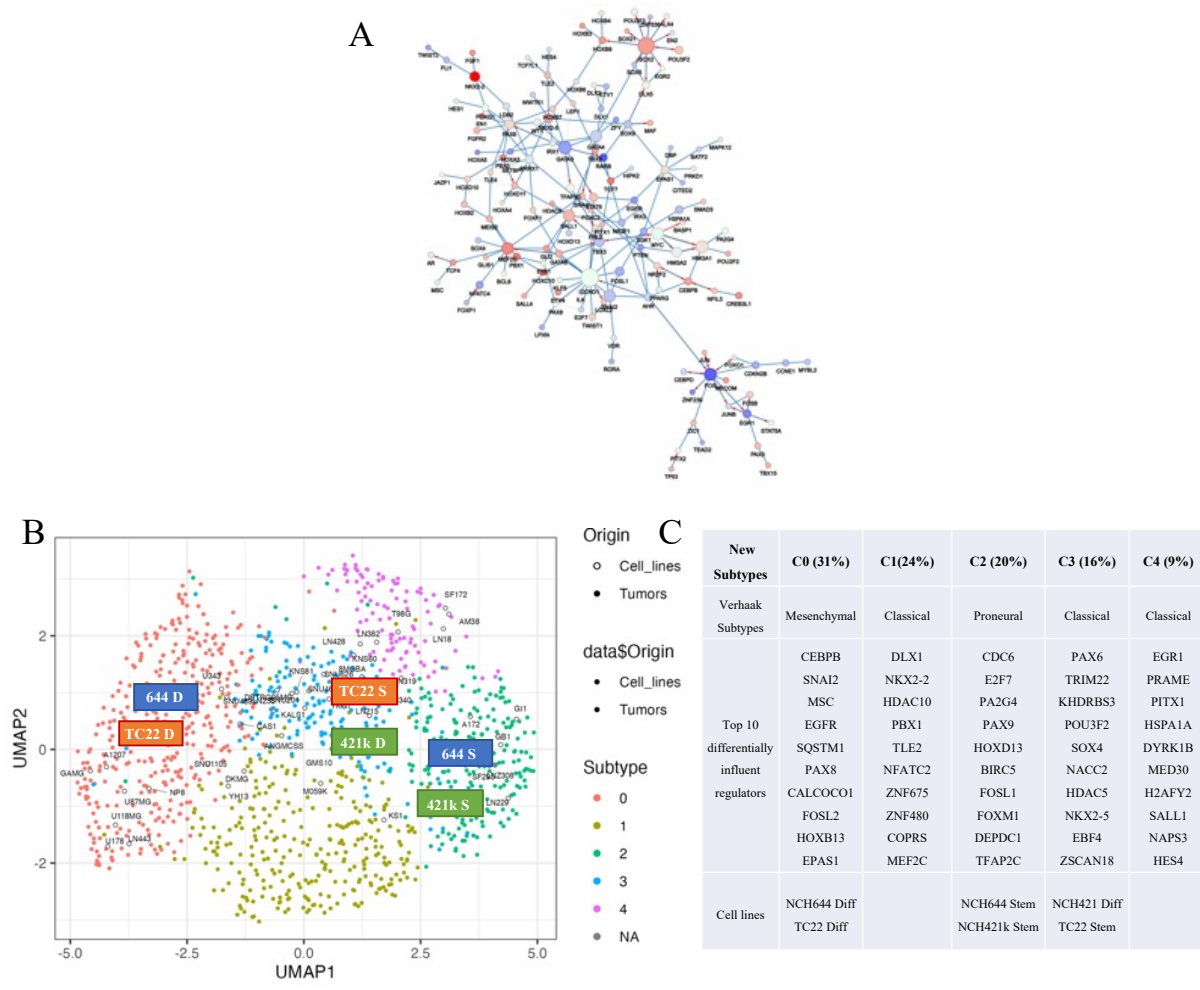


Figure 23 : Un réseau de régulateurs spécifique des GBM

A - Exemple d'un réseau de régulateur de la lignée TC22. Ce réseau représente l'activité des facteurs de transcription et des gènes associés. L'importance des régulateurs sont en fonction de la taille des ronds. Les ronds en rouge représentent les régulateurs activés et en bleu les régulateurs pas activés. B - Cartographie des 5 nouvelles sous-classes de GBM basée sur l'influence des facteurs de transcriptions de chaque échantillon, déterminées à partir de l'expression de leurs gènes cibles. Trois de nos lignées souches et leurs congénères différenciés ont été placés sur cette carte. En vert la lignée NCH421k souche (421k S) et différenciée (421k D) ; En bleu le lignée NCH644 souche (644 S) et différenciée (644 D) ; En orange la lignée TC22 souche (TC22 S) et différenciée (TC22 D). C - Tableau récapitulatif des 5 sous-classes avec les caractéristiques moléculaires de chaque sous-classe.

2. Un réseau de régulateurs spécifique des GBM

Le projet s'est appuyé sur une étude collaborative avec l'équipe du Pr. Elati (Canther, Lille) pour identifier un réseau de régulateurs spécifiques du GBM en utilisant une approche de biologie des systèmes. L'exploitation de la banque de données CCLE 2019Q1 sur des lignées cellulaires de GBM permet de proposer un réseau de régulateurs/corégulateurs qui définit spécifiquement un GBM. Dans ce réseau de régulateurs, l'importance des facteurs de transcription est représentée par la taille des cercles et l'activation par la couleur (en rouge le régulateur est activé ; en bleu le régulateur n'est pas activé) (Figure 23A). Les données transcriptomiques de plus de 1500 tumeurs de patients atteints d'un GBM issu de la banque de données GlioVis, ont été appliquées à ce réseau et mettent en évidence 5 sous-classes montrant une activité différentielle des facteurs de transcription du réseau. Les sous-classes définies par Verhaak (proneural, classique et mésenchymal) y sont retrouvées mais 2 classes supplémentaires ont été mises en évidence, découpant les tumeurs classiques en 3 sous-groupes différenciés par le réseau et permettant une précision de la classe classique de Verhaak. Une cartographie de ces 5 sous-classes a été réalisée (Figure 23B et C). L'application de ce réseau à des données transcriptomiques, obtenues dans différentes conditions de culture de cellules, permet par exemple de comparer l'impact de la différenciation ou de l'hypoxie sur l'activité des régulateurs ou de comparer des données issues de patients au diagnostic par rapport à la récurrence. Grâce à ce réseau, il est possible de mesurer l'impact d'une activation/inhibition d'un régulateur donné sur ses gènes cibles. Les données RNAseq de trois de nos lignées souches vs leurs congénères différenciés ont été appliquées au réseau. Cela a permis de classer ces 3 lignées cellulaires en fonction des 5 sous-classes de GBM (Figure 23B). A l'état souche, NCH644 et NCH421k se retrouvent dans la classe C2 (regroupant les tumeurs proneurales) et TC22 dans la classe C3 (une des sous-classes des tumeurs classiques). Après différenciation ces 3 lignées montrent une évolution et changent de classes. Par exemple, la lignée NCH421k à l'état souche appartient à la sous-classe C2 et à l'état différencié cette lignée se retrouve dans la sous-classe C3 qui correspond à la classe classique de Verhaak (Figure 23B et C). Les 2 lignées NCH644 et TC22 différenciées se retrouvent dans le groupe C0 apparenté à la classe mésenchymale de Verhaak. Ainsi en comparant deux états cellulaires, ce réseau de régulateurs montre la plasticité des cellules de GBM à évoluer d'une classe à une autre. Ce réseau représente un outil intéressant pour l'identification de cible thérapeutique dans le GBM en comparant deux conditions et en étudiant les différences d'activation des régulateurs impliqués dans chaque condition. Les données RNAseq de toutes les lignées étudiées, en cellules souches, différenciées ou en hypoxie sont disponibles et sont en cours d'exploration par le réseau de régulateurs.

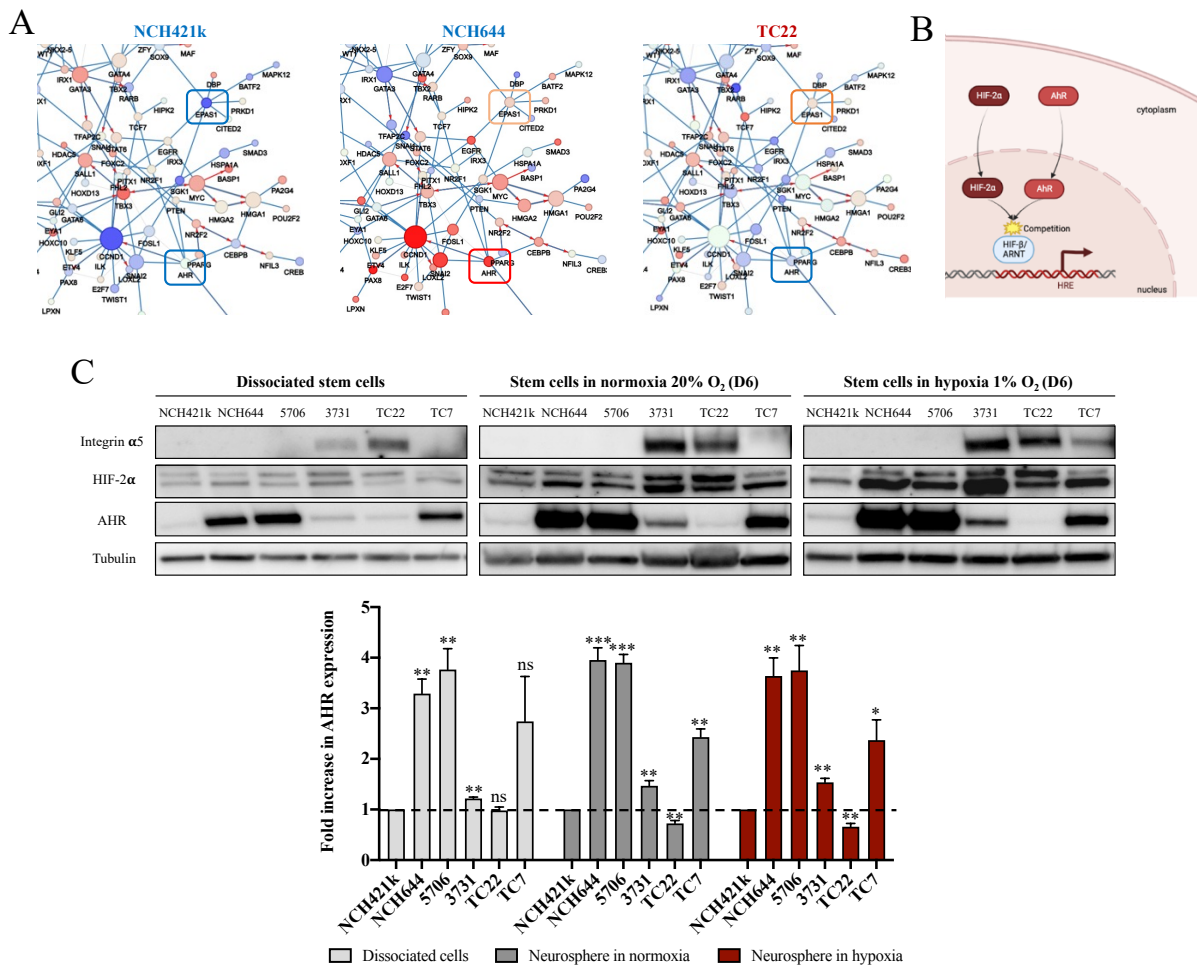


Figure 24 : Compétition entre HIF-2 α et AhR pour la dimérisation à l'ARNT.

A - Identification d'un nouveau régulateur de l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ à l'aide de données bioinformatiques. Un réseau de régulateurs spécifiques du GBM a été identifié en utilisant une approche de biologie des systèmes. Ce réseau représente l'activité des facteurs de transcription et des gènes associés. La taille des cercles indique l'importance du facteur de transcription et la couleur indique son activité : en rouge le régulateur est actif ; en bleu le régulateur est inactif. B - Représentation schématique de la compétition entre HIF-2 α et AhR dans le noyau pour la dimérisation à ARNT. Figure créée avec <https://biorender.com/>. C - Analyse protéique de l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ en relation avec HIF-2 α et l'expression d'AhR au sein de nos différentes lignées de cellules souches en condition hypoxique et normoxique. Des quantifications relatives de l'expression d'AhR ont été réalisées en fonction de l'expression de la tubuline. L'analyse de l'expression d'AhR est représentée : en gris clair pour les cellules après dissociation des neurosphères ; en gris foncé pour les neurosphères cultivées en normoxie 20% O₂ pendant 6 jours ; en rouge pour les neurosphères cultivées en hypoxie 1% O₂ pendant 6 jours. Les données représentent la moyenne \pm S.E.M de 3 expériences indépendantes avec * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; ns = non significatif.

3. Régulation de l'intégrine $\alpha 5$

L'étude des 5 sous-classes montre que l'on retrouve une expression élevée de l'ARNm de l'intégrine $\alpha 5$ uniquement dans la classe C0 apparentée à la sous-classe mésenchymale de Verhaak (Figure 23C). Il est intéressant de noter que HIF-2 α (ou EPAS1) (et non HIF-1 α) est retrouvé dans le réseau de régulateurs confirmant son rôle dans le GBM (Figure 23C). En mettant en relation les activités des régulateurs avec l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ pour chaque lignée cellulaire, nous pourrions identifier les régulateurs potentiellement impliqués dans la modulation de l'expression de l'intégrine $\alpha 5$. L'étude du réseau de la lignée NCH421k révèle une inactivation de HIF-2 α en relation avec sa faible expression dans cette lignée (Figure 2 de la publication 1). Cela pourrait expliquer l'absence d'expression de l'intégrine $\alpha 5$ dans cette lignée. Dans la lignée NCH644, nous observons une activation de HIF-2 α , alors que cette lignée n'exprime pas l'intégrine $\alpha 5$ en condition basale ou hypoxique (Figure 2 de la publication 1). On peut faire l'hypothèse d'une contre régulation de HIF-2 α par un autre facteur de transcription. Par contre, dans le réseau correspondant à la lignée TC22, HIF-2 α est activé et l'intégrine $\alpha 5$ est exprimée (Figure 24A).

En comparant le réseau de ces 3 lignées, on peut remarquer une activation dans la lignée NCH644 et une inactivation dans la lignée TC22 de AhR (Aryl hydrocarbon receptor). Cette différence de régulation apparaît intéressante car ce facteur de transcription a le même mode d'activation que HIF-2 α . C'est un récepteur nucléaire qui se transloque dans le noyau lors de son activation pour se dimériser avec la sous-unité ARNT (Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) et exercer son action de facteur de transcription (347) comme HIF-2 α . Nous avons émis l'hypothèse d'une compétition entre AhR et HIF-2 α pour la dimérisation avec ARNT (Figure 24B). Si cette hypothèse est vraie, une expression/activation élevée de AhR empêcherait la fonction de HIF-2 α . Nous avons donc mesuré l'expression de AhR dans les lignées. La quantification du niveau de l'expression d'AhR a été faite par rapport à la lignée NCH421k qui n'exprime ni AhR ni l'intégrine $\alpha 5$. Les résultats indiquent une forte expression d'AhR dans les lignées n'exprimant pas l'intégrine $\alpha 5$ (NCH644, 5706 et TC7) et plus faible ou nul dans les lignées capables d'exprimer l'intégrine $\alpha 5$ (TC22 et 3731) (Figure 24C).

Les résultats semblent être en accord avec les informations obtenues par le réseau. Cette hypothèse d'une relation inverse entre l'expression de AhR et HIF-2 α et l'expression de l'intégrine α 5 doit cependant être vérifiée. Nous inhiberons l'expression d'AhR par des siRNA dans les lignées qui n'expriment pas l'intégrine α 5 en espérant ainsi induire son expression par activation du complexe HIF-2 α /ARNT.

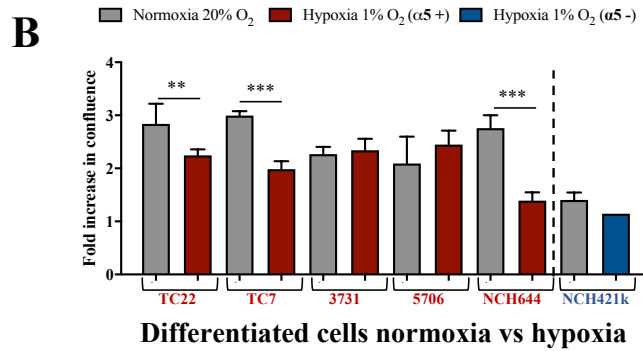
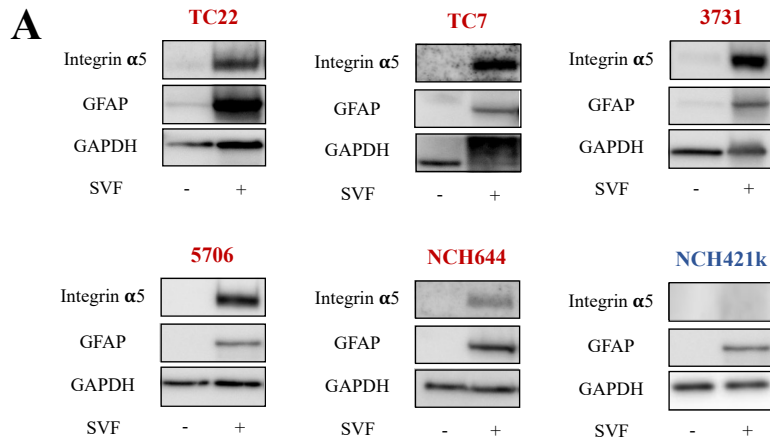


Figure 25 : Impact de la différenciation des cellules souches.

A – Expression de l'intégrine $\alpha 5$ après différenciation des CSG. La GFAP est un marqueur de différenciation astrocytaire. B - Étude de la prolifération cellulaire par la technologie Incucyte[®]. Le graphique représente la confluence des puits à 144h (J6) en normoxie 20% O₂ vs en hypoxie 1% O₂. Les cellules cultivées en normoxie sont représentées en gris (intégrine $\alpha 5+$ sauf lignée NCH421k $\alpha 5-$). Le rouge représente les lignées intégrine $\alpha 5+$ cultivées en hypoxie et le bleu représente les lignées intégrine $\alpha 5-$ cultivées en hypoxie. Les données représentent la moyenne \pm S.E.M de 3 expériences indépendantes avec * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$.

4. Étude après différenciation

Après avoir étudié l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ au sein de différentes lignées de CSG, nous avons évalué l'expression de cette intégrine après différenciation des cellules souches. La GFAP a été utilisé comme marqueur de différenciation. Nous avons constaté que les lignées déjà positives à l'état de cellules souches pour l'intégrine $\alpha 5$ (TC22 et 3731) restaient positives après différenciation. La lignée NCH421k qui était négative pour l'intégrine $\alpha 5$ ne l'exprime toujours pas après différenciation. Cependant les lignées NCH644, 5706 et TC7 qui n'exprimaient pas l'intégrine $\alpha 5$ à l'état de cellules souches, l'exprime après différenciation des cellules (Figure 25A). Ces résultats sont à mettre en relation avec les données du réseau concernant la lignée NCH644. Après différenciation, la lignée NCH644 se retrouve comme la lignée TC22 dans la classe C0 regroupant les tumeurs mésenchymales. Ces résultats montrent une plasticité des cellules souches à exprimer l'intégrine $\alpha 5$ après différenciation favorisant l'hétérogénéité inter- et intratumorale.

Nous avons par la suite évalué la prolifération cellulaire des cellules après différenciation en hypoxie 1% O₂ vs normoxie 20% O₂. Nous avons d'abord observé que la lignée négative pour l'intégrine $\alpha 5$ (NCH421k) ne proliférait pas. Ces résultats suggèrent que la prolifération des cellules différenciée est influencée par l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ contrairement aux cellules souches. Les résultats montrent également une prolifération cellulaire ralentie en hypoxie pour les lignées TC22, TC7 et NCH644 (Figure 25B). Ces premiers résultats indiquent que les cellules différenciées ont une capacité d'adaptation inférieure en condition hypoxique par rapport aux cellules souches qui gardent une bonne prolifération cellulaire en hypoxie. Il serait intéressant d'étudier l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ dans les cellules différenciées en condition hypoxique pour évaluer si son expression diminue et voir si cela pourrait être la cause d'une prolifération ralentie.

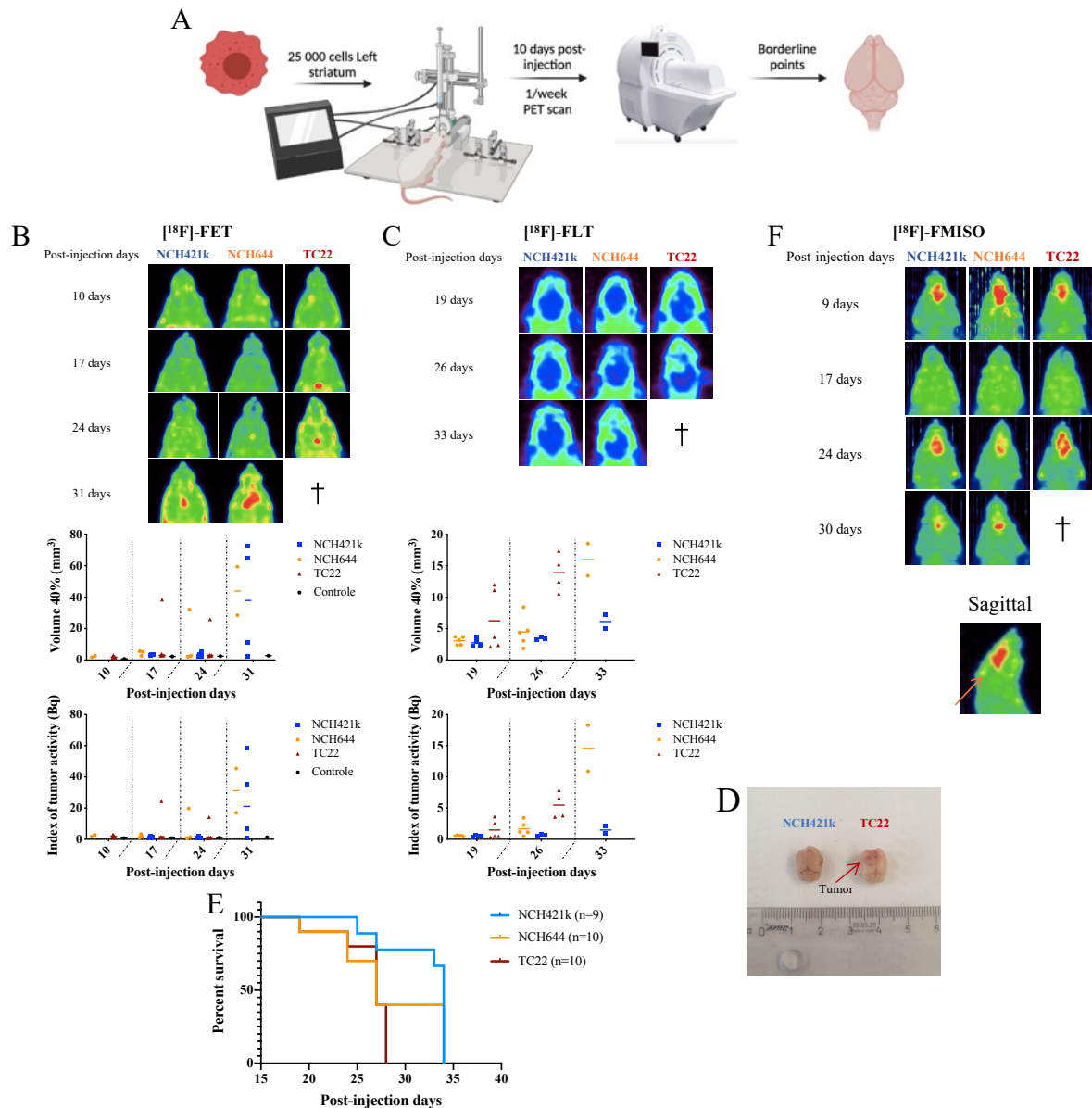


Figure 26 : Évaluation de la croissance tumorale par imagerie TEP.

A - Protocole suivie pour les injections orthotopiques des cellules souches. 200 000 cellules ont été injectées en intracérébrale puis 10 à 15 jours après les injections la première séance d'imagerie a été réalisée. 1 séance par semaine pendant 3 à 4 semaines est réalisée. Lorsque les souris ont atteint leurs points limites (perte de poids et/ou symptômes neurologiques) ces dernières ont été sacrifiées. B - Suivre de la progression tumorale avec la $[^{18}\text{F}]$ -FET. Images 3D-MIP (maximum intensity projection) en coupe frontale des souris obtenues lors des séances TEP et représentation graphique de la quantification du volume tumoral (à 40% de la SUV) et de l'index de l'activité tumorale en fonction des jours post-injection. C - Suivre de la prolifération cellulaire avec la $[^{18}\text{F}]$ -FLT. Images 2D en coupe frontale des souris et représentation graphique de la quantification du volume tumoral (à 40% de la SUV) et de l'index de l'activité tumorale en fonction des jours post-injection. D - Photo de cerveaux récupérés après sacrifice des souris fixé en PFA. Cerveau transplanté avec la lignée NCH421k à gauche et avec la lignée TC22 à droite. E - Représentation graphique de la courbe de survie des souris imagées avec la $[^{18}\text{F}]$ -FET et la $[^{18}\text{F}]$ -FLT. F – Évaluation de l'hypoxie tumorale avec le $[^{18}\text{F}]$ -FMISO. Images 3D-MIP (maximum intensity projection) en coupe frontale des souris lors des séances TEP. Un exemple en coupe sagittale d'une souris au 9^{ème} jour après l'injection est représenté. La flèche orange montre le point d'injection.

5. Études *in vivo* par TEP

L'hétérogénéité de l'expression d'une cible thérapeutique, telle que l'intégrine $\alpha 5$, dans les cellules souches de GBM est liée aux caractéristiques moléculaires initiales de la cellule mais également au microenvironnement qu'elle rencontre (par exemple dans les niches hypoxiques). Les conclusions des expériences précédentes ont été obtenues *in vitro*. Il est important de les soutenir par des expériences *in vivo*. Nous nous sommes intéressés à la capacité des cellules souches à induire une tumeur *in vivo* et de l'impact de l'expression de l'intégrine dans ces cellules. Nous avons choisi de suivre les tumeurs de façon non invasive par imagerie TEP. Pour ces expériences nous avons sélectionné trois lignées qui expriment différemment l'intégrine $\alpha 5$ *in vitro* : la lignée NCH421k qui n'exprime jamais l'intégrine $\alpha 5$, la lignée TC22 qui exprime l'intégrine $\alpha 5$ à l'état souche et différencié et la lignée NCH644 qui exprime l'intégrine $\alpha 5$ seulement après différenciation mais jamais à l'état de cellules souches (Figure 26A). Dans un premier temps, nous avons effectué des xénogreffes hétérotopiques sous-cutanées dans des souris Nude NMRI femelle. Différentes densités cellulaires ont été testées mais aucune prise de tumeur n'a pu être mise en évidence suggérant le rôle important d'un microenvironnement approprié pour la formation d'une tumeur.

Des greffes orthotopiques dans le cerveau (striatum gauche) de souris Nude NMRI ont été effectuées. Un suivi de la croissance tumorale a été réalisé par imagerie TEP (Figure 26A). Plusieurs radioligands synthétisés au laboratoire de l'IPHC (plateforme CYRCE) ont été testés. La [^{18}F]-FET ([^{18}F]-fluoro-éthyl-L-tyrosine) permet de suivre la progression tumorale au cours du temps. Une souris contrôle (sans injection de cellules tumorales) permet de vérifier que le milieu avec lequel les cellules ont été injectées n'induit pas de toxicité pour la souris. Chaque lignée cellulaire a été injectée dans un groupe de 5 souris. Lors de la quantification des résultats l'hémisphère droit (tissu sain) a été utilisé en contrôle pour normaliser les résultats (voir matériels et méthodes pour la description du protocole). En ce qui concerne la lignée TC22, une prise de tumeur est observée dès le 17^e jour. Toutes les souris de ce groupe ont été sacrifiées avant la dernière séance d'imagerie car elles avaient atteint leur point limite (atteinte locomoteur et/ou perte de poids des souris). Les xénogreffes des lignées NCH644 et NCH421k sont visibles par TEP [^{18}F]-FET à partir du 24^e jour et du 31^e jour après injection respectivement (Figure 26B). Ces résultats montrent également une prise de tumeur et une progression tumorale plus rapide pour une lignée positive *in vitro* pour l'intégrine $\alpha 5$ (TC22) par rapport à une lignée négative (NCH421k). Ces données suggèrent une implication

potentielle de l'intégrine $\alpha 5$ dans la progression tumorale *in vivo* des lignées de cellules souches de GBM. La [^{18}F]-FET apparaît comme un radiotracteur pertinent pour le suivi de la progression tumorale.

Nous avons ensuite évalué la capacité proliférative de ces trois lignées cellulaires *in vivo* en utilisant le radiotracteur [^{18}F]-FLT ([^{18}F]-fluoro-thymidine) qui est un marqueur de prolifération. Le même protocole a été utilisé avec 3 séances d'imagerie au lieu de 4 dans le protocole précédent (problème de disponibilité du PET-scan). La 1^{ère} séance de TEP a été réalisée 19 jours après injection des cellules. Ce radiotracteur émet un signal plus faible que la [^{18}F]-FET. Les images représentées dans la figure 3C sont celles obtenues en 2D car en 3D-MIP (maximum intensity projection) le signal n'est pas assez élevé pour être visible. Les résultats ont montré un volume tumoral plus important pour la lignée positive à l'intégrine $\alpha 5$ (TC22) par rapport à la lignée négative (NCH421k). On observe un volume tumoral moyen de 14 mm³ à 26 jours après l'injection des cellules TC22 tandis que les tumeurs obtenues avec les cellules NCH644 atteignent ce volume (16 mm³) à 33 jours après l'injection. Les tumeurs obtenues avec les cellules NCH421k n'atteignent qu'un volume de 6 mm³ lors de la dernière séance de TEP. La lignée positive pour l'intégrine $\alpha 5$ (TC22) montre également une captation du radiotracteur (index de l'activité tumorale) plus importante par rapport à la lignée négative (NCH421k) qui ne présente pas de prolifération cellulaire détectable (Figure 26C). L'utilisation de ce radiotracteur suggère une implication de l'intégrine $\alpha 5$ dans la prolifération cellulaire entraînant une progression tumorale plus rapide et affectant la survie des souris. En compilant les données obtenues avec les deux radiotraceurs ([^{18}F]-FET et [^{18}F]-FLT), les résultats montrent que les souris de la lignée TC22 ont une survie moins importante que les deux autres lignées (Figure 26D).

Nous avons montré *in vitro* que l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ était modulée par l'hypoxie. Nous avons donc évalué l'hypoxie intratumorale à l'aide du [^{18}F]-FMISO ([^{18}F]-fluoromisonidazole) qui est un marqueur hypoxique. Le protocole utilisé pour les radiotraceurs précédents a été appliqué pour ces expériences. Curieusement un signal était détecté dès le 9^{ème} jour après injection des cellules pour toutes les lignées. Ce signal se positionne en avant du cerveau et représente un marquage non-spécifique et non tumoral de ce radiotracteur. En analysant ce marquage plus en détail nous observons en coupe sagittale le point d'injection des cellules montré par une flèche sur la figure 26E. Mais le signal se situe plus haut, au niveau du

museau de la souris confirmant l'aspect aspécifique du marquage par ce radiotracer (Figure 26E). Récemment il a été montré que le FMISO et ses dérivés marqués au ^{18}F ou au ^{64}Cu pouvaient être captés par le bulbe olfactif chez l'animal qui serait sensible à l'hypoxie. Il a également été montré qu'une anesthésie par inhalation pouvait réduire la pression partielle en oxygène et ainsi favoriser la captation du FMISO par le bulbe olfactif [348–350]. Par conséquent l'utilisation de ce radiotracer dans le petit animal n'est pas appropriée pour la quantification de l'hypoxie des tumeurs cérébrales en utilisant ce protocole. Pour éviter la captation du FMISO au niveau du bulbe olfactif il faudrait trouver une alternative à l'anesthésie par l'isoflurane en utilisant un anesthésiant par injection sous-cutanée par exemple. L'utilisation du [^{18}F]-FAZA (18F-fluoroazomycine arabinoside), un nitroimidazole de deuxième génération pourrait également être une bonne alternative pour étudier l'hypoxie des tumeurs cérébrales. Il a été montré que ce radiotracer présente une demi-vie biologique plus longue et un contraste plus élevé avec les tissus non marqués par rapport au [^{18}F]-FMISO. Le [^{18}F]-FAZA présente également une meilleure qualité d'image due à un rapport tumeur sur bruit de fond amélioré. Cependant, il est plus hydrophile que le [^{18}F]-FMISO et s'accumule difficilement dans les tumeurs dont la BHE est préservée [351–355].

L'équipe de Notni et *al.* [356] a mis au point un radiotracer marqué au ^{68}Ga hautement spécifique de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et testé chez les rongeurs, le [^{68}Ga]-aquibepin [356–358]. Afin d'étudier l'évolution de l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ au cours du développement tumoral de nos différentes lignées de cellules souches, une discussion avec le Dr. Notni a été engagée. Une collaboration aurait pu nous permettre d'utiliser ce peptide RGD spécifique de l'intégrine $\alpha 5$ pour caractériser *in vivo* la modulation de l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ au cours du temps. Cette compréhension de l'évolution temporelle de l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ pourrait nous aider à mieux comprendre le fonctionnement de cette dernière dans l'optique d'un traitement personnalisé visant l'intégrine $\alpha 5$. Cependant ce peptide marqué au ^{68}Ga ne pouvait être synthétisé au laboratoire. La crise sanitaire et les nombreux confinements ont entravé l'avancement de cette partie du projet qui n'a donc pas pu aboutir. Néanmoins, le marquage au ^{68}Ga est maintenant disponible au sein du laboratoire IPHC et pourrait permettre d'avancer sur ce point.

6. Discussion et perspectives

L'implication des intégrines à différentes étapes de la progression tumorale a largement été démontrée depuis de nombreuses années [329, 359–362]. Au sein du laboratoire l'attention s'est portée sur l'intégrine $\alpha 5$ qui est retrouvée dans le sous-type mésenchymal de la classification de Verhaak, le sous-type le plus agressif [72, 260, 311]. Il a été montré que cette intégrine est de mauvais pronostic dans les GBM et qu'elle joue un rôle dans la résistance thérapeutique [334, 335, 363]. Cela fait de l'intégrine $\alpha 5$ une cible thérapeutique attrayante pour le traitement du GBM.

Au cours de ma thèse, j'ai pu mettre en évidence une hétérogénéité de l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ au sein de différentes lignées de CSG, à mettre en relation avec une expression hétérogène retrouvée dans les tumeurs de patients. Pour une même lignée, le microenvironnement (hypoxie) ou l'état cellulaire (différentiation) peut moduler l'expression de l'intégrine rendant plus complexe l'impact de son inhibition sur une tumeur donnée. Il semble important de comprendre les mécanismes responsables de cette modulation de l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ en fonction du microenvironnement tumoral pour pouvoir ajuster une thérapie anti-intégrine et être plus efficace.

L'hypoxie est principalement régulée par deux facteurs induits par l'hypoxie, HIF-1 α et HIF-2 α . Il a été montré dans le cancer du sein que les deux HIFs se lient à un site consensus de liaison sur le promoteur du gène de l'intégrine $\alpha 5$ et qu'ils étaient tous deux impliqués dans l'expression de l'ARNm et de la protéine de l'intégrine $\alpha 5$ [300]. Ce lien entre l'hypoxie et l'intégrine $\alpha 5$ a également été montré dans le cancer gastrique. Une augmentation de l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ a été observée en hypoxie liée à une augmentation du VEGF [364]. Nos résultats montrent un effet préférentiel de HIF-2 α sur l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ dans les CSG. De plus, HIF-2 α fait partie intégrante du réseau de régulateurs spécifique du GBM que nous avons caractérisé avec nos collaborateurs. HIF-2 α se démarque ainsi largement de HIF-1 α dans le GBM au contraire d'autres tumeurs solides. D'autres travaux montrent également que les CSG utilisent préférentiellement HIF-2 α pour maintenir leur état de cellules souches [203, 204]. Globalement HIF-2 α se profile comme une cible thérapeutique intéressante pour le GBM. De plus, nous avons observé en hypoxie que la migration des cellules souches est augmentée potentiellement en relation avec la surexpression de l'intégrine $\alpha 5$. L'inhibition

de HIF-2 α et l'inhibition de l'intégrine affecte cette migration suggérant là encore une relation entre les deux. Ainsi pour la première fois dans le GBM, notre étude montre un lien important entre HIF-2 α et l'intégrine α 5 qui se répercute sur le phénotype des CSG. L'augmentation de l'évasion cellulaire en hypoxie serait responsable d'une invasion tumorale plus importante des CSG positive à l'intégrine α 5. Ces résultats font écho à ceux obtenus précédemment dans l'équipe sur la capacité migratoire dépendante de l'intégrine α 5 dans des cellules tumorales différenciées de GBM [329].

Étant une cible intéressante dans le cancer, des inhibiteurs pour contrer les facteurs d'hypoxie ont été développés. Nous venons de voir que HIF-2 α est préférentiellement utilisé dans les GBM, c'est pourquoi nous nous sommes focalisés sur cette cible pour développer une éventuelle thérapie combinant le ciblage de HIF-2 α et de l'intégrine α 5 dans le GBM. Deux inhibiteurs spécifiques de HIF-2 α ont été utilisés dans notre étude : le PT2977 [365] et le composé 2 [366]. Ce dernier va se lier au domaine d'interaction protéine-protéine PAS-B (Per-ARNT-Sim-B) de HIF-2 α et empêcher sa dimérisation avec ARNT (due à des changements conformationnels de HIF-2 α). Cela aura pour conséquence d'empêcher la transcription des gènes cibles de HIF-2 α . Cette spécificité du composé 2 pour HIF-2 α est due à la cavité du domaine PAS-B qui est plus grande par rapport au domaine PAS-B de HIF-1 α . Par conséquent, le composé 2 va préférentiellement se lier à HIF-2 α qui a une cavité assez grande pour accueillir le composé 2 et ainsi diminuer son activité (Figure 27) [366].

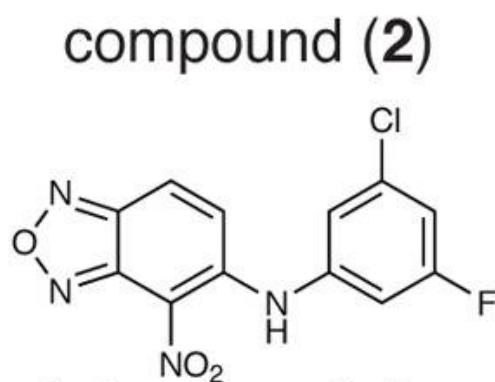


Figure 27 : Structure chimique du composé 2 [366].

En se basant sur la structure chimique du composé 2, Wallace et *al.* ont mis au point le PT2385 montrant une efficacité supérieure dans les carcinomes rénaux à cellules claires ainsi qu'une efficacité pharmacologique *in vivo* plus efficace par rapport au composé 2. De plus, il a été montré que le PT2385 diminue également le taux en ARNm et en protéine de HIF-2 α en plus

de diminuer la transcription des gènes cibles de HIF-2 α . Il a été montré que la surexpression de la protéine HIF-2 α améliore l'activité du promoteur du gène de HIF-2 α (EPAS1) [367, 368]. Le PT2977 est la 2^{ème} génération du PT2385. Cette molécule est 2 à 3 fois plus spécifique pour HIF-2 α par rapport au PT2385. Cette spécificité est due au déplacement du fluor d'une position trans à une position cis qui rend le PT2977 moins lipophile entraînant une réduction significative de la liaison aux protéines plasmatiques. Ces composés se lient préférentiellement à HIF-2 α et empêchent sa dimérisation avec ARNT entraînant une diminution de la transcription des gènes cibles de HIF-2 α (Figure 28) [365].

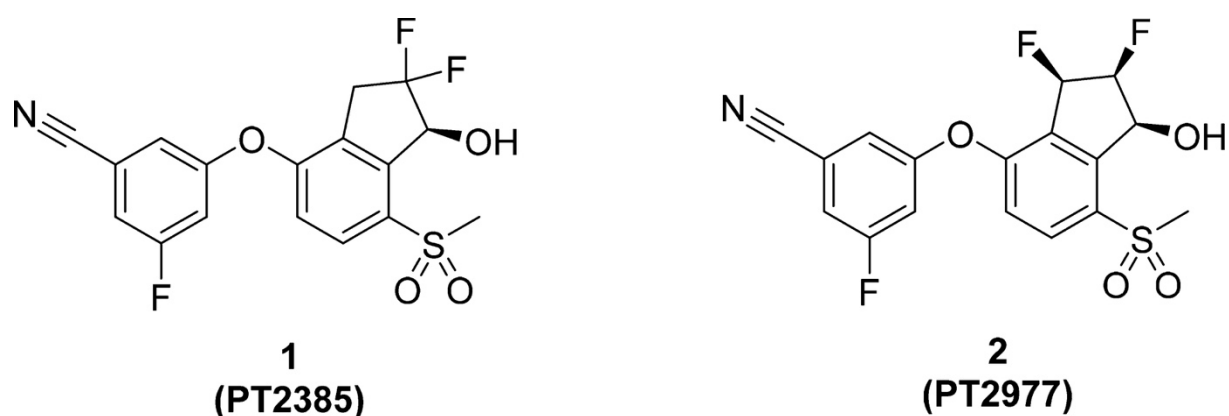


Figure 28 : Structure chimique du PT2385 et du PT2977 [365].

Au cours de notre étude nous avons montré une meilleure efficacité du composé 2 par rapport au PT2977 pour l'inhibition de la transcription du VEGF, un des gènes cibles de HIF-2 α mais également une diminution du niveau d'expression protéique de HIF-2 α . L'impact plus important du composé 2 sur la diminution de HIF-2 α a entraîné une diminution plus efficace de l'expression de l'intégrine $\alpha 5$. Ainsi nos données montrent une meilleure efficacité du composé 2 dans les CSG par rapport au PT2977.

Nos résultats montrent également que la combinaison du composé 2 et du FR248 (antagoniste de l'intégrine $\alpha 5$) serait intéressante dans le traitement des GBM. Ces deux composés (20 μ M) administrés seuls n'ont pas d'effet sur la taille des sphères des cellules souches. Cependant, leur combinaison entraîne diminution significative de la taille des sphères pour la lignée TC22 ($\alpha 5^+$). Il serait intéressant d'évaluer l'effet de cette combinaison sur des modèles pré-cliniques *in vivo* pour démontrer sa pertinence. Il serait aussi primordial de pouvoir suivre l'évolution temporelle de l'intégrine $\alpha 5$ lors de ce traitement pour confirmer son implication dans l'agressivité tumorale. Ce suivi pourrait également nous permettre de mieux caractériser

l'évolution de cette intégrine au cours du développement tumoral. Ainsi l'idée d'exploiter le RGD radiomarqué spécifique de l'intégrine $\alpha 5$ du Dr. Notni [356] reste pertinente dans nos modèles pré-cliniques et plus largement à plus long terme en clinique humaine. Cela permettrait également de sélectionner les patients les plus pertinents pour recevoir une thérapie anti-intégrine (patients intégrine $\alpha 5$ positifs).

L'inhibition de l'intégrine $\alpha 5$ en présence d'un inhibiteur de HIF-2 α ne permet pas d'inhiber complètement l'expression de cette intégrine. Il est donc clair que d'autres acteurs entrent en jeu pour moduler l'expression de l'intégrine. Mes investigations ont porté tout d'abord sur la partie de l'expression de l'intégrine liée à l'hypoxie / HIF-2 α . En utilisant le réseau de régulateurs, nous nous sommes focalisés sur AhR, qui utilise ARNT (comme HIF-2 α) pour exercer son rôle de facteur de transcription dans les cellules. Des revues récentes de la littérature mettent en avant son rôle dans les tumeurs cérébrales [369, 370]. AhR serait un suppresseur de tumeur dans les GBM. Une inactivation de AhR dans les GBM entraîne une augmentation de la migration et de l'invasion cellulaire en relation avec une augmentation de l'axe CXCL12/CXCR4/MMP9 et une augmentation de certaines intégrines (ITGA2, ITGA4). La perte d'AhR provoque une augmentation de la liaison de la polymérase II aux promoteurs de CXCL12, CXCR4 et MMP9 et de l'intégrine $\alpha 5$ [371]. Ces résultats suggèrent qu'effectivement AhR est susceptible d'empêcher l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ dans nos modèles de CSG. Il est maintenant important de confirmer que cet effet peut passer par la compétition avec HIF-2 α pour la liaison à ARNT (HIF-1 β). Mes résultats préliminaires semblent aller dans ce sens car son expression apparait inversement liée à celle de HIF-2 α et de l'intégrine. Mais cette hypothèse doit être confirmée par inhibition de AhR dans les lignées qui n'expriment pas l'intégrine $\alpha 5$ pour l'induire. Une autre hypothèse pourrait être pertinente pour expliquer la modulation de l'intégrine $\alpha 5$ dans les CSG, il s'agit des modifications épigénétiques. Dans la littérature, il a été montré que l'hypoxie réduit l'activité des déméthylases (TET) et entraîne des hyperméthylations [372]. L'étude du méthylome des CSG (qui est faisable au laboratoire) pourrait nous indiquer s'il existe des modifications épigénétiques en hypoxie qui pourrait influencer l'expression de l'intégrine $\alpha 5$. Cela pourrait expliquer pourquoi la lignée NCH421k n'est jamais capable d'exprimer l'intégrine $\alpha 5$ que ce soit en condition hypoxique ou après la différenciation des CSG.

Il serait également intéressant de comprendre les mécanismes de modulation de cette intégrine dans les cellules différenciées pour optimiser l'inhibition de cette cible thérapeutique dans les GBM. Une expression élevée de l'intégrine $\alpha 5$ est retrouvée dans le sous-type mésenchymal de la classification de Verhaak [260, 311] et l'analyse GSEA des données de patients indiquent que la transition épithélio-mésenchymateuse est une des voies mise en jeu dans les tumeurs sur-exprimant l'intégrine $\alpha 5$. La compréhension des mécanismes impliqués dans l'induction de l'expression de cette intégrine dans les cellules différenciées donnera des informations complémentaires sur la potentialité de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques. L'étude du réseau de régulateurs peut là encore nous donner des pistes. Il s'agira de comparer cellules souches *vs* cellules différenciées pour mettre en évidence les régulateurs activés/inhibés différenciellement.

Mes résultats mettent en avant toute la difficulté d'une thérapie ciblant une protéine pro-tumorale particulière, ici avec l'exemple de l'intégrine $\alpha 5$. Les cibles thérapeutiques sont exprimées de façon hétérogène entre 2 tumeurs ou même dans une tumeur donnée. En combinant les connaissances acquises sur les cellules souches et leurs congénères différenciées, on pourrait imaginer une thérapie pour inhiber une même cible dans les 2 types de cellules. Dans notre exemple, un antagoniste de HIF-2 α inhiberait l'expression de l'intégrine dans les niches hypoxiques et un antagoniste de l'inducteur de l'intégrine lors de la différenciation, ciblerait les cellules différenciées. Cette combinaison de traitement permettrait de diminuer l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ dans les cellules souches et les cellules différenciées pour avoir une efficacité plus importante sur la tumeur globale. De plus, il a été montré par l'équipe de JN. Rich [163] une coopération entre les CSG et leurs congénères différenciés. Une co-implantation de CSG et de cellules différenciées *in vivo* a entraîné la formation de tumeurs plus importantes et réduit la survie des souris par rapport à l'implantation de CSG seules [163]. Pour mettre au point cette thérapie combinée visant les cellules souches et les cellules différenciées il serait intéressant de réaliser des cocultures avec ces deux types cellulaires et d'observer l'effet de la combinaison sur la survie des deux populations cellulaires. L'utilisation de tumoroïdes cérébraux pourrait également être une option pour mettre au point une thérapie combinée anti-intégrine visant ces deux types cellulaires. L'utilisation des organoïdes de GBM permettra de récapituler l'hétérogénéité et la plasticité cellulaire pour le développement de thérapies personnalisées [238, 373–375].

2^{ème} partie : Étude de l'intégrine $\alpha 5$ dans des lignées résistantes au témozolomide




I. Publication 2

1. Résumé

Le GBM est la tumeur cérébrale la plus agressive avec dans la quasi-totalité des cas une récurrence, malgré le traitement intensif suivi par les patients. C'est pourquoi il est essentiel de comprendre les résistances thérapeutiques observées afin d'améliorer le traitement des GBM. C'est dans ce contexte que l'équipe a étudié les modifications moléculaires et phénotypiques induites par le TMZ, traitement chimiothérapeutique de référence des GBM. Cette étude a été menée sur un modèle cellulaire de référence pour les GBM, les cellules U87MG. Ces cellules ont été traitées avec 50 μ M de TMZ jusqu'à obtenir des cellules résistantes. Ces cellules résistantes stables sont cultivées en présence de TMZ et appelées cellules U87MG R50. Une autre lignée résistante de façon stable a été obtenue en enlevant la pression du TMZ et appelées U87MG OFF. Les cellules U87MG OFF peuvent être considérées comme des mimes de tumeurs récidivantes après arrêt du traitement d'un patient. Une étude transcriptomique comparative des 3 lignées a montré des changements moléculaires pendant et après le traitement, et notamment sur le répertoire des intégrines. Nous nous sommes concentrés sur l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, notre cible thérapeutique de prédilection. L'expression de cette intégrine (ARNm et protéine) diminue sous l'effet du TMZ (U87MG R50) mais revient au niveau initial, existant avant traitement (U87MG), dans les cellules U87MG OFF. Les 2 lignées U87MG et U87MG OFF ont des caractéristiques phénotypiques identiques *in vitro* en termes de prolifération ou de migration dépendante de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. La lignée U87MG ainsi que les lignées dérivées résistantes expriment une protéine p53 sauvage. Nous avons pu montrer que l'activation de p53 par l'idanasutlin (un inhibiteur de la liaison entre p53 et MDM2) combinée à une inhibition de l'intégrine par des antagonistes spécifiques était très efficace dans les cellules U87MG et U87MG OFF. Ces résultats montrent que le traitement chimiothérapeutique modifie profondément tout le répertoire des intégrines des cellules tumorales et en particulier l'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. Nous proposons une nouvelle thérapie combinant un activateur de p53 et un antagoniste d'intégrine qui serait efficace pour des tumeurs à p53 sauvage et exprimant l'intégrine $\alpha 5$. Cette association thérapeutique pourrait s'avérer intéressante dans le cas de récurrences tumorales qui se révèlent après l'arrêt du traitement.

Article

Temozolomide-Acquired Resistance Is Associated with Modulation of the Integrin Repertoire in Glioblastoma, Impact of $\alpha 5\beta 1$ Integrin

Saidu Sani ^{1,2} , Nikita Pallaoro ¹, Mélissa Messe ¹, Chloé Bernhard ¹, Nelly Etienne-Selloum ^{1,3} , Horst Kessler ⁴ , Luciana Marinelli ⁵, Natacha Entz-Werle ^{1,6}, Sophie Foppolo ¹ , Sophie Martin ¹ , Damien Reita ^{1,7}  and Monique Dontenwill ^{1,*} 

- ¹ Laboratoire de Bioimagerie et Pathologies (LBP), UMR CNRS 7021, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, 67401 Illkirch, France; Sanisaidu96@gmail.com (S.S.); npallaoro@unistra.fr (N.P.); melissa.messe@etu.unistra.fr (M.M.); chloe.bernhard@etu.unistra.fr (C.B.); nelly.etienne-selloum@unistra.fr (N.E.-S.); Natacha.Entz-Werle@chru-strasbourg.fr (N.E.-W.); sophie.foppolo@unistra.fr (S.F.); sophie.martin@unistra.fr (S.M.); damien.reita@gmail.com (D.R.)
- ² Cancer and Diabetic Research Group, Department of Biochemistry, Faculty of Biological Science, Federal University Ndufu-Alike Ikwo, Abakaliki 482131, Nigeria
- ³ Department of Pharmacy, Institut de Cancérologie Strasbourg Europe (ICANS), 67200 Strasbourg, France
- ⁴ Department of Chemistry, Institute for Advanced Study, Technical University of Munich, 85748 Garching, Germany; kessler@tum.de
- ⁵ Dipartimento di Farmacia, Università degli Studi di Napoli “Federico II”, 80131 Naples, Italy; lmarinel@unina.it
- ⁶ Pediatric Onco-Hematology Unit, University Hospital of Strasbourg, 67098 Strasbourg, France
- ⁷ Département de Génétique Moléculaire des Cancers, Oncologie Moléculaire & Pharmacogénétique, University Hospital of Strasbourg, 67000 Strasbourg, France
- * Correspondence: monique.dontenwill@unistra.fr



Citation: Sani, S.; Pallaoro, N.; Messe, M.; Bernhard, C.; Etienne-Selloum, N.; Kessler, H.; Marinelli, L.; Entz-Werle, N.; Foppolo, S.; Martin, S.; et al. Temozolomide-Acquired Resistance Is Associated with Modulation of the Integrin Repertoire in Glioblastoma, Impact of $\alpha 5\beta 1$ Integrin. *Cancers* **2022**, *14*, 369. <https://doi.org/10.3390/cancers14020369>

Academic Editors: Suzanne Ponik and Seiichiro Ishihara

Received: 25 October 2021

Accepted: 5 January 2022

Published: 12 January 2022

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: Glioblastomas are the deadliest brain tumours. The standard of care associates surgery, radio- and chemotherapy with Temozolomide as the reference drug. Despite this treatment, most of the tumours recur. The characterization of resistance mechanisms is of paramount importance to enable the proposal of more effective therapies. In this work we aimed to evaluate the molecular changes occurring during and after Temozolomide treatment in a glioma cell line. A high plasticity in the integrin repertoire exists in these cells. As an example, variations of the $\alpha 5\beta 1$ integrin expression were observed with a reduction during the treatment and re-expression after removal of the drug. The association of integrin antagonists with p53 reactivators appears to be efficient in recurrent tumours. Specific integrins may thus be particularly targetable at different time points of glioblastoma treatment and combination therapies evaluated according to their time-dependent expression.

Abstract: Despite extensive treatment, glioblastoma inevitably recurs, leading to an overall survival of around 16 months. Understanding why and how tumours resist to radio/chemotherapies is crucial to overcome this unmet oncological challenge. Primary and acquired resistance to Temozolomide (TMZ), the standard-of-care chemotherapeutic drug, have been the subjects of several studies. This work aimed to evaluate molecular and phenotypic changes occurring during and after TMZ treatment in a glioblastoma cell model, the U87MG. These initially TMZ-sensitive cells acquire long-lasting resistance even after removal of the drug. Transcriptomic analysis revealed that profound changes occurred between parental and resistant cells, particularly at the level of the integrin repertoire. Focusing on $\alpha 5\beta 1$ integrin, which we proposed earlier as a glioblastoma therapeutic target, we demonstrated that its expression was decreased in the presence of TMZ but restored after removal of the drug. In this glioblastoma model of recurrence, $\alpha 5\beta 1$ integrin plays an important role in the proliferation and migration of tumoral cells. We also demonstrated that reactivating p53 by MDM2 inhibitors concomitantly with the inhibition of this integrin in recurrent cells may overcome the TMZ resistance. Our results may explain some integrin-based targeted therapy failure as integrin expressions are highly switchable during the time of treatment. We also propose an alternative way to alter the viability of recurrent glioblastoma cells expressing a high level of $\alpha 5\beta 1$ integrin.

Keywords: glioblastoma; temozolomide resistance; integrins; p53 reactivation

1. Introduction

Glioblastoma (GBM) is the most common and most aggressive malignant brain tumour in adults and is characterized by high proliferation, invasion into normal brain tissue and resistance to therapies [1,2]. Currently there is no effective long-term treatment for this killer disease, but the standard of care (Stupp protocol) is maximal surgical resection, followed by radiotherapy with concomitant and adjuvant Temozolomide (TMZ) chemotherapy [3]. However, the prognosis of patients with glioblastoma remains poor and has not improved despite numerous clinical trials on new therapeutic propositions [4]. Therefore, there is an urgent need for novel therapeutic strategies, which may be supported by a deep understanding of GBM and surrounding microenvironment crosstalk.

Primary and acquired resistances are the major challenges for the clinical use of standard and targeted therapies in GBM [5,6]. One of the mechanisms of glioblastoma resistance to TMZ involves O⁶-methylguanine DNA methyl transferase (MGMT), a suicide enzyme that allows the direct repair of the lesions caused by TMZ, through the removal of a methyl group in position O⁶ of guanine [7]. Previous studies have shown that intracellular accumulation of the tumour suppressor protein p53 downregulates the expression of MGMT [8,9]. The p53 protein is mutated in about 30% of glioblastomas [10], although a subtype of glioblastoma expressing mostly wild type p53 has been identified in an integrated genomic analysis [11]. However, even if wild type p53 is expressed in 70% of GBM, its functions are frequently suppressed by MDM2/MDM4, E3 ubiquitin ligases that mark and target p53 for proteasomal degradation [12–14]. MDM2, a zinc finger nuclear phosphoprotein and negative regulator of the p53 protein, is often overexpressed in GBM and has been implicated in cancer cell proliferation and survival. Inhibition of the p53–MDM2 interaction can prevent p53 degradation and restore p53 transcriptional activity, leading to the p53-mediated induction of tumour cell apoptosis, thus making the p53–MDM2 complex a promising target for glioblastoma expressing wild type p53 [15–17]. The discovery of the p53–MDM2 inhibitor Nutlin-3a represented a breakthrough in the development of p53-activators¹⁴. The more recent development of RG7388 (Idasanutlin), a second-generation MDM2 inhibitor with greater potency, selectivity, bioavailability and effective p53-activating ability leading to the p53-mediated induction of tumour cell apoptosis, is promising for cancers, including GBM [18,19].

Integrins have become, in the past 20 years, the subject of numerous studies because of the vital role they play in tumour progression [20,21]. The integrins are transmembrane heterodimeric cell surface receptors that mediate cell adhesion to the extracellular matrix (ECM) and support cell–cell interactions in multiple physiological and pathological conditions [22,23]. The frequent deregulation of integrin expressions and pathways in cancer cells underscores specific integrin major contributions in tumour growth and resistance to therapies [24]. The disruption of the integrin signalling pathways by integrin antagonists has been shown to inhibit tumour growth and sensitize tumours to therapies in preclinical contexts. Cilengitide [25] was the first integrin $\alpha v\beta 3/\beta 5$ antagonist to reach the clinic, but clinical trials for GBM with cilengitide in combination with the standard of care (Stupp protocol) were unsuccessful [26]. Several reasons may explain these failures, as reviewed in [27]. However, knowledge on integrin expressions and functions in GBM merits further investigations to adapt integrin-based therapies to specific subpopulations of patients. In this way, expression of $\alpha 5$ subunit of the $\alpha 5\beta 1$ integrin heterodimer is enhanced in the mesenchymal subgroup of glioblastoma patients as compared to the others [11,28], presumably conferring to these patients a better sensitivity to anti- $\alpha 5$ integrin therapy. We and others showed previously that $\alpha 5\beta 1$ integrin is an interesting therapeutic target for GBM. Its overexpression at the mRNA [29,30] or protein [31] levels define populations of patients with worse prognostics. In preclinical experiments it was shown that this integrin

is involved in survival, migration, resistance to therapies and neo-angiogenesis, all being hallmarks of GBM [32–35].

Integrin expressions in GBM vary after therapies [36]. As an example, it was shown that in tumours recurring after bevacizumab treatment, $\alpha 5\beta 1$ integrin was overexpressed in a subpopulation of patients [37]. In particular, we demonstrated the existence of a negative crosstalk between $\alpha 5\beta 1$ integrin and p53 pathways supporting an implication in glioma resistance to chemotherapies [30,38]. We also showed that the inhibition of the integrin concomitantly with p53 activation with Nutlin 3a in $\alpha 5$ -overexpressing cells led to a huge increase in cell apoptosis [39].

In this study, we aimed to investigate if Temozolomide treatment affects the integrin repertory in glioma cells, taking the U87MG cell line as an example. Resistant cells were obtained that conserve the resistance even after removal of the drug. Transcriptomic analysis of non-treated U87MG cells and resistant cells cultured in the presence or absence of TMZ showed a high variation in integrin expressions. Interestingly, $\alpha 5\beta 1$ integrin expression decreases in the presence of the drug but recovers after its removal, suggesting that it may represent a therapeutic target for recurrent glioblastoma. We also investigated if treatment of these recurrent TMZ-resistant cells may be sensitive to a combination of highly active and selective $\alpha 5\beta 1$ integrin antagonists and p53 reactivators. Our results may add new therapeutic perspectives for recurrent glioblastoma expressing high level of $\alpha 5\beta 1$ integrin.

2. Materials and Methods

2.1. Drugs

Temozolomide (TMZ), 8-carbamoyl-3-methylimidazo[5,1-d]-1,2,3,5-tetrazin (3H)-one 5 (Sigma-Aldrich), was prepared as a 100 mM stock solution in DMSO and stored at 4 °C until use. Nutlin-3a, (4-[4,5-bis-(4-chlorophenyl)-2-(2-isopropoxy-4-methoxy-phenyl)-4,5-dihydro-imidazole-1-carbonyl]-piperazin-2-one), the active enantiomer, was from Cayman chemical company (Interchim, Montluçon, France). Nutlin-3a was prepared as a 10 mM stock solution in ethanol and stored at –20 °C until use. Idasanutlin, also known as RG7388 (C₃₁H₂₉C₁₂F₂N₃O₄), was from Euromedex (Souffelweyersheim, France). Idasanutlin was prepared as a 10 mM stock solution in DMSO and stored at –20 °C until use. RITA (5,5'-(2,5-furandiyl) bis-2 thiophenemethanol) was from Cayman chemical company (Interchim, France). RITA was prepared as a 10 mM stock solution in ethanol and stored at –20 °C until use. Antagonists of $\alpha 5\beta 1$ integrin, 34c and 1b (respectively named K34C and FR248 in this work) were synthesized according to the procedure described in [40,41]. Their structures and binding activities for integrin $\alpha 5\beta 1$ and integrin $\alpha v\beta 3$ are shown in [34]. Compound 9 was prepared as described in [42]. They were prepared as 10 mM stock solutions in DMSO and stored at 4 °C until use.

2.2. Cell Culture

U87MG glioblastoma cell line (p53 wild type) was from American Type Culture Collection (LGC Standards Sarl, Molsheim, France). Cell lines were routinely cultured in EMEM (Minimum Essential Medium Eagle) supplemented with 10% heat-inactivated foetal bovine serum, 1% Na pyruvate and 1% non-essential amino acids at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. All cells were periodically authenticated by Multiplexion GmbH and tested for the presence of mycoplasma.

2.3. Generation of Temozolomide-Resistant Glioblastoma Cells

U87MG cells (500,000) were seeded in T25 cm² cell culture flask containing EMEM (Eagle's minimal essential medium) supplemented with 10% serum, 1% Na pyruvate and 1% non-essential amino acids. Cells were allowed to adhere for 24 h, and the medium was replaced with a fresh medium containing 50 μ M of TMZ. Cell treatment was repeated twice a week for several weeks, resulting in a sub-population of stable TMZ-resistant cells. The sub-population of resistant cells generated were continuously cultured in a medium

containing TMZ and named U87MG R50. After two months, a subpopulation of U87MG R50 cells was cultured in medium without TMZ and named U87MG R50 OFF (or U87MG OFF). The maintenance of resistance in this cell line is checked regularly (every three months) by the Incucyte technology and resistance has appeared stable for at least one year.

2.4. IncuCyte Cell Confluence Assay as an Index of Proliferation

Cells were plated (2000 cells in 100 μ L per well) into 96-well culture plates. The control solvent or drugs at 2 \times concentration in 100 μ L of 2% FBS-containing medium was added to the appropriate wells. To monitor cell growth, the plates were placed into the IncuCyte live-cell analysis system and allowed to warm at 37 $^{\circ}$ C for 30 min prior to standard scanning with 4 \times objective every 3 h for at least 96 h. The captured phase contrast images were analysed using the IncuCyte ZOOM software provided by the manufacturer.

2.5. Senescence Assay

The β -galactosidase activity at pH 6 was determined using the Senescence Cells Histochemical Staining Kit (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) according to the manufacturer's instructions. Briefly, cells were plated (2000 cells/200 μ L) into a 96 well plate. The cells were washed twice with 1 \times PBS and fixed with 1 \times fixation buffer for 7 min at room temperature. The fixation buffer was aspirated and wells rinsed thrice with 1 \times PBS. After washing, the cells were covered with staining mixture and incubated at 37 $^{\circ}$ C without CO₂. After 12 h of staining, light microscopy was used to identify senescent (blue-stained) cells.

2.6. Western Blotting

Cells were plated (200,000 cells per well) into 6-well culture plates and treated with the control solvent or drugs. For the basal level values of proteins of interest, cells were used 24 h after plating. Proteins were extracted from adherent and floating cells after lysis with Laemmli sample buffer (Bio-Rad, Marnes La Coquette, France) on ice and lysates heated at 95 $^{\circ}$ C for 10 min. Proteins were separated on precast gradient 4–20% SDSPAGE gels (Bio-Rad) and transferred to PVDF membrane (GE Healthcare, Velizy, France). After 1 h of blocking at room temperature, membranes were probed with appropriate primary antibodies (Table 1) overnight at 4 $^{\circ}$ C. Membranes were subsequently incubated with anti-rabbit or anti-mouse antibodies conjugated to horseradish peroxidase (Promega, Charbonnières les-Bains, France), developed using chemoluminescence (ECL, Bio-Rad) and visualized with Las4000 image analyser (GE Healthcare, France). Quantification of non-saturated images was done using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). GAPDH or tubulin was used as the loading control for all samples.

Table 1. List of antibodies used in the study.

Antibody	Blocking Solution	Antibody Dilution
Anti- α 5 integrin H104 (Santa Cruz)	5% milk/1 \times TBS/0.1% Tween -20	1/1000
Anti- β 1 integrin TS2/16 (Millipore)	5% milk/1 \times TBS/0.1% Tween -20	1/1000
Anti- α v integrin (Cell signalling)	5% milk/1 \times TBS/0.1% Tween -20	1/1000
Anti- β 3 integrin (Cell signalling)	5% milk/1 \times TBS/0.1% Tween -20	1/1000
Anti-p53 (BD Bioscience)	5% milk/1 \times TBS/0.1% Tween -20	1/1000
Anti-pp53ser15 (Cell signalling)	5% BSA/1 \times TBS/0.1% Tween -20	1/1000
Anti-p16 (Cell signalling)	5% milk/1 \times TBS/0.1% Tween -20	1/1000
Anti-p21 (Cell signalling)	5% milk/1 \times TBS/0.1% Tween -20	1/1000
Anti-MDM2 (Calbiochem)	5% milk/1 \times PBS/0.1% Tween -20	1/1000
Anti-GAPDH (Millipore)	5% milk/1 \times TBS/0.1% Tween -20	1/5000
Anti-tubulin (Sigma-Aldrich)	5% milk/1 \times TBS/0.1% Tween -20	1/3000
Mouse HRP-conjugated secondary antibody	5% milk/1 \times TBS/0.1% Tween -20	1/10,000
Rabbit HRP-conjugated secondary antibody	5% milk/1 \times TBS/0.1% Tween -20	1/10,000

2.7. RNAseq Data

RNA-Seq libraries were generated from 400 ng of total RNA using TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit and TruSeq RNA Single Indexes kits A and B (Illumina, San Diego, CA, USA), according to manufacturer's instructions. Briefly, following purification with poly-T oligo-attached magnetic beads, the mRNA was fragmented using divalent cations at 94 °C for 2 min. The cleaved RNA fragments were copied into first-strand cDNA using reverse transcriptase and random primers. Strand specificity was achieved by replacing dTTP with dUTP during second-strand cDNA synthesis using DNA Polymerase I and RNase H. Following addition of a single 'A' base and subsequent ligation of the adapter on double-stranded cDNA fragments, the products were purified and enriched with PCR (30 s at 98 °C; (10 s at 98 °C, 30 s at 60 °C, 30 s at 72 °C) × 12 cycles; 5 min at 72 °C) to create the cDNA library. Surplus PCR primers were further removed by purification using AMPure XP beads (Beckman Coulter, Villepinte, France), and the final cDNA libraries were checked for quality and quantified using capillary electrophoresis. Libraries were then sequenced on an Illumina HiSeq4000 system as single-end 1 × 50 base reads. Image analysis and base calling were performed using RTA 2.7.7 and bcl2fastq 2.17.1.14. Reads (Illumina, San Diego, CA, USA) were preprocessed using Cutadapt version 1.10 in order to remove adapter, polyA and low-quality sequences (Phred quality score below 20), and reads shorter than 40 bases were discarded for further analysis. Reads mapping to rRNA were also discarded (this mapping was performed using Bowtie version 2.2.8). Reads were then mapped onto the hg38 assembly of human genome using STAR version 2.5.3a (twopassMode Basic). Gene expression was quantified using htseq-count version 0.6.1p1 and gene annotations from Ensembl release 99. Statistical analysis was performed using R 3.3.2 and DESeq2 1.16.1 Bioconductor library. Sequencing was performed by the GenomEast platform, a member of the 'France Génomique' consortium (ANR-10-INBS-0009).

Gene expression data obtained with DESeq2 were used to generate the heatmaps and dendrogram with R. Only genes expressed in all conditions (defined if normalized reads count divided by median of transcripts length in kb is greater than 1 for gene across all nine libraries) were taken into account for visualization. Hierarchical clustering method was performed according to pairwise complete-linkage method and using Pearson correlation for row clustering and Spearman correlation for column clustering. The biological significance of differentially expressed genes (DEGs) obtained was explored using ReactomePA, an R/Bioconductor package for reactome pathway analysis and visualization. $|\log_2(\text{fold change})| > 2$ ($|\log_2\text{FC}| > 2$) and an adjusted false discovery rate (FDR) < 0.05 (using Benjamini–Hochberg correction) were used as the cut-off criteria of DEGs samples.

2.8. Confocal Microscopy and Image Analysis

Coverslips were coated with fibronectin (20 µg/mL in DPBS), and 25,000 cells were seeded in 10% serum containing medium and cultured for 24 h. Cells were then fixed in 4% (*v/v*) paraformaldehyde for 12 min and permeabilized with 0.1% Triton-X100 for 2 min. After 1 h of blocking step in 3% bovine serum albumin (BSA)-PBS solution, cells were incubated with primary antibodies against integrin $\alpha 5$ (clone IIA1 Pharmingen, 1 µL/100 µL in 3% PBS-BSA) and $\beta 1$ integrin (purified anti-human CD29, Clone:TS2/16, 1 µL/100 µL in 3% PBS-BSA) overnight at 4 °C. Cells were rinsed in 1 × PBS and incubated with appropriate secondary antibodies (Alexa fluor@ 647 goat anti-mouse (A21236) 1 µL/200 µL in 3% PBS-BSA and Alexa fluor@ 688 goat anti-mouse 1 µL/200 µL in 3% PBS-BSA) and 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (1 µL/2000 µL in 3% PBS-BSA was added for nuclei staining) for 45 min. Samples were mounted on microscope slides using fluorescence mounting medium (Dako). Images were acquired using a confocal microscope (LEICA TCS SPE II, 63× magnification). For each experiment, identical background subtraction and scaling was applied to all images. Pearson correlation coefficient from 10–12 images (4–5 cells per images) from 3 independent experiments was calculated using JACoP plugin ImageJ software.

2.9. Spheroid Migration Assays

A single-cell suspension was mixed in MEM supplemented with 10% foetal bovine serum, 1% Na pyruvate, 1% non-essential amino acid containing 20% of methylcellulose. Spheroids were made by the hanging drop method with 2000 cells in a 20 μ L drop as previously described [43]. Tissue culture plates were coated with fibronectin or polylysine (10 μ g/mL in DPBS solution) for 3 h at 37 °C. Two-day-old spheroids were allowed to adhere to fibronectin-coated plates and migrate in complete medium (MEM, 10% FBS, 1% Na pyruvate and 1% non-essential amino acids) either with solvent or supplemented with 20 or 5 μ M of K34C or FR248. Eighteen hours later, cells were fixed with glutaraldehyde 1% (Electron Microscopy Sciences) and stained with DAPI diluted at 1 μ g/mL in 3% PBS-BSA (Sigma-Aldrich). Nuclei were pictured under the objective 5 \times in the fluorescence microscope ZEISS-Axio (ZEISS). To evaluate the number of cells that migrated out of the spheroid and the average distance of migration out of the spheroid, image analysis was performed with ImageJ software using a homemade plugin [43]. Phase-contrast images (EVOS XL, Core10 \times magnification, Thermo Scientific) were also acquired.

2.10. Statistical Analysis

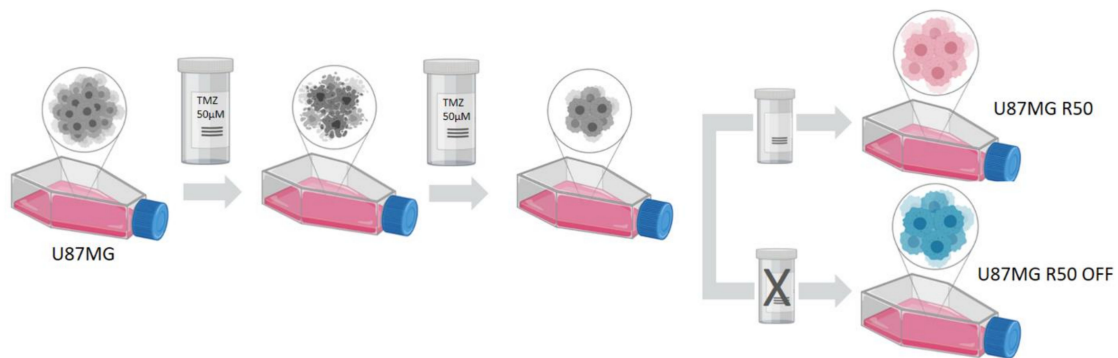
Statistical analyses were performed using Student's *t*-test with GraphPad Prism software. All data are presented as mean \pm SEM from three or more independent experiments with *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

3. Results

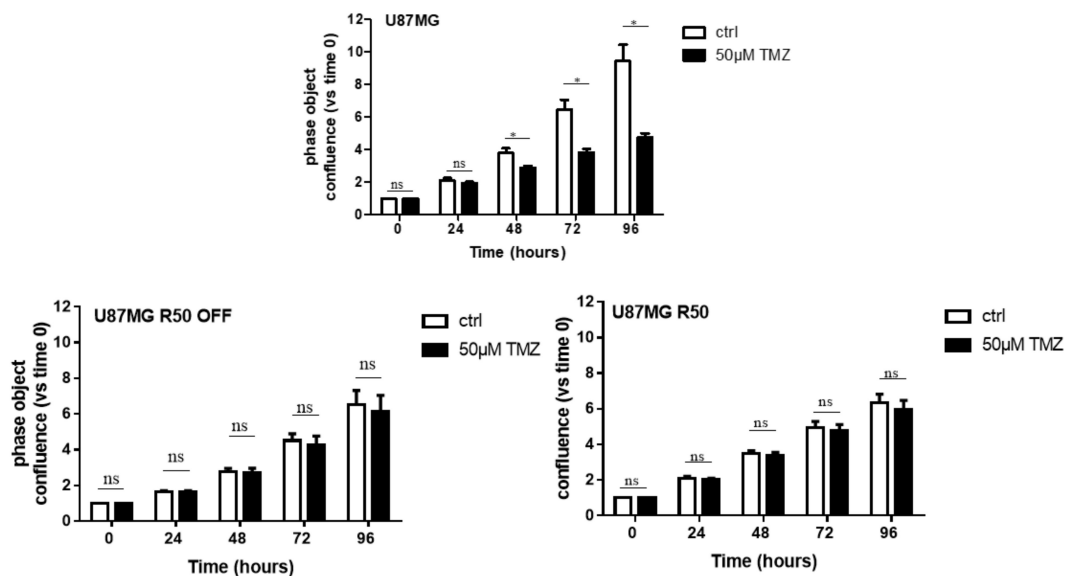
3.1. Long-Term Exposure of U87MG Cells to TMZ Generates Persistent Resistant Cells

To generate TMZ-resistant cells, we subjected U87MG cells to 50 μ M of TMZ for several weeks, resulting in a sub-population of stable TMZ-resistant U87MG cells. The sub-population of resistant cells was either continuously cultured in the medium containing 50 μ M of TMZ (U87MG R50) or, after 2 months in the presence of TMZ, cultured in the medium without TMZ (U87MG R50 OFF). We confirmed that the parental cells were sensitive to 50 μ M of TMZ and that the U87MG R50 cells were insensitive to TMZ for up to 96 h (Figure 1A). Interestingly, TMZ resistance was maintained in U87MG R50 OFF cells (Figure 1A). Furthermore, while the parental cells were dose-dependently sensitive to TMZ, the U87MG R50 and U87MG R50 OFF cells remained insensitive to varying concentrations up to 100 μ M of TMZ (Supplementary Figure S1).

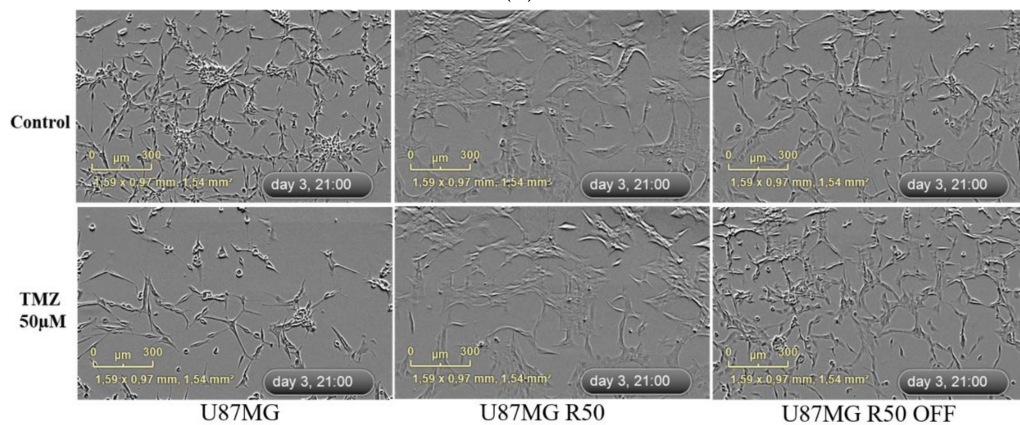
Phase-contrast images obtained from the IncuCyte (Figure 1B) showed that the cellular morphology of U87MG R50 cells differed from their parental cells by having a more spread, enlarged and flattened morphology. The U87MG R50 OFF cells displayed a mixed morphology, with some cells presenting the morphology of U87MG R50 cells while the others presented the morphology of the parental cells. TMZ treatment for 3 days produced a profound change in the cellular morphology of the parental cells, causing extensive branching, reduction in total cell number and confluence (Figure 1B). On the contrary, both the U87MG R50 cells and U87MG R50 OFF cells appeared healthy, with no obvious morphological changes 72 h post TMZ treatment (Figure 1B). Overall, these results demonstrate that a fraction of the U87MG cells that survived prolonged exposure to TMZ developed acquired TMZ-resistance, which was maintained even after the withdrawal of TMZ. According to the sample RNAseq data (see below), this resistance is not due to MGMT expression as no increase in MGMT mRNA was observed.



(A)



(B)



(C)

Figure 1. Confirmation of acquired TMZ resistance in U87MG GBM cells: (A) Generation of TMZ resistance U87MG R50 and U87MG R50 OFF cells. (B) Representative histograms showing the effect of TMZ (50 μM) on cell confluence of U87MG, U87MG R50 and U87MG R50 OFF cells from 0 to 96 h of treatment. Results are expressed as the relative area of plate covered versus the area covered by solvent-treated control cells. Histograms represent mean ± S.E.M. of at least three separate experiments. (C) Representative phase contrast images from the IncuCyte showing the cellular morphology of U87MG, U87MG R50 and U87MG R50 OFF cells 72 h post treatment with 50 μM of TMZ. Scale bar, 300 μm. *, $p < 0.05$; ns, non-significant.

3.2. TMZ Induces Senescence in U87MG Cells

Since the resistant cells showed the morphological features of senescent cells, we next tested the senescence marker SA- β GAL. Upon short incubation in 50 μ M of TMZ, the remaining cells were all positive for SA- β GAL staining. Positive cells were maintained in the U87MG R50 cells but largely decreased in U87MG R50 OFF cells (Figure 2A). Accordingly, a significant increase in the expression of proteins p16 and p21, known to be involved in senescence, was observed in U87MG R50 cells as compared to the parental cells. An increase in p16 but not in p21 was recorded in U87MG R50 OFF cells (Figure 2B). Altogether, the results confirm that TMZ triggers senescence in U87MG cells, as already reported in [44], which is resumed after TMZ removal.

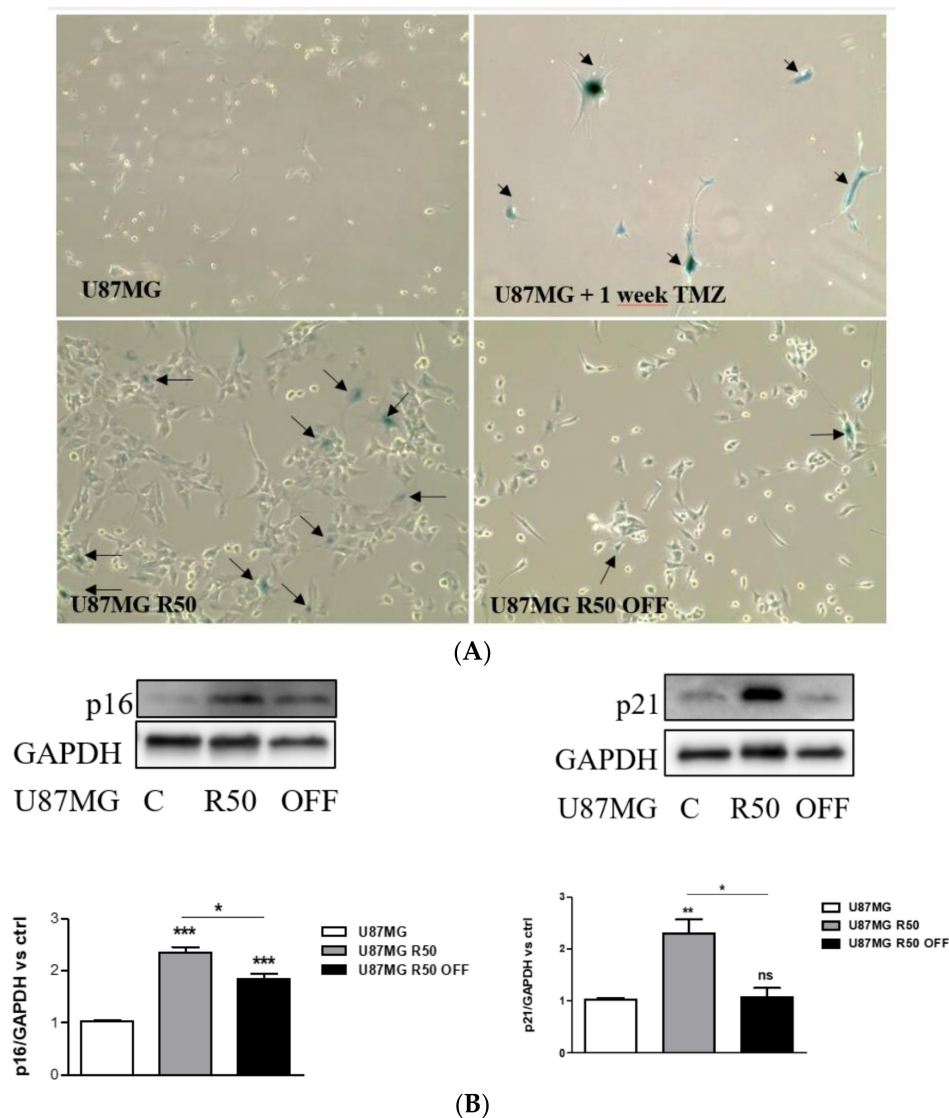


Figure 2. TMZ induces senescence in U87MG cells: (A) Representative photomicrographs showing cellular senescence after staining with SA- β Gal. Arrows: senescent cells. (B) Representative Western blot analysis showing basal expression of p16 and p21 in TMZ-resistant cells (U87MG R50 and U87MG R50 OFF) compared to the parental cells. Histograms represent the mean \pm S.E.M. of three separate experiments, and GAPDH expression was used as the loading control. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ns, non-significant.

3.3. Extracellular Matrix Organization and Integrins Are Affected by TMZ

We used RNAseq analysis to compare the three cell lines. Analysis of global gene variations by unsupervised hierarchical clustering showed that profound changes occurred during TMZ treatment, with the largest differences recorded between U87MG and U87MG R50 cells (Figure 3A). U87MG R50 OFF were more closely related to the U87MG non-treated cells. The most significant genes were subjected to gene ontology analysis. Biological pathways mostly impacted by long-term Temozolomide treatment (R50 versus control cells) are extracellular matrix organization, O-linked glycosylation and integrin cell surface interactions (Figure 3B). By contrast fewer biological pathways, including neuronal system and extracellular Matrix organization, appear to be impacted in U87MG R50 OFF cells compared to non-treated cells (Figure 3C).

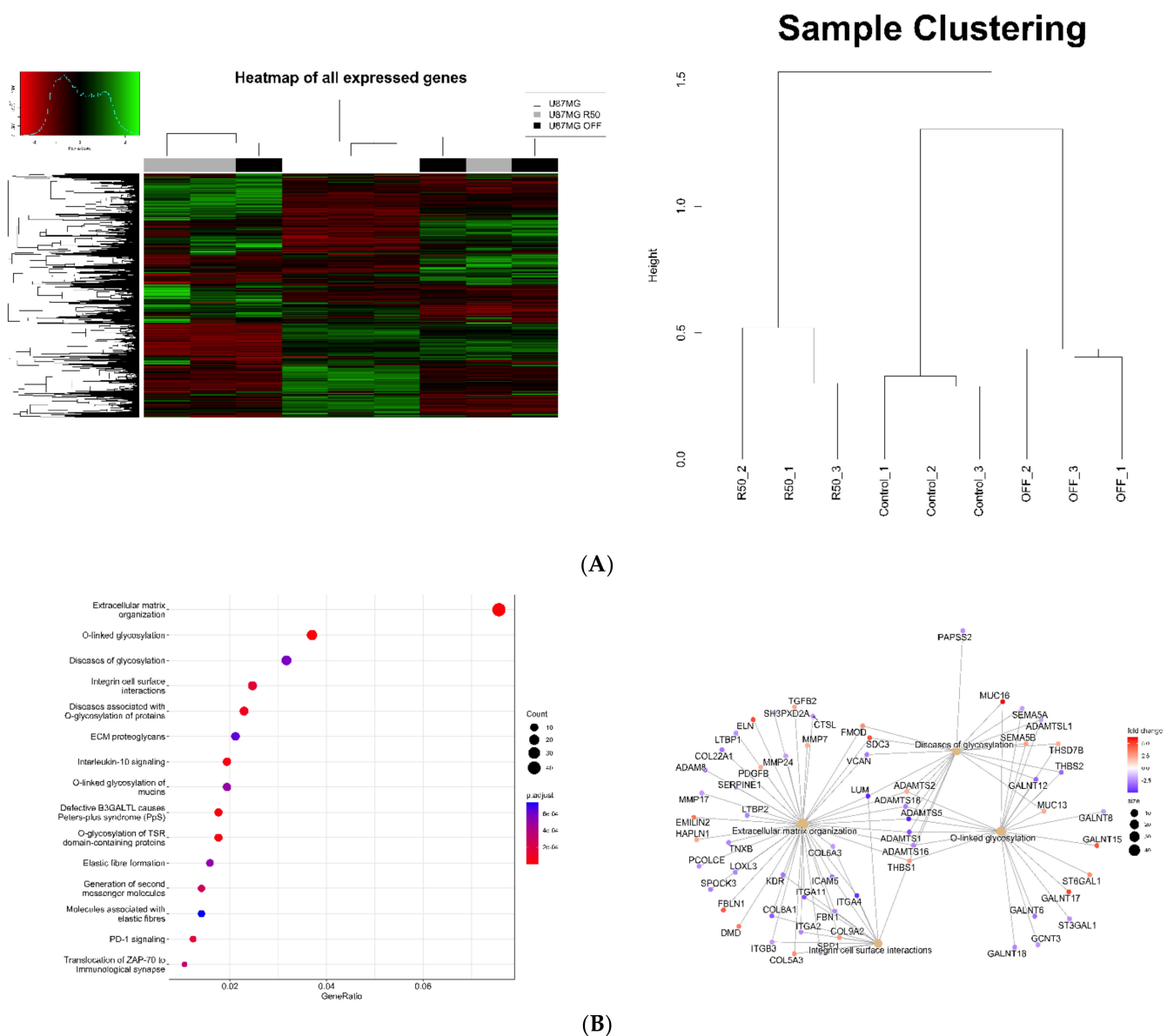


Figure 3. Cont.

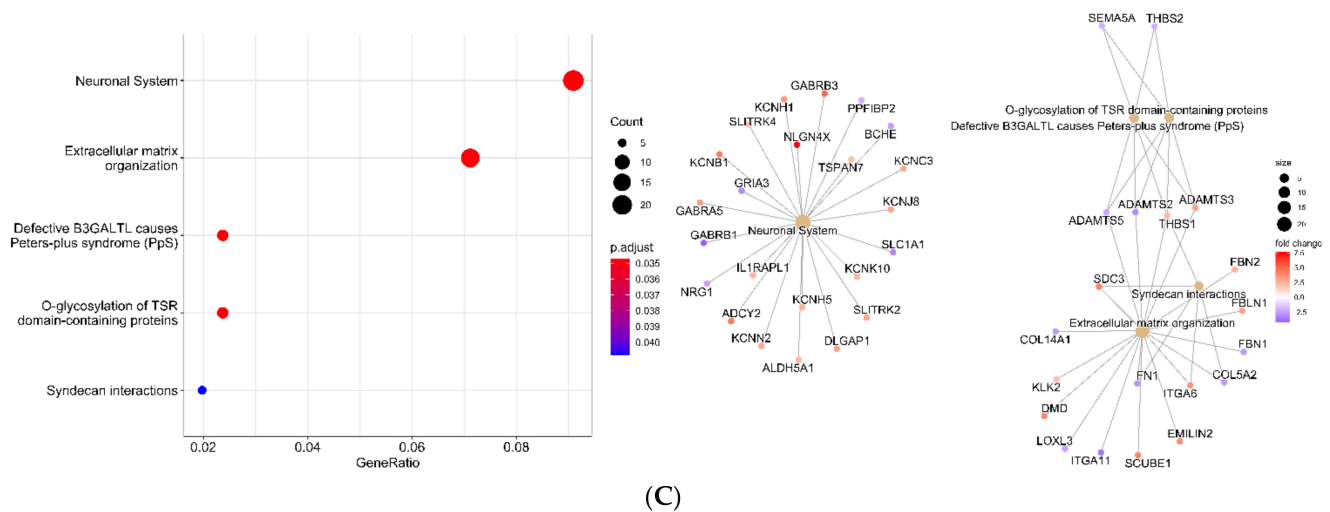


Figure 3. RNAseq analysis of TMZ-resistant and parental cell gene expression: (A) Heatmap grouped the nine samples based on the global expression profiles. Colour scale shows high and low expressions as green and red, respectively. Dendrogram depicting correlation among different samples based on global expression profiles. (B) Top 15 enriched reactome pathways for differentially expressed genes in U87MG R50 cells versus control. Enrichment map with the inter-relation of the top three enriched reactome pathways and visualization of DEGs. (C) Top five enriched reactome pathways for differentially expressed genes in U87MG R50 OFF cells versus control. Enrichment map with the inter-relation of the top three enriched reactome pathways and visualization of DEGs.

Focusing on the integrin genes, profound rearrangements of integrin subunit expression levels were observed (Figure 4A). Four main clusters exist, which define particular integrin expressions in the different cell lines. Cluster 1 corresponds to integrins expressed in U87MG control cells but repressed in R50 cells and with intermediary expression in R50 OFF cells (Integrins $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 10$, $\alpha 11$, αv , $\beta 1$, $\beta 3$). Cluster 2 involves integrins overexpressed in U87MG R50 OFF cells as compared to the two other cell lines ($\alpha 6$, $\beta 6$ and $\beta 8$), of which $\alpha 6$ and $\beta 8$ are described as markers of glioma stem cells [36,45,46]. Cluster 3 corresponds to integrins repressed in U87MG R50 OFF cells ($\alpha 7$, $\alpha 9$, αx , αD , $\beta 5$, $\beta 7$). Cluster 4 includes integrins overexpressed in U87MG R50 cells ($\alpha 1$, αL , αM , $\beta 2$, $\beta 4$), including some leucocyte specific integrins. Data confirm that integrin mRNA expressions are subjected to specific variations during the time course of chemotherapy with Temozolomide.

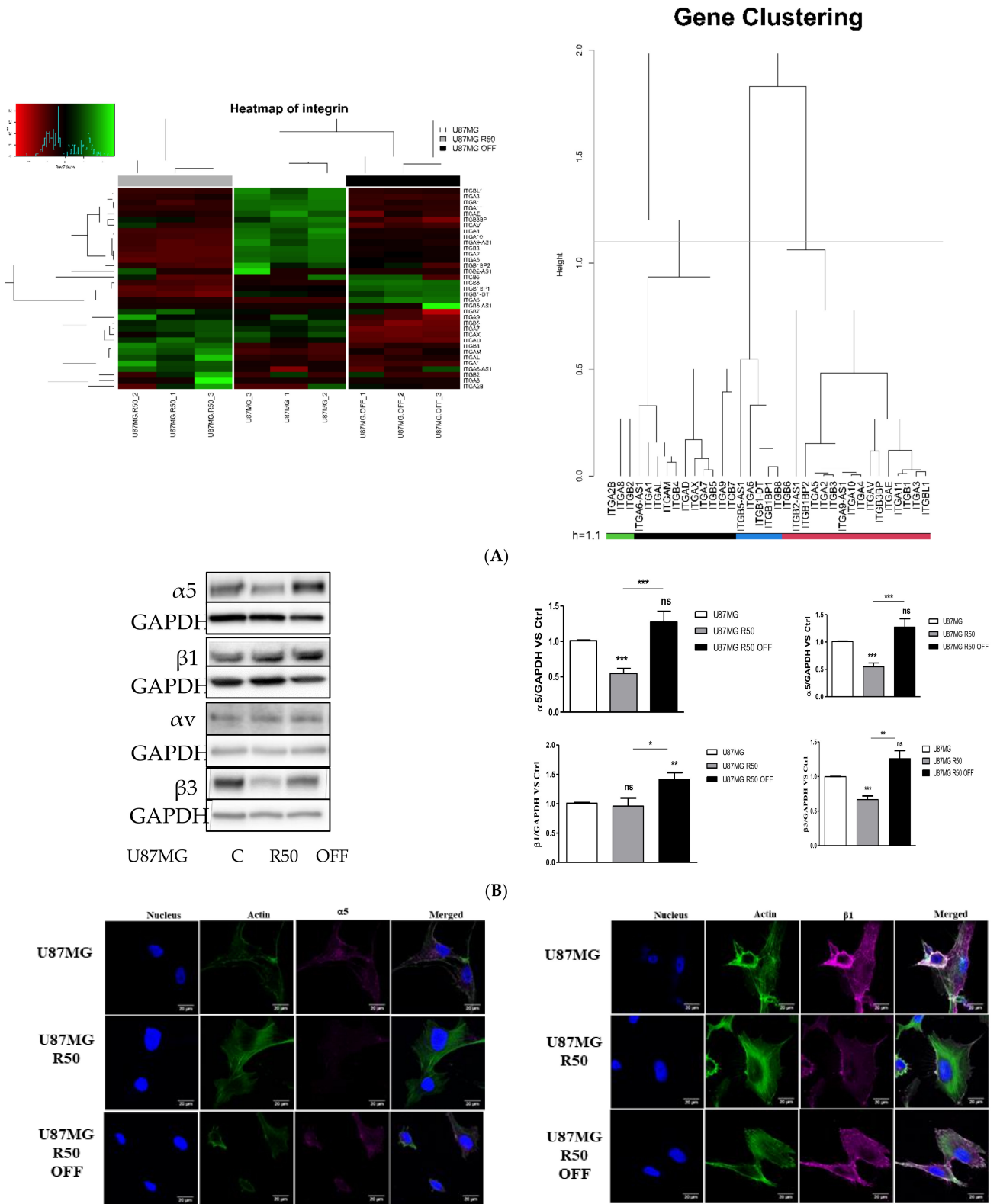


Figure 4. Cont.

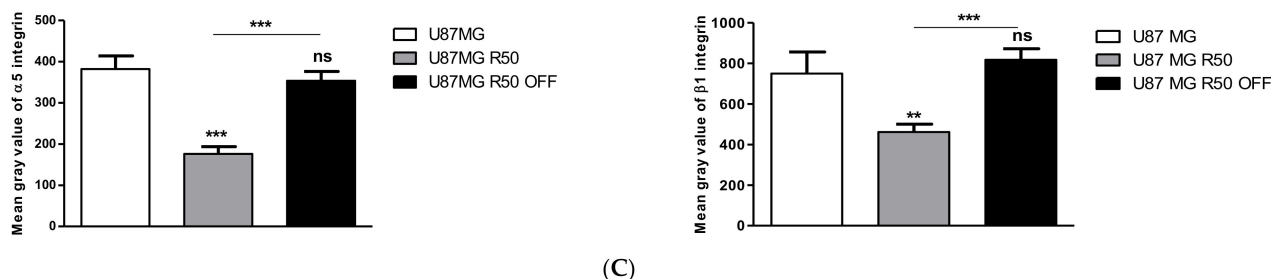
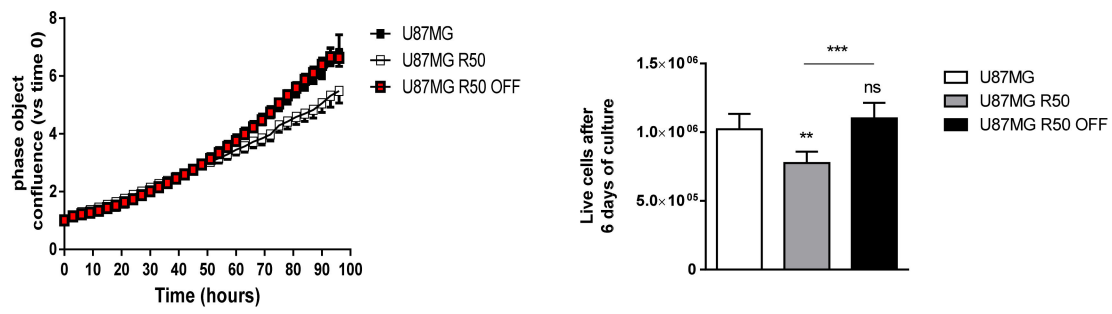


Figure 4. Integrin variations during TMZ treatment: (A) Heatmap visualization comparing expression of genes encoding integrins between samples with dendrogram to show clustering. Colour scale shows high and low expressions as green and red, respectively. (B) Representative Western blot analysis showing basal expression of $\alpha 5$, $\beta 1$, αv and $\beta 3$ integrins in U87MG R50 and U87MG R50 OFF cells compared to the parental cells. Histograms represent the mean \pm S.E.M. of three separate experiments, and GAPDH was used as the loading control. (C) Representative fluorescence confocal microscopy images and mean grey value of basal $\alpha 5$ and $\beta 1$ integrin subunits expression in TMZ-resistant U87MG R50 and U87MG R50 OFF cells compared to the parental cells. Scale bars: 20 μ m. Histograms represent mean \pm S.E.M. of three separate experiments. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ns, non-significant.

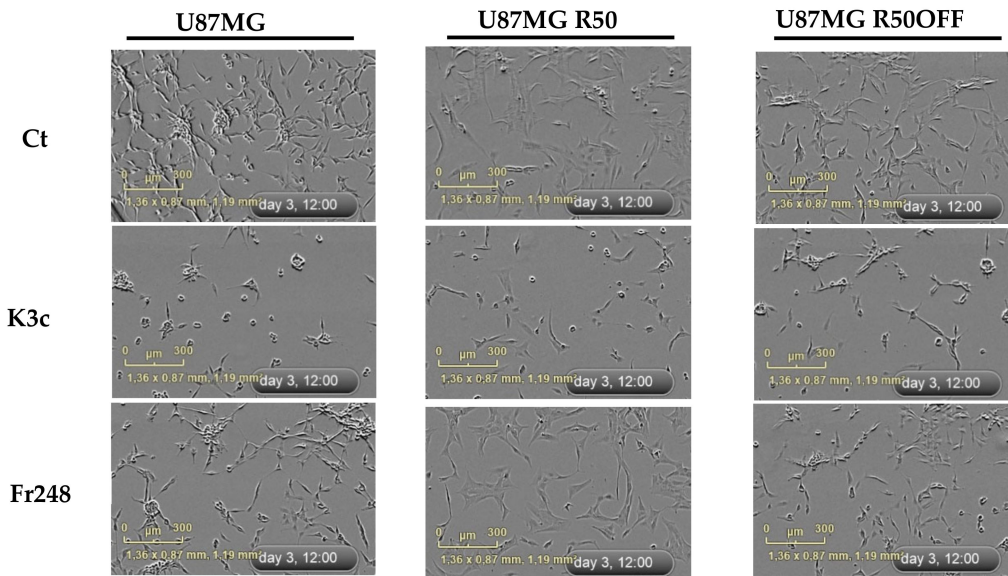
As we demonstrated previously that integrin $\alpha 5\beta 1$ is involved in TMZ resistance [30], we next focused on this integrin and examined its expression at the protein level in the parent and TMZ-resistant cells lines. By Western blot, we observed a clear decrease in the $\alpha 5$ subunit in U87MG R50 cells without a significant change in that of the $\beta 1$ subunit. Interestingly, the $\alpha 5$ integrin level increased after removal of TMZ in the U87MG R50 OFF cells, reaching those seen in non-treated cells without changes in the $\beta 1$ integrin level (Figure 4B). By contrast, the αv integrin level did not change between the three cell lines, although $\beta 3$ integrin expression followed those of $\alpha 5$ integrin, showing that both $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha v\beta 3$ integrins, which are largely involved in glioblastoma aggressiveness, were affected by Temozolomide treatment. As a confirmation we checked the expression changes of $\alpha 5\beta 1$ integrin by immunohistochemistry. As can be seen in Figure 4C, the expression of both $\alpha 5$ and $\beta 1$ integrins was reduced in U87MG R50 but reappeared after removal of TMZ in U87MG R50 OFF cells.

3.4. TMZ Affects Glioma Cell Proliferation and Migration through Modulation of $\alpha 5\beta 1$ Integrin

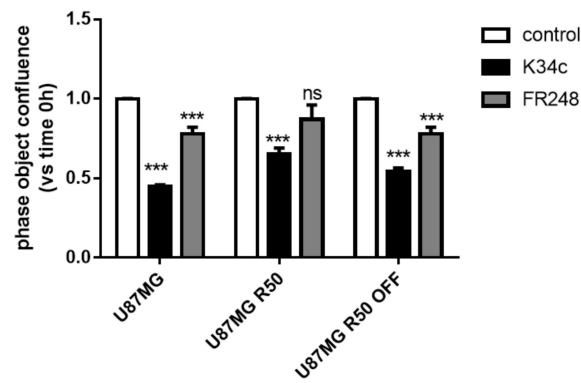
The capacity to fill the culture wells as well as the proliferation index was slightly decreased for U87MG R50 cells as compared to parental and U87MG R50 OFF cells (Figure 5A) presumably due, at least in part, to the decrease in integrins. To confirm the impact of $\alpha 5\beta 1$ integrin on proliferation, we used the integrin antagonists K34c and FR248, which are RGD-based peptidomimetics optimized for high affinity to $\alpha 5\beta 1$ integrin with a reduced affinity to $\alpha v\beta 3$ integrin. We already showed that both antagonists recognize $\alpha 5\beta 1$ integrin and inhibit glioma cell adhesion to fibronectin and cell migration [35]. As shown in Figure 5B, K34c proved able to decrease the cell adherence for all three cell lines, inhibiting the cell spreading and forming some sphere-like structures, particularly in U87MG and U87MG R50 OFF cells. FR248 is less efficient in inhibiting cell spreading than K34c and particularly ineffective in U87MG R50 cells. A quantification of cell confluence after 3 days of treatments confirmed these morphological observations (Figure 5C). FR248, which is slightly more selective than K34c for $\alpha 5\beta 1$, is inactive in U87MG R50 cells in accordance with the low level of $\alpha 5\beta 1$ integrin in these cells. The data suggest that U87MG and U87MG R50 OFF cells may be similarly sensitive to $\alpha 5\beta 1$ integrin antagonists at least for the inhibition of cell adherence and confluence.



(A)



(B)



(C)

Figure 5. Proliferation and effects of integrin antagonists on TMZ-resistant and parental cells: (A) (left). Cell confluence was calculated using IncuCyte Zoom software based on phase-contrast images of U87MG, U87MG R50 and U87MG R50 OFF cells from 0 h to 96 h. (right) Proliferation calculated as the number of viable cells after 6 days in culture compared to the number of plated cells at day 0. (B) Representative phase contrast images from the IncuCyte showing the cellular morphology of U87MG, U87MG R50 and U87MG R50 OFF cells 72 h post treatment with solvent, K34c (20 μ M) and Fr248 (20 μ M). Scale bar, 300 μ M. (C) Cell confluence was calculated using IncuCyte Zoom software based on phase-contrast images of U87MG, U87MG R50 and U87MG R50 OFF cells at 72 h post treatment. For all panels: mean \pm S.E.M. of at least three independent experiments with **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ns, non-significant.

Integrins are largely involved in glioma cell migration, as we have shown previously for $\alpha 5\beta 1$ integrin [33,34,43]. The capability of cell dispersion out of gliomaspheres in a

fibronectin-rich environment was then compared among the three cell lines. As shown in Figure 6, U87MG and U87MG R50 OFF cells were able to disseminate out of the spheres, but dissemination was blocked in U87MG R50 cells. This dissemination was clearly impacted by the expression of $\alpha 5\beta 1$ integrin as it was largely inhibited by K34c and FR248 at 20 μM (Figure 6) but also at 5 μM (Supplementary Figure S2) in U87MG and U87MG R50 OFF cells. TMZ acute treatment of U87MG and U87MG R50 OFF cells did not affect cell migration, nor did TMZ removal affect U87MG R50 cells (Supplementary Figure S3). Both cell lines were unable to migrate strongly on polylysine, a nonspecific substrate, as compared to fibronectin, the privileged ECM substrate of $\alpha 5\beta 1$ integrin (Supplementary Figure S4). The results show that TMZ-resistant U87MG R50 OFF cells recover their capacity not only to proliferate but also to migrate on a fibronectin-rich substrate.

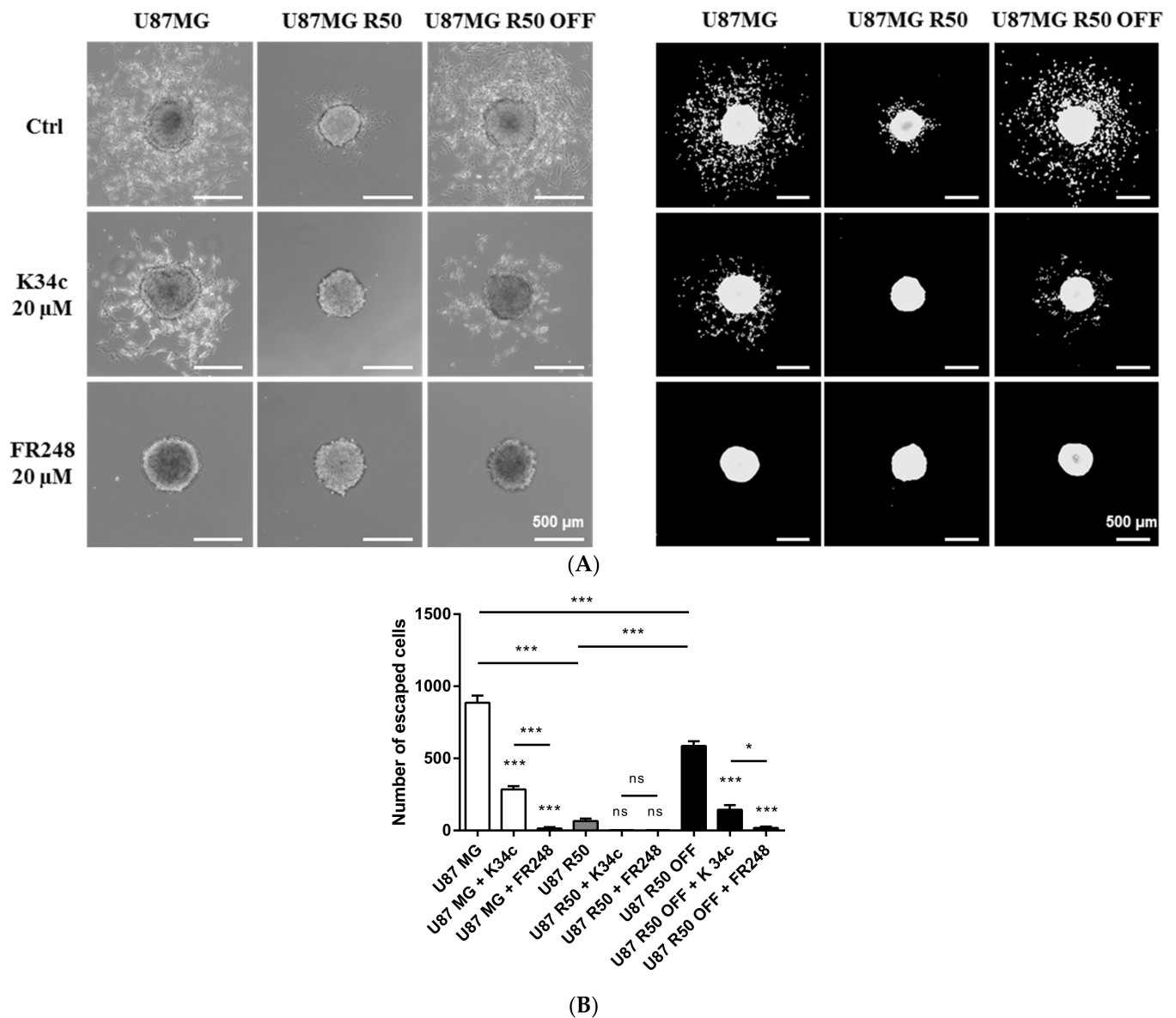


Figure 6. Cont.

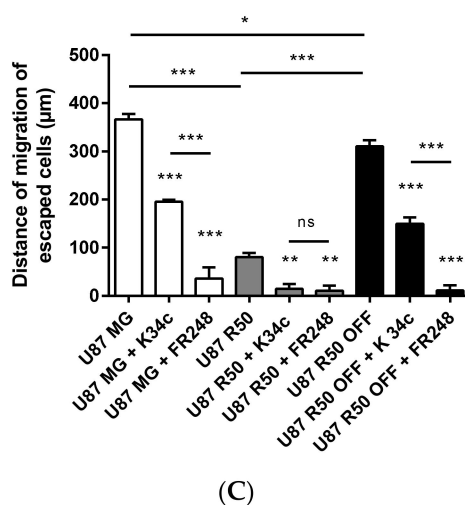


Figure 6. Cell evasion from spheroids and effects of integrin antagonists on TMZ-resistant and parental cells: (A) (left) Representative phase-contrast images of TMZ-resistant (U87MG R50 and U87MG R50 OFF) or parental cells spheroids after 18 h of migration and treatment with solvent, K34c 20 μ M or Fr248 20 μ M. Scale bars, 500 μ m. (right) Representative fluorescence images (DAPI staining) of TMZ-resistant (U87MG R50 and U87MG R50 OFF) or parental cells spheroids after 18 h of migration and treatment with solvent, K34c 20 μ M or Fr248 20 μ M. Scale bars, 500 μ m. (B) Analysis of the number of cells that migrated out of the spheroid and (C) analysis of the average distance of migration out of the spheroid for TMZ-resistant cells (U87MG R50 and U87MG R50 OFF) compared to parental cells, treated during 18 h with solvent, K34c 20 μ M or Fr248 20 μ M. Image analyses were performed with ImageJ software using a homemade plugin [43]. For all panels: mean \pm S.E.M. of at least three independent experiments with *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ns, non-significant.

3.5. p53 Signalling Pathway in U87MG and TMZ-Resistant Cells

TMZ is known to activate the p53 pathway. We checked p53 stabilisation and activation in the three cell lines in the basal conditions of the culture. In U87MG R50 cells as well as in the U87MG R50 OFF cells, p53 is stabilized, and its target genes MDM2 and p21 are both increased at the mRNA level in the former cell line but only MDM2 in the latter one (Figure 7A). These data are confirmed by the protein level of both p21 (see Figure 2B) and MDM2 (Figure 7A). MDM2 may thus be used as a target in these resistant cells. We considered three inhibitors of MDM2/p53 interactions already known to reactivate p53 signalling. The different molecules used were Nutlin-3a and Idasanutlin, which bind to the MDM2 part and RITA, which binds to the p53 part of the MDM2–p53 complex. As can be seen in Figure 7B, all three drugs enhanced the stability of p53 as well as its activation (shown by the increase in MDM2 protein). No differences could be observed between control U87MG cells and their TMZ-resistant counterparts as far as the activation of p53 is concerned. In these experiments, Idasanutlin was the most efficient activator of the p53 pathway, even at 0.1 μ M (a concentration 10 times lower than for Nutlin-3a and RITA), and RITA was less efficient after 24 h of treatment. The results suggest that TMZ-resistant cells may benefit from an alternative way to activate the p53 tumour suppressor pathway.

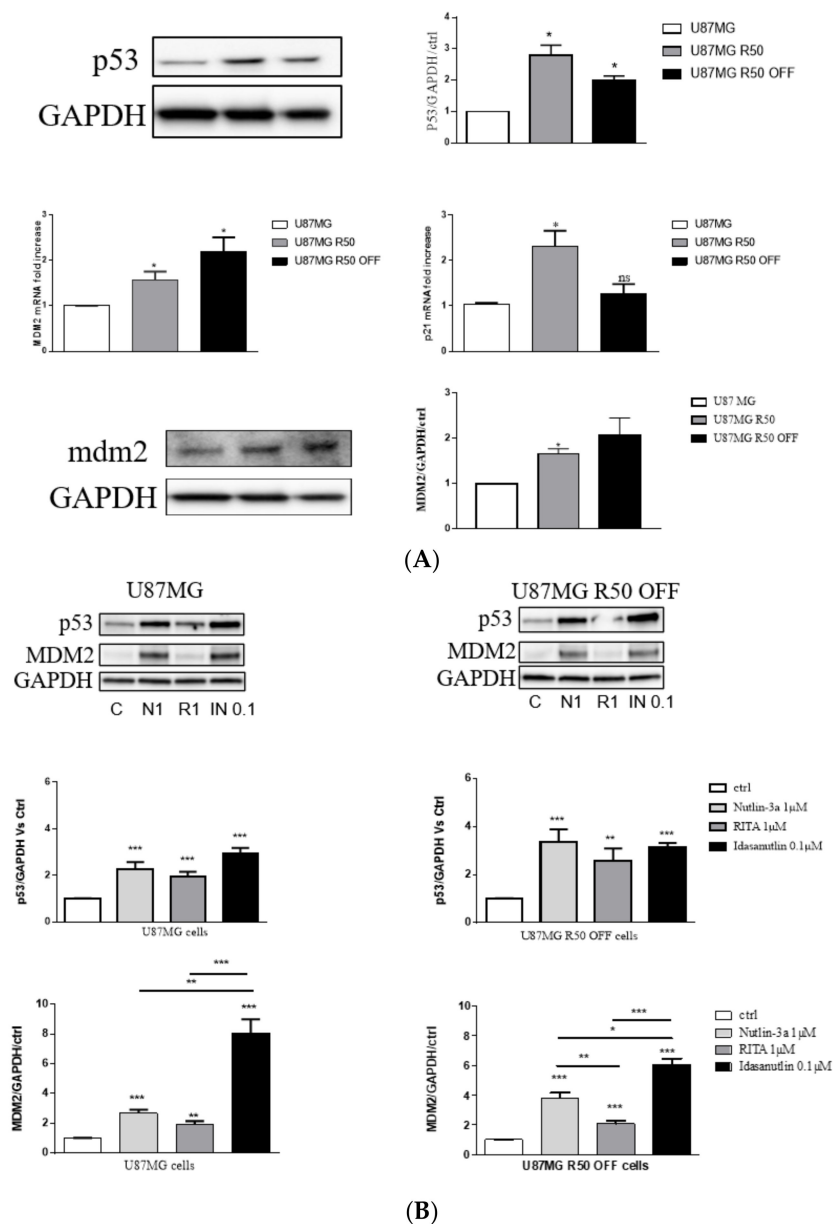


Figure 7. Modulation of the p53 pathway in U87MG, U87MG R50 and U87MG R50 OFF cells. (A) Representative Western blot of p53 (upper panel) and RT-qPCR analysis of p53 target genes mdm2 and p21 (middle panel) in U87MG R50 and U87MG R50 OFF compared to the parental cells. Representative Western blot of MDM2 is shown (lower panel) as well as the corresponding histograms. (B) Representative Western blot of p53 stabilisation and MDM2 expression 24 h post treatment with Nutlin-3a (1 μM/N1), RITA (1 μM/R1) and Idasanutlin (0.1 μM/IN 0.1) in U87MG R50 OFF cells compared to the parental cells. Histograms represent the mean ± S.E.M. of three separate experiments and GAPDH was used as the loading control. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ns, non-significant.

3.6. p53 Activation and Integrin Inhibition as a Therapeutic Option for TMZ-Resistant Cells

We described previously negative crosstalk between $\alpha 5\beta 1$ integrin and p53 signalling pathways implicated in the chemotherapy resistance of glioma cells. We showed that activating p53 concomitantly with inhibiting integrin $\alpha 5\beta 1$ led to an increase in p53 signalling in $\alpha 5$ integrin subunit overexpressing cells [39]. We thus wondered if similar results might be obtained in TMZ-resistant cells. We investigated the association of p53 activators Nutlin-3a and Idasanutlin with the two integrin antagonists on cell confluence. Data are

summarized in Table 2. As an example, results after 72h of treatment with Idasanutlin (0.1 μ M) in association with K34c (20 μ M) or FR248 (20 μ M) are shown in Figure 8A. In addition, the p53 signalling pathway appears over-activated in U87MG R50 OFF cells after the association of Idasanutlin with FR248 (Figure 8B).

Table 2. Summary of Incucyte experiment results at 3 days after treatment with the different drugs alone or in combination. Results are expressed as mean \pm s.e.m. of 3 to 5 independent experiments. * refers to statistical comparison between control and treatment and # comparison between combination therapies and each treatment alone. * and # are indicative of $p < 0.01$. ns = non significant.

Treatment	U87MG Cells	U87MG R50 OFF Cells	U87MG R50
Control	1	1	1
TMZ	0.57 ± 0.01 *	0.94 ± 0.02 ns	-
K34c	0.44 ± 0.01 *	0.54 ± 0.03 *	0.65 ± 0.04 *
FR248	0.78 ± 0.04 *	0.78 ± 0.04 *	0.86 ± 0.09 ns
Nutlin-3a	0.35 ± 0.01 *	0.42 ± 0.02 *	0.42 ± 0.01 *
Idasanutlin	0.52 ± 0.05 *	0.45 ± 0.02 *	-
Nutlin-3a + K34c	0.21 ± 0.01 * #	0.24 ± 0.01 * #	0.25 ± 0.008 * #
Nutlin-3a + FR248	0.28 ± 0.02 * #	0.33 ± 0.01 * #	0.37 ± 0.01 * ns
Idasanutlin + K34c	0.265 ± 0.005 * #	0.244 ± 0.007 * #	-
Idasanutlin + FR248	0.399 ± 0.005 * #	0.319 ± 0.009 * #	-

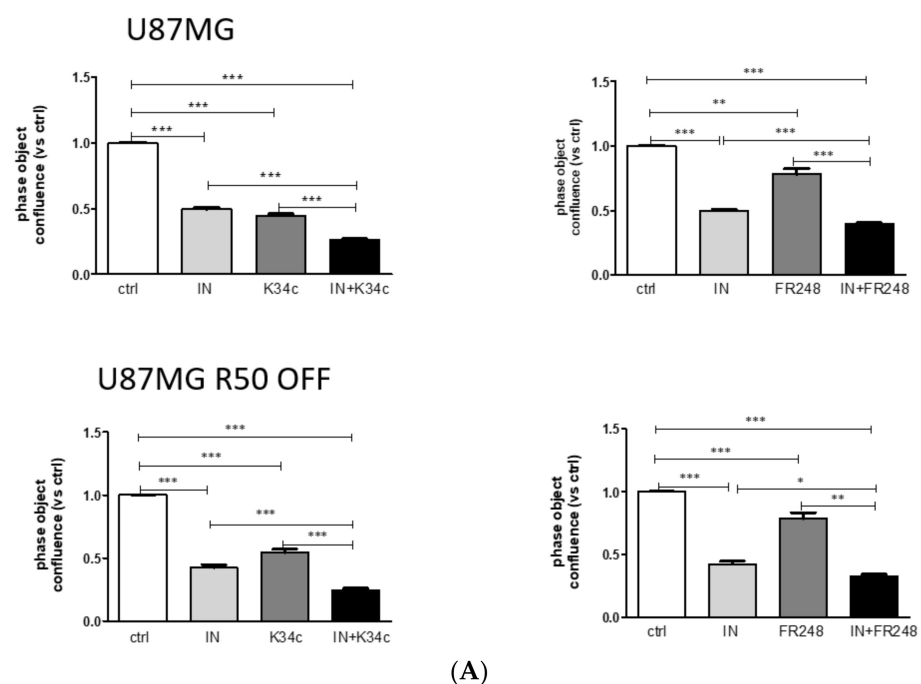


Figure 8. Cont.

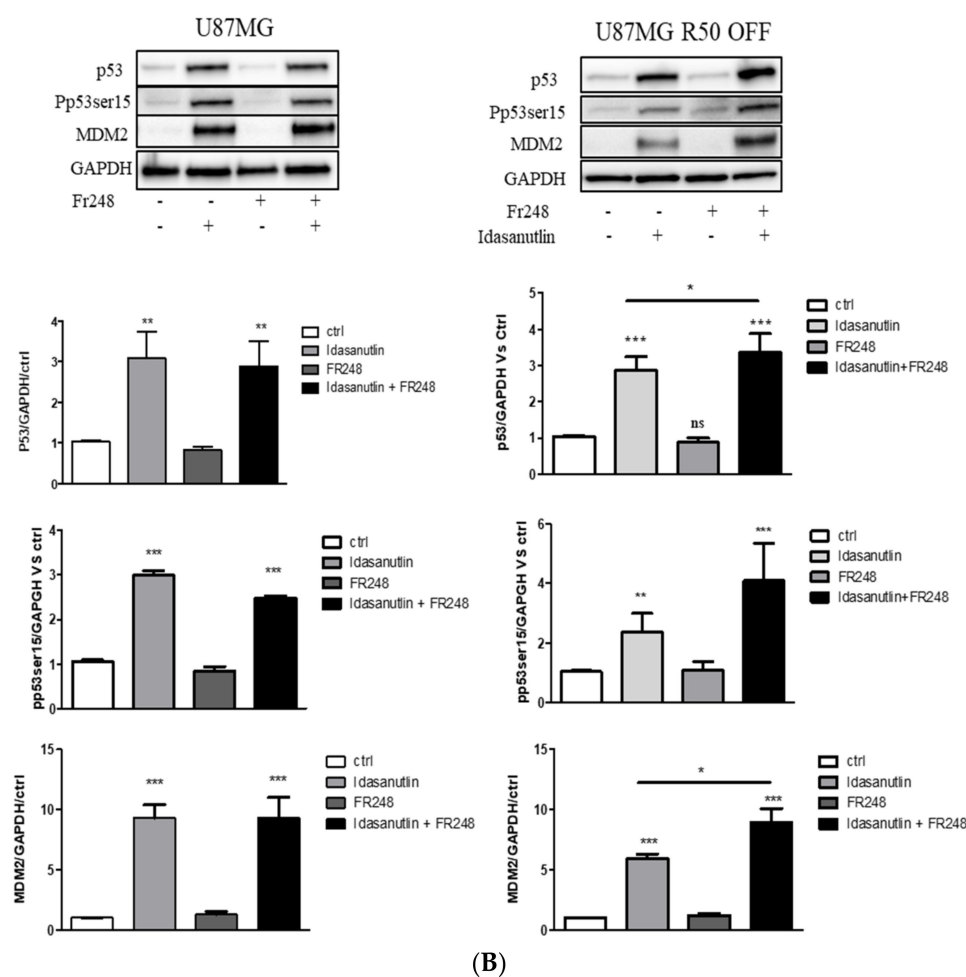


Figure 8. Effect of Idasanutlin and integrin antagonists on TMZ-resistant and parental cells. (A) Cell confluence was calculated using IncuCyte Zoom software based on phase-contrast images of U87MG and U87MG R50 OFF cells at 72 h after treatment with solvent, Idasanutlin (0.1 μ M), K34c (20 μ M) or FR248 (20 μ M) alone or in combination. (B) Representative Western blots of p53 stability and activity (phosphorylation at ser¹⁵) and the p53 target gene MDM2 expression in U87MG R50 OFF compared to the parental cells 24 h post treatment with Idasanutlin (0.1 μ M) and Fr248 (20 μ M) either separately or in combination. Histograms represent the mean \pm S.E.M. of three separate experiments with GAPDH as the loading control. For all panels: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ns, non-significant.

Compound **9** was described as a potent $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha v\beta 3$ integrin inhibitor coupled with an inhibitory activity on MDM2 and MDM4, thus combining the effects we were studying [42]. We thus checked the effect of compound **9** in our cell lines. It was highly effective in inhibiting cell confluence in both U87MG and U87MG R50 OFF, cells even at low doses with 50% inhibition around 0.6 μ M and profound changes on cell morphology, as shown in Figure 9A,B. Low doses of compound **9** (0.1 to 0.6 μ M) hardly affected U87MG cells that were knocked down for the $\alpha 5$ integrin gene by the CRISPR/Cas9 technology (U87MG $\alpha 5$ KO cells), confirming its capability to recognize this integrin (Supplementary Figure S5). Interestingly, in low doses, compound **9** (0.6 μ M) behaved as integrin inhibitor K34c treatment alone but in high doses (above 5 μ M), it had similar effects to the association of K34c with p53 activators in U87MG and U87MG R50 OFF cells (compare with Figure 8A). It seems that high doses are needed to activate p53 target genes (data not shown). The results suggest that compound **9** behaves as a strong inhibitor of naïve and TMZ-resistant U87MG cells through the concomitant inhibition of integrins and MDM2/MDM4.

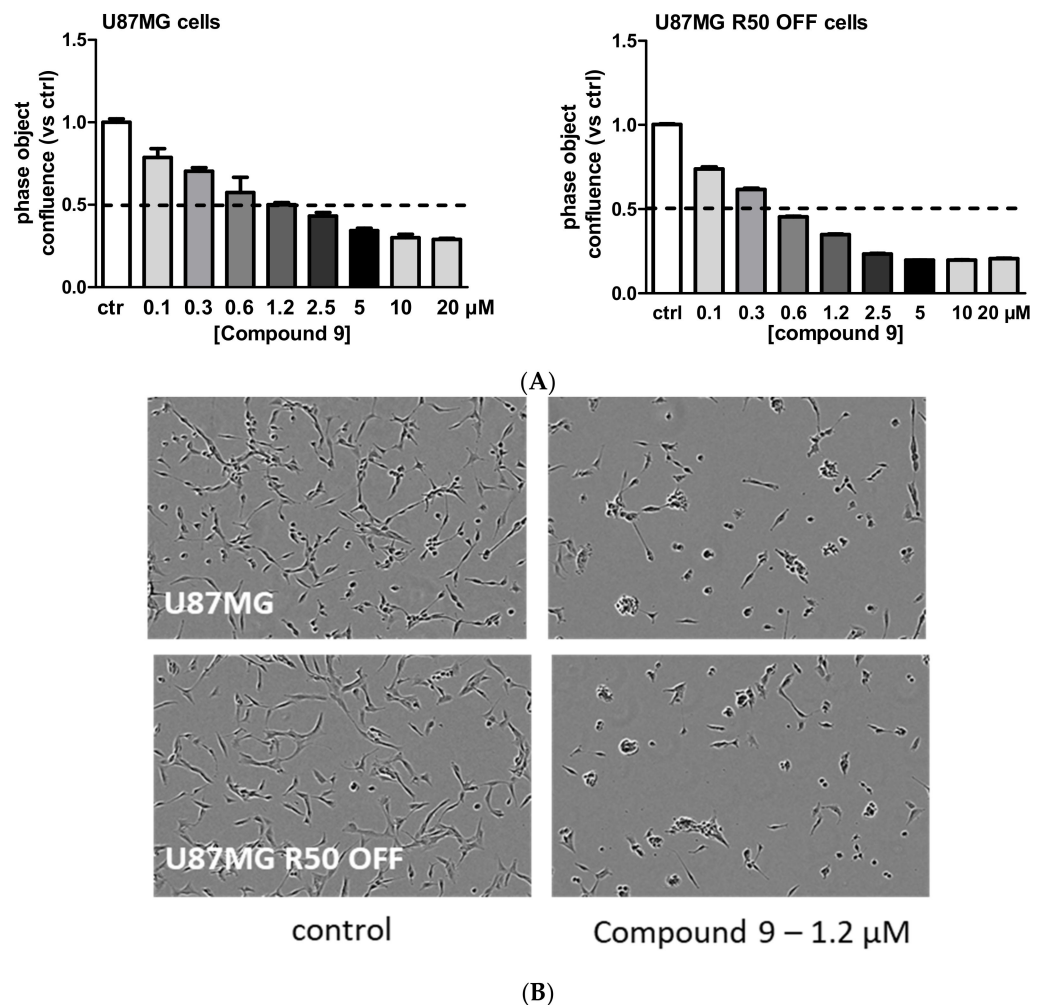


Figure 9. Effects of compound 9 on TMZ-resistant and parental cells: (A) Dose—response effects of compound 9 on cell confluence in U87MG and U87MG R50 OFF cells. (B) Representative phase contrast images from the IncuCyte showing the cellular morphology of U87MG and U87MG R50 OFF cells 72 h post treatment with compound 9 (1.2 μM). Histograms represents the mean ± S.E.M. of three separate experiments after 72 h treatment with TMZ or compound 9.

4. Discussion

Although TMZ is currently the only approved chemotherapeutic drug known to significantly improve the overall survival of GBM patients [47,48], the development of acquired TMZ resistance leading to treatment failure remains one of the challenges to be resolved. Numerous works aimed to understand intrinsic and acquired TMZ resistance and recent reviews dedicated to this topic are available [49,50]. It appears clear that a multifaceted view is to be considered related to the high molecular heterogeneity of GBM and the plasticity of GBM cells. A consensus already exists about the role of MGMT, through which epigenetic regulation (promoter methylation or demethylation) is involved in the clinical response to TMZ. However, GBM-expressing or non-expressing MGMT can develop resistance to TMZ. Acquired resistance was also often linked to DNA damage repair pathways leading to new therapeutic avenues [51].

In this work, we generated TMZ-resistant cells by subjecting U87MG cells to TMZ 50 μM treatment as an in vitro model of MGMT-negative TMZ resistance. We aimed to compare cells continuously grown in the presence of TMZ (U87MG R50) with resistant cells growing in the absence of TMZ (U87MG R50 OFF), using this last model as a reflection of clinical recurrence. We confirmed that U87MG cells were sensitive to TMZ, resulting in large percentage of cell death at the treatment, beginning with few cells remaining alive

but exhibiting hallmarks of senescence. Senescence is considered a favourable response to chemotherapy as it blocks tumoral cell proliferation. This view has been challenged as the irreversibility of drug-induced senescence remains under debate and the pro-tumorigenic properties of the senescent-associated secretory phenotype (SASP) are clearly demonstrated [52,53]. It has already been demonstrated that TMZ induces senescence rather than apoptosis in glioma cells [44,54,55]. In line with this, we demonstrated that the few U87MG cells that remained alive after one-week incubation with TMZ were all positive for SA- β GAL staining. In our experimental conditions, the regrowth of the few surviving cell population occurred in the presence of TMZ from these stained cells, suggesting that senescence was reversible, but this point remains to be confirmed. The regrowth of U87MG cells after TMZ treatment to obtain resistant cell populations is largely described in the literature. However, treatments followed different experimental procedures (with large variations in the chosen doses, duration of treatments, time of omics or phenotypic evaluations, etc . . .) that may result in different biological outcomes [50]. The characterization of TMZ-resistant cells was generally made at the endpoint of cell treatment rather than along the treatment protocol. Recently the development of resistance was studied in a glioma cell line. Interestingly, a transient state (from day 3 to 9 after treatment) defined by slow growth and morphological and metabolic changes was characterized. Resistant cells will emerge from these transient state cells [56]. The link with senescence has not been studied in this work.

In our work we aimed to analyse another step of the TMZ resistance, i.e., how resistant cells behave after removal of the drug, to gain an understand of what may happen in patients before or at the point of recurrence. To the best of our knowledge, the molecular and phenotypic characterization of resistant cells before and after removal of the drug has not been extensively studied. Interestingly, profound changes were observed between U87MG R50 cells and the non-treated cell, whereas U87MG R50 OFF cells showed more closely related characteristics to the control cells. One of the most affected pathways was, in both cases, extracellular matrix organization, including integrin expression level modifications. Interestingly, profound changes in ECM-receptor interactions were also noted in the response of the glioma to ionizing radiation [57]. The heatmap of integrins (Figure 4) revealed particular sets of integrins overexpressed in each cell line, suggesting that anti-integrin therapeutic options have to be considered in a timely manner during therapies. As an example, U87MG R50 OFF cells overexpress α 6 and β 8 integrins, both known to be glioma stem cell markers [36,45]. Accordingly, a dedifferentiation of differentiated cells towards glioma stem cells has been reported in tumours after radiotherapy or TMZ chemotherapy [58,59]. Specific anti- α 6 and/or β 8 integrin therapies may thus be used for recurrent as well as for primary tumours.

In this work we focused on RGD-integrins such as α 5 β 1 and α v β 3, as we demonstrated in previous studies that α 5 β 1 integrin is involved in TMZ resistance [30]. We found that continuous treatment with TMZ decreased the expression of α 5 β 1 integrin (as well as those of β 3), while recovery of expression was found after removal of the drug. Interestingly, phenotypic alterations (proliferation and migration) are coupled with the level of this integrin. These findings portray α 5 β 1 integrin as a promising target for recurrent GBM, as was proposed in studies examining bevacizumab-treated recurrent glioblastoma [37,60]. In our previous work [31], we showed that α 5 integrin expression in primary tumours was not impacted by their MGMT status. Whether this absence of a relationship remains recurring is currently not known and deserves further studies.

Beside integrin changes, resistant cell lines exhibit p53 pathway activation with a long-lasting increase in MDM2 expression. Restoration of the tumour-suppressor function of p53 by disrupting the MDM2-p53 protein-protein interaction is considered an attractive therapeutic strategy for GBM expressing p53 wild type. Combination therapy of TMZ with Nutlin 3a, an MDM2 antagonist, was already shown to enhance the survival of mice engrafted with a GBM cell line by activating p53 and downregulating DNA repair proteins [61]. Preclinical evaluation of RG7112, another MDM2 antagonist, showed a

reduced tumour growth of p53 wild-type patient-derived cell lines with the amplification of MDM2 [17]. The significant efficacy of this drug in a subset of non-MDM2-amplified models has also been observed. We show in this work that TMZ-resistant cells remain sensitive to MDM2 inhibitors and that the p53 pathway can be over-activated in these cells by three different drugs. Our previous results point out a negative crosstalk between $\alpha 5\beta 1$ integrin and p53 signalling pathways implicated in chemotherapy resistance of glioma cells. Activating p53 concomitantly with inhibiting integrin $\alpha 5\beta 1$ led to an increase in p53 signalling and glioma cell death in $\alpha 5$ integrin subunit-overexpressing cells [30,39]. We evaluated this strategy on the TMZ-resistant U87MG R50 OFF cells, which re-express the integrin. The results obtained in experiments associating Idasanutlin (the most efficient MDM2 antagonist) with FR248 (the most specific $\alpha 5\beta 1$ integrin antagonist) suggest that resistance to TMZ may be overcome by this strategy. The U87MG R50 OFF cell line appeared more sensitive than the non-treated cells, even if the expression of the $\alpha 5\beta 1$ integrin was similar between the two cell lines. We cannot exclude at this point that other molecular changes participate in this phenomenon, which deserves further studies. We thus propose a new therapeutic option for recurrent GBM expressing $\alpha 5\beta 1$ integrin: p53 activation along with inhibition of the integrin. This therapy may be achieved with a single molecule, compound **9**, which is able to target RGD-integrin-expressing cells and inhibit MDM2 at the same time [42]. We show here that this molecule is able to target U87MG and TMZ-resistant U87MG R50 OFF cells at lower concentrations than integrin antagonists, suggesting decreased potential side effects. Future works have to be carried out to more precisely investigate this compound, which may be very interesting to treat recurrent glioblastoma.

In conclusion, our work shows a huge impact of Temozolomide on the integrin repertoire of U87MG cells. The integrin expressions appear highly switchable during the course of temozolomide treatment. Specific integrins may be particularly targetable at different time points of glioblastoma treatment and combination therapies evaluated according to their time-dependent expression. Although confirmation in patient-derived cell lines and other preclinical models is needed, our data add new evidence that $\alpha 5\beta 1$ integrin has a role to play as a therapeutic target in recurrent glioblastoma.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers14020369/s1>, Figure S1: Dose-dependent effect of Temozolomide on the 3 cell lines, Figure S2: Cell evasion from spheroids and effects of low dose (5 μ M) of integrin antagonists on TMZ-resistant and parental cells, Figure S3: Temozolomide effect on cell migration. Figure S4: Cell evasion from spheroids on polylysine versus fibronectin Figure S5: Effect of compound **9** on U87MG- $\alpha 5$ integrin KO cells.

Author Contributions: Conceptualisation, N.E.-S., N.E.-W., S.M. and M.D.; Data curation, D.R.; Funding acquisition, N.E.-W., S.M. and M.D.; Investigation, S.S., N.P., M.M., C.B. and S.F.; Methodology, N.P. and D.R.; Project administration, N.E.-S., N.E.-W., S.M. and M.D.; Resources, Horst Kessler, L.M. and D.R.; Validation, S.S. and N.P.; Visualisation, S.S., N.P., M.M. and C.B.; Writing—original draft, S.S., N.P., N.E.-S., H.K., L.M., S.F., S.M., D.R. and M.D.; Writing—review and editing, S.S., N.E.-S., L.M., S.M. and M.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: We are thankful for financial support from Institut National du Cancer (grant INCA_11527), Ligue contre le Cancer (CCIR Est), ITI Innovec (IdEx (ANR-10-IDEX-0002), SFRI (ANR-20-SFRI-0012)), Association pour la Recherche contre le Cancer, from the CNRS through the 80|Prime program, the University of Strasbourg (France), the Alex Akwueme Federal University Ndufu-Alike Ikwo (Nigeria), the Associations-charities Lyons Club de Niederbronn Les Bains, Franck Rayon de Soleil and Life Pink.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: RNAseq data will be available after request to the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors have no conflict of interest to declare.

References

1. Geraldo, L.H.M.; Garcia, C.; da Fonseca, A.C.C.; Dubois, L.G.F.; de Sampaio e Spohr, T.C.L.; Matias, D.; de Camargo Magalhães, E.S.; do Amaral, R.F.; da Rosa, B.G.; Grimaldi, I.; et al. Glioblastoma Therapy in the Age of Molecular Medicine. *Trends Cancer* **2019**, *5*, 46–65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Omuro, A. Glioblastoma and Other Malignant Gliomas: A Clinical Review. *JAMA* **2013**, *310*, 1842. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Stupp, R.; Weller, M.; Belanger, K.; Bogdahn, U.; Ludwin, S.K.; Lacombe, D.; Mirimanoff, R.O. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *10*, 987–996. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Cruz Da Silva, E.; Mercier, M.-C.; Etienne-Selloum, N.; Dontenwill, M.; Choulier, L. A Systematic Review of Glioblastoma-Targeted Therapies in Phases II, III, IV Clinical Trials. *Cancers* **2021**, *13*, 1795. [[CrossRef](#)]
5. Khaddour, K.; Johanns, T.; Anstas, G. The Landscape of Novel Therapeutics and Challenges in Glioblastoma Multiforme: Contemporary State and Future Directions. *Pharmaceuticals* **2020**, *13*, 389. [[CrossRef](#)]
6. Hotchkiss, K.M.; Sampson, J.H. Temozolomide Treatment Outcomes and Immunotherapy Efficacy in Brain Tumor. *J. Neurooncol.* **2020**, *151*, 55–62. [[CrossRef](#)]
7. Park, C.-K.; Kim, J.E.; Kim, J.Y.; Song, S.W.; Kim, J.W.; Choi, S.H.; Kim, T.M.; Lee, S.-H.; Kim, I.H.; Park, S.-H. The Changes in MGMT Promoter Methylation Status in Initial and Recurrent Glioblastomas. *Transl. Oncol.* **2012**, *5*, 393–397. [[CrossRef](#)]
8. Grombacher, T.; Eichhorn, U.; Kaina, B. P53 Is Involved in Regulation of the DNA Repair Gene O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase (MGMT) by DNA Damaging Agents. *Oncogene* **1998**, *17*, 845–851. [[CrossRef](#)]
9. Harris, L.C.; Remack, J.S.; Houghton, P.J.; Brent, T.P. Wild-Type P53 Suppresses Transcription of the Human O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase Gene. *Cancer Res.* **1996**, *56*, 2029–2032.
10. Brennan, C.W.; Verhaak, R.G.W.; McKenna, A.; Campos, B.; Nounshmehr, H.; Salama, S.R.; Zheng, S.; Chakravarty, D.; Sanborn, J.Z.; Berman, S.H.; et al. The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma. *Cell* **2013**, *155*, 462–477. [[CrossRef](#)]
11. Verhaak, R.G.W.; Hoadley, K.A.; Purdom, E.; Wang, V.; Qi, Y.; Wilkerson, M.D.; Miller, C.R.; Ding, L.; Golub, T.; Mesirov, J.P.; et al. Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* **2010**, *17*, 98–110. [[CrossRef](#)]
12. Crespo, I.; Vital, A.L.; Gonzalez-Tablas, M.; del Carmen Patino, M.; Otero, A.; Lopes, M.C.; de Oliveira, C.; Domingues, P.; Orfao, A.; Taberner, M.D. Molecular and Genomic Alterations in Glioblastoma Multiforme. *Am. J. Pathol.* **2015**, *185*, 1820–1833. [[CrossRef](#)]
13. England, B.; Huang, T.; Karsy, M. Current Understanding of the Role and Targeting of Tumor Suppressor P53 in Glioblastoma Multiforme. *Tumor Biol.* **2013**, *34*, 2063–2074. [[CrossRef](#)]
14. Vassilev, L.T. In Vivo Activation of the P53 Pathway by Small-Molecule Antagonists of MDM2. *Science* **2004**, *303*, 844–848. [[CrossRef](#)]
15. Her, N.-G.; Oh, J.-W.; Oh, Y.J.; Han, S.; Cho, H.J.; Lee, Y.; Ryu, G.H.; Nam, D.-H. Potent Effect of the MDM2 Inhibitor AMG232 on Suppression of Glioblastoma Stem Cells. *Cell Death Dis.* **2018**, *9*, 792. [[CrossRef](#)]
16. Reifemberger, G.; Liu, L.; Ichimura, K.; Schmidt, E.E.; Collins, V.P. Amplification and Overexpression of the MDM2 Gene in a Subset of Human Malignant Gliomas without P53 Mutations. *Cancer Res.* **1993**, *53*, 2736–2739.
17. Verreault, M.; Schmitt, C.; Goldwirt, L.; Pelton, K.; Haidar, S.; Levasseur, C.; Guehennec, J.; Knoff, D.; Labussiere, M.; Marie, Y.; et al. Preclinical Efficacy of the MDM2 Inhibitor RG7112 in MDM2-Amplified and TP53 Wild-Type Glioblastomas. *Clin. Cancer Res.* **2016**, *22*, 1185–1196. [[CrossRef](#)]
18. Berberich, A.; Kessler, T.; Thomé, C.M.; Pusch, S.; Hielscher, T.; Sahm, F.; Oezen, I.; Schmitt, L.-M.; Ciprut, S.; Hucke, N.; et al. Targeting Resistance against the MDM2 Inhibitor RG7388 in Glioblastoma Cells by the MEK Inhibitor Trametinib. *Clin. Cancer Res.* **2019**, *25*, 253–265. [[CrossRef](#)]
19. Fishlock, D.; Diodone, R.; Hildbrand, S.; Kuhn, B.; Mössner, C.; Peters, C.; Rege, P.D.; Rimmler, G.; Schantz, M. Efficient Industrial Synthesis of the MDM2 Antagonist Idasanutlin via a Cu(I)-Catalyzed [3+2] Asymmetric Cycloaddition. *Chim. Int. J. Chem.* **2018**, *72*, 492–500. [[CrossRef](#)]
20. Nieberler, M.; Reuning, U.; Reichart, F.; Notni, J.; Wester, H.-J.; Schwaiger, M.; Weinmüller, M.; Räder, A.; Steiger, K.; Kessler, H. Exploring the Role of RGD-Recognizing Integrins in Cancer. *Cancers* **2017**, *9*, 116. [[CrossRef](#)]
21. Ludwig, B.S.; Kessler, H.; Kossatz, S.; Reuning, U. RGD-Binding Integrins Revisited: How Recently Discovered Functions and Novel Synthetic Ligands (Re-)Shape an Ever-Evolving Field. *Cancers* **2021**, *13*, 1711. [[CrossRef](#)]
22. Su, C.; Li, J.; Zhang, L.; Wang, H.; Wang, F.; Tao, Y.; Wang, Y.; Guo, Q.; Li, J.; Liu, Y.; et al. The Biological Functions and Clinical Applications of Integrins in Cancers. *Front. Pharmacol.* **2020**, *11*, 579068. [[CrossRef](#)]
23. 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. Interest of Integrins Targeting in Glioblastoma According to Tumor Heterogeneity and Cancer Stem Cell Paradigm: An Update. *Oncotarget* **2017**, *8*, 86947–86968. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Blandin, A.-F.; Renner, G.; Lehmann, M.; Lelong-Rebel, I.; Martin, S.; Dontenwill, M. B1 Integrins as Therapeutic Targets to Disrupt Hallmarks of Cancer. *Front. Pharmacol.* **2015**, *6*, 279. [[CrossRef](#)]
25. Mas-Moruno, C.; Rechenmacher, F.; Kessler, H. Cilengitide: The First Anti-Angiogenic Small Molecule Drug Candidate. Design, Synthesis and Clinical Evaluation. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2010**, *10*, 753–768. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. 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. 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**, *15*, 1100–1108. [[CrossRef](#)]
27. Tucci, M.; Stucci, S.; Silvestris, F. Does Cilengitide Deserve Another Chance? *Lancet Oncol.* **2014**, *15*, e584–e585. [[CrossRef](#)]
28. Ellert-Miklaszewska, A.; Poleszak, K.; Pasierbinska, M.; Kaminska, B. Integrin Signaling in Glioma Pathogenesis: From Biology to Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 888. [[CrossRef](#)]
29. Holmes, K.M.; Annala, M.; Chua, C.Y.X.; Dunlap, S.M.; Liu, Y.; Hugen, N.; Moore, L.M.; Cogdell, D.; Hu, L.; Nykter, M.; et al. Insulin-like Growth Factor-Binding Protein 2-Driven Glioma Progression Is Prevented by Blocking a Clinically Significant Integrin, Integrin-Linked Kinase, and NF- κ B Network. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 3475–3480. [[CrossRef](#)]
30. Janouskova, H.; Maglott, A.; Leger, D.Y.; Bossert, C.; Noulet, F.; Guerin, E.; Guenot, D.; Pinel, S.; Chastagner, P.; Plenat, F.; et al. Integrin $\alpha 5 \beta 1$ Plays a Critical Role in Resistance to Temozolomide by Interfering with the P53 Pathway in High-Grade Glioma. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 3463–3470. [[CrossRef](#)]
31. Etienne-Selloum, N.; Prades, J.; Bello-Roufai, D.; Boone, M.; Sevestre, H.; Trudel, S.; Caillet, P.; Coutte, A.; Desenclos, C.; Constans, J.-M.; et al. Expression Analysis of A5 Integrin Subunit Reveals Its Upregulation as a Negative Prognostic Biomarker for Glioblastoma. *Pharmaceuticals* **2021**, *14*, 882. [[CrossRef](#)]
32. Schaffner, F.; Ray, A.; Dontenwill, M. Integrin A5 $\beta 1$, the Fibronectin Receptor, as a Pertinent Therapeutic Target in Solid Tumors. *Cancers* **2013**, *5*, 27–47. [[CrossRef](#)]
33. Renner, G.; Noulet, F.; Mercier, M.-C.; Choulier, L.; Etienne-Selloum, N.; Gies, J.-P.; Lehmann, M.; Lelong-Rebel, I.; Martin, S.; Dontenwill, M. Expression/Activation of A5 $\beta 1$ Integrin Is Linked to the β -Catenin Signaling Pathway to Drive Migration in Glioma Cells. *Oncotarget* **2016**, *7*, 62194–62207. [[CrossRef](#)]
34. Ray, A.-M.; Schaffner, F.; Janouskova, H.; Noulet, F.; Rognan, D.; Lelong-Rebel, I.; Choulier, L.; Blandin, A.-F.; Lehmann, M.; Martin, S.; et al. Single Cell Tracking Assay Reveals an Opposite Effect of Selective Small Non-Peptidic A5 $\beta 1$ or Av $\beta 3$ /B5 Integrin Antagonists in U87MG Glioma Cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA Gen. Subj.* **2014**, *1840*, 2978–2987. [[CrossRef](#)]
35. Dudvarski Stanković, N.; Bicker, F.; Keller, S.; Jones, D.T.; Harter, P.N.; Kienzle, A.; Gillmann, C.; Arnold, P.; Golebiewska, A.; Keunen, O.; et al. EGFL7 Enhances Surface Expression of Integrin $\alpha 5 \beta 1$ to Promote Angiogenesis in Malignant Brain Tumors. *EMBO Mol. Med.* **2018**, *10*, e8420. [[CrossRef](#)]
36. Malric, L.; Monferran, S.; Delmas, C.; Arnauduc, F.; Dahan, P.; Boyrie, S.; Deshors, P.; Lubrano, V.; Da Mota, D.F.; Gilhodes, J.; et al. Inhibiting Integrin B8 to Differentiate and Radiosensitize Glioblastoma-Initiating Cells. *Mol. Cancer Res.* **2019**, *17*, 384–397. [[CrossRef](#)]
37. DeLay, M.; Jahangiri, A.; Carbonell, W.S.; Hu, Y.-L.; Tsao, S.; Tom, M.W.; Paquette, J.; Tokuyasu, T.A.; Aghi, M.K. Microarray Analysis Verifies Two Distinct Phenotypes of Glioblastomas Resistant to Antiangiogenic Therapy. *Clin. Cancer Res.* **2012**, *18*, 2930–2942. [[CrossRef](#)]
38. Martin, S.; Janouskova, H.; Dontenwill, M. Integrins and P53 Pathways in Glioblastoma Resistance to Temozolomide. *Front. Oncol.* **2012**, *2*, 157. [[CrossRef](#)]
39. Renner, G.; Janouskova, H.; Noulet, F.; Koenig, V.; Guerin, E.; Bär, S.; Nuesch, J.; Rechenmacher, F.; Neubauer, S.; Kessler, H.; et al. Integrin A5 $\beta 1$ and P53 Convergent Pathways in the Control of Anti-Apoptotic Proteins PEA-15 and Survivin in High-Grade Glioma. *Cell Death Differ.* **2016**, *23*, 640–653. [[CrossRef](#)]
40. Heckmann, D.; Meyer, A.; Laufer, B.; Zahn, G.; Stragies, R.; Kessler, H. Rational Design of Highly Active and Selective Ligands for the A5 $\beta 1$ Integrin Receptor. *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1397–1407. [[CrossRef](#)]
41. Rechenmacher, F.; Neubauer, S.; Polleux, J.; Mas-Moruno, C.; De Simone, M.; Cavalcanti-Adam, E.A.; Spatz, J.P.; Fässler, R.; Kessler, H. Functionalizing Av $\beta 3$ - or A5 $\beta 1$ -Selective Integrin Antagonists for Surface Coating: A Method to Discriminate Integrin Subtypes In Vitro. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 1572–1575. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Merlino, F.; Daniele, S.; La Pietra, V.; Di Maro, S.; Di Leva, F.S.; Brancaccio, D.; Tomassi, S.; Giuntini, S.; Cerofolini, L.; Fragai, M.; et al. Simultaneous Targeting of RGD-Integrins and Dual Murine Double Minute Proteins in Glioblastoma Multiforme. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 4791–4809. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. 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. Glioma Cell Dispersion Is Driven by A5 Integrin-Mediated Cell–Matrix and Cell–Cell Interactions. *Cancer Lett.* **2016**, *376*, 328–338. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Aasland, D.; Götzinger, L.; Hauck, L.; Berte, N.; Meyer, J.; Effenberger, M.; Schneider, S.; Reuber, E.E.; Roos, W.P.; Tomicic, M.T.; et al. Temozolomide Induces Senescence and Repression of DNA Repair Pathways in Glioblastoma Cells via Activation of ATR–CHK1, P21, and NF- κ B. *Cancer Res.* **2019**, *79*, 99–113. [[CrossRef](#)]
45. Lathia, J.D.; Gallagher, J.; Heddleston, J.M.; Wang, J.; Eyler, C.E.; MacSwords, J.; Wu, Q.; Vasanji, A.; McLendon, R.E.; Hjelmeland, A.B.; et al. Integrin Alpha 6 Regulates Glioblastoma Stem Cells. *Cell Stem Cell* **2010**, *6*, 421–432. [[CrossRef](#)]
46. 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.; et al. Glioblastoma Stem Cells Exploit the Av $\beta 8$ Integrin-TGF $\beta 1$ Signaling Axis to Drive Tumor Initiation and Progression. *Oncogene* **2017**, *36*, 6568–6580. [[CrossRef](#)]
47. Stupp, R.; Hegi, M.E.; Mason, W.P.; van den Bent, M.J.; Taphoorn, M.J.; Janzer, R.C.; Ludwin, S.K.; Allgeier, A.; Fisher, B.; Belanger, K.; 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. [[CrossRef](#)]

48. Fisher, J.P.; Adamson, D.C. Current FDA-Approved Therapies for High-Grade Malignant Gliomas. *Biomedicines* **2021**, *9*, 324. [[CrossRef](#)]
49. Ortiz, R.; Perazzoli, G.; Cabeza, L.; Jiménez-Luna, C.; Luque, R.; Prados, J.; Melguizo, C. Temozolomide: An Updated Overview of Resistance Mechanisms, Nanotechnology Advances and Clinical Applications. *Curr. Neuropharmacol.* **2021**, *19*, 513–537. [[CrossRef](#)]
50. Lee, S.Y. Temozolomide Resistance in Glioblastoma Multiforme. *Genes Dis.* **2016**, *3*, 198–210. [[CrossRef](#)]
51. Lang, F.; Liu, Y.; Chou, F.-J.; Yang, C. Genotoxic Therapy and Resistance Mechanism in Gliomas. *Pharmacol. Ther.* **2021**, *228*, 107922. [[CrossRef](#)]
52. Faget, D.V.; Ren, Q.; Stewart, S.A. Unmasking Senescence: Context-Dependent Effects of SASP in Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2019**, *19*, 439–453. [[CrossRef](#)]
53. Putavet, D.A.; de Keizer, P.L.J. Residual Disease in Glioma Recurrence: A Dangerous Liaison with Senescence. *Cancers* **2021**, *13*, 1560. [[CrossRef](#)]
54. Martinkova, E.; Maglott, A.; Leger, D.Y.; Bonnet, D.; Stiborova, M.; Takeda, K.; Martin, S.; Dontenwill, M. A5β1 Integrin Antagonists Reduce Chemotherapy-Induced Premature Senescence and Facilitate Apoptosis in Human Glioblastoma Cells. *Int. J. Cancer* **2010**, *127*, 1240–1248. [[CrossRef](#)]
55. Li, L.; Hu, Y.; Ylivinkka, I.; Li, H.; Chen, P.; Keski-Oja, J.; Hyytiäinen, M. NETRIN-4 Protects Glioblastoma Cells FROM Temozolomide Induced Senescence. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e80363. [[CrossRef](#)]
56. Rabé, M.; Dumont, S.; Álvarez-Arenas, A.; Janati, H.; Belmonte-Beitia, J.; Calvo, G.F.; Thibault-Carpentier, C.; Séry, Q.; Chauvin, C.; Joalland, N.; et al. Identification of a Transient State during the Acquisition of Temozolomide Resistance in Glioblastoma. *Cell Death Dis.* **2020**, *11*, 19. [[CrossRef](#)]
57. Serafim, R.B.; da Silva, P.; Cardoso, C.; Di Cristofaro, L.F.M.; Netto, R.P.; de Almeida, R.; Navegante, G.; Storti, C.B.; de Sousa, J.F.; de Souza, F.C.; et al. Expression Profiling of Glioblastoma Cell Lines Reveals Novel Extracellular Matrix-Receptor Genes Correlated with the Responsiveness of Glioma Patients to Ionizing Radiation. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 668090. [[CrossRef](#)]
58. Auffinger, B.; Tobias, A.L.; Han, Y.; Lee, G.; Guo, D.; Dey, M.; Lesniak, M.S.; Ahmed, A.U. Conversion of Differentiated Cancer Cells into Cancer Stem-like Cells in a Glioblastoma Model after Primary Chemotherapy. *Cell Death Differ.* **2014**, *21*, 1119–1131. [[CrossRef](#)]
59. 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. [[CrossRef](#)]
60. Carbonell, W.S.; DeLay, M.; Jahangiri, A.; Park, C.C.; Aghi, M.K. B1 Integrin Targeting Potentiates Antiangiogenic Therapy and Inhibits the Growth of Bevacizumab-Resistant Glioblastoma. *Cancer Res.* **2013**, *73*, 3145–3154. [[CrossRef](#)]
61. Wang, H.; Cai, S.; Bailey, B.J.; Reza Saadatzaheh, M.; Ding, J.; Tonsing-Carter, E.; Georgiadis, T.M.; Zachary Gunter, T.; Long, E.C.; Minto, R.E.; et al. Combination Therapy in a Xenograft Model of Glioblastoma: Enhancement of the Antitumor Activity of Temozolomide by an MDM2 Antagonist. *J. Neurosurg.* **2017**, *126*, 446–459. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

II. Résultats supplémentaires (suite publication 2)

1. Introduction

Les données présentées dans cette publication ont toutes été obtenues *in vitro*. Mes travaux ont alors été consacrés à les confirmer *in vivo* en utilisant des xénogreffes des 3 lignées en conditions hétérotopiques et orthotopiques. Mon expertise dans la technique TEP a été mise à profit pour suivre les tumeurs de façon non invasive pour les xénogreffes orthotopiques. D'après les résultats obtenus *in vitro*, l'hypothèse de départ était de confirmer une croissance rapide des tumeurs obtenues par injection des cellules U87MG et U87MG OFF (exprimant toutes deux l'intégrine $\alpha 5\beta 1$) et une croissance plus lente des tumeurs obtenues par injection des cellules U87MG R50. Les données transcriptomiques de ces 3 lignées cellulaires ont également été appliquées au réseau du Pr. Elati (détaillé dans la 1^{ère} partie) pour vérifier certaines observations du réseau de régulateurs.

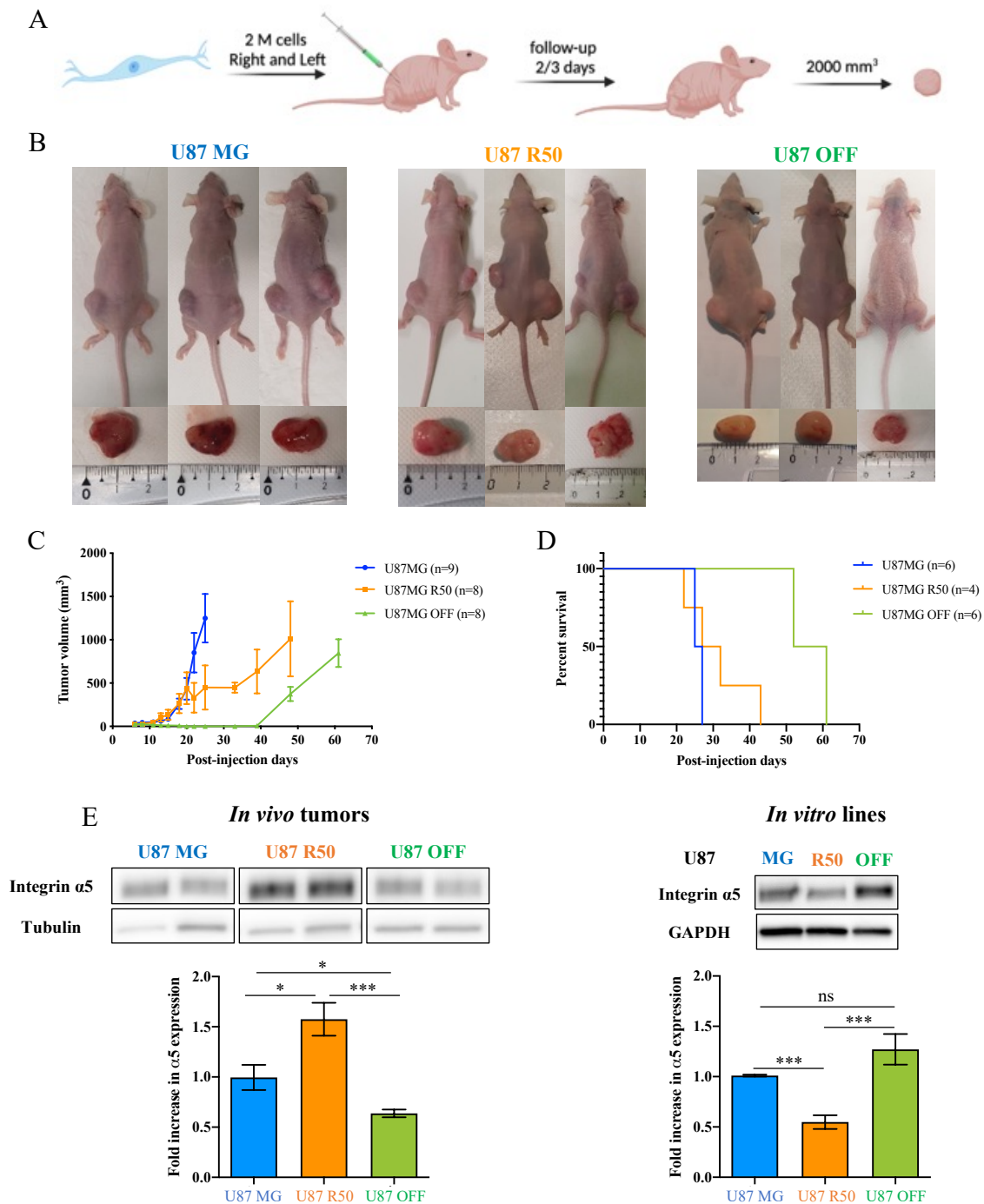


Figure 29 : Évaluation de la croissance tumorale *in vivo* par xénogreffe hétérotopique.

A – Protocole suivi pour l'expérience. Deux millions de cellules ont été injectées sur le flanc droit et gauche de chaque souris puis les souris ont été suivies tous les deux à trois jours par semaine. Les souris ont été sacrifiées lorsqu'elles ont atteint leurs points limites (perte de poids et/ou 2000 mm³ pour la taille de la tumeur). B – Photos des souris après sacrifice ainsi que des tumeurs sous-cutanées récupérées. C – Représentation graphique du volume tumorale en mm³ en fonction des jours post injection. D – Courbe de survie en fonction des jours post injection. E – Analyse de l'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ par western blot. L'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ a été évaluée dans les tumeurs sous-cutanées vs dans les différentes lignées de cellules U87. Les quantifications de l'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ a été normalisée en fonction de l' α -tubuline ou de la GAPDH. Les données représentent la moyenne \pm S.E.M de 3 expériences indépendante avec *** $p < 0,005$; ns = non-significatif.

2. Étude de la croissance tumorale *in vivo* des lignées U87MG sensibles et résistantes au TMZ par xénogreffes hétérotopiques.

Les 3 lignées ont été injectées dans le flanc droit et gauche de souris Nude NMRI. La croissance des tumeurs a été mesurée par la technique du pied à coulisse (Figure 29A). De façon surprenante, la prise de tumeur est équivalente pour les lignées U87MG et U87MG R50 (Figure 29C). Les tumeurs obtenues avec les cellules U87MG OFF ne sont apparentes qu'au bout de 40 jours après injection des cellules. Les résultats montrent également une croissance tumorale plus importante pour la lignée U87MG par rapport à la lignée U87MG R50 (Figure 29C). On observe à 25 jours post-injection un volume tumoral de $1250 \text{ mm}^3 \pm 843 \text{ mm}^3$ pour les tumeurs de cellules U87MG et de $450 \text{ mm}^3 \pm 625 \text{ mm}^3$ pour les tumeurs de cellules U87MG R50. A 25 jours post injection, aucune tumeur n'est visible pour la lignée U87MG OFF. Après un temps de latence de 40 jours post-injection, les tumeurs deviennent mesurables et atteignent un volume moyen de $845 \text{ mm}^3 \pm 455 \text{ mm}^3$ après 60 jours. Les résultats indiquent un retard de croissance pour les tumeurs obtenues avec les cellules U87MG OFF. En relation avec ce taux de croissance, la survie des souris est affectée différemment pour les 3 types de tumeurs (Figure 29D). Les souris avec des tumeurs de la lignée U87MG ont toutes été sacrifiées à 25 jours post-injection (points limites atteints), les souris avec des tumeurs U87MG R50 à 48 jours post-injection tandis que les souris de la lignée U87MG OFF ont toutes été sacrifiées à 61 jours post-injection (Figure 29D). Au moment du sacrifice, nous pouvons observer visuellement des tumeurs très infiltrées par du sang pour la lignée U87MG par rapport à la lignée U87MG OFF (Figure 29B) ce qui laisse supposer une angiogenèse plus importante. Ces données montrent des tumeurs plus agressives pour les lignées U87MG et U87MG R50 par rapport à la lignée U87MG OFF. Ces observations *in vivo* sont contradictoires avec les résultats obtenus *in vitro*.

Nous nous sommes alors demandé si l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ était identique à celle observée lors de la caractérisation des modèles cellulaires. Une moitié des tumeurs a été récupérée pour en extraire les protéines. Les analyses protéiques des tumeurs ont été comparées avec les analyses *in vitro* de chaque lignée cellulaire. Nous observons une inversion de l'expression protéique de l'intégrine $\alpha 5$ entre les lignées U87MG R50 et U87MG OFF. Dans les modèles cellulaires nous avons un niveau d'expression de l'intégrine $\alpha 5$ significativement plus important pour les lignées U87MG et U87MG OFF (comme montré dans la publication 2) mais dans les modèles *in vivo*, nous observons un niveau d'expression de l'intégrine $\alpha 5$ plus

important dans les tumeurs provenant de la lignée U87MG R50 par rapport aux 2 autres lignées (Figure 29E).

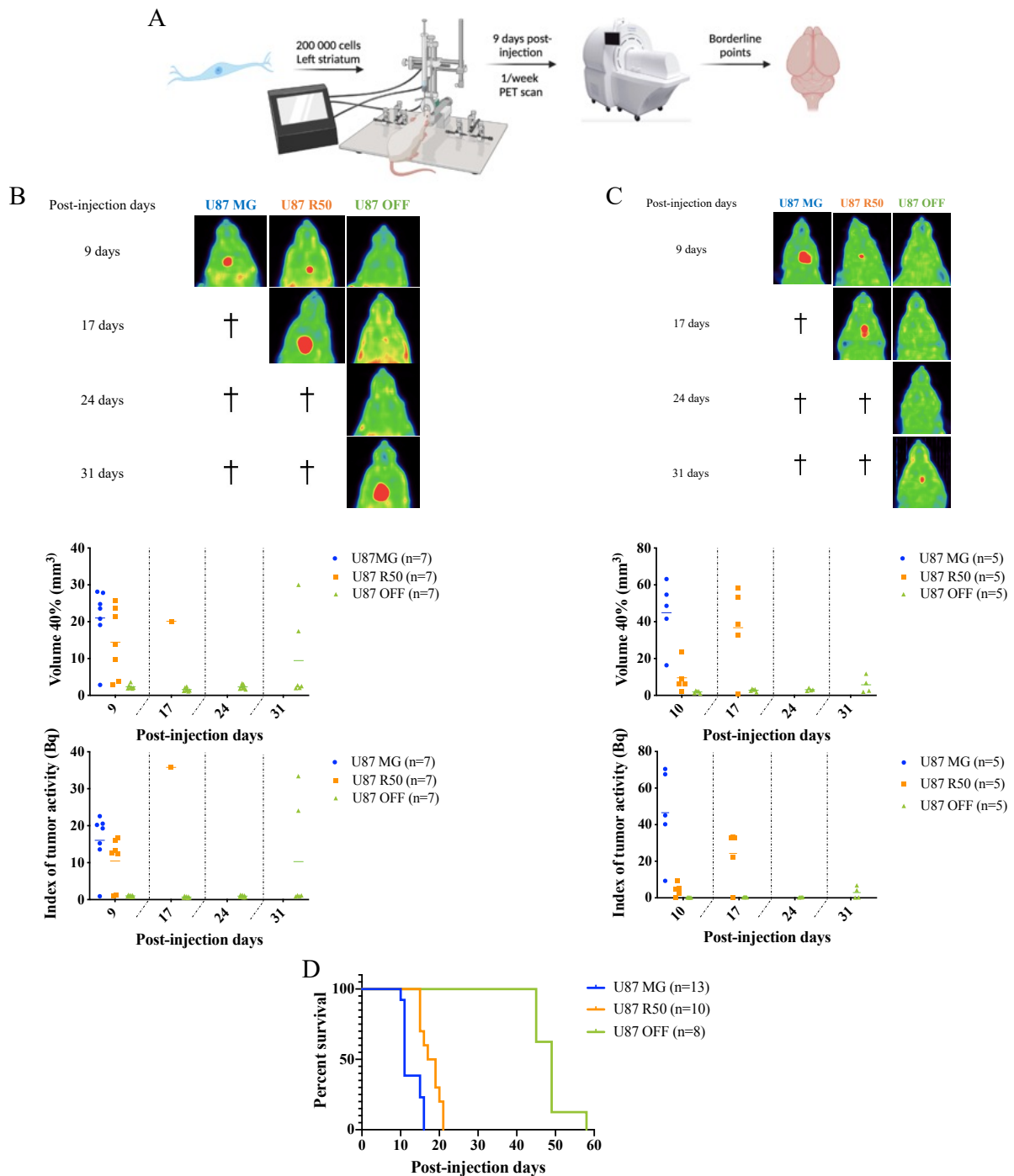


Figure 30 : Évaluation de la croissance tumorale *in vivo* par xénogreffe orthotopique.

A – Protocole suivi pour l'expérimentation. Lorsque les souris ont atteint leurs points limites (perte de poids et/ou symptômes neurologiques) ces dernières ont été sacrifiées. B – Images en plan frontal recueillies lors des séances d'imagerie TEP. Représentation graphique de la quantification du volume tumoral (à 40% de la SUV) et de l'index de l'activité tumorale en fonction des jours post-injection. Le radiotracer utilisé est la [¹⁸F]-FET pour le suivi de la croissance tumorale. C – Radiotracer utilisé la [¹⁸F]-FLT, marqueur de prolifération. D – Représentation des courbes de survie en fonction des jours post-injection.

3. Étude de la croissance tumorale *in vivo* des lignées U87MG sensibles et résistantes au TMZ par xénogreffe orthotopique.

Ces résultats surprenants ont été confirmés par des études de xénogreffes orthotopiques avec les 3 lignées cellulaires. Les lignées ont été injectées dans le striatum gauche de la souris puis un suivi de la croissance tumorale par imagerie TEP a été réalisé à l'aide du [¹⁸F]-FET et du [¹⁸F]-FLT. Les résultats ont été normalisés à l'aide de l'hémisphère sain du cerveau (Figure 30A). L'évaluation de la croissance tumorale et de la prolifération cellulaire montrent des résultats similaires aux résultats obtenus avec les xénogreffes hétérotopiques. On observe un début de croissance tumorale à J9 post-injection pour les lignées U87MG et U87MG R50 tandis que pour la lignée U87MG OFF on observe un retard de la croissance tumorale qui débute seulement à J31. Les résultats montrent également une activité du radiotracer plus élevée pour les lignées U87MG et U87M R50 par rapport à la lignée U87MG OFF (Figure 30B et C). La survie des souris est affectée car on observe une survie plus longue des souris transplantées avec la lignée U87MG OFF par rapport aux souris transplantées avec les deux autres lignées. Les souris de la lignée U87MG présentent la moins bonne survie (Figure 30D). Ces résultats confirment ceux obtenus lors des xénogreffes hétérotopiques avec les lignées U87MG et U87MG R50 qui ont une croissance tumorale et une prolifération cellulaire plus importante avec une mauvaise survie par rapport à la lignée U87MG OFF.

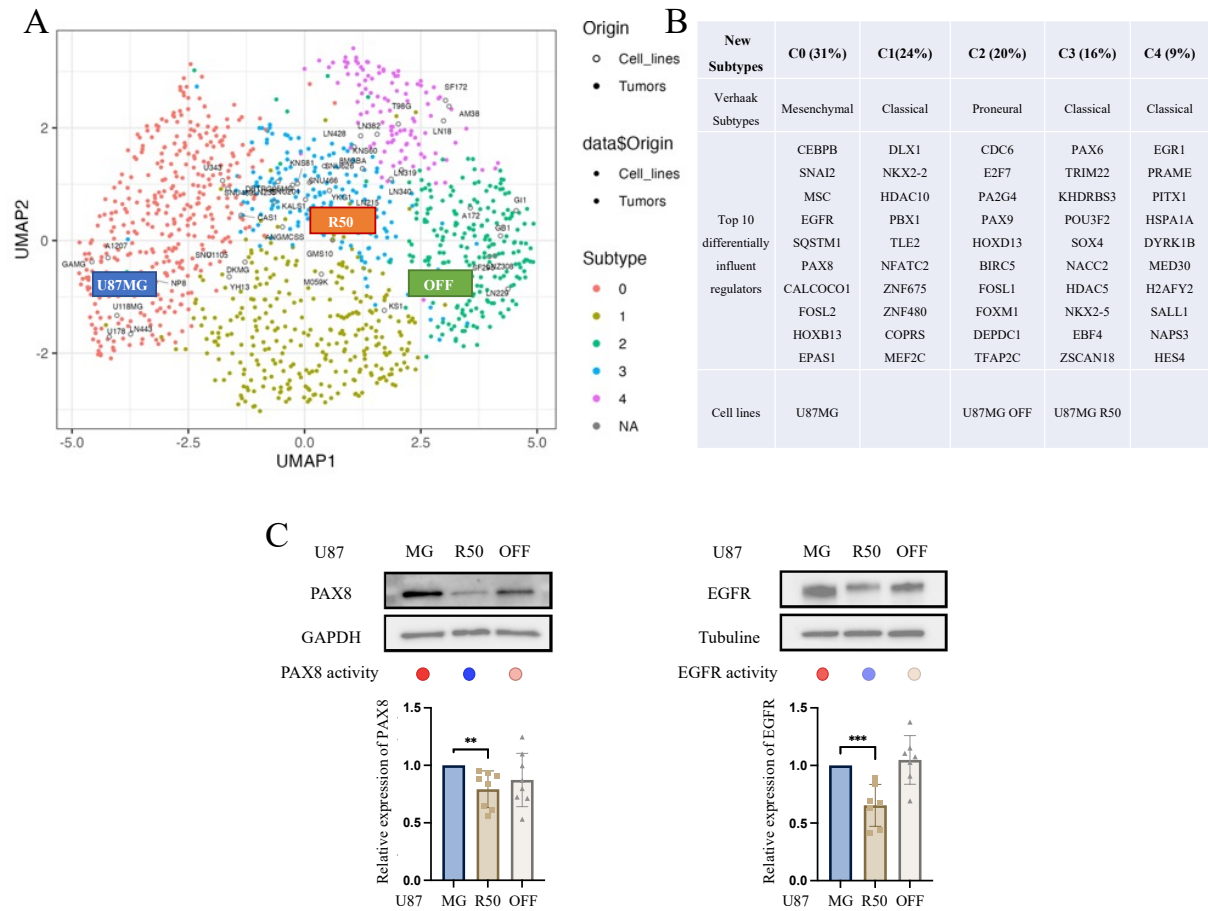


Figure 31 : Application des lignées U87MG sensibles et résistantes au TMZ au réseau de régulateurs. A – Les lignées sensibles et résistantes au TMZ ont été placées sur la carte représentant les 5 sous-classes. En bleu la lignée U87MG (U87MG) ; En orange le lignée U87MG R50 (R50) ; En vert la lignée U87MG OFF (OFF). B - Tableau récapitulatif des 5 sous-classes avec les caractéristiques moléculaires de chaque sous-classe. C - Vérification de l'activité de PAX8 et EGFR observé dans le réseau de régulateurs des lignées U87MG, U87MG R50 et U87MG OFF en fonction de leur niveau d'expression protéomique. Le rond rouge signifie que le régulateur est activé dans le réseau et en bleu qu'il est inactif. Des quantifications relatives de l'expression de PAX8 et EGFR ont été réalisées en fonction de l'expression de la GAPDH et la tubuline respectivement. Les données représentent la moyenne \pm S.E.M de 3 expériences indépendantes minimum avec $**p < 0,01$ et $***p < 0,005$.

4. Données transcriptomiques et réseau de régulateurs

Les données transcriptomiques des lignées cellulaires U87MG, U87MG R50 et U87MG OFF ont été appliquées au réseau de régulateurs (détaillé dans la partie 1 des résultats). Il est intéressant de noter que ces 3 lignées cellulaires se trouvent dans des sous-classes différentes. La lignée U87MG est dans la sous-classe C0 (classe mésenchymale de Verhaak), la lignée U87MG R50 dans à la sous-classe C3 (classe classique de Verhaak) et la lignée U87MG OFF dans la sous-classe C2 (classe proneurale de Verhaak) (Figure 31A). Ces 3 lignées ont été utilisées afin de vérifier les caractéristiques moléculaires indiquées par ce réseau de régulateurs. Parmi le top 10 des gènes régulateurs nous retrouvons PAX8 et EGFR (Figure 31B). Une différence d'activation de ces deux gènes régulateurs peut être notée dans le réseau de ces 3 lignées cellulaires. Les données montrent une inactivation de PAX8 et EGFR dans la lignée U87MG R50 tandis que le réseau des lignées U87MG et U87MG OFF montrent une activation de ces gènes régulateurs. Le niveau protéique de PAX8 et EGFR est significativement moins important dans la lignée U87MG R50 par rapport à la lignée U87MG (Figure 31C). Ces résultats mettent en relation le taux d'activation et l'expression de PAX8 et EGFR dans la lignée U87MG R50 par rapport à la lignée U87MG. Ce réseau peut ainsi donner des indications pour évaluer la plasticité des cellules à passer d'une classe à une autre en fonction du microenvironnement mais également pour identifier les régulateurs différemment activés associés à cette plasticité.

5. Discussion et perspectives

Cette 2^{ème} partie visait à évaluer les changements moléculaires et phénotypiques survenant pendant et après le traitement par Témzolomide (TMZ), chimiothérapie de référence dans le GBM, dans un modèle de cellules de GBM, les U87MG. Ces cellules initialement sensibles ont été rendu résistantes au TMZ de manière durable même après l'arrêt du TMZ. L'analyse transcriptomique a révélé que des changements importants se produisent entre les cellules parentales et résistantes, en particulier au niveau du répertoire des intégrines. En se concentrant sur l'intégrine $\alpha 5$, il a été démontré que son expression est diminuée en présence de TMZ mais restaurée après l'arrêt de la chimiothérapie. Dans ce modèle *in vitro* de glioblastome récurrent après traitement, l'intégrine $\alpha 5$ joue un rôle important dans la prolifération et la migration des cellules tumorales. Ces résultats peuvent expliquer l'échec de certaines thérapies ciblant les intégrines car leur expression est variable au cours du traitement. Il semblerait plus judicieux d'appliquer des thérapies anti-intégrine sur des tumeurs à récurrence plutôt qu'en combinaison avec le protocole Stupp. En appui de cette proposition, une publication de 2012 [376] mettait en évidence 2 types de GBM récurrents après une thérapie anti-angiogénique avec le Bevacizumab dont l'une plus hypoxique exprimait l'intégrine $\alpha 5$ et la fibronectine.

Ces données observées *in vitro* ont ensuite été vérifiées *in vivo*. Il est intéressant de noter une différence notable dans nos modèles *in vivo* par rapport aux lignées *in vitro*. Les données *in vivo* ont montrés une croissance tumorale plus importante avec la lignée U87MG R50 par rapport à la lignée U87MG OFF qui sont toutes deux résistantes au TMZ. L'inverse est observé *in vitro* avec une prolifération plus importante de la lignée U87MG OFF par rapport à la lignée U87MG R50. L'expression de l'intégrine $\alpha 5$ suit la même logique avec une expression importante de l'intégrine $\alpha 5$ dans la lignée U87MG R50 *in vivo* mais une faible expression *in vitro*. Ces données montrent l'importance du microenvironnement dans le développement tumoral qui impacte le profil moléculaire et a des conséquences phénotypiques. C'est pourquoi il est important de vérifier les données *in vitro* dans un modèle *in vivo* en cancérologie. Pour mieux comprendre les différences observées, les tumeurs hétérotopiques ont été prélevées et soumises à une analyse transcriptomique par RNAseq. Ces données transcriptomiques vont également être intégrées au réseau de régulateurs. Ceci nous permettra de faire une étude comparative des régulateurs activés/inhibés *in vitro* vs *in vivo* pour les 3 lignées.

Conclusion Générale

Tout au long de mon projet de thèse, je me suis focalisée sur l'étude d'une cible thérapeutique identifiée et étudiée au laboratoire, l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$, dans le glioblastome. Les cellules souches sont reconnues comme étant à l'origine de l'hétérogénéité moléculaire des GBM. Cette hétérogénéité est le résultat de la plasticité inhérente des CSG, leur permettant de s'adapter en fonction du microenvironnement rencontré (hypoxie vs normoxie) ou du traitement. Il est donc primordial de comprendre les mécanismes et d'identifier les acteurs impliqués dans l'hétérogénéité moléculaire qui caractérise le GBM. Cette compréhension permettra de mieux appréhender les thérapies ciblées de manière générale. C'est dans ce contexte que les deux principaux objectifs de mon projet de thèse étaient : 1) d'étudier la régulation de l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ dans des CSG en normoxie puis soumises *in vitro* à des pressions d'hypoxie et 2) d'étudier l'intégrine $\alpha 5$ dans un modèle de tumeur résistante à la chimiothérapie obtenu *in vitro*. Les deux modèles ont également été explorés pour leur capacité à initier des tumeurs *in vivo* en particulier par la technique d'imagerie non invasive TEP.

Dans la 1^{ère} partie de ma thèse j'ai mis en évidence une importante hétérogénéité de l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ au sein de lignées de CSG, en relation peut-être avec une expression hétérogène retrouvée dans les tumeurs de patients. Cette expression de notre cible thérapeutique est impactée par l'hypoxie mais également par la différenciation des CSG. Nous avons montré que les CSG utilisent préférentiellement HIF-2 α pour moduler l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ en condition hypoxique. L'augmentation de l'intégrine $\alpha 5$ en hypoxie a entraîné une augmentation de la migration cellulaire. La combinaison d'un inhibiteur de HIF-2 α et d'un antagoniste de l'intégrine $\alpha 5$ s'est montrée efficace dans le cas de cellules exprimant l'intégrine $\alpha 5$. Notre étude met en évidence pour la première fois un lien entre HIF-2 α et l'intégrine $\alpha 5$ qui se répercute sur le phénotype des CSG et qui peut aboutir à une nouvelle combinaison thérapeutique.

Dans la 2^{ème} partie de ma thèse, nous avons mis en évidence une plasticité des cellules différenciées de GBM (U87MG), qui s'adaptent en fonction du traitement chimiothérapeutique (TMZ). Nous avons observé une diminution de l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ pendant le traitement au TMZ qui est restaurée lors de l'arrêt du traitement. Ces résultats montrent une

nouvelle fois l'importante capacité des cellules de GBM à pouvoir s'adapter au microenvironnement, dans ce cas modifié par une chimiothérapie.

Mes résultats soulignent non seulement une hétérogénéité d'expression initiale d'une cible thérapeutique mais également une hétérogénéité induite par des facteurs exogènes du microenvironnement tumoral (niches, molécules thérapeutiques...). Cela peut expliquer en partie l'échec de thérapies ciblant les intégrines car leur expression apparaît très variable d'une tumeur à une autre, à l'intérieur d'une tumeur donnée et au cours du traitement chimiothérapeutique. Cela rend également plus complexe la sélection de patients pouvant bénéficier d'une thérapie anti-intégrine $\alpha 5$. Le suivi longitudinal des tumeurs par TEP à l'aide d'un ligand spécifique radiomarqué serait un vrai plus pour cette sélection.

La résolution de l'hétérogénéité moléculaire des GBM est un sujet d'actualité. Le nouvel outil développé en collaboration avec l'équipe de bioinformaticiens du Pr Elati est de ce point de vue très intéressant. Les résultats préliminaires obtenus dans le cadre de mon projet confirment son intérêt pour mieux appréhender la plasticité des tumeurs de type GBM. Le logiciel sera disponible rapidement pour la communauté scientifique intéressée par les GBM et complètera les possibilités d'analyse des données transcriptomiques des tumeurs. Un de ses avantages est de pouvoir compiler des données provenant de différentes sources (Affymetrix, RNAseq) puisqu'il ne s'adresse pas à la quantification des ARNm mais à l'activité de régulateurs. Mes travaux seront complétés prochainement par l'analyse de toutes les données collectées sur les différentes lignées de GSC dans différentes conditions de culture. Nous aurons ainsi la possibilité de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques adaptées à la plasticité des cellules tumorales.

Bibliographie

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68:394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
2. Ostrom QT, Bauchet L, Davis FG, et al (2014) The epidemiology of glioma in adults: a “state of the science” review. *Neuro-Oncol* 16:896–913. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nou087>
3. Koshy M, Villano JL, Dolecek TA, et al (2012) Improved survival time trends for glioblastoma using the SEER 17 population-based registries. *J Neurooncol* 107:207–212. <https://doi.org/10.1007/s11060-011-0738-7>
4. Ostrom QT, Patil N, Cioffi G, et al (2020) CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2013-2017. *Neuro-Oncol* 22:iv1–iv96. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noaa200>
5. Dieudonné N, De Micheli R, Hottinger A (2016) [Palliative care for glioblastoma]. *Rev Med Suisse* 12:853–856
6. Fabbro-Peray P, Zouaoui S, Darlix A, et al (2019) Association of patterns of care, prognostic factors, and use of radiotherapy-temozolomide therapy with survival in patients with newly diagnosed glioblastoma: a French national population-based study. *J Neurooncol* 142:91–101. <https://doi.org/10.1007/s11060-018-03065-z>
7. Li K, Lu D, Guo Y, et al (2018) Trends and patterns of incidence of diffuse glioma in adults in the United States, 1973-2014. *Cancer Med* 7:5281–5290. <https://doi.org/10.1002/cam4.1757>
8. Bell EH, Pugh SL, McElroy JP, et al (2017) Molecular-Based Recursive Partitioning Analysis Model for Glioblastoma in the Temozolomide Era: A Correlative Analysis Based on NRG Oncology RTOG 0525. *JAMA Oncol* 3:784–792. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.6020>
9. Ostrom QT, Cioffi G, Gittleman H, et al (2019) CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012-2016. *Neuro-Oncol* 21:v1–v100. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noz150>
10. Defossez G, Le Guyader-Peyrou S, Uhry Z, Grosclaude P, Colonna M, Dantony E, et al. (2019) Estimations nationales de l’incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018. Volume 1 – Tumeurs solides. Saint-Maurice (Fra) : Santé publique France
11. Swanson KR, Bridge C, Murray JD, Alvord EC (2003) Virtual and real brain tumors:

- using mathematical modeling to quantify glioma growth and invasion. *J Neurol Sci* 216:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2003.06.001>
12. Brat DJ, Mapstone TB (2003) Malignant glioma physiology: cellular response to hypoxia and its role in tumor progression. *Ann Intern Med* 138:659–668. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-138-8-200304150-00014>
 13. Nagy JA, Chang S-H, Shih S-C, et al (2010) Heterogeneity of the tumor vasculature. *Semin Thromb Hemost* 36:321–331. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1253454>
 14. Perry A, Wesseling P (2016) Histologic classification of gliomas. *Handb Clin Neurol* 134:71–95. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802997-8.00005-0>
 15. Cruz JVR, Batista C, Afonso B de H, et al (2022) Obstacles to Glioblastoma Treatment Two Decades after Temozolomide. *Cancers* 14:3203. <https://doi.org/10.3390/cancers14133203>
 16. Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, et al (2007) Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev* 21:2683–2710. <https://doi.org/10.1101/gad.1596707>
 17. Jiang Y, Uhrbom L (2012) On the origin of glioma. *Ups J Med Sci* 117:113–121. <https://doi.org/10.3109/03009734.2012.658976>
 18. Omuro A, DeAngelis LM (2013) Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review. *JAMA* 310:1842–1850. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.280319>
 19. Hanif F, Muzaffar K, Perveen K, et al (2017) Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP* 18:3–9. <https://doi.org/10.22034/APJCP.2017.18.1.3>
 20. Nelson SJ, Cha S (2003) Imaging glioblastoma multiforme. *Cancer J Sudbury Mass* 9:134–145. <https://doi.org/10.1097/00130404-200303000-00009>
 21. Chen W (2007) Clinical applications of PET in brain tumors. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med* 48:1468–1481. <https://doi.org/10.2967/jnumed.106.037689>
 22. Moreau A, Febvey O, Mognetti T, et al (2019) Contribution of Different Positron Emission Tomography Tracers in Glioma Management: Focus on Glioblastoma. *Front Oncol* 9:1134. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01134>
 23. Collet S, Guillamo J-S, Berro DH, et al (2021) Simultaneous Mapping of Vasculature, Hypoxia, and Proliferation Using Dynamic Susceptibility Contrast MRI, 18F-FMISO PET, and 18F-FLT PET in Relation to Contrast Enhancement in Newly Diagnosed Glioblastoma. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med* 62:1349–1356. <https://doi.org/10.2967/jnumed.120.249524>

24. Collet S, Valable S, Constans JM, et al (2015) [18F]-fluoro-l-thymidine PET and advanced MRI for preoperative grading of gliomas. *NeuroImage Clin* 8:448–454. <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2015.05.012>
25. Alavi JB, Alavi A, Chawluk J, et al (1988) Positron emission tomography in patients with glioma. A predictor of prognosis. *Cancer* 62:1074–1078. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19880915\)62:6<1074::aid-cncr2820620609>3.0.co;2-h](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19880915)62:6<1074::aid-cncr2820620609>3.0.co;2-h)
26. la Fougère C, Suchorska B, Bartenstein P, et al (2011) Molecular imaging of gliomas with PET: opportunities and limitations. *Neuro-Oncol* 13:806–819. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nor054>
27. Verger A, Langen K-J (2017) PET Imaging in Glioblastoma: Use in Clinical Practice. In: De Vleeschouwer S (ed) *Glioblastoma*. Codon Publications, Brisbane (AU)
28. Yamamoto Y, Ono Y, Aga F, et al (2012) Correlation of 18F-FLT uptake with tumor grade and Ki-67 immunohistochemistry in patients with newly diagnosed and recurrent gliomas. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med* 53:1911–1915. <https://doi.org/10.2967/jnumed.112.104729>
29. Corroyer-Dulmont A, Pérès EA, Petit E, et al (2013) Detection of glioblastoma response to temozolomide combined with bevacizumab based on μ MRI and μ PET imaging reveals [18F]-fluoro-L-thymidine as an early and robust predictive marker for treatment efficacy. *Neuro-Oncol* 15:41–56. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nos260>
30. Spence AM, Muzi M, Swanson KR, et al (2008) Regional hypoxia in glioblastoma multiforme quantified with [18F]fluoromisonidazole positron emission tomography before radiotherapy: correlation with time to progression and survival. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 14:2623–2630. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-4995>
31. Gerstner ER, Zhang Z, Fink JR, et al (2016) ACRIN 6684: Assessment of Tumor Hypoxia in Newly Diagnosed Glioblastoma Using 18F-FMISO PET and MRI. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 22:5079–5086. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2529>
32. Bruehlmeier M, Roelcke U, Schubiger PA, Ametamey SM (2004) Assessment of hypoxia and perfusion in human brain tumors using PET with 18F-fluoromisonidazole and 15O-H₂O. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med* 45:1851–1859
33. Sani S, Messe M, Fuchs Q, et al (2021) Biological Relevance of RGD-Integrin Subtype-Specific Ligands in Cancer. *ChemBioChem* 22:1151–1160. <https://doi.org/10.1002/cbic.202000626>
34. Mana G, Valdembri D, Serini G (2020) Conformationally active integrin endocytosis and

- traffic: why, where, when and how? *Biochem Soc Trans* 48:83–93. <https://doi.org/10.1042/BST20190309>
35. Nieberler M, Reuning U, Reichart F, et al (2017) Exploring the Role of RGD-Recognizing Integrins in Cancer. *Cancers* 9:E116. <https://doi.org/10.3390/cancers9090116>
 36. D'Alessandria C, Pohle K, Rechenmacher F, et al (2016) In vivo biokinetic and metabolic characterization of the ⁶⁸Ga-labelled $\alpha 5\beta 1$ -selective peptidomimetic FR366. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 43:953–963. <https://doi.org/10.1007/s00259-015-3218-z>
 37. Kapp TG, Di Leva FS, Notni J, et al (2018) N-Methylation of isoDGR Peptides: Discovery of a Selective $\alpha 5\beta 1$ -Integrin Ligand as a Potent Tumor Imaging Agent. *J Med Chem* 61:2490–2499. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01752>
 38. Li L, Chen X, Yu J, Yuan S (2022) Preliminary Clinical Application of RGD-Containing Peptides as PET Radiotracers for Imaging Tumors. *Front Oncol* 12:837952. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.837952>
 39. Wu Y, Zhang X, Xiong Z, et al (2005) microPET imaging of glioma integrin $\alpha v\beta 3$ expression using (64)Cu-labeled tetrameric RGD peptide. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med* 46:1707–1718
 40. Ebenhan T, Schoeman I, Rossouw DD, et al (2017) Evaluation of a Flexible NOTA-RGD Kit Solution Using Gallium-68 from Different ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga-Generators: Pharmacokinetics and Biodistribution in Nonhuman Primates and Demonstration of Solitary Pulmonary Nodule Imaging in Humans. *Mol Imaging Biol* 19:469–482. <https://doi.org/10.1007/s11307-016-1014-1>
 41. Mena E, Owenius R, Turkbey B, et al (2014) [¹⁸F]fluciclatide in the in vivo evaluation of human melanoma and renal tumors expressing $\alpha v\beta 3$ and $\alpha v\beta 5$ integrins. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 41:1879–1888. <https://doi.org/10.1007/s00259-014-2791-x>
 42. Kenny LM, Coombes RC, Oulie I, et al (2008) Phase I trial of the positron-emitting Arg-Gly-Asp (RGD) peptide radioligand ¹⁸F-AH111585 in breast cancer patients. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med* 49:879–886. <https://doi.org/10.2967/jnumed.107.049452>
 43. Wang Z, Lee TY, Ho PC (2012) A novel dextran-oleate-cRGDfK conjugate for self-assembly of nanodrug. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med* 8:194–203. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.06.006>
 44. Yu KKH, Patel AR, Moss NS (2020) The Role of Stereotactic Biopsy in Brain Metastases. *Neurosurg Clin N Am* 31:515–526. <https://doi.org/10.1016/j.nec.2020.06.002>
 45. Miller AM, Shah RH, Pentsova EI, et al (2019) Tracking tumour evolution in glioma

- through liquid biopsies of cerebrospinal fluid. *Nature* 565:654–658. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0882-3>
46. Eibl RH, Schneemann M (2021) Liquid Biopsy and Primary Brain Tumors. *Cancers* 13:5429. <https://doi.org/10.3390/cancers13215429>
 47. Bowers DC, Nathan PC, Constine L, et al (2013) Subsequent neoplasms of the CNS among survivors of childhood cancer: a systematic review. *Lancet Oncol* 14:e321-328. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70107-4](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70107-4)
 48. Sadetzki S, Chetrit A, Freedman L, et al (2005) Long-term follow-up for brain tumor development after childhood exposure to ionizing radiation for tinea capitis. *Radiat Res* 163:424–432. <https://doi.org/10.1667/rr3329>
 49. Moore SC, Rajaraman P, Dubrow R, et al (2009) Height, body mass index, and physical activity in relation to glioma risk. *Cancer Res* 69:8349–8355. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1669>
 50. Ahn S, Han K, Lee JE, et al (2021) Association between height and the risk of primary brain malignancy in adults: a nationwide population-based cohort study. *Neuro-Oncol Adv* 3:vdab098. <https://doi.org/10.1093/nojnl/vdab098>
 51. Kalya M, Kel A, Wlochowitz D, et al (2021) IGFBP2 Is a Potential Master Regulator Driving the Dysregulated Gene Network Responsible for Short Survival in Glioblastoma Multiforme. *Front Genet* 12:670240. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.670240>
 52. Phillips LM, Zhou X, Cogdell DE, et al (2016) Glioma progression is mediated by an addiction to aberrant IGFBP2 expression and can be blocked using anti-IGFBP2 strategies. *J Pathol* 239:355–364. <https://doi.org/10.1002/path.4734>
 53. Yuan Q, Cai H-Q, Zhong Y, et al (2019) Overexpression of IGFBP2 mRNA predicts poor survival in patients with glioblastoma. *Biosci Rep* 39:BSR20190045. <https://doi.org/10.1042/BSR20190045>
 54. Dunlap SM, Celestino J, Wang H, et al (2007) Insulin-like growth factor binding protein 2 promotes glioma development and progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:11736–11741. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703145104>
 55. Armstrong TS, Vera-Bolanos E, Acquaye AA, et al (2016) The symptom burden of primary brain tumors: evidence for a core set of tumor- and treatment-related symptoms. *Neuro-Oncol* 18:252–260. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nov166>
 56. Orešković D, Kaštelančić A, Raguž M, et al (2021) The vicious interplay between disrupted sleep and malignant brain tumors: a narrative review. *Croat Med J* 62:376–386
 57. Dong Z, Zhang G, Qu M, et al (2019) Targeting Glioblastoma Stem Cells through Disruption of the Circadian Clock. *Cancer Discov* 9:1556–1573.

<https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-0215>

58. Yu M, Li W, Wang Q, et al (2018) Circadian regulator NR1D2 regulates glioblastoma cell proliferation and motility. *Oncogene* 37:4838–4853. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0319-8>
59. Li A, Lin X, Tan X, et al (2013) Circadian gene Clock contributes to cell proliferation and migration of glioma and is directly regulated by tumor-suppressive miR-124. *FEBS Lett* 587:2455–2460. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.06.018>
60. Cutando A, López-Valverde A, Arias-Santiago S, et al (2012) Role of melatonin in cancer treatment. *Anticancer Res* 32:2747–2753
61. Zheng X, Pang B, Gu G, et al (2017) Melatonin Inhibits Glioblastoma Stem-like cells through Suppression of EZH2-NOTCH1 Signaling Axis. *Int J Biol Sci* 13:245–253. <https://doi.org/10.7150/ijbs.16818>
62. Zülch KJ (1980) Principles of the new World Health Organization (WHO) classification of brain tumors. *Neuroradiology* 19:59–66. <https://doi.org/10.1007/BF00342596>
63. Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW (1993) The new WHO classification of brain tumours. *Brain Pathol Zurich Switz* 3:255–268. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1993.tb00752.x>
64. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al (2007) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol (Berl)* 114:97–109. <https://doi.org/10.1007/s00401-007-0243-4>
65. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al (2016) The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol (Berl)* 131:803–820. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>
66. Brouland JP, Hottinger AF (2017) [Revised WHO classification 2016 of gliomas : what's new ?]. *Rev Med Suisse* 13:1805–1809
67. Figarella-Branger D, Appay R, Metais A, et al (2021) La classification de l'OMS 2021 des tumeurs du système nerveux central. *Ann Pathol*. <https://doi.org/10.1016/j.annpat.2021.11.005>
68. Louis DN, Perry A, Wesseling P, et al (2021) The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro-Oncol* 23:1231–1251. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab106>
69. Grochans S, Cybulska AM, Simińska D, et al (2022) Epidemiology of Glioblastoma Multiforme-Literature Review. *Cancers* 14:2412. <https://doi.org/10.3390/cancers14102412>

70. Ohgaki H, Kleihues P (2013) The Definition of Primary and Secondary Glioblastoma. *Clin Cancer Res* 19:764–772. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3002>
71. Watanabe T, Nobusawa S, Kleihues P, Ohgaki H (2009) IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. *Am J Pathol* 174:1149–1153. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080958>
72. Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, 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. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.020>
73. Sharma A, Bendre A, Mondal A, et al (2017) Angiogenic Gene Signature Derived from Subtype Specific Cell Models Segregate Proneural and Mesenchymal Glioblastoma. *Front Oncol* 7:146. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00146>
74. Steponaitis G, Tamasauskas A (2021) Mesenchymal and Proneural Subtypes of Glioblastoma Disclose Branching Based on GSC Associated Signature. *Int J Mol Sci* 22:4964. <https://doi.org/10.3390/ijms22094964>
75. Kaffes I, Szulzewsky F, Chen Z, et al (2019) Human Mesenchymal glioblastomas are characterized by an increased immune cell presence compared to Proneural and Classical tumors. *Oncoimmunology* 8:e1655360. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2019.1655360>
76. Zhang Z, Chen J, Huo X, et al (2021) Identification of a mesenchymal-related signature associated with clinical prognosis in glioma. *Aging* 13:12431–12455. <https://doi.org/10.18632/aging.202886>
77. Wang Q, Hu B, Hu X, et al (2017) Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment. *Cancer Cell* 32:42-56.e6. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.06.003>
78. Patel AP, Tirosh I, Trombetta JJ, et al (2014) Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science* 344:1396–1401. <https://doi.org/10.1126/science.1254257>
79. Lathia JD, Mack SC, Mulkearns-Hubert EE, et al (2015) Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes Dev* 29:1203–1217. <https://doi.org/10.1101/gad.261982.115>
80. Chen J, Li Y, Yu T-S, et al (2012) A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature* 488:522–526. <https://doi.org/10.1038/nature11287>
81. Neftel C, Laffy J, Filbin MG, et al (2019) An Integrative Model of Cellular States, Plasticity, and Genetics for Glioblastoma. *Cell* 178:835-849.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.06.024>

82. Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, 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. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.02.019>
83. Parsons DW, Jones S, Zhang X, et al (2008) An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 321:1807–1812. <https://doi.org/10.1126/science.1164382>
84. Al-Khallaf H (2017) Isocitrate dehydrogenases in physiology and cancer: biochemical and molecular insight. *Cell Biosci* 7:37. <https://doi.org/10.1186/s13578-017-0165-3>
85. Stupp R, Brada M, van den Bent MJ, et al (2014) High-grade glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 25 Suppl 3:iii93-101. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu050>
86. Hartmann C, Hentschel B, Simon M, et al (2013) Long-term survival in primary glioblastoma with versus without isocitrate dehydrogenase mutations. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 19:5146–5157. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0017>
87. Sanson M (2016) Marqueurs tumoraux des gliomes. *J Neuroradiol* 43:74–75. <https://doi.org/10.1016/j.neurad.2016.01.032>
88. Hegi ME, Liu L, Herman JG, et al (2008) Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 26:4189–4199. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.11.5964>
89. Malmström A, Grønberg BH, Marosi C, et al (2012) Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 13:916–926. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70265-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70265-6)
90. Vinagre J, Pinto V, Celestino R, et al (2014) Telomerase promoter mutations in cancer: an emerging molecular biomarker? *Virchows Arch Int J Pathol* 465:119–133. <https://doi.org/10.1007/s00428-014-1608-4>
91. Powter B, Jeffreys SA, Sareen H, et al (2021) Human TERT promoter mutations as a prognostic biomarker in glioma. *J Cancer Res Clin Oncol* 147:1007–1017. <https://doi.org/10.1007/s00432-021-03536-3>
92. Bell RJA, Rube HT, Xavier-Magalhães A, et al (2016) Understanding TERT Promoter Mutations: A Common Path to Immortality. *Mol Cancer Res* 14:315–323. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-16-0003>
93. Crespo I, Vital AL, Nieto AB, et al (2011) Detailed Characterization of Alterations of

- Chromosomes 7, 9, and 10 in Glioblastomas as Assessed by Single-Nucleotide Polymorphism Arrays. *J Mol Diagn* 13:634–647. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2011.06.003>
94. Fujisawa H, Reis RM, Nakamura M, et al (2000) Loss of Heterozygosity on Chromosome 10 Is More Extensive in Primary (De Novo) Than in Secondary Glioblastomas. *Lab Invest* 80:65–72. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3780009>
 95. Mizoguchi M, Kuga D, Guan Y, et al (2011) Loss of heterozygosity analysis in malignant gliomas. *Brain Tumor Pathol* 28:191–196. <https://doi.org/10.1007/s10014-011-0038-0>
 96. Stichel D, Ebrahimi A, Reuss D, et al (2018) Distribution of EGFR amplification, combined chromosome 7 gain and chromosome 10 loss, and TERT promoter mutation in brain tumors and their potential for the reclassification of IDHwt astrocytoma to glioblastoma. *Acta Neuropathol (Berl)* 136:793–803. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1905-0>
 97. An Z, Aksoy O, Zheng T, et al (2018) Epidermal growth factor receptor and EGFRvIII in glioblastoma: signaling pathways and targeted therapies. *Oncogene* 37:1561–1575. <https://doi.org/10.1038/s41388-017-0045-7>
 98. Benitez JA, Ma J, D'Antonio M, et al (2017) PTEN regulates glioblastoma oncogenesis through chromatin-associated complexes of DAXX and histone H3.3. *Nat Commun* 8:15223. <https://doi.org/10.1038/ncomms15223>
 99. Koul D (2008) PTEN signaling pathways in glioblastoma. *Cancer Biol Ther* 7:1321–1325. <https://doi.org/10.4161/cbt.7.9.6954>
 100. Ohgaki H, Kleihues P (2009) Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer Sci* 100:2235–2241. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01308.x>
 101. England B, Huang T, Karsy M (2013) Current understanding of the role and targeting of tumor suppressor p53 in glioblastoma multiforme. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med* 34:2063–2074. <https://doi.org/10.1007/s13277-013-0871-3>
 102. Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, et al (2006) Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol* 7:392–401. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(06\)70665-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(06)70665-9)
 103. Hadjipanayis CG, Stummer W (2019) 5-ALA and FDA approval for glioma surgery. *J Neurooncol* 141:479–486. <https://doi.org/10.1007/s11060-019-03098-y>
 104. Lakomkin N, Hadjipanayis CG (2018) Fluorescence-guided surgery for high-grade

- gliomas. *J Surg Oncol* 118:356–361. <https://doi.org/10.1002/jso.25154>
105. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352:987–996. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043330>
 106. Hegi ME, Diserens A-C, Gorlia T, et al (2005) MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 352:997–1003. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043331>
 107. Nabors LB, Portnow J, Ahluwalia M, et al (2020) Central Nervous System Cancers, Version 3.2020, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Cancer Netw JNCCN* 18:1537–1570. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2020.0052>
 108. Suchorska B, Weller M, Tabatabai G, et al (2016) Complete resection of contrast-enhancing tumor volume is associated with improved survival in recurrent glioblastoma—results from the DIRECTOR trial. *Neuro-Oncol* 18:549–556. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nov326>
 109. Stupp R, Wong ET, Kanner AA, et al (2012) NovoTTF-100A versus physician’s choice chemotherapy in recurrent glioblastoma: a randomised phase III trial of a novel treatment modality. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990 48:2192–2202. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.04.011>
 110. Díaz-Flores L, Gutiérrez R, González-Gómez M, et al (2021) Disproportion in Pericyte/Endothelial Cell Proliferation and Mechanisms of Intussusceptive Angiogenesis Participate in Bizarre Vessel Formation in Glioblastoma. *Cells* 10:2625. <https://doi.org/10.3390/cells10102625>
 111. Hardee ME, Zagzag D (2012) Mechanisms of glioma-associated neovascularization. *Am J Pathol* 181:1126–1141. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.06.030>
 112. Hattori Y, Kurozumi K, Otani Y, et al (2022) Combination of Ad-SGE-REIC and bevacizumab modulates glioma progression by suppressing tumor invasion and angiogenesis. *PloS One* 17:e0273242. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0273242>
 113. Reardon DA, Brandes AA, Omuro A, et al (2020) Effect of Nivolumab vs Bevacizumab in Patients With Recurrent Glioblastoma: The CheckMate 143 Phase 3 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol* 6:1003–1010. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2020.1024>
 114. Thompson EM, Frenkel EP, Neuwelt EA (2011) The paradoxical effect of bevacizumab in the therapy of malignant gliomas. *Neurology* 76:87–93. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e318204a3af>
 115. de Groot JF, Fuller G, Kumar AJ, et al (2010) Tumor invasion after treatment of glioblastoma with bevacizumab: radiographic and pathologic correlation in humans and

- mice. *Neuro-Oncol* 12:233–242. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nop027>
116. Lu KV, Chang JP, Parachoniak CA, et al (2012) VEGF inhibits tumor cell invasion and mesenchymal transition through a MET/VEGFR2 complex. *Cancer Cell* 22:21–35. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.05.037>
 117. Li Y, Ali S, Clarke J, Cha S (2017) Bevacizumab in Recurrent Glioma: Patterns of Treatment Failure and Implications. *Brain Tumor Res Treat* 5:1–9. <https://doi.org/10.14791/btrt.2017.5.1.1>
 118. Batchelor TT, Gilbert MR, Supko JG, et al (2004) Phase 2 study of weekly irinotecan in adults with recurrent malignant glioma: final report of NABTT 97-11. *Neuro-Oncol* 6:21–27. <https://doi.org/10.1215/s1152851703000218>
 119. Vredenburgh JJ, Desjardins A, Herndon JE, et al (2007) Phase II trial of bevacizumab and irinotecan in recurrent malignant glioma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 13:1253–1259. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-2309>
 120. Friedman HS, Prados MD, Wen PY, et al (2009) Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 27:4733–4740. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.19.8721>
 121. Stupp R, Taillibert S, Kanner AA, et al (2015) Maintenance Therapy With Tumor-Treating Fields Plus Temozolomide vs Temozolomide Alone for Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 314:2535–2543. <https://doi.org/10.1001/jama.2015.16669>
 122. Stupp R, Taillibert S, Kanner A, et al (2017) Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 318:2306–2316. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.18718>
 123. Ghiaseddin AP, Shin D, Melnick K, Tran DD (2020) Tumor Treating Fields in the Management of Patients with Malignant Gliomas. *Curr Treat Options Oncol* 21:76. <https://doi.org/10.1007/s11864-020-00773-5>
 124. Gramatzki D, Roth P, Rushing EJ, et al (2018) Bevacizumab may improve quality of life, but not overall survival in glioblastoma: an epidemiological study. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 29:1431–1436. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy106>
 125. Nava F, Tramacere I, Fittipaldo A, et al (2014) Survival effect of first- and second-line treatments for patients with primary glioblastoma: a cohort study from a prospective registry, 1997-2010. *Neuro-Oncol* 16:719–727. <https://doi.org/10.1093/neuonc/not316>
 126. Idbaih A, Duran-peña A, Alentorn A (2015) Thérapie ciblée des glioblastomes : bilan et perspectives. *Bull Académie Natl Médecine* 199:1323–1329.

[https://doi.org/10.1016/S0001-4079\(19\)30818-0](https://doi.org/10.1016/S0001-4079(19)30818-0)

127. Cruz Da Silva E, Mercier M-C, Etienne-Selloum N, et al (2021) A Systematic Review of Glioblastoma-Targeted Therapies in Phases II, III, IV Clinical Trials. *Cancers* 13:1795. <https://doi.org/10.3390/cancers13081795>
128. Van Den Bent M, Eoli M, Sepulveda JM, et al (2020) INTELLANCE 2/EORTC 1410 randomized phase II study of Depatux-M alone and with temozolomide vs temozolomide or lomustine in recurrent EGFR amplified glioblastoma. *Neuro-Oncol* 22:684–693. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noz222>
129. Schwartz K, Noel M, Nikolae M, et al (2019) ACTR-22. INITIAL TREATMENT OF GBM WITH A KETOGENIC DIET ALONG WITH RADIATION AND CHEMOTHERAPY: CLINICAL OUTCOMES. *Neuro-Oncol* 21:vi17. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noz175.065>
130. Wen PY, Touat M, Alexander BM, et al (2019) Buparlisib in Patients With Recurrent Glioblastoma Harboring Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway Activation: An Open-Label, Multicenter, Multi-Arm, Phase II Trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 37:741–750. <https://doi.org/10.1200/JCO.18.01207>
131. Chi AS, Batchelor TT, Kwak EL, et al (2012) Rapid radiographic and clinical improvement after treatment of a MET-amplified recurrent glioblastoma with a mesenchymal-epithelial transition inhibitor. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 30:e30-33. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.38.4586>
132. Liu Y, Carlsson R, Ambjørn M, et al (2013) PD-L1 expression by neurons nearby tumors indicates better prognosis in glioblastoma patients. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 33:14231–14245. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5812-12.2013>
133. Berghoff AS, Kiesel B, Widhalm G, et al (2015) Programmed death ligand 1 expression and tumor-infiltrating lymphocytes in glioblastoma. *Neuro-Oncol* 17:1064–1075. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nou307>
134. Nduom EK, Wei J, Yaghi NK, et al (2016) PD-L1 expression and prognostic impact in glioblastoma. *Neuro-Oncol* 18:195–205. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nov172>
135. Wang X, Guo G, Guan H, et al (2019) Challenges and potential of PD-1/PD-L1 checkpoint blockade immunotherapy for glioblastoma. *J Exp Clin Cancer Res CR* 38:87. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1085-3>
136. Reardon DA, Omuro A, Brandes AA, et al (2017) OS10.3 Randomized Phase 3 Study Evaluating the Efficacy and Safety of Nivolumab vs Bevacizumab in Patients With Recurrent Glioblastoma: CheckMate 143. *Neuro-Oncol* 19:iii21. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nox036.071>

137. Yovino S, Kleinberg L, Grossman SA, et al (2013) The etiology of treatment-related lymphopenia in patients with malignant gliomas: modeling radiation dose to circulating lymphocytes explains clinical observations and suggests methods of modifying the impact of radiation on immune cells. *Cancer Invest* 31:140–144. <https://doi.org/10.3109/07357907.2012.762780>
138. Jena L, McErlean E, McCarthy H (2020) Delivery across the blood-brain barrier: nanomedicine for glioblastoma multiforme. *Drug Deliv Transl Res* 10:304–318. <https://doi.org/10.1007/s13346-019-00679-2>
139. Wolbers JG (2014) Novel strategies in glioblastoma surgery aim at safe, supra-maximum resection in conjunction with local therapies. *Chin J Cancer* 33:8–15. <https://doi.org/10.5732/cjc.013.10219>
140. Wang X, Zhou R, Xiong Y, et al (2021) Sequential fate-switches in stem-like cells drive the tumorigenic trajectory from human neural stem cells to malignant glioma. *Cell Res* 31:684–702. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-00451-z>
141. Bocangel DB, Finkelstein S, Schold SC, et al (2002) Multifaceted resistance of gliomas to temozolomide. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 8:2725–2734
142. Kallenberg K, Goldmann T, Menke J, et al (2013) Glioma infiltration of the corpus callosum: early signs detected by DTI. *J Neurooncol* 112:217–222. <https://doi.org/10.1007/s11060-013-1049-y>
143. Cheng L, Wu Q, Guryanova OA, et al (2011) Elevated invasive potential of glioblastoma stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 406:643–648. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.02.123>
144. Segerman A, Niklasson M, Haglund C, et al (2016) Clonal Variation in Drug and Radiation Response among Glioma-Initiating Cells Is Linked to Proneural-Mesenchymal Transition. *Cell Rep* 17:2994–3009. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.11.056>
145. Barami K, Sloan AE, Rojiani A, et al (2009) Relationship of gliomas to the ventricular walls. *J Clin Neurosci Off J Neurosurg Soc Australas* 16:195–201. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2008.03.006>
146. Bardella C, Al-Dalahmah O, Krell D, et al (2016) Expression of Idh1R132H in the Murine Subventricular Zone Stem Cell Niche Recapitulates Features of Early Gliomagenesis. *Cancer Cell* 30:578–594. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.08.017>
147. Lee JH, Lee JE, Kahng JY, et al (2018) Human glioblastoma arises from subventricular zone cells with low-level driver mutations. *Nature* 560:243–247. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0389-3>
148. Jackson M, Hassiotou F, Nowak A (2015) Glioblastoma stem-like cells: at the root of

- tumor recurrence and a therapeutic target. *Carcinogenesis* 36:177–185. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgu243>
149. Beier D, Hau P, Proescholdt M, et al (2007) CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res* 67:4010–4015. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4180>
 150. Rich JN, Eyler CE (2008) Cancer stem cells in brain tumor biology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 73:411–420. <https://doi.org/10.1101/sqb.2008.73.060>
 151. Kumar SM, Liu S, Lu H, et al (2012) Acquired cancer stem cell phenotypes through Oct4-mediated dedifferentiation. *Oncogene* 31:4898–4911. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.656>
 152. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, et al (2003) Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 63:5821–5828
 153. Beier D, Hau P, Proescholdt M, et al (2007) CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res* 67:4010–4015. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4180>
 154. Yu J-B, Jiang H, Zhan R-Y (2016) Aberrant Notch signaling in glioblastoma stem cells contributes to tumor recurrence and invasion. *Mol Med Rep* 14:1263–1268. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5391>
 155. Lee J, Kotliarova S, Kotliarov Y, 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. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.03.030>
 156. Vasileva NS, Kuligina EV, Dymova MA, et al (2022) Transcriptome Changes in Glioma Cells Cultivated under Conditions of Neurosphere Formation. *Cells* 11:3106. <https://doi.org/10.3390/cells11193106>
 157. Huang Z, Cheng L, Guryanova OA, et al (2010) Cancer stem cells in glioblastoma--molecular signaling and therapeutic targeting. *Protein Cell* 1:638–655. <https://doi.org/10.1007/s13238-010-0078-y>
 158. Zhou D, Alver BM, Li S, et al (2018) Distinctive epigenomes characterize glioma stem cells and their response to differentiation cues. *Genome Biol* 19:43. <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1420-6>
 159. Piccirillo SGM, Reynolds BA, Zanetti N, et al (2006) Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells. *Nature* 444:761–765. <https://doi.org/10.1038/nature05349>
 160. Tate CM, Pallini R, Ricci-Vitiani L, et al (2012) A BMP7 variant inhibits the tumorigenic

- potential of glioblastoma stem-like cells. *Cell Death Differ* 19:1644–1654. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.44>
161. Wang T-C, Luo S-J, Chang S-F (2021) Bone Morphogenetic Protein 7 Effect on Human Glioblastoma Cell Transmigration and Migration. *Life Basel Switz* 11:708. <https://doi.org/10.3390/life11070708>
 162. Rampazzo E, Dettin M, Maule F, et al (2017) A synthetic BMP-2 mimicking peptide induces glioblastoma stem cell differentiation. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1861:2282–2292. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.07.001>
 163. Wang X, Prager BC, Wu Q, et al (2018) Reciprocal Signaling between Glioblastoma Stem Cells and Differentiated Tumor Cells Promotes Malignant Progression. *Cell Stem Cell* 22:514-528.e5. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.03.011>
 164. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al (2004) Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432:396–401. <https://doi.org/10.1038/nature03128>
 165. Lathia JD, Gallagher J, Myers JT, et al (2011) Direct In Vivo Evidence for Tumor Propagation by Glioblastoma Cancer Stem Cells. *PLoS ONE* 6:e24807. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024807>
 166. Tchoghandjian A, Baeza N, Colin C, et al (2010) A2B5 cells from human glioblastoma have cancer stem cell properties. *Brain Pathol Zurich Switz* 20:211–221. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2009.00269.x>
 167. Figarella-Branger D, Colin C, Baeza-Kallee N, Tchoghandjian A (2022) A2B5 Expression in Central Nervous System and Gliomas. *Int J Mol Sci* 23:4670. <https://doi.org/10.3390/ijms23094670>
 168. Corti S, Nizzardo M, Nardini M, et al (2007) Isolation and characterization of murine neural stem/progenitor cells based on Prominin-1 expression. *Exp Neurol* 205:547–562. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.03.021>
 169. Sun Y, Kong W, Falk A, et al (2009) CD133 (Prominin) negative human neural stem cells are clonogenic and tripotent. *PloS One* 4:e5498. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005498>
 170. Ding B-S, James D, Iyer R, et al (2013) Prominin 1/CD133 Endothelium Sustains Growth of Proneural Glioma. *PLOS ONE* 8:e62150. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062150>
 171. Sun T, Chen G, Li Y, et al (2015) Aggressive invasion is observed in CD133-/A2B5+ glioma-initiating cells. *Oncol Lett* 10:3399–3406. <https://doi.org/10.3892/ol.2015.3823>
 172. Lottaz C, Beier D, Meyer K, et al (2010) Transcriptional profiles of CD133+ and CD133- glioblastoma-derived cancer stem cell lines suggest different cells of origin. *Cancer Res*

70:2030–2040. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1707>

173. Dirkse A, Golebiewska A, Buder T, et al (2019) Stem cell-associated heterogeneity in Glioblastoma results from intrinsic tumor plasticity shaped by the microenvironment. *Nat Commun* 10:1787. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09853-z>
174. Li Z, Wang H, Eyler CE, et al (2009) Turning cancer stem cells inside out: an exploration of glioma stem cell signaling pathways. *J Biol Chem* 284:16705–16709. <https://doi.org/10.1074/jbc.R900013200>
175. Charles N, Ozawa T, Squatrito M, et al (2010) Perivascular nitric oxide activates notch signaling and promotes stem-like character in PDGF-induced glioma cells. *Cell Stem Cell* 6:141–152. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.01.001>
176. Qiang L, Wu T, Zhang H-W, et al (2012) HIF-1 α is critical for hypoxia-mediated maintenance of glioblastoma stem cells by activating Notch signaling pathway. *Cell Death Differ* 19:284–294. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.95>
177. Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, et al (2007) A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell* 11:69–82. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.11.020>
178. Zhu TS, Costello MA, Talsma CE, 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. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-4269>
179. Lathia JD, Gallagher J, Heddleston JM, et al (2010) Integrin alpha 6 regulates glioblastoma stem cells. *Cell Stem Cell* 6:421–432. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.02.018>
180. Hardee ME, Marciscano AE, Medina-Ramirez CM, et al (2012) Resistance of glioblastoma-initiating cells to radiation mediated by the tumor microenvironment can be abolished by inhibiting transforming growth factor- β . *Cancer Res* 72:4119–4129. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-0546>
181. Ye X, Xu S, Xin Y, et al (2012) Tumor-associated microglia/macrophages enhance the invasion of glioma stem-like cells via TGF- β 1 signaling pathway. *J Immunol Baltim Md* 1950 189:444–453. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103248>
182. Filatova A, Acker T, Garvalov BK (2013) The cancer stem cell niche(s): the crosstalk between glioma stem cells and their microenvironment. *Biochim Biophys Acta* 1830:2496–2508. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.10.008>
183. Di Tomaso T, Mazzoleni S, Wang E, et al (2010) Immunobiological characterization of cancer stem cells isolated from glioblastoma patients. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 16:800–813. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-2730>
184. Chongsathidkiet P, Jackson C, Koyama S, et al (2018) Sequestration of T cells in bone

- marrow in the setting of glioblastoma and other intracranial tumors. *Nat Med* 24:1459–1468. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0135-2>
185. Ricklefs FL, Alayo Q, Krenzlin H, et al (2018) Immune evasion mediated by PD-L1 on glioblastoma-derived extracellular vesicles. *Sci Adv* 4:eaar2766. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aar2766>
 186. Zhou W, Ke SQ, Huang Z, et al (2015) Periostin secreted by glioblastoma stem cells recruits M2 tumour-associated macrophages and promotes malignant growth. *Nat Cell Biol* 17:170–182. <https://doi.org/10.1038/ncb3090>
 187. Butovsky O, Jedrychowski MP, Moore CS, et al (2014) Identification of a unique TGF- β -dependent molecular and functional signature in microglia. *Nat Neurosci* 17:131–143. <https://doi.org/10.1038/nn.3599>
 188. Zhou W, Yu X, Sun S, et al (2019) Increased expression of MMP-2 and MMP-9 indicates poor prognosis in glioma recurrence. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother* 118:109369. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109369>
 189. Zhao D, Zhang H, Uyar R, et al (2021) Comparing Tumor Cell Invasion and Myeloid Cell Composition in Compatible Primary and Relapsing Glioblastoma. *Cancers* 13:3636. <https://doi.org/10.3390/cancers13143636>
 190. Virtuoso A, De Luca C, Cirillo G, et al (2022) Tumor Microenvironment and Immune Escape in the Time Course of Glioblastoma. *Mol Neurobiol* 59:6857–6873. <https://doi.org/10.1007/s12035-022-02996-z>
 191. Sørensen MD, Dahlrot RH, Boldt HB, et al (2018) Tumour-associated microglia/macrophages predict poor prognosis in high-grade gliomas and correlate with an aggressive tumour subtype. *Neuropathol Appl Neurobiol* 44:185–206. <https://doi.org/10.1111/nan.12428>
 192. Ricard C, Tchoghandjian A, Luche H, et al (2016) Phenotypic dynamics of microglial and monocyte-derived cells in glioblastoma-bearing mice. *Sci Rep* 6:26381. <https://doi.org/10.1038/srep26381>
 193. Doucette T, Rao G, Rao A, et al (2013) Immune heterogeneity of glioblastoma subtypes: extrapolation from the cancer genome atlas. *Cancer Immunol Res* 1:112–122. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-13-0028>
 194. Zannotto-Filho A, Gonçalves RM, Klafke K, et al (2017) Inflammatory landscape of human brain tumors reveals an NF κ B dependent cytokine pathway associated with mesenchymal glioblastoma. *Cancer Lett* 390:176–187. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.12.015>
 195. Bar EE (2011) Glioblastoma, cancer stem cells and hypoxia. *Brain Pathol Zurich Switz*

21:119–129. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2010.00460.x>

196. Liao C, Zhang Q (2020) Understanding the Oxygen-Sensing Pathway and Its Therapeutic Implications in Diseases. *Am J Pathol* 190:1584–1595. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2020.04.003>
197. Holmquist-Mengelbier L, Fredlund E, Löfstedt T, et al (2006) Recruitment of HIF-1alpha and HIF-2alpha to common target genes is differentially regulated in neuroblastoma: HIF-2alpha promotes an aggressive phenotype. *Cancer Cell* 10:413–423. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.08.026>
198. Mohlin S, Hamidian A, von Stedingk K, et al (2015) PI3K-mTORC2 but not PI3K-mTORC1 regulates transcription of HIF2A/EPAS1 and vascularization in neuroblastoma. *Cancer Res* 75:4617–4628. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0708>
199. Pietras A, Gisselsson D, Ora I, et al (2008) High levels of HIF-2alpha highlight an immature neural crest-like neuroblastoma cell cohort located in a perivascular niche. *J Pathol* 214:482–488. <https://doi.org/10.1002/path.2304>
200. Persson CU, von Stedingk K, Fredlund E, et al (2020) ARNT-dependent HIF-2 transcriptional activity is not sufficient to regulate downstream target genes in neuroblastoma. *Exp Cell Res* 388:111845. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2020.111845>
201. D'Alessio A, Proietti G, Lama G, et al (2016) Analysis of angiogenesis related factors in glioblastoma, peritumoral tissue and their derived cancer stem cells. *Oncotarget* 7:78541–78556. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12398>
202. Johansson E, Grassi ES, Pantazopoulou V, et al (2017) CD44 Interacts with HIF-2 α to Modulate the Hypoxic Phenotype of Perinecrotic and Perivascular Glioma Cells. *Cell Rep* 20:1641–1653. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.07.049>
203. Heddleston JM, Li Z, McLendon RE, et al (2009) The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stem cell phenotype. *Cell Cycle Georget Tex* 8:3274–3284. <https://doi.org/10.4161/cc.8.20.9701>
204. Li Z, Bao S, Wu Q, et al (2009) Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Cancer Cell* 15:501–513. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.03.018>
205. Nusblat LM, Tanna S, Roth CM (2020) Gene silencing of HIF-2 α disrupts glioblastoma stem cell phenotype. *Cancer Drug Resist Alhambra Calif* 3:199–208. <https://doi.org/10.20517/cdr.2019.96>
206. Flavahan WA, Wu Q, Hitomi M, et al (2013) Brain tumor initiating cells adapt to restricted nutrition through preferential glucose uptake. *Nat Neurosci* 16:1373–1382.

<https://doi.org/10.1038/nm.3510>

207. Stanke KM, Wilson C, Kidambi S (2021) High Expression of Glycolytic Genes in Clinical Glioblastoma Patients Correlates With Lower Survival. *Front Mol Biosci* 8:752404. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.752404>
208. Eyler CE, Wu Q, Yan K, et al (2011) Glioma stem cell proliferation and tumor growth are promoted by nitric oxide synthase-2. *Cell* 146:53–66. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.006>
209. Bonavia R, Inda M-M, Cavenee WK, Furnari FB (2011) Heterogeneity maintenance in glioblastoma: a social network. *Cancer Res* 71:4055–4060. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-0153>
210. Kang M, Na HY, Ahn S, et al (2022) Gallbladder adenocarcinomas undergo subclonal diversification and selection from precancerous lesions to metastatic tumors. *eLife* 11:e78636. <https://doi.org/10.7554/eLife.78636>
211. Lomakin A, Svedlund J, Strell C, et al (2022) Spatial genomics maps the structure, nature and evolution of cancer clones. *Nature* 611:594–602. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05425-2>
212. Couturier CP, Ayyadhury S, Le PU, et al (2020) Single-cell RNA-seq reveals that glioblastoma recapitulates a normal neurodevelopmental hierarchy. *Nat Commun* 11:3406. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17186-5>
213. Gimple RC, Yang K, Halbert ME, et al (2022) Brain cancer stem cells: resilience through adaptive plasticity and hierarchical heterogeneity. *Nat Rev Cancer* 22:497–514. <https://doi.org/10.1038/s41568-022-00486-x>
214. Yabo YA, Niclou SP, Golebiewska A (2022) Cancer cell heterogeneity and plasticity: A paradigm shift in glioblastoma. *Neuro-Oncol* 24:669–682. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab269>
215. Gangemi RMR, Griffiero F, Marubbi D, et al (2009) SOX2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity. *Stem Cells Dayt Ohio* 27:40–48. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2008-0493>
216. Guo Y, Liu S, Wang P, et al (2011) Expression profile of embryonic stem cell-associated genes Oct4, Sox2 and Nanog in human gliomas. *Histopathology* 59:763–775. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2011.03993.x>
217. Balbous A, Cortes U, Guilloteau K, et al (2014) A mesenchymal glioma stem cell profile is related to clinical outcome. *Oncogenesis* 3:e91. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2014.5>
218. Wang P, Gong S, Liao B, et al (2022) HIF1 α /HIF2 α induces glioma cell dedifferentiation into cancer stem cells through Sox2 under hypoxic conditions. *J Cancer* 13:1–14.

<https://doi.org/10.7150/jca.54402>

219. Barthel FP, Johnson KC, Varn FS, et al (2019) LONGITUDINAL MOLECULAR TRAJECTORIES OF DIFFUSE GLIOMA IN ADULTS. *Nature* 576:112–120. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1775-1>
220. Kim J, Lee I-H, Cho HJ, et al (2015) Spatiotemporal Evolution of the Primary Glioblastoma Genome. *Cancer Cell* 28:318–328. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.07.013>
221. Atkins RJ, Stylli SS, Kurganovs N, et al (2019) Cell quiescence correlates with enhanced glioblastoma cell invasion and cytotoxic resistance. *Exp Cell Res* 374:353–364. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2018.12.010>
222. Larsson I, Dalmo E, Elgendy R, et al (2021) Modeling glioblastoma heterogeneity as a dynamic network of cell states. *Mol Syst Biol* 17:e10105. <https://doi.org/10.15252/msb.202010105>
223. Meacham CE, Morrison SJ (2013) Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature* 501:328–337. <https://doi.org/10.1038/nature12624>
224. Puchalski RB, Shah N, Miller J, et al (2018) An anatomic transcriptional atlas of human glioblastoma. *Science* 360:660–663. <https://doi.org/10.1126/science.aaf2666>
225. Adamski V, Hempelmann A, Flüh C, et al (2017) Dormant glioblastoma cells acquire stem cell characteristics and are differentially affected by Temozolomide and AT101 treatment. *Oncotarget* 8:108064–108078. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22514>
226. Xie XP, Laks DR, Sun D, et al (2022) Quiescent human glioblastoma cancer stem cells drive tumor initiation, expansion, and recurrence following chemotherapy. *Dev Cell* 57:32–46.e8. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.12.007>
227. Gong X, Schwartz PH, Linskey ME, Bota DA (2011) Neural stem/progenitors and glioma stem-like cells have differential sensitivity to chemotherapy. *Neurology* 76:1126–1134. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e318212a89f>
228. Sciuscio D, Diserens A-C, van Dommelen K, et al (2011) Extent and patterns of MGMT promoter methylation in glioblastoma- and respective glioblastoma-derived spheres. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 17:255–266. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-1931>
229. Jones PM, George AM (2013) Mechanism of the ABC transporter ATPase domains: catalytic models and the biochemical and biophysical record. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 48:39–50. <https://doi.org/10.3109/10409238.2012.735644>
230. Gilbert CA, Daou M-C, Moser RP, Ross AH (2010) Gamma-secretase inhibitors enhance temozolomide treatment of human gliomas by inhibiting neurosphere repopulation and

- xenograft recurrence. *Cancer Res* 70:6870–6879. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1378>
231. Tubiana M (2008) Computed tomography and radiation exposure. *N Engl J Med* 358:850; author reply 852-853. <https://doi.org/10.1056/NEJMc073513>
 232. Pajonk F, Vlashi E, McBride WH (2010) Radiation resistance of cancer stem cells: the 4 R's of radiobiology revisited. *Stem Cells Dayt Ohio* 28:639–648. <https://doi.org/10.1002/stem.318>
 233. Bao S, Wu Q, McLendon RE, et al (2006) Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444:756–760. <https://doi.org/10.1038/nature05236>
 234. Liu C, Srihari S, Cao K-AL, et al (2014) A fine-scale dissection of the DNA double-strand break repair machinery and its implications for breast cancer therapy. *Nucleic Acids Res* 42:6106–6127. <https://doi.org/10.1093/nar/gku284>
 235. Bao S, Wu Q, Sathornsumetee S, et al (2006) Stem Cell-like Glioma Cells Promote Tumor Angiogenesis through Vascular Endothelial Growth Factor. *Cancer Res* 66:7843–7848. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-1010>
 236. Hjelmeland AB, Wu Q, Heddleston JM, et al (2011) Acidic stress promotes a glioma stem cell phenotype. *Cell Death Differ* 18:829–840. <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.150>
 237. Ren P, Wang J-Y, Zeng Z-R, et al (2022) A novel hypoxia-driven gene signature that can predict the prognosis and drug resistance of gliomas. *Front Genet* 13:976356. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.976356>
 238. Hubert CG, Rivera M, Spangler LC, et al (2016) A Three-Dimensional Organoid Culture System Derived from Human Glioblastomas Recapitulates the Hypoxic Gradients and Cancer Stem Cell Heterogeneity of Tumors Found In Vivo. *Cancer Res* 76:2465–2477. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-2402>
 239. Tejero R, Huang Y, Katsyv I, et al (2019) Gene signatures of quiescent glioblastoma cells reveal mesenchymal shift and interactions with niche microenvironment. *EBioMedicine* 42:252–269. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.03.064>
 240. Li Z, Rich JN (2010) Hypoxia and hypoxia inducible factors in cancer stem cell maintenance. *Curr Top Microbiol Immunol* 345:21–30. https://doi.org/10.1007/82_2010_75
 241. Seidel S, Garvalov BK, Wirta V, et al (2010) A hypoxic niche regulates glioblastoma stem cells through hypoxia inducible factor 2 α . *Brain* 133:983–995. <https://doi.org/10.1093/brain/awq042>

242. Gozdz A, Wojtaś B, Szpak P, et al (2022) Preservation of the Hypoxic Transcriptome in Glioblastoma Patient-Derived Cell Lines Maintained at Lowered Oxygen Tension. *Cancers* 14:4852. <https://doi.org/10.3390/cancers14194852>
243. Persano L, Pistollato F, Rampazzo E, et al (2012) BMP2 sensitizes glioblastoma stem-like cells to Temozolomide by affecting HIF-1 α stability and MGMT expression. *Cell Death Dis* 3:e412. <https://doi.org/10.1038/cddis.2012.153>
244. Begicevic R-R, Falasca M (2017) ABC Transporters in Cancer Stem Cells: Beyond Chemoresistance. *Int J Mol Sci* 18:E2362. <https://doi.org/10.3390/ijms18112362>
245. Bleau A-M, Hambardzumyan D, Ozawa T, et al (2009) PTEN/PI3K/Akt pathway regulates the side population phenotype and ABCG2 activity in glioma tumor stem-like cells. *Cell Stem Cell* 4:226–235. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.01.007>
246. Rocha J-D, Uribe D, Delgado J, et al (2022) A2B Adenosine Receptor Enhances Chemoresistance of Glioblastoma Stem-Like Cells under Hypoxia: New Insights into MRP3 Transporter Function. *Int J Mol Sci* 23:9022. <https://doi.org/10.3390/ijms23169022>
247. Monteiro AR, Hill R, Pilkington GJ, Madureira PA (2017) The Role of Hypoxia in Glioblastoma Invasion. *Cells* 6:E45. <https://doi.org/10.3390/cells6040045>
248. Horton ER, Byron A, Askari JA, et al (2015) Definition of a consensus integrin adhesome and its dynamics during adhesion complex assembly and disassembly. *Nat Cell Biol* 17:1577–1587. <https://doi.org/10.1038/ncb3257>
249. Horton ER, Humphries JD, James J, et al (2016) The integrin adhesome network at a glance. *J Cell Sci* 129:4159–4163. <https://doi.org/10.1242/jcs.192054>
250. Barczyk M, Carracedo S, Gullberg D (2010) Integrins. *Cell Tissue Res* 339:269–280. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0834-6>
251. Socovich AM, Naba A (2019) The cancer matrisome: From comprehensive characterization to biomarker discovery. *Semin Cell Dev Biol* 89:157–166. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.06.005>
252. Campbell ID, Humphries MJ (2011) Integrin Structure, Activation, and Interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3:. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004994>
253. Askari JA, Buckley PA, Mould AP, Humphries MJ (2009) Linking integrin conformation to function. *J Cell Sci* 122:165–170. <https://doi.org/10.1242/jcs.018556>
254. Li J, Su Y, Xia W, et al (2017) Conformational equilibria and intrinsic affinities define integrin activation. *EMBO J* 36:629–645. <https://doi.org/10.15252/emboj.201695803>
255. Su Y, Iacob RE, Li J, et al (2022) Dynamics of integrin $\alpha 5\beta 1$, fibronectin, and their

- complex reveal sites of interaction and conformational change. *J Biol Chem* 102323. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102323>
256. Ginsberg MH (2014) Integrin activation. *BMB Rep* 47:655–659. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2014.47.12.241>
257. Ha BH, Yigit S, Natarajan N, et al (2022) Molecular basis for integrin adhesion receptor binding to p21-activated kinase 4 (PAK4). *Commun Biol* 5:1257. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-04157-3>
258. Dalton AC, Shlamkovitch T, Papo N, Barton WA (2016) Constitutive Association of Tie1 and Tie2 with Endothelial Integrins is Functionally Modulated by Angiopoietin-1 and Fibronectin. *PLoS One* 11:e0163732. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163732>
259. Pan L, Zhao Y, Yuan Z, Qin G (2016) Research advances on structure and biological functions of integrins. *SpringerPlus* 5:. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2502-0>
260. Ellert-Miklaszewska A, Poleszak K, Pasierbinska M, Kaminska B (2020) Integrin Signaling in Glioma Pathogenesis: From Biology to Therapy. *Int J Mol Sci* 21:E888. <https://doi.org/10.3390/ijms21030888>
261. Diaz Osterman CJ, Ozmadenci D, Kleinschmidt EG, et al (2019) FAK activity sustains intrinsic and acquired ovarian cancer resistance to platinum chemotherapy. *eLife* 8:e47327. <https://doi.org/10.7554/eLife.47327>
262. Hirata E, Girotti MR, Viros A, et al (2015) Intravital imaging reveals how BRAF inhibition generates drug-tolerant microenvironments with high integrin β 1/FAK signaling. *Cancer Cell* 27:574–588. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.03.008>
263. McDonald PC, Dedhar S (2022) New Perspectives on the Role of Integrin-Linked Kinase (ILK) Signaling in Cancer Metastasis. *Cancers* 14:3209. <https://doi.org/10.3390/cancers14133209>
264. Li Q, Lan T, Xie J, et al (2022) Integrin-Mediated Tumorigenesis and Its Therapeutic Applications. *Front Oncol* 12:812480. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.812480>
265. Lawson C, Lim S-T, Uryu S, et al (2012) FAK promotes recruitment of talin to nascent adhesions to control cell motility. *J Cell Biol* 196:223–232. <https://doi.org/10.1083/jcb.201108078>
266. Amable G, Martínez-León E, Picco ME, et al (2020) Metformin inhibition of colorectal cancer cell migration is associated with rebuilt adherens junctions and FAK downregulation. *J Cell Physiol* 235:8334–8344. <https://doi.org/10.1002/jcp.29677>
267. Kiwanuka E, Andersson L, Caterson EJ, et al (2013) CCN2 promotes keratinocyte adhesion and migration via integrin α 5 β 1. *Exp Cell Res* 319:2938–2946. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.08.021>

268. Marks PW, Hendey B, Maxfield FR (1991) Attachment to fibronectin or vitronectin makes human neutrophil migration sensitive to alterations in cytosolic free calcium concentration. *J Cell Biol* 112:149–158. <https://doi.org/10.1083/jcb.112.1.149>
269. Kuonen F, Surbeck I, Sarin KY, et al (2018) TGF β , Fibronectin and Integrin α 5 β 1 Promote Invasion in Basal Cell Carcinoma. *J Invest Dermatol* 138:2432–2442. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.04.029>
270. Yang Y, Wang Y, Che X, et al (2021) Integrin α 5 promotes migration and invasion through the FAK/STAT3/AKT signaling pathway in icotinib-resistant non-small cell lung cancer cells. *Oncol Lett* 22:556. <https://doi.org/10.3892/ol.2021.12817>
271. Lin G, Zhang X, Ren J, et al (2013) Integrin signaling is required for maintenance and proliferation of intestinal stem cells in *Drosophila*. *Dev Biol* 377:177–187. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.01.032>
272. Eberwein P, Laird D, Schulz S, et al (2015) Modulation of focal adhesion constituents and their down-stream events by EGF: On the cross-talk of integrins and growth factor receptors. *Biochim Biophys Acta* 1853:2183–2198. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.06.004>
273. Jones MC, Askari JA, Humphries JD, Humphries MJ (2018) Cell adhesion is regulated by CDK1 during the cell cycle. *J Cell Biol* 217:3203–3218. <https://doi.org/10.1083/jcb.201802088>
274. Naci D, Aoudjit F (2014) Alpha2beta1 integrin promotes T cell survival and migration through the concomitant activation of ERK/Mcl-1 and p38 MAPK pathways. *Cell Signal* 26:2008–2015. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.05.016>
275. Dolinschek R, Hingerl J, Bengel A, et al (2021) Constitutive activation of integrin α v β 3 contributes to anoikis resistance of ovarian cancer cells. *Mol Oncol* 15:503–522. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12845>
276. Lugano R, Vemuri K, Yu D, et al (2018) CD93 promotes β 1 integrin activation and fibronectin fibrillogenesis during tumor angiogenesis. *J Clin Invest* 128:3280–3297. <https://doi.org/10.1172/JCI97459>
277. Salvi AM, DeMali KA (2018) Mechanisms linking mechanotransduction and cell metabolism. *Curr Opin Cell Biol* 54:114–120. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.05.004>
278. Georgiadou M, Lilja J, Jacquemet G, et al (2017) AMPK negatively regulates tensin-dependent integrin activity. *J Cell Biol* 216:1107–1121. <https://doi.org/10.1083/jcb.201609066>
279. Lechler T, Fuchs E (2005) Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin. *Nature* 437:275–280.

<https://doi.org/10.1038/nature03922>

280. Yoshioka T, Otero J, Chen Y, et al (2013) β 4 Integrin signaling induces expansion of prostate tumor progenitors. *J Clin Invest* 123:682–699. <https://doi.org/10.1172/JCI60720>
281. Zheng Y, de la Cruz CC, Sayles LC, 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. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.05.021>
282. Cooper J, Giancotti FG (2019) Integrin Signaling in Cancer: Mechanotransduction, Stemness, Epithelial Plasticity, and Therapeutic Resistance. *Cancer Cell* 35:347–367. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.01.007>
283. Lathia JD, Gallagher J, Heddleston JM, et al (2010) Integrin alpha 6 regulates glioblastoma stem cells. *Cell Stem Cell* 6:421–432. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.02.018>
284. Rao TC, Ma VP-Y, Blanchard A, et al (2020) EGFR activation attenuates the mechanical threshold for integrin tension and focal adhesion formation. *J Cell Sci* 133:jcs238840. <https://doi.org/10.1242/jcs.238840>
285. Valencia-Expósito A, Gómez-Lamarca MJ, Widmann TJ, Martín-Bermudo MD (2022) Integrins Cooperate With the EGFR/Ras Pathway to Preserve Epithelia Survival and Architecture in Development and Oncogenesis. *Front Cell Dev Biol* 10:892691. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.892691>
286. Novoseletskaia E, Grigorieva O, Nimiritsky P, et al (2020) Mesenchymal Stromal Cell-Produced Components of Extracellular Matrix Potentiate Multipotent Stem Cell Response to Differentiation Stimuli. *Front Cell Dev Biol* 8:555378. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.555378>
287. Peng Z, Hao M, Tong H, et al (2022) The interactions between integrin α 5 β 1 of liver cancer cells and fibronectin of fibroblasts promote tumor growth and angiogenesis. *Int J Biol Sci* 18:5019–5037. <https://doi.org/10.7150/ijbs.72367>
288. Kim S-M, Lim E-J, Yoo K-C, et al (2022) Glioblastoma-educated mesenchymal stem-like cells promote glioblastoma infiltration via extracellular matrix remodelling in the tumour microenvironment. *Clin Transl Med* 12:e997. <https://doi.org/10.1002/ctm2.997>
289. Fang Y, Liang S, Gao J, et al (2022) Extracellular matrix stiffness mediates radiosensitivity in a 3D nasopharyngeal carcinoma model. *Cancer Cell Int* 22:364. <https://doi.org/10.1186/s12935-022-02787-5>
290. Mohammadi H, Sahai E (2018) Mechanisms and impact of altered tumour mechanics. *Nat Cell Biol* 20:766–774. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0131-2>

291. Miroshnikova YA, Mouw JK, Barnes JM, et al (2016) Tissue mechanics promote IDH1-dependent HIF1 α -tenascin C feedback to regulate glioblastoma aggression. *Nat Cell Biol* 18:1336–1345. <https://doi.org/10.1038/ncb3429>
292. Mia MS, Jarajapu Y, Rao R, Mathew S (2021) Integrin β 1 Promotes Pancreatic Tumor Growth by Upregulating Kindlin-2 and TGF- β Receptor-2. *Int J Mol Sci* 22:10599. <https://doi.org/10.3390/ijms221910599>
293. Tod J, Hanley CJ, Morgan MR, et al (2017) Pro-migratory and TGF- β -activating functions of α v β 6 integrin in pancreatic cancer are differentially regulated via an Eps8-dependent GTPase switch. *J Pathol* 243:37–50. <https://doi.org/10.1002/path.4923>
294. Barnes JM, Kaushik S, Bainer RO, et al (2018) A tension-mediated glycocalyx-integrin feedback loop promotes mesenchymal-like glioblastoma. *Nat Cell Biol* 20:1203–1214. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0183-3>
295. Woods D, Cherwinski H, Venetsanakos E, et al (2001) Induction of beta3-integrin gene expression by sustained activation of the Ras-regulated Raf-MEK-extracellular signal-regulated kinase signaling pathway. *Mol Cell Biol* 21:3192–3205. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.9.3192-3205.2001>
296. Jacquemet G, Green DM, Bridgewater RE, et al (2013) RCP-driven α 5 β 1 recycling suppresses Rac and promotes RhoA activity via the RacGAP1-IQGAP1 complex. *J Cell Biol* 202:917–935. <https://doi.org/10.1083/jcb.201302041>
297. Blandin A-F, Cruz Da Silva E, Mercier M-C, et al (2021) Gefitinib induces EGFR and α 5 β 1 integrin co-endocytosis in glioblastoma cells. *Cell Mol Life Sci CMLS* 78:2949–2962. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03686-6>
298. Iwanicki MP, Chen H-Y, Iavarone C, et al (2016) Mutant p53 regulates ovarian cancer transformed phenotypes through autocrine matrix deposition. *JCI Insight* 1:e86829, 86829. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.86829>
299. You D, Xin J, Volk A, et al (2015) FAK mediates a compensatory survival signal parallel to PI3K-AKT in PTEN-null T-ALL cells. *Cell Rep* 10:2055–2068. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.02.056>
300. Ju JA, Godet I, Ye IC, et al (2017) Hypoxia Selectively Enhances Integrin α 5 β 1 Receptor Expression in Breast Cancer to Promote Metastasis. *Mol Cancer Res MCR* 15:723–734. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-16-0338>
301. Quaglia F, Krishn SR, Wang Y, et al (2021) Differential expression of α V β 3 and α V β 6 integrins in prostate cancer progression. *PloS One* 16:e0244985. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244985>
302. Quaglia F, Krishn SR, Daaboul GG, et al (2020) Small extracellular vesicles modulated

- by $\alpha V\beta 3$ integrin induce neuroendocrine differentiation in recipient cancer cells. *J Extracell Vesicles* 9:1761072. <https://doi.org/10.1080/20013078.2020.1761072>
303. Li Z, Lin P, Gao C, et al (2016) Integrin $\beta 6$ acts as an unfavorable prognostic indicator and promotes cellular malignant behaviors via ERK-ETS1 pathway in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med* 37:5117–5131. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4353-7>
 304. Lenggenhager D, Bengs S, Fritsch R, et al (2021) $\beta 6$ -Integrin Serves as a Potential Serum Marker for Diagnosis and Prognosis of Pancreatic Adenocarcinoma. *Clin Transl Gastroenterol* 12:e00395. <https://doi.org/10.14309/ctg.0000000000000395>
 305. Jahangiri A, Nguyen A, Chandra A, et al (2017) Cross-activating c-Met/ $\beta 1$ integrin complex drives metastasis and invasive resistance in cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:E8685–E8694. <https://doi.org/10.1073/pnas.1701821114>
 306. Dudvarski Stanković N, Bicker F, Keller S, et al (2018) EGFL7 enhances surface expression of integrin $\alpha 5\beta 1$ to promote angiogenesis in malignant brain tumors. *EMBO Mol Med* 10:e8420. <https://doi.org/10.15252/emmm.201708420>
 307. Pantano F, Croset M, Driouch K, et al (2021) Integrin alpha5 in human breast cancer is a mediator of bone metastasis and a therapeutic target for the treatment of osteolytic lesions. *Oncogene* 40:1284–1299. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-01603-6>
 308. Zhu H, Wang G, Zhu H, Xu A (2021) ITGA5 is a prognostic biomarker and correlated with immune infiltration in gastrointestinal tumors. *BMC Cancer* 21:269. <https://doi.org/10.1186/s12885-021-07996-1>
 309. Shi Y, Wu M, Liu Y, et al (2021) ITGA5 Predicts Dual-Drug Resistance to Temozolomide and Bevacizumab in Glioma. *Front Oncol* 11:769592. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.769592>
 310. Schittenhelm J, Schwab EI, Sperveslage J, et al (2013) Longitudinal expression analysis of αv integrins in human gliomas reveals upregulation of integrin $\alpha v\beta 3$ as a negative prognostic factor. *J Neuropathol Exp Neurol* 72:194–210. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e3182851019>
 311. Malric L, Monferran S, Gilhodes J, et al (2017) Interest of integrins targeting in glioblastoma according to tumor heterogeneity and cancer stem cell paradigm: an update. *Oncotarget* 8:86947–86968. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20372>
 312. Schumacher S, Dedden D, Nunez RV, et al (2021) Structural insights into integrin $\alpha 5\beta 1$ opening by fibronectin ligand. *Sci Adv* 7:eabe9716. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abe9716>
 313. Grant RP, Spitzfaden C, Altroff H, et al (1997) Structural Requirements for Biological

- Activity of the Ninth and Tenth FIII Domains of Human Fibronectin. *J Biol Chem* 272:6159–6166
314. Nagae M, Re S, Mihara E, et al (2012) Crystal structure of $\alpha 5\beta 1$ integrin ectodomain: Atomic details of the fibronectin receptor. *J Cell Biol* 197:131–140. <https://doi.org/10.1083/jcb.201111077>
 315. Margadant C, Monsuur HN, Norman JC, Sonnenberg A (2011) Mechanisms of integrin activation and trafficking. *Curr Opin Cell Biol* 23:607–614. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2011.08.005>
 316. George EL, Georges-Labouesse EN, Patel-King RS, et al (1993) Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Dev Camb Engl* 119:1079–1091. <https://doi.org/10.1242/dev.119.4.1079>
 317. Halder SK, Kant R, Milner R (2018) Chronic mild hypoxia promotes profound vascular remodeling in spinal cord blood vessels, preferentially in white matter, via an $\alpha 5\beta 1$ integrin-mediated mechanism. *Angiogenesis* 21:251–266. <https://doi.org/10.1007/s10456-017-9593-2>
 318. Schaffner F, Ray AM, Dontenwill M (2013) Integrin $\alpha 5\beta 1$, the Fibronectin Receptor, as a Pertinent Therapeutic Target in Solid Tumors. *Cancers* 5:27–47. <https://doi.org/10.3390/cancers5010027>
 319. Carlson TR, Hu H, Braren R, et al (2008) Cell-autonomous requirement for beta1 integrin in endothelial cell adhesion, migration and survival during angiogenesis in mice. *Dev Camb Engl* 135:2193–2202. <https://doi.org/10.1242/dev.016378>
 320. Huizer K, Sacchetti A, Swagemakers S, et al (2020) Circulating angiogenic cells in glioblastoma: toward defining crucial functional differences in CAC-induced neoplastic versus reactive neovascularization. *Neuro-Oncol Adv* 2:vdaa040. <https://doi.org/10.1093/noajnl/vdaa040>
 321. Orecchia A, Lacial PM, Schietroma C, et al (2003) Vascular endothelial growth factor receptor-1 is deposited in the extracellular matrix by endothelial cells and is a ligand for the alpha 5 beta 1 integrin. *J Cell Sci* 116:3479–3489. <https://doi.org/10.1242/jcs.00673>
 322. Alghamdi AAA, Benwell CJ, Atkinson SJ, et al (2020) NRP2 as an Emerging Angiogenic Player; Promoting Endothelial Cell Adhesion and Migration by Regulating Recycling of $\alpha 5$ Integrin. *Front Cell Dev Biol* 8:395. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00395>
 323. Mittelbronn M, Warth A, Meyermann R, et al (2013) Expression of integrins $\alpha \nu \beta 3$ and $\alpha \nu \beta 5$ and their ligands in primary and secondary central nervous system neoplasms. *Histol Histopathol* 28:749–758. <https://doi.org/10.14670/HH-28.749>

324. Martin S, Cosset EC, Terrand J, et al (2009) Caveolin-1 regulates glioblastoma aggressiveness through the control of $\alpha 5 \beta 1$ integrin expression and modulates glioblastoma responsiveness to SJ749, an $\alpha 5 \beta 1$ integrin antagonist. *Biochim Biophys Acta* 1793:354–367. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.09.019>
325. Mallawaarachy DM, Buckland ME, McDonald KL, et al (2015) Membrane proteome analysis of glioblastoma cell invasion. *J Neuropathol Exp Neurol* 74:425–441. <https://doi.org/10.1097/NEN.0000000000000187>
326. Larue L, Bellacosa A (2005) Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogene* 24:7443–7454. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209091>
327. Ray A-M, Schaffner F, Janouskova H, et al (2014) Single cell tracking assay reveals an opposite effect of selective small non-peptidic $\alpha 5 \beta 1$ or $\alpha v \beta 3 / \beta 5$ integrin antagonists in U87MG glioma cells. *Biochim Biophys Acta* 1840:2978–2987. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.04.024>
328. Renner G, Noulet F, Mercier M-C, et al (2016) Expression/activation of $\alpha 5 \beta 1$ integrin is linked to the β -catenin signaling pathway to drive migration in glioma cells. *Oncotarget* 7:62194–62207. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11552>
329. Blandin A-F, Noulet F, Renner G, et al (2016) Glioma cell dispersion is driven by $\alpha 5$ integrin-mediated cell-matrix and cell-cell interactions. *Cancer Lett* 376:328–338. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.04.007>
330. Nam E-H, Lee Y, Park Y-K, et al (2012) ZEB2 upregulates integrin $\alpha 5$ expression through cooperation with Sp1 to induce invasion during epithelial-mesenchymal transition of human cancer cells. *Carcinogenesis* 33:563–571. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs005>
331. Janouskova H, Maglott A, Leger DY, et al (2012) Integrin $\alpha 5 \beta 1$ plays a critical role in resistance to temozolomide by interfering with the p53 pathway in high-grade glioma. *Cancer Res* 72:3463–3470. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-4199>
332. Renner G, Janouskova H, Noulet F, et al (2016) Integrin $\alpha 5 \beta 1$ and p53 convergent pathways in the control of anti-apoptotic proteins PEA-15 and survivin in high-grade glioma. *Cell Death Differ* 23:640–653. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.131>
333. Martinkova E, Maglott A, Leger DY, et al (2010) $\alpha 5 \beta 1$ integrin antagonists reduce chemotherapy-induced premature senescence and facilitate apoptosis in human glioblastoma cells. *Int J Cancer* 127:1240–1248. <https://doi.org/10.1002/ijc.25187>
334. Sani S, Pallaoro N, Messe M, et al (2022) Temozolomide-Acquired Resistance Is Associated with Modulation of the Integrin Repertoire in Glioblastoma, Impact of $\alpha 5 \beta 1$ Integrin. *Cancers* 14:369. <https://doi.org/10.3390/cancers14020369>

335. Etienne-Selloum N, Prades J, Bello-Roufai D, et al (2021) Expression Analysis of $\alpha 5$ Integrin Subunit Reveals Its Upregulation as a Negative Prognostic Biomarker for Glioblastoma. *Pharm Basel Switz* 14:882. <https://doi.org/10.3390/ph14090882>
336. Reardon DA, Cheresch D (2011) Cilengitide: a prototypic integrin inhibitor for the treatment of glioblastoma and other malignancies. *Genes Cancer* 2:1159–1165. <https://doi.org/10.1177/1947601912450586>
337. Stupp R, Hegi ME, Gorlia T, et al (2014) Cilengitide combined with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CENTRIC EORTC 26071-22072 study): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 15:1100–1108. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70379-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70379-1)
338. Vansteenkiste J, Barlesi F, Waller CF, 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 Off J Eur Soc Med Oncol* 26:1734–1740. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv219>
339. Zhao Y-Z, Lin Q, Wong HL, et al (2016) Glioma-targeted therapy using Cilengitide nanoparticles combined with UTMD enhanced delivery. *J Control Release Off J Control Release Soc* 224:112–125. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.01.015>
340. Cianfrocca ME, Kimmel KA, Gallo J, 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. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603171>
341. Silginer M, Weller M, Ziegler U, Roth P (2014) Integrin inhibition promotes atypical anoikis in glioma cells. *Cell Death Dis* 5:e1012. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.543>
342. Cirkel GA, Kerklaan BM, Vanhoutte F, et al (2016) 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* 34:184–192. <https://doi.org/10.1007/s10637-015-0320-9>
343. Heckmann D, Meyer A, Marinelli L, et al (2007) Probing integrin selectivity: rational design of highly active and selective ligands for the $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha v\beta 3$ integrin receptor. *Angew Chem Int Ed Engl* 46:3571–3574. <https://doi.org/10.1002/anie.200700008>
344. Heckmann D, Meyer A, Laufer B, et al (2008) Rational design of highly active and selective ligands for the $\alpha 5\beta 1$ integrin receptor. *Chembiochem Eur J Chem Biol* 9:1397–1407. <https://doi.org/10.1002/cbic.200800045>
345. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, et al (2005) Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl*

Acad Sci U S A 102:15545–15550. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506580102>

346. Liberzon A, Birger C, Thorvaldsdóttir H, et al (2015) The Molecular Signatures Database (MSigDB) hallmark gene set collection. *Cell Syst* 1:417–425. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2015.12.004>
347. Foty R (2011) A simple hanging drop cell culture protocol for generation of 3D spheroids. *J Vis Exp JoVE* 2720. <https://doi.org/10.3791/2720>
348. Hoffmann A, Kunze R, Helluy X, et al (2016) High-Field MRI Reveals a Drastic Increase of Hypoxia-Induced Microhemorrhages upon Tissue Reoxygenation in the Mouse Brain with Strong Predominance in the Olfactory Bulb. *PloS One* 11:e0148441. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148441>
349. Lyons DG, Parpaleix A, Roche M, Charpak S (2016) Mapping oxygen concentration in the awake mouse brain. *eLife* 5:e12024. <https://doi.org/10.7554/eLife.12024>
350. Bayly SR, King RC, Honess DJ, et al (2008) In vitro and in vivo evaluations of a hydrophilic ⁶⁴Cu-bis(thiosemicarbazonato)-glucose conjugate for hypoxia imaging. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med* 49:1862–1868. <https://doi.org/10.2967/jnumed.108.054015>
351. Stieb S, Eleftheriou A, Warnock G, et al (2018) Longitudinal PET imaging of tumor hypoxia during the course of radiotherapy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 45:2201–2217. <https://doi.org/10.1007/s00259-018-4116-y>
352. Postema EJ, McEwan AJB, Riauka TA, et al (2009) Initial results of hypoxia imaging using 1- α -D: -(5-deoxy-5-[¹⁸F]-fluoroarabinofuranosyl)-2-nitroimidazole (¹⁸F-FAZA). *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 36:1565–1573. <https://doi.org/10.1007/s00259-009-1154-5>
353. Mapelli P, Zerbetto F, Incerti E, et al (2017) ¹⁸F-FAZA PET/CT Hypoxia Imaging of High-Grade Glioma Before and After Radiotherapy. *Clin Nucl Med* 42:e525–e526. <https://doi.org/10.1097/RLU.0000000000001850>
354. Choen S, Kent MS, Chaudhari AJ, et al (2023) Kinetic Evaluation of the Hypoxia Radiotracers [¹⁸F]FMISO and [¹⁸F]FAZA in Dogs with Spontaneous Tumors Using Dynamic PET/CT Imaging. *Nucl Med Mol Imaging* 57:16–25. <https://doi.org/10.1007/s13139-022-00780-4>
355. Carlin S, Zhang H, Reese M, et al (2014) A comparison of the imaging characteristics and microregional distribution of 4 hypoxia PET tracers. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med* 55:515–521. <https://doi.org/10.2967/jnumed.113.126615>
356. Notni J, Steiger K, Hoffmann F, et al (2016) Complementary, Selective PET Imaging of Integrin Subtypes $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha v\beta 3$ Using ⁶⁸Ga-Aquibepirin and ⁶⁸Ga-Avebetrin. *J Nucl*

- Med Off Publ Soc Nucl Med 57:460–466. <https://doi.org/10.2967/jnumed.115.165720>
357. Notni J, Steiger K, Hoffmann F, et al (2016) Variation of Specific Activities of ⁶⁸Ga-Aquibeptrin and ⁶⁸Ga-Avebetrin Enables Selective PET Imaging of Different Expression Levels of Integrins $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha v\beta 3$. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med* 57:1618–1624. <https://doi.org/10.2967/jnumed.116.173948>
358. Notni J, Wester H-J (2018) Re-thinking the role of radiometal isotopes: Towards a future concept for theranostic radiopharmaceuticals. *J Label Compd Radiopharm* 61:141–153. <https://doi.org/10.1002/jlcr.3582>
359. Hamidi H, Ivaska J (2018) Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* 18:533–548. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0038-z>
360. Bergonzini C, Kroese K, Zweemer AJM, Danen EHJ (2022) Targeting Integrins for Cancer Therapy - Disappointments and Opportunities. *Front Cell Dev Biol* 10:863850. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.863850>
361. Hanahan D (2022) Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov* 12:31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
362. Kuninty PR, Bansal R, De Geus SWL, et al (2019) ITGA5 inhibition in pancreatic stellate cells attenuates desmoplasia and potentiates efficacy of chemotherapy in pancreatic cancer. *Sci Adv* 5:eaax2770. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax2770>
363. Li S, Zhang N, Liu S, et al (2022) ITGA5 Is a Novel Oncogenic Biomarker and Correlates With Tumor Immune Microenvironment in Gliomas. *Front Oncol* 12:844144. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.844144>
364. Wang X, Che X, Yu Y, et al (2020) Hypoxia-autophagy axis induces VEGFA by peritoneal mesothelial cells to promote gastric cancer peritoneal metastasis through an integrin $\alpha 5$ -fibronectin pathway. *J Exp Clin Cancer Res CR* 39:221. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01703-x>
365. Xu R, Wang K, Rizzi JP, et al (2019) 3-[(1S,2S,3R)-2,3-Difluoro-1-hydroxy-7-methylsulfonylindan-4-yl]oxy-5-fluorobenzonitrile (PT2977), a Hypoxia-Inducible Factor 2 α (HIF-2 α) Inhibitor for the Treatment of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *J Med Chem* 62:6876–6893. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00719>
366. Scheuermann TH, Li Q, Ma H-W, et al (2013) Allosteric inhibition of hypoxia inducible factor-2 with small molecules. *Nat Chem Biol* 9:271–276. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1185>
367. Sato M, Tanaka T, Maeno T, et al (2002) Inducible expression of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia in human lung adenocarcinoma A549 cells. Role of Src family kinases-dependent pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol* 26:127–134.

<https://doi.org/10.1165/ajrcmb.26.1.4319>

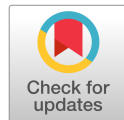
368. Wallace EM, Rizzi JP, Han G, et al (2016) A Small-Molecule Antagonist of HIF2 α Is Efficacious in Preclinical Models of Renal Cell Carcinoma. *Cancer Res* 76:5491–5500. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0473>
369. Lim TX, Ahamed M, Reutens DC (2022) The aryl hydrocarbon receptor: A diagnostic and therapeutic target in glioma. *Drug Discov Today* 27:422–435. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.09.021>
370. Zaragoza-Ojeda M, Apatiga-Vega E, Arenas-Huertero F (2021) Role of aryl hydrocarbon receptor in central nervous system tumors: Biological and therapeutic implications. *Oncol Lett* 21:460. <https://doi.org/10.3892/ol.2021.12721>
371. Jin U-H, Karki K, Cheng Y, et al (2019) The aryl hydrocarbon receptor is a tumor suppressor-like gene in glioblastoma. *J Biol Chem* 294:11342–11353. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.008882>
372. Thienpont B, Van Dyck L, Lambrechts D (2016) Tumors smother their epigenome. *Mol Cell Oncol* 3:e1240549. <https://doi.org/10.1080/23723556.2016.1240549>
373. Rybin MJ, Ivan ME, Ayad NG, Zeier Z (2021) Organoid Models of Glioblastoma and Their Role in Drug Discovery. *Front Cell Neurosci* 15:605255. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.605255>
374. Jacob F, Salinas RD, Zhang DY, et al (2020) A Patient-Derived Glioblastoma Organoid Model and Biobank Recapitulates Inter- and Intra-tumoral Heterogeneity. *Cell* 180:188-204.e22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.11.036>
375. Pine AR, Cirigliano SM, Nicholson JG, et al (2020) Tumor Microenvironment Is Critical for the Maintenance of Cellular States Found in Primary Glioblastomas. *Cancer Discov* 10:964–979. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-0057>
376. DeLay M, Jahangiri A, Carbonell WS, et al (2012) Microarray analysis verifies two distinct phenotypes of glioblastomas resistant to antiangiogenic therapy. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 18:2930–2942. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-2390>

Annexes

Annexe 1

Revue scientifique

**Biological relevance of RGD-integrin subtype-specific ligands in
cancer**



Accepted Article

Title: Biological relevance of RGD-integrin subtype-specific ligands in cancer

Authors: Saidu SANI, Mélissa MESSE, Quentin FUCHS, Marina PIERREVELCIN, Patrice LAQUERRIERE, Natacha ENTZ-WERLE, Damien REITA, Nelly ETIENNE-SELLOUM, Véronique BRUBAN, Laurence CHOULIER, Sophie MARTIN, and Monique Dontenwill

This manuscript has been accepted after peer review and appears as an Accepted Article online prior to editing, proofing, and formal publication of the final Version of Record (VoR). This work is currently citable by using the Digital Object Identifier (DOI) given below. The VoR will be published online in Early View as soon as possible and may be different to this Accepted Article as a result of editing. Readers should obtain the VoR from the journal website shown below when it is published to ensure accuracy of information. The authors are responsible for the content of this Accepted Article.

To be cited as: *ChemBioChem* 10.1002/cbic.202000626

Link to VoR: <https://doi.org/10.1002/cbic.202000626>

Biological relevance of RGD-integrin subtype-specific ligands in cancer

Saidu SANI^{a,b,\$}, Mélissa MESSE^{a,c} \$, Quentin FUCHS^a, Marina PIERREVELCIN^a, Patrice LAQUERRIERE^c, Natacha ENTZ-WERLE^{a,d}, Damien REITA^{a,e}, Nelly ETIENNE-SELLOUM^{a,f}, Véronique BRUBAN^a, Laurence CHOULIER^a, Sophie MARTIN^a and Monique DONTENWILL^{a,*}

a) Laboratoire de Bioimagerie et Pathologies (LBP), UMR CNRS 7021, Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, 74 route du Rhin, CS 60024, 67401 Illkirch cedex, France. Institut Thématique Interdisciplinaire InnoVec, Université de Strasbourg.

b) Cancer and Diabetic Research Group, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Science, Federal University Ndufu-Alike Ikwo, P.M.B 1010, Abakaliki, Ebonyi State. Nigeria.

c) Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien (IPHC), UMR CNRS 7178, Université de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France.

d) Pediatric Onco-Hematology Department, Pediatrics, University Hospital of Strasbourg, 1 avenue Molière, 67098 Strasbourg, France.

e) Department of Oncobiology, Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, University Hospital of Strasbourg, France

f) Institut du Cancer Strasbourg Europe (ICANS), Service de Pharmacie, Strasbourg, France.

\$ equal first authors

* corresponding author; monique.dontenwill@unistra.fr

ABSTRACT

Integrins are heterodimeric transmembrane proteins able to connect the cells with the micro-environment. They represent a family of receptors involved in almost all the hallmarks of cancer. Integrins recognizing the Arg-Gly-Asp (RGD) peptide in their natural extracellular-matrix ligands, have been particularly investigated as tumoral therapeutic targets. In the last 30 years, intense research was dedicated to design specific RGD-like ligands able to discriminate selectively the different RGD-recognizing integrins. Efforts of chemists led to the proposition of modified peptide or peptidomimetic libraries to be used for tumor targeting and/or for tumor imaging. Here we review, from the biological point of view, the rational underlying the need to clearly delineate each RGD-integrin subtype by selective tools. We describe the complex roles of RGD-integrins (mainly the most studied $\alpha\beta3$ and $\alpha5\beta1$ integrins) in tumors, the steps towards selective ligands and the current usefulness of such ligands. Although the impact of integrins in cancer is well acknowledged, the biological characteristics of each integrin subtype in a specific tumor are far from being completely

resolved. Selective ligands may help to reconsider integrins as therapeutic targets in specific clinical settings.

1 INTRODUCTION

Integrins are heterodimeric transmembrane proteins recognized first as adhesion molecules on specific extracellular matrix (ECM) components. They were further assigned to a true receptor family as their ability to initiate intracellular signaling pathways was largely emphasized. In the hallmarks of cancer as defined by Hanahan and Weinberg in 2000 ^[1], integrins were acknowledged as actors of self-sufficiency growth signaling, as regulators of anti-apoptotic signaling, angiogenesis and adaptation to new environments during invasion and metastasis of tumor cells. New hallmarks were added ten years later ^[2], in particular, the contribution of the tumor microenvironment (TME) to tumorigenesis. The TME does not only contain ECM but also recruits immune and stromal cells able to facilitate tumor growth. Changes in the repertoire and expression level of integrins in these non tumoral cells were described to support aggressive tumoral phenotypes ^[3]. Integrins were recognized early as therapeutic targets in cancers ^[4–6]. The most studied integrins in oncology belong to the RGD-integrin subfamily with $\alpha\beta3/\beta5$ and $\alpha5\beta1$ integrins in the spotlight for the two last decades ^[7]. The RGD (Arg-Gly-Asp) peptidic motif is found in ECM proteins (fibronectin, vitronectin, osteopontin, thrombospondin among others) and represents a selective binding site for integrins to ECM. Since activation of integrins by adhesion to their ECM ligands was shown to be essential to non-tumoral adherent cell survival ^[8,9], similar effect was expected for tumoral cells. Disrupting the interactions between integrins and ECM through RGD-like compounds appeared therefore a valuable strategy to trigger tumor cell apoptosis. Research in the design and characterization of integrin antagonists as cancer drug candidates has expanded rapidly ^[10]. Cilengitide, a cyclic RGD peptide, was the first $\alpha\beta3/\beta5$ integrin antagonist that reached the clinic ^[11]. Despite numerous preclinical encouraging data, cilengitide failed to improve glioblastoma patient's survival in phase II/III randomized clinical trials ^[12,13]. No better outcomes were obtained with Volociximab or MINT1526A, both $\alpha5\beta1$ integrin inhibitory antibodies, in several clinical settings ^[14,15]. These disappointing results impeded considerably research on RGD-integrins as therapeutic targets in oncology. However, recent reviews on integrins and cancer emphasize the need to reconsider the topic ^[6,7,16–20]. In this review we will focus mainly on RGD-integrins $\alpha\beta3$ and $\alpha5\beta1$ as most ligands have been designed for them. We will support the idea that integrins should still be considered as targets for anti-cancer therapies. In addition, ligands specific for definite subtypes of integrins will help in understanding how and where integrins must be targeted and will shed more light on the complexity of the topic.

2 RGD-integrins in cancer

2.1. Integrins in focal adhesion and cell migration

Common rules of integrins have been extensively reviewed elsewhere (for a recent review see ^[21]). In human, 18 α and 8 β subunits can combine to form heterodimeric transmembrane

proteins with specific ligand recognition properties. They share an architecture comprising an extracellular domain, a transmembrane region, and a generally short intracellular part. If specific adhesion to ligands lies in the composition of the $\alpha\beta$ extracellular head, integrins signal inside the cells by structural changes and recruitment of cytoplasmic proteins in complexes named adhesomes^[22]. Such complexes contain about 2000 proteins among which a highly dynamic “consensus adhesome” of 60 proteins may control integrin dependent cell adhesion and signaling^[23]. Mechanical forces can influence the assembly/disassembly of these macro-molecular structures adding a further level of complexity^[24]. Recent work pointed that $\beta3$ integrins were more strongly bound to their substrate in adhesion sites submitted to high tension than $\beta1$ integrins^[25]. The dynamic nanoscale organization of integrins and their regulators within focal adhesion points was shown to differ between $\beta3$ - and $\beta1$ -integrins in the control of signaling during cellular functions^[26,27]. Although both integrins recognize fibronectin, striking differences between $\alpha5\beta1$ and $\alpha\beta3$ integrin signaling pathways have been described in normal/tumoral cells. Most data addressed the question of focal adhesion point maturation and cell migration. $\alpha\beta3$ integrins were associated with persistent migration through activation of Rac-mDia1, whereas $\alpha5\beta1$ integrins were linked to RhoA-Rock-MyoDII pathway and random migration^[28]. The role of both fibronectin-binding integrin classes can begin with an initial competition followed by a cooperative crosstalk^[29]. Alternatively, blocking $\alpha\beta3$ integrin may activate $\alpha5\beta1$ integrin recycling back to membrane and increase cell migration^[30]. Distinct mechanisms and/or efficient crosstalk between both integrins have emerged over the years^[31]. New insights on focal adhesion maturation have been made possible using ligands specifically designed to target either $\alpha\beta3$ or $\alpha5\beta1$ integrins. It was shown that focal adhesion maturation on $\alpha5\beta1$ integrin-selective substrates is dependent on $\alpha\beta3$ integrin recruitment^[32–34]. Most of the above described knowledges were obtained in non-tumoral cells and translation to cancer cells may be even more decisive for their functional behavior as the expression of integrins and the ratio between $\alpha\beta3$ and $\alpha5\beta1$ integrin levels are specifically altered in tumoral tissues as is the case for the expression of their common ECM ligand fibronectin^[35].

2.2. Integrins in hallmarks of cancer

Thirty years ago integrin $\alpha\beta3$ emerged as a marker of tumoral neo-angiogenesis which was inhibited by specific antagonists such as cilengitide in preclinical models^[36–38]. These results were challenged as enhanced pathological angiogenesis and increased primary tumor growth were observed in mice lacking $\beta3$ or $\beta3/\beta5$ integrins^[39]. Specific overexpression of Integrin $\beta3$ in tumor cells suppressed tumor growth in a human model of gliomagenesis^[40]. Additionally, it was shown that nanomolar concentrations of RGD-mimetic $\alpha\beta3/\alpha\beta5$ inhibitors can enhance the growth of tumors in vivo by promoting VEGF-mediated angiogenesis^[41]. These data may explain in part why the therapies with these inhibitors have failed in humans^[12,13]. Other integrins participate in angiogenesis^[42] and the proangiogenic function of $\alpha5\beta1$ integrin has been clearly demonstrated^[43–45]. It was shown that reduced expression of the $\alpha5$ subunit is associated with reduced blood vessel formation and tumor growth^[46] and that $\alpha5\beta1$ integrin was overexpressed in tumoral vessels^[47]. It will be essential to reconsider and to revisit fundamental biology underlying how these integrins coordinate angiogenesis to successfully target them^[48].

Beside their role in angiogenesis, both integrins are overexpressed in many tumoral cells and thought to participate in enhanced survival and resistance to therapies [7,20,49–52]. This overexpression is mainly characterized at the mRNA level but less data exist at the protein level in cohorts of patients. The large transcriptomic databanks available nowadays for different tumor types help not only to define the inter-patient heterogeneity but also to correlate specific gene overexpression in tumor subtypes to patient survival. They have been used for high grade brain tumors (glioblastoma, GBM) for example [53]. In these tumors, $\alpha 5$ and $\beta 1$ integrin mRNAs are overexpressed in GBM versus normal brain but even more in the GBM mesenchymal subgroup [54]; it was less subgroup dependent for αv and $\beta 3$ integrin mRNA [55]. $\alpha 5$ and $\beta 1$ genes are included in the GBM mesenchymal signature so that they represent biomarkers of this aggressive subtype. Interestingly $\alpha 5$ integrin is also overexpressed in subclones of pediatric brain tumors [56]. Extensive evaluation and comparison of integrin gene expression in different tumors and tumor subtypes would be a first step towards efficient anti-integrin therapeutic strategies. Even if determination of integrin proteins in cell lines is a prerequisite to characterize functional implication in vitro, the missing link is however the characterization of integrins at the protein level in clinical studies. Few data on small- to medium-sized patient cohorts are available in the literature. Immunohistochemical analysis of αv or $\beta 3$ integrin protein expression in such cohorts were recently reported in osteosarcoma [57], hepatocellular carcinoma [58], leukemia [59] and the relationships with patient survival established. A retrospective immunohistochemical analysis of $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$ or $\alpha v\beta 8$ integrins in the glioblastoma patient cohorts of cilengitide clinical trials was done. It revealed that only $\alpha v\beta 3$ integrin expression in tumoral cells may predict benefit from cilengitide inhibition in a subset of patients with glioblastoma lacking *MGMT* promoter methylation [60]. Similarly, high levels of $\alpha 5$ or $\beta 1$ integrin protein expression corresponded to worse survival in oral carcinoma [61], triple negative breast cancer [62], pancreatic cancer [63], osteosarcoma [64] and colorectal cancer [65]. In the last period, data concerning integrin expressions and functions in non-tumoral cells in the microenvironment of tumors have been increasingly reported. Roles of integrins in Cancer Associated Fibroblasts (CAF) have been reviewed recently [66]. Engineered mice models allowed deletion of integrin gene in specific population of cells. It was shown that acute deletion of $\beta 3$ integrin in endothelial cells transiently diminished tumor growth and angiogenesis but long term deletion was ineffective [67]. Specific deletion of this gene in myeloid cells resulted in enhanced tumor growth [68] and increase of M2 macrophages at the tumor site thus promoting pro-tumoral functions in the microenvironment [69]. In another work, it was shown that tumor-associated macrophages (TAM) accumulation correlated with tumor cell expression of $\alpha v\beta 3$. This characteristic was used to design an $\alpha v\beta 3$ antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) against tumoral cells [70]. Two recent works underlined the expression of $\alpha 5$ integrin in the stroma of pancreatic [71] and colorectal tumors [72]. In the former study, inhibition of this integrin in pancreatic stellate cells attenuates tumorigenicity and potentiates efficacy of chemotherapy; in the latter, integrin depletion reduced the ability of CAF to promote cancer cell migration presumably by the down regulation of fibronectin.

All the non-exhaustive recent findings described in the first part of this review suggest that we need to better understand the roles of RGD-integrins in tumors. Encouraging preclinical discoveries with integrin inhibitors did not translate to clinical successes due to the complexity

of integrin biology. We will have to consider not only integrins in tumoral cells and vessels but also in the tumor microenvironment including the immune system (Figure 1). For this point, preclinical modeling of the clinical reality remains a challenge. The overexpression of some integrins in treatment-resistant cells or at metastatic sites must be thoroughly characterized. We will have to refine the positive or negative crosstalk between different integrins and their relationships in specific tumor area or in specific subset of patients. We need to compare different integrin subtypes more systematically to address their respective contribution to tumorigenicity and optimize the use of specific inhibitors. The availability of specific and selective integrin ligands is of great importance to go further on.

3 RGD-integrin ligands

Three main classes of integrin ligands have been proposed: antibodies, RGD-derived peptides and RGD-mimetic small molecules (Figures 2 and 3). More recently, aptamers (short nucleic acid sequences) have been included in this list [73,74]. While antibodies may be highly integrin subtype-specific by nature, RGD-derived ligands may recognize all RGD-binding integrins. Efforts towards achieving high selectivity of RGD-integrin ligands were actively made during the last two decades with, for example, the pioneer works of H. Kessler's group. Although recognizing the same tripeptide sequence in their natural ligands, similarities and differences between RGD-integrins have been highlighted based on their crystal structures. The structures of the extracellular fragment of integrins $\alpha v\beta 3$, $\alpha IIb\beta 3$ and $\alpha 5\beta 1$ were respectively resolved in 2001 [75,76], 2004 [77] and 2012 [78] helping to understand how ligands fit in the integrin binding sites.

3.1. Specificity, selectivity, and activity of integrin ligands.

Until today, integrin ligands were mainly tested for their capacity to bind integrins and to disrupt their interactions with their preferred natural ligands, using as a readout the role of integrin as adhesion proteins. For the evaluation of large libraries of compounds, tests must be rapid and reliable for lead characterization and optimization. They are based either on cell adhesion assays or on purified soluble integrins adhesion assays on specific ECM substrates. Results (expressed as IC50 values) obtained by both approaches are strongly variable depending on several parameters. Rational design of such tests appears crucial to compare ligands for one integrin or one ligand for different integrins. Recent works give insights in this topic [79,80]. Concerning activity, the notion of integrin antagonism versus agonism is fairly taken into account in the first steps of ligand selection. This point becomes critical in the field of oncology where disruption of cell adherence does not automatically relate to cell death. Moreover, RGD-like compounds may behave as true agonists mimicking the ECM natural ligand-dependent activation of integrins and subsequent pro-tumoral signaling pathways [41]. Very interestingly, recent developments on integrin pure antagonists have been published supporting a new area in integrin ligand research [81–84]. Based on electron microscopy, X-ray crystallography and receptor priming studies, it was shown that these new classes of integrin antagonists do not induce the integrin conformational changes associated with activation.

3.2 Antibodies

Specific antibodies against RGD-integrins contributed to study integrin activation-state regulation, integrin biology and integrin-based therapeutics. In contrast with peptides or peptide-mimetics acting essentially at the RGD binding domain, they cover a large set of epitopes localized in different structural parts of the α or β integrin subunits^[85]. They can be classified into three main groups: stimulatory or activation-specific, inhibitory and non-functional antibodies as largely described by the group of M. Humphries^[86–88]. It must be emphasized here that integrin conformations are known to be variable in relation to their functional status which addressed mainly their capacity to adhere to ECM ligands. The bent, the extended closed and the extended open global conformations are likely to be shared by the majority of integrins. Using electron microscopy and biophysical thermodynamic analysis on $\alpha 5\beta 1$ integrin and with the help of specific antibodies, it was shown that only the extended-open conformation mediates adhesion to fibronectin and that intrinsic affinity depends on specific integrin conformational states^[89,90]. Antibodies against $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha v\beta 3$ integrins are thus widely used in preclinical studies to depict fundamental cues, label or inhibit these integrins. Among inhibitory antibodies, some reached early phases clinical trials (volociximab for $\alpha 5\beta 1$ integrin and Intratumumab/CNTO95 or abituzumab for $\alpha v\beta x$ integrin)^[91,92]. But despite being well tolerated, they failed to progress to phase II/III trials.

3.3. RGD-derived peptides

Cilengitide, a cyclic pentapeptide, developed twenty years ago by Horst Kessler and his group, became the prototype of RGD-derived peptides with enhanced selectivity towards $\alpha v\beta 3$ integrin. The story of cilengitide is extensively described in^[93] explaining the different steps of development from a linear, flexible and non-selective RGD peptide to a cyclic, rigid and selective one. In the search for peptides with increased selectivity either towards $\alpha v\beta 3$ or $\alpha 5\beta 1$ integrins, multiple strategies have been explored using isoDGR motifs^[94,95], cyclic azapeptides^[96] or di-N-methylation of cilengitide^[97]. Cilengitide remains the reference compound in the field and integrin binding characteristics of new integrin ligands are often compared to it. Other groups worked around the cyclic pentapeptide structure. For example, cyclic RGD pseudopentapeptide incorporating bicyclic lactams were described^[98] and further optimized leading to potent antagonists of $\alpha v\beta 3/\beta 5$ integrins^[98–101]. Series of cyclo-octapeptides including RGD have also been described. Based on One-bead One-Compound combinatorial library technology, the lead compound LXW7 was discovered^[102] and optimized as LXW64 and LXZ2^[103,104]. These compounds proved able to selectively label tumoral cells expressing $\alpha v\beta 3$ in vitro and in vivo. Recently, a novel specific integrin $\alpha v\beta 3$ targeting linear pentapeptide, RWrNK, was described^[105]. Its development used a structure-based pharmacophore method integrated with molecular docking. Bifunctional diketopiperazines were introduced into cyclic peptidomimetics containing the RGD sequence (DKP-RGD) leading to compounds specific for $\alpha v\beta 3/\beta 5$ integrins^[106]. Interestingly, these compounds exhibited binding affinities towards $\alpha 5\beta 1$ integrin but always lower than for $\alpha v\beta 3$ integrin^[107]. Thus using several approaches, numerous peptidic ligands specific/ selective for $\alpha v\beta 3/\beta 5$ integrins have been made available unlike those for $\alpha 5\beta 1$ integrin. The isoDGR peptide library^[95] was screened to confer to the small lead pentapeptide selectivity towards the fibronectin-binding integrins $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha v\beta 6$ ^[94]. Through sequential N-methylation, the biselective c(phg-isoDGR-k) was converted to c(phg-isoDGR-(NMe)k) which appeared as a selective $\alpha 5\beta 1$ integrin ligand

^[108]. It should be noted that other peptides highly selective for $\alpha 5\beta 1$ integrin have also been proposed without an RGD sequence. The first example is the Cys-Arg-Arg-Glu-Thr-Ala-Trp-Ala-Cys (CRRETAWAC) peptide originally discovered in 1993 from the screening of a phage-display library in which heptapeptides were flanked by cysteine residues, thus making the inserts potentially cyclic ^[109]. Further investigations showed that residues of the $\alpha 5$ subunit involved in recognition of RRETAWA are predicted to lie close to those involved in RGD binding but do not completely overlap ^[110]. The second example is ATN161, a capped five amino-acid peptide derived from the synergy region PHSRN of fibronectin (which contributes to high affinity recognition of fibronectin by $\alpha 5\beta 1$ integrin). It was shown to be very selective for $\alpha 5\beta 1$ integrin over $\alpha \nu\beta 3/\beta 5/\beta 6/\beta 8$ integrins in an ELISA test using soluble purified integrins ^[79]. Compared to other integrin ligands, ATN-161 has the particularity of not competing with the fibronectin binding and thus is unable to detach the cells from the matrix. It was included in two clinical trials (for advanced renal cancer and recurrent glioblastoma) but no results were posted to date.

Panels of selective RGD-derived peptides are available. Few of them have been studied as true antagonists of integrin signaling pathways and pro-tumoral effects. However, knowledge on the mode of binding of RGD-containing peptidomimetics has largely increased with the advent of computer-assisted docking studies in the crystal structure of the integrin binding sites. This helped and will further improve the design of new ligands.

3.4. Small molecules as RGD-mimetics.

In parallel with the design of RGD-derived peptides, search for RGD-mimetics, led to the discovery of selective more stable and bioavailable small molecules as integrin ligands. The first goal of research was to obtain selectivity for $\alpha \nu\beta 3$ versus $\alpha IIb\beta 3$ integrins. This latter RGD-integrin is involved in platelets regulation and undesirable antagonist side effects had to be avoided. The second goal was to evaluate the possibility of distinguishing the $\alpha \nu\beta 3$ integrin from the $\alpha 5\beta 1$ in order to have highly selective ligands even though their RGD binding site are highly homologous. Both goals were achieved by pharmaceutical and academic groups. A review recapitulated the $\alpha \nu\beta 3$ antagonists available in 2000 ^[111]. The field has progressed and began to focus also on $\alpha 5\beta 1$ integrin. The initial series of $\alpha \nu\beta 3$ integrin ligands were generally also recognized by $\alpha 5\beta 1$ integrin. A series of nonpeptide integrin ligands containing spirocyclic scaffolds was described including SJ749 and SJ755, the first highly selective molecules for $\alpha 5\beta 1$ integrin ^[112,113]. Their biological effects have been characterized : they behave as potential enhancers of antibiotic efficacy by interfering with $\alpha 5\beta 1$ integrin/fibronectin/M1 protein-dependent bacterial entry in epithelial cells ^[114], as blockers of angiogenesis ^[115] and as inhibitors of proliferation and migration of glioma cells ^[116,117]. Docking of SJ749 into a built 3D model of the binding domain of $\alpha 5\beta 1$ integrin has permitted the identification of two potentially important and unique regions of this integrin compared to others ^[118]. This model was largely used for the rational design of highly active and selective ligands for $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha \nu\beta 3$ integrins achieving a selectivity ratio as high as 10000 ^[119–121]. The differentiation between the $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha \nu\beta 3$ integrin-dependent glioma migration modes was possible using such ligands and revealed that $\alpha \nu\beta 3$ integrin antagonists increased single cell migration whereas $\alpha 5\beta 1$ integrin antagonists decreased it ^[122]. Additionally, we showed that, unlike

$\alpha\beta3$ integrin antagonists, those selective for $\alpha5\beta1$ integrin pushed glioma cells towards apoptosis when combined with chemotherapy or p53 activators^[123–125]. Starting from a virtual combinatorial library designed to cover the chemical space specific for RGD-like compounds, Stragies et al synthesized dual $\alpha5\beta1/\alpha\beta3$ specific inhibitors^[126]. Optimization of one lead gave JSM6427 which exhibits 10000 times more affinity for $\alpha5\beta1$ versus $\alpha\beta3$ and showed inhibitory activity in several models of pathological angiogenesis^[127–129]. It was further developed for the treatment of macular degeneration but did not overpass the phase 1 clinical trial.

More recently, new β -lactam derivatives were designed to target integrins. Interestingly, the concept of integrin agonists has gradually emerged since compounds with azetidinone as the only cyclic framework increased integrin-dependent cell adhesion rather than decreasing it^[130]. Substituent variations around the β -lactam core led to the discovery of selective compounds for different integrins including $\alpha5\beta1$ and $\alpha\beta3/\beta5$. Similar selectivity ranges were obtained for these integrins by competitive solid-phase binding assays using purified integrins and cell-adhesion based assays^[131,132]. Increase in cell adhesion by integrin “agonists” was corroborated by an increase in integrin-dependent ERK signaling pathway. First characterized as racemic compounds, it was demonstrated that only (S)-enantiomers maintain the agonist activity thus revealing an important stereochemical requirement for integrin recognition and activation^[133]. Whether integrin agonists could play a role as therapeutic drugs in oncology remains to be demonstrated^[134].

Taking together all the data concerning these RGD-mimetic ligands, structural determinants discriminating different RGD-binding integrins have been characterized based on compound structure-activity relationships and computer-assisted docking on crystallographic integrin models. As is the case for the RGD-derived peptides, few of these original ligands are currently under investigations to check their potential anti-tumoral effects. The main knowledge concerns their ability to inhibit/increase integrin-dependent cell adhesion. Analysis of their roles on integrin signaling pathways has become an urgent need to more clearly decipher the biological cues of specific RGD-integrins in tumoral or surrounding stromal cells.

4 Current applications of RGD-ligands

Huge efforts to get more and more selective RGD-ligands led to interesting libraries of compounds. Due to the failure of the lead cilengitide to improve patient survival in clinical trials, none of them appears to be developed as anti-cancer therapeutics. Currently they are being exploited as useful tools either as tumor diagnostic or tumor targeting markers. They also serve for functionalization of biomaterials helping to solve several selective integrin-dependent cell phenotypes.

4.1. RGD-ligands for tumor diagnostic

As stated above, the input of RGD-integrins in hallmarks of cancer is largely acknowledged. Their heterogeneous expression in patient tumors closed the way to use their antagonists as therapeutics in unselected cohort of patients. Characterization of the integrin expression panel by a noninvasive way may be of importance to delineate patient subpopulations and adapt therapies. From early 2000 to 2015, huge efforts to characterize Positron Emission

Tomography (PET) markers for $\alpha\beta3$ integrin were made. Radiolabeled cyclic RGD peptides (with ^{18}F , $^{64}\text{Cu}/^{68}\text{Ga}$ tracers) were thoroughly designed and characterized (for review see [135] and [136]). Several were investigated in the clinic [137–139]. By contrast very few radiotracers specific for $\alpha5\beta1$ integrin are available (Table 1) as this integrin moved in the forefront of cancer research more recently, in particular for its unambiguous role in neoangiogenesis. The first $\alpha5\beta1$ -selective integrin antagonist useful as a PET tracer was described in 2013 by the group of H. Kessler [140]. A selective $\alpha5\beta1$ integrin peptidomimetic (described in [119,141]) was functionalized with the NODAGA chelator, labelled with ^{68}Ga and named FR366 [142]. FR366 has a high affinity for $\alpha5\beta1$ integrin, a specific integrin uptake in vivo and a good tumor-to-background contrast. A further step was achieved by trimerization of an azide-functionalized pseudopeptide [143] using a 1-pot click chemistry procedure with a TRAP chelator scaffold [144]. The compound ^{68}Ga -Aquibepirin obtained by this way has affinity and selectivity for $\alpha5\beta1$ integrins and gave high contrast PET imaging in vivo [145,146]. A similar approach was used with c(phg-isoDGR-(NMe)k peptide (see above) which was conjugated to pentynoic acid on the lysine side chain and then trimerized by the TRAP chelator. In a proof of concept experiment this compound labeled with ^{68}Ga behaved as a potential PET agent for noninvasive imaging of $\alpha5\beta1$ expressing tumors [108]. Other PET peptidic radiotracers for $\alpha5\beta1$ integrin were proposed (based on CRETAVAC or KSSPHSRN(SG)5RGDSP linear peptides) but they lack an efficient accumulation in $\alpha5\beta1$ integrin-positive tumors in vivo [147,148].

4.2. RGD-ligands for tumor targeting

Integrins appear as valuable entry door for anti-cancer drugs in a tumor selective way. Based on the overexpression of $\alpha\beta3$ and $\alpha5\beta1$ integrins in tumor vasculature and cells and their ability to get internalized through endosomes [149], strategies have been developed to achieve specific transport for therapeutics. RGD-ligands coupled to cytotoxic drugs can serve as direct carriers and are intensively investigated. The drug is coupled to the RGD peptide by a linker which may be cleaved inside the cell to allow the therapeutic effect (for review see [150,151]). Examples of RGD-ligands and cytotoxic drug complexes can be found in two recent reviews ([152,153]). Recent advances in the field included dual-functional complexes that incorporate one fluorophore on one side for imaging and a cytotoxic pro-drug on the other side [154]. But currently intense efforts are mainly directed towards nanocarriers functionalized with RGD-ligands. We will not develop here this topic as recent reviews are available to which readers can refer [155–161].

Although huge literature exists concerning the applications available with RGD-ligands for targeting tumors, they appear, to our knowledge, non-dedicated to address specifically the selectivity of RGD-integrins. The RGD-ligands mainly used in these studies have been designed to target $\alpha\beta3$ integrins. From a biologist point of view, further improvements will be achieved when tailored systems will be proposed to target specifically either $\alpha\beta3$ or $\alpha5\beta1$ integrin expressing tumors.

5 Summary and outlook

In this review we focused on two RGD-integrins which are important players in oncology, the $\alpha\beta3$ and $\alpha5\beta1$ integrins. It is important to note that other RGD-integrins become under

spotlight as for example the $\alpha\beta6$ integrin ^[162]. Selective Inhibitors and PET tracers have been designed ^[163–167] which will be useful to detect and treat epithelial carcinoma for example. Integrins remain therapeutic targets in oncology (as assessed by 2 recent reviews ^[168,169]) but we have to reconsider their roles in the area of personalized medicine.

Our goal in this review was to give the biologist point of view regarding the chemical approaches to design selective compounds differentiating RGD-integrins in preclinical and clinical settings. According to the data (even the recent ones), the $\alpha\beta3$ integrin still remains the gold standard tumoral target. Efforts are however made towards other integrins. This is an important point in order to have a better knowledge of the complex integrin world. To go further, we have to set up a virtuous circle by increasing the knowledge on one particular integrin using selective ligands and inversely to take into account this knowledge to design new ligands with improved efficacy. The biological tests are crucial as are the preclinical models. It is time to progress towards models that better reflect the clinical reality to test integrin antagonists. For example, replacing 2D by 3D sphere cultures and hence by organoids/tumoroids to test integrin antagonists is nowadays accessible steps. In addition, we have to develop high/medium throughput assays aiming to characterize the biological effects of RGD-ligands on not only integrin/cell adhesion but also on oncogenic signaling pathways. We have also to keep in mind that integrin antagonists/agonists may inhibit/activate general mechanisms which are under the control of several players. It will be of great interest to evaluate more thoroughly the benefit of their association with other targeted therapies. Transdisciplinary networks involving biologists, clinicians and chemists will greatly help to go through preclinical investigations towards clinical benefits with integrin ligands.

Acknowledgements

We are thankful for financial support from Institut National du Cancer (grant INCA_11527), Ligue contre le Cancer (CCIR Est), Association pour la Recherche contre le Cancer, CNRS (grant 80 PRIME), the University of Strasbourg (France), the Alex Akwueme Federal University Ndufu-Alike Ikwo (Nigeria), the Association Lyons Club de Niederbronn Les Bains.

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest to declare.

Keywords : RGD-integrins, ligand design, inhibitors, peptides, cancer

References

- [1] D. Hanahan, R. A. Weinberg, *Cell* **2000**, *100*, 57–70.
- [2] D. Hanahan, R. A. Weinberg, *Cell* **2011**, *144*, 646–674.
- [3] J. A. Eble, D. Gullberg, *Cancers* **2019**, *11*, DOI 10.3390/cancers11091296.
- [4] J. S. Desgrosellier, D. A. Cheresh, *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 9–22.
- [5] D. Bianconi, M. Unseld, G. W. Prager, *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, DOI 10.3390/ijms17122037.
- [6] S. Raab-Westphal, J. F. Marshall, S. L. Goodman, *Cancers* **2017**, *9*, 110.

- [7] M. Nieberler, U. Reuning, F. Reichart, J. Notni, H.-J. Wester, M. Schwaiger, M. Weinmüller, A. Räder, K. Steiger, H. Kessler, *Cancers* **2017**, *9*, 116.
- [8] S. M. Frisch, K. Vuori, E. Ruoslahti, P. Y. Chan-Hui, *J. Cell Biol.* **1996**, *134*, 793–799.
- [9] D. G. Stupack, X. S. Puente, S. Boutsaboualoy, C. M. Storgard, D. A. Cheresch, *J. Cell Biol.* **2001**, *155*, 459–470.
- [10] A. Meyer, J. Auernheimer, A. Modlinger, H. Kessler, *Curr. Pharm. Des.* **2006**, *12*, 2723–2747.
- [11] C. Mas-Moruno, F. Rechenmacher, H. Kessler, *Anticancer Agents Med. Chem.* **2010**, *10*, 753–768.
- [12] R. Stupp, M. E. Hegi, T. Gorlia, S. C. Erridge, J. Perry, Y.-K. Hong, K. D. Aldape, B. Lhermitte, T. Pietsch, D. Grujicic, J. P. Steinbach, W. Wick, R. Tarnawski, D.-H. Nam, P. Hau, A. Weyerbrock, M. J. B. Taphoorn, C.-C. Shen, N. Rao, L. Thurzo, U. Herrlinger, T. Gupta, R.-D. Kortmann, K. Adamska, C. McBain, A. A. Brandes, J. C. Tonn, O. Schnell, T. Wiegel, C.-Y. Kim, L. B. Nabors, D. A. Reardon, M. J. van den Bent, C. Hicking, A. Markivskyy, M. Picard, M. Weller, *Lancet Oncol.* **2014**, *15*, 1100–1108.
- [13] L. B. Nabors, K. L. Fink, T. Mikkelsen, D. Grujicic, R. Tarnawski, D. H. Nam, M. Mazurkiewicz, M. Salacz, L. Ashby, V. Zagonel, R. Depenni, J. R. Perry, C. Hicking, M. Picard, M. E. Hegi, B. Lhermitte, D. A. Reardon, *Neuro-Oncol.* **2015**, *17*, 708–717.
- [14] C. D. Weekes, L. S. Rosen, A. Capasso, K. M. Wong, W. Ye, M. Anderson, B. McCall, J. Fredrickson, E. Wakshull, S. Eppler, Q. Shon-Nguyen, R. Desai, M. Huseni, P. S. Hegde, T. Pourmohamad, I. Rhee, A. Bessudo, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2018**, *82*, 339–351.
- [15] K. M. Bell-McGuinn, C. M. Matthews, S. N. Ho, M. Barve, L. Gilbert, R. T. Penson, E. Lengyel, R. Palaparthi, K. Gilder, A. Vassos, W. McAuliffe, S. Weymer, J. Barton, R. J. Schilder, *Gynecol. Oncol.* **2011**, *121*, 273–279.
- [16] D. Bianconi, M. Unseld, G. W. Prager, *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 2037.
- [17] A. Ellert-Miklaszewska, K. Poleszak, M. Pasierbinska, B. Kaminska, *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 888.
- [18] M. Janiszewska, M. C. Primi, T. Izard, *J. Biol. Chem.* **2020**, *295*, 2495–2505.
- [19] H. Hamidi, J. Ivaska, *Nat. Rev. Cancer* **2018**, *18*, 533–548.
- [20] A.-F. Blandin, G. Renner, M. Lehmann, I. Lelong-Rebel, S. Martin, M. Dontenwill, *Front. Pharmacol.* **2015**, *6*, 279.
- [21] Y. A. Kadry, D. A. Calderwood, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2020**, *1862*, 183206.
- [22] R. O. Hynes, *Cell* **2002**, *110*, 673–687.
- [23] E. R. Horton, A. Byron, J. A. Askari, D. H. J. Ng, A. Millon-Frémillon, J. Robertson, E. J. Koper, N. R. Paul, S. Warwood, D. Knight, J. D. Humphries, M. J. Humphries, *Nat. Cell Biol.* **2015**, *17*, 1577–1587.
- [24] L. MacKay, A. Khadra, *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2020**, *18*, 393–416.
- [25] R. De Mets, I. Wang, M. Balland, C. Oddou, P. Moreau, B. Fourcade, C. Albiges-Rizo, A. Delon, O. Destaing, *Mol. Biol. Cell* **2018**, *30*, 181–190.
- [26] O. Rossier, V. Oceau, J.-B. Sibarita, C. Leduc, B. Tessier, D. Nair, V. Gatterdam, O. Destaing, C. Albigès-Rizo, R. Tampé, L. Cagnet, D. Choquet, B. Lounis, G. Giannone, *Nat. Cell Biol.* **2012**, *14*, 1057–1067.
- [27] N. Strohmeier, M. Bharadwaj, M. Costell, R. Fässler, D. J. Müller, *Nat. Mater.* **2017**, *16*, 1262–1270.
- [28] H. B. Schiller, M.-R. Hermann, J. Polleux, T. Vignaud, S. Zanivan, C. C. Friedel, Z. Sun, A. Raducanu, K.-E. Gottschalk, M. Théry, M. Mann, R. Fässler, *Nat. Cell Biol.* **2013**, *15*, 625–636.

- [29] M. Bharadwaj, N. Strohmeyer, G. P. Colo, J. Helenius, N. Beerenwinkel, H. B. Schiller, R. Fässler, D. J. Müller, *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 14348.
- [30] G. Jacquemet, D. M. Green, R. E. Bridgewater, A. von Kriegsheim, M. J. Humphries, J. C. Norman, P. T. Caswell, *J. Cell Biol.* **2013**, *202*, 917–935.
- [31] I. Samaržija, A. Dekanić, J. D. Humphries, M. Paradžik, N. Stojanović, M. J. Humphries, A. Ambriović-Ristov, *Cancers* **2020**, *12*, 1910.
- [32] D. Missirlis, T. Haraszti, C. v. C. Scheele, T. Wiegand, C. Diaz, S. Neubauer, F. Rechenmacher, H. Kessler, J. P. Spatz, *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 23258.
- [33] C. Diaz, S. Neubauer, F. Rechenmacher, H. Kessler, D. Missirlis, *J. Cell Sci.* **2020**, *133*, DOI 10.1242/jcs.232702.
- [34] V. Schaufler, H. Czichos-Medda, V. Hirschfeld-Warnecken, S. Neubauer, F. Rechenmacher, R. Medda, H. Kessler, B. Geiger, J. P. Spatz, E. A. Cavalcanti-Adam, *Cell Adhes. Migr.* **2016**, *10*, 505–515.
- [35] G. Efthymiou, A. Saint, M. Ruff, Z. Rekad, D. Ciais, E. Van Obberghen-Schilling, *Front. Oncol.* **2020**, *10*, DOI 10.3389/fonc.2020.00641.
- [36] P. C. Brooks, R. A. Clark, D. A. Cheresch, *Science* **1994**, *264*, 569–571.
- [37] P. C. Brooks, A. M. Montgomery, M. Rosenfeld, R. A. Reisfeld, T. Hu, G. Klier, D. A. Cheresch, *Cell* **1994**, *79*, 1157–1164.
- [38] S. Yamada, X.-Y. Bu, V. Khankaldyyan, I. Gonzales-Gomez, J. G. McComb, W. E. Laug, *Neurosurgery* **2006**, *59*, 1304–1312; discussion 1312.
- [39] D. Taverna, H. Moher, D. Crowley, L. Borsig, A. Varki, R. O. Hynes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 763–768.
- [40] M. Kanamori, S. R. Vanden Berg, G. Bergers, M. S. Berger, R. O. Pieper, *Cancer Res.* **2004**, *64*, 2751–2758.
- [41] A. R. Reynolds, I. R. Hart, A. R. Watson, J. C. Welte, R. G. Silva, S. D. Robinson, G. Da Violante, M. Gourlaouen, M. Salih, M. C. Jones, D. T. Jones, G. Saunders, V. Kostourou, F. Perron-Sierra, J. C. Norman, G. C. Tucker, K. M. Hodivala-Dilke, *Nat. Med.* **2009**, *15*, 392–400.
- [42] C. J. Avraamides, B. Garmy-Susini, J. A. Varner, *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 604–617.
- [43] L. Li, J. Welser-Alves, A. van der Flier, A. Boroujerdi, R. O. Hynes, R. Milner, *Exp. Neurol.* **2012**, *237*, 46–54.
- [44] D. Pang, L. Wang, J. Dong, X. Lai, Q. Huang, R. Milner, L. Li, *Exp. Mol. Med.* **2018**, *50*, 117.
- [45] S. E. Francis, K. L. Goh, K. Hodivala-Dilke, B. L. Bader, M. Stark, D. Davidson, R. O. Hynes, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2002**, *22*, 927–933.
- [46] D. Taverna, R. O. Hynes, *Cancer Res.* **2001**, *61*, 5255–5261.
- [47] P. Parsons-Wingerter, I. M. Kasman, S. Norberg, A. Magnussen, S. Zanivan, A. Rissone, P. Baluk, C. J. Favre, U. Jeffry, R. Murray, D. M. McDonald, *Am. J. Pathol.* **2005**, *167*, 193–211.
- [48] F. Demircioglu, K. Hodivala-Dilke, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2016**, *42*, 121–127.
- [49] E. Cruz da Silva, M. Dontenwill, L. Choulier, M. Lehmann, *Cancers* **2019**, *11*, DOI 10.3390/cancers11050692.
- [50] S. Martin, H. Janouskova, M. Dontenwill, *Front. Oncol.* **2012**, *2*, 157.
- [51] F. Schaffner, A. M. Ray, M. Dontenwill, *Cancers* **2013**, *5*, 27–47.
- [52] L. Seguin, J. S. Desgrosellier, S. M. Weis, D. A. Cheresch, *Trends Cell Biol.* **2015**, *25*, 234–240.
- [53] R. G. W. Verhaak, K. A. Hoadley, E. Purdom, V. Wang, Y. Qi, M. D. Wilkerson, C. R. Miller, L. Ding, T. Golub, J. P. Mesirov, G. Alexe, M. Lawrence, M. O’Kelly, P. Tamayo, B. A. Weir, S. Gabriel, W. Winckler, S. Gupta, L. Jakkula, H. S. Feiler, J. G. Hodgson, C. D. James, J. N. Sarkaria, C. Brennan, A. Kahn, P. T. Spellman, R. K.

- Wilson, T. P. Speed, J. W. Gray, M. Meyerson, G. Getz, C. M. Perou, D. N. Hayes, Cancer Genome Atlas Research Network, *Cancer Cell* **2010**, *17*, 98–110.
- [54] Y.-B. Pan, S. Wang, B. Yang, Z. Jiang, C. Lenahan, J. Wang, J. Zhang, A. Shao, *J. Cell. Mol. Med.* **2020**, *24*, 3901–3916.
- [55] L. Malric, S. Monferran, J. Gilhodes, S. Boyrie, P. Dahan, N. Skuli, J. Sesen, T. Filleron, A. Kowalski-Chauvel, E. Cohen-Jonathan Moyal, C. Toulas, A. Lemarié, *Oncotarget* **2017**, *8*, 86947–86968.
- [56] M. Vinci, A. Burford, V. Molinari, K. Kessler, S. Popov, M. Clarke, K. R. Taylor, H. N. Pemberton, C. J. Lord, A. Gutteridge, T. Forshew, D. Carvalho, L. V. Marshall, E. Y. Qin, W. J. Ingram, A. S. Moore, H.-K. Ng, S. Trabelsi, D. H'mida-Ben Brahim, N. Entz-Werle, S. Zacharoulis, S. Vaidya, H. C. Mandeville, L. R. Bridges, A. J. Martin, S. Al-Sarraj, C. Chandler, M. Sunol, J. Mora, C. de Torres, O. Cruz, A. M. Carcaboso, M. Monje, A. Mackay, C. Jones, *Nat. Med.* **2018**, *24*, 1204–1215.
- [57] K. Shi, S.-L. Wang, B. Shen, F.-Q. Yu, D.-F. Weng, J.-H. Lin, *World J. Surg. Oncol.* **2019**, *17*, 23.
- [58] F. Sun, J. Wang, Q. Sun, F. Li, H. Gao, L. Xu, J. Zhang, X. Sun, Y. Tian, Q. Zhao, H. Shen, K. Zhang, J. Liu, *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2019**, *38*, 449.
- [59] S. Johansen, A. K. Brenner, S. Bartaula-Brevik, H. Reikvam, Ø. Bruserud, *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, DOI 10.3390/ijms19010251.
- [60] M. Weller, L. B. Nabors, T. Gorlia, H. Leske, E. Rushing, P. Bady, C. Hicking, J. Perry, Y.-K. Hong, P. Roth, W. Wick, S. L. Goodman, M. E. Hegi, M. Picard, H. Moch, J. Straub, R. Stupp, *Oncotarget* **2016**, *7*, 15018–15032.
- [61] Y. Deng, Q. Wan, W. Yan, “<p>Integrin $\alpha 5$ /ITGA5 Promotes The Proliferation, Migration, Invasion And Progression Of Oral Squamous Carcinoma By Epithelial–Mesenchymal Transition</p>,” can be found under <https://www.dovepress.com/integrin-alpha5itga5-promotes-the-proliferation-migration-invasion-and-peer-reviewed-article-CMAR>, **2019**.
- [62] F. Ou-Yang, M.-R. Pan, S.-J. Chang, C.-C. Wu, S.-Y. Fang, C.-L. Li, M.-F. Hou, C.-W. Luo, *Life Sci.* **2019**, *238*, 116963.
- [63] K. Taniuchi, M. Furihata, S. Naganuma, M. Sakaguchi, T. Saibara, *PLOS ONE* **2019**, *14*, e0217920.
- [64] R. Li, Y. Shi, S. Zhao, T. Shi, G. Zhang, *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *123*, 1035–1043.
- [65] Z. Niu, P. Xu, D. Zhu, W. Tang, M. Ji, Q. Lin, T. Liu, L. Ren, Y. Wei, J. Xu, *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2018**, *11*, 4771–4783.
- [66] C. Zeltz, I. Primac, P. Erusappan, J. Alam, A. Noel, D. Gullberg, *Semin. Cancer Biol.* **2020**, *62*, 166–181.
- [67] V. Steri, T. S. Ellison, A. M. Gontarczyk, K. Weilbaecher, J. G. Schneider, D. Edwards, M. Fruttiger, K. M. Hodivala-Dilke, S. D. Robinson, *Circ. Res.* **2014**, *114*, 79–91.
- [68] E. A. Morgan, J. G. Schneider, T. E. Baroni, O. Uluçkan, E. Heller, M. A. Hurchla, H. Deng, D. Floyd, A. Berdy, J. L. Prior, D. Piwnica-Worms, S. L. Teitelbaum, F. Patrick Ross, K. N. Weilbaecher, *FASEB J.* **2010**, *24*, 1117–1127.
- [69] X. Su, A. K. Esser, S. R. Amend, J. Xiang, Y. Xu, M. H. Ross, G. C. Fox, T. Kobayashi, V. Steri, K. Roomp, F. Fontana, M. A. Hurchla, B. L. Knolhoff, M. A. Meyer, E. A. Morgan, J. C. Tomasson, J. S. Novack, W. Zou, R. Faccio, D. V. Novack, S. D. Robinson, S. L. Teitelbaum, D. G. DeNardo, J. G. Schneider, K. N. Weilbaecher, *Cancer Res.* **2016**, *76*, 3484–3495.
- [70] H. I. Wettersten, S. M. Weis, P. Pathria, T. Von Schalscha, T. Minami, J. A. Varner, D. A. Cheresch, *Cancer Res.* **2019**, *79*, 5048–5059.

- [71] P. R. Kuninty, R. Bansal, S. W. L. De Geus, D. F. Mardhian, J. Schnittert, J. van Baarlen, G. Storm, M. F. Bijlsma, H. W. van Laarhoven, J. M. Metselaar, P. J. K. Kuppen, A. L. Vahrmeijer, A. Östman, C. F. M. Sier, J. Prakash, *Sci. Adv.* **2019**, *5*, eaax2770.
- [72] L. Lu, R. Xie, R. Wei, C. Cai, D. Bi, D. Yin, H. Liu, J. Zheng, Y. Zhang, F. Song, Y. Gao, L. Tan, Q. Wei, H. Qin, *Mol. Oncol.* **2019**, *13*, 2697–2714.
- [73] P. Fechter, E. Cruz Da Silva, M.-C. Mercier, F. Noulet, N. Etienne-Seloum, D. Guenot, M. Lehmann, R. Vauchelles, S. Martin, I. Lelong-Rebel, A.-M. Ray, C. Seguin, M. Dontenwill, L. Choulier, *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **2019**, *17*, 63–77.
- [74] Marie-Cécile Mercier, Monique Dontenwill, Laurence Choulier, *Cancers* **2017**, *9*, 69.
- [75] J.-P. Xiong, *Science* **2001**, *294*, 339–345.
- [76] J.-P. Xiong, *Science* **2002**, *296*, 151–155.
- [77] T. Xiao, J. Takagi, B. S. Collier, J.-H. Wang, T. A. Springer, *Nature* **2004**, *432*, 59–67.
- [78] M. Nagae, S. Re, E. Mihara, T. Nogi, Y. Sugita, J. Takagi, *J. Cell Biol.* **2012**, *197*, 131–140.
- [79] T. G. Kapp, F. Rechenmacher, S. Neubauer, O. V. Maltsev, E. A. Cavalcanti-Adam, R. Zarka, U. Reuning, J. Notni, H.-J. Wester, C. Mas-Moruno, J. Spatz, B. Geiger, H. Kessler, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 39805.
- [80] R. J. D. Hatley, S. J. F. Macdonald, R. J. Slack, J. Le, S. B. Ludbrook, P. T. Lukey, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 3298–3321.
- [81] J. F. Van Agthoven, J.-P. Xiong, J. L. Alonso, X. Rui, B. D. Adair, S. L. Goodman, M. A. Arnaout, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2014**, *21*, 383–388.
- [82] J. Li, Y. Fukase, Y. Shang, W. Zou, J. M. Muñoz-Félix, L. Buitrago, J. van Agthoven, Y. Zhang, R. Hara, Y. Tanaka, R. Okamoto, T. Yasui, T. Nakahata, T. Imaeda, K. Aso, Y. Zhou, C. Locuson, D. Nestic, M. Duggan, J. Takagi, R. D. Vaughan, T. Walz, K. Hodivala-Dilke, S. L. Teitelbaum, M. A. Arnaout, M. Filizola, M. A. Foley, B. S. Collier, *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* **2019**, *2*, 387–401.
- [83] R. C. Turaga, L. Yin, J. J. Yang, H. Lee, I. Ivanov, C. Yan, H. Yang, H. E. Grossniklaus, S. Wang, C. Ma, L. Sun, Z.-R. Liu, *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 11675.
- [84] B. D. Adair, J. L. Alonso, J. van Agthoven, V. Hayes, H. S. Ahn, I.-S. Yu, S.-W. Lin, J.-P. Xiong, M. Poncz, M. A. Arnaout, *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 398.
- [85] A. Byron, J. D. Humphries, J. A. Askari, S. E. Craig, A. P. Mould, M. J. Humphries, *J. Cell Sci.* **2009**, *122*, 4009–4011.
- [86] A. P. Mould, M. J. Humphries, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2004**, *16*, 544–551.
- [87] A. P. Mould, J. A. Askari, A. Byron, Y. Takada, T. A. Jowitt, M. J. Humphries, *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 20993–21007.
- [88] A. P. Mould, S. E. Craig, S. K. Byron, M. J. Humphries, T. A. Jowitt, *Biochem. J.* **2014**, *464*, 301–313.
- [89] J. Li, Y. Su, W. Xia, Y. Qin, M. J. Humphries, D. Vestweber, C. Cabañas, C. Lu, T. A. Springer, *EMBO J.* **2017**, *36*, 629–645.
- [90] Y. Su, W. Xia, J. Li, T. Walz, M. J. Humphries, D. Vestweber, C. Cabañas, C. Lu, T. A. Springer, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2016**, *113*, E3872–E3881.
- [91] S. Almokadem, C. P. Belani, *Expert Opin. Biol. Ther.* **2012**, *12*, 251–257.
- [92] M. Hussain, S. Le Moulec, C. Gimmi, R. Bruns, J. Straub, K. Miller, on behalf of the PERSEUS Study Group, *Clin. Cancer Res.* **2016**, *22*, 3192–3200.
- [93] M. A. Dechantsreiter, E. Planker, B. Mathä, E. Lohof, G. Hölzemann, A. Jonczyk, S. L. Goodman, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3033–3040.
- [94] A. Bochen, U. K. Marelli, E. Otto, D. Pallarola, C. Mas-Moruno, F. S. Di Leva, H. Boehm, J. P. Spatz, E. Novellino, H. Kessler, L. Marinelli, *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 1509–1519.

- [95] A. O. Frank, E. Otto, C. Mas-Moruno, H. B. Schiller, L. Marinelli, S. Cosconati, A. Bochen, D. Vossmeier, G. Zahn, R. Stragies, E. Novellino, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 9278–9281.
- [96] J. Spiegel, C. Mas-Moruno, H. Kessler, W. D. Lubell, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 5271–5278.
- [97] C. Mas-Moruno, J. G. Beck, L. Doedens, A. O. Frank, L. Marinelli, S. Cosconati, E. Novellino, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9496–9500.
- [98] L. Belvisi, A. Bernardi, A. Checchia, L. Manzoni, D. Potenza, C. Scolastico, M. Castorina, A. Cupelli, G. Giannini, P. Carminati, C. Pisano, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1001–1004.
- [99] D. Arosio, L. Belvisi, L. Colombo, M. Colombo, D. Invernizzi, L. Manzoni, D. Potenza, M. Serra, M. Castorina, C. Pisano, C. Scolastico, *ChemMedChem* **2008**, *3*, 1589–1603.
- [100] L. Belvisi, A. Bernardi, M. Colombo, L. Manzoni, D. Potenza, C. Scolastico, G. Giannini, M. Marcellini, T. Riccioni, M. Castorina, P. LoGiudice, C. Pisano, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 169–180.
- [101] L. Belvisi, T. Riccioni, M. Marcellini, L. Vesce, I. Chiarucci, D. Efrati, D. Potenza, C. Scolastico, L. Manzoni, K. Lombardo, M. A. Stasi, A. Orlandi, A. Ciucci, B. Nico, D. Ribatti, G. Giannini, M. Presta, P. Carminati, C. Pisano, *Mol. Cancer Ther.* **2005**, *4*, 1670–1680.
- [102] W. Xiao, Y. Wang, E. Y. Lau, J. Luo, N. Yao, C. Shi, L. Meza, H. Tseng, Y. Maeda, P. Kumaresan, R. Liu, F. C. Lightstone, Y. Takada, K. S. Lam, *Mol. Cancer Ther.* **2010**, *9*, 2714–2723.
- [103] Y. Wang, W. Xiao, Y. Zhang, L. Meza, H. Tseng, Y. Takada, J. B. Ames, K. S. Lam, *Mol. Cancer Ther.* **2016**, *15*, 232–240.
- [104] A. Silva, W. Xiao, Y. Wang, W. Wang, H. W. Chang, J. B. Ames, K. S. Lam, Y. Zhang, *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 3076.
- [105] L. Zhang, X. Shan, X. Meng, T. Gu, L. Guo, X. An, Q. Jiang, H. Ge, X. Ning, *Mol. Pharm.* **2019**, *16*, 3977–3984.
- [106] A. S. M. da Ressurreição, A. Vidu, M. Civera, L. Belvisi, D. Potenza, L. Manzoni, S. Ongerì, C. Gennari, U. Piarulli, *Chem. - Eur. J.* **2009**, *15*, 12184–12188.
- [107] I. Guzzetti, M. Civera, F. Vasile, D. Arosio, C. Tringali, U. Piarulli, C. Gennari, L. Pignataro, L. Belvisi, D. Potenza, *ChemistryOpen* **2017**, *6*, 128–136.
- [108] T. G. Kapp, F. S. Di Leva, J. Notni, A. F. B. Räder, M. Fottner, F. Reichart, D. Reich, A. Wurzer, K. Steiger, E. Novellino, U. K. Marelli, H.-J. Wester, L. Marinelli, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 2490–2499.
- [109] E. Koivunen, B. Wang, E. Ruoslahti, *J. Cell Biol.* **1994**, *124*, 373–380.
- [110] A. P. Mould, L. Burrows, M. J. Humphries, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 25664–25672.
- [111] W. H. Miller, R. M. Keenan, R. N. Willette, M. W. Lark, *Drug Discov. Today* **2000**, *5*, 397–408.
- [112] W. J. Pitts, J. Wityak, J. M. Smallheer, A. E. Tobin, J. W. Jetter, J. S. Buynitsky, P. P. Harlow, K. A. Solomon, M. H. Corjay, S. A. Mousa, R. R. Wexler, P. K. Jadhav, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 27–40.
- [113] J. M. Smallheer, C. A. Weigelt, F. J. Woerner, J. S. Wells, W. F. Daneker, S. A. Mousa, R. R. Wexler, P. K. Jadhav, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 383–387.
- [114] D. Cue, S. O. Southern, P. J. Southern, J. Prabhakar, W. Lorelli, J. M. Smallheer, S. A. Mousa, P. P. Cleary, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, *97*, 2858–2863.
- [115] S. Kim, K. Bell, S. A. Mousa, J. A. Varner, *Am. J. Pathol.* **2000**, *156*, 1345–1362.
- [116] A. Maglott, P. Bartik, S. Cosgun, P. Klotz, P. Rondé, G. Fuhrmann, K. Takeda, S. Martin, M. Dontenwill, *Cancer Res.* **2006**, *66*, 6002–6007.

- [117] S. Martin, E. C. Cosset, J. Terrand, A. Maglott, K. Takeda, M. Dontenwill, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **2009**, *1793*, 354–367.
- [118] L. Marinelli, A. Meyer, D. Heckmann, A. Lavecchia, E. Novellino, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4204–4207.
- [119] D. Heckmann, A. Meyer, L. Marinelli, G. Zahn, R. Stragies, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 3571–3574.
- [120] N. C. Henderson, T. D. Arnold, Y. Katamura, M. M. Giacomini, J. D. Rodriguez, J. H. McCarty, A. Pellicoro, E. Raschperger, C. Betsholtz, P. G. Ruminski, D. W. Griggs, M. J. Prinsen, J. J. Maher, J. P. Iredale, A. Lacy-Hulbert, R. H. Adams, D. Sheppard, *Nat. Med.* **2013**, *19*, 1617–1624.
- [121] S. Neubauer, F. Rechenmacher, R. Brimiouille, F. S. Di Leva, A. Bochen, T. R. Sobahi, M. Schottelius, E. Novellino, C. Mas-Moruno, L. Marinelli, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 3410–3417.
- [122] A.-M. Ray, F. Schaffner, H. Janouskova, F. Noulet, D. Rognan, I. Lelong-Rebel, L. Choulier, A.-F. Blandin, M. Lehmann, S. Martin, T. Kapp, S. Neubauer, F. Rechenmacher, H. Kessler, M. Dontenwill, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **2014**, *1840*, 2978–2987.
- [123] H. Janouskova, A.-M. Ray, F. Noulet, I. Lelong-Rebel, L. Choulier, F. Schaffner, M. Lehmann, S. Martin, J. Teisinger, M. Dontenwill, *Cancer Lett.* **2013**, *336*, 307–318.
- [124] G. Renner, H. Janouskova, F. Noulet, V. Koenig, E. Guerin, S. Bär, J. Nuesch, F. Rechenmacher, S. Neubauer, H. Kessler, A.-F. Blandin, L. Choulier, N. Etienne-Selloum, M. Lehmann, I. Lelong-Rebel, S. Martin, M. Dontenwill, *Cell Death Differ.* **2016**, *23*, 640–653.
- [125] E. Martinkova, A. Maglott, D. Y. Leger, D. Bonnet, M. Stiborova, K. Takeda, S. Martin, M. Dontenwill, *Int. J. Cancer* **2010**, *127*, 1240–1248.
- [126] R. Stragies, F. Osterkamp, G. Zischinsky, D. Vossmeier, H. Kalkhof, U. Reimer, G. Zahn, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 3786–3794.
- [127] G. Zahn, K. Volk, G. P. Lewis, D. Vossmeier, R. Stragies, J. S. Heier, P. E. Daniel, A. P. Adamis, E. A. Chapin, S. K. Fisher, F. G. Holz, K. U. Löffler, J. Knolle, *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* **2010**, *51*, 1028.
- [128] G. Zahn, *Arch. Ophthalmol.* **2009**, *127*, 1329.
- [129] A.-K. B. Maier, N. Kociok, G. Zahn, D. Vossmeier, R. Stragies, P. S. Muether, A. M. Joussen, *Curr. Eye Res.* **2007**, *32*, 801–812.
- [130] P. Galletti, R. Soldati, M. Pori, M. Durso, A. Tolomelli, L. Gentilucci, S. D. Dattoli, M. Baiula, S. Spampinato, D. Giacomini, *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *83*, 284–293.
- [131] M. Baiula, P. Galletti, G. Martelli, R. Soldati, L. Belvisi, M. Civera, S. D. Dattoli, S. M. Spampinato, D. Giacomini, *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 9721–9742.
- [132] G. Martelli, M. Baiula, A. Caligiana, P. Galletti, L. Gentilucci, R. Artali, S. Spampinato, D. Giacomini, *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 10156–10166.
- [133] G. Martelli, P. Galletti, M. Baiula, L. Calcinari, G. Boschi, D. Giacomini, *Bioorganic Chem.* **2019**, *88*, 102975.
- [134] A. Tolomelli, P. Galletti, M. Baiula, D. Giacomini, *Cancers* **2017**, *9*, 78.
- [135] H. Cai, P. S. Conti, *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2013**, *56*, 264–279.
- [136] J. Shi, F. Wang, S. Liu, *Biophys. Rep.* **2016**, *2*, 1–20.
- [137] R. Haubner, W. A. Weber, A. J. Beer, E. Vabuliene, D. Reim, M. Sarbia, K.-F. Becker, M. Goebel, R. Hein, H.-J. Wester, H. Kessler, M. Schwaiger, *PLoS Med.* **2005**, *2*, e70.
- [138] O. Schnell, B. Krebs, J. Carlsen, I. Miederer, C. Goetz, R. H. Goldbrunner, H.-J. Wester, R. Haubner, G. Pöpperl, M. Holtmannspötter, H. A. Kretschmar, H. Kessler, J.-C. Tonn, M. Schwaiger, A. J. Beer, *Neuro-Oncol.* **2009**, *11*, 861–870.

- [139] N. Withofs, N. Signolle, J. Somja, P. Lovinfosse, E. M. Nzaramba, F. Mievis, F. Giacomelli, D. Waltregny, D. Cataldo, S. S. Gambhir, R. Hustinx, *J. Nucl. Med.* **2015**, *56*, 361–364.
- [140] S. Neubauer, F. Rechenmacher, A. J. Beer, F. Curnis, K. Pohle, C. D'Alessandria, H.-J. Wester, U. Reuning, A. Corti, M. Schwaiger, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 11656–11659.
- [141] D. Heckmann, A. Meyer, B. Laufer, G. Zahn, R. Stragies, H. Kessler, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1397–1407.
- [142] C. D'Alessandria, K. Pohle, F. Rechenmacher, S. Neubauer, J. Notni, H.-J. Wester, M. Schwaiger, H. Kessler, A. J. Beer, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2016**, *43*, 953–963.
- [143] F. Rechenmacher, S. Neubauer, C. Mas-Moruno, P. M. Dorfner, J. Polleux, J. Guasch, B. Conings, H.-G. Boyen, A. Bochen, T. R. Sobahi, R. Burgkart, J. P. Spatz, R. Fässler, H. Kessler, *Chem. - Eur. J.* **2013**, *19*, 9218–9223.
- [144] J. Notni, J. Šimeček, P. Hermann, H.-J. Wester, *Chem. - Eur. J.* **2011**, *17*, 14718–14722.
- [145] J. Notni, K. Steiger, F. Hoffmann, D. Reich, T. G. Kapp, F. Rechenmacher, S. Neubauer, H. Kessler, H.-J. Wester, *J. Nucl. Med.* **2016**, *57*, 460–466.
- [146] J. Notni, K. Steiger, F. Hoffmann, D. Reich, M. Schwaiger, H. Kessler, H.-J. Wester, *J. Nucl. Med.* **2016**, *57*, 1618–1624.
- [147] R. Haubner, S. Maschauer, J. Einsiedel, I. E. Eder, C. Rangger, P. Gmeiner, I. J. Virgolini, O. Prante, *BioMed Res. Int.* **2014**, *2014*, 1–12.
- [148] Z.-H. Jin, T. Furukawa, K. Kumata, L. Xie, J. Yui, H. Wakizaka, Y. Fujibayashi, M.-R. Zhang, T. Saga, *Biol. Pharm. Bull.* **2015**, *38*, 1722–1731.
- [149] G. Mana, D. Valdembri, G. Serini, *Biochem. Soc. Trans.* **2020**, *48*, 83–93.
- [150] A. Dal Corso, L. Pignataro, L. Belvisi, C. Gennari, *Curr. Top. Med. Chem.* **2015**, *16*, 314–329.
- [151] A. Dal Corso, L. Pignataro, L. Belvisi, C. Gennari, *Chem. – Eur. J.* **2019**, *25*, 14740–14757.
- [152] D. Arosio, L. Manzoni, C. Corno, P. Perego, *Recent Patents Anticancer Drug Discov.* **2017**, *12*, 148–168.
- [153] S. Katsamakos, T. Chatzisideri, S. Thysiadis, V. Sarli, *Future Med. Chem.* **2017**, *9*, 579–604.
- [154] H.-J. Cho, S.-J. Park, Y.-S. Lee, S. Kim, *J. Controlled Release* **2019**, *300*, 73–80.
- [155] K. Ahmad, E. J. Lee, S. Shaikh, A. Kumar, K. M. Rao, S.-Y. Park, J. O. Jin, S. S. Han, I. Choi, *Semin. Cancer Biol.* **2019**, S1044579X19302068.
- [156] M. Alipour, M. Baneshi, S. Hosseinkhani, R. Mahmoudi, A. Jabari Arabzadeh, M. Akrami, J. Mehrzad, H. Bardania, *J. Biomed. Mater. Res. A* **2020**, *108*, 839–850.
- [157] P.-H. Wu, A. E. Opadele, Y. Onodera, J.-M. Nam, *Cancers* **2019**, *11*, 1783.
- [158] Y. Cheng, Y. Ji, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2019**, *128*, 8–17.
- [159] K. R. Gajbhiye, V. Gajbhiye, I. A. Siddiqui, J. M. Gajbhiye, *J. Drug Target.* **2019**, *27*, 111–124.
- [160] S. Fu, X. Xu, Y. Ma, S. Zhang, S. Zhang, *J. Drug Target.* **2019**, *27*, 1–11.
- [161] U. K. Marelli, F. Rechenmacher, T. R. A. Sobahi, C. Mas-Moruno, H. Kessler, *Front. Oncol.* **2013**, *3*, DOI 10.3389/fonc.2013.00222.
- [162] J. Niu, Z. Li, *Cancer Lett.* **2017**, *403*, 128–137.
- [163] F. S. Di Leva, S. Tomassi, S. Di Maro, F. Reichart, J. Notni, A. Dangi, U. K. Marelli, D. Brancaccio, F. Merlino, H.-J. Wester, E. Novellino, H. Kessler, L. Marinelli, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 14645–14649.

- [164] O. V. Maltsev, U. K. Marelli, T. G. Kapp, F. S. Di Leva, S. Di Maro, M. Nieberler, U. Reuning, M. Schwaiger, E. Novellino, L. Marinelli, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 1535–1539.
- [165] R. H. Kimura, L. Wang, B. Shen, L. Huo, W. Tummers, F. V. Filipp, H. H. Guo, T. Haywood, L. Abou-Elkacem, L. Baratto, F. Habte, R. Devulapally, T. H. Witney, Y. Cheng, S. Tikole, S. Chakraborti, J. Nix, C. A. Bonagura, N. Hatami, J. J. Mooney, T. Desai, S. Turner, R. S. Gaster, A. Otte, B. C. Visser, G. A. Poultsides, J. Norton, W. Park, M. Stolowitz, K. Lau, E. Yang, A. Natarajan, O. Ilovich, S. Srinivas, A. Srinivasan, R. Paulmurugan, J. Willmann, F. T. Chin, Z. Cheng, A. Iagaru, F. Li, S. S. Gambhir, *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 4673.
- [166] J. Notni, D. Reich, O. V. Maltsev, T. G. Kapp, K. Steiger, F. Hoffmann, I. Esposito, W. Weichert, H. Kessler, H.-J. Wester, *J. Nucl. Med.* **2017**, *58*, 671–677.
- [167] Y. Tang, R. Davis, T. Ganguly, J. Sutcliffe, *Molecules* **2019**, *24*, 309.
- [168] B. Alday-Parejo, R. Stupp, C. Rüegg, *Cancers* **2019**, *11*, 978.
- [169] J. Cooper, F. G. Giancotti, *Cancer Cell* **2019**, *35*, 347–367.

ligand	Cell line	models	references
⁶⁸ Ga-NODAGA-peptidomimetic	Human colon carcinoma (RKO cells) Human melanoma (M21 cells)	Heterotopic xenografts in mice	Neubauer et al, 2013
⁶⁸ Ga-NODAGA-peptidomimetic (FR366)			D'Alessandria et al, 2016
⁶⁸ Ga-TRAP-peptidomimetic (Aquibepirin)			Notni et al, 2016
¹⁸ F-peptide (CRRETAWAC)	Human prostate carcinoma (DU145 cells)	Heterotopic xenografts in mice	Hauber et al, 2014
¹⁸ F-NOTA-peptide (KSSPHSRN(SG) ₅ RGDSP)	Murine melanoma (B16-F10 cells) Human colorectal carcinoma (SW48 cells)	Heterotopic xenografts in mice	Jin et al, 2015
⁶⁸ Ga-TRAP-peptide (c(phg-isoDGR-(NMe)k))	Human melanoma (M21 cells)	Heterotopic xenografts in mice	Kapp et al, 2018

Table1: PET radiotracers selective for $\alpha 5\beta 1$ integrin. Different xenografted tumoral cell lines have been used with differential expression of $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha v\beta 3$ integrins. RKO cells : $\alpha 5\beta 1 +$, $\alpha v\beta 3 -$; M21 cells: $\alpha 5\beta 1 +/-$ and $\alpha v\beta 3 +$; DU145 cells: $\alpha 5\beta 1 +$, $\alpha v\beta 3 -$; B16-F10: $\alpha 5\beta 1+$, $\alpha v\beta 3 +/-$; SW48 cells: $\alpha 5\beta 1 -$, $\alpha v\beta 3 +/-$.

Legends to figures

Figure 1: Integrins in hallmarks of cancer. Altered expressions of integrins are detected in tumor cells but also in non tumoral cells in the tumor microenvironment. Integrin-activated signaling pathways have pro-tumoral functions.

Figure 2: RGD-integrin ligands. Integrins $\alpha v\beta 3$ and $\alpha 5\beta 1$ both recognize Fibronectin (FN). Ligands able to interfere with FN-integrin complexes have been developed mainly as integrin antagonists of cell adherence (RGD-based peptides, RGD-mimetics). Antibodies recognize epitopes in- or outside the RGD binding sites and are useful to mark integrins in inactivated or activated states. Non-RGD peptides have been developed based on the FN synergy site (PHSRN) recognized by $\alpha 5\beta 1$ integrin.

Figure 3: Chemical structures of some RGD-integrin ligands. Cilengitide was the first RGD-containing cyclic peptide reaching the clinic for glioblastoma treatment [93]. LXW7 is a cyclooctapeptide described in [102]. C(phg-isoDGR-NMe)k is described in [108]. SJ755 was one of the first small molecule specific for $\alpha 5\beta 1$ integrin [112]. Compound 1 is described in [141] and compound 17 is an $\alpha 5\beta 1$ integrin agonist [131].

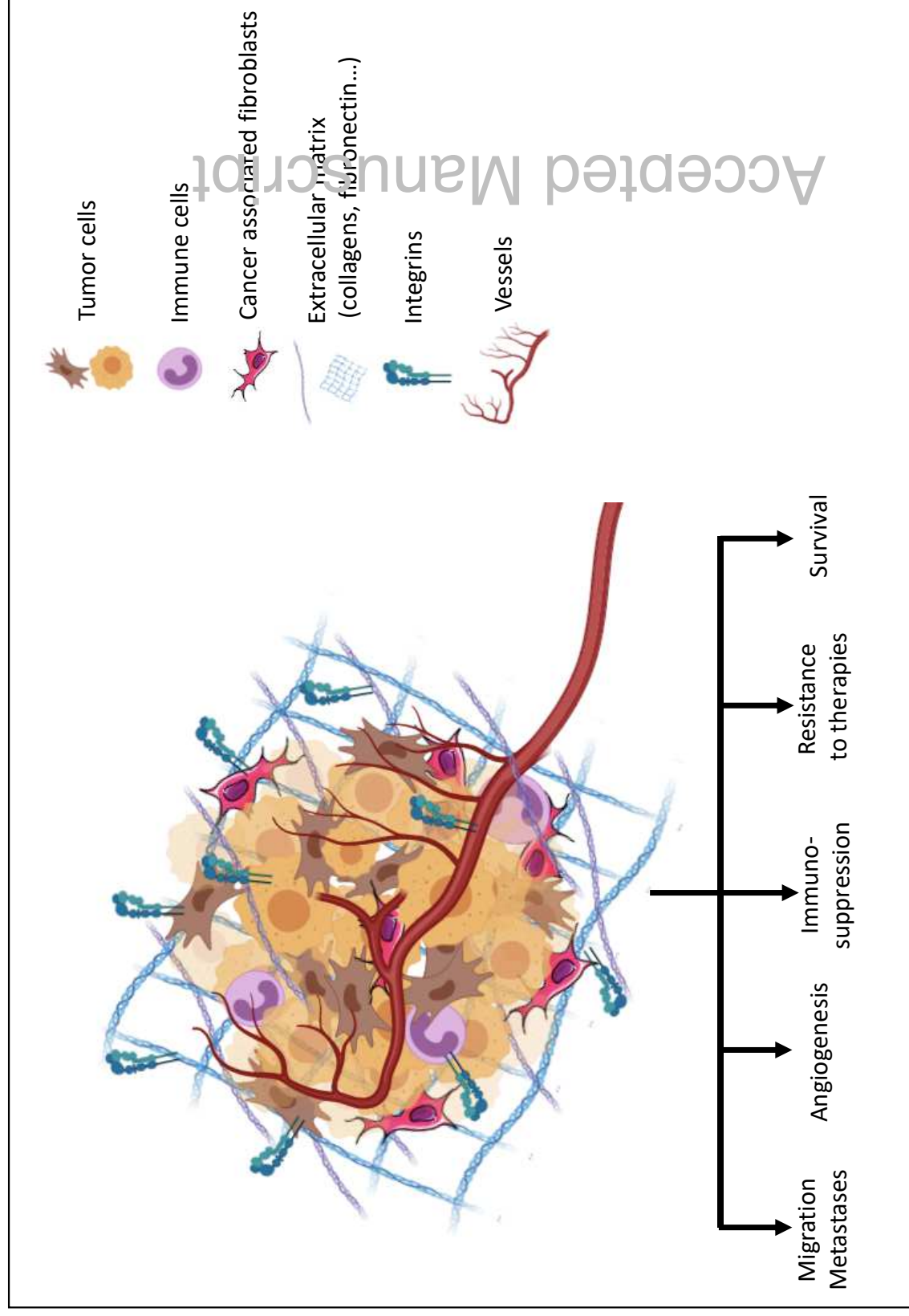
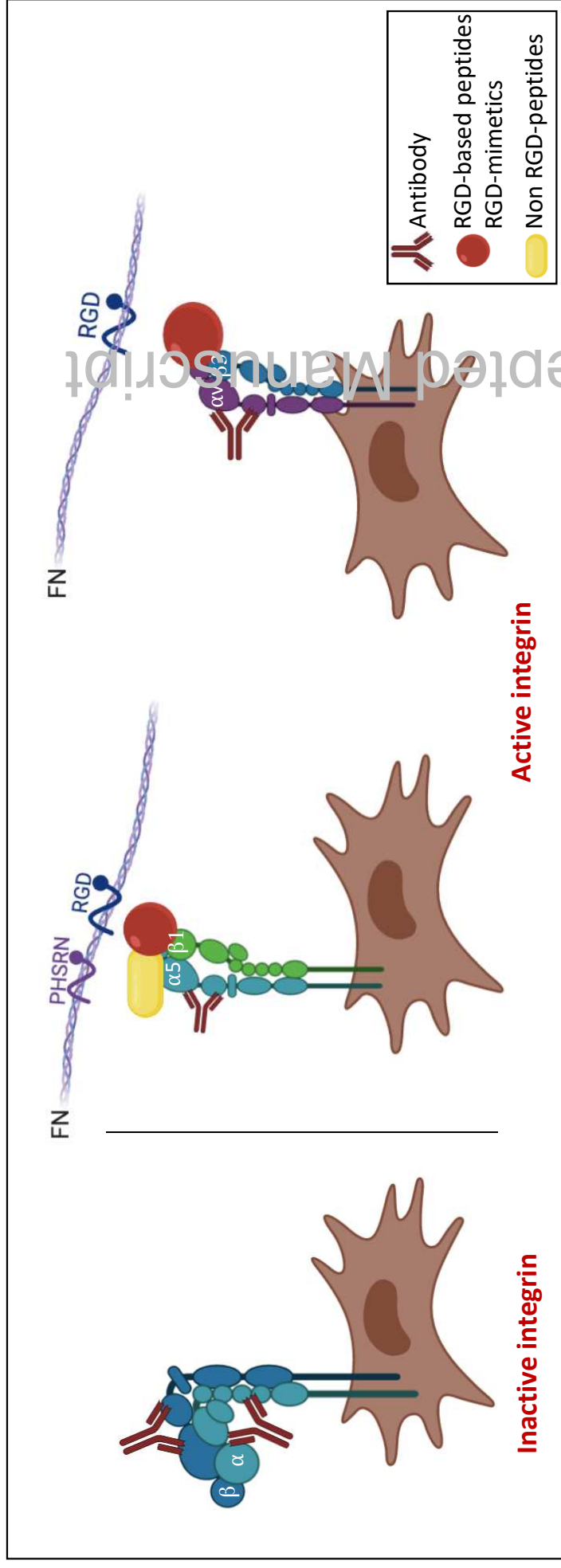


Figure 1

Figure 2



Accepted Manuscript

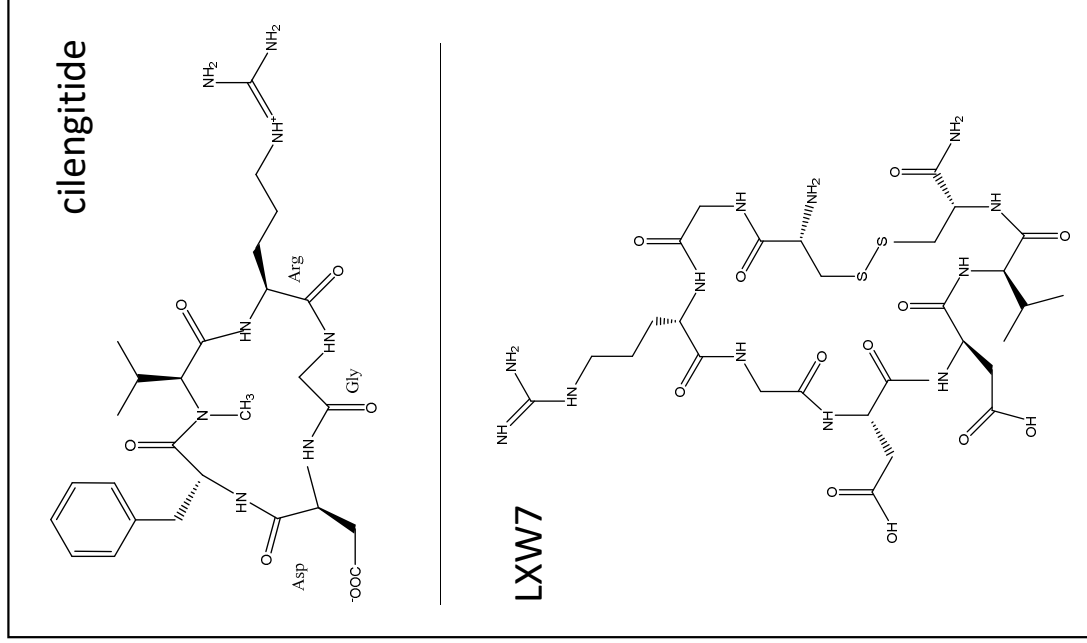
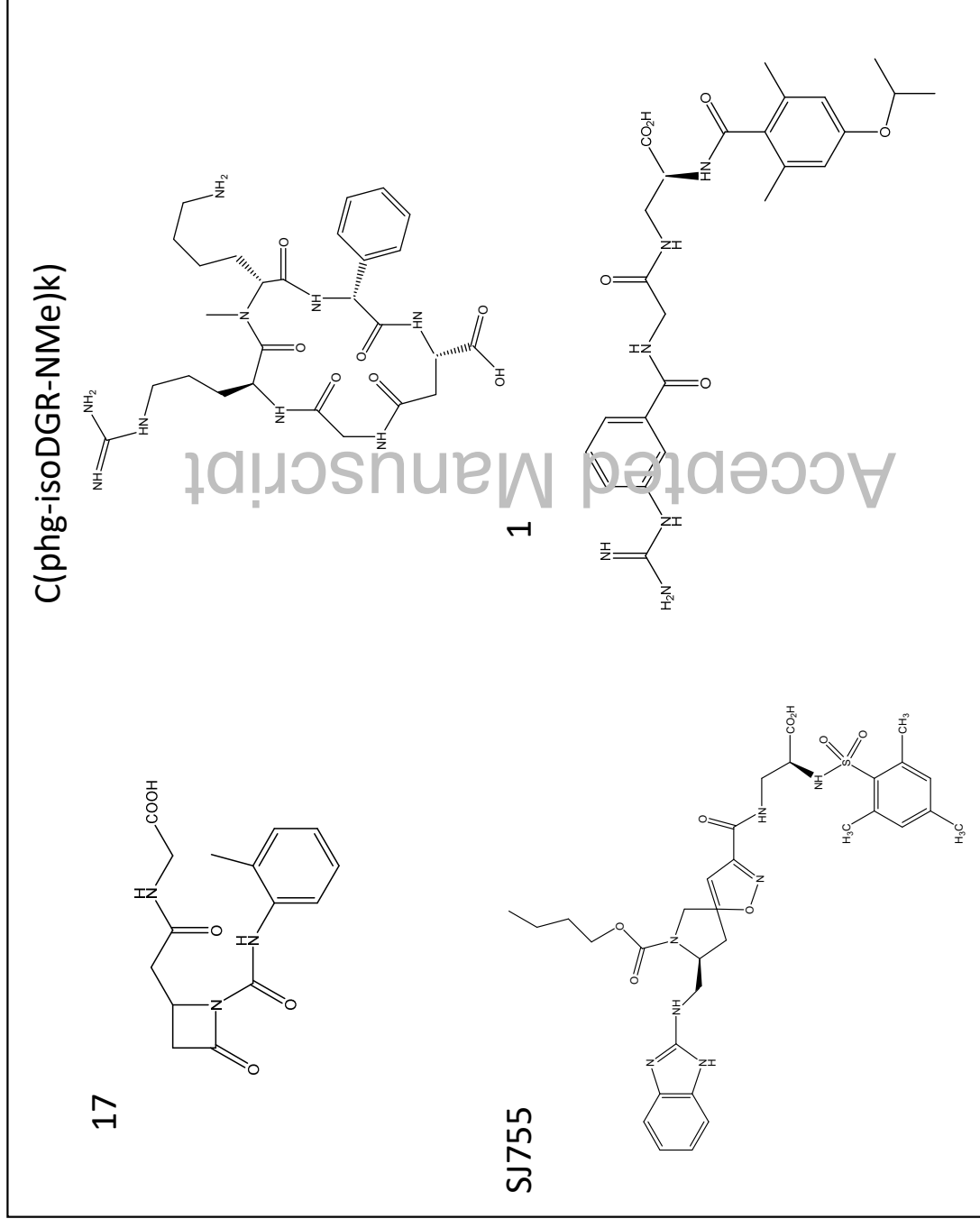
$\alpha\text{v}\beta\text{3}$ integrin $\alpha\text{5}\beta\text{1}$ integrin

Figure 3

Annexe 2

Revue scientifique

Hypoxia inducible factors' signaling in pediatric high-grade gliomas: role, modelization and innovative targeted approaches

Review

Hypoxia Inducible Factors' Signaling in Pediatric High-Grade Gliomas: Role, Modelization and Innovative Targeted Approaches

Quentin Fuchs¹, Marina Pierrevelcin¹, Melissa Messe¹, Benoit Lhermitte^{1,2}, Anne-Florence Blandin³, Christophe Papin⁴, Andres Coca⁵, Monique Dontenwill¹ and Natacha Entz-Werlé^{1,6,*}

¹ UMR CNRS 7021, Laboratory Bioimaging and Pathologies, Tumoral Signaling and Therapeutic Targets team, Faculty of Pharmacy, 74 route du Rhin, 67405 Illkirch, France; quentin.fuchs@unistra.fr (Q.F.); marina.pierrevelcin@etu.unistra.fr (M.P.); melissa.messe@etu.unistra.fr (M.M.); benoit.lhermitte@chru-strasbourg.fr (B.L.); monique.dontenwill@unistra.fr (M.D.)

² Pathology Department, University Hospital of Strasbourg, 1 avenue Molière, 67098 Strasbourg, France

³ Pediatric Oncology, Dana Farber Institute, Boston, MA 02215, USA; anneflorence.blandin@gmail.com

⁴ Inserm U1258, UMR CNRS 7104, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Université de Strasbourg, 67400 Illkirch, France; papin@igbmc.fr

⁵ Neurosurgery, University Hospital of Strasbourg, 1 avenue Molière, 67098 Strasbourg, France; hugoandres.coca@chru-strasbourg.fr

⁶ Pediatric Onco-Hematology Department, Pediatrics, University hospital of Strasbourg, 1 avenue Molière, 67098 Strasbourg, France

* Correspondence: Natacha.entz-werle@chru-strasbourg.fr; Tel.: +33-388128396; Fax: +33-388128092

Received: 4 March 2020; Accepted: 7 April 2020; Published: 15 April 2020



Abstract: The brain tumor microenvironment has recently become a major challenge in all pediatric cancers, but especially in brain tumors like high-grade gliomas. Hypoxia is one of the extrinsic tumor features that interacts with tumor cells, but also with the blood–brain barrier and all normal brain cells. It is the result of a dramatic proliferation and expansion of tumor cells that deprive the tissues of oxygen inflow. However, cancer cells, especially tumor stem cells, can endure extreme hypoxic conditions by rescheduling various genes' expression involved in cell proliferation, metabolism and angiogenesis and thus, promote tumor expansion, therapeutic resistance and metabolic adaptation. This cellular adaptation implies Hypoxia-Inducible Factors (HIF), namely HIF-1 α and HIF-2 α . In pediatric high-grade gliomas (pHGGs), several questions remained open on hypoxia-specific role in normal brain during gliomagenesis and pHGG progression, as well how to model it in preclinical studies and how it might be counteracted with targeted therapies. Therefore, this review aims to gather various data about this key extrinsic tumor factor in pHGGs.

Keywords: high-grade gliomas; pediatric; hypoxia; HIFs

1. Introduction

Pediatric high-grade gliomas (pHGG) are aggressive and incurable tumors of the central nervous system (CNS). These infiltrative solid tumors account for 15% to 20% of all pediatric brain tumors and represent the leading cause of morbidity and death related to cancer during childhood and adolescence [1]. Only forty percent of the pHGGs originated from cerebral hemispheres and the remaining 60% are located in the midline (half in the brainstem and pons and half in the thalamus) [2]. The common standard protocol to treat hemispheric pHGG is largely inspired by adult glioblastomas and starts with surgical resection of the tumor, followed by radiotherapy and chemotherapy [3–5].

Unfortunately, with this type of protocol, up to 80% of children will finally relapse in the two following years, more rapidly than adult high-grade gliomas (aHGGs). In midline pHGGs, due to the widespread invasiveness of HGG cells, complete surgical resection is quite complex with the coexistence side by side of malignant and healthy cells. While many other pediatric cancers have experienced therapeutic management advances in recent decades, the median survival of pHGG has remained unchanged, with a range from 12 to 15 months in hemispheric and thalamic locations and from 9 to 12 months in Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas (DIPGs). For all these reasons, there is a pressing need for novel therapeutic approaches to treat pHGGs. The first step was to understand and characterize intrinsic and extrinsic tumor features to reproduce pHGG conditions and be able to model it in *in vitro* and *in vivo* preclinical studies.

Since 2010 [6–8], clearer intrinsic pHGG features have arisen from molecular and genomic studies that led to the update in 2016 of the World Health Organization (WHO) classification of CNS tumors and its continuous improvement [9,10]. These molecular insights differentiated pHGGs from their adult counterparts, except for thalamic locations, where similar genomic features can be described in both [11]. Those studies evidenced driver mutations on histone H3 and their impact on patient outcome, linking H3.3 mutations to a specific brain location and to a worst evolution compared to H3.1 mutation [2,12,13]. Additionally, to those genomic modifications, several mutations or CNVs (Copy Number Variations) are also described mainly on *ACVR1* (Activin A receptor type I), *TP53*, *EGFR* (Epidermal Growth Factor Receptor), *ATRX* (Alpha-Thalassemia/mental Retardation X-linked), *PTEN* (Phosphatase and TENsin homolog) or *PDGFRA* (Platelet Derived Growth Factor Receptor Alpha) [2,6–8,12–14]. Other rare driver mutations are also observed on *BRAF* or *IDH1* (Isocitrate DeHydrogenase 1). All these molecular abnormalities opened the path to new treatment approaches, but also increased knowledge on tumor heterogeneity and, thus, tumor complexity [15,16]. These molecular aspects are fundamentally different from those observed in aHGGs, explaining the specificities of pHGG and how they are divergent from the aHGGs in terms of cellular origins, epidemiology, genetic complexity, driver mutations, but also their specific extrinsic tumor features such as interactions with local hypoxic environment and brain locations [17].

For extrinsic tumor features, studies mainly focus on brain microenvironment, taking into account vascular cells, brain cells and their electric activity, but also immune cells [18,19]. As most solid tumors, one key of the brain microenvironment in pHGGs seems to be hypoxia, as a result of the dramatic proliferation and expansion of tumor cells that deprive the tissues of oxygen inflow [18,20–25]. Basically, hypoxia has deleterious effects on normal cells that rapidly undergo apoptosis or necrosis after prolonged oxygen deprivation [26]. However, cancer cells, especially tumor stem cells, can endure extreme hypoxic conditions by rescheduling various genes' expression involved in cell proliferation, metabolism and angiogenesis and thus, promote tumor expansion, resistance, and metabolic adaptation. This cellular adaptation implies HIFs (Hypoxia-Inducible Factors), namely HIF-1 α , HIF-2 α and HIF-3 α [27–29]. These transcription factors mediate several key pathways in cancer and might represent interesting targets for cancer treatments, especially in pHGGs [21,24,29]. Nevertheless, several questions remained open specifically in pHGGs on the role of hypoxia in the brain during gliomagenesis, pHGG cell proliferation and widespread across normal structures, as well how to model it in preclinical studies and how it might be counteracted with targeted therapies. Therefore, this review aims to gather various data about extrinsic and intrinsic pHGG features that might interfere with intra-tumor hypoxia and where HIFs play central roles (Figure 1).

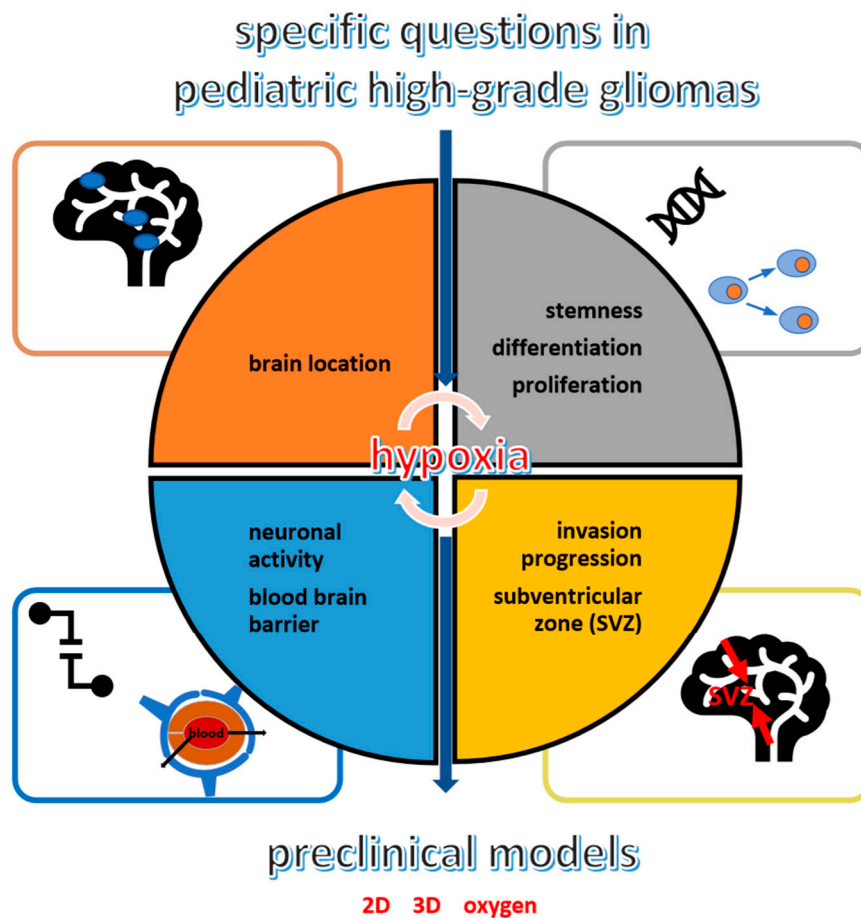


Figure 1. Specific questions on pediatric high-grade gliomas (pHGGs): hypoxia links with locations (orange), cell properties (grey), propensity to migrate especially from and in a subventricular zone (SVZ) (yellow) and the neuronal/blood–brain barrier environment (blue).

2. Role of Brain Physiological Hypoxia Location or Brain Physioxia and the Sub-Ventricular Zone in pHGGs

Hypoxia is a general concept referring to decreased oxygen (O_2) amounts reaching a tissue. However, in humans, physiological O_2 levels in healthy tissues vary from 3% to 10% [21,30,31]. Thus, the physiologically hypoxic conditions are organ-dependent and can be renamed physioxia. Furthermore, O_2 is not homogeneously distributed into one single organ but unevenly distributed in tissues, creating O_2 gradients [32]. The brain is one of the organs with the poorest tissue oxygen concentrations, covering a range from 3% to 4.5% [30,31,33]. This is the equivalent of an oxygen partial pressure (pO_2) of about 25 to 48 mmHg, depending on altitude. Any oxygen level below this value would be considered brain hypoxia. The high brain energy requirements compared to the paradoxically low brain energy reserves implies that the brain will need continuous oxygen inflows through a very developed and active vascularization. In fact, any important oxygen fluctuation can cause nerve cell injuries. Hippocampus and cerebellum neurons seem very sensitive and hypoxia-intolerant [26], whereas neural stem-cells require hypoxic niches to remain in an undifferentiated state and maintain their pluripotency [34]. The physiological hypoxic niches are notably located in the sub-ventricular zone (SVZ) along the lateral walls of the lateral ventricles, the major site of post-natal continuous neurogenesis [23,34,35]. Controversial studies have investigated this SVZ niche as a region originating glioma stem cells [36,37]. Among those publications, signaling via mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1), protein activating HIF-1 α , has been proposed to regulate self-renewal, proliferative divisions, differentiation, and brain ventricle morphogenesis in this SVZ [38]. HIF-1 α was also described as a repressor of BMP (Bone Morphogenetic protein) and thus, promoting HGG

precursors in the SVZ niche [21]. On the other hand, glioma stem cells might directly result from the intra-tumoral hypoxic gradient [39] and explain how the glioma stem cells are located away from the SVZ [40–42]. They are directly initiated in the periphery of the necrotic/hypoxic regions, where HIFs are highly expressed (Figure 2).

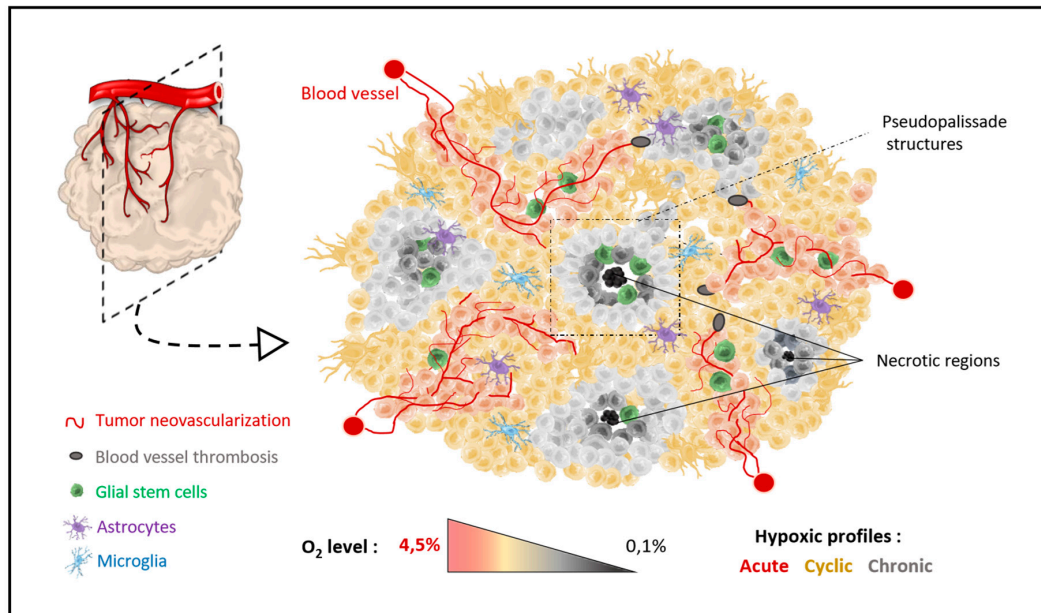


Figure 2. Organization of hypoxic regions across tumors. The pediatric high-grade gliomas are composed by necrotic regions surrounded by pseudopalisade structures and associated with stem cell niches. Neovascularization is starting from the periphery of the tumor and is decreasing in the center. Three hypoxic profiles are, then, described within pHGG tumors: acute, cyclic and/or chronic oxygen tensions.

Despite these contradictory results between SVZ and local hypoxia, it appears that physiological neural stem cells benefit from hypoxic conditions in a healthy brain and are thus capable of self-renewing to give birth to neural cells that migrate while differentiating into mature and functional neurons. Probably, these normal stem cell capacities in hypoxic niches are also used by pHGG stem cells, leading to an even more complex HGG hypoxic environment, unlimited and slow self-renewal and a high propensity to migrate rapidly [43]. This can also explain why a really frequent invasive terminal process in this SVZ is present during pHGG progression. It results from mTor/HIF-1 α expression in the tumors and its close hypoxic environment [13,38,44].

3. Macroscopic and Microscopic Aspects of pHGG Hypoxia within the Tumors

Hypoxia in brain tumors might be closely related to the dramatic proliferation of tumor cells. Tumor expansion progressively deprives tissues from oxygen inflows by increasing their distance from blood vessels. In response to this oxygen deprivation, tumor cells promote neovascularization via VEGF (vascular endothelial growth factor) secretion. However, this tumor neovascularization is very anarchic; it results in the formation of altered and disorganized blood vessels and is unable to assure the complete oxygen delivery to tumor tissues [44]. Even VEGF and its receptor VEGFR hyperexpression have not frequently been observed in the molecular publications on pHGGs; angiogenic features and interactions with angiogenesis have been frequently discussed in preclinical studies, as well as in pHGG and DIPG trials [5,45–48]. For this specific blocking, usually, bevacizumab was used as single agent or in combination with chemo- or radiotherapy. The study of Castel et al. associated this pro-angiogenic signature to H3.1 K27M mutated tumors, but other studies using Magnetic Resonance Imaging (MRI) analyses on T2-weighted sequences showed a direct link between necrotic and hypoxic

zones within pHGGs and more aggressive subtypes like H3.3 K27M mutated DIPG or those bearing TP53 mutation [47,49]. Typical DIPG images have depicted it as arising from the brainstem and being diffusively involved in more than half of the pons. Surprisingly Hoffmann et al. found that the MRIs of short-term survivors were associated with a low necrosis percentage but a less frequent ring enhancement [50]. All those studies might explain a balance between level of hypoxic zones, neoangiogenesis and the high diffusive phenotype of the pHGG cells side to side with normal neurons and fibers, especially in pons.

The MRI imaging also showed a heterogeneous hypoxic environment in pHGG with various oxygen gradients inside one single tumor. In the same tumor, the oxygen level typically can differ in a spatio-temporal manner, creating pockets of regions with a low oxygen level surrounded by regions with a normal oxygen level that could vary over time and might be mostly localized at the tumor periphery (Figure 2). This process can be subdivided into acute, chronic and/or cyclic hypoxia [18,22,27,39,50–52]. Acute hypoxia acts on peripheral cells that are incompletely and intermittently oxygenated by an aberrant neovascularization. The temporal scale for acute hypoxia is generally considered from minutes to several hours. After 24 h of poor oxygen levels, the tumor cells are considered in a chronic hypoxic state and usually located in the furthest part of the tumor from the blood vessels. Lastly, the cyclic hypoxia might be considered as a kind of intermediary between acute and chronic hypoxia. The cells from the intermediate layer of the tumor endure very low oxygen levels for a few minutes to several days before being briefly re-oxygenated by immature blood vessels. These variations can explain HGG stem cell niches [29,36,53], as well as the microscopic architecture characterized by central pseudopalisades associated to neovessels and necrosis [54]. They outline the differences observed between peripheral cells of the tumor, which are oxygenated and bear less aggressive features, and inner core cells with less ring enhancement in the MRI and a very aggressive cell phenotype [37,50] (Figure 2). Usually, those extrinsic hypoxic-related features are correlated to a worst outcome and resistance to treatments (e.g., radio- and chemotherapy) [21,24,50].

4. Hypoxia Inducible Factors (HIFs) in pHGGs

Hypoxia-Inducible Factors are heterodimeric transcription factors composed of a regulating α subunit, which is sensitive to oxygen, and a constitutively expressed β subunit also named ARNT (Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator). Three different homologous α subunits are commonly described, namely HIF-1, HIF-2 and HIF-3 [18,20,22,27,28,55]. For instance, knowledge is very limited regarding the HIF-3 α role, but HIF-1 α and HIF-2 α are frequently described in hypoxia regulation. HIF- α s are a type of on/off switch for cellular adaptation to hypoxia. In the presence of oxygen, the regulating α subunit undergoes hydroxylation by the PHD (Prolyl Hydroxylase Domain) enzymes, which use oxygen and α -ketoglutarate as substrates and iron and ascorbate as cofactors. HIF- α s are, then, degraded through the proteasome pathway after being recognized and ubiquitinated in the presence of VHL (Von Hippel-Lindau) tumor suppressor. As oxygen level decreases, PHD is inhibited and the HIF- α subunit is no more degraded and accumulates in the nucleus, where it binds to the ARNT subunit. This heterodimeric complex can then fix the HRE (Hypoxia Response Element), inducing various genes' expression mediating cell response to hypoxia. HIF-1 α and HIF-2 α , sharing 48% of their sequences, bind to the same HRE sequences and have many overlapping target genes. However, growing evidence suggests that HIF-1 α and HIF-2 α are differentially regulated in a time-dependent manner. In fact, HIF-1 α is dedicated to acute hypoxia, whereas HIF-2 α seems to be expressed during chronic phase of hypoxia to maintain immature cells and probably pHGG stem cell niches [27,29,35,53,54]. Their hyperexpressions are quite frequent in DIPG and pHGG cohorts. They are usually associated to mTor activation or PI3K (PhosphoInositide 3-kinase)/Akt signaling, just above the central node HIF-1 α /HIF-2 α [2,8,13,24,48]. Preclinical studies inducing HIF-2 α knockdown reduced only in vitro glioma stem cell-mediated angiogenesis and increased glioma cell apoptosis, whereas HIF-1 α knockdown resulted in reduced cell growth in both stem cells and non-stem cells [24,55].

5. HIF Target Genes in pHGG

As already described above, hypoxia, subsequently to HIFs induction, is associated to the expression of various proteins that will increase oxygen inflows in tissues through erythropoiesis (EPO (erythropoietin), transferrine, transferrin receptor) and aberrant neoangiogenesis in tissues (secretion of VEGF and iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase)) [18,20–22,28]. A metabolic adaptation to these low oxygen concentrations is also present with the Warburg effect, inducing glucose transporters and glycolytic enzymes. pHGGs, like most other solid tumors, are highly glycolytic cancers producing large amounts of lactate as a metabolic by-product, increasing resistance to radiotherapy. All these genes have a common objective: adapt the pHGG cells to the newly encountered hypoxia conditions and maintain their proliferation and homeostasis [24,25,56,57].

For cell proliferation, HIF-1 α and HIF-2 α seem to govern differentially their downstream signaling pathways, although in opposite ways [24,27,28] (Figure 3). To regulate cell cycle progression, HIF-1 α inhibits MYC, while HIF-2 α promotes MYC/MYCIN stabilization. On cell lines with poor MYC expression but high HIF-2 α expression, this latter was sufficient to promote cell proliferation in the absence of MYC/MYCIN deregulation. Indeed, the unique inhibition of HIF-2 α , but not HIF-1 α , was sufficient to decrease cell proliferation in MYC amplified cells, suggesting a complex transcriptional synergy between HIF-1 α and HIF-2 α . MYC seems also to maintain self-renewal exclusively in pHGG stem cells by selective binding to the HIF-2 α promoter and the activation of the HIF-2 α stemness pathway [58]. The balanced expression of HIF-1 α /HIF-2 α probably is one of the key drivers of pHGG cell survival and renewal concomitantly to a high level of Oct4 or CD133+ cells [40,58].

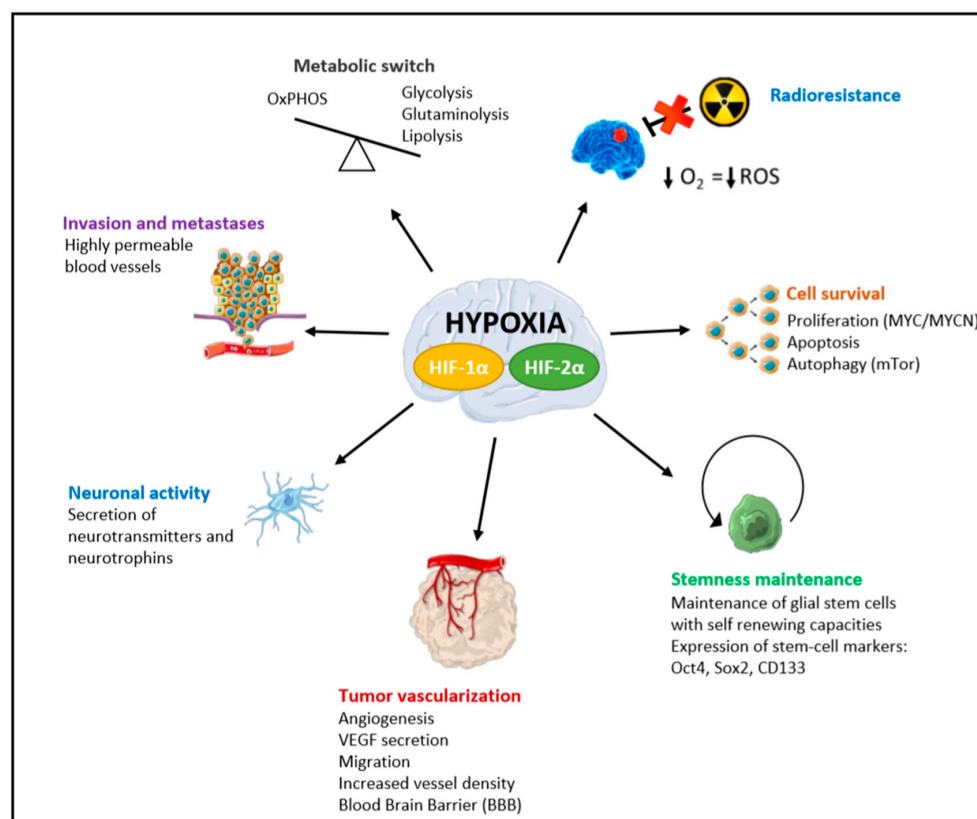


Figure 3. Effects of Hypoxia-Inducible Factors' (HIF-1 α and HIF-2 α) hyperexpressions in pediatric high-grade gliomas. HIFs have a specific role in metabolism, radioresistance, cell survival and stemness maintenance, but also in vascularization, neuronal activity and pHGG cell migration. (OxPHOS = mitochondrial oxidative phosphorylation system, ROS = Reactive Oxygen Species).

For cell homeostasis, in addition to the glycolytic switch, the mitochondrial oxidative phosphorylation system (OxPHOS) usually appears when Warburg effect decreases during tumor reoxygenation, and promotes a smaller pHGG cell viability [56] (Figure 3). However, HIF-1 α and HIF-2 α led the cells to a final complete metabolic reprogramming with the activation of glutaminolysis, serinolysis and/or phospholipid metabolism [24,25]. Glutamine addiction is usually associated to glycolysis impairment and Akt induction in those HGG cells [6]. This was demonstrated in patients' tumors, as well as in pHGG-derived cell lines [24,25]. Glutaminolysis and serinolysis were associated significantly to histone *H3F3A* mutation and phospholipid metabolism to a poorer outcome [25,59,60]. These metabolic alterations represent an onco-requisite factor of pHGG progression and probably tumorigenesis. These metabolism modifications can be explored by MRI spectroscopy as well as FDG-PET (Fluoro-Deoxy-Glucose/Positron Emission Tomography) [61].

Following the metabolic modifications and linked to the oxidative stress, ROS (Reactive Oxygen Species) can increase dramatically and lead to important DNA damages, aiming to destroy tumor cells [62]. The ROS in brain tumors has long been studied since they are major criterion for radiotherapy resistance. Nevertheless, lower is the oxygen level, lower is the rate of ROS produced, resulting in lower DNA damages for the same radiation dose. Hypoxic tumors are, thus, considered as radioresistant cancers. Thus, high hypoxic regions in pHGG are predictive of poor response to radiotherapy with poor overall survival in direct correlation with ROS production. This ROS increase can also lead to autophagy induction and interplay with mTORC1 and mTORC2 hyperexpressions [38].

All those adaptive processes favor invasion and cell migration [21]. In addition, the aberrant vasculature resulting from HIF-hypoxia signaling allows a higher permeability of vessels. In addition to regular vessels, in the brain, there is a specific structure named the blood–brain barrier (BBB) that is considered as the major obstacle to adequate drug delivery in brain tumors [63,64]. The BBB is a neurovascular unit composed of endothelial cells and surrounding pericytes (Figures 1 and 3). Both are characterized at the molecular level by tight junction proteins. Directly on the BBB, astrocytic feet, neurons and microglia are described. Indeed, neurogenesis and angiogenesis share regulatory factors that contribute to the simultaneous formation of vascular networks and neuronal circuits in the brain. The driving pathways of this interplay are usually based on VEGF/VEGFR balance as well as neurotransmitters like dopamine or glutamate that activate hypoxia response and the other way around [19,36,65] (Figure 3). Moreover, the interaction between hypoxic pHGG cells and neuronal activity or neurotransmitters might be now an opening field understanding further tumorigenesis and pave the way for innovative therapeutic strategies.

For instance, to our knowledge, studies in pHGGs on the interplay between immune response and hypoxia or genomic instability are very rare and would give further insight to treatment possibilities.

6. Comparison with Adult High-Grade Glioma (aHGG) Hypoxia

The aHGG are quite different from pHGG in various aspects, explaining the differential roles of hypoxia during their gliomagenesis. Epidemiology, clinical features, outcome, brain locations, as well as genetic and epigenetic abnormalities, are completely divergent between the two age entities.

Immunity and genomic instability are clearly two specific interplays already described with hypoxia in aHGGs. In fact, pHGGs are driven by epigenetic events, mainly mutations involving Histone 3 that are confer a hypomethylated profile, setting them clearly apart from their adult counterparts, where a predominant DNA hypermethylation is usually present [66]. These epigenetic modifications have a direct impact on tumor development and their features. DNA methylation patterns are described in adult cancers as a mechanism explaining the changes in splicing patterns under hypoxia. Recent publications in aHGG described this post-transcriptional process as a new hallmark of aggressiveness and linked intra-aHGG hypoxia to hypermethylation [67]. This RNA splicing is not present and induced in pHGG in association with hypoxia. The other additional impact of hypoxia is its role in aHGG genomic instability, where genomics, epigenomics and hypoxia are directly linked together [68].

The other main difference between adult and pediatric patients is the tumor location that we did not precisely describe in the previous paragraphs. In fact, aHGG are mainly located in hemispheres, whereas pHGG are frequently located in midline brainstem and thalamic structures. As already mentioned, O₂ tensions and hypoxic niches are not directly located in those brain areas [21,23,34,35,43]. Nevertheless, both aHGG and pHGG invade the SVZ at the end of their evolution with differences in the invasive process under the pressure of hypoxic regions and gene deregulations [36]. The starting points in the brain of age HGG-entities may also result in differences between hypoxia locations changing during brain development and neuronal maturation during life [21,23].

All those observations bring grist to the mill for separate hypoxic-related consequences in aHGGs and pHGGs.

7. Hypoxia Modelization in pHGG In Vitro Studies

Today, the most accurate in vitro model for pHGG is a patient-derived cell line initiated from tumor biopsy at diagnosis or at relapse time [13,24,25,69]. Therefore, a worldwide effort was dedicated in the last decade to develop such models to mimic accurately the intrinsic patient tumor behavior. Nevertheless, in vitro hypoxia induction is underdeveloped in the preclinical pHGG studies, but as we discussed above, HIFs seem to be key drivers for pHGG cell proliferation, survival, migration and stemness maintenance. To recreate acute, chronic and cyclic hypoxic conditions in pHGG, different techniques can be proposed: either chemically hypoxia induction using Cobalt (II) Chloride hexahydrate (CoCl₂) or Deferoxamine (DFO or DFX), either “physically” using a modular incubator chamber, 3D organoid/spheroid models or cells cultured in microenvironment matrix [24,25,32,70]. CoCl₂ inhibits the PHD enzyme, which is then unable to mark HIF-1 α subunit, stop its degradation and favor its accumulation in the nucleus, leading to the expression of its target genes. CoCl₂ mimics only one aspect of hypoxic conditions, which is HIF-1 α stabilization, but little is known about its effects on HIF-2 α . We can probably obtain the same effect with recently developed PHD inhibitors [70,71]. For DFO, an iron chelator, its use in cells also leads to HIF-1 α and VEGF accumulations due to MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) signaling activation, with the same questioning on HIF-2 α .

Finally, the only way to better reproduce the global hypoxic conditions in cells is using a hypoxic chamber or incubator in which oxygen levels can be regulated from 21% (normoxia) to the most extreme hypoxia encountered in HGG with O₂ less than 0.1%. It can easily help us to study the variations in oxygen levels to understand the acute versus chronic versus cyclic hypoxia and then decipher the dynamics of HIF- α signaling [24,25]. Another tool that can help to quantitatively dissect the effects of hypoxia is microfluidic devices, as well as 3D and matrix environment cultures, which enable to mimic successfully the tumor microenvironment in vitro with varying concentrations of oxygen in the presence of brain cells in addition to pHGG cells and/or the BBB structures [63]. Those models are thereafter used for drug screening to find the appropriate therapies in pHGGs combined or not with irradiation, but taking into account this major microenvironment actor. In fact, the hypoxia environment impacts pHGG cell response to conventional or new therapies [24,25] through their proliferation, their metabolism and their gene expressions.

8. HIF Targeted Therapies

Beyond the understanding of hypoxia-related actors in pHGG, this pathway and especially HIF α s can be new therapeutic options to improve conventional chemo- and radiotherapy, but also as specific targeted therapies. Despite their close homologies in amino-acid sequence, HIF-1 α and HIF-2 α proteins conformations are very different and probably need specific targeting. Several mechanisms and targets can stop $\alpha\alpha$ activity when inhibited: mRNA or protein HIF expression, HIF- α /HIF- β dimerization, DNA binding at HRE, transcriptional activity or increase of proteasomal degradation [71]. To target all these steps, different drugs are proposed.

For mRNA, partial or total downregulation of HIF-1 α , aminoflavone, an aryl hydrocarbon receptor ligand, has been described, as well as synthetic antisense oligonucleotides, like EZN-2968. They only

partially impact HIF-2 α mRNA expression. The translation of HIF- α mRNA is also controlled by growth factor signaling pathways such as the PI3K/Akt/mTor pathway, that can be targeted with specific drugs. Irinotecan and topotecan are topoisomerase I inhibitors also able to downregulate HIF-1 α and HIF-2 α levels [24,25].

To avoid HIF- α /HIF- β complex assembly, small molecules were recently developed to interact with PAS domains in the HIF- α and HIF-1 β /ARNT subunits, like cyclic peptide inhibitor (cyclo-CLLFVY) for HIF-1 α , PT2385 or PT2977 for HIF-2 α and acriflavine for both HIF- α s. This blocking prevents HIFs transcription factor activity. Another way is to stop p300/CBP co-activator binding to HIF- α /HIF- β complex with chetomin, bortezomib or amphotericine B, for example. Transcriptional activation of target genes by HIFs requires a direct binding at HRE. Echinomycin or specific polyamides are those inhibitors. The last mechanism that might be used for therapeutic inhibition is an induction of HIF-1 α proteasomal degradation in a VHL-independent manner (heat shock protein inhibitors) or not (histone deacetylase inhibitors). This approach is not fully understood for HIF-2 α inhibition [71].

Another strategy that has been rarely, but recently, described is using drug-enhancing oxygen in the tumors, like trans sodium crocetinate [72].

In the very last trials in pHGG which have not yet been published—but information on them is available on the ClinicalTrials.gov website—the use of topoisomerase I inhibitors and PI3K/Akt/mTor targeting is frequent. As it is a frequently induced pathway in the pHGG environment, more and more studies will probably be opened or are currently recruiting with specific HIF inhibitors, like our French national RAPIRI phase I trial based on our previous preclinical work using a mTor and HIF-1 α targeting [24].

Nevertheless, only partial HIF inhibition is for now available with those inhibitors and a lot of effort will be applied in the next decade to search for potent specific HIF-1 α and HIF-2 α antagonists. In addition to the lack of a complete antagonism of HIF- α , we might also be able to face, in the case of the entire inhibition of one single HIF- α , the balanced pathway based on HIF-1, HIF-2 and probably HIF-3 expressions and/or upstream and downstream reinduction able to overpass this inhibition. For other targeted therapies, a deep knowledge on their functional inhibition will help us to refine accurately the future trials in pHGGs.

9. Conclusions

In conclusion, HIF-hypoxia signaling seems to be very frequently involved in each step of pHGG development or progression and might be a new path for tumorigenesis and treatment resistance understanding. Nevertheless, we need many more pHGG studies to extend our knowledge and to select which specific groups of pHGG will benefit from these therapeutic strategies targeting the hypoxia-driven pathway. This might also be an indispensable factor to consider when developing preclinical drug screening in future pHGG trials because of its particularly high impact on cell resistance to therapies (e.g., radiotherapy or targeted drugs).

Author Contributions: All authors contributed to the conceptualization and methodology of this review. Q.F., A.-F.B., M.M., B.L., C.P., A.C. and N.E.-W. completed the previous and current research topics on hypoxia in pHGGs in the Lab. Q.F, M.P., B.L., M.D. and N.E.-W. were involved in the writing-original draft preparation. Q.F. and N.E.-W. were designing and preparing the Figures. All authors contributed to writing-review and editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Ostrom, Q.T.; de Blank, P.M.; Kruchko, C.; Petersen, C.M.; Liao, P.; Finlay, J.L.; Stearns, D.S.; Wolff, J.E.; Wolinsky, Y.; Letterio, J.J.; et al. Alex's Lemonade Stand Foundation Infant and Childhood Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2007–2011. *Neuro-Oncol.* **2015**, *16*, x1–x36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Mackay, A.; Burford, A.; Carvalho, D.; Izquierdo, E.; Fazal-Salom, J.; Taylor, K.R.; Bjerke, L.; Clarke, M.; Vinci, M.; Nandhabalan, M.; et al. Integrated Molecular Meta-Analysis of 1,000 Pediatric High-Grade and Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Cancer Cell* **2017**, *32*, 520–537. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. El-Khouly, F.E.; Veldhuijzen van Zanten, S.E.M.; Santa-Maria Lopez, V.; Hendrikse, N.H.; Kaspers, G.J.L.; Loizos, G.; Sumerauer, D.; Nysom, K.; Pruunsild, K.; Pentikainen, V.; et al. Diagnostics and treatment of diffuse intrinsic pontine glioma: Where do we stand? *J. Neurooncol.* **2019**, *145*, 177–184. [[CrossRef](#)]
4. MacDonald, T.J.; Aguilera, D.; Kramm, C.M. Treatment of high-grade glioma in children and adolescents. *Neuro-Oncol.* **2011**, *13*, 1049–1058. [[CrossRef](#)]
5. Grill, J.; Massimino, M.; Bouffet, E.; Azizi, A.A.; McCowage, G.; Cañete, A.; Saran, F.; Le Deley, M.C.; Varlet, P.; Morgan, P.S.; et al. Phase II, Open-Label, Randomized, Multicenter Trial (HERBY) of Bevacizumab in Pediatric Patients with Newly Diagnosed High-Grade Glioma. *J. Clin. Oncol.* **2018**, *36*, 951–958. [[CrossRef](#)]
6. Bax, D.A.; Mackay, A.; Little, S.E.; Carvalho, D.; Viana-Pereira, M.; Tamber, N.; Grigoriadis, A.E.; Ashworth, A.; Reis, R.M.; Ellison, D.W.; et al. A distinct spectrum of copy number aberrations in pediatric high-grade gliomas. *Clin. Cancer Res.* **2010**, *16*, 3368–3377. [[CrossRef](#)]
7. Schwartzentruber, J.; Korshunov, A.; Liu, X.Y.; Jones, D.T.; Pfaff, E.; Jacob, K.; Sturm, D.; Fontebasso, A.M.; Quang, D.A.; Tönjes, M.; et al. Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature* **2012**, *482*, 226–231. [[CrossRef](#)]
8. Taylor, K.R.; Mackay, A.; Truffaux, N.; Butterfield, Y.; Morozova, O.; Philippe, C.; Castel, D.; Grasso, C.S.; Vinci, M.; Carvalho, D.; et al. Recurrent activating ACVR1 mutations in diffuse intrinsic pontine glioma. *Nat. Genet.* **2014**, *46*, 457–461. [[CrossRef](#)]
9. Louis, D.N.; Perry, A.; Reifenberger, G.; von Deimling, A.; Figarella-Branger, D.; Cavenee, W.K.; Ohgaki, H.; Wiestler, O.D.; Kleihues, P.; Ellison, D.W. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: A summary. *Acta Neuropathol.* **2016**, *131*, 803–820. [[CrossRef](#)]
10. Louis, D.N.; Ellison, D.W.; Brat, D.J.; Aldape, K.; Capper, D.; Hawkins, C.; Paulus, W.; Perry, A.; Reifenberger, G.; Figarella-Branger, D.; et al. cIMPACT-NOW: A practical summary of diagnostic points from Round 1 updates. *Brain Pathol.* **2019**, *29*, 469–472. [[CrossRef](#)]
11. Aihara, K.; Mukasa, A.; Gotoh, K.; Saito, K.; Nagae, G.; Tsuji, S.; Tatsuno, K.; Yamamoto, S.; Takayanagi, S.; Narita, Y.; et al. H3F3A K27M mutations in thalamic gliomas from young adult patients. *Neuro-Oncol.* **2014**, *16*, 140–146. [[CrossRef](#)]
12. Khuong-Quang, D.-A.; Buczkowicz, P.; Rakopoulos, P.; Liu, X.-Y.; Fontebasso, A.M.; Bouffet, E.; Bartels, U.; Albrecht, S.; Schwartzentruber, J.; Letourneau, L.; et al. K27M mutation in histone H3.3 defines clinically and biologically distinct subgroups of pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas. *Acta Neuropathol.* **2012**, *124*, 439–447. [[CrossRef](#)]
13. Castel, D.; Philippe, C.; Kergrohen, T.; Sill, M.; Merlevede, J.; Barret, E.; Puget, S.; Sainte-Rose, C.; Kramm, C.M.; Jones, C.; et al. Transcriptomic and epigenetic profiling of 'diffuse midline gliomas, H3 K27M-mutant' discriminate two subgroups based on the type of histone H3 mutated and not supratentorial or infratentorial location. *Acta Neuropathol. Commun.* **2018**, *6*, e117. [[CrossRef](#)]
14. Mackay, A.; Burford, A.; Molinari, V.; Jones, D.T.W.; Izquierdo, E.; Brouwer-Visser, J.; Giangaspero, F.; Haberler, C.; Pietsch, T.; Jacques, T.S.; et al. Molecular, Pathological, Radiological, and Immune Profiling of Non-brainstem Pediatric High-Grade Glioma from the HERBY Phase II Randomized Trial. *Cancer Cell* **2018**, *33*, 829–842. [[CrossRef](#)]
15. Filbin, M.G.; Tirosh, I.; Hovestadt, V.; Shaw, M.L.; Escalante, L.E.; Mathewson, N.D.; Neftel, C.; Frank, N.; Pelton, K.; Hebert, C.M.; et al. Developmental and oncogenic programs in H3K27M gliomas dissected by single-cell RNA-seq. *Science* **2018**, *360*, 331–335. [[CrossRef](#)]
16. Silveira, A.B.; Kasper, L.H.; Fan, Y.; Jin, H.; Wu, G.; Shaw, T.I.; Zhu, X.; Larson, J.D.; Easton, J.; Shao, Y.; et al. H3.3 K27M depletion increases differentiation and extends latency of diffuse intrinsic pontine glioma growth in vivo. *Acta Neuropathol.* **2019**, *137*, 637–655. [[CrossRef](#)]

17. Jean-Quartier, C.; Jeanquartier, F.; Holzinger, A. Open Data for Differential Network Analysis in Glioma. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, e547. [[CrossRef](#)]
18. Samanta, D.; Semenza, G.L. Metabolic adaptation of cancer and immune cells mediated by hypoxia-inducible factors. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* **2018**, *1870*, 15–22. [[CrossRef](#)]
19. Venkatesh, H.S.; Morishita, W.; Geraghty, A.C.; Silverbush, D.; Gillespie, S.M.; Arzt, M.; Tam, L.T.; Espenel, C.; Ponnuswami, A.; Ni, L.; et al. Electrical and synaptic integration of glioma into neural circuits. *Nature* **2019**, *573*, 539–545. [[CrossRef](#)]
20. Kaur, B.; Khwaja, F.W.; Severson, E.A.; Matheny, S.L.; Brat, D.J.; Van Meir, E.G. Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis. *Neuro-oncol.* **2005**, *7*, 134–153. [[CrossRef](#)]
21. Muz, B.; de la Puente, P.; Azab, F.; Azab, A.K. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia (Auckl)* **2015**, *3*, 83–92. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Schito, L.; Semenza, G.L. Hypoxia-Inducible Factors: Master Regulators of Cancer Progression. *Trends Cancer* **2016**, *2*, 758–770. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Pistollato, F.; Chen, H.L.; Rood, B.R.; Zhang, H.Z.; D’Avella, D.; Denaro, L.; Gardiman, M.; te Kronnie, G.; Schwartz, P.H.; Favaro, E.; et al. Hypoxia and HIF1alpha repress the differentiative effects of BMPs in high-grade glioma. *Stem Cells* **2009**, *27*, 7–17. [[CrossRef](#)]
24. Nguyen, A.; Moussallieh, F.M.; Mackay, A.; Cicek, A.E.; Coca, A.; Chenard, M.P.; Weingertner, N.; Lhermitte, B.; Letouzé, E.; Guérin, E.; et al. Characterization of the transcriptional and metabolic responses of pediatric high-grade gliomas to mTOR-HIF-1 α axis inhibition. *Oncotarget* **2017**, *8*, 71597–71617. [[CrossRef](#)]
25. Blandin, A.F.; Durand, A.; Litzler, M.; Tripp, A.; Guérin, É.; Ruhland, E.; Obrecht, A.; Keime, C.; Fuchs, Q.; Reita, D.; et al. Hypoxic Environment and Paired Hierarchical 3D and 2D Models of Pediatric H3.3-Mutated Gliomas Recreate the Patient Tumor Complexity. *Cancers* **2019**, *11*, e1875. [[CrossRef](#)]
26. Cervós-Navarro, J.; Diemer, N.H. Selective vulnerability in brain hypoxia. *Crit. Rev. Neurobiol* **1991**, *6*, 149–182.
27. Pugh, C.W.; Ratcliffe, P.J. New horizons in hypoxia signaling pathways. *Exp. Cell Res.* **2017**, *356*, 116–121. [[CrossRef](#)]
28. Loboda, A.; Jozkowicz, A.; Dulak, J. HIF-1 and HIF-2 Transcription Factors-Similar but Not Identical. *Mol. Cells* **2010**, *29*, 435–442. [[CrossRef](#)]
29. Li, Z.; Bao, S.; Wu, Q.; Wang, H.; Eyler, C.; Sathornsumetee, S.; Shi, Q.; Cao, Y.; Lathia, J.; McLendon, R.E.; et al. Hypoxia-Inducible Factors Regulate Tumorigenic Capacity of Glioma Stem Cells. *Cancer Cell* **2009**, *15*, 501–513. [[CrossRef](#)]
30. Dings, J.; Meixensberger, J.; Jäger, A.; Roosen, K. Clinical experience with 118 brain tissue oxygen partial pressure catheter probes. *Neurosurgery* **1998**, *43*, 1082–1095. [[CrossRef](#)]
31. Brahimi-Horn, M.C.; Pouyssegur, J. Oxygen, a source of life and stress. *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 3582–3591. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Wenger, R.; Kurtcuoglu, V.; Scholz, C.; Marti, H.; Hoogewijs, D. Frequently asked questions in hypoxia research. *Hypoxia* **2015**, *3*, e35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Ortiz-Prado, E.; Dunn, J.F.; Vasconez, J.; Castillo, D.; Viscor, G. Partial pressure of oxygen in the human body: A general review. *Am. J. Blood Res.* **2019**, *9*, 1–14. [[PubMed](#)]
34. Sun, C.; Fu, J.; Qu, Z.; Li, D.; Si, P.; Qiao, Q.; Zhang, W.; Xue, Y.; Zhen, J.; Wang, W. Chronic mild hypoxia promotes hippocampal neurogenesis involving Notch1 signaling in epileptic rats. *Brain Res.* **2019**, *1714*, 88–98. [[CrossRef](#)]
35. Coletti, A.M.; Singh, D.; Kumar, S.; Shafin, T.N.; Briody, P.J.; Babbitt, B.F.; Pan, D.; Norton, E.S.; Brown, E.C.; Kahle, K.T.; et al. Characterization of the ventricular-subventricular stem cell niche during human brain development. *Development* **2018**, *26*, e145. [[CrossRef](#)]
36. Qin, E.Y.; Cooper, D.D.; Abbott, K.L.; Lennon, J.; Nagaraja, S.; Mackay, A.; Jones, C.; Vogel, H.; Jackson, P.K.; Monje, M. Neural Precursor-Derived Pleiotrophin Mediates Subventricular Zone Invasion by Glioma. *Cell* **2017**, *170*, 845–859. [[CrossRef](#)]
37. Lee, J.H.; Lee, J.E.; Kahng, J.Y.; Kim, S.H.; Park, J.S.; Yoon, S.J.; Um, J.Y.; Kim, W.K.; Lee, J.K.; Park, J.; et al. Human glioblastoma arises from subventricular zone cells with low-level driver mutations. *Nature* **2018**, *560*, 243–247. [[CrossRef](#)]

38. Rushing, G.V.; Brockman, A.A.; Bollig, M.K.; Leelatian, N.; Mobley, B.C.; Irish, J.M.; Ess, K.C.; Fu, C.; Ihrie, R.A. Location-dependent maintenance of intrinsic susceptibility to mTORC1-driven tumorigenesis. *Life Sci. Alliance* **2019**, *25*, e2. [[CrossRef](#)]
39. Pistollato, F.; Abbadi, S.; Rampazzo, E.; Persanon, L.; Della Puppan, A.; Frassonn, C.; Sarton, E.; Scienzan, R.; D'avellann, D.; Basso, G. Intratumoral hypoxic gradient drives stem cells distribution and MGMT expression in glioblastoma. *Stem Cells* **2010**, *28*, 851–862. [[CrossRef](#)]
40. Soedan, A.; Park, M.; Lee, D.; Mintz, A.; Androutsellis-Theotokis, A.; McKay, R.D.; Engh, J.; Iwama, T.; Kunisada, T.; Kassam, A.B.; et al. Hypoxia promotes expansion of the CD133-positive glioma stem cells through activation of HIF-1alpha. *Oncogene* **2009**, *28*, 3949–3959. [[CrossRef](#)]
41. Semenza, G.L. Dynamic regulation of stem cell specification and maintenance by hypoxia-inducible factors. *Mol. Asp. Med.* **2016**, *47*, 15–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Bohman, L.-E.; Swanson, K.R.; Moore, J.L.; Rockne, R.; Mandigo, C.; Hankinson, T.; Assanah, M.; Canoll, P.; Bruce, J.N. Magnetic resonance imaging characteristics of glioblastoma multiforme: Implications for understanding glioma ontogeny. *Neurosurgery* **2010**, *67*, 1319–1327. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Hoffman, M.; Gillmor, A.H.; Kunz, D.J.; Johnston, M.J.; Nikolic, A.; Narta, K.; Zarrei, M.; King, J.; Ellestad, K.; Dang, N.H.; et al. Intratumoral Genetic and Functional Heterogeneity in Pediatric Glioblastoma. *Cancer Res.* **2019**, *79*, 2111–2123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Jensen, R.L.; Mumert, M.L.; Gillespie, D.L.; Kinney, A.Y.; Schabel, M.C.; Salzman, K.L. Preoperative dynamic contrast-enhanced MRI correlates with molecular markers of hypoxia and vascularity in specific areas of intratumoral microenvironment and is predictive of patient outcome. *Neuro-Oncol.* **2014**, *16*, 280–291. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Shaik, S.; Kennis, B.; Maegawa, S.; Schadler, K.; Yanwen, Y.; Callegari, K.; Lulla, R.R.; Goldman, S.; Nazarian, J.; Rajaram, V.; et al. REST upregulates gremlin to modulate diffuse intrinsic pontine glioma vasculature. *Oncotarget* **2017**, *9*, 5233–5250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Duchatel, R.J.; Jackson, E.R.; Alvaro, F.; Nixon, B.; Hondermarck, H.; Dun, M.D. Signal Transduction in Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Proteomics* **2019**, *19*, e1800479. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Castel, D.; Philippe, C.; Calmon, R.; Le Dret, L.; Truffaux, N.; Boddaert, N.; Pagès, M.; Taylor, K.R.; Saulnier, P.; Lacroix, L.; et al. Histone H3F3A and HIST1H3B K27M mutations define two subgroups of diffuse intrinsic pontine gliomas with different prognosis and phenotypes. *Acta Neuropathol.* **2015**, *130*, 815–827. [[CrossRef](#)]
48. Piha-Paul, S.A.; Shin, S.J.; Vats, T.; Guha-Thakurta, N.; Aaron, J.; Rytting, M.; Kleinerman, E.; Kurzrock, R. Pediatric patients with refractory central nervous system tumors: Experiences of a clinical trial combining bevacizumab and temsirolimus. *Anticancer Res.* **2014**, *34*, 1939–1945.
49. Ceschin, R.; Kocak, M.; Vajapeyam, S.; Pollack, I.F.; Onar-Thomas, A.; Dunkel, I.J.; Poussaint, T.Y.; Panigrahy, A. Quantifying radiation therapy response using apparent diffusion coefficient (ADC) parametric mapping of pediatric diffuse intrinsic pontine glioma: A report from the pediatric brain tumor consortium. *J. Neurooncol.* **2019**, *143*, 79–86. [[CrossRef](#)]
50. Hoffman, L.M.; van Zanten, S.E.V.; Colditz, N.; Baugh, J.; Chaney, B.; Hoffmann, M.; Lane, A.; Fuller, C.; Miles, L.; Hawkins, C.; et al. Clinical, Radiologic, Pathologic, and Molecular Characteristics of Long-Term Survivors of Diffuse Intrinsic Pontine Glioma (DIPG): A Collaborative Report from the International and European Society for Pediatric Oncology DIPG Registries. *J. Clin. Oncol.* **2018**, *36*, 1963–1972. [[CrossRef](#)]
51. Mohyeldin, A.; Garzón-Muvdi, T.; Quiñones-Hinojosa, A. Oxygen in Stem Cell Biology: A Critical Component of the Stem Cell Niche. *Cell Stem Cell* **2010**, *7*, 150–161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Saxena, K.; Jolly, M.K. Acute vs. Chronic vs. Cyclic Hypoxia: Their Differential Dynamics, Molecular Mechanisms, and Effects on Tumor Progression. *Biomolecules* **2019**, *9*, e339. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Donovan, L.K.; Potter, N.E.; Warr, T.; Pilkington, G.J. A Prominin-1-Rich Pediatric Glioblastoma: Biologic Behavior Is Determined by Oxygen Tension-Modulated CD133 Expression but Not Accompanied by Underlying Molecular Profiles. *Transl. Oncol.* **2012**, *5*, 141–154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Rong, Y.; Durden, D.L.; Meir, E.G.V.; Brat, D.J. Pseudopalisading Necrosis in Glioblastoma: A Familiar Morphologic Feature That Links Vascular Pathology, Hypoxia, and Angiogenesis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2006**, *65*, e11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Ratcliffe, P.J. HIF-1 and HIF-2: Working alone or together in hypoxia? *J. Clin. Invest.* **2007**, *117*, 862–865. [[CrossRef](#)]

56. Shen, H.; Yu, M.; Tsoli, M.; Chang, C.; Joshi, S.; Liu, J.; Ryall, S.; Chornenkyy, Y.; Siddaway, R.; Hawkins, C.; et al. Targeting reduced mitochondrial DNA quantity as a therapeutic approach in pediatric high-grade gliomas. *Neuro-Oncol.* **2020**, *22*, 139–151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Al-Saffar, N.M.; Marshall, L.V.; Jackson, L.E.; Balarajah, G.; Eykyn, T.R.; Agliano, A.; Clarke, P.A.; Jones, C.; Workman, P.; Pearson, A.D.; et al. Lactate and choline metabolites detected in vitro by nuclear magnetic resonance spectroscopy are potential metabolic biomarkers for PI3K inhibition in pediatric glioblastoma. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e103835. [[CrossRef](#)]
58. Das, B.; Pal, B.; Bhuyan, R.; Li, H.; Sarma, A.; Gayan, S.; Talukdar, J.; Sandhya, S.; Bhuyan, S.; Gogoi, G.; et al. MYC Regulates the HIF2 α Stemness Pathway via Nanog and Sox2 to Maintain Self-Renewal in Cancer Stem Cells versus Non-Stem Cancer Cells. *Cancer Res.* **2019**, *79*, 4015–4025. [[CrossRef](#)]
59. Sainz de la Maza, D.; Moratilla, A.; Aparicio, V.; Lorca, C.; Alcaina, Y.; Martín, D.; De Miguel, M.P. Metabolic Reprogramming, Autophagy, and Reactive Oxygen Species Are Necessary for Primordial Germ Cell Reprogramming into Pluripotency. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, *2017*, e4745252. [[CrossRef](#)]
60. Yang, C.; Sudderth, J.; Dang, T.; Bachoo, R.M.; McDonald, J.G.; DeBerardinis, R.J. Glioblastoma cells require glutamate dehydrogenase to survive impairments of glucose metabolism or Akt signaling. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 7986–7993. [[CrossRef](#)]
61. Zukotynski, K.A.; Vajapeyam, S.; Fahey, F.H.; Kocak, M.; Brown, D.; Ricci, K.I.; Onar-Thomas, A.; Fouladi, M.; Poussaint, T.Y. Correlation of ¹⁸F-FDG PET and MRI Apparent Diffusion Coefficient Histogram Metrics with Survival in Diffuse Intrinsic Pontine Glioma: A Report from the Pediatric Brain Tumor Consortium. *J. Nucl. Med.* **2017**, *58*, 1264–1269. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Chen, R.; Lai, U.H.; Zhu, L.; Singh, A.; Ahmed, M.; Forsyth, N.R. Reactive Oxygen Species Formation in the Brain at Different Oxygen Levels: The Role of Hypoxia Inducible Factors. *Front. Cell Dev. Biol.* **2018**, *6*, e132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Warren, K.E. Beyond the Blood:Brain Barrier: The Importance of Central Nervous System (CNS) Pharmacokinetics for the Treatment of CNS Tumors, Including Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Front. Oncol.* **2018**, *8*, e239. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Da Ros, M.; De Gregorio, V.; Iorio, A.L.; Giunti, L.; Guidi, M.; de Martino, M.; Genitori, L.; Sardi, I. Glioblastoma Chemoresistance: The Double Play by Microenvironment and Blood-Brain Barrier. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, e2879. [[CrossRef](#)]
65. Caragher, S.P.; Shireman, J.M.; Huang, M.; Miska, J.; Atashi, F.; Baisiwala, S.; Hong Park, C.; Saathoff, M.R.; Warnke, L.; Xiao, T.; et al. Activation of Dopamine Receptor 2 Prompts Transcriptomic and Metabolic Plasticity in Glioblastoma. *J. Neurosci.* **2019**, *39*, 1982–1993. [[CrossRef](#)]
66. Tabouret, E.; Nguyen, A.T.; Dehais, C.; Carpentier, C.; Ducray, F.; Idbaih, A.; Mokhtari, K.; Jouvet, A.; Uro-Coste, E.; Colin, C.; et al. For POLA Network. Prognostic impact of the 2016 WHO classification of diffuse gliomas in the French POLA cohort. *Acta Neuropathol.* **2016**, *132*, 625–634. [[CrossRef](#)]
67. Zheng, H.; Momeni, A.; Cedoz, P.L.; Vogel, H.; Gevaert, O. Whole slide images reflect DNA methylation patterns of human tumors. *NPJ Genom. Med.* **2020**, *5*, e11. [[CrossRef](#)]
68. Archer, T.C.; Sengupta, S.; Pomergy, S.L. Brain cancer genomics and epigenomics. *Handb. Clin. Neurol.* **2018**, *148*, 785–797.
69. Tsoli, M.; Shen, H.; Mayoh, C.; Franshaw, L.; Ehteda, A.; Upton, D.; Carvalho, D.; Vinci, M.; Meel, M.H.; van Vuurden, D.; et al. International experience in the development of patient-derived xenograft models of diffuse intrinsic pontine glioma. *J. Neurooncol.* **2019**, *141*, 253–263. [[CrossRef](#)]
70. Sood, D.; Tang-Schomer, M.; Pouli, D.; Mizzoni, C.; Raia, N.; Tai, A.; Arkun, K.; Wu, J.; Black, L.D.; 3rd; Scheffler, B.; et al. 3D extracellular matrix microenvironment in bioengineered tissue models of primary pediatric and adult brain tumors. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, e4529. [[CrossRef](#)]
71. Wigerup, C.; Pählman, S.; Bexell, D. Therapeutic targeting of hypoxia and hypoxia-inducible factors in cancer. *Pharmacol. Ther.* **2016**, *164*, 152–169. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Gainer, J.L.; Sheehan, J.P.; Lerner, J.M.; Jones, D.R. Trans sodium crocetin with temozolomide and radiation therapy for glioblastoma multiforme. *J. Neurosurg.* **2017**, *126*, 460–466. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]




Annexe 3

Revue scientifique

**Focus on hypoxia-related pathways in pediatric osteosarcomas and their
druggability**

Review

Focus on Hypoxia-Related Pathways in Pediatric Osteosarcomas and Their Druggability

Marina Pierrelvecin ¹, Quentin Fuchs ¹, Benoit Lhermitte ^{1,2}, Melissa Messé ¹, Eric Guérin ³ , Noelle Weingertner ², Sophie Martin ¹, Isabelle Lelong-Rebel ¹, Charlotte Nazon ⁴, Monique Dontenwill ¹ and Natacha Entz-Werlé ^{1,4,*}

¹ Laboratory of Bioimaging and Pathologies, UMR CNRS 7021, 67405 Illkirch, France; marina.pierrelvecin@etu.unistra.fr (M.P.); quentin.fuchs@etu.unistra.fr (Q.F.); Benoit.lhermitte@chru-strasbourg.fr (B.L.); melissa.messe@etu.unistra.fr (M.M.); sophie.martin@unistra.fr (S.M.); isabelle.lelong-rebel@unistra.fr (I.L.-R.); monique.dontenwill@unistra.fr (M.D.)

² Pathology Department, University Hospital of Strasbourg, 67098 Strasbourg, France; Noelle.weingertner@chru-strasbourg.fr

³ Oncobiology, Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, University Hospital of Strasbourg, 67098 Strasbourg, France; Eric.guerin@chru-strasbourg.fr

⁴ Pediatric Oncohematology Unit, University Hospital of Strasbourg, 67098 Strasbourg, France; Charlotte.nazon@chru-strasbourg.fr

* Correspondence: Natacha.entz-werle@chru-strasbourg.fr; Tel.: +33-3-8812-8396; Fax: +33-3-8812-8092

Received: 2 August 2020; Accepted: 22 August 2020; Published: 31 August 2020



Abstract: Osteosarcoma is the most frequent primary bone tumor diagnosed during adolescence and young adulthood. It is associated with the worst outcomes in the case of poor response to chemotherapy and in metastatic disease. While no molecular biomarkers are clearly and currently associated with those worse situations, the study of pathways involved in the high level of tumor necrosis and in the immune/metabolic intra-tumor environment seems to be a way to understand these resistant and progressive osteosarcomas. In this review, we provide an updated overview of the role of hypoxia in osteosarcoma oncogenesis, progression and during treatment. We describe the role of normoxic/hypoxic environment in normal tissues, bones and osteosarcomas to understand their role and to estimate their druggability. We focus particularly on the role of intra-tumor hypoxia in osteosarcoma cell resistance to treatments and its impact in its endogenous immune component. Together, these previously published observations conduct us to present potential perspectives on the use of therapies targeting hypoxia pathways. These therapies could afford new treatment approaches in this bone cancer. Nevertheless, to study the osteosarcoma cell druggability, we now need specific in vitro models closely mimicking the tumor, its intra-tumor hypoxia and the immune microenvironment to more accurately predict treatment efficacy and be complementary to mouse models.

Keywords: osteosarcoma; hypoxia; progression; immunity; druggability; preclinical models

1. Introduction

The overall survival (OS) of osteosarcoma (OTS) patients has remained stable for three decades. For that reason, it is important to find new therapeutic strategies and new biomarkers to be able to predict the outcome and refine the prognosis of those children from the diagnosis. Pediatric high-grade OTS is the most common primary malignant bone tumor in children and adolescents. Those tumors account for more than 50% of primary bone cancers each year. The annual incidence is around 2 per million persons [1,2] with an incidence peak during puberty in a gender-dependent manner (males

are more affected than females) [3]. Ten-year OS is 65% for patients diagnosed without metastases and decreases to 20% for patients with metastatic disease at diagnosis [4]. The most frequent tumor localizations are metaphyseal areas of long bones (e.g., 42% in the femur, 19% in the tibia and 10% in humerus) [5]. These metaphyseal bones are close to the growth plates, where there is rapid bone growth. OTS is characterized by an impaired balance between the osteoblast, osteoclast and the mesenchymal precursor activities. They are defined by an extracellular osteoid and sometimes chondroid matrix produced by the malignant osteoblasts and a rapid proliferation with early micro- and macro-metastases [5]. At diagnosis, 80% of the patients present “invisible” micro-metastasis and 23% of the patients will have already visible metastases, which are located for more than two-thirds of the cases in the lungs and 16% in bones [4,5].

This bone cancer is known as a highly necrotic tumor even at diagnosis, where this histological feature is frequently observed on biopsies. This necrosis might be the consequence of the excessive and rapid growth of cancer cells, which are proficient in creating a hypoxic microenvironment [6,7] and an abnormal neoangiogenesis [8,9]. Besides finding tumor necrosis at biopsy, OTS is also characterized by necrotic rate assessment on surgical tumor resection after a neoadjuvant multichemotherapy approach. The histological Huvos grading classifies OTS patients in 2 groups considering the number of residual tumor cells and their paired necrotic percentage [7,10]. A rate of less than 10% viable cells is the witness of good histological response (GR): grade III GRs have less than 10% residual tumor cells and grade IV GRs have a complete tumor necrosis. A rate above 10% viable cells is related to a poor histological response (PR): grade II PR is between 10 and 50% residual tumor cells and grade I PR is above 50% of residual tumor cells. The 5-year OS in localized GR patients is 80%, whereas this OS decreases dramatically at less than 30% in patients with PR, an unresectable tumor, a primitive metastatic tumor or a therapeutic resistance [7,11]. Tumor necrosis is believed to represent the endpoint of severe chronic hypoxia. This necrosis can promote oxidative stress and modify metabolic responses due to inducing hypoxia-related biomarkers. Hypoxia itself can induce necrosis in the heart of the tumor, but, oppositely, can also induce inhibition of apoptosis and necrosis during cancer progression and treatment [12]. The cancer-related hypoxia is in addition to *in vivo* physiological oxygen tension, called physioxia (Figure 1). The atmospheric oxygen level (21% oxygen) is a non-physiological environment and can be considered as hyperoxia. The physioxia within human organs ranges from 5 to 9% depending on body regions (e.g., breast is at 8.5%, bone marrow at 7% and 5% for bones) [12–14]. Therefore, the hypoxic level can be probably defined in tumors and OTS as the rate of oxygen, which is below physiological oxygen concentration, then, less than 9% (Figure 1). This hypoxia directly induces the overexpression of hypoxia-inducible factors (HIFs). These hypoxia-related biomarkers were in past studies found to be frequently associated with the worst OS in many cancers, including OTS. HIF-1 α hyperexpression was significantly linked with metastatic disease, poor prognosis and outcome in OTS, supporting its probable role at diagnosis and during progression [15–18]. Usually, hypoxia confers a more aggressive phenotype by activating a cascade of molecular events partly mediated and regulated by HIFs. These also play an essential role in immunological responses and are considered as crucial physiological regulators of homeostasis, vascularization and anaerobic metabolism. So, the hypoxia-specific tumor microenvironment might be of importance during OTS oncogenesis, progression and during their treatment. Therefore, we try to decipher the normoxic/hypoxic pathways in normal tissues, bones and osteosarcomas to understand their role and to estimate their druggability in OTS. To study the efficacy of drugs inhibiting hypoxic biomarkers, we now need specific *in vitro* models closely mimicking the tumor and its intra-tumor hypoxia.

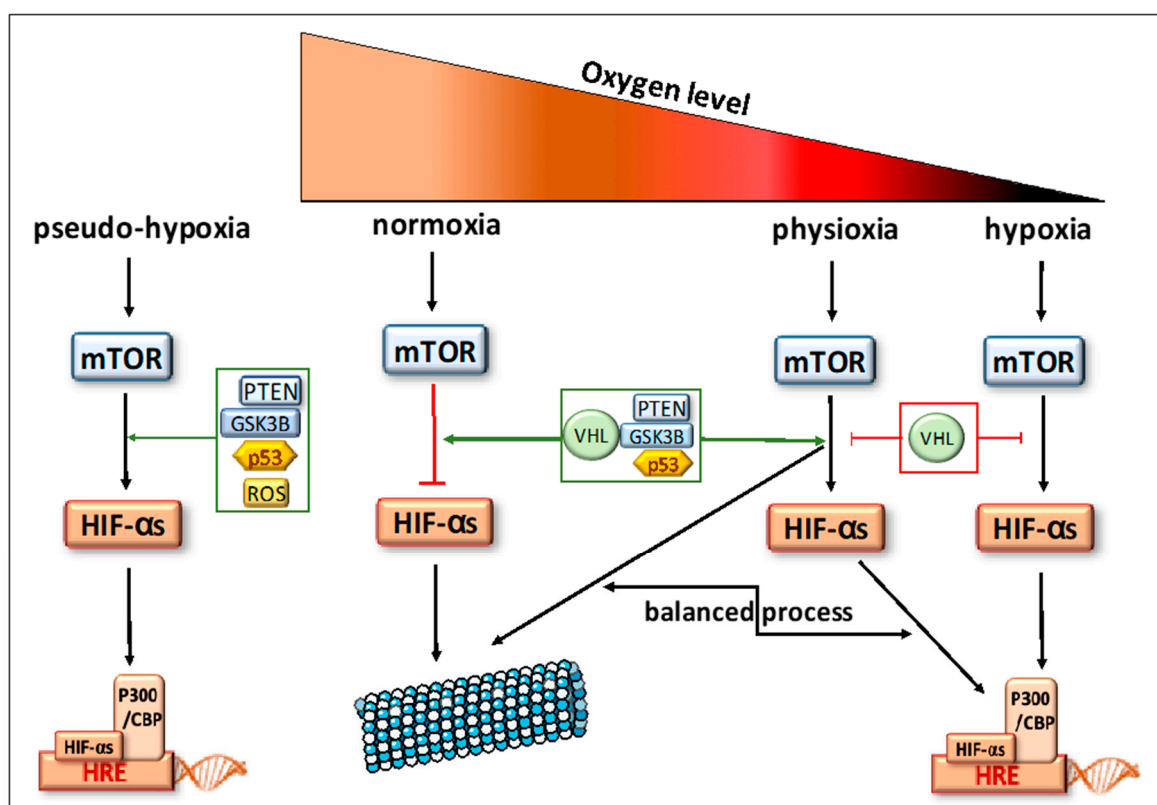


Figure 1. Oxygen tensions in bone tissues. Description of the signaling pathways controlling responses to oxygen variations.

2. Biomarkers Related to Hypoxia Regulation in Normal Tissues

In response to a decrease in oxygen level, HIFs are induced and will rapidly after induction regulate the downstream- and upstream-related pathways (descriptions in Figures 1 and 2). These transcription factors are heterodimeric DNA-binding complexes with a basic helix-loop-helix-PAS domain and comprise one α subunit (HIF-1 α , HIF-2 α or HIF-3 α) and the paired β subunit. Knowledge is very limited for the role of HIF-3 α , but HIF-1 α and HIF-2 α are frequently described in hypoxia regulation [19]. The aryl hydrocarbon nuclear translocator (ARNT), the β unit, is constitutively expressed in the cell nucleus and its rate is constant and independent of oxygen tension. The α subunits are in normoxic conditions hydroxylated at their proline residues (PHD) by HIF prolyl-hydroxylases to be, thereafter, ubiquitinated by the pVHL (protein Von Hippel-Lindau) ubiquitin ligase complex and degraded by the proteasome (Figure 2A). In hypoxia, HIF prolyl-hydroxylases are inhibited and HIF- α subunits are stabilized to translocate into the nucleus, where they heterodimerize with the β unit (Figure 2B). The heterocomplex composed of the HIF- α and HIF- β will bind the hypoxia response element (HRE) with the coactivators CBP and p300 and recognize the promoters of a large number of genes to enhance their transcription [20–23]. Physioxia (Figure 1) seems to be part of these hypoxia-related pathways and is associated with a modulation of stress signals that can induce a balance between proteasomal degradation of HIFs- α and their stabilization [24]. No clear-cut threshold separates physioxia from hypoxia nor normoxia.

Globally, HIFs are regulated by their upstream signaling cascade in all oxygen tensions (Figure 2A,B). When PI3K/AKT/mTOR or RAS/RAF/MEK/ERK pathways are upregulated, HIF- α mRNA transcriptions and protein translations are promoted [25–28]. The distinct roles of HIF-1 α and HIF-2 α cover the regulation of cell differentiation and promotion of the tumor cell resistance and invasion. HIF-1 α is known to activate acutely more than one hundred genes [19] in combination with PI3K/AKT/mTOR [29,30], RAS/MAPK [21,30] and NF- κ B pathways [31]. These molecular cascades will

activate cell proliferation and oncogenic features, cell migration and invasion [32]. Locally or during metastatic processes, HIF-1 α will induce a neoangiogenesis with VEGF/VEGFR (vascular endothelial growth factor and receptor) cascade and an anaerobic glycolytic switch, pushing cells in a specific phenotype in case of acute hypoxia. It will also play a role in epithelial–mesenchymal transition, as well as in the tumor cell resistance to therapies through p53 or upstream signaling [16,20,30,33–35]. HIF-2 α regulates, like its HIF-1 α counterpart, many physiological functions, such as local or metastatic neoangiogenesis, cell proliferation, and migration [23,30,33,36]. For the metabolism, HIF-2 α seems to promote an alternative metabolic switch like phospholipid or amino acid metabolisms [37]. Through its specific roles, HIF-2 α mostly drives the response to chronic hypoxia, maintaining immature tumor cells [23,32,33,38,39]. Both HIFs are modulated and combined to adapt normal and cancer cells to oxygen variations and tensions. They have probable compensatory activities because, when HIF-1 α is underexpressed, HIF-2 α can in different conditions increase its expression. Nevertheless, this modulation is probably in a tissue dependency manner [11,19,23,24,40].

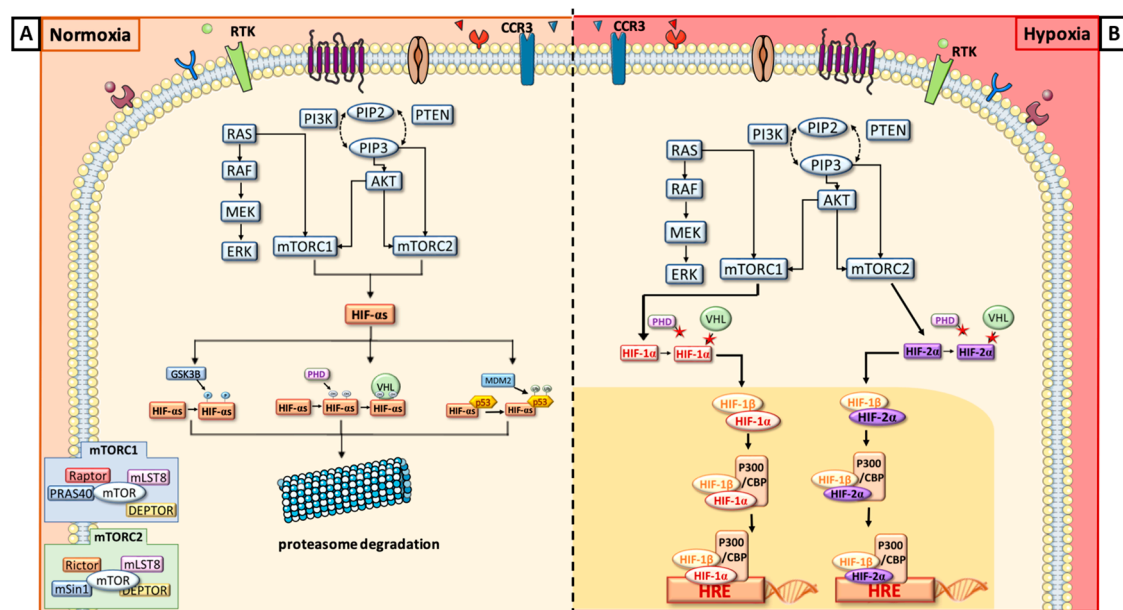


Figure 2. Schematic description of the biomarkers involved in normoxia (A) and hypoxia (B) and their interplay.

Just upstream to HIFs (Figures 1 and 2), there is the mammalian target of rapamycin (mTOR), a serine/threonine kinase, which is represented by two subunits: mTORC1 and mTORC2. They have several common components: mTOR kinase, which is the central catalytic component, mLST8, a scaffolding protein, and Deptor, a regulatory subunit. mTORC1 is associated with Raptor, a scaffolding protein necessary to stabilize its subcellular localization and with PRAS40, inhibiting mTORC1 activity in absence of growth factor. mTORC2 is composed of Rictor and mSin1, a negative regulator. Rictor and Raptor have similar functions [41,42]. To simplify, usually, mTORC1 upregulates HIF-1 α via the S6 ribosomal protein (S6K), whereas mTORC2 directly activates HIF-2 α [25,32,33].

Upstream to mTOR, we have two signaling cascades, both stimulated by tyrosine kinase receptor phosphorylation: PI3K/AKT and RAS/ERK/MAPK. The production of phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate (PIP3) will directly activate mTORC2, which phosphorylates Akt on ser473. mTORC1 is activated by PI3K/AKT in two different ways: either by phosphorylation of PRAS40 or by the inhibition of tuberous sclerosis complex 2 (TSC2) [43,44]. RAS indirectly activates mTORC1 and ERK HIF-1 α through S6K [45].

In parallel to these cascades, where oxygen variations are predominant drivers [46], there are two oxygen-independent conditions where HIFs can be regulated by other mechanisms than the

pVHL-induced proteasomal process. Indeed, HIF-1 α will also undergo proteasomal degradation, after it binds p53 protein leading to ubiquitination by MDM2 (Murine Double Minute 2), another ubiquitin ligase. Another mechanism of HIF-1 α degradation is driven by glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β). In fact, GSK3 β is known to phosphorylate HIF-1 α and then enhance its degradation [47]. Furthermore, a specific mechanism, called pseudo-hypoxia (Figure 1), is also described for HIF- α induction in normoxic conditions. It is a compromised cellular capacity of utilizing oxygen due to decreased levels of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD), which can cause the accumulation of NADH with the occurrence of NADH/NAD redox imbalance. These metabolic modifications might induce HIF production or stabilization mainly through stress signals and ROS accumulations [19].

3. Normal Bone and Hypoxia: Involvement in Osseous Production and Formation and Osteoclast-Mediated Bone Resorption

Bone and its associated marrow microenvironment offer access to growth factors, cytokines, blood supply and tumor-supportive cells including macrophages, T cells and stromal cells. The osteoblasts and the osteoclasts play a pivotal role in skeletal development and remodeling. Bone can form through two different mechanisms: intramembranous or endochondral ossification. The intramembranous bone formation is dedicated to flat bones. It develops from mesenchymal cells that directly differentiate into osteoblasts for the skull. In other flat skeletal locations, it derives from a chondrocyte anlage that is replaced by bone [48–50]. For the endochondral bone development, we have three steps where physioxia and hypoxia play major roles. The first step is the condensation of mesenchymal cells, which will next differentiate into chondrocytes and, at the end, generate the growth plates. In the growth plates, chondrocytes are highly proliferative and will form columnar layers, where, in the most distal part, cells will stop proliferating, exit the cell cycle and differentiate into hypertrophic chondrocytes associated with mineralization [50,51]. The growth plate is a unique mesenchymal tissue with avascular and hypoxic regions [52]. To overpass this challenging microenvironment, the chondrocytes need HIF-1 α expression and production of VEGF-A to induce the angiogenic switch and be able to replace cartilage by bone [51]. This overexpression is associated with pVHL expression, that is modulated by HIF-1 α , and the stabilization of HIF-2 α , which is balancing HIF-1 α action [53]. In fact, the HIF signaling pathway has a critical role in regulating both the osteoblastic and the vascular niches during the endochondral process. HIF-1 α is considered as a positive regulator of bone formation, as well as osteoblast number and activity. It stimulates non-oxidative glycolysis in osteoblasts and can delay osteoclastogenesis, favoring the senescence of bone macrophages [51]. So, HIF-1 α will play a role of regulator of osteoclast-mediated bone resorption, but with little effect on osteoclast differentiation itself [54]. It stimulates the expression of cytokines that might regulate the differentiation process and increases both the glycolytic and mitochondrial metabolic rate to provide an adaptive support to the macrophages during bone resorption [35,55]. By contrast HIF-2 α can, then, be considered as a negative regulator of bone mass accrual with a direct action on osteoblast lineage [51]. In compensation, MIF (macrophage migration inhibitory factor) seems to regulate HIF-1 α activity in a p53-dependant manner. This physiological oxygen tension and pathological hypoxia during cancer processes might in this context of hypoxic growth plate be a good site to favor tumor cell homing and initiation, as well as tumor expansion. It can also explain the tight interactions between malignant osteoblast and its immune environment, as well as blood vessel formation and the macrophages infiltrating tumor microenvironment.

4. Presence of Hypoxic Biomarkers in Osteosarcomas Is Related to Progression and Resistance to Treatment

Hypoxia seems to be an important key in OTS local and distant environments. As described above, the local environment of growth plates is conducive to favor variations in oxygen levels and is typically the location where osteosarcoma cell arise. The hypoxic biomarkers seem to be modulated during osteosarcoma initiation and progression. Correlations have been established in numerous

publications between OTS poor prognosis and those biomarkers including HIFs, mTOR or CA IX (Carbonic Anhydrase IX) [16–18,47,56–58]. They are underlining the dominant driving force of hypoxia for OTS cancer progression, drug resistance and metastatic propensity. When looking at the material used in studies, the proof of concept for hypoxia in osteosarcomas was made in in vitro or in vivo preclinical models, as well as in tumor collections. However, constantly, HIF-1 α was the central hypoxia-related marker involved in OTS and is frequently hyper-expressed in locally aggressive and metastatic OTS [17–19,58,59]. It is associated with GLUT-1 (GLucose Transporter 1), CA IX or VEGF/VEGFR overexpression [57–59], explaining a global enhancement of the hypoxia pathways from the membrane to the nucleus and the increase of intra-tumor microvessel density [20]. HIF-1 α was, then, mostly described as a major driver of tumor microenvironment modulation. HIF-2 α was less studied in OTS than its homologues, but seems to be implicated in OTS cell proliferation and apoptosis and promotes OTS stemness features [17,36,38,56,60,61]. So, HIF-2 α was mostly described as a major driver in OTS cells with specific metabolic switch [40]. mTOR was frequently involved in direct links with autophagic processes and was associated with Pi3K/AKT upstream signaling stimulated by different tyrosine kinase receptors [62–64], combining an OTS cell and tumor microenvironment effect. Nevertheless, it is for instance not so clear how all those biomarkers specifically interact during OTS progression and metastatic propension, as hypoxia is present since the OTS cell initiation. A balanced HIF-1 α /HIF-2 α , as well as a variation of expression of both markers, are now more precisely described to explain the intermittent role of hypoxia signaling pathways in many cancer types, but must be more studied in OTS [33,47].

Recent insights also associate a global intra-tumor hypoxia to elevated genomic instability in cancer cells, including osteosarcomas, where a high level of chromosomal breakage and chromothripsis are usually observed [15,65]. This genomic instability and complexity is linked to a poor outcome and is frequently correlated in such tumor types with a high dysregulation of microRNAs subsequent to hypoxia. In OTS, it is miRNA-133a that was probably shown to be part of chromosomal deregulation and osteosarcoma progression [66].

The epithelial–mesenchymal transition (EMT) is a mechanism also playing a role in OTS proliferation and cell invasion. One central signaling pathway was particularly deciphered in OTS EMT process, which is Wnt/ β -catenin signaling. Surprisingly, studies more often describe a balance of down- and up-regulation to explain the role of the Wnt/ β catenin pathway. In fact, it is up-regulated to favor cell proliferation, colony formation and migration [67], but it is down-regulated by hypoxia and, then, promotes cell resistance to chemotherapies through stemness properties and MDR (MultiDrug Resistance) induction [68]. For these treatment resistances, several other studies have focused on hypoxia as a way for OTS cells to adapt to their new environment and induce neoangiogenesis to favor cell proliferation and tumor growth, avoiding autophagic and apoptotic response to therapies [8,11,33,38,68,69]. They confirmed that MDR phenotype is reactivated during oxygen hypoxic tension [70]. Another process was the inhibition by PI3K/AKT and HIF-1 α of MAX dimerization protein 1 (Mxdm1), a member of the Myc/Mxd/Max family, to notably overpass cisplatin DNA toxicity in OTS cells [70,71]. Finally, the overproduction of reactive oxygen species (ROS) interplays with OTS hypoxia and the AMPK signaling pathway, as well as autophagy and another hypoxic biomarker [71,72], to promote treatment resistance for chemotherapeutic strategies and for irradiation [57].

5. Immune Response, Hypoxia and Osteosarcoma Cells

The OTS microenvironment is surprisingly characterized by specific immune infiltrates in which mostly macrophages and osteoclasts are present. T cell response, able to fight against the tumor cells, is suppressed in OTS leading to a T-cell exhaustion. It induces immune tolerance and prevents excessive immune responses leading to tumor growth, drug resistance and/or metastatic spread [73–75]. Besides the fact that programmed death receptor-1 (PD-1) and its ligand PD-L1 seem to be interesting cancer targets, PD-L1 is absent in the OTS primary tumor. The PD-1/PD-L1 expression is described

mostly in metastatic locations and is linked to a poorer outcome [76,77]. Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) is another suppressive protein, which is also minimally expressed as PD-1 and only in metastatic disease [77]. Nevertheless, this T-cell immunity is rare in OTS, explaining the fact that predominant immune system balance is macrophage based [74,77–80]. Hypoxia is known to attract myeloid-derived suppressor cells and tumor-associated macrophages (TAMs).

In the innate immune response, osteoclasts favor metastatic OTS spread with local environment destruction. A balance between M1, considered as pro-inflammatory and anti-tumoral macrophages, and M2, considered as pro-tumoral macrophages, is frequently described in OTS to explain the response to macrophage modulators, as well as the capacity to have local or distant progression. This M2 polarization phenotype and specific TAM infiltration change during OTS tumor growth represents a whole dynamic process precisely regulated by hypoxia [59,79,81,82]. Hypoxia and especially the PI3K/AKT/mTOR upstream pathway are known to regulate this osteoclastogenesis phenomenon [82,83], but also the immune system through cell surface protein modulations. This balanced M1/M2 phenotype in OTS is complex, but growing evidence suggests that a high density of M2 TAM is associated with OTS primary and metastatic locations. The TAM recruitment in the OTS microenvironment is hypoxia-dependent and in direct link with several chemokines and their receptors.

In fact, M1 macrophages, which are activated by interferon γ or lipopolysaccharide, exhibit anti-tumor properties through the production of pro-inflammatory cytokines (interleukin-1 β and interleukin-6) and inducible factors against pathogens such as the tumor necrosis factor α (TNF- α) and the nitric oxide synthase (iNOS). HIF-1 α upregulation usually stimulates the amino acid metabolism and promotes nitric oxide synthase activity. When suppressing the M1 macrophage activity, as in the recent OS2006 therapeutic protocol, it can promote a poorer outcome in metastatic disease [81]. The presence of the M1 subtype was therefore linked to a better OTS patient outcome [78–80]. M2 macrophages, instead, are activated by anti-inflammatory cytokines (interleukin-4 and interleukin-10) and the PI3K/AKT/mTOR pathway, and exert immunosuppressive effects associated with enhanced angiogenesis and tumor progression, pushing OTS cells in stemness status [78,82,83]. In fact, they are able to suppress T cell proliferation [84], favor angiogenesis through VEGF and angiopoietin signaling, and enhance cancer stem cell properties by upregulating CD133+ cells [34].

Additional effects of hypoxia reinforce this M2 pro-tumoral phenotype. In fact, hypoxia can also decrease the expression of cell surface MHC class I-related chain molecules A (MICA) and prevents the immune cells degrading the tumor cell via a HIF-1 α -dependent pathway linked to increased expression of metalloproteinase (MMP) [77]. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) interplays with HIF-1 α protein overexpression and stabilization [50] for the promotion of OTS tumorigenesis, whereas osteoclast activity is enhanced by the hypoxia-induced ANGPTL4 (angiopoietin-like 4) overexpression [8].

Recent studies have linked hypoxia and immunomodulation scores in OTS [77,85]. This score also supports the idea that hypoxia-driven immunity is associated with glycolytic metabolic switch, collagen biosynthesis and redox regulation. Globally, HIFs and mTOR pathway exert a tumor-promoting effect by intra-tumor immunosuppression.

6. HIFs Targeting in OTS

All these findings point out the crucial role of HIFs in osteosarcoma initiation, progression and immune dynamic modulation. They suggest that HIFs and their upstream and downstream pathways might be key targets in OTS treatments. Many hypoxia inhibitors exist to stop directly or indirectly the hypoxic pathways and now are progressively used in clinical trials. When focusing on HIFs, several levels of inhibition can be listed and are summarized in Figure 3. In fact, a growing number of molecules have been demonstrated to inhibit HIFs by reducing mRNA or protein levels, DNA-binding activity or the trans-activation of some HIFs related genes [85]. They can also block HIFs/HIF-1 β dimerization. The synthesis of HIF-1 α is strictly related to mTOR activity. As described above, the continuous activation of PI3K/AKT and RAS/MAPK signals determines the increase of mTOR activity and the

consecutive activation of HIFs [26,27]. Thus, inhibitors of those biomarkers are also able to inhibit HIF activity and reduce their impact on OTS cell adaptation.

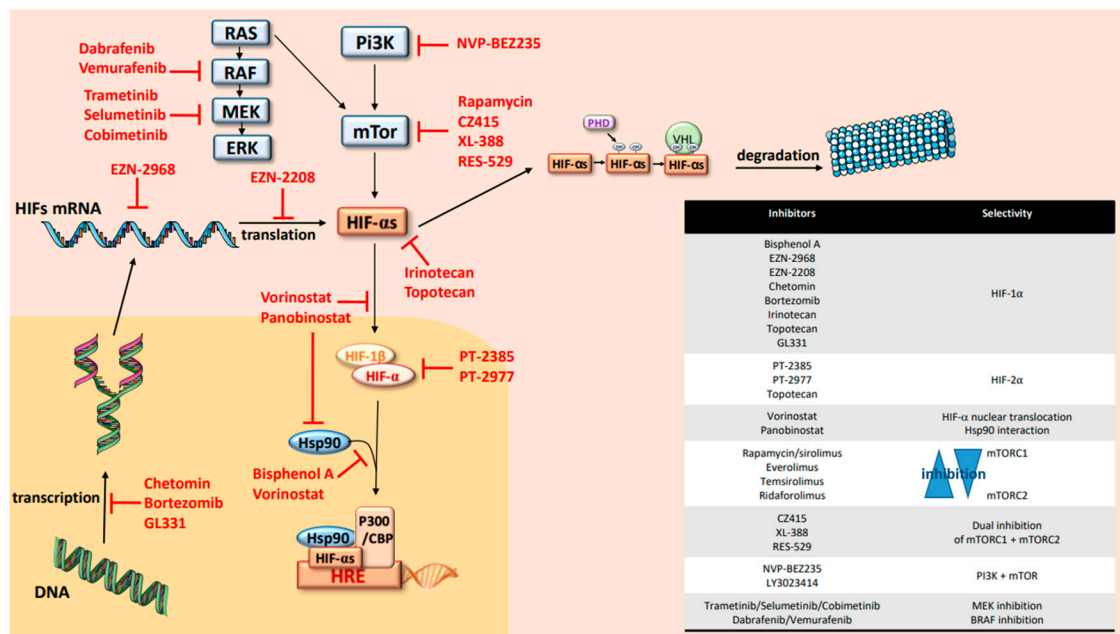


Figure 3. Hypoxia cascade targeting.

HIFs, as transcription factors, have been considered undruggable for a long time [40]. To date, no specific inhibitors of HIF-1α have been brought to the market, but the use of indirect or partial inhibitors are currently increasing in trials and recently in OTS protocols. Oppositely, recent direct inhibitors of HIF-2α have been developed and commercialized, such as PT2385 or PT2977, but are not used directly in OTS and only preclinical data show that HIF-2α targeting can attenuate the proliferation, migration and invasion of OTS cells [61,85,86]. Those specific inhibitors of HIF-2α destabilize heterodimerization of HIF-2α with ARNT, leading to inhibition of target genes and tumor regression. These treatments were used recently in clinical trials for patients with clear cell renal cell carcinoma, where the majority of patients had a partial response or a stable disease associated with a good tolerance [61,85,86]. The HIF-1α inhibitors are mostly decreasing HIF-1α expression with a proven mRNA downregulation in the OTS preclinical models or in cancer trials [85–90]. So, molecules like EZN-2968 or EZN-2208 and topoisomerase I (irinotecan) and II (topotecan and GL331) are frequently used for this purpose. A small number of pediatric studies have proposed these molecules, which were well tolerated and efficient in hypoxic tumors like neuroblastomas. Only topotecan seems to have a dual effect of HIF-1α/HIF-2α. Histone DeAcetylase (HDAC) inhibitors, like vorinostat or panobinostat, can also block HIF-1α nuclear translocation via direct acetylation of its associated chaperone, heat shock protein 90 (Hsp90) [90]. Artificially, the same mechanism of inhibition was also shown with Bisphenol A that is not used in clinics [91]. Another way to stop HIF transcription is to interrupt interaction between HIF-1α and its coactivator p300, which results in a mitigation of hypoxia-inducible transcription [92]. Proteasome inhibitors like bortezomib might also interact with HIF transcription and can be used efficiently alone or in combination with other targeted therapies of the mTOR/HIF pathway [93,94]. Upstream to HIFs, PI3K/AKT, RAS/ERK/MAPK and mTOR are also good candidates for targeted treatments using specific mTORC1 and/or mTORC2 inhibitors or combining mTOR and PI3K antagonists [62,72,95,96]. In parallel, RAS/BRAF/MEK/ERK mitogen-activated protein kinase cascade is known to be involved in OTS. It integrates signals from cell surface receptors to activate ERK and such upregulation can be also targeted by MEK or BRAF inhibitors. In fact, multiple selective, orally available, non-ATP-competitive small-molecules are now available in clinics to block MEK1 and

MEK2 (MAPK kinase) proteins and might be administered in new OTS trials. They might be proposed in a single drug approach or combined with BRAF inhibitors.

Finally, when inhibiting mechanisms induced by hypoxia, efficient drugs should promote tumor growth and cell proliferation arrest through an up-regulation of caspase-3. These molecules might also attenuate tumor angiogenesis leading to efficacy antitumor strategies and reduce usually radio- and chemoresistance of human OS cells in hypoxic conditions. Nevertheless, frequent oncogenic addictions are described due to an AKT reinduction after mTOR or HIFs inhibition, leading to a selective resistance to these inhibitors and conducting the proposal of more and more combinations in phase I and II trials [62,72,94].

When looking at osteosarcoma trials on the <https://clinicaltrials.gov> website, fewer than 15 currently opened protocols are using such strategies with HIFs inhibitors such as irinotecan, mTor inhibitors (ridaforolimus, everolimus, sirolimus) or AKT/Pi3K inhibition with dual mTOR/PI3K targeting. More recently, other therapies independently from HIFs, such as the CA IX inhibitors or strategies targeting metabolic OTS cell vulnerabilities, seem to be effective in in vitro and in vivo models with an increase of cytotoxicity on OTS cells [97].

The future of all those therapies' proposals is to combine treatments in order to increase the effects and decrease therapeutic resistance.

7. In Vitro and In Vivo Models to Recreate OTS Hypoxic Microenvironment

To study hypoxia features and test druggability of those biomarkers, a recent effort was made to develop appropriate models to mimic closely both OTS patient cells and the tumor microenvironment (Figure 4). First, the OTS cells themselves are now mostly patient-derived cell lines based on diagnostic tumor or relapse tissue specimens. In fact, for several years, there have been commercial cell lines allowing the study of OTS. In order to get as close as possible to the physiological conditions, it is important to develop cell models able to recreate the OTS behavior and heterogeneity and the tumor microenvironment, where several supporting stromal cell subtypes are present [98]. For this purpose, more and more 3D-based approaches have been developed and offer advantages over the monolayer-based cultures (Figure 4).

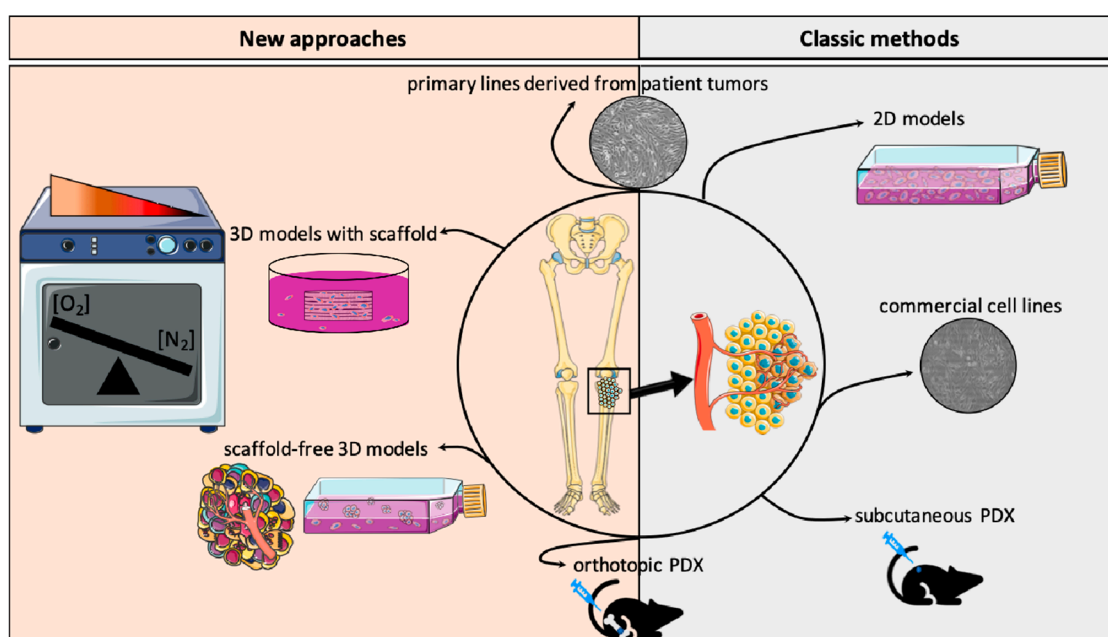


Figure 4. In vitro and in vivo models recreating osteosarcoma and hypoxic environment.

The evolution of 3D OTS culture systems now takes into account the engineered osteoid matrix, as well as oxygen concentrations, angiogenic cells or intrinsic immune components (e.g., macrophages or lymphocytes). They overlap the tumor spheroids to the complex organoid-derived models, where the endogenous infiltrating immune stroma is automatically present. In sphere culture, co-culture with angiogenic cells like HUVEC, as well as macrophages, can partially replace the stromal or immune subtypes observed in initial patient tumors. For the bone environment, one major part is the osseous matrix, which can be mimicked by natural (e.g., collagen, Matrigel) or synthetic scaffolds (e.g., hydrogels) [99]. For hypoxia features and oxygen variations, hypoxia chambers are the most accurate culture environment, where deep intra-tumor hypoxia might be approximate (Figure 4).

Patient tumor cells can also be injected subcutaneously or orthotopically in mouse models [100]. Unfortunately, in these models, metastatic modelization is variable and probably more frequently accessible during orthotopic injections. To facilitate tumor cell dissemination and metastatic spread, some publications describe femoral artery ligation close to the orthotopic injection to promote a hypoxic environment and enhance the probability of success in obtaining pulmonary metastases.

The final goal of all those models is to obtain more representative results after drug testing and allow a rapid translation of those preclinical data into new innovative therapeutic trials for patients.

8. Conclusions

Development of innovative therapies for worst outcome OTS is an unmet medical need. The extended knowledge in hypoxia-driven OTS development offers understanding of crucial key points of OTS progression and interaction with its immune environment. It also helps to support the development of personalized hypoxia-targeting trials in OTS, as drugs are available and might be used in combination. Nevertheless, to improve targeting hypoxic biomarkers, a number of challenges need to be addressed in specific 3D preclinical models integrating hypoxia, bone matrix, patient-derived OTS cells and the endogenous immune-infiltrating macrophages.

Author Contributions: N.E.-W. conceived the plan of the review and wrote together with M.P. the manuscript. M.P. did also the figures in collaboration with Q.F., B.L., N.W. and C.N. brought their expertise in the writing of osteosarcoma development. M.M., E.G., I.L.-R., S.M. and M.D. were helping in the writing on model. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research did not receive any specific grant.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest for this publication.

References

1. Duong, L.M.; Richardson, L.C. Descriptive epidemiology of malignant primary osteosarcoma using population-based registries, United States, 1999–2008. *J. Regist. Manag.* **2013**, *40*, 59–64.
2. Kaatsch, P.; Strothotte, J.; Becker, C.; Bielack, S.; Dirksen, U.; Blettner, M. Pediatric bone tumors in Germany from 1987 to 2011: Incidence rates, time trends and survival. *Acta Oncol.* **2016**, *55*, 1145–1151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Mirabello, L.; Troisi, R.J.; Savage, S.A. Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004. *Cancer* **2009**, *115*, 1531–1543. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Duchman, K.; Gao, Y.; Miller, B.T. Prognostic factors for survival in patients with high-grade osteosarcoma using the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program database. *Cancer Epidemiol.* **2015**, *39*, 593–599. [[CrossRef](#)]
5. Moore, D.D.; Luu, H.H. Osteosarcoma. *Cancer Treat. Res.* **2014**, *162*, 65–92.
6. Cates, J.M.M.; Dupont, W.D. Cytologic anaplasia is a prognostic factor in osteosarcoma biopsies, but mitotic rate or extent of spontaneous tumor necrosis are not: A critique of the College of American Pathologists Bone Biopsy template. *Mod. Pathol.* **2016**, *30*, 52–59. [[CrossRef](#)]
7. Friebele, J.C.; Peck, J.; Pan, X.; Abdel-Rasoul, M.; Mayerson, J.L. Osteosarcoma: A Meta-Analysis and Review of the Literature. *Am. J. Orthop.* **2015**, *44*, 547–553.

8. Zhang, T.; Kastrenopoulou, A.; Larrouture, Q.; Athanasou, N.A.; Knowles, H.J. Angiopoietin-like 4 promotes osteosarcoma cell proliferation and migration and stimulates osteoclastogenesis. *BMC Cancer* **2018**, *18*, 536. [[CrossRef](#)]
9. Lowery, C.D.; Blosser, W.; Dowless, M.; Renschler, M.; Perez, L.V.; Stephens, J.; Pytowski, B.; Wasserstrom, H.; Stancato, L.F.; Falcon, B.; et al. Anti-VEGFR2 therapy delays growth of preclinical pediatric tumor models and enhances anti-tumor activity of chemotherapy. *Oncotarget* **2019**, *10*, 5523–5533. [[CrossRef](#)]
10. Huvos, A.G.; Rosen, G.; Marcove, R.C. Primary osteogenic sarcoma: Pathologic aspects in 20 patients after treatment with chemotherapy en bloc resection, and prosthetic bone replacement. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **1977**, *101*, 14–18.
11. Hayashi, Y.; Yokota, A.; Harada, H.; Huang, G. Hypoxia/pseudohypoxia-mediated activation of hypoxia-inducible factor-1 α in cancer. *Cancer Sci.* **2019**, *110*, 1510–1517. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Brahim-Horn, M.C.; Pouysségur, J. Oxygen, a source of life and stress. *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 3582–3591. [[CrossRef](#)]
13. Wenger, R.H.; Kurtcuoglu, V.; Scholz, C.; Marti, H.H.; Hoogewijs, D. Frequently asked questions in hypoxia research. *Hypoxia* **2015**, *3*, 35–43. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Carreau, A.; El Hafny-Rahbi, B.; Matejuk, A.; Grillon, C.; Kieda, C. Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *J. Cell. Mol. Med.* **2011**, *15*, 1239–1253. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Bhandari, V.; Hoey, C.; Liu, L.Y.; LaLonde, E.; Ray, J.; Livingstone, J.; Lesurf, R.; Shiah, Y.-J.; Vujcic, T.; Huang, X.; et al. Molecular landmarks of tumor hypoxia across cancer types. *Nat. Genet.* **2019**, *51*, 308–318. [[CrossRef](#)]
16. Ouyang, Y.; Li, H.; Bu, J.; Li, X.; Chen, Z.; Xiao, T. Hypoxia-Inducible Factor-1 Expression Predicts Osteosarcoma Patients' Survival: A Meta-Analysis. *Int. J. Biol. Markers* **2016**, *31*, 229–234. [[CrossRef](#)]
17. Li, Y.; Zhang, W.; Li, P.; Tu, C. Prognosis value of Hypoxia-inducible factor-1 α expression in patients with bone and soft tissue sarcoma: A meta-analysis. *SpringerPlus* **2016**, *5*, 1370. [[CrossRef](#)]
18. Zhang, B.; Li, Y.-L.; Zhao, J.-L.; Zhen, O.; Yu, C.; Yang, B.-H.; Yu, X.-R. Hypoxia-inducible factor-1 promotes cancer progression through activating AKT/Cyclin D1 signaling pathway in osteosarcoma. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *105*, 1–9. [[CrossRef](#)]
19. Schito, L.; Semenza, G.L. Hypoxia-Inducible Factors: Master Regulators of Cancer Progression. *Trends Cancer* **2016**, *2*, 758–770. [[CrossRef](#)]
20. Carmeliet, P.; Dor, Y.; Herbert, J.-M.; Fukumura, D.; Brusselmans, K.; Dewerchin, M.; Neeman, M.; Bono, F.; Abramovitch, R.; Maxwell, P.H.; et al. Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* **1998**, *394*, 485–490. [[CrossRef](#)]
21. Wang, G.L.; Jiang, B.; Rue, E.A.; Semenza, G.L. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 5510–5514. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Pugh, C.W.; O'Rourke, J.F.; Nagao, M.; Gleadle, J.M.; Ratcliffe, P.J. Activation of Hypoxia-inducible Factor-1; Definition of Regulatory Domains within the α Subunit. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 11205–11214. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Ratcliffe, P.J. HIF-1 and HIF-2: Working alone or together in hypoxia? *J. Clin. Investig.* **2007**, *117*, 862–865. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Chen, R.; Lai, U.H.; Zhu, L.; Singh, A.; Ahmed, M.; Forsyth, N.R. Reactive Oxygen Species Formation in the Brain at Different Oxygen Levels: The Role of Hypoxia Inducible Factors. *Front. Cell Dev. Biol.* **2018**, *6*, 6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Mohlin, S.; Hamidian, A.; Von Stedingk, K.; Bridges, E.; Wigerup, C.; Bexell, D.; Pålman, S. PI3K–mTORC2 but not PI3K–mTORC1 Regulates Transcription of HIF2A/EPAS1 and Vascularization in Neuroblastoma. *Cancer Res.* **2015**, *75*, 4617–4628. [[CrossRef](#)]
26. Arsham, A.M.; Howell, J.J.; Simon, M.C. A novel hypoxia-inducible factor-independent hypoxic response regulating mammalian target of rapamycin and its targets. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 29655–29660. [[CrossRef](#)]
27. Minet, E.; Arnould, T.; Michel, G.; Roland, I.; Mottet, D.; Raes, M.; Remacle, J.; Michiels, C. ERK activation upon hypoxia: Involvement in HIF-1 activation. *FEBS Lett.* **2000**, *468*, 53–58. [[CrossRef](#)]

28. Green, Y.S.; Sargis, T.; Reichert, E.C.; Rudasi, E.; Fuja, D.; Jonasch, E.; Koh, M.Y. Hypoxia-Associated Factor (HAF) Mediates Neurofibromin Ubiquitination and Degradation Leading to Ras–ERK Pathway Activation in Hypoxia. *Mol. Cancer Res.* **2019**, *17*, 1220–1232. [[CrossRef](#)]
29. Courtney, R.; Ngo, D.C.; Malik, N.; Ververis, K.; Tortorella, S.M.; Karagiannis, T.C. Cancer metabolism and the Warburg effect: The role of HIF-1 and PI3K. *Mol. Biol. Rep.* **2015**, *42*, 841–851. [[CrossRef](#)]
30. Semenza, G.L. HIF-1: Using two hands to flip the angiogenic switch. *Cancer Metastasis Rev.* **2000**, *19*, 59–65. [[CrossRef](#)]
31. Royds, J.A.; Dower, S.K.; Qwarnstrom, E.E.; Lewis, C.E. Response of tumour cells to hypoxia: Role of p53 and NFkB. *Mol. Pathol.* **1998**, *51*, 55–61. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Semenza, G.L. Hypoxia-Inducible Factors in Physiology and Medicine. *Cell* **2012**, *148*, 399–408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Keith, B.; Johnson, R.S.; Simon, M.C. HIF1 α and HIF2 α : Sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *12*, 9–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Koka, P.; Mundre, R.S.; Rangarajan, R.; Chandramohan, Y.; Subramanian, R.; Dhanasekaran, A. Uncoupling Warburg effect and stemness in CD133+ve cancer stem cells from Saos-2 (osteosarcoma) cell line under hypoxia. *Mol. Biol. Rep.* **2018**, *45*, 1653–1662. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Oda, S.; Oda, T.; Nishi, K.; Takabuchi, S.; Wakamatsu, T.; Tanaka, T.; Adachi, T.; Fukuda, K.; Semenza, G.L.; Hirota, K. Macrophage Migration Inhibitory Factor Activates Hypoxia-Inducible Factor in a p53-Dependent Manner. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e2215. [[CrossRef](#)]
36. Wang, Y.; Wang, X.; Su, X.; Liu, T. HIF-2 α affects proliferation and apoptosis of MG-63 osteosarcoma cells through MAPK signaling. *Mol. Med. Rep.* **2017**, *15*, 2174–2178. [[CrossRef](#)]
37. Rankin, E.B.; Rha, J.; Selak, M.A.; Unger, T.L.; Keith, B.; Liu, Q.; Haase, V.H. Hypoxia-Inducible Factor 2 Regulates Hepatic Lipid Metabolism. *Mol. Cell. Biol.* **2009**, *29*, 4527–4538. [[CrossRef](#)]
38. Wagner, F.; Holzapfel, B.M.; Martine, L.C.; McGovern, J.; Lahr, C.A.; Boxberg, M.; Proding, P.M.; Grassel, S.; Loessner, D.; Hutmacher, D.W. A humanized bone microenvironment uncovers HIF2 alpha as a latent marker for osteosarcoma. *Acta Biomater.* **2019**, *89*, 372–381. [[CrossRef](#)]
39. Serocki, M.; Bartoszewska, S.; Janaszak-Jasiecka, A.; Ochocka, R.J.; Collawn, J.F.; Bartoszewski, R. miRNAs regulate the HIF switch during hypoxia: A novel therapeutic target. *Angiogenesis* **2018**, *21*, 183–202. [[CrossRef](#)]
40. Johnson, R.W.; Schipani, E.; Giaccia, A.J. HIF targets in bone remodeling and metastatic disease. *Pharmacol. Ther.* **2015**, *150*, 169–177. [[CrossRef](#)]
41. Kim, D.-H.; Sarbassov, D.D.; Ali, S.M.; King, J.E.; Latek, R.R.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P.; Sabatini, D.M. mTOR Interacts with Raptor to Form a Nutrient-Sensitive Complex that Signals to the Cell Growth Machinery. *Cell* **2002**, *110*, 163–175. [[CrossRef](#)]
42. Guertin, D.A.; Sabatini, D.M. Defining the Role of mTOR in Cancer. *Cancer Cell* **2007**, *12*, 9–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Shaw, R.J.; Cantley, L.C. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* **2006**, *441*, 424–430. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Manning, B.D.; Tee, A.R.; Logsdon, M.N.; Blenis, J.; Cantley, L.C. Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. *Mol. Cell* **2002**, *10*, 151–162. [[CrossRef](#)]
45. Avruch, J.; Long, X.; Lin, Y.; Ortiz-Vega, S.; Rapley, J.; Papageorgiou, A.; Oshiro, N.; Kikkawa, U. Activation of mTORC1 in two steps: Rheb-GTP activation of catalytic function and increased binding of substrates to raptor1. *Biochem. Soc. Trans.* **2009**, *37*, 223–226. [[CrossRef](#)]
46. Semenza, G.L. HIF-1: Upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2010**, *20*, 51–56. [[CrossRef](#)]
47. Koh, M.Y.; Spivak-Kroizman, T.R.; Powis, G. HIF-1 regulation: Not so easy come, easy go. *Trends Biochem. Sci.* **2008**, *33*, 526–534. [[CrossRef](#)]
48. Karsenty, G. The complexities of skeletal biology. *Nature* **2003**, *423*, 316–318. [[CrossRef](#)]
49. Kronenberg, H.M. Developmental regulation of the growth plate. *Nature* **2003**, *423*, 332–336. [[CrossRef](#)]
50. Provot, S.; Schipani, E. Molecular mechanisms of endochondral bone development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *328*, 658–665. [[CrossRef](#)]

51. Cramer, T.; Schipani, E.; Johnson, R.S.; Swoboda, B.; Pfander, D. Expression of VEGF isoforms by epiphyseal chondrocytes during low-oxygen tension is HIF-1 alpha dependent. *Osteoarthr. Cartil.* **2004**, *12*, 433–439. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Maes, C.; Araldi, E.; Haigh, K.; Khatri, R.; Van Looveren, R.; Giaccia, A.J.; Haigh, J.J.; Carmeliet, G.; Schipani, E. VEGF-independent cell-autonomous functions of HIF-1 α regulating oxygen consumption in fetal cartilage are critical for chondrocyte survival. *J. Bone Miner. Res.* **2012**, *27*, 596–609. [[CrossRef](#)]
53. Rankin, E.B.; Wu, C.; Khatri, R.; Wilson, T.L.; Andersen, R.; Araldi, E.; Rankin, A.L.; Yuan, J.; Kuo, C.J.; Schipani, E.; et al. The HIF Signaling Pathway in Osteoblasts Directly Modulates Erythropoiesis through the Production of EPO. *Cell* **2012**, *149*, 63–74. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Gorissen, B.M.C.; De Bruin, A.; Miranda-Bedate, A.; Korthagen, N.; Wolschrijn, C.; De Vries, T.J.; Van Weeren, R.; Tryfonidou, M. Hypoxia negatively affects senescence in osteoclasts and delays osteoclastogenesis. *J. Cell. Physiol.* **2018**, *234*, 414–426. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Hulley, P.A.; Bishop, T.; Vernet, A.; Schneider, J.E.; Edwards, J.R.; Athanasou, N.A.; Knowles, H.J. Hypoxia-inducible factor 1-alpha does not regulate osteoclastogenesis but enhances bone resorption activity via prolyl-4-hydroxylase 2: HIF-1 α and PHD2 regulate bone resorption by osteoclasts. *J. Pathol.* **2017**, *242*, 322–333. [[CrossRef](#)]
56. Li, W.; He, X.; Xue, R.; Zhang, Y.; Zhang, X.; Lu, J.; Zhang, Z.; Xue, L.; Zhan, Y. Combined over-expression of the hypoxia-inducible factor 2 α gene and its long non-coding RNA predicts unfavorable prognosis of patients with osteosarcoma. *Pathol.-Res. Pract.* **2016**, *212*, 861–866. [[CrossRef](#)]
57. Okuno, K.; Matsubara, T.; Nakamura, T.; Iino, T.; Kakimoto, T.; Asanuma, K.; Matsumine, A.; Sudo, A. Carbonic anhydrase IX enhances tumor cell proliferation and tumor progression in osteosarcoma. *OncoTargets Ther.* **2018**, *11*, 6879–6886. [[CrossRef](#)]
58. Mizobuchi, H.; García-Castellano, J.M.; Philip, S.; Healey, J.H.; Gorlick, R. Hypoxia Markers in Human Osteosarcoma: An Exploratory Study. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2008**, *466*, 2052–2059. [[CrossRef](#)]
59. XIX CONGRESSO NAZIONALE S.I.C.O.O.P. SOCIETA' ITALIANA CHIRURGHI ORTOPEDICI DELL'OSPEDALITA' PRIVATA ACCREDITATA; Capasso, L.; Florio, M.; Lillo, M.; Basilico, M.; De Santis, V.; Ziranu, A.; Grasso, A.; Minutillo, F.; Maccauro, G. Vascular endothelial growth factor expression as a biomarker of prognosis in patients with chondrosarcoma, Ewing's sarcoma and osteosarcoma. Current concepts. *J. Boil. Regul. Homeost.* **2019**, *33*, 39–43.
60. Wagner, F.; Holzapfel, B.M.; Thibaudeau, L.; Straub, M.; Ling, M.-T.; Grifka, J.; Loessner, D.; Levesque, J.-P.; Hutmacher, D.W.; Martine, L. A Validated Preclinical Animal Model for Primary Bone Tumor Research. *J. Bone Joint. Surg. Am. Vol.* **2016**, *98*, 916–925. [[CrossRef](#)]
61. Zhao, D.; Wang, S.; Chu, X.; Han, D. LncRNA HIF2PUT inhibited osteosarcoma stem cells proliferation, migration and invasion by regulating HIF2 expression. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* **2019**, *47*, 1342–1348. [[CrossRef](#)]
62. Bertoldo, F.; Silvestris, F.; Ibrahim, T.; Cognetti, F.; Generali, D.; Ripamonti, C.; Amadori, D.; Colleoni, M.; Conte, P.; Del Mastro, L.; et al. Targeting bone metastatic cancer: Role of the mTOR pathway. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Bioenergy* **2014**, *1845*, 248–254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Niu, J.; Yan, T.; Guo, W.; Wang, W.; Zhao, Z. Insight Into the Role of Autophagy in Osteosarcoma and Its Therapeutic Implication. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Feng, H.; Wang, J.; Chen, W.; Shan, B.; Guo, Y.; Xu, J.; Wang, L.; Guo, P.; Zhang, Y. Hypoxia-induced autophagy as an additional mechanism in human osteosarcoma radioresistance. *J. Bone Oncol.* **2016**, *5*, 67–73. [[CrossRef](#)]
65. Smida, J.; Xu, H.; Zhang, Y.; Baumhoer, D.; Ribi, S.; Kovac, M.; Von Luettichau, I.; Bielack, S.; O'Leary, V.B.; Leib-Mösch, C.; et al. Genome-wide analysis of somatic copy number alterations and chromosomal breakages in osteosarcoma. *Int. J. Cancer* **2017**, *141*, 816–828. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Yang, W.; Qi, Y.-B.; Si, M.; Hou, Y.; Nie, L. A comprehensive analysis for associations between multiple microRNAs and prognosis of osteosarcoma patients. *Peer J.* **2020**, *8*, 8389.
67. Fang, F.; VanCleave, A.; Helmuth, R.; Torres, H.; Rickel, K.; Wollenzien, H.; Sun, H.; Zeng, E.; Zhao, J.; Tao, J. Targeting the Wnt/ β -catenin pathway in human osteosarcoma cells. *Oncotarget* **2018**, *9*, 36780–36792. [[CrossRef](#)]

68. Scholten, D.J.; Timmer, C.M.; Peacock, J.D.; Pelle, D.W.; Williams, B.O.; Steensma, M.R. Down Regulation of Wnt Signaling Mitigates Hypoxia-Induced Chemoresistance in Human Osteosarcoma Cells. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e111431. [[CrossRef](#)]
69. Zhao, C.; Zhang, Q.; Yu, T.; Sun, S.; Wang, W.; Liu, G. Hypoxia promotes drug resistance in osteosarcoma cells via activating AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling. *J. Bone Oncol.* **2016**, *5*, 22–29. [[CrossRef](#)]
70. Roncuzzi, L.; Pancotti, F.; Baldini, N. Involvement of HIF-1 α activation in the doxorubicin resistance of human osteosarcoma cells. *Oncol. Rep.* **2014**, *32*, 389–394. [[CrossRef](#)]
71. Zheng, D.; Wu, W.; Dong, N.; Jiang, X.; Xu, J.; Zhan, X.; Zhang, Z.; Hu, Z. Mxd1 mediates hypoxia-induced cisplatin resistance in osteosarcoma cells by repression of the PTEN tumor suppressor gene. *Mol. Carcinog.* **2017**, *56*, 2234–2244. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Kiezun, A.; Perry, J.; Tonzi, P.; Van Allen, E.; Carter, S.L.; Baca, S.; Bhatt, A.; Lawrence, M.; Walensky, L.; Wagle, N.; et al. Abstract A41: Complementary genomic approaches highlight the PI3K/mTOR pathway as a common vulnerability in osteosarcoma. *Sarcomas* **2014**, *111*, 5564. [[CrossRef](#)]
73. Ahmed, N.; Salsman, V.S.; Yvon, E.; Louis, C.U.; Perlaky, L.; Wels, W.S.; Dishop, M.K.; E Kleinerman, E.; Pulé, M.; Rooney, C.M.; et al. Immunotherapy for Osteosarcoma: Genetic Modification of T cells Overcomes Low Levels of Tumor Antigen Expression. *Mol. Ther.* **2009**, *17*, 1779–1787. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Shen, J.K.; Cote, G.M.; Choy, E.; Yang, P.; Harmon, D.; Schwab, J.; Nielsen, G.P.; Chebib, I.; Ferrone, S.; Wang, X.; et al. Programmed cell death 1 ligand 1 expression in osteosarcoma. *Cancer Immunol. Res.* **2014**, *2*, 690–698. [[CrossRef](#)]
75. Koirala, P.; Roth, M.E.; Gill, J.; Piperdi, S.; Chinai, J.M.; Geller, D.S.; Hoang, B.H.; Park, A.; Fremed, M.A.; Zang, X.; et al. Immune infiltration and PD-L1 expression in the tumor microenvironment are prognostic in osteosarcoma. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 30093. [[CrossRef](#)]
76. Thanindratarn, P.; Dean, D.C.; Nelson, S.D.; Hornicek, F.J.; Duan, Z. Advances in immune checkpoint inhibitors for bone sarcoma therapy. *J. Bone Oncol.* **2019**, *15*, 100221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Mceachron, T.A.; Triche, T.J.; Sorenson, L.; Parham, D.M.; Carpten, J.D. Profiling targetable immune checkpoints in osteosarcoma. *OncolImmunology* **2018**, *7*, e1475873-12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Hong, W.; Yuan, H.; Gu, Y.; Liu, M.; Ji, Y.; Huang, Z.; Yang, J.; Ma, L. Immune-related prognosis biomarkers associated with osteosarcoma microenvironment. *Cancer Cell Int.* **2020**, *20*, 1–12. [[CrossRef](#)]
79. Gomez-Brouchet, A.; Illac, C.; Gilhodes, J.; Bouvier, C.; Aubert, S.; Guinebretiere, J.-M.; Marie, B.; Larousserie, F.; Entz-Werlé, N.; De Pinieux, G.; et al. CD163-positive tumor-associated macrophages and CD8-positive cytotoxic lymphocytes are powerful diagnostic markers for the therapeutic stratification of osteosarcoma patients: An immunohistochemical analysis of the biopsies from the French OS2006 phase 3 trial. *OncolImmunology* **2017**, *6*, e1331193. [[CrossRef](#)]
80. Buddingh, E.P.; Kuijjer, M.L.; Duim, R.A.; Agelopoulos, K.; Myklebost, O.; Serra, M.; Mertens, F.; Hogendoorn, P.C.; Lankester, A.C.; Cleton-Jansen, A.-M.; et al. Tumor-Infiltrating Macrophages Are Associated with Metastasis Suppression in High-Grade Osteosarcoma: A Rationale for Treatment with Macrophage Activating Agents. *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17*, 2110–2119. [[CrossRef](#)]
81. Piperno-Neumann, S.; Le Deley, M.-C.; Rédini, F.; Pacquement, H.; Marec-Berard, P.; Petit, P.; Brisse, H.J.; Lervat, C.; Gentet, J.C.; Entz-Werlé, N.; et al. Zoledronate in combination with chemotherapy and surgery to treat osteosarcoma (OS2006): A randomised, multicentre, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **2016**, *17*, 1070–1080. [[CrossRef](#)]
82. Tiedemann, K.; Le Nihouannen, D.; Fong, J.E.; Hussein, O.; Barralet, J.E.; Komarova, S.V. Regulation of Osteoclast Growth and Fusion by mTOR/raptor and mTOR/riCTOR/Akt. *Front. Cell Dev. Boil.* **2017**, *5*, 5. [[CrossRef](#)]
83. Linke, M.; Fritsch, S.D.; Sukhbaatar, N.; Hengstschläger, M.; Weichhart, T. mTORC1 and mTORC2 as regulators of cell metabolism in immunity. *FEBS Lett.* **2017**, *591*, 3089–3103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Wigerup, C.; Pählman, S.; Bexell, D. Therapeutic targeting of hypoxia and hypoxia-inducible factors in cancer. *Pharmacol. Ther.* **2016**, *164*, 152–169. [[CrossRef](#)]
85. Song, Z.; Pearce, M.C.; Jiang, Y.; Yang, L.; Goodall, C.; Miranda, C.L.; Milovancev, M.; Bracha, S.; Kolluri, S.K.; Maier, C.S. Delineation of hypoxia-induced proteome shifts in osteosarcoma cells with different metastatic propensities. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 727. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

86. Courtney, K.D.; Infante, J.R.; Lam, E.T.; Figlin, R.A.; Rini, B.I.; Brugarolas, J.; Zojwalla, N.J.; Lowe, A.M.; Wang, K.; Wallace, E.M.; et al. Phase I Dose-Escalation Trial of PT2385, a First-in-Class Hypoxia-Inducible Factor-2 α Antagonist in Patients With Previously Treated Advanced Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *J. Clin. Oncol.* **2018**, *36*, 867–874. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Jeong, W.; Rapisarda, A.; Park, S.R.; Kinders, R.J.; Chen, A.; Melillo, G.; Turkbey, B.; Steinberg, S.M.; Choyke, P.; Doroshow, J.H.; et al. Pilot trial of EZN-2968, an antisense oligonucleotide inhibitor of hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1 α), in patients with refractory solid tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2013**, *73*, 343–348. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Norris, R.E.; Shusterman, S.; Gore, L.; Muscal, J.A.; Macy, M.E.; Fox, E.; Berkowitz, N.; Buchbinder, A.; Bagatell, R. Phase 1 evaluation of EZN-2208, a polyethylene glycol conjugate of SN38, in children adolescents and young adults with relapsed or refractory solid tumors. *Pediatr. Blood Cancer* **2014**, *61*, 1792–1797. [[CrossRef](#)]
89. Guérin, E.; Raffelsberger, W.; Pencreach, E.; Maier, A.; Neuville, A.; Schneider, A.; Bachellier, P.; Rohr, S.; Petitprez, A.; Poch, O.; et al. In Vivo Topoisomerase I Inhibition Attenuates the Expression of Hypoxia-Inducible Factor 1 α Target Genes and Decreases Tumor Angiogenesis. *Mol. Med.* **2011**, *18*, 83–94. [[CrossRef](#)]
90. Zhang, C.; Yang, C.; Feldman, M.J.; Wang, H.; Pang, Y.; Maggio, D.M.; Zhu, D.; Nesvick, C.L.; Dmitriev, P.; Bullova, P.; et al. Vorinostat suppresses hypoxia signaling by modulating nuclear translocation of hypoxia inducible factor 1 alpha. *Oncotarget* **2017**, *8*, 56110–56125. [[CrossRef](#)]
91. Kubo, T.; Maezawa, N.; Osada, M.; Katsumura, S.; Funae, Y.; Imaoka, S. Bisphenol A, an environmental endocrine-disrupting chemical, inhibits hypoxic response via degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha): Structural requirement of bisphenol A for degradation of HIF-1alpha. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *318*, 1006–1011. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Jin, Z.; Aixi, Y.; Baiwen, Q.; Zonghuan, L.; Xiang, H. Inhibition of Hypoxia-inducible Factor-1 Alpha Radiosensitized MG-63 Human Osteosarcoma Cells in Vitro. *Tumori J.* **2015**, *101*, 578–584. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Abd-Aziz, N.; Stanbridge, E.J.; Shafee, N. Bortezomib attenuates HIF-1- but not HIF-2-mediated transcriptional activation. *Oncol. Lett.* **2015**, *10*, 2192–2196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Loh, A.H.; Stewart, E.; Bradley, C.L.; Chen, X.; Daryani, V.; Stewart, C.F.; Calabrese, C.; Funk, A.; Miller, G.; Karlstrom, A.; et al. Combinatorial screening using orthotopic patient derived xenograft-expanded early phase cultures of osteosarcoma identify novel therapeutic drug combinations. *Cancer Lett.* **2019**, *442*, 262–270. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Zhu, Y.-R.; Zhou, X.-Z.; Zhu, L.-Q.; Yao, C.; Fang, J.-F.; Zhou, F.; Deng, X.-W.; Zhang, Y.-Q. The anti-cancer activity of the mTORC1/2 dual inhibitor XL388 in preclinical osteosarcoma models. *Oncotarget* **2016**, *7*, 49527–49538. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Huang, J.-C.; Cui, Z.-F.; Chen, S.-M.; Yang, L.-J.; Lian, H.-K.; Liu, B.; Su, Z.-H.; Liu, J.-S.; Wang, M.; Hu, Z.-B.; et al. NVP-BE235 synergizes cisplatin sensitivity in osteosarcoma. *Oncotarget* **2017**, *9*, 10483–10496. [[CrossRef](#)]
97. Perut, F.; Carta, F.; Bonuccelli, G.; Grisendi, G.; Di Pompo, G.; Avnet, S.; Sbrana, F.V.; Hosogi, S.; Dominici, M.; Kusuzaki, K.; et al. Carbonic anhydrase IX inhibition is an effective strategy for osteosarcoma treatment. *Expert Opin. Ther. Targets* **2015**, *19*, 1593–1605. [[CrossRef](#)]
98. Cortini, M.; Baldini, N.; Avnet, S. New Advances in the Study of Bone Tumors: A Lesson From the 3D Environment. *Front. Physiol.* **2019**, *10*, 814. [[CrossRef](#)]
99. Monteiro, M.V.; Gaspar, V.M.; Ferreira, L.P.; Mano, J.F. Hydrogel 3D in vitro tumor models for screening cell aggregation mediated drug response. *Biomater. Sci.* **2020**, *8*, 1855–1864. [[CrossRef](#)]
100. Castillo-Tandazo, W.; Mutsaers, A.J.; Walkley, C.R. Osteosarcoma in the Post Genome Era: Preclinical Models and Approaches to Identify Tractable Therapeutic Targets. *Curr. Osteoporos. Rep.* **2019**, *17*, 343–352. [[CrossRef](#)]



Annexe 4

Communications orales et posters :

Communication orale : Messé M., Bernhard C., Mercier M.C., Foppolo S., Laquerrière P. and Dontenwill M. Modulation of expression of therapeutic targets in glioblastoma ; Example of the $\alpha 5\beta 1$ integrin. Pour les journées campus d'Illkirch le 19 avril 2021.

Poster : Messé M., Bernhard C., Mercier M.C., Fuchs Q., Foppolo S., Thomas L., Marchand P., Jessel B., Laquerrière P., Herold-Mende C., Entz-Werlé N., Dontenwill M. Heterogeneity and plasticity of integrin $\alpha 5\beta 1$ expression in glioblastoma stem cells. Pour le congrès national ANOCEF, le 1^{er} et 2 juillet 2022 à Rouen (**Prix meilleur poster**).

Poster : Messé M., Bernhard C., Mercier M.C., Fuchs Q., Foppolo S., Thomas L., Marchand P., Jessel B., Laquerrière P., Herold-Mende C., Entz-Werlé N., Dontenwill M. Heterogeneity and plasticity of integrin $\alpha 5\beta 1$ expression in glioblastoma stem cells. Pour le congrès international SUNRISE, le 8 et 9 juin 2022 à Paris.

Poster : Messé M., Bernhard C., Mercier M.C., Fuchs Q., Foppolo S., Thomas L., Marchand P., Jessel B., Laquerrière P., Herold-Mende C., Elati M., Entz-Werlé N., Dontenwill M. Study of the modulation of integrin $\alpha 5\beta 1$ expression in glioblastoma. Pour les ED days, le 21 et 22 avril 2022 à Strasbourg.

Poster : Messé M., Bernhard C., Mercier M.C., Fuchs Q., Foppolo S., Herold-Mende C., Namer I., Bund C., Elati M., Entz-Werlé N., Dontenwill M. Heterogeneity and plasticity of integrin $\alpha 5\beta 1$ expression in glioblastoma stem cells. Pour le congrès international EANO, le 25 et 26 octobre 2021 en visio.

Mélissa MESSÉ

Hétérogénéité et plasticité de l'intégrine $\alpha 5$ dans les cellules souches de glioblastome

Résumé

Les glioblastomes (GBM) sont les tumeurs les plus fréquentes et les plus agressives du système nerveux central. Depuis 2005, le protocole Stupp est suivi pour le traitement du GBM (chirurgie, radiothérapie/chimiothérapie). Malgré ce lourd traitement, les patients récidivent. L'hétérogénéité moléculaire intra- et inter-tumorale du GBM ainsi que la présence de cellules souches cancéreuses (CSC) sont en partie responsables des échecs thérapeutiques. Le microenvironnement module les caractéristiques des CSC, entraînant une plasticité. Ce projet porte sur l'étude d'une cible thérapeutique, l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$, dont l'expression est associée à une résistance thérapeutique et à un mauvais pronostic. Il vise à caractériser la plasticité des CSC et particulièrement l'impact de l'hypoxie et du traitement sur l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ dans des modèles *in vitro* et *in vivo*. L'étude de l'influence de cette expression sur le phénotype tumoral confirmera son intérêt comme cible thérapeutique pour des populations spécifiques et permettra de proposer des alternatives thérapeutiques pour une médecine personnalisée.

Mots clés : Hétérogénéité, plasticité, intégrine $\alpha 5$, HIF-2 α , glioblastome.

Abstract

Glioblastomas (GBM) are the most frequent and aggressive tumors of the central nervous system. Since 2005, the Stupp protocol has been followed for the treatment of GBM (surgery, radiotherapy/chemotherapy). Despite this heavy treatment, patients recur. The intra- and inter-tumoral molecular heterogeneity of GBM as well as the presence of cancer stem cells (CSC) are partly responsible for the therapeutic failures. The microenvironment modulates the characteristics of CSCs, leading to plasticity. This project focuses on the study of a therapeutic target, integrin $\alpha 5 \beta 1$, whose expression is associated with therapeutic resistance and poor prognosis. It aims to characterize the plasticity of CSCs and particularly the impact of hypoxia and treatment on $\alpha 5$ integrin expression *in vitro* and *in vivo* models. The study of the influence of this expression on the tumor phenotype will confirm its interest as a therapeutic target for specific populations and will allow to propose therapeutic alternatives for a personalized medicine.

Keywords : Heterogeneity, plasticity, $\alpha 5$ integrin, HIF-2 α , glioblastoma.