

UNIVERSITE DE STRASBOURG

Ecole doctorale de la Vie et de la Santé

Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie
UMR CNRS 7213 – Faculté de Pharmacie

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG

Discipline : Sciences du Vivant

Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la Biologie

par

MAGLOTT-ROTH Anne

L'INTEGRINE $\alpha 5\beta 1$ DANS LES GLIOMES HUMAINS : UNE CIBLE THERAPEUTIQUE ET UN ACTEUR DE LA RESISTANCE A LA CHIMIOETHERAPIE.

Présentée et soutenue publiquement le 3 juillet 2009

Docteur Monique DONTENWILL
Professeur Pascal CHASTAGNER
Docteur Jean-Luc COLL
Docteur Dominique BAGNARD

Directrice de Thèse
Rapporteur Externe, Nancy
Rapporteur Externe, Grenoble
Rapporteur Interne, Strasbourg

UNIVERSITE DE STRASBOURG

Ecole doctorale de la Vie et de la Santé

Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie
UMR CNRS 7213 – Faculté de Pharmacie

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG

Discipline : Sciences du Vivant

Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la Biologie

par

MAGLOTT-ROTH Anne

L'INTEGRINE $\alpha 5\beta 1$ DANS LES GLIOMES HUMAINS : UNE CIBLE THERAPEUTIQUE ET UN ACTEUR DE LA RESISTANCE A LA CHIMIOETHERAPIE.

Présentée et soutenue publiquement le 3 juillet 2009

Docteur Monique DONTENWILL
Professeur Pascal CHASTAGNER
Docteur Jean-Luc COLL
Docteur Dominique BAGNARD

Directrice de Thèse
Rapporteur Externe, Nancy
Rapporteur Externe, Grenoble
Rapporteur Interne, Strasbourg

REMERCIEMENTS

Je voudrais exprimer ma profonde reconnaissance au Dr Monique DONTEINWILL pour la qualité de son encadrement tout au long de ma thèse. Merci de m'avoir accueillie dans cette équipe en pleine expansion. Sa disponibilité, sa rigueur scientifique, son sens de la synthèse et sa patience m'ont permis de mener à bien ce projet de thèse. Merci pour ces discussions tardives qui m'ont apportées un autre regard sur le monde de la recherche.

Merci à toi, Sophie, pour ton sens de l'organisation et tes astuces techniques qui m'ont beaucoup apportés pendant ces quatre années. Je regretterai nos ateliers de bricolage à la « MacGyver » nécessaires à la survie des indispensables du labo.

Je remercie les Docteurs Jean-Luc COLL et Dominique BAGNARD ainsi que le Professeur Pascal CHASTAGNER pour avoir accepté de juger mon travail de thèse.

Un grand merci à tous les membres de l'équipe « Intégrine » pour leur présence de tous les jours et leur contribution à ce projet de recherche. Merci à Eva et Petr, la partie tchèque du laboratoire, qui m'ont si gentiment fait découvrir leur pays. Merci à David pour son apport masculin au sein de l'équipe.

Je remercie tous les membres passés et présents du laboratoire et tous mes voisins de bureaux éparpillés dans les différents étages de la Faculté de Pharmacie pour leur soutien moral et technique. Merci aux membres de l'équipe Boucher pour ces nombreux échanges aussi bien matériels que scientifiques. Jérôme, nos séances sportives me manqueront.

Merci à l'équipe des Enseignants-chercheurs en Pharmacologie et en Biologie cellulaire pour leur accueil et leur soutien. Cette découverte des différents aspects du métier se révéla épanouissante et instructive.

Je tiens à remercier les chimistes qui ont contribué à la synthèse des antagonistes pour leur investissement et leur disponibilité.

Un merci particulier à Claudine Ebel pour son assistance technique et sa bonne humeur durant le temps passé au service de cytométrie de l'IGBMC.

Je remercie également Anaïs Altmeyer et Pierre Bischoff du Centre Paul Strauss pour leur disponibilité.

Je souhaite également remercier mes parents pour leur soutien durant ces longues années d'études et pour avoir cru en moi. Merci à Nicolas pour avoir décrypté et supporté mes humeurs. Malgré la difficulté de concilier nos projets personnels et professionnels tu as toujours été là.

A Mamy

A Nicolas
A ma famille

RESUME

L'INTEGRINE $\alpha 5\beta 1$ DANS LES GLIOMES HUMAINS : UNE CIBLE THERAPEUTIQUE ET UN ACTEUR DE LA RESISTANCE A LA CHIMIOOTHERAPIE.

Mots clés : gliome humain, intégrine $\alpha 5\beta 1$, sénescence, apoptose, p53, SJ749

Les intégrines, protéines transmembranaires de la famille des molécules d'adhérence cellulaire, participent à de nombreux processus physiologiques et physiopathologiques. L'implication des intégrines à différents stades de la tumorigenèse a été montrée dans de nombreux cancers et les positionne comme des cibles thérapeutiques intéressantes. Les tumeurs cérébrales constituent des tumeurs particulièrement agressives pour lesquelles les thérapies classiques se révèlent souvent inefficaces. Nous proposons une nouvelle cible thérapeutique pour les glioblastomes : l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. En effet, des données récentes de la littérature indiquent que cette intégrine est surexprimée dans les gliomes en fonction du grade tumoral, qu'elle est au centre d'un réseau fonctionnel dans les glioblastomes et participe à la formation de nouveaux vaisseaux. Ainsi les objectifs de mon travail de thèse ont consisté en (1) la caractérisation du rôle de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans les glioblastomes, (2) la démonstration de son intérêt en tant que cible thérapeutique et (3) son implication dans les phénomènes de résistance.

Les résultats obtenus montrent que la modulation du taux d'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans des lignées de glioblastomes humains (A172, U87MG et U373) modifie les paramètres cellulaires en relation avec leur agressivité (prolifération, clonogénicité). Le niveau d'expression de la sous-unité $\alpha 5$ et la tumorigénicité ne sont pas corrélés de manière identique dans les trois lignées étudiées. La répression de la sous-unité $\alpha 5$ dans les cellules U87MG ou sa sur-expression dans les cellules U373 entraîne une induction de sénescence prématurée. L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ est fortement impliquée dans l'agressivité des glioblastomes.

Les antagonistes de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ sont définis comme des molécules capables d'inhiber l'adhérence cellulaire à la fibronectine. Ces molécules sont également capables d'inhiber la prolifération et la clonogénicité indépendamment de leur effet sur l'adhérence. Les effets de ces antagonistes sur la tumorigénicité augmentent avec le taux d'intégrine $\alpha 5\beta 1$. Les antagonistes de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ présentent une activité anti-tumorale.

La réponse cellulaire aux agents chimiothérapeutiques est modulée par le taux d'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ ou son état d'activation. L'application d'un antagoniste de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ régule la balance sénescence/apoptose en réponse à l'ellipticine. Cette régulation passe par la modulation de l'activation de la protéine p53 et de ses gènes cibles. L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ se positionne comme un acteur de la chimiorésistance dans les glioblastomes humains.

Ces travaux nous ont permis de mettre en évidence un rôle primordial de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans la tumorigénicité des cellules mais également dans la résistance à une chimiothérapie des glioblastomes humains. La relation entre l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et la protéine p53 ouvre de nouvelles perspectives thérapeutiques pour le traitement de tumeurs cérébrales selon leur taux d'expression d'intégrine et le statut de la protéine p53.

ABSTRACT

$\alpha 5\beta 1$ INTEGRIN IN HUMAN GLIOMAS : A THERAPEUTIC TARGET AND AN ACTOR OF CHEMORESISTANCE.

Keywords : human glioma, $\alpha 5\beta 1$ integrin, senescence, apoptosis, p53, SJ749

Integrins are transmembrane proteins, part of cell adhesion molecules involved in various physiologic and pathophysiological processes. Their implications in different stages contributing to tumorigenesis is described in many types of cancer and make them interesting therapeutic targets. Malignant brain tumors are considered among the most aggressive cancers due to their poor responsiveness to classical therapies. We propose $\alpha 5\beta 1$ integrin as a target in the treatment of cerebral tumors. Recent works described a functional network in glioblastoma in which $\alpha 5\beta 1$ integrin play a central role. This integrin is overexpressed in brain tumors relatively to their grading and in newly formed blood vessels. Therefore aims of my study were (1) to characterize the role of $\alpha 5\beta 1$ integrin in glioblastomas, (2) to demonstrate its use as a therapeutic target and (3) to describe its implication in the mechanism of chemoresistance.

Our results showed that modulating $\alpha 5\beta 1$ integrin level in glioblastomas has some consequences in cellular parameters relative to tumoral aggressivity (proliferation, clonogenicity). $\alpha 5$ subunit expression and tumorigenicity are not correlated in the same way in the three cell lines studied. $\alpha 5$ repression in U87MG cells and overexpression in U373 cells lead to the induction of premature senescence. $\alpha 5\beta 1$ integrin is highly involved in glioblastomas aggressiveness.

$\alpha 5\beta 1$ integrin antagonists are molecules inhibiting cell adhesion to fibronectin. These molecules are able to inhibit proliferation and clonogenicity independently to their effect on cell adhesion. Effects of these antagonists on tumorigenicity increase with $\alpha 5\beta 1$ integrin level. $\alpha 5\beta 1$ integrin antagonists have some anti-tumoral activities.

Cell response to chemotherapeutics agents is modulated by $\alpha 5\beta 1$ integrin level and activation state. Treatment with integrin antagonists regulates the balance between senescence and apoptosis in response to ellipticine. This regulation involves modulation of p53 activation and target genes. $\alpha 5\beta 1$ integrin can be considered as an actor of the chemoresistance of human gliomas.

Informations obtained here attribute a crucial role for $\alpha 5\beta 1$ integrin in tumorigenicity and control of chemosensitivity of glioblastomas. The relation between $\alpha 5\beta 1$ integrin level and p53 will help to develop new therapeutic strategies for brain tumors according to their $\alpha 5\beta 1$ integrin level and p53 status.

TABLE DES MATIERES

| | |
|---|-----------|
| TABLE DES MATIERES | 1 |
| TABLE DES ILLUSTRATIONS | 4 |
| ABREVIATIONS..... | 6 |
| PARTIE I : INTRODUCTION | 11 |
| A) LES TUMEURS CEREBRALES | 11 |
| 1) Classification générale et diagnostic | 11 |
| 2) Les gliomes..... | 12 |
| a. Classification | 12 |
| b. Causes | 13 |
| c. Physiopathologie cellulaire et moléculaire..... | 14 |
| 3) Traitements des gliomes..... | 15 |
| a. Thérapies conventionnelles | 15 |
| b. Thérapies ciblées | 17 |
| c. Nouvelles stratégies thérapeutiques | 18 |
| B) LES INTEGRINES | 19 |
| 1) Les intégrines, molécules d'adhérence cellulaire..... | 19 |
| a. Dimères et ligands | 20 |
| b. Conformations et activation | 23 |
| c. Glycosylation | 25 |
| 2) Les intégrines, points d'ancrages des complexes de signalisation | 26 |
| a. Partenaires cytoplasmiques | 26 |
| b. Partenaires membranaires..... | 28 |
| c. Signalisation « outside-in » et « inside-out »..... | 29 |
| d. Plateforme de signalisation | 30 |
| 3) Rôles des intégrines dans le cancer | 31 |
| a. Les intégrines dans la transformation et la progression tumorale | 31 |
| b. Les intégrines dans la formation de métastases | 33 |
| c. Les intégrines dans l'angiogenèse tumorale | 35 |
| d. Les intégrines et l'apoptose | 37 |
| 4) Adhérence cellulaire et résistance | 38 |
| a. Interactions cellule-cellule | 39 |
| b. Importance de la matrice extracellulaire | 40 |
| c. Intégrines et mécanismes de résistance | 40 |
| C) L'INTEGRINE $\alpha 5\beta 1$ EN TANT QUE CIBLE THERAPEUTIQUE DANS LES GLIOMES | 42 |
| 1) Importance de l'intégrine $\alpha V\beta 3$ | 42 |
| a. Angiogenèse | 42 |
| b. Surexpression dans les tumeurs | 44 |
| c. Antagonistes et essais cliniques..... | 44 |
| 2) Une nouvelle cible thérapeutique : l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ | 47 |
| a. Rôle dans l'angiogenèse..... | 47 |
| b. Signalisation | 48 |
| c. Surexpression dans les tumeurs | 49 |
| 3) Les antagonistes de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ | 51 |
| a. Les anticorps | 51 |
| b. Les peptides et peptidomimétiques | 51 |
| c. Les petites molécules non-peptidiques..... | 53 |
| d. L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans les essais cliniques..... | 55 |

| | |
|---|-----------|
| OBJECTIFS..... | 57 |
| PARTIE II : PARTIE EXPERIMENTALE | 61 |
| 1) Modèles d'étude..... | 61 |
| 2) Antagonistes de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ | 62 |
| 3) Adhérence..... | 62 |
| 4) Agents chimiothérapeutiques et autres inhibiteurs..... | 63 |
| 5) Expression protéique..... | 64 |
| 6) Réponse cellulaire..... | 66 |
| 7) Statistiques | 68 |
| PARTIE III : RESULTATS | 71 |
| A) L'INTEGRINE $\alpha 5\beta 1$ DANS LES GLIOMES | 71 |
| 1) L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans les gliomes | 71 |
| a. Expression endogène de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ | 71 |
| b. Localisation de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ | 71 |
| c. L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ est fonctionnelle : adhérence..... | 73 |
| d. Modulation de la conformation de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ | 75 |
| 2) Etude de la prolifération cellulaire dans différentes conditions | 75 |
| a. Cellules A172..... | 75 |
| b. Cellules U87MG..... | 77 |
| c. Cellules U373 | 77 |
| 3) Manipulation de l'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans les gliomes..... | 77 |
| a. Cellules A172 sur-exprimant $\alpha 5$ ou $\beta 1$ | 79 |
| b. Cellules U87MG sur-exprimant $\alpha 5$ | 81 |
| c. Cellules U87MG sous-exprimant $\alpha 5$ | 83 |
| d. Cellules U373 sur-exprimant $\alpha 5$ | 85 |
| e. Cellules U373 sous-exprimant $\alpha 5$ | 89 |
| 4) Discussion | 89 |
| B) L'INTEGRINE $\alpha 5\beta 1$ EN TANT QUE CIBLE THERAPEUTIQUE DANS LES GLIOMES | 95 |
| 1) Etude d'un antagoniste spécifique de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$: le SJ749..... | 95 |
| a. Effets sur l'adhérence cellulaire | 97 |
| b. Effets sur la prolifération cellulaire..... | 99 |
| 2) Les cellules A172 et le SJ749 | 101 |
| a. Culture tridimensionnelle..... | 101 |
| b. Le SJ749 et le taux d'intégrine : adhérence..... | 101 |
| c. Le SJ749 et le taux d'intégrine : prolifération | 101 |
| d. Le SJ749 et le taux d'intégrine : clonogénicité..... | 102 |
| 3) Les cellules U87MG et le SJ749..... | 103 |
| a. Clonogénicité | 103 |
| b. Le SJ749 et la fibronectine : prolifération | 103 |
| c. Le SJ749 et la fibronectine : clonogénicité..... | 105 |
| d. Le SJ749 et l'attachement cellulaire | 105 |
| 4) Etudes d'autres antagonistes spécifiques de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ | 107 |
| a. Molécule K34c | 107 |
| b. Recherche d'antagonistes par criblage <i>in silico</i> | 107 |
| 5) Discussion | 108 |
| C) L'INTEGRINE $\alpha 5\beta 1$: MEDIEUR DE LA CHIMIORESISTANCE DES GLIOMES ?..... | 115 |
| 1) Effets de l'ellipticine..... | 115 |
| a. Effets cellulaires de l'ellipticine | 115 |
| b. Ellipticine et voies de la protéine p53 | 123 |
| 2) Thérapie combinée : ellipticine + antagoniste de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ | 127 |

| | | |
|---|--|-----|
| a. | Dans les cellules U87MG..... | 127 |
| b. | Dans les cellules U373..... | 135 |
| 3) | Discussion | 136 |
| CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES | | 147 |
| PUBLICATIONS | | 149 |
| A) | MANUSCRIT N°1 : <i>Cancer Res</i> (2006) 66 : 6002-7 | 151 |
| B) | MANUSCRIT N°2 : <i>Int J Oncol</i> (2008) 32 : 1021-31 | 158 |
| C) | MANUSCRIT N°3 : <i>BBA</i> (2008) 1793 : 354-67 | 170 |
| D) | MANUSCRIT N°4 : <i>Soumis</i> | 185 |
| | Liste des publications et communications | 212 |
| BIBLIOGRAPHIE..... | | 215 |

TABLE DES ILLUSTRATIONS

TABLEAUX :

| | |
|---|-----|
| Tableau 1 : Les différents grades de gliomes et les altérations génétiques associées. | 13 |
| Tableau 2 : Partenaires cytoplasmiques des différentes intégrines. | 27 |
| Tableau 3 : Partenaires membranaires des différentes intégrines. | 28 |
| Tableau 4 : Détermination par immunohistochimie de l'expression des intégrines dans différentes tumeurs. | 32 |
| Tableau 5 : Les intégrines dans l'angiogenèse et la lymphangiogenèse. | 36 |
| Tableau 6 : Les antagonistes de l'intégrine $\alpha V\beta 3$ en phases cliniques dans le traitement du cancer. | 46 |
| Tableau 7 : Quantification de l'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans des biopsies humaines. | 94 |
| Tableau 8 : Bilan des données bibliographiques et des résultats obtenus pour l'affinité du SJ749. | 97 |
| Tableau 9 : Comparaison des effets de la modulation du taux de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et de son inhibition par un antagoniste spécifique, le SJ749. | 112 |
| Tableau 10 : Modulation de la sensibilité aux thérapies par l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans les cellules U87MG. | 138 |
| Tableau 11 : Bilan de la modulation des effets de l'ellipticine par l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans les cellules U87MG. | 139 |
| Tableau 12 : Bilan de la modulation des effets de l'ellipticine par l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans les cellules U373. | 143 |

FIGURES :

| | |
|--|-----|
| Figure 1 : Agents chimiothérapeutiques et dommages à l'ADN. | 16 |
| Figure 2 : Les intégrines et leurs ligands. | 21 |
| Figure 3 : Représentation schématique de la structure des intégrines. | 22 |
| Figure 4 : Structures des intégrines. | 23 |
| Figure 5 : Conformations actives et inactives de l'intégrine. | 24 |
| Figure 6 : Structure d'un point focal d'adhérence cellulaire. | 31 |
| Figure 7 : La cascade métastatique. | 34 |
| Figure 8 : Mort cellulaire induite par les intégrines. | 38 |
| Figure 9 : Rôle bivalent de l'intégrine $\alpha V\beta 3$ dans l'angiogenèse. | 43 |
| Figure 10 : Antagonistes de l'intégrine $\alpha V\beta 3$ | 45 |
| Figure 11 : Expression de l'intégrine $\alpha 5$ dans le cerveau et les tumeurs cérébrales. | 50 |
| Figure 12 : Antagonistes de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ | 54 |
| Figure 13 : Expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans les glioblastomes (lignées A172, U87MG et U373). | 72 |
| Figure 14 : Etude de la prolifération et de la progression dans le cycle cellulaire des lignées de glioblastomes. | 74 |
| Figure 15 : Effets de la sur-expression de chacune des sous-unités de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans les cellules A172. | 78 |
| Figure 16: Effets de la sur-expression de l'intégrine $\alpha 5$ dans les cellules U87MG. Le clone F8. | 80 |
| Figure 17: Effets de la sous-expression de l'intégrine $\alpha 5$ dans les cellules U87MG. Le clone D4. | 82 |
| Figure 18: Effets de la sur-expression de l'intégrine $\alpha 5$ dans les cellules U373. Le clone D7. | 84 |
| Figure 19: Effets de la sur-expression de l'intégrine $\alpha 5$ dans les cellules U373. Les clones B9, D5 et D7. | 86 |
| Figure 20: Effets de la sous-expression de l'intégrine $\alpha 5$ dans les cellules U373. Le clone E7. | 88 |
| Figure 21 : Bilan des effets de la modulation de l'expression de la sous-unité $\alpha 5$ sur la tumorigénicité des glioblastomes <i>in vitro</i> | 91 |
| Figure 22: Effets du SJ749 sur l'adhérence cellulaire. | 96 |
| Figure 23: Effets cellulaires du SJ749. | 98 |
| Figure 24: Effets cellulaires du SJ749 sur les cellules A172. | 100 |
| Figure 25 : Effets cellulaires du SJ749 sur les cellules U87MG. | 104 |
| Figure 26: Effets d'autres antagonistes de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ | 106 |

| | |
|--|-----|
| Figure 27 : Effets de l'ellipticine dans les cellules U87MG. | 116 |
| Figure 28: Répression de la sous-unité $\alpha 5$ et effets de l'ellipticine dans les cellules U87MG. | 118 |
| Figure 29: Sur-expression de la sous-unité $\alpha 5$ et effets de l'ellipticine dans les cellules U87MG. | 119 |
| Figure 30: Effets de l'ellipticine dans les cellules U373. | 120 |
| Figure 31: Modulation de l'expression de la sous-unité $\alpha 5$ et effets de l'ellipticine dans les cellules U373. | 122 |
| Figure 32: Effets de l'ellipticine sur la protéine p53. | 124 |
| Figure 33: Inhibition de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ par un antagoniste et effets de l'ellipticine sur les cellules U87MG. . | 126 |
| Figure 34: Activation de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et effets de l'ellipticine dans les cellules U87MG. | 128 |
| Figure 35: Effets de la modulation de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ sur l'activation de la voie p53 par l'ellipticine. | 130 |
| Figure 36: Inhibition de p53 et effets de l'ellipticine dans des cellules U87MG. | 132 |
| Figure 37: Inhibition de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ par un antagoniste et effets de l'ellipticine sur les cellules U373. | 134 |

ABREVIATIONS

- Aa** acide aminé
Ac-PHSCN-NH₂ Pro-His-Ser-Cys-Asn, ATN-161
ADMIDAS adjacent to MIDAS
ADN acide désoxyribonucléique
ADP adenosine diphosphate
Akt protein kinase B
AP-1 activator protein-1 facteur de transcription
ARF ADP ribosylation factor
ARNm acide ribonucléique messenger
ATP adenosine triphosphate
- Bak** Bcl-2 antagonist killer-1
Bax Bcl-2 associated X protein
Bcl-2 B-cell CLL/Lymphoma 2
Bcl-X_L Bcl-2 related gene, long isoform
Bcl-X_S Bcl-2 related gene, short isoform
BCNU 1,3-bis(2-chloroéthyle)-1 nitrosurée, carmustine
bFGF basic fibroblast growth factor
- CAM-DR** cell adhesion mediated drug resistance
CAM-RR cell adhesion mediated radioresistance
Caspase protéase à cystéine clivant avant un aspartate
CCNU 1-(2-chloroéthyle)-3-cyclohexyl-1 nitrosurée, lomustine
CD40 membre de la famille du TNF récepteur
Cdc42 membre de la famille Rho, GTPase
CDK cyclin dependent kinase
CDKI cyclin dependent kinase inhibitor
Chk1/2 sérine/thréonine kinase impliquée dans le contrôle des dommages à l'ADN
CHO chinese hamster ovary
CI50 concentration inhibitrice 50%
Cilengitide cyclo(*L*-arginyl-glycyl-*L*-aspartyl-*D*-phenylalanyl-*N*-methyl-*L*-valyl), EMD121974, Merck
CLIBS cation and ligand influenced binding site
Coll collagène
Crk CT10 regulator of kinase
- Cytochrome P450** enzyme impliquée dans la dégradation des molécules exogènes
- DMSO** diméthylsulfoxyde
- E** jour du stade embryonnaire
E2F1 facteur de transcription
EGF epithelial growth factor
EGFR récepteur à l'EGF
EMEM Eagle's minimum essential medium
ERBB2 récepteur à activité tyrosine kinase de la famille de l'EGFR, oncogène (HER2)
Erk extracellular-regulated kinase, membre de la famille des MAPkinases
- FAK** focal adhesion kinase
FARP2 FERM, RhoGEF and pleckstrin domain protein 2
Fas récepteur du FasL
FasL Fas ligand
FITC fluorescein isothiocyanate
FKHR Forkhead homolog 1
FN fibronectine
Fyn oncogène, tyrosine kinase
- GAP** GTPase activating protein
GAPDH glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase
GEF guanine nucleotide exchange factor
GPI glycosyl phosphatidyl inositol
GSK3 β glycosyl synthase kinase 3 β
GTP guanosine triphosphate
GTPases guanosine triphosphatases
Gy Gray
- HDAC** histone déacétylase
HER2 human epidermal growth factor receptor, oncoprotéine
HIF hypoxie induced factor
HGF hepatocyte growth factor
Hox D3 homeobox D3
HRP horseradish peroxidase
Hsp Heat Shock Protein
HT29 cellules tumorales du colon
HUVEC human umbilical vascular endothelial cell

Hzf hematopoietic zinc finger

IAP integrin associated protein

ILK integrin linked kinase

IMD integrin mediated death

IRM imagerie par resonance magnétique

Jnk janus kinase

JSM6427 3-(2-(1-alkyl-5-[(pyridin-2-ylamino)-methyl]-pyrrolidin-3-yloxy)-acetyl-amino)-2-(alkylamino)-propionic acid, Jerini

kD kiloDalton

Ki67 marqueur de prolifération

KXGFFKR Lys-X-Gly-Phe-Phe-Lys-Arg

LIMBS ligand-associated metal binding site

MAPkinase mitogen activated protein, sérine/thréonine kinase

Mcl-1 Myeloid cell leukemia 1

Mdm2 murine double minute oncogene

MFI mean fluorescence intensity

MIDAS metal ion –dependent adhesion site

MMP metalloprotéase matricielle

MT1-MMP membrane type 1 metalloprotéase

mTOR molecular target of rapamycin

MTS 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt

NCI US National Cancer Institute

NFκB nuclear factor kappa B, facteur de transcription

nM nanomolaire

NPXY Asn-Pro-X-Tyr

Nrp-1 neuropilin-1

OMS organisation mondiale pour la santé

p130Cas Crk-associated substrate, protéine adaptatrice se liant aux intégrines

p14 protéine adaptatrice, voie Erk

p16 CDKI, protéine de 16kD

p21 CDKI, protéine de 21kD

p27 CDKI, protéine de 27kD

p38 membre de la famille des MAPkinases, protéine de 38kD

p53 facteur de transcription, protéine de 53kD

p53WT p53 wild type

PARP-1 poly(ADP-ribose)polymerase-1

pb paires de bases

PBS phosphate buffer saline

PCR polymerase chain reaction (reaction en chaîne par polymérase)

PDGFR récepteur au platelet derived growth factor

PE phycoérythrin

PFA paraformaldéhyde

pH potentiel hydrogène

PHSRN Phe-His-Ser-Arg-Asn

PI3K phosphoinositide-3-kinase

PIP2 phosphatidyl inositol-4,5-diphosphate

PIP3 phosphatidyl inositol-3,4,5-triphosphate

PKA protéine kinase A

PKC protéine kinase C

PLCγ phospholipase Cγ

plexinA1 récepteur des sémaphorines

PSI plexine, sémaphorine, intégrine

PTEN phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10

Rac membre de la famille Rho

Raf sérine/thréonine kinase, oncogène, se lie à Ras-GTP

Ras superfamille de petite GTPase, oncogène

Rb protéine du rétinoblastome

RCPG récepteur couplé aux protéines G

RGD Arg-Gly-Asp

RGDK Arg-Gly-Asp-Lys

Rho sous-famille de Ras, GTPase

RITA reactivation of p53 and induction of tumor cell apoptosis, 2,5-bis(5-hydroxy-methyl-2-thienyl) Furan, petite molécule réactivant p53

Rnd1 membre de la famille Rho, GTPase

S247 3-(S)-(3-Bromo-5-chloro-2-hydroxyphenyl)-3-(2-([5-(5-hydroxy-1,4,5,6-tetrahydro-pyrimidin-2-ylamino)-pyridine-3-carbonyl]-amino)-acetyl-amino)-propionic acid

SA-β-Gal senescence associated β-galactosidase
Sema3A sémaphorine 3A
Shc Src homology 2 domain containing transforming protein
shRNA short hairpin RNA
SJ749 (S)-2-[(2,4,6-triméthylphényl)-sulfonyl] amino-3-[[7-benzyloxycarbonyl-8-(2-pyridinylaminométhyl)-1-oxa-2,7-diazaspiro-(4,4)-non-2-èn-3-yl]-carbonylamino]-propionic acid, Merck
Snail superfamille de facteurs de transcriptions contenant un doigt zinc
SNP single nucleotide polymorphism
Src tyrosine kinase, proto-oncogène, *Rous sarcoma virus*
TGF-β Transforming Growth Factor β

TIMPs tissue inhibitor of MMP
TNF-α tumor necrosis factor α

μM micromolaire
uPA urokinase plasminogen activator
uPAR récepteur à l'uPA

VCAM-1 vascular cell adhesion molecule-1
VEGF vascular endothelial growth factor
VEGFR récepteur au VEGF
VN vitronectine

WHO world health organisation

X acide aminé quelconque

PARTIE I : INTRODUCTION

PARTIE I : INTRODUCTION

A) LES TUMEURS CEREBRALES

Dans cette étude nous nous sommes particulièrement intéressés à une forme de tumeur fortement vascularisée et agressive : les tumeurs cérébrales. Ces tumeurs se révèlent réfractaires à la plupart des traitements et font souvent l'objet de récives.

1) Classification générale et diagnostic

Les tumeurs cérébrales représentent 2% des cas de cancer soit 21810 nouveaux cas par an aux Etats-Unis et 13070 décès (données NCI 2008), elles touchent 3000 personnes chaque année en France. Ces tumeurs bénignes ou malignes naissent par prolifération anormale de cellules nerveuses, gliales ou endothéliales dans le cerveau et la moelle épinière, ce sont alors des tumeurs primaires. Il existe également des tumeurs cérébrales secondaires apparaissant par métastase d'une tumeur extra-crânienne. Les tumeurs bénignes sont constituées de cellules non-cancéreuses proliférant lentement. Les tumeurs malignes croissent rapidement, possèdent un fort pouvoir invasif et endommagent les structures cérébrales. Les tumeurs primaires sont plus fréquentes chez l'enfant et constituent la forme de cancer la plus répandue après les cancers du sang. Ces tumeurs ont un très mauvais pronostic vital et induisent de nombreuses séquelles irréversibles chez l'enfant.

Les manifestations cliniques d'une tumeur cérébrale sont variables et dépendent essentiellement de la localisation de la masse tumorale et de son volume. Elle peut entraîner une hypertension intracrânienne et de l'hydrocéphalie associée ou non à un œdème. Les signes neurologiques s'étendent des simples maux de tête, vomissements, vertiges, troubles auditifs et visuels aux convulsions, dysfonctions neurologiques et modifications du comportement. Le scanner et l'IRM sont les examens les plus fréquemment pratiqués. Jusqu'à aujourd'hui, le diagnostic de certitude repose sur l'analyse morphologique, en microscopie, d'un fragment de tumeur prélevé lors de l'intervention. L'identification précise du type tumoral (par exemple entre astrocytome et oligodendrogliome) ou de son degré d'évolutivité est souvent très délicate. La classification par l'OMS (Organisation Mondiale pour la Santé) des tumeurs cérébrales tient compte de leur origine cellulaire et de leur degré de malignité (4 grades).

Les lymphomes cérébraux primitifs sont assez rares. Ils dérivent des lymphocytes et restent limités au cerveau, ils se distinguent donc des lymphomes dits "systémiques" qui peuvent affecter l'ensemble du corps et que l'on rencontre en hématologie. Les méningiomes se développent très lentement à partir des méninges. Il existe plusieurs autres types de tumeurs cérébrales primitives tels que les médulloblastomes (qui se développent dans le cervelet), les germinomes (qui se développent dans la glande pinéale) ou les épendymomes mais les tumeurs cérébrales primitives les plus fréquentes sont les gliomes.

2) Les gliomes

a. Classification

Les gliomes représentent 50% des tumeurs cérébrales et se divisent en 3 groupes : les oligoastrocytomes (<10%), les oligodendrogliomes (10-30%) et les astrocytomes (60-70%). Cette forme de tumeur cérébrale représente 1% des cas de cancer et 2.5% des décès liés aux cancers aux Etats-Unis (Fine *et al.*, 1993). Les gliomes constituent la forme de tumeur solide la plus répandue et ils représentent la deuxième cause de mortalité chez les enfants de moins de 15 ans et la troisième chez les personnes de 15 à 34 ans. Ces tumeurs sont très invasives et présentent un fort taux de récurrence locale. Mise à part la résection chirurgicale, aucun standard de soin n'est appliqué pour le traitement des gliomes et le pronostic vital reste faible malgré la thérapie.

Les astrocytomes sont classés selon leur capacité à s'infiltrer dans le cerveau en quatre grades de malignité (Lefranc *et al.*, 2005). Les astrocytomes pilocytiques (grade I) sont bénins et très fréquents chez l'enfant. Le traitement de choix pour ces tumeurs est la résection chirurgicale qui permet souvent de soigner le patient. Les astrocytomes de grade II sont dits de bas grade ou fibrillaires (Tableau 1), leur pouvoir invasif reste modéré. Ces tumeurs sont difficilement supprimables par chirurgie. Les astrocytomes anaplasiques (grade III) présentent une prolifération supérieure aux tumeurs de grade inférieur et leur médiane de survie se réduit à 2-3 ans. Les glioblastomes (grade IV) sont très agressifs, invasifs et destructifs, ils constituent près de 50% des gliomes. Ces tumeurs présentent des caractères de haute malignité tels que la prolifération vasculaire, la nécrose et sont souvent réfractaires aux traitements classiques (chimio- ou radiothérapie). Leur prévalence est de 1/100000 et leur prolifération est de 2 à 5 fois supérieure à celle des astrocytomes de grade inférieur. Ils se révèlent en général léthaux dans une période inférieure à un an et leur taux de récurrence après chirurgie est de 90%. Le taux de survie à 5 ans est de 30% pour les astrocytomes anaplasiques alors qu'il n'est que de 3% pour les glioblastomes. Sur le plan clinique on distingue les glioblastomes primaires

(majoritaires chez les patients âgés) et secondaires (âge des patients < 45 ans) selon que la tumeur soit formée directement ou découle de la transformation progressive d'une tumeur de grade inférieur. Les glioblastomes secondaires sont issus à près de 70% d'astrocytomes anaplasiques évoluant en grade III/IV entre 5 et 10 ans après le diagnostic (Furnari *et al.*, 2007).

| Désignation WHO | Grade WHO | Caractéristiques | Altérations génétiques |
|--|-----------|---|--|
| Astrocytome pilocytique | I | Tumeur bénigne, infantile (5-15 ans) Peu invasif, masse tumorale circonscrite Bon pronostic après ablation Médiane de survie > 20 ans | Caryotype normal Mutation PTEN |
| Astrocytome fibrillaire (de bas grade) | II | Tumeur bénigne Invasif, diffuse légèrement Ablation difficile Médiane de survie ≈ 10 ans | Délétion 17p, 22q Mutation p53 Surexpression PDGFR |
| Astrocytome anaplasique | III | Tumeur maligne Assez invasif, diffusion modérée Médiane de survie ≈ 28 mois Affecte surtout les hémisphères cérébraux Médiane de survie : 2-3 ans | Délétion 10q, 22q, 9p, 13q Trisomie 7 Mutations p53, p16, Mdm2 et Arf |
| Glioblastome | IV | Tumeur hautement maligne, Age > 40 ans Très invasif et diffus Très vascularisée, zone nécrosée, masse molle Médiane de survie < 1 an | Délétions 10q, 19q, 9p et 22q Trisomie 7 Délétion p16 Mutations p53 et PTEN Surexpression EGFR, Mdm2 |

Tableau 1 : Les différents grades de gliomes et les altérations génétiques associées.

b. Causes

Dans près de 95% des cas, la cause des tumeurs cérébrales ainsi que les mécanismes contribuant à la transformation néoplasique et à l'évolution tumorale sont inconnus. La classification de l'OMS basée sur des critères histologiques constitue un des facteurs pronostiques les plus solides avec l'âge du patient. La principale altération génétique recherchée dans les biopsies est la co-délétion des bras chromosomiques 1p et 19q, caractéristique de tumeurs à bon pronostic et à forte sensibilité aux traitements.

L'hypothèse de l'apparition des gliomes est qu'une série d'altérations génétiques contrôlant le cycle cellulaire résulte en une prolifération non-contrôlée de cellules normales (notamment des cellules souches ou progénitrices). Il s'agit soit de l'activation d'oncogènes, soit de

l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs (Psimaras et Delattre, 2008). Le mécanisme exact à l'origine de ces altérations n'a pas encore été élucidé. Les formes familiales sont exceptionnelles mais peuvent s'intégrer dans un syndrome de Turcot ou de Li-Fraumeni ou une neurofibromatose de type I.

Afin d'améliorer les connaissances des causes des gliomes, un consortium international a été créé : « Gliogene ». Il est chargé de découvrir des gènes impliqués dans les gliomes familiaux en utilisant des techniques d'analyse pangénomique des polymorphismes d'une seule paire de base (SNP). Dans la majorité des gliomes la part des facteurs environnementaux et génétiques reste à déterminer mais à ce jour il n'a pas été établi de relation entre tumeurs cérébrales et facteurs environnementaux (ondes électromagnétiques, pesticides...). Il semble que les polymorphismes génétiques fonctionnels contribuent grandement à la survenue de gliomes et constituent des marqueurs pronostiques efficaces.

Les glioblastomes présentent une hétérogénéité intra-tumorale aux niveaux cytologiques, transcriptionnels et génomiques. Cette complexité, combinée à une sous-population de cellules souches cancéreuses et à de nombreuses altérations génétiques, rendent ces tumeurs particulièrement difficiles à comprendre et à traiter.

c. Physiopathologie cellulaire et moléculaire

Ces dernières années de nombreuses études sont menées pour mieux appréhender les voies moléculaires et les altérations génétiques impliquées dans les gliomes. Les principaux mécanismes affectent la régulation du cycle cellulaire (point de contrôle G1/S, protéines Rb et p53), la prolifération (voies des récepteurs à activité tyrosine kinase) et l'apoptose. D'autres modifications touchent les protéines participant à l'angiogenèse, à l'invasion ou à la formation des métastases. Ces altérations ont tendance à s'additionner au cours du développement et de la progression tumorale

Les altérations génétiques les plus courantes dans les glioblastomes sont une perte d'hétérozygotie au niveau du chromosome 10q (Ohgaki et Kleihues, 2007). Dans les glioblastomes primaires on note une surexpression de l'EGFR et de Mdm2, une délétion de p16 et la délétion ou mutation de PTEN. Les glioblastomes secondaires présentent un fort taux de mutation de la protéine p53 ainsi qu'une perte des chromosomes 19q et 22q.

Les voies p53 et Rb sont le siège de nombreuses mutations dans les glioblastomes. Le gène *Rb1* situé sur le chromosome 13q14 est muté dans le quart des astrocytomes de haut-grade. Les régulateurs de l'activité de Rb (CDK4, CDK6 et p16) sont également fréquemment délétés ou inactivés. La neutralisation de la voie Rb et la dérégulation du cycle cellulaire qui

en découle ne sont pas suffisantes pour permettre la transformation tumorale. La voie de la protéine p53 participe à la progression dans le cycle cellulaire et à l'apoptose. Cette voie est altérée dans la majorité des gliomes par mutation ponctuelle ou perte du chromosome 17p (Furnari *et al.*, 2007). La protéine Mdm2 (ubiquitine-ligase) est un régulateur négatif de p53 durant la tumorigenèse. Cet oncogène est amplifié dans 10% des glioblastomes et son homologue Mdm4 dans 4%.

Les gliomes présentent de nombreuses altérations des signaux mitogènes qui réduisent leur dépendance aux facteurs de croissance et permettent l'activation constitutive des voies MAP kinases et PI3K. Les MAPkinases sont stimulées par les récepteurs à activité tyrosine kinase et les intégrines en passant par des protéines adaptatrices ou intermédiaires tels que Grb2 et Ras. Peu de mutations de Ras ont été trouvées dans les gliomes ce qui démontre que la voie des MAPkinases est stimulée par dérégulation des signaux en amont (au niveau des récepteurs). L'activité PI3K est antagonisée de manière directe par la phosphatase PTEN. Ce suppresseur de tumeur se trouve inactivé dans 50% des gliomes de haut-grade, ce qui conduit à la stimulation non-contrôlée de PI3K. Toutes ces voies régulant la prolifération cellulaire sont étroitement liées et sous la dépendance de divers récepteurs. L'EGFR est amplifié dans près de 40% des glioblastomes et muté dans un quart des cas. Ceci augmente la tumorigénicité en réduisant l'apoptose et stimulant la prolifération. Le PDGFR α et ses ligands sont exprimés dans les gliomes mais ils ne sont pas mutés ni amplifiés. Il semble y avoir une boucle de régulation interne qui permet l'activation de la signalisation en aval. De plus cette voie stimule l'angiogenèse tumorale.

3) Traitements des gliomes

a. Thérapies conventionnelles

Le traitement des gliomes s'effectue en deux étapes. La première consiste en la résection chirurgicale de la totalité de la tumeur (si sa localisation le permet), il s'en suit un traitement par chimio- et/ou radiothérapie. Les gliomes étant très diffus la suppression totale de la tumeur se révèle très difficile. De plus les chirurgiens sont souvent amenés à épargner certaines zones du cerveau pour limiter les dommages neurologiques. La médiane de survie post-opératoire se révèle très courte (4-6 mois). Dans les années 70, on a commencé à prescrire une chimiothérapie et/ou des radiations après l'intervention chirurgicale (Fine *et al.*, 1993).

La radiothérapie a été le premier traitement utilisé en post-opératoire dans le traitement des gliomes. Les rayonnements les plus courants sont les photons émis par les rayons X. L'action

biologique de ces rayons s'effectue en deux étapes : l'ionisation de l'eau qui va produire des radicaux libres puis l'interaction de ces radicaux avec l'ADN ce qui va induire des lésions irréversibles dans la molécule d'ADN et la mort cellulaire. Les traitements standards se composent de radiations localisées totalisant 60 Gy en 30 fractions.

La combinaison d'une radiothérapie et d'une chimiothérapie a fait ses preuves dans de nombreuses tumeurs solides. Les agents chimiothérapeutiques les plus utilisés ces trente dernières années sont les nitrosourées : BCNU et CCNU (Figure 1). Le BCNU présente des bénéfices modestes et se trouve souvent associé à une autre molécule (procarbazine, vincristine) ou à une radiothérapie. L'effet cytotoxique du BCNU sur les cellules U87MG semble très limité et l'induction d'apoptose est très lente (Batista *et al.*, 2007).

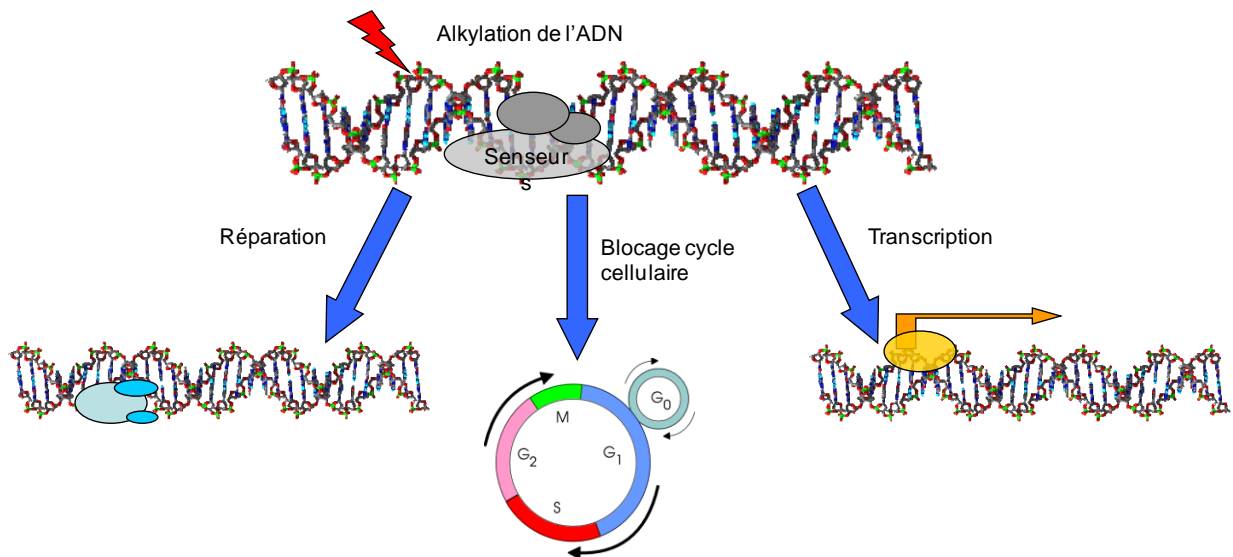
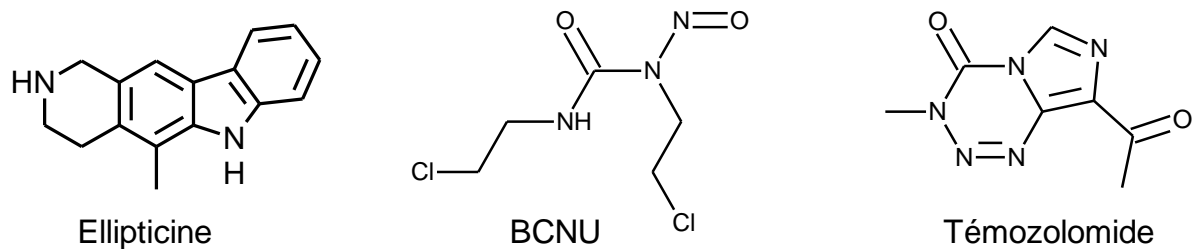


Figure 1 : Agents chimiothérapeutiques et dommages à l'ADN.

Le BCNU appartient à la famille des nitrosourées. Le Témzolomide est un agent alkylant. L'ellipticine est un alcaloïde inhibiteur de la topoisomérase II et intercalant de l'ADN.

Le témozolomide (agent alkylant capable de traverser la barrière hémato-encéphalique) démontre un bon potentiel dans le traitement des tumeurs cérébrales. Il affecte 35% des astrocytomes anaplasiques et 5% des glioblastomes avec une survie sans progression à 6 mois

de 21% (Soffietti *et al.*, 2007). Le témozolomide induit de l'apoptose dans les cellules U87MG mais n'inhibe pas l'activité transcriptionnelle (Roos *et al.*, 2007). Récemment, en associant le témozolomide à des radiations ionisantes dans le traitement des glioblastomes, on a observé une augmentation du taux de survie après 2 ans de 10 à 27% (Brandsma et van den Bent, 2007 ; Stupp *et al.*, 2007). Même si ce traitement est bien toléré et se révèle le plus efficace, les bénéfices obtenus restent modestes et d'autres molécules font l'objet d'essais cliniques.

L'ellipticine (alcaloïde naturel issu de l'Apocynaceae) est un agent antinéoplasique s'intercalant dans l'ADN et inhibant la topoisomérase II. L'ellipticine et ses dérivés présentent une cytotoxicité plus importante dans les tumeurs cérébrales selon une étude du NCI criblant 60 lignées cancéreuses humaines (Jurayj *et al.*, 1994). Elle est capable de former des adduits sur l'ADN après sa dégradation par le cytochrome P450 (Stiborova *et al.*, 2003 ; Stiborova *et al.*, 2007a). Ainsi l'ellipticine induit l'inhibition de la prolifération de cellules cancéreuses mammaires en provoquant l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose par activation des caspases (PL Kuo *et al.*, 2005). Un dérivé de l'ellipticine inhibe quant à lui la croissance des cellules U87MG en réduisant l'expression de p27 (Pamarthy *et al.*, 2007).

Malgré la résection chirurgicale et la thérapie concomittante, les glioblastomes font souvent l'objet de récives à 2-3cm de la tumeur initiale. Des traitements locorégionaux (irradiation ou chimiothérapie par stéréotaxisme) sont en cours d'évaluation afin de limiter la cytotoxicité et d'augmenter le contrôle local de la tumeur. Cependant les traitements conventionnels des glioblastomes présentent de faibles bénéfices et de nombreux effets secondaires et se révèlent souvent uniquement palliatifs. Les recherches de nouvelles molécules s'orientent vers des thérapies ciblées sur les oncogènes impliqués dans la progression tumorale.

b. Thérapies ciblées

L'analyse moléculaire des gliomes a permis l'identification de voies de signalisation impliquées dans leur agressivité. Il s'agit par exemple de la voie de l'EGFR qui est surexprimé dans 40% des glioblastomes. L'expression du variant III de l'EGFR et la délétion de PTEN sont associées à l'activation de la voie PI3K et donc à une stimulation de la prolifération. Des inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase de l'EGFR sont en cours d'étude (seul ou en association avec un agent chimiothérapeutique), on peut citer le Gefitinib (ZD1839) et l'Erlotinib (OSI-774) qui présentent des résultats encourageants. Cependant la sensibilité des tumeurs à ces inhibiteurs dépend de la présence de PTEN et du statut d'activation d'Akt. Une association avec une molécule ciblant mTOR (Temsirrolimus)

améliore la réponse à l'Erlotinib. D'autres inhibiteurs ciblent les différents récepteurs impliqués dans l'angiogenèse tumorale : le mésylate d'imatinib (Gleevec) pour le PDGFR et le Bevacizumab (Avastin) pour le VEGFR. Le Thalidomide inhibe l'angiogenèse médiée par le VEGF et le bFGF, son efficacité anti-tumorale en monothérapie ou en association avec un agent chimiothérapeutique a été démontrée pour les tumeurs cérébrales (Tuettenberg *et al.*, 2006).

L'activation de ces récepteurs à activité tyrosine kinase conduit au recrutement d'effecteurs intracellulaires tels que Ras, PI3K et PKC. Divers inhibiteurs de ces effecteurs ont été développés et font l'objet d'études cliniques. La petite protéine G, Ras, est rarement mutée dans les gliomes mais son activité est forte suite aux altérations des récepteurs aux facteurs de croissance. La localisation membranaire de Ras est sous le contrôle de farnésyltransférases apportant les lipides nécessaires. Deux inhibiteurs de ces enzymes, le Tipifarnib et le Lonafarnib sont évalués pour le traitement des gliomes (Sathornsumetee et Rich, 2008). L'activation de la voie PI3K est associée à un mauvais pronostic pour les gliomes. La Périfosine, inhibiteur de Akt ainsi qu'un inhibiteur ciblant PI3K et mTOR, le PI-103 sont en cours d'évaluation clinique. L'Enzastaurin est un inhibiteur de GSK3 β (kinase activée par PKC) a démontré son potentiel dans le traitement des gliomes en monothérapie et en association avec une radiothérapie.

c. Nouvelles stratégies thérapeutiques

Malgré les efforts réalisés en clinique pour relier l'efficacité d'une thérapie à un profil histomoléculaire de la tumeur, la plupart des molécules développées ne démontrent que de faibles bénéfices. D'autres cibles moléculaires sont évoquées pour le développement de nouvelles thérapies. Parmi elles, on peut citer Src et son inhibiteur le Dasatinib, les HDAC et le Vorinostat mais aussi les inhibiteurs du protéasome.

Les gliomes contiennent une proportion de cellules non-différenciées, les cellules souches cancéreuses. Ces cellules contribuent à la progression de la tumeur ainsi qu'aux mécanismes de résistance. Elles potentialisent l'angiogenèse en sécrétant du VEGF. Les cellules souches cancéreuses constituent donc une cible thérapeutique potentielle. Les tumeurs cérébrales sont beaucoup moins accessibles que les autres tumeurs solides car elles sont protégées par la barrière hémato-encéphalique. Une stratégie pour augmenter l'efficacité des agents thérapeutiques passe par la modulation des transporteurs membranaires. On peut également imaginer modifier la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique ou administrer les molécules dans des liposomes ou des nanoparticules.

Un autre moyen de contourner la résistance des gliomes est d'associer différentes molécules ou d'utiliser des inhibiteurs multi-cibles. Dans cette optique les possibilités de combinaison sont quasi illimitées c'est pourquoi il est nécessaire de développer une stratégie pour déterminer les associations efficaces. Les agents multi-cibles sont le plus souvent des inhibiteurs de récepteurs à activité tyrosine kinase. L'association de deux molécules ciblant la même voie démontre des effets bénéfiques. Il est également envisageable d'inhiber à la fois la tumeur et sa vascularisation en ciblant les cellules endothéliales en plus des cellules cancéreuses. L'association la plus courante combine une chimio- ou radiothérapie à une molécule ciblée.

Malgré toutes ces possibilités de traitements en monothérapie ou multithérapie, les gliomes se révèlent toujours réfractaires. Les raisons de ces échecs thérapeutiques sont en partie liées à la grande hétérogénéité des gliomes et à leur fort taux de récurrence. La recherche de traitements pour ces tumeurs particulièrement agressives constitue un défi en oncologie.

B) LES INTEGRINES

1) Les intégrines, molécules d'adhérence cellulaire

Les intégrines appartiennent à la superfamille des protéines d'adhérence cellulaire qui assurent la liaison entre la cellule et sa matrice extracellulaire ou d'autres ligands (solubles ou à la surface d'autres cellules). Les interactions entre les intégrines et leur ligand permettent l'interaction physique entre la cellule et son environnement et assurent la base des tensions mises en jeu lors des mouvements cellulaires. Cette interaction assure également l'organisation de complexes de signalisation intracellulaires modulant la différenciation et le devenir cellulaire. Les intégrines jouent un rôle important dans de nombreux processus physiologiques tels que le développement embryonnaire, l'agrégation plaquettaire, l'inflammation, la vascularisation et la tumorigenèse. Les études menées en délétant les différents gènes codant pour les intégrines ont montré un rôle essentiel de chacune et leurs implications dans de nombreux processus. Bien que leur contribution principale soit le maintien de la cohésion tissulaire et la migration cellulaire, les dimères d'intégrine sont également impliqués dans la progression de nombreuses pathologies ce qui les présente comme des cibles thérapeutiques potentielles (Humphries, 2000).

a. Dimères et ligands

L'analyse du génome humain a permis de découvrir 24 sous-unités α et 9 sous-unités β pouvant s'associer en 24 hétérodimères distincts (Danen et Yamada, 2001). L'association $\alpha\beta$ détermine la spécificité de l'intégrine pour son substrat. Cette famille de protéines d'adhérence est représentée dans de nombreuses espèces animales : du nématode *Ceanorhabditis elegans* aux mammifères. Le répertoire de dimères d'intégrines exprimés à la surface d'une cellule détermine les composants de la matrice extracellulaire avec lesquels la cellule pourra interagir (Stupack et Chersesh, 2002). L'interaction intégrine-ligand est modulée par l'avidité et l'affinité et est fortement influencée par la conformation du ligand et la formation d'éventuels multimères. Cette liaison entre l'intégrine et son ligand assure une transmission de signal à l'intérieur de la cellule. Comme un même ligand peut être reconnu par différentes intégrines, par le jeu des coopérations et des compétitions entre les intégrines le signal qui en découle peut être très complexe. Il ne s'agit pas d'une simple interaction physique entre la cellule et la matrice extracellulaire mais bien d'une analyse précise de son environnement direct par la cellule.

A ce jour, les 18 sous-unités α et les 8 β reconnues au niveau protéique peuvent s'associer en 24 dimères. De par la spécificité pour leur ligand, les intégrines peuvent être classées en différents groupes : les intégrines à laminine, les intégrines à collagène, les intégrines leucocytaires et les intégrines reconnaissant des motifs RGD (Takada *et al.*, 2007) (Figure 2). Les sous-unités α et β sont constituées d'un large domaine extracellulaire (700-1100 Aa) et d'une petite partie cytoplasmique (30-50 Aa) (Humphries, 2000), cependant aucune homologie n'a été détectée entre elles. Par contre les séquences des sous-unités α sont identiques à 30% et celles des sous-unités β à 45% (Ruoslahti, 1988). Ces deux familles de gènes ont donc évoluées par duplication. Bien que la structure des deux sous-unités soit différente, la complémentarité de leurs deux domaines extracellulaires permet la spécificité du ligand. Les études par microscopie électronique ont permis de déterminer la forme et la taille de l'intégrine : le récepteur mesure 28nm de long et se compose d'une « tête » globuleuse de 8x12nm et de deux queues de 2nm d'épaisseur et d'environ 18nm de long.

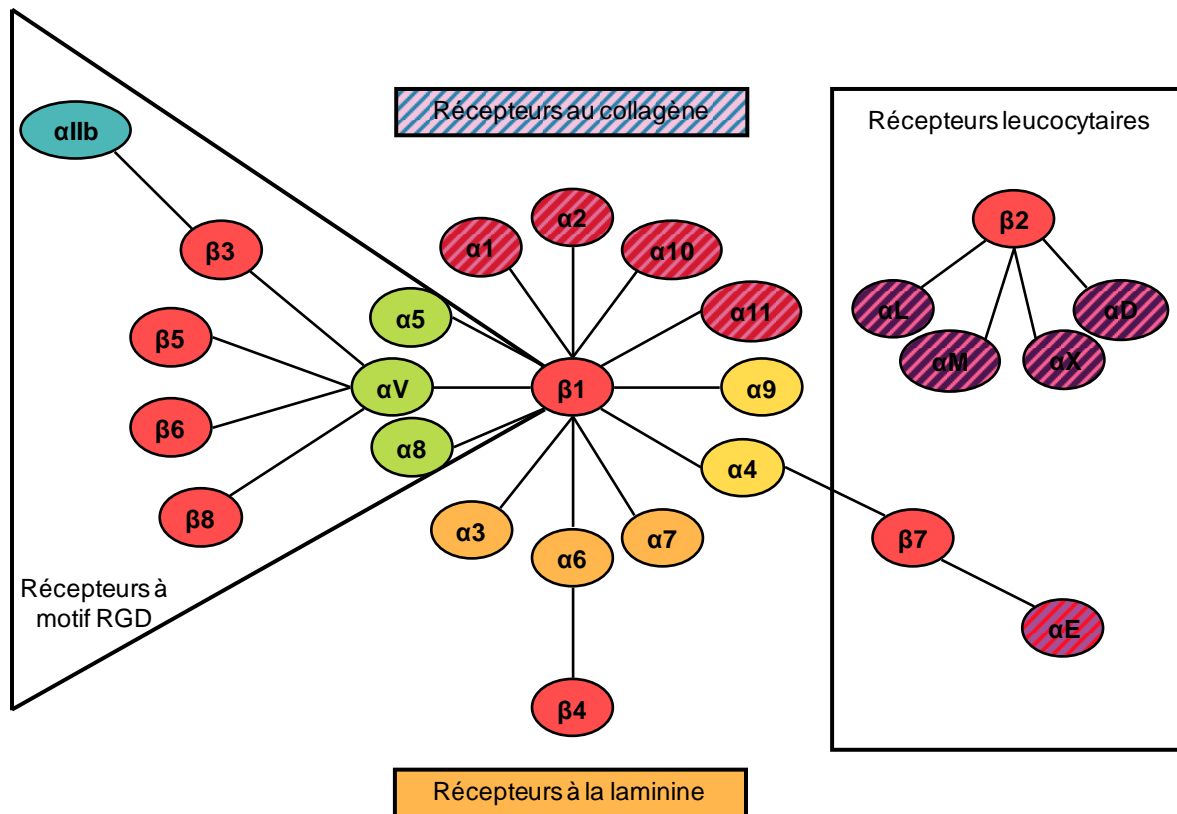


Figure 2 : Les intégrines et leurs ligands.

Hachure=sous-unité α à domaine I. Les 18 sous-unités α et les 8 sous-unités β s'associent pour former 24 hétérodimères. (Adapté de Hynes, 2002).

Structure de la sous-unité α : La région N-terminale de la sous-unité α est constituée d'une répétition de 7 segments d'environ 60 Aa chacun qui présentent une forte homologie entre eux. Ces segments se replient pour former un tonneau β qui comprend des sites de liaison des ions Ca^{2+} (Takagi et Springer, 2002). On distingue deux types de sous-unités α selon la présence ou non d'un domaine additionnel, le domaine I qui joue un rôle important dans l'interaction avec le ligand et les interactions cellulaires (Hynes, 2002) et s'insère entre les feuillets β 2 et 3 du tonneau β . La structure tridimensionnelle de ce domaine est de type Rossmann fold et contient un site MIDAS (metal ion-dependent adhesion site). Les sous-unités α contenant ce domaine sont au nombre de 9 (α 1, α 2, α 10, α 11, α L, α M, α X, α D et α E). La région C-terminale de la sous-unité contient environ 500Aa de la partie extracellulaire et forme une région linéaire constituée de trois ensembles de feuillets β .

Structure de la sous-unité β : La région N-terminale de la sous-unité β présente des homologies avec des protéines membranaires telles que les plexines, les sémaphorines et le récepteur c-Met ce qui lui vaut son nom PSI (plexine, sémaphorine, intégrine). Cette région de 50Aa composée de deux hélices α contient 7 résidus cystéine qui assurent des ponts disulfures au

sein de la sous-unité. La sous-unité β est constituée d'un large domaine très conservé de 240 Aa en N-terminal de la protéine qui adopte la même conformation que le domaine I de la sous-unité α (Leitinger *et al.*, 2000). Ce domaine contient un site MIDAS et interagit avec le tonneau β de la sous-unité α . Le domaine hybride est constitué de résidus situés de part et d'autre du domaine I-like et forme des feuillets β . Les résidus 435 à 600 se divisent en quatre segments riches en Cystéines ressemblant à l'EGF.

Les parties transmembranaires des deux sous-unités sont très courtes et en forme d'hélice. Leur partie cytoplasmique est restreinte (moins de 75 Aa) sauf pour l'intégrine $\beta 4$ et dépourvue de toute activité catalytique. Ce domaine permet de recruter un grand nombre de partenaires intracellulaires grâce à des sites de liaison très conservés (Figure 3). La structure de l'intégrine $\alpha V\beta 3$ a été résolue par cristallographie aux rayons X (Xiong *et al.*, 2001), celle-ci a révélée une forme ovoïde de la tête des intégrines supportée par deux régions linéaires (Figure 4). Le domaine globulaire contient la poche de liaison du ligand qui met en jeu des résidus des deux sous-unités. Les domaines extracellulaires interagissent par liaisons non-covalentes et seuls quelques ponts disulfures au sein d'une même sous-unité assurent la cohésion du dimère.

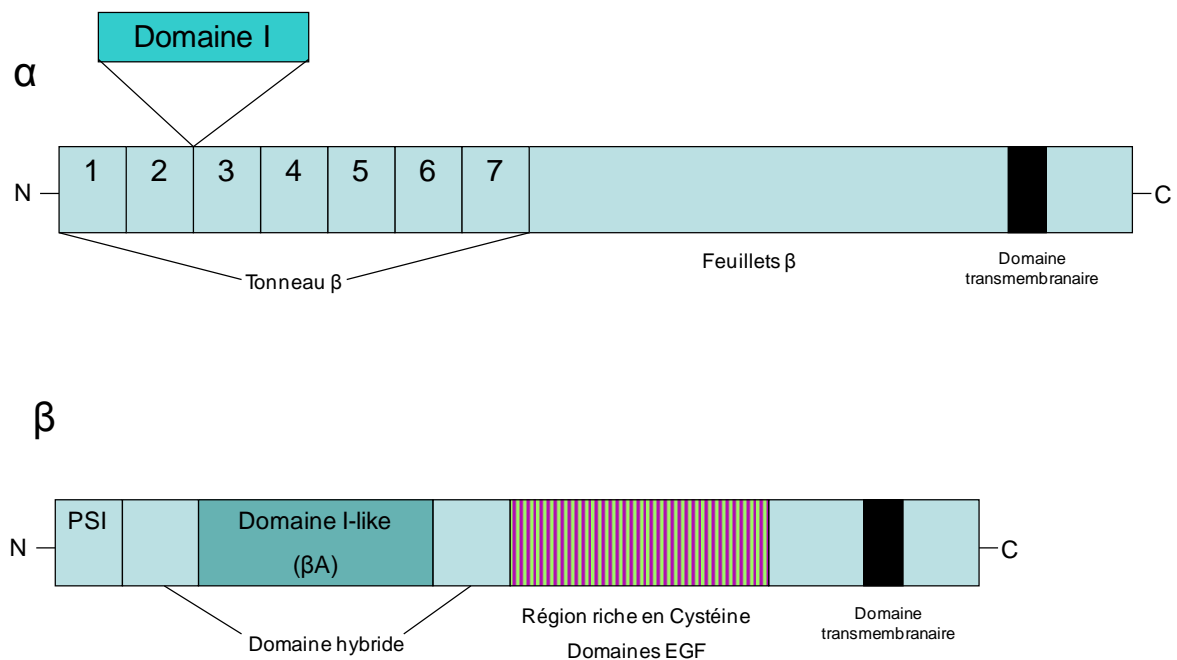


Figure 3 : Représentation schématique de la structure des intégrines. (Adapté de Leitinger, 2000).

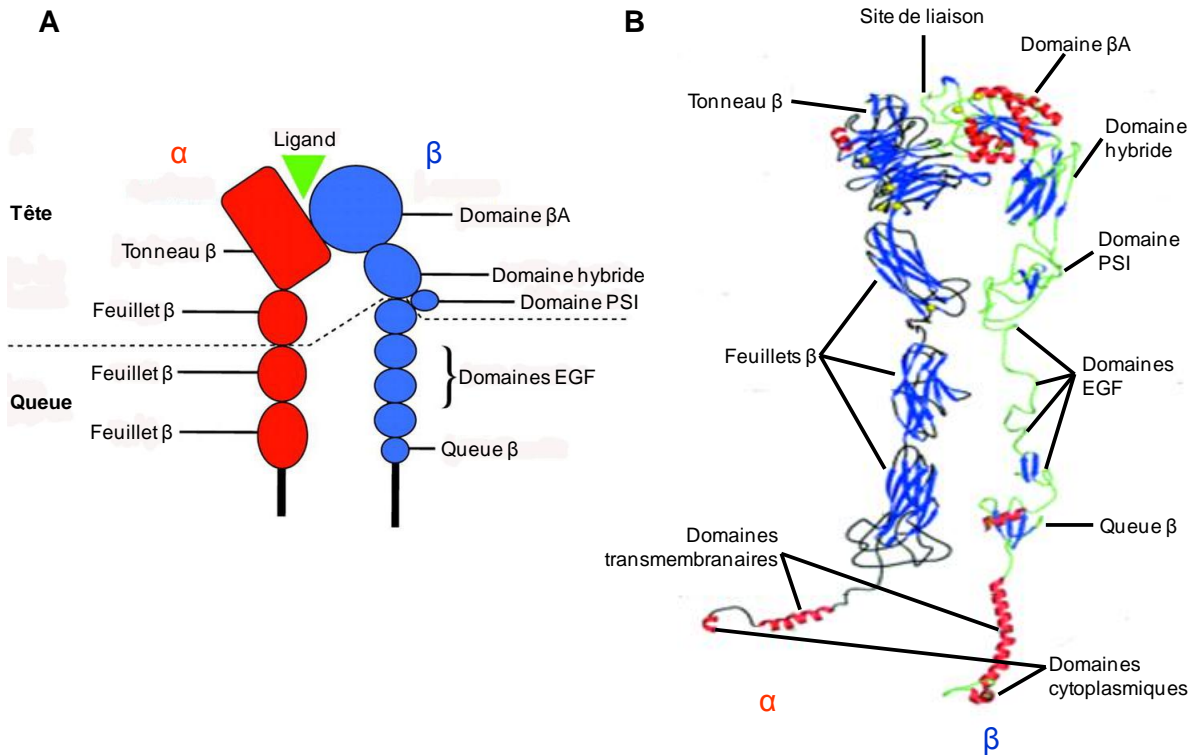


Figure 4 : Structures des intégrines.

A) Diagramme schématisé de la structure du dimère d'intégrines. (Adapté de Askari, 2009). B) Représentation de la structure 3D de l'intégrine $\alpha V\beta 3$ déterminée par cristallographie. (Adapté de Humphries, 2003).

b. Conformations et activation

Les intégrines sont des dimères pouvant adopter différentes conformations modifiant leur affinité pour le ligand et leur état d'activation. De nombreuses intégrines ne sont pas constitutivement actives, elles peuvent être exprimées à la surface des cellules dans une forme inactive : pas d'interaction avec le ligand et pas de signal. L'intégrine plaquettaire $\alpha IIb\beta 3$ a été très étudiée pour ces changements conformationnels notamment en utilisant des anticorps spécifiques de la forme active dont les épitopes sont souvent situés dans la partie riche en Cystéines de la sous-unité β (Takagi et Springer, 2002). On décrit principalement deux conformations des intégrines : (1) l'une repliée où les sous-unités sont courbées et pour laquelle le site de liaison présente peu d'affinité, c'est la forme inactive et (2) la conformation étendue avec des sous-unités linéaires et un site de liaison très affiné, c'est la forme active. Ces conformations ont été mises en évidence par microscopie électronique en présence de Mn^{2+} pour la forme active et de Ca^{2+} pour la forme inactive de l'intégrine $\alpha V\beta 3$. Le passage d'une conformation à l'autre nécessite de rompre l'interaction entre la tête de l'intégrine et sa queue, la tête passant alors d'une position proche de la membrane à une position rendant possible l'interaction avec son ligand (Figure 5).

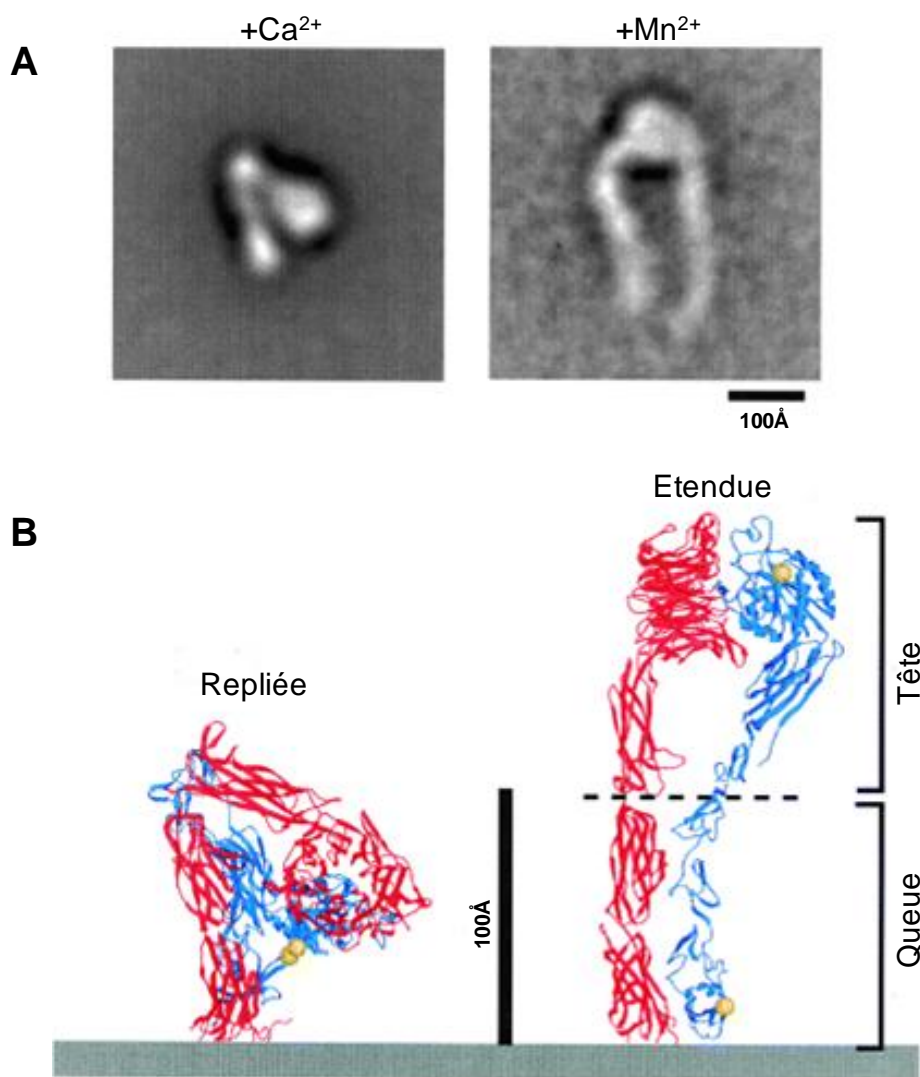


Figure 5 : Conformations actives et inactives de l'intégrine.

A) Microscopie électronique. B) Représentation schématique. (Adapté de Takagi et Springer, 2004).

La modulation de la conformation de l'intégrine par ces cations divalents passe par leur fixation sur les sites MIDAS mais aussi sur des sites additionnels ADMIDAS (adjacent to MIDAS) et LIMBS (ligand-associated metal binding site). Les changements de conformations de l'intégrine modulent directement son affinité pour le ligand. Lorsque l'intégrine est active elle présente des épitopes spécifiques que l'on nomme CLIBS (cation and ligand influenced binding site) et qui sont situés dans la partie linéaire du dimère. Des anticorps dirigés contre ces épitopes sont capables d'induire l'activation de l'intégrine tout comme les cations divalents (Bazzoni et Hemler, 1998). Les domaines transmembranaires des deux sous-unités semblent jouer un rôle dans les changements conformationnels du dimère. Des mutations au

sein de ces domaines modifient l'affinité de l'intégrine pour son ligand et il semble que dans la conformation active de l'intégrine les deux segments transmembranaires soient éloignés l'un de l'autre (Kamata *et al.*, 2005). Ainsi la conformation du dimère est affectée par la présence de cations, l'interaction avec son ligand, des anticorps spécifiques mais elle peut également être modulée par interaction avec d'autres protéines (intracellulaires ou membranaires) ou des modifications post-traductionnelles.

c. Glycosylation

Les intégrines subissent des modifications post-traductionnelles et notamment des glycosylations. Il existe deux types principaux de glycanes selon le résidu sur lequel ils sont attachés de manière covalente : les O-glycanes sont liés à des sérines ou thréonines et les N-glycanes se fixent sur les asparagines au sein d'une séquence précise (Asn-X-Ser/Thr). Les oligosaccharides présents sur les intégrines sont essentiellement de type N-glycanes. La glycosylation de l'intégrine est nécessaire à la formation du dimère et à sa liaison avec la matrice. Dans le cas de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$, 35 structures oligosaccharidiques ont été identifiées : 10 neutres, 6 mono-sialyl, 10 di-sialyl, 7 tri-sialyl et 2 tetra-sialyl (Nakagawa *et al.*, 1996). Les sites de glycosylation situés sur le tonneau β de la sous-unité $\alpha 5$ sont très importants dans la fonction de l'intégrine et permettent son adressage à la membrane (Isaji *et al.*, 2006).

Les intermédiaires oligosaccharidiques sont synthétisés dans le réticulum endoplasmique par des glycosyl-transférases puis ces structures glucidiques sont greffées à la protéine par des oligosaccharyl-transférases dans le Golgi. La succession des enzymes requises lors de la glycosylation assure la maturation progressive de la protéine ainsi que sa fonctionnalisation. L'absence d'une seule de ces enzymes telle que la N-acétylglucosaminyltransférase V modifie les propriétés de toutes les molécules d'adhérence et conduit à une altération de la motilité cellulaire (HB Guo *et al.*, 2005). De manière similaire, les sialidases régulent l'adhérence cellulaire et modulent la signalisation médiée par les intégrines en jouant sur la phosphorylation de l'intégrine et de ses partenaires cytoplasmiques. La sialidase NEU3 se situe dans des microdomaines membranaires, elle promeut l'adhérence cellulaire à la laminine et contribue à la phosphorylation de FAK (focal adhesion kinase) et Shc par l'intégrine $\alpha 6 \beta 4$ ce qui active Erk et potentialise le signal de prolifération (Kato *et al.*, 2006).

Les oligosaccharides présents sur les intégrines sont indispensables à la localisation, la dimérisation, et la fonction du dimère. Ces modifications post-traductionnelles régulent également l'affinité pour le ligand et la signalisation intracellulaire.

2) Les intégrines, points d'ancrages des complexes de signalisation

Les intégrines ont une grande importance pour l'adhérence des cellules à leur matrice ou aux cellules adjacentes mais servent également de lien entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette. Les interactions du dimère avec les protéines du cytosquelette sont complexes et assurent la régulation de la fonction de l'intégrine (Hynes, 2002). Les intégrines constituent également un point d'ancrage de plateformes de signalisation impliquées dans de nombreux processus physiologiques et physiopathologiques tels que la différenciation cellulaire, la prolifération et la balance survie/apoptose. Cette famille de récepteurs assure donc deux types de signaux : « inside-out » afin d'adapter l'affinité de l'intégrine à son environnement sous le contrôle de stimulus intracellulaire et « outside-in » afin de réguler des processus intracellulaires après liaison de l'intégrine à sa matrice (Jones et Walker, 1999). Comme les intégrines ne possèdent pas d'activité enzymatique intrinsèque, elles recrutent différents partenaires enzymatiques pour transmettre un signal.

a. Partenaires cytoplasmiques

Le domaine cytoplasmique des intégrines joue un rôle central dans la signalisation bidirectionnelle et de nombreux partenaires cytoplasmiques ont été identifiés. Ces protéines interagissant avec la queue cytoplasmiques des sous-unités appartiennent à diverses familles : protéines se liant à l'actine, protéines de signalisation et d'autres protéines de structure (Liu *et al.*, 2000). Dans le cas de la sous-unité β il a été identifié 21 protéines interagissant avec son domaine intracellulaire (Tableau2). La taline et l' α -actinine assurent la liaison entre les intégrines et le cytosquelette d'actine. Ces deux protéines se lient à un motif de type NPXY très conservé. En plus des nombreuses protéines du cytosquelette interagissant avec la sous-unité β , ce domaine peut également recruter des protéines de signalisation telles que ILK (Integrin linked kinase) et FAK (Dedhar et Hannigan, 1996). La FAK se situe dans les points d'adhérence cellulaire et son activité tyrosine kinase est régulée par la liaison des intégrines à la matrice extracellulaire. Cette kinase est capable de recruter de nombreux partenaires cytoplasmiques impliqués dans des phénomènes divers : survie cellulaire, prolifération, migration, angiogenèse et invasion (van Nimwegen et van de Water, 2007). L'ILK est une sérine/thréonine kinase impliquée dans la régulation de l'adhérence, la survie cellulaire et la progression dans le cycle cellulaire.

| Partenaires cytoplasmiques | Intégrines |
|----------------------------|---|
| <i>Cytosquelette</i> | |
| Taline | β_{1A} , β_{1D} , β_2 , β_3 |
| α -actinine | β_{1A} , β_2 |
| Myosine | β_3 |
| Filamine | β_{1A} , β_2 , β_3 , β_7 |
| Skelémine | β_1 , β_3 |
| <i>Signalisation</i> | |
| ILK | β_1 , β_3 |
| FAK | β_1 , β_2 , β_3 |
| Cytohésines-1/3 | β_2 |
| <i>Autres protéines</i> | |
| Paxilline | β_1 , β_3 , α_4 |
| SHC | β_3 |
| Cavéoline-1 | α |
| Nischarine | α_5 |
| Grb2 | β_3 |
| Calréticuline | α |
| Rack1 | β_1 , β_2 , β_5 |
| Mélusine | β_{1A} , β_{1B} , β_{1D} |
| ICAP-1 | β_{1A} |
| Endonéxine- β_3 | β_3 |
| TAP-20 | β_5 |
| WAIT-1 | β_7 |
| JAB-1 | β_2 |
| MIBP | β_{1A} , β_{1D} |

Tableau 2 : Partenaires cytoplasmiques des différentes intégrines. (Adapté de Liu *et al.*, 2000).

Les partenaires cytoplasmiques interagissant avec la sous-unité α sont beaucoup moins nombreux. Cependant la partie cytoplasmique des intégrines α est très conservée et contient notamment une séquence KXGFFKR proche de la membrane ce qui suggère que cette sous-unité est importante pour la fonction des intégrines. Une protéine interagissant avec la sous-unité α est la cavéoline, protéine transmembranaire de 21kDa, composant principal des cavéoles (Park *et al.*, 2000). La cavéoline constitue une protéine d'échafaudage au sein de la membrane des cavéoles et interagit avec des protéines de signalisation cellulaire dont Fyn et Shc pour aboutir à l'activation de la voie des MAPkinases (Giancotti et Ruoslahti, 1999). Des membres de la famille des petites protéines G tels que Rho, Rac et Cdc42 semblent également être activés par les intégrines, elles modifient le cytosquelette d'actine en réponse à un stimulus externe (Juliano, 2002). Les intégrines, de part leur grande variété de partenaires cytoplasmiques, modulent tant des processus physiques (migration, invasion) que des voies purement intracellulaires (survie, prolifération). La complexité de cette signalisation est

accentuée par la capacité des intégrines à moduler des signaux médiés par d'autres récepteurs membranaires et inversement (Porter et Hogg, 1998 ; Juliano, 2002).

b. Partenaires membranaires

Les intégrines sont capables de former des complexes avec d'autres récepteurs membranaires et de recruter des protéines de signalisation au sein de ces sites d'interaction cellule-cellule ou cellule-matrice (Porter et Hogg, 1998). Les récepteurs membranaires interagissant avec les intégrines sont nombreux et variés (Tableau 3).

| Partenaires membranaires | Intégrines |
|--|--|
| <i>Protéine associée aux intégrines (IAP)</i> CD47 | $\alpha_V\beta_3$, $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_2\beta_1$ |
| <i>Tétraspandines</i> CD9, CD37, CD53, CD63, CD81, CD82, CD151/PETA, NAG-2 | $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_4\beta_7$ |
| <i>Récepteurs aux facteurs de croissance</i> Récepteur à l'insuline Récepteur au PDGF- β | $\alpha_V\beta_3$ $\alpha_V\beta_3$ |
| <i>Récepteurs GPI</i> uPAR (CD87) CD16B CD14/LPS/LBP CD98 | $\alpha_M\beta_2$, $\alpha_L\beta_2$, $\alpha_X\beta_2$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_V\beta_3$ $\alpha_M\beta_2$, $\alpha_L\beta_2$ $\alpha_M\beta_2$ Intégrines β_1 |
| <i>Autres</i> EMMPRIN/BASIGIN/OX47 M6/CD147 | $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$ |

Tableau 3 : Partenaires membranaires des différentes intégrines. (Adapté de Porter et Hogg, 1998).

L'IAP (integrin associated protein), protéine à 5 domaines transmembranaires, recrute les protéines G trimériques de type Gi suite à son interaction avec les intégrines (Juliano, 2002). En effet, le complexe intégrine-IAP comporte 7 domaines transmembranaires et possède donc les mêmes propriétés que les RCPG (récepteurs couplés aux protéines G). Certains récepteurs aux facteurs de croissance sont localisés dans les points d'adhérence cellulaire et leur interaction avec des intégrines activées est essentielle aux signaux prolifératifs médiés par ces récepteurs (Damsky et Ilic, 2002). La liaison de l'intégrine avec son ligand induit l'activation et l'autophosphorylation des récepteurs à activité tyrosine kinase (Juliano *et al.*, 2004). Le récepteur à urokinase (uPAR), protéine membranaire ancrée par GPI (glycosylphosphatidylinositol) s'associe aux intégrines β_1 , β_2 , β_3 et β_5 (Wei *et al.*, 2007) pour pouvoir induire un

signal. En effet ce récepteur est dépourvu de domaines transmembranaires et cytoplasmiques, il a donc besoin de partenaires pour jouer son rôle. La signalisation médiée par les intégrines est modulée de manière très fine par les différentes protéines (cytoplasmiques, membranaires, extracellulaires) avec lesquelles elles interagissent. De plus, l'agrégation des dimères d'intégrine dans les points focaux modifie également leur fonction (Gilcrease, 2006).

c. Signalisation « outside-in » et « inside-out »

Les intégrines constituent une machinerie bidirectionnelle et allostérique de signalisation cellulaire. La régulation de l'affinité de l'intégrine pour son ligand est régulée par un signal « inside-out » qui met en jeu des partenaires cytoplasmiques des intégrines. En se liant à la queue cytoplasmique, ces protéines induisent des changements de conformation qui modifient l'affinité du site de liaison de l'intégrine (Dedhar et Hannigan, 1996 ; Jones et Walker, 1999). La taline interagit avec la queue de la sous-unité β et induit une restructuration des domaines transmembranaires qui permet l'activation des intégrines. Certains motifs des domaines cytoplasmiques impliqués dans ces changements de conformation ont été identifiés et il semble qu'ils soient le siège de jeux de phosphorylation/déphosphorylation ou de réarrangements structurels. De petites protéines G sont également capables de réguler le signal « inside-out ».

Les interactions entre la cellule et la matrice extracellulaire modulent de nombreux processus intracellulaires tels que la survie, la différenciation, la prolifération et la migration cellulaire. Cette signalisation « outside-in » requiert une coopération entre les récepteurs aux facteurs de croissance et les protéines du cytosquelette (Dedhar et Hannigan, 1996). La fixation du ligand sur l'intégrine induit son activation et le recrutement de nombreux partenaires cytoplasmiques comprenant des kinases (FAK, Erk, PI3K), des petites protéines G et des protéines adaptatrices (Schwartz, 2001). La liaison de l'intégrine à son ligand entraîne des changements conformationnels au sein du domaine globulaire qui se propagent vers les domaines transmembranaires et les parties cytoplasmiques. Les intégrines diffusent le long de la membrane pour former des agrégats et permettre la création de complexes intracellulaires de signalisation liés au cytosquelette.

Le rôle majeur des intégrines dans la survie cellulaire en réponse aux facteurs de la matrice extracellulaire est accentué par la capacité des intégrines libres à induire une forme de mort cellulaire nommée IMD (integrin mediated death). En effet, dans certains types cellulaires (cellules endothéliales), l'absence de signaux de survie lorsque l'intégrine est libre aboutit à l'anoïkis. Les cellules tumorales sont résistantes à ce type de mort cellulaire induit par le

détachement des cellules mais dans ce cas les intégrines non liées à leur ligand de la matrice recrutent la caspase 8 pour induire l'apoptose (Stupack, 2005). Les intégrines constituent ainsi des récepteurs à dépendance car des cellules ont besoin d'adhérer à leur matrice pour survivre.

d. Plateforme de signalisation

Cette signalisation bidirectionnelle nécessite un assemblage dynamique et régulé de complexes multiprotéiques ancrés aux domaines cytoplasmiques des intégrines (Harburger et Calderwood, 2009). Geiger et al. ont décrit récemment l'adhésome des intégrines, un réseau de 156 protéines connectées par 690 interactions (Zaidel-Bar *et al.*, 2007). Les protéines sont rassemblées en groupes fonctionnels comprenant 25 protéines adaptatrices, 24 protéines du cytosquelette, 9 protéines se liant à l'actine, 10 sérine/thréonine kinases, 3 sérine/thréonine phosphatases, 9 tyrosine phosphatases, 8 tyrosine kinases, 8 GAP, 8 GEF, 7 récepteurs transmembranaires, 6 protéines d'adhérence, 5 GTPases et 32 autres protéines. Ce réseau met en évidence la complexité de la signalisation cellulaire induite ou modulée par les intégrines.

Le premier rôle des intégrines reste l'adhérence cellulaire et les points focaux d'adhérence représentent un exemple de réseau fonctionnel les impliquant (Figure 6). Ces structures contiennent jusqu'à 50 protéines cytoplasmiques regroupées en 3 classes : les protéines interagissant avec les intégrines, les protéines adaptatrices et les enzymes (Berrier et Yamada, 2007). La taline se lie directement à l'intégrine et régule son activation ainsi que sa signalisation. Les protéines adaptatrices font le lien entre les intégrines et l'actine ou d'autres composants du cytosquelette. Et les principales enzymes participant à ces complexes sont la FAK et Src, des tyrosine kinases impliquées dans l'assemblage des points focaux. La FAK est une kinase dont l'état de phosphorylation détermine son activation. C'est une cible de l'EGFR et du PDGFR et elle interagit avec Src pour activer la voie des MAPkinases.

Ces structures très complexes permettent de coupler la matrice extracellulaire et le cytosquelette et jouent donc un rôle fondamental dans la migration cellulaire. Cependant elles sont également capables de modeler la matrice extracellulaire en formant des adhésions fibrillaires le long desquelles la fibronectine polymérise (Pankov *et al.*, 2000). Les points focaux d'adhérence constituent des complexes dynamiques dont les fonctions s'étendent de la simple migration cellulaire à la régulation de la survie cellulaire, la prolifération et l'invasion (van Nimwegen et van de Water, 2007) en passant par la modulation de l'environnement extracellulaire. Les intégrines constituent la clé de voûte de cette signalisation bidirectionnelle permettant l'adaptation de la cellule à son environnement et inversement.

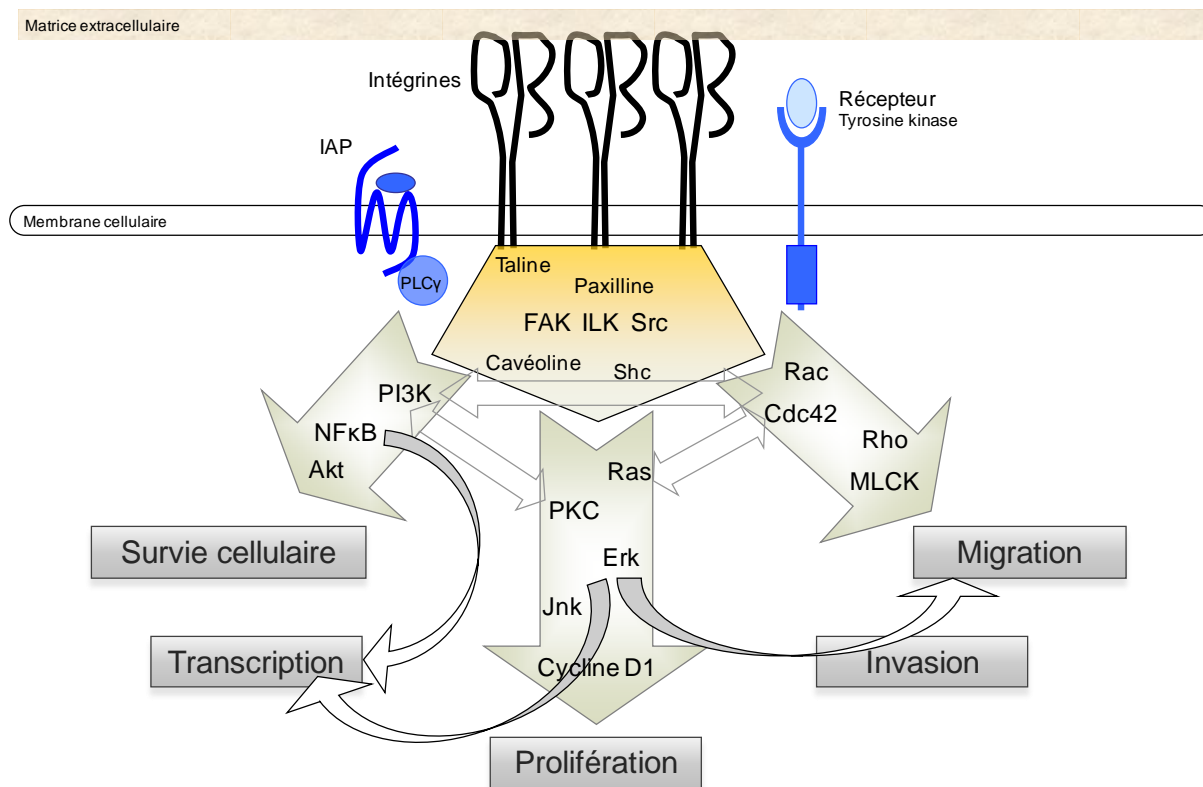


Figure 6 : Structure d'un point focal d'adhérence cellulaire. (Adapté de Hynes, 2002).

3) Rôles des intégrines dans le cancer

Le cancer est caractérisé par la multiplication incontrôlée d'une cellule aboutissant à la formation d'une tumeur. Les cellules tumorales prolifèrent de façon anarchique et perdent leur spécificité. De part leur large spectre d'actions intracellulaires, les intégrines peuvent être considérées comme des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeur. En effet, elles participent à toutes les étapes de la tumorigenèse : de la transformation tumorale à la propagation par métastases. De nombreux types de tumeurs présentent un panel d'expression d'intégrines différent du tissu sain et la fonction de celles-ci est également modulée au cours de la transformation tumorale (Hehlhans *et al.*, 2007). Ainsi les intégrines semblent constituer une cible thérapeutique potentielle dans le traitement des tumeurs.

a. Les intégrines dans la transformation et la progression tumorale

La transformation tumorale se caractérise par la désorganisation du cytosquelette, une perte d'adhérence et une modification des réponses liées à l'attachement cellulaire. En analysant les modifications du panel d'intégrines exprimées dans le tissu sain et la tumeur on a remarqué que les intégrines participaient soit positivement soit négativement au phénotype de transformation tumorale. Certains fibroblastes transformés présentent une modification de

l'expression d'intégrines se liant à la fibronectine et bien d'autres modifications d'expression d'intégrines ont été observées dans des cellules malignes (Tableau 4).

| | | Hétérodimères d'intégrines | | | | | | | | | |
|---------------|---------------|----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Tissu tumoral | Stade tumoral | $\alpha 1\beta 1$ | $\alpha 2\beta 1$ | $\alpha 3\beta 1$ | $\alpha 4\beta 1$ | $\alpha 5\beta 1$ | $\alpha 6\beta 1$ | $\alpha V\beta 1$ | $\alpha V\beta 3$ | $\alpha 6\beta 4$ | $\alpha V\beta 5$ |
| Sein | Transformée | | ± | ± | | | ± | | | ± | |
| | Primaire | - | ± | ± | | | ± | - | - | ± | |
| | Métastase | + | ± | ± | | | | + | | ± | |
| Colon | Transformée | | | ± | | - | | | | | |
| | Primaire | - | - | ± | | - | ± | | - | | |
| | Métastase | | ± | | - | + | | | | + | |
| Rein | Transformée | | | | | | - | + | + | | + |
| | Primaire | | | + | | | ± | | | | |
| | Métastase | | ± | ± | | + | | ± | | | ± |
| Poumon | Transformée | - | + | + | | - | + | + | - | | + |
| | Primaire | | - | ± | | | - | ± | ± | | |
| | Métastase | | | + | | | | | | | |
| Mélanome | Transformée | | + | | | | | | | | |
| | Primaire | - | ± | + | | ± | - | | + | ± | |
| | Métastase | + | + | ± | ± | + | ± | | + | + | |
| Ovaire | Transformée | | | | | + | | - | | | |
| | Primaire | | | + | | - | | | | | |
| | Métastase | | | + | | - | | - | | | |
| Peau | Transformée | | | | | + | | | | + | + |
| | Primaire | | - | - | | - | - | | + | | |
| | Métastase | | + | + | - | | + | - | - | + | |

Tableau 4 : Détermination par immunohistochimie de l'expression des intégrines dans différentes tumeurs. (Adapté de Mizejewski, 1999).

Dans les carcinomes on note une désorganisation des intégrines à la surface cellulaire ce qui peut affecter l'affinité pour le ligand et modifier l'organisation de la membrane basale. Les mélanomes et les ostéosarcomes ont besoin d'intégrine $\alpha 2\beta 1$ afin de pouvoir réorganiser la matrice et former une tumeur. Il semble donc que les modifications de panel d'expression d'intégrines précèdent la formation de tumeur. Ainsi les intégrines constitueraient une cible potentielle dans le cadre d'une thérapie préventive visant à empêcher la transformation tumorale (Mizejewski, 1999).

Les intégrines étant des glycoprotéines, toute altération de leur structure glucidique influe sur leur fonction. L'hypersialylation des intégrines $\beta 1$ augmente la motilité des adénocarcinomes du colon et contribue ainsi à la progression tumorale (Seales *et al.*, 2005). Au cours de la

croissance tumorale de nombreuses modifications de l'expression des intégrines à la fois qualitatives et quantitatives sont observées. Certaines sont surexprimées, d'autres sont réprimées, d'autres encore sont phosphorylées ce qui affecte leur interaction avec les ligands extracellulaires et les partenaires cytoplasmiques. Il ne semble pas y avoir de règle précise pour la contribution d'une intégrine au phénotype tumoral, l'importance d'une intégrine dépend du type tumoral et de son stade. Les intégrines $\alpha 2\beta 1$ et $\alpha 3\beta 1$ sont présentes dans les fibroadénomes mais absentes dans les carcinomes mammaires. En général le gain ou la perte d'expression d'une intégrine semblent impliqués indirectement dans la transformation tumorale mais participe activement à la progression et à la formation de métastases.

b. Les intégrines dans la formation de métastases

La formation de métastases permet à la tumeur primaire de s'étendre à d'autres organes en utilisant la circulation sanguine ou lymphatique. L'entrée d'une cellule tumorale dans le vaisseau sanguin met en jeu des phénomènes de perte d'adhérence, de sécrétion de protéases pour dégrader la lame basale du capillaire et de migration à travers les parois du vaisseau (Figure 7). La matrice extracellulaire et les intégrines constituent des protéines clés dans ces processus car elles participent à l'invasion et à la migration cellulaire (Mizejewski, 1999).

La rupture des interactions cellule-cellule passe par une dérégulation des signaux induits par l'interaction entre les intégrines et les récepteurs aux facteurs de croissance. Les cadhérines font partie de la famille des protéines d'adhérence, elles sont fortement impliquées dans les liaisons intercellulaires. Les intégrines sont capables d'inhiber l'expression des cadhérines et donc de rompre les interactions cellule-cellule (W Guo et Giancotti, 2004). La FAK est un régulateur de la migration cellulaire, cette kinase phosphoryle les protéines des points focaux (p130Cas et paxilline) ce qui permet de recruter la protéine adaptatrice Crk et de former un complexe composé de tous les effecteurs nécessaires à la migration cellulaire (Parise *et al.*, 2000). La signalisation de la FAK recrute différents acteurs dont de la GTPase Rac qui, une fois activée aboutit à l'extension des lamellipodes, et Src qui induit le désassemblage des points focaux étape indispensable à la migration des cellules. Les intégrines peuvent également activer la cascade des kinases Erk et la kinase Jnk via l'activation de Shc ou FAK. Ces deux kinases régulent la migration cellulaire en phosphorylant des composants du cytosquelette mais aussi en modifiant l'expression de gènes (induction de AP-1).

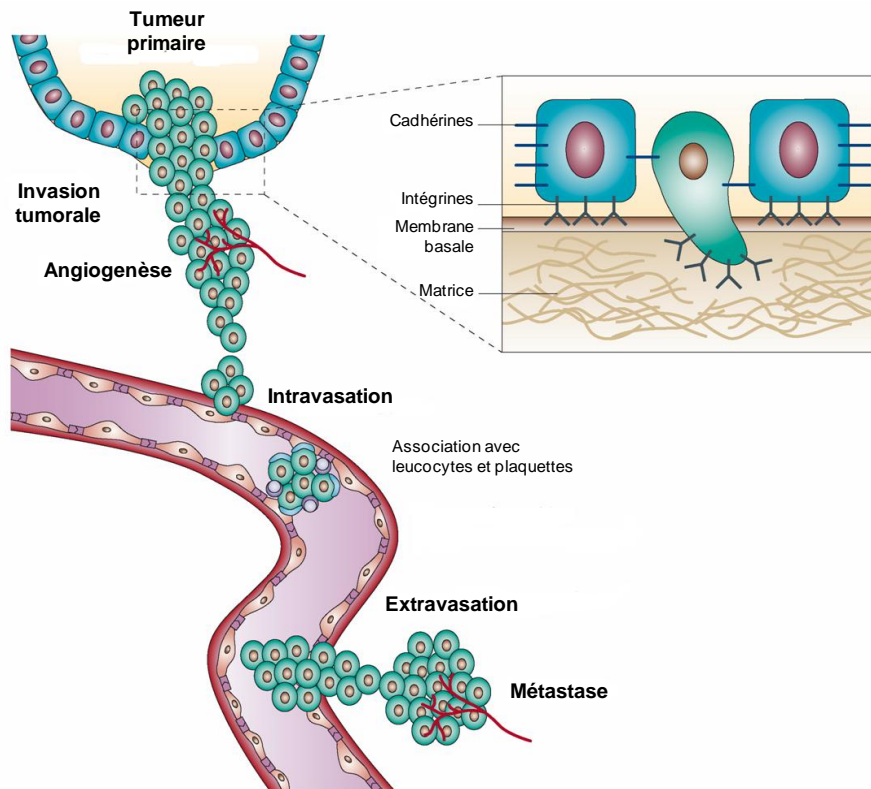


Figure 7 : La cascade métastatique. (Adapté de Guo et Giancotti, 2004).

La migration met en jeu de nombreux types de déplacements qui semblent être régulé par des voies différentes. En effet la FAK module le mouvement cellulaire dirigé et Shc promeut la motilité cellulaire aléatoire. Les GTPases de la famille Rho participent aux modifications du cytosquelette d'actine médiées par les intégrines. Cdc42 et Rac induisent la polymérisation des filaments d'actine et la formation de lamellipodes alors que Rho joue sur l'assemblage et la contraction des fibres d'actomyosine.

Lors de l'invasion tumorale une partie de la matrice extracellulaire doit être dégradée mais cette digestion fait l'objet de nombreuses régulations afin de permettre aux cellules de continuer à adhérer à la matrice tout en migrant au travers. Les MMP sont les principales protéases participant au remodelage de la matrice extracellulaire, elles sont synthétisées sous forme inactive et activées par clivage de leur domaine inhibiteur. Ces enzymes ont un substrat spécifique et sont régulées par des TIMPs (tissue inhibitor of MMP). Les intégrines interagissent avec les MMP et les activent soit de manière directe, soit en s'associant avec uPAR (Tang et Wei, 2008). La FAK peut également induire l'expression de MMP2 et MMP9 via l'activation de Jnk. Lors de la dégradation de la matrice, de nouveaux sites d'interaction avec les intégrines sont rendus accessibles ce qui permet aux cellules tumorales de progresser

et d'atteindre la paroi vasculaire. Les vaisseaux tumoraux présentent des jonctions cellulaires irrégulières ce qui facilite l'intravasation des cellules tumorales.

Une fois qu'elles ont pénétré dans le vaisseau sanguin, les cellules tumorales adhèrent aux plaquettes ou aux leucocytes pour former des caillots qui vont s'arrêter dans les microvaisseaux et permettre l'extravasation des métastases. Pour assurer son expansion la métastase recrute des nouveaux vaisseaux sanguins pour lui apporter les nutriments nécessaires, c'est l'angiogenèse tumorale.

c. Les intégrines dans l'angiogenèse tumorale

L'angiogenèse est un phénomène indispensable à la croissance tumorale, ce mécanisme est déclenché par la tumeur elle-même qui secrète des facteurs de croissance angiogéniques afin d'induire le développement d'un nouveau vaisseau sanguin. Il existe de nombreux modulateurs de l'angiogenèse (Ruegg *et al.*, 2006) : des récepteurs aux facteurs de croissance (VEGF), des molécules d'adhérence (intégrines, cadhérines), des composants de la matrice extracellulaire (fibronectine, collagène), des molécules de guidage (éphrines, nétrines, sémaphorines), des protéases (MMP, uPA), des molécules de signalisation (Raf, MAPkinases, PKA) et des facteurs de transcription (HIF, NFκB). Le VEGF et le bFGF sont des facteurs de croissance angiogéniques qui modulent l'expression et l'activation d'intégrines impliquées dans l'angiogenèse (W Guo et Giancotti, 2004). La croissance des capillaires est affectée par la composition de la matrice extracellulaire car celle-ci module la signalisation médiée par les intégrines. Certaines molécules inhibitrices de l'angiogenèse bloquent les intégrines et présentent des propriétés intéressantes dans des thérapies anti-cancéreuses.

Les cellules endothéliales expriment les intégrines $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 9\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$, $\alpha V\beta 3$ et $\alpha V\beta 5$ (Avraamides *et al.*, 2008). Des études *in vivo* par délétions de gène mettent en avant une importance de ces différentes intégrines dans l'angiogenèse (Tableau 5). D'un point de vue historique, les intégrines $\alpha V\beta 3$ et $\alpha V\beta 5$ ont été les premières impliquées dans l'angiogenèse, elles se lient à la fibronectine et à la vitronectine et sont fortement exprimées dans les néovaisseaux tumoraux. Leur expression est régulée par des facteurs angiogéniques et leur inhibition par des antagonistes induit une diminution de la croissance tumorale due à une baisse de l'angiogenèse. L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et son ligand la fibronectine sont surexprimés dans les vaisseaux tumoraux. Les antagonistes de $\alpha 5\beta 1$ bloquent l'angiogenèse et la croissance tumorale (Serini *et al.*, 2006).

| Intégrine | Type cellulaire | Ligand | Phénotype murin |
|-------------------|--------------------------------|---|---|
| $\alpha 1\beta 1$ | CEV, CEL | Collagène, laminine | Itga1 ^{-/-} développement vasculaire normal ; angiogenèse réduite chez l'adulte |
| $\alpha 2\beta 1$ | CEV, CEL | Collagène, laminine, $\alpha 3\beta 1$ | Itga2 ^{-/-} développement vasculaire normal ; angiogenèse tumorale amplifiée chez l'adulte |
| $\alpha 4\beta 1$ | CEV, CEL, monocyte, macrophage | Fibronectine, VCAM1 | Itga4 ^{-/-} léthal au stade embryonnaire ; 50% meurent à E9.5-10.5 de défaut de fusion de la membrane chorion-allantoïde ; 50% meurent à E11.5 de défauts cardiovasculaires |
| $\alpha 5\beta 1$ | CEV, CEL | Fibronectine, L1-CAM | Itga5 ^{-/-} léthal au stade embryonnaire E10-11 ; défauts de vaisseaux embryonnaires et du sac vitellin ; défauts des somites postérieurs |
| $\alpha 6\beta 1$ | CEV | Laminine, mérosine, kalinine | Itga6 ^{-/-} léthal au stade embryonnaire ; défauts de l'épiderme ; pas de défauts vasculaires |
| $\alpha 9\beta 1$ | CEV, CEL | Ténascine, fibronectine, thrombospondine, VCAM, collagène, laminine | Itga9 ^{-/-} léthal en post-natal P8-12 ; défauts lymphatiques (chylothorax) |
| $\alpha M\beta 2$ | Monocyte, macrophage | ICAM1, iC3b, fibrinogène | Itgam ^{-/-} développement normal ; effets sur l'angiogenèse tumorale inconnus |
| $\alpha V\beta 3$ | CEV, CEL | Fibronectine, vitronectine, vWF, thrombospondine, ténascine, DEL1, ostéopontine | Itgav ^{-/-} 80% léthal au stade embryonnaire E9.5 ; 20% meurent à P0 d'hémorragies cérébrales Itgb3 ^{-/-} 50% léthal au stade embryonnaire ou post-natal précoce ; angiogenèse amplifiée chez l'adulte |
| $\alpha V\beta 5$ | CEV, CEL | Vitronectine, ostéopontine, DEL1 | Itgav ^{-/-} 80% léthal au stade embryonnaire E9.5 ; 20% meurent à P0 d'hémorragies cérébrales Itgb5 ^{-/-} développement normal ; angiogenèse réduite chez l'adulte |
| $\alpha V\beta 8$ | Cellule gliale | Collagène, laminine, fibronectine | Itgb8 ^{-/-} vaisseaux sanguins cérébraux discontinus |
| $\alpha 6\beta 4$ | CEV | Laminine 5 | Itgb4 ^{-/-} développement vasculaire normal mais défauts d'épiderme léthaux |

CEV, cellule endothéliale vasculaire ; CEL, cellule endothéliale lymphatique ; E, jour embryonnaire ; P, jour post-natal ; vWF, von Willebrand factor

Tableau 5 : Les intégrines dans l'angiogenèse et la lymphangiogenèse. (Adapté de Avraamides, 2008).

Les intégrines constituent une bonne cible pour le développement de thérapies anti-cancéreuses. L'utilisation d'antagonistes des intégrines en association ou non avec des agents chimiothérapeutiques a donné des résultats prometteurs dans des études précliniques pour le traitement du cancer. D'autre part les intégrines constituent une voie de développement de ligands marqués permettant un suivi et une analyse par imagerie de la tumeur. Elles permettent également l'administration ciblée d'agents chimiothérapeutiques en servant de protéine d'adressage pour des liposomes.

d. Les intégrines et l'apoptose

La balance entre la prolifération et la mort cellulaire contrôle la croissance tumorale et cette balance est fortement régulée par les intégrines. L'adhérence cellulaire médiée par les intégrines module l'apoptose soit en inhibant des voies pro-apoptotiques soit en les activant. La PI3K et son effecteur Akt sont activés par des récepteurs à activité tyrosine kinase en réponse à la liaison de l'intégrine à la matrice extracellulaire. La sérine/thréonine kinase Akt, une fois activée, peut phosphoryler de nombreux substrats tels que la caspase 9 (ce qui inhibe son activité protéasique) et FKHR (ce qui diminue son activité transcriptionnelle). L'activation de Akt réduit l'expression de gènes apoptotiques et inhibe l'activation de protéines pro-apoptotiques (Parise *et al.*, 2000). L'intégrine liée à la matrice induit donc des signaux de survie cellulaire en activant des voies passant par Akt, Erk ou Jnk.

Par opposition, dans les cellules endothéliales et épithéliales détachées de leur matrice on a montré une forme d'apoptose nommée anoïkis. Cette mort cellulaire semble être un phénomène passif provoqué par l'absence de signaux de survie médiés par les intégrines (Stupack, 2005). De nombreuses kinases et phosphatases sont impliquées dans la régulation de l'anoïkis. L'ILK active Akt et sa surexpression supprime l'anoïkis dans les cellules épithéliales (Frisch et Screaton, 2001). Ce phénomène est sous l'influence de nombreuses autres protéines telles que Jnk, les récepteurs à activité tyrosine kinase et les composants du cytosquelette. Bien que cette forme de mort cellulaire assure la cohésion tissulaire, il a été montré que l'activation de certains oncogènes (Ras) rendait les cellules résistantes à l'anoïkis en empêchant l'inhibition de la protéine anti-apoptotique Bcl-X_L.

Les intégrines ont besoin d'un ligand immobilisé pour créer un couplage mécanique avec le cytosquelette et ainsi promouvoir la survie cellulaire. Les ligands solubles et les antagonistes des intégrines sont incapables d'induire des signaux de survie et au contraire ils activent des signaux de mort cellulaire de manière directe ou en inhibant les signaux de survie. Il a été montré que les intégrines $\alpha V\beta 3$ et $\beta 1$ non liées ou antagonisées recrutent la caspase 8 et

induisent une forme de mort cellulaire nommée IMD (Integrin Mediated Death) dans des cellules attachées à la matrice. Cette forme d'apoptose semble associée à une complexation des intégrines à la surface, recrutant ainsi la caspase 8 (Stupack *et al.*, 2001 ; Cheresh et Stupack, 2002 ; Zhao *et al.*, 2005). De plus les peptides RGD recrutent directement la caspase 3 quand ils interagissent avec l'intégrine (Buckley *et al.*, 1999). Ainsi les intégrines, de part leur engagement ou non avec la matrice extracellulaire, régulent de manière fine la balance survie/apoptose (Figure 8). Ceci constitue un mécanisme important dans la modulation de la progression tumorale, en particulier dans l'invasion et la formation de métastases.

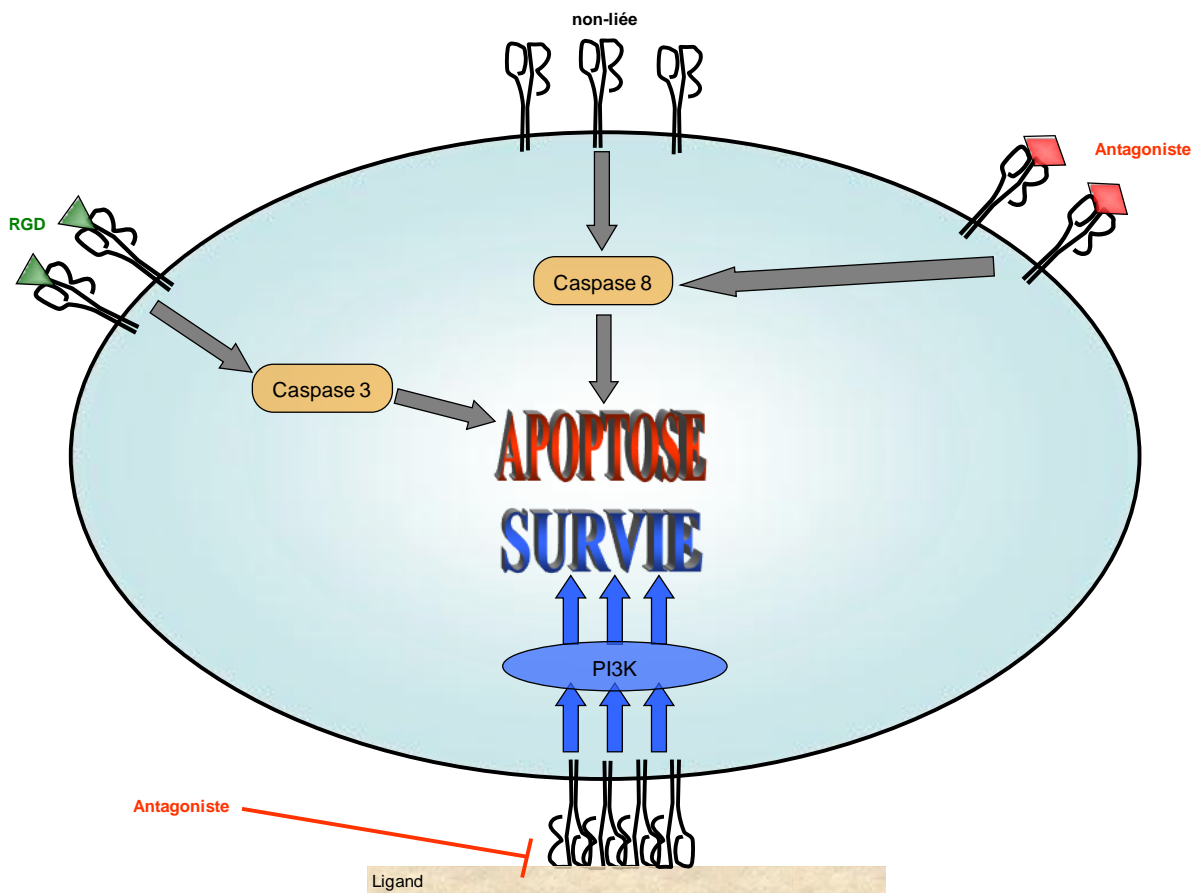


Figure 8 : Mort cellulaire induite par les intégrines.
Integrin mediated death. (Adapté de Hynes, 2002).

4) Adhérence cellulaire et résistance

De nombreuses études comparant l'effet de traitements sur des cellules en suspension ou attachées mettent en évidence des différences de sensibilité qui semblent liées à l'expression de protéines de l'adhérence cellulaire (Stein *et al.*, 2005). Par exemple, des lymphomes traités par l'étoposide (inhibiteur topoisomérase II) répondent différemment selon leur

environnement : 20% d'apoptose dans un milieu activant le CD40 et l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ et 85% d'apoptose en suspension (Taylor *et al.*, 2000). Cette forme de résistance aux thérapies liée au microenvironnement cellulaire est appelée CAM-DR (Cell Adhesion Mediated Drug Resistance) ou CAM-RR (Cell Adhesion Mediated Radio Resistance), il s'agit d'un mécanisme épigénétique procurant à la cellule une moindre sensibilité aux thérapies en la protégeant de l'apoptose.

a. Interactions cellule-cellule

Le stroma se compose d'une population cellulaire hétérogène contenant des fibroblastes, des péricytes, des cellules souches mésenchymateuses et des cellules hématopoïétiques. Les cellules stromales constituent une niche protectrice et assurent la croissance et la progression tumorale en favorisant l'angiogenèse tumorale et en réduisant les réactions immunitaires. Dans le cas des leucémies chroniques, les cellules stromales de la moelle osseuse jouent une action protectrice contre l'apoptose induite par la fludarabine (cytotoxique antimétabolite) en induisant l'expression de protéines de survie (Bcl-2, Mcl-1) dans les cellules leucémiques (Balakrishnan *et al.*, 2009). Les cellules cancéreuses du colon utilisent le microenvironnement formé par les composants de la matrice stromale pour se développer et métastaser. La matrice stromale confère aux carcinomes du colon une résistance à la camptothecin et à l'étoposide car elle influe sur l'expression de protéines anti-apoptotiques (famille Bcl-2) en réponse aux agents cytotoxiques (Kouniavsky *et al.*, 2002).

Il existe un paradoxe dans la résistance acquise par les tumeurs ; les cellules issues de tumeurs résistantes se révèlent souvent sensibles lorsqu'elles sont cultivées *in vitro* en monocouche. Cette différence de sensibilité peut être résolue en cultivant les cellules en sphéroïdes. Le mécanisme de résistance de ces sphéroïdes est lié aux interactions cellule-cellule et à leur capacité de moduler la réponse apoptotique. Les protéines intervenant dans la cohésion des sphéroïdes sont les intégrines, les cadhérines, les jonctions intercellulaires et d'autres protéines membranaires (Bates *et al.*, 2000). Les cellules HT29 en suspension se regroupent pour former des sphéroïdes et interagissent principalement par la cadhérine-E. La sensibilité de ces sphéroïdes aux agents cytotoxiques est réduite (Frankel *et al.*, 1997). L'ajout d'un anticorps dirigé contre la cadhérine-E désagrège les sphéroïdes et prolonge la survie des souris portant des xénogreffes de tumeur du colon (Green *et al.*, 2002). De tels traitements rompant l'adhérence cellulaire permettent de réduire le potentiel métastatique des tumeurs mais aussi d'augmenter la sensibilité aux thérapies.

b. Importance de la matrice extracellulaire

Les différents composants de la matrice extracellulaire peuvent être sécrétés par les cellules tumorales elles-mêmes. Ces ligands assurent à la fois la croissance tumorale et la résistance des cellules à certaines thérapies. Les cellules tumorales du poumon sont moins sensibles aux chimiothérapies lorsqu'elles adhèrent à la laminine, la fibronectine ou le collagène. Les protéines intervenant dans l'acquisition de cette résistance en inhibant l'apoptose sont les intégrines et les récepteurs à activité tyrosine kinase (Sethi *et al.*, 1999). Les myélomes adhérant à la fibronectine survivent mieux à la doxorubicine et leur taux d'apoptose après traitement est réduit. Cette résistance ne met pas en jeu l'expression de protéines anti-apoptotiques ni l'accumulation intracellulaire de la drogue car ces paramètres sont inchangés. Mais la quantité d'intégrine exprimée dans les cellules résistantes est plus élevée que dans les cellules sensibles (Damiano *et al.*, 1999).

La sensibilité cellulaire aux différentes thérapies est régulée à la fois au niveau extracellulaire et au niveau intracellulaire. Les traitements anti-cancéreux induisent des modifications du taux de protéines sécrété et de leur nature, des modulations d'expression de protéines intracellulaires et de protéines membranaires. De plus il semble que les cellules tumorales soient capables de combiner différents mécanismes de résistance selon leur environnement. Lorsque la matrice est favorable c'est elle qui assure les signaux de résistance et en absence de ligand les cellules se regroupent en sphéroïdes afin de multiplier les interactions cellulaires et d'assurer une protection contre l'apoptose (Westhoff *et al.*, 2008). Malgré la grande diversité de moyens disponibles pour protéger la cellule de la mort cellulaire induite par les thérapies anti-cancéreuses il se dégage une famille de protéines particulièrement impliquée dans ce processus : les intégrines.

c. Intégrines et mécanismes de résistance

Les phénomènes de résistance sont souvent attribués aux intégrines qui sont capables de bloquer des signaux de mort dans les cellules cancéreuses.

L'inhibition de l'intégrine $\alpha V\beta 3$ par un peptide cyclique le S247 permet d'augmenter l'efficacité des radiations. La radiothérapie affecte aussi bien les cellules tumorales que les cellules endothéliales. L'expression de l'intégrine $\alpha V\beta 3$ augmente après traitement dans les cellules endothéliales. La combinaison d'une radiothérapie et d'un antagoniste de l'intégrine réduit la prolifération et la migration des cellules endothéliales ainsi que la clonogénicité de cellules cancéreuses et la croissance tumorale *in vivo*. Cet effet est lié à une inhibition de la vascularisation et une baisse de la prolifération des cellules tumorales. L'intégrine promeut la

survie des cellules endothéliales en activant la voie PI3K/Akt. Le S247 est capable d'inhiber cette activation afin d'augmenter la réponse apoptotique (Abdollahi *et al.*, 2005).

Les myélomes adhérant à la fibronectine sont moins sensibles à la doxorubicine (inhibiteur topoisomérase II) et ceci grâce à l'inhibition de la réponse apoptotique. Après traitement ces myélomes expriment plus d'intégrine $\alpha 4\beta 1$ et adhèrent plus à la fibronectine (Damiano *et al.*, 1999). De manière identique, les lymphomes U937 exposés à la mitoxanthrone (agent alkylant de l'ADN et inhibiteur de topoisomérase II) présentent une résistance en présence de fibronectine liée à une moindre induction de ruptures double-brins dans l'ADN. Dans ce modèle l'adhérence à la fibronectine entraîne une réduction de l'expression de la topoisomérase II et une modification de sa localisation qui corrèle avec la baisse de sensibilité des cellules (Hazlehurst *et al.*, 2001 ; Hazlehurst *et al.*, 2006).

Différents partenaires cytoplasmiques ont été identifiés dans la résistance induite par les intégrines, on peut citer les membres de la famille Bcl-2, Akt et les inhibiteurs de CDK (p21, p27). Les gliomes D54 et U251 traités par le topotecan (inhibiteur topoisomérase I) sont moins apoptotiques sur vitronectine que sur fibronectine. Cette différence de sensibilité selon le substrat est due à l'interaction de l'intégrine $\alpha V\beta 5$ avec la vitronectine. En effet l'ajout d'un anticorps dirigé contre cette intégrine protège les cellules de l'apoptose induite par le topotecan et inversement en présence d'un antagoniste de $\alpha V\beta 5$ les cellules meurent par apoptose. L'adhérence cellulaire à la vitronectine entraîne une augmentation de l'expression de deux protéines anti-apoptotiques : Bcl-2 et Bcl-X_L (Uhm *et al.*, 1999).

La protection assurée par l'engagement des intégrines avec les composants de la matrice extracellulaire ne présente pas de règle précise. Tout dépend des agents cytotoxiques, du type cellulaire, des intégrines engagées avec la matrice et des composants de la matrice. Même si les données suggèrent que la résistance est liée à l'engagement des intégrines avec leur ligand, il est possible que la seule sur-expression des intégrines suite aux traitements contribue au phénomène de résistance.

C) L'INTEGRINE $\alpha 5 \beta 1$ EN TANT QUE CIBLE THERAPEUTIQUE DANS LES GLIOMES

1) Importance de l'intégrine $\alpha V \beta 3$

L'intégrine $\alpha V \beta 3$ constitue historiquement l'intégrine la plus étudiée et celle pour laquelle le plus d'antagonistes ont été développés. Cette intégrine est régulée tout au long du développement tumoral. Elle joue un rôle important dans l'angiogenèse, l'apoptose et la transduction du signal.

a. Angiogenèse

L'intégrine $\alpha V \beta 3$ est exprimée à un niveau faible dans les vaisseaux existants mais surexprimée dans les cellules endothéliales au cours de l'angiogenèse tumorale ou après stimulation par des facteurs de croissance (Varner et Cheresh, 1996). Le bFGF est capable d'augmenter le taux d'expression de la sous-unité $\beta 3$ dans des cellules endothéliales *in vitro* et dans des modèles d'angiogenèse *in vivo*. Les ligands de l'intégrine $\alpha V \beta 3$ sont la vitronectine et la fibronectine. Au cours de l'angiogenèse les cellules endothéliales adhèrent à leur matrice ce qui induit une augmentation de la réponse au VEGF car l'intégrine s'associe au VEGFR. Ce complexe requiert l'activation du récepteur à activité tyrosine kinase par son ligand pour pouvoir recruter la PI3K et Src. Le VEGFR active Src qui phosphoryle alors le domaine cytoplasmique de l'intégrine $\beta 3$ et la rend active (Serini *et al.*, 2008). Mais ces mécanismes d'activation sont encore peu explorés et il subsiste des doutes quant à la voie impliquée. Le VEGFR peut activer directement la PI3K ou passer par l'intermédiaire de Ras (Serini *et al.*, 2006). De plus les récepteurs à activité tyrosine kinase sont capables d'activer la PLC γ qui va ensuite activer Ras et la PI3K peut également activer ILK qui va ensuite recruter des protéines du cytosquelette pour activer l'intégrine. Le signal inside-out régissant l'activation de l'intégrine par des facteurs angiogéniques semble complexe.

Une autre classe de molécules intervient dans cette régulation, les sémaphorines. Ces facteurs répulsifs inhibent la fonction des intégrines en intervenant dans la voie Ras. La Sema3A se lie au complexe Nrp-1/plexinA1 induisant la dissociation de FARP2, un GEF. FARP2 va ainsi pouvoir jouer son rôle de facteur d'échange des guanosines et favoriser Rac sous sa forme GTP. Cette protéine va à son tour faciliter la liaison de la petite protéine G Rnd1 à la plexinA1 et induire son activité R-Ras GAP. La protéine Ras est alors inactivée ce qui va induire l'inhibition de l'intégrine.

Il a également été montré que les intégrines $\alpha V \beta 3$ présentes sur les cellules endothéliales induisaient une forme de mort cellulaire lorsqu'elles n'étaient pas liées à la matrice. C'est

l'anoïkis, phénomène passif dû à l'absence de signaux de survie médiés par PI3K. Une autre forme de mort cellulaire, active, peut être induite par les intégrines $\alpha V\beta 3$ non liées en recrutant la caspase 8, c'est l'IMD (Hodivala-Dilke *et al.*, 2003). Les intégrines $\alpha V\beta 3$ ont un rôle bivalent dans la promotion de l'angiogenèse et cette complexité est accentuée par les nombreuses protéines interagissant avec ces intégrines $\alpha V\beta 3$ pour aboutir à des signaux pro-angiogéniques ou anti-angiogéniques (Figure 9). Parmi elles on note des antagonistes endogènes tels que la thrombospondine et l'angiostatine mais aussi des agonistes contenant pour la plupart un site de liaison RGD.

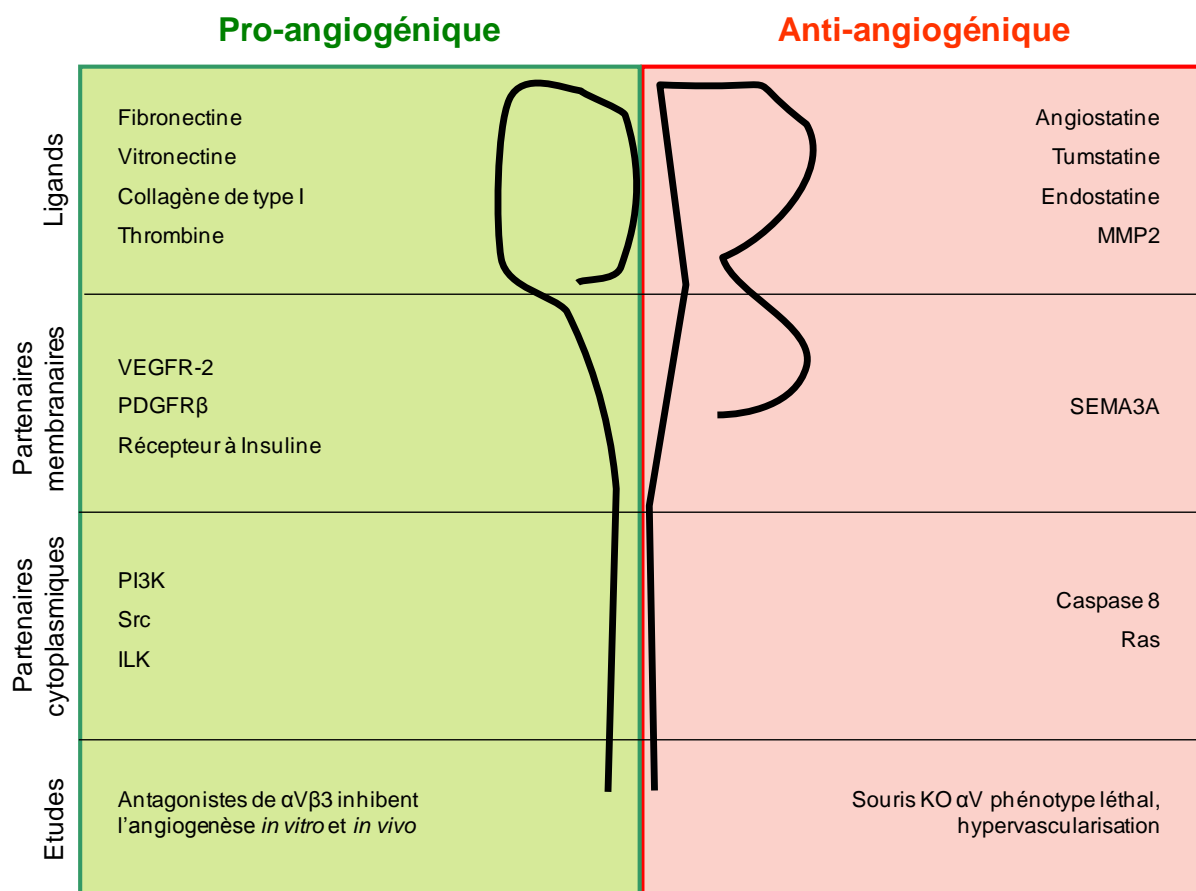


Figure 9 : Rôle bivalent de l'intégrine $\alpha V\beta 3$ dans l'angiogenèse.

Des études *in vivo* menées sur des souris délétées pour la sous-unité αV ont démontrées une mortalité de 100% des embryons mais un développement angiogénique normal jusqu'à E9.5. Par la suite des défauts placentaires apparaissent puis des hémorragies. La délétion de la sous-unité $\beta 3$ n'a pas d'effet sur la vasculogenèse mais induit une augmentation de la croissance et de l'angiogenèse tumorale et une surexpression du VEGFR sur les cellules endothéliales (Mahabeleshwar *et al.*, 2006). Ces deux résultats nous laissent penser que l'intégrine $\alpha V\beta 3$ se

comporte comme un régulateur négatif de l'angiogenèse alors qu'elle est exprimée sur les néovaisseaux. L'application d'antagonistes de $\alpha V\beta 3$ inhibe l'angiogenèse dans des modèles *in vitro* et *in vivo*. Le LM609, un anticorps bloquant la fonction de l'intégrine, a fait l'objet d'essais cliniques dans des thérapies cancéreuses et a démontré son potentiel. Le rôle exact de l'intégrine $\alpha V\beta 3$ dans l'angiogenèse se révèle très ambigu et son potentiel dans les traitements anti-cancéreux fait l'objet de nombreuses interrogations.

b. Surexpression dans les tumeurs

Les glioblastomes, gliomes les plus agressifs, présentent une forte prolifération des cellules endothéliales ainsi qu'une importante vascularisation. L'intégrine $\alpha V\beta 3$ est exprimée dans les microvaisseaux irriguant la tumeur et se révèle inexistante dans le cerveau (Schnell *et al.*, 2008). Cependant son expression au sein de la tumeur ne semble pas limitée aux cellules endothéliales, elle est exprimée dans les cellules tumorales invasives où elle colocalise avec la MMP2. En étudiant le taux d'intégrine $\alpha V\beta 3$ avec le degré de malignité des gliomes, on note une expression corrélée avec le grade tumoral. En effet, les glioblastomes expriment un taux plus élevé d'intégrine $\alpha V\beta 3$ que les astrocytomes de bas grade. La présence de cette intégrine dans environ 30% des glioblastomes semble conférer à ce type de tumeur une agressivité plus importante. L'intégrine module la perméabilité vasculaire grâce à son interaction avec le VEGFR. Son implication dans la migration cellulaire est importante car elle peut se lier à un grand nombre de composants de la matrice extracellulaire (vitronectine, fibronectine, laminine, collagène, etc.). La motilité et la migration cellulaire dépendent de la séquence NPXY de la partie cytoplasmique de $\beta 3$. Dans des mélanocytes exprimant une sous-unité $\beta 3$ mutée dans cette séquence on observe une incapacité des cellules à s'étaler et à migrer sur la vitronectine (Filardo *et al.*, 1995).

c. Antagonistes et essais cliniques

Les premiers antagonistes de l'intégrine $\alpha V\beta 3$ ont été développés en tant qu'agents anti-angiogéniques en exploitant l'anoïkis des cellules endothéliales mais cette stratégie a vite été élargie à d'autres pathologies et en particulier le cancer (Huveneers *et al.*, 2007). La séquence RGD est un point essentiel de l'interaction de l'intégrine avec son ligand c'est pourquoi elle constitue le point de départ pour le développement de nombreux antagonistes (Figure 10).

Divers peptides, linéaires et cycliques, ont été testés mais leur grande taille et leur instabilité métabolique limitent leurs applications cliniques. Le Cilengitide (EMD121974), pentapeptide cyclique antagoniste de $\alpha V\beta 3$ et $\alpha V\beta 5$, inhibe l'angiogenèse tumorale dans un modèle de

membranes d'œufs embryonnés de poules contenant des fragments de gliomes et la croissance tumorale dans un modèle orthotopique de gliomes (MacDonald *et al.*, 2001). Par contre dans un modèle hétérotopique ce peptide se révèle incapable d'inhiber la croissance tumorale.

Des petites molécules non peptidiques ont également été développées comme antagonistes de l'intégrine $\alpha V\beta 3$. Le S247 est un peptidomimétique antagoniste des intégrines $\alpha V\beta 3$ et $\alpha V\beta 5$, inhibant l'adhérence des cellules à la vitronectine. En évaluant le potentiel thérapeutique de cette molécule dans un modèle murin de métastases de cancer du foie, on observe une diminution du nombre de métastases et une augmentation du temps de survie. De plus de nombreuses cellules apoptotiques sont présentes dans les cellules métastasées et dans les cellules endothéliales. La vascularisation de la tumeur est inhibée sous l'action du S247. Ce composé inhibe la clonogénicité et la migration de cellules endothéliales *in vitro*. Bien que cette molécule présente des résultats encourageants, l'utilisation d'une thérapie anti-angiogénique semble se restreindre à inhiber la croissance tumorale plutôt qu'à induire une régression de la tumeur (Reinmuth *et al.*, 2003).

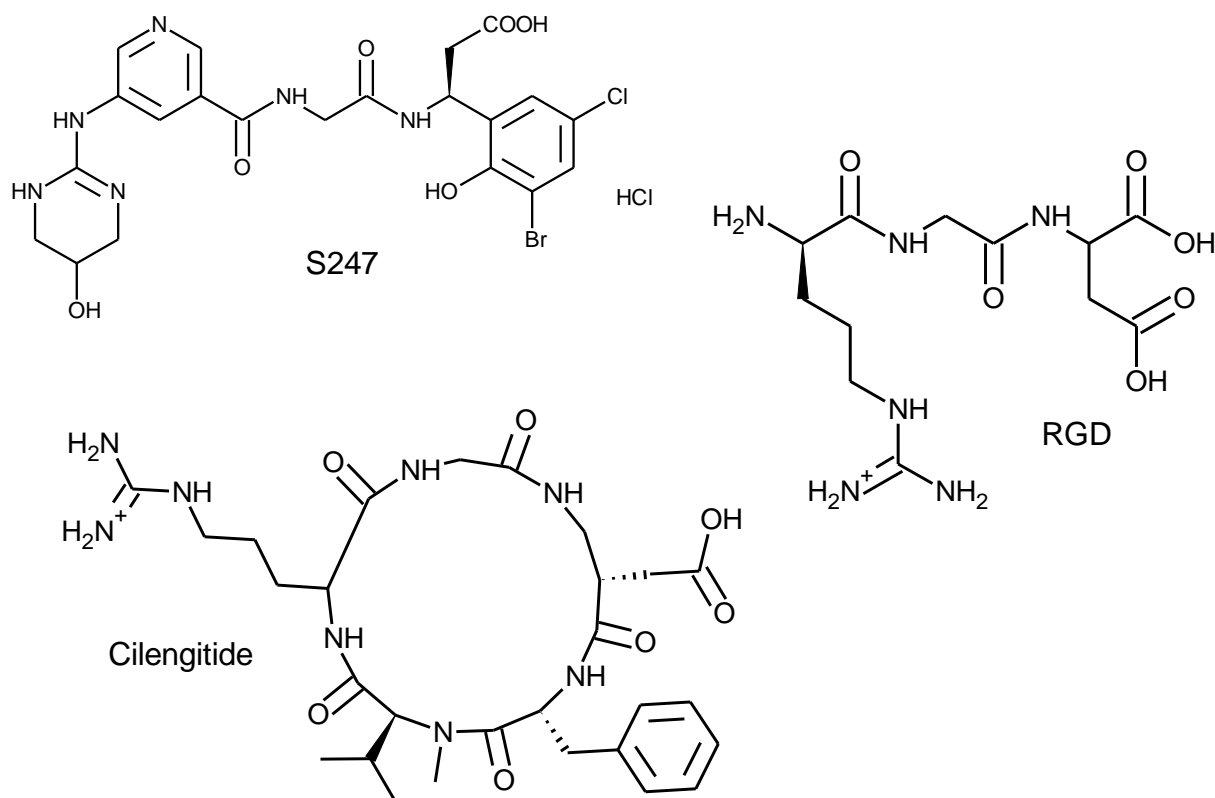


Figure 10 : Antagonistes de l'intégrine $\alpha V\beta 3$.

RGD et Cilengitide sont des peptides. S247 est une petite molécule non-peptidique.

Une autre façon d'antagoniser la fonction de l'intégrine consiste à la bloquer par un anticorps spécifique. Le 7E3 est un anticorps monoclonal dirigé contre les intégrines $\alpha V\beta 3$ et $\alpha IIb\beta 3$, il inhibe l'agrégation plaquettaire et l'adhérence cellulaire à la vitronectine. L'Abciximab est dérivé de cet anticorps, il est approuvé dans le traitement préventif des risques d'ischémie après intervention coronarienne. Après injection de cet anticorps dans un modèle murin de mélanome on note une réduction significative de la croissance tumorale (60% de diminution de masse) ainsi qu'une diminution du nombre de vaisseaux sanguins. Les mélanomes utilisés dans cette étude n'exprimant pas d'intégrine $\alpha V\beta 3$ il semble que les effets observés soient uniquement lié aux effets du 7E3 sur l'angiogenèse (Varner *et al.*, 1999).

Cette thérapie ciblée uniquement sur l'intégrine $\alpha V\beta 3$ présente des limites dans les thérapies cancéreuses lorsque la tumeur n'exprime pas l'intégrine. Il serait avantageux de coupler un antagoniste de l'intégrine avec une autre thérapie soit un agent chimiothérapeutique ou une autre molécule ciblée. En couplant un inhibiteur du VEGFR (SU5416) à un antagoniste de $\alpha V\beta 3$ (EMD270179) on aboutit à une diminution de la densité vasculaire, une perte de volume de la tumeur et une absence totale de métastases dans un modèle murin de développement tumoral (Varner *et al.*, 1999).

De nombreux essais cliniques portant sur une association entre un antagoniste de l'intégrine $\alpha V\beta 3$ et d'autres molécules utilisées en cancérologie sont en cours pour démontrer le potentiel de l'intégrine $\alpha V\beta 3$ dans le développement tumoral et apporter des thérapies adaptées à chaque tumeur (Tableau 6).

| Antagoniste (type) | Phase clinique | Type tumoral |
|------------------------------|----------------|------------------------------------|
| MEDI-522, Vitaxin | II | Mélanome métastatique |
| (anticorps humanisé, LM609) | II | Cancer de la prostate métastatique |
| | II | Carcinome colorectal |
| CNT095 (anticorps humain) | I | Cancers réfractaires avancés |
| EMD121974, Cilengitide | II | Mélanome métastatique |
| (peptide, cRGDF-MeV) | II | Cancer de la prostate métastatique |
| | II | Cancer du pancréas |
| | II | Cancer du poumon |
| | II | Glioblastomes |

Tableau 6 : Les antagonistes de l'intégrine $\alpha V\beta 3$ en phases cliniques dans le traitement du cancer. (Adapté de Avraamides, 2008).

L'anticorps humanisé dérivé du LM609, MEDI-522, dirigé contre l'intégrine $\alpha V\beta 3$ présente une amélioration du temps de survie dans une étude de phase II portant sur des mélanomes métastatiques. Le Cilengitide, peptide ciblant les intégrines $\alpha V\beta 3$ et $\alpha V\beta 5$, a démontré son efficacité en phase I/IIa : augmentation de survie sans progression pour des glioblastomes (Nabors *et al.*, 2007). Ces résultats encourageants ont déclenché le lancement d'une série d'essais portant sur différentes tumeurs dont un essai de phase III pour les glioblastomes.

2) Une nouvelle cible thérapeutique : l'intégrine $\alpha 5\beta 1$

Malgré les résultats encourageants obtenus en ciblant l'intégrine $\alpha V\beta 3$ dans les glioblastomes, son caractère bivalent dans l'angiogenèse pose de nombreux problèmes de spécificité et de pronostic. Dans cette optique l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ semble constituer une meilleure cible.

a. Rôle dans l'angiogenèse

Les études *in vivo* menées sur des souris délétées pour l'intégrine $\beta 1$ démontrent un rôle essentiel de cette intégrine dans l'angiogenèse. En effet, le phénotype est léthal au stade embryonnaire (E9.5-10.5) à cause d'un déficit d'implantation *in utero*. Les cellules souches $\beta 1^{-/-}$ sont capables de se différencier en cellules endothéliales mais leur organisation en vaisseaux est ralentie (Avraamides *et al.*, 2008). Les mêmes études sur l'intégrine $\alpha 5$ présentent également un phénotype léthal au stade embryonnaire lié à des défauts du sac vitellin, de la vascularisation et des somites postérieurs. Les cellules souches $\alpha 5^{-/-}$ prolifèrent moins, meurent par apoptose et l'angiogenèse tumorale est diminuée. Ainsi l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ joue un rôle clé dans l'angiogenèse et la vasculogenèse.

On note également que l'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ est faible sur les vaisseaux sanguins existants mais augmente au cours de l'angiogenèse tumorale. Son expression est régulée par des facteurs angiogéniques tels que bFGF, l'interleukine-8 et le TNF- α mais pas par le VEGF (Kim *et al.*, 2000a). Il semble que cette régulation se fasse au niveau transcriptionnel (Boudreau et Varner, 2004), le facteur de transcription Hox D3 induit l'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ en réponse au bFGF. Hox D3 est exprimé dans l'endothélium vasculaire et induit la transcription de gènes tels que la cycline D1, uPA et l'intégrine $\alpha V\beta 3$.

L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ participe aux mécanismes d'angiogenèse et plus particulièrement à l'angiogenèse tumorale. Dans ce cadre elle constitue une meilleure cible que $\alpha V\beta 3$.

b. Signalisation

Les intégrines et plus particulièrement l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ participent à la régulation de nombreux processus physiologiques et pathologiques. La fibronectine étant le ligand spécifique de cette intégrine et la sous-unité $\alpha 5$ ne s'associant qu'à $\beta 1$, les protéines recrutées par l'intégrine après son activation devraient être peu nombreuses et bien caractérisées. Or il n'en est rien, de nombreuses zones d'ombre persistent sur la transmission du signal et celle-ci semble dépendre du type cellulaire. Vu la complexité et la diversité des voies de signalisation activées par l'intégrine $\alpha 5$ je vous présenterai une liste non exhaustive des partenaires recrutés : PI3K, FAK, ILK et PKA.

La principale voie de survie passe par l'activation de PI3K/Akt qui phosphoryle tout un panel de protéines impliquées dans de nombreux processus. La PI3K est un hétérodimère constitué d'une sous-unité catalytique et d'une sous-unité régulatrice. Les différentes isoformes de cette kinase considérée comme un oncogène phosphorylent le phosphatidylinositol-4,5-diphosphate (PIP2) en phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3) qui agit comme un second messager lipidique essentiel à la translocation de Akt vers la membrane. Cette kinase, une fois phosphorylée et activée, va se libérer de la membrane et phosphoryler ces différentes protéines cibles. Dans des lignées de cancer du colon on a observé qu'en bloquant l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ on diminuait la phosphorylation de Akt et on augmentait l'apoptose (Murillo *et al.*, 2004). Ainsi l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ active la voie PI3K et phosphoryle Akt pour induire des signaux de survie (Lee et Juliano, 2000).

La FAK, kinase majeure des points d'adhérence, possède de nombreux sites de phosphorylation qui servent de point d'ancrage pour d'autres protéines de signalisation intervenant dans des processus variés. La liaison de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ à la fibronectine dans des fibrosarcomes induit la phosphorylation de la FAK sur la tyrosine 397 (Wei *et al.*, 2007). La même activation est obtenue après liaison d'un peptide RGD sur l'intégrine. La FAK peut activer Akt, les MAPkinases ou les petites protéines G mais peut également moduler la signalisation induite par les récepteurs aux facteurs de croissance (Matter et Ruoslahti, 2001 ; Cascone *et al.*, 2005 ; Gibson *et al.*, 2005).

L'angiopoïétine-2 induit la migration et l'invasion de cellules de cancer mammaire en activant la voie $\alpha 5\beta 1$ /ILK/Akt/GSK3 β /Snail (Imanishi *et al.*, 2007). La liaison de l'angiopoïétine-2 à l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ active ILK qui va phosphoryler Akt sur la sérine 473 et GSK3 β sur la sérine 9. Akt ainsi activé stimule la transcription de Snail, il en est de même pour GSK3 β qui se retrouve dans sa forme inactive après phosphorylation. Le taux intracellulaire de Snail augmente, le facteur de transcription peut alors réprimer le gène de la

cadhérine-E. Snail est un marqueur de la progression tumorale et de l'invasion principalement par son action sur l'expression de la cadhérine-E. Dans cette voie l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ agit comme un potentialisateur de l'agressivité tumorale.

Les signaux de survie médiée par l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ impliquent également la modulation de la voie apoptotique. L'adhérence des cellules CHO à la fibronectine entraîne la surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2. Le blocage de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ par un anticorps induit une augmentation de l'apoptose. Dans ces mêmes cellules, les intégrines $\alpha V\beta 1$ et $\alpha V\beta 3$ ne stimulent pas la voie de survie (Zhang *et al.*, 1995). On sait également que l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ non-liée ou antagonisée recrute la PKA et induit des signaux de mort cellulaire dans les cellules endothéliales (Kim *et al.*, 2000b). Dans le cas des cellules cancéreuses, les intégrines non liées sont capables d'activer la voie des caspases pour induire de l'IMD. Ce recrutement semble associé aux sous-unités $\beta 1$ et $\beta 3$ et plus particulièrement à un domaine proche de la membrane sur lequel se fixe la caspase 8 (Stupack *et al.*, 2001).

Cette petite revue des voies impliquées dans la signalisation $\alpha 5\beta 1$ montre bien le large spectre d'action de l'intégrine. Sa signalisation dépend du type cellulaire ainsi que de son environnement. Il s'agit d'une protéine connectant les protéines cytoplasmiques, le cytosquelette et la matrice extracellulaire. Ce réseau fonctionnel fait de l'intégrine un point de régulation central dans les différents processus clés de la progression tumorale et de l'angiogenèse.

c. Surexpression dans les tumeurs

L'importance de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans la régulation de la prolifération des cellules tumorales a été démontrée dans plusieurs types cellulaires surexprimant cette intégrine. Les ostéosarcomes MG63 et les cellules érythroleucémiques K562 adhérant le mieux à la fibronectine expriment cinq fois plus d'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et présentent une réduction de leur tumorigénicité (Symington, 1990 ; Varner et Cheresch, 1996). Cette relation inverse entre le taux d'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et la tumorigénicité a également été montrée dans les cellules CHO et les HT29. Cependant cette diminution de prolifération est abolie par la présence de fibronectine. L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ aurait donc un effet inhibiteur de la prolifération lorsqu'elle est non liée. Bien que les Caco-2 surexprimant $\alpha 5$ ne présentent pas de modification de la prolifération en conditions adhérentes (car elles produisent de la fibronectine), l'intégrine a un effet délétère sur la prolifération en conditions non-adhérentes comme pour les HT29 (Kuwada et Li, 2000). Des résultats opposés ont été obtenus dans des lignées de cancer du colon, en présence d'un anticorps bloquant de l'intégrine, ces cellules

réduisent leur activation de PI3K et meurent par apoptose (Murillo *et al.*, 2004). Dans des fibroblastes, en inhibant l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ on obtient également une diminution de prolifération (Davey *et al.*, 1999). De plus, le récepteur à activité tyrosine kinase ERBB2 est capable d'induire l'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ en activant le facteur de transcription HIF dans des carcinomes du sein. Ces cellules adhèrent plus à la fibronectine et présentent une prolifération exacerbée sur fibronectine ainsi qu'une résistance à des conditions de stress telles que l'hypoxie, la déplétion en sérum et les traitements chimiothérapeutiques (Spangenberg *et al.*, 2006).

L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ semble avoir un rôle important dans la prolifération et la tumorigénicité mais celui-ci dépend du type cellulaire étudié. Alors que l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ ne semble pas exprimée dans le cerveau (Paulus *et al.*, 1993), elle l'est dans les tumeurs cérébrales (Figure 11) et plus particulièrement les glioblastomes (Kita *et al.*, 2001 ; Mattern *et al.*, 2005) où elle se trouve au cœur d'un réseau complexe de signalisation (Bredel *et al.*, 2005). La fibronectine est également exprimée dans les tumeurs cérébrales (Oz *et al.*, 2000).

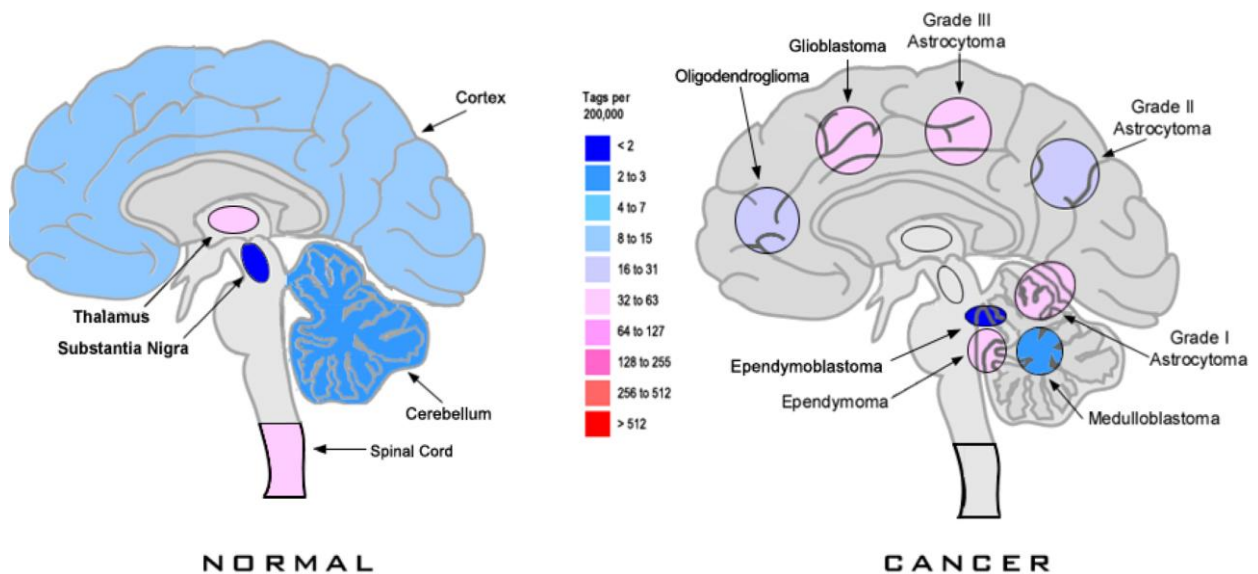


Figure 11 : Expression de l'intégrine $\alpha 5$ dans le cerveau et les tumeurs cérébrales (cgap.nci.nih.gov).

Ainsi l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ est surexprimée dans les tumeurs cérébrales et exprimée lors de l'angiogenèse tumorale, elle constitue donc une cible potentielle dans le traitement des tumeurs cérébrales. De plus, elle régule la balance survie/apoptose et la prolifération, participe

à l'adhérence, la migration et l'invasion mais elle intervient aussi dans la formation de métastases, l'angiogénèse et la croissance tumorale.

3) Les antagonistes de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$

Les antagonistes des intégrines se divisent en trois catégories : les anticorps, les peptides et peptidomimétiques et les petites molécules non-peptidiques. Bien qu'ils aient tous été développés en se basant sur leur capacité à inhiber l'adhérence cellulaire à la fibronectine, ils n'interagissent pas forcément tous avec le site de liaison. Afin de modifier l'affinité de l'intégrine pour son ligand, la molécule peut agir de manière compétitive en se fixant directement sur le site de liaison ou de manière non-compétitive en se fixant sur un autre site pour induire des changements de conformation.

a. Les anticorps

A ce jour un seul anticorps dirigé contre l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ a fait l'objet d'essais cliniques, il s'agit du Volociximab (M200). Le Volociximab est un anticorps humanisé dérivé de l'anticorps monoclonal IIA1 (PDL BioPharma) qui reconnaît uniquement l'intégrine $\alpha 5$ humaine et présente une affinité de l'ordre du nanomolaire (Bhaskar *et al.*, 2007). L'anticorps IIA1 inhibe l'adhérence cellulaire à la fibronectine, l'invasion et la prolifération de cellules cancéreuses ovariennes (Sawada *et al.*, 2008). Dans un modèle murin de tumeur orthotopique on note une inhibition de la formation de métastases, une baisse de la croissance tumorale et une augmentation de la médiane de survie.

Le Volociximab a été testé essentiellement dans l'angiogénèse. Il inhibe la prolifération des cellules endothéliales, empêche la formation de vaisseaux induite par le VEGF et le bFGF *in vitro* et induit l'apoptose des cellules endothéliales actives. La seule étude menée sur des cellules cancéreuses démontre l'efficacité *in vivo* du Volociximab chez le lapin. La masse tumorale de carcinomes est réduite par l'administration de Volociximab. L'anticorps inhibe également la vascularisation de la tumeur (Bhaskar *et al.*, 2008).

b. Les peptides et peptidomimétiques

Les intégrines $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha V\beta 3$ interagissent avec la fibronectine par deux sites principaux : la séquence de liaison RGD et le site synergique PHSRN (Mould *et al.*, 1997). Les antagonistes basés sur la séquence RGD sont les plus fréquents mais ils ne sont pas spécifiques de

l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ car cette séquence est également reconnue par les intégrines $\alpha V\beta 3/\alpha V\beta 5$, $\alpha IIb\beta 3$ et $\alpha 4\beta 1$. Il est possible de cibler de manière sélective une intégrine reconnaissant le peptide RGD en jouant sur les différences entre les sites de liaison des différentes intégrines. Récemment il a été publié un lipopeptide RGDK capable de lier sélectivement l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ (Pramanik *et al.*, 2008). La lysine située juste après la séquence RGD apporte la sélectivité pour le site de liaison de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. Ce lipopeptide forme des liposomes qui vont permettre le transport de gènes vers les cellules exprimant l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. En administrant un complexe composé d'un gène anti-cancéreux et du lipopeptide RGDK à des souris inoculées par des tumeurs agressives B16F1 (mélanomes) on observe une diminution de la croissance tumorale due à une inhibition de la vascularisation tumorale. Cette approche semble efficace pour inhiber l'angiogenèse tumorale de manière ciblée et peut également permettre l'observation de la vascularisation de la tumeur.

L'antagoniste ATN-161 (Attenuon LLC, San Diego, CA) a fait l'objet d'essais cliniques de phase I/II dans le traitement de tumeurs solides (Cianfrocca *et al.*, 2006). Il s'agit d'un pentapeptide Ac-PHSCN-NH₂ dérivé du site synergique de la fibronectine (Khalili *et al.*, 2006). Ce ligand de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ inhibe fortement l'invasion de cellules cancéreuses de prostate et est capable de réduire la croissance de tumeurs chez le rat. L'effet de cet antagoniste se matérialise par une diminution de la densité des vaisseaux sanguins et une baisse du nombre de métastases (Livant *et al.*, 2000). Le même type d'étude menée sur un modèle murin de cancer de la prostate démontre également le potentiel anti-métastatique du peptide Ac-PHSCN-NH₂ en association avec un composé anti-angiogénique, le tétramolybdate (van Golen *et al.*, 2002). L'ATN-161 semble efficace dans le traitement d'un certain nombre de tumeurs et présente des effets synergiques avec des agents chimiothérapeutiques (Stoeltzing *et al.*, 2003). Cependant il a été montré récemment qu'il interagit aussi avec les intégrines $\alpha V\beta 3$ et $\alpha V\beta 5$.

En plus, de ces antagonistes synthétiques, il existe des désintégrines, peptides issus du venin de serpent, contenant une séquence RGD et riches en ponts disulfures, capables de se lier aux intégrines avec une grande affinité. La contortrostatine appartient aux désintégrines, elle est composée de deux sous-unités identiques contenant une séquence RGD. Elle se lie aux intégrines $\alpha IIb\beta 3$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha V\beta 3$ et $\alpha V\beta 5$ et inhibe l'adhérence cellulaire à la fibronectine et à la vitronectine. La contortrostatine inhibe l'invasion, l'angiogenèse et la progression tumorale *in vivo* (Schmitmeier *et al.*, 2005). Les inconvénients majeurs de ces peptides pour une utilisation thérapeutique sont leur instabilité, leur manque de spécificité et leur faible biodisponibilité. La caractérisation du site de liaison de l'intégrine $\alpha V\beta 3$ et son extrapolation

à celle de $\alpha 5\beta 1$ permettent d'optimiser la sélectivité des ligands en fonction de l'encombrement stérique ou des interactions possibles avec les différents résidus (Marinelli *et al.*, 2005 ; Heckmann *et al.*, 2007).

c. Les petites molécules non-peptidiques

La première molécule non-peptidique décrite comme antagoniste de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ est le SJ749 (Figure 12). Bien que mimant la séquence RGD, cette petite molécule constituée d'un squelette spirocyclique possède les contraintes conformationnelles nécessaires à sa sélectivité pour $\alpha 5\beta 1$ plutôt que $\alpha IIb\beta 3$ ou $\alpha V\beta 3$ (Smallheer *et al.*, 2004). Le SJ749 présente une CI50 de 1.8nmol/L pour l'interaction entre l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et la fibronectine, de 1 μ mol/L pour $\alpha V\beta 3$ et la vitronectine et supérieure à 10 μ mol/L pour $\alpha IIb\beta 3$ et le fibrinogène. Les premiers travaux sur cette molécule démontrent son aptitude à inhiber l'adhérence cellulaire à la fibronectine et l'invasion streptococcale (Cue *et al.*, 2000). Le SJ749 inhibe la migration des cellules endothéliales (Kim *et al.*, 2000b) et l'adhérence de cellules tumorales (Kim *et al.*, 2000a). Cet antagoniste bloque l'angiogenèse induite par le bFGF mais pas par le VEGF dans un modèle d'œufs embryonnés de poules. Lorsque des cellules tumorales (HT29) sont injectées dans la membrane chorioallantoïque, le SJ749 est capable de réduire la taille des tumeurs de 50%. Les cellules HT29 n'exprimant pas d'intégrine $\alpha 5\beta 1$ cet effet est dû à l'action du SJ749 sur les cellules endothéliales.

Récemment deux autres molécules non-peptidiques spécifiques de $\alpha 5\beta 1$ ont été décrites : le JSM6427 (Jerini AG Pharma, Berlin, Allemagne) et une molécule synthétisée par l'équipe du Pr Horst Kessler (Heckmann *et al.*, 2008), nommée K34c. Le JSM6427 induit de l'apoptose dans des cellules endothéliales *in vitro* et *in vivo* et inhibe la vascularisation *in vivo*. Cet antagoniste réduit la prolifération des cellules endothéliales lymphatiques et sanguines et provoque le détachement d'une partie d'entre elles *in vitro*. Il inhibe également la lymphangiogenèse *in vivo* (Dietrich *et al.*, 2007). La molécule K34c n'a pas encore fait l'objet d'études biologiques, seule son affinité pour l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ est connue (CI50=3.1nM pour $\alpha 5\beta 1$ et 1624nM pour $\alpha V\beta 3$).

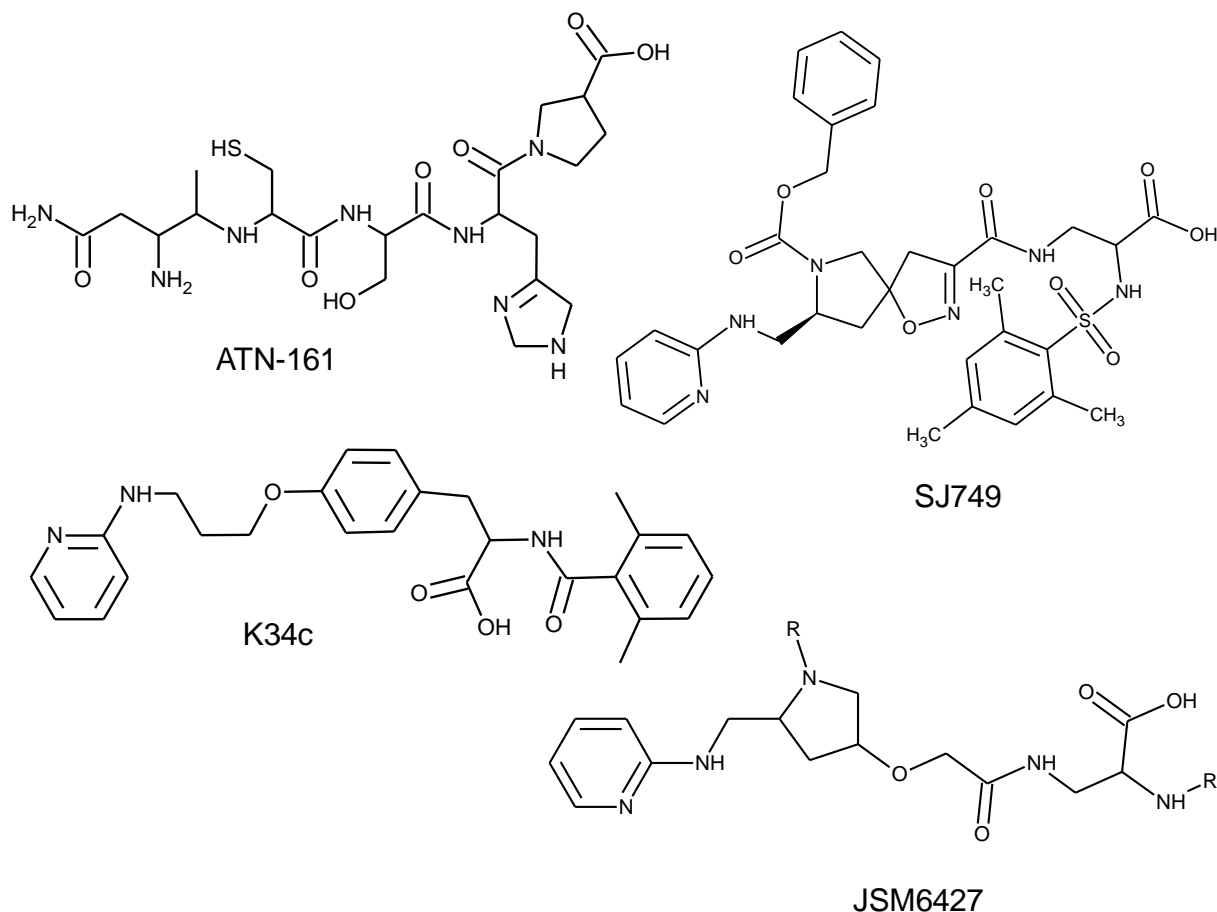


Figure 12 : Antagonistes de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$.

ATN-161 est un peptide mimant la séquence synergique de la fibronectine. SJ749, JSM6427 et K34c sont des petites molécules non-peptidiques.

Les antagonistes présentés ci-dessus sont tous capables d'inhiber l'adhérence cellulaire mais leurs effets sur la signalisation de l'intégrine n'ont pas fait l'objet d'études approfondies. Certains peptides RGD sont antagonistes de l'adhérence mais agonistes de la signalisation et d'autres ont des effets opposés selon la dose utilisée (Tucker, 2002). Dans le cadre d'une thérapie anti-cancéreuse il serait avantageux qu'un antagoniste de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ réduise l'angiogenèse par anoïkis des cellules endothéliales et joue sur la croissance tumorale en inhibant les signaux de prolifération médiés par l'intégrine au sein des cellules cancéreuses (Bello *et al.*, 2004). Cette hypothèse s'applique particulièrement bien aux glioblastomes dans lesquels l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ est surexprimée dans la tumeur et présente sur les néovaisseaux l'irriguant.

d. L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans les essais cliniques

Dans la plupart des cancers on se dirige vers des plurithérapies associant un agent chimiothérapeutique classique ou une radiothérapie à une molécule plus ciblée. Les antagonistes des intégrines entrent bien dans ce type de stratégie car leur action sur l'angiogenèse en fait un bon complément. D'autre part, la cancérogenèse nécessite une modification de l'expression des molécules d'adhérence et de l'architecture tissulaire et l'invasion tumorale et la migration des cellules (Lafrenie *et al.*, 2007). Ces étapes clés de la progression tumorale font toutes appels aux intégrines, c'est pourquoi des antagonistes de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ sont utilisés en clinique dans le traitement de différents cancers.

Le Volociximab est l'antagoniste de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ le plus exploité dans les essais cliniques. Il fait l'objet d'une étude de phase II en monothérapie dans le traitement de cancers ovariens avancés résistant aux sels de platine, d'une étude de phase II en combinaison avec l'Erlotinib (un inhibiteur de l'activité tyrosine kinase du VEGFR) dans le cancer du poumon et d'une étude de phase I/II en association ou non avec la Doxorubicine dans les cancers ovariens avancés et les cancers du péritoine.

Le peptide ATN-161 quant à lui est actuellement en phase I/II en combinaison avec le carboplatine pour le traitement de tumeurs cérébrales. La petite molécule JSM6427 a trouvé une autre application que le cancer en faisant l'objet d'une phase I dans la dégénérescence maculaire liée à l'âge.

L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ peut également servir de cible pour l'administration de drogues contenues dans des liposomes se liant spécifiquement. Quelques molécules ont déjà été développées, un peptide RGD couplé au Paclitaxel et un autre à la Doxorubicine. Les premiers résultats obtenus mettent en évidence une augmentation de la survie et une inhibition de la progression tumorale (Dunehoo *et al.*, 2006).

OBJECTIFS

Au cours de ce travail de thèse nous nous sommes intéressés au rôle de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans les tumeurs cérébrales. Cette intégrine est exprimée lors de l'angiogenèse tumorale et amplifiée dans les glioblastomes. Nous proposons cette protéine comme cible pour le traitement de ces tumeurs particulièrement agressives et résistantes.

Afin de confirmer notre hypothèse de travail nous avons choisi trois lignées de glioblastomes humains possédant des propriétés agressives différentes : les cellules A172, U87MG et U373.

Les objectifs principaux de ce travail sont les suivants :

- caractériser l'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans les lignées de glioblastomes et mettre en relation son niveau d'expression avec la tumorigénicité,
- démontrer le potentiel thérapeutique de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans le cadre d'une thérapie ciblée en utilisant divers antagonistes,
- explorer l'implication de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans les phénomènes de résistance.

PARTIE II : PARTIE EXPERIMENTALE

PARTIE II : PARTIE EXPERIMENTALE

1) Modèles d'étude

Toutes les études ont été réalisées *in vitro*.

a. Modèles cellulaires

Nous avons utilisé trois lignées de glioblastomes : les cellules A172 et U87MG ont été obtenues de l'ATCC et les cellules U373 de l'ECACC. Les cellules sont cultivées en milieu Eagle's MEM complété de 10% de sérum fœtal de veau, 0.6mg/ml de glutamine, 200IU/ml de pénicilline, 0.2mg/ml de streptomycine et 0.1mg/ml de gentamicine dans un incubateur à 37°C avec 5% CO₂.

b. Transfection

Les cellules sont placées en plaque 6 puits dans un milieu ne contenant pas d'antibiotique 24h avant transfection. La transfection est réalisée par 1µg de plasmide et 10µl de Lipofectamine 2000 (Sigma). Le milieu de culture est remplacé par du milieu contenant l'antibiotique de sélection le lendemain afin d'obtenir des lignées stables.

La sous-unité $\alpha 5$ humaine extraite du plasmide pECE- $\alpha 5$ fourni par le Dr Ruoslahti (La Jolla, CA) a été clonée dans un plasmide pcDNA3.1 (Invitrogen) entre les sites XbaI et NotI. Ce plasmide $\alpha 5$ pcDNA comporte une séquence de résistance à la généticine G418. Le plasmide codant pour la sous-unité $\beta 1$ humaine est un don du Dr Humphries (Manchester), il s'agit d'un plasmide $\beta 1$ pIRES portant un gène de résistance à l'hygromycine.

Les constructions plasmidiques permettant la répression de la sous-unité $\alpha 5$ et son contrôle ont été obtenus chez OpenBiosystems. Il s'agit de plasmides codant pour des shRNA ne possédant pas de séquence cible (NS1) ou un shRNA interagissant avec le gène de l'intégrine $\alpha 5$ ($\alpha 5$ pSM2). Ces plasmides sont transfectés grâce à l'Arrest-In dans un milieu Optimem. La sélection s'effectue par la puromycine.

c. Clonage

Après sélection de la population de cellules transfectée par le plasmide, les cellules sont récupérées et comptées. Une dilution en cascade est réalisée jusqu'à obtention d'une solution contenant une cellule dans 200µl. Cette solution est distribuée dans des plaques 96 puits qui sont ensuite placées à l'incubateur. Par observation des puits nous sélectionnons ceux contenant un seul clone et les amplifions. Le criblage des clones ainsi sélectionnés est réalisé par analyse de l'expression de l'intégrine par western blot ou cytométrie en flux.

d. Anticorps

Les anticorps contre les parties cytoplasmiques de $\alpha 5$ et $\beta 1$, AB1928 et AB1952 respectivement proviennent de Chemicon International. Les anticorps dirigés contre la partie extracellulaire du dimère d'intégrine nous ont été offerts par les Drs E Georges-Labouesse (IGBMC, Illkirch) [TS2/16], M Humphries (Manchester) [snaka51] et D Vestweber (Freiburg) [9EG7]. Les autres anticorps utilisés sont : anti-p53 (BD Pharmingen), anti-p21 (Santa Cruz) et anti-GAPDH (Millipore).

2) Antagonistes de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$

a. SJ749

La molécule SJ749 ((S)-2-[(2,4,6-triméthylphényl)-sulfonyl] amino-3-[[7-benzyloxycarbonyl-8-(2-pyridinylaminométhyl)-1-oxa-2,7-diazaspiro-(4,4)-non-2-èn-3-yl]-carbonylamino]-propionic acid) a été synthétisée comme décrit dans le brevet WO 97/33887 par le Dr P Klotz. La solution mère est réalisée à 10mM dans un mélange 50/50 méthanol/eau.

b. K34c

L'antagoniste nommé K34c (2-(S)-(2,6-diméthylbenzamido)-3-(4-[3-(pyridin-2-ylamino)propoxy]phenyl) propionic acid) décrit par le Dr H Kessler dans sa dernière publication a été synthétisé par le Dr D Bonnet (UMR7200 CNRS). La solution mère à 10mM est réalisée dans du DMSO.

c. Molécules criblées *in silico*

Le criblage *in silico* d'une banque de molécules commerciales par calcul de similarité avec la conformation du SJ749 dans la poche de liaison de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ a été réalisé par le Dr D Rognan (UMR7200 CNRS) : six molécules ont été sélectionnées. Parmi ces molécules seules trois ont présentées une activité inhibitrice de l'adhérence des cellules U87MG à la fibronectine : PHA166880, PHA180496 et CDI387887. Les solutions mères à 10mM sont réalisées dans du DMSO.

3) Adhérence

Les expériences d'adhérence cellulaire sont effectuées en plaques de culture à 96 puits. Les puits sont incubés pendant deux heures à température ambiante avec le substrat puis bloqués avec de la BSA (1% dans PBS) pendant une heure. La poly-L-Lysine (Sigma) sert de substrat référence pour le nombre de cellules déposées, c'est le 100% d'adhérence. La BSA seule révèle l'adhérence non-spécifique, c'est le zéro. Les substrats utilisés sont la fibronectine

(Roche), le collagène de type I (Sigma), la vitronectine (BD Bioscience) et le VCAM-1 (R&D Systems). Les cellules sont détachées par une solution d'EDTA, lavées, comptées et diluées à 2.10^4 cellules/puits dans du milieu HBSS. Elles sont alors déposées dans les puits et la plaque est placée à 37°C pendant 30min. Les puits sont lavés au PBS puis fixés au glutaraldéhyde (5% dans PBS) et enfin colorés au cristal violet (0.25%). Après dissolution du marquage par de l'acide acétique, l'absorbance à 595nm est analysée et le pourcentage de cellules adhérentes est calculé.

Pour les expériences avec les antagonistes (SJ749 et K34c), la solution contenant la molécule à différentes concentrations est placée dans le puit et les cellules sont rajoutées. Les molécules sélectionnées par criblage virtuel quand à elles sont incubées à différentes concentrations pendant 30min avec les cellules avant d'être placées dans les puits. Les 100% d'adhérence correspondent aux puits ne contenant pas d'antagoniste. Les CI50 sont calculées à l'aide du logiciel GraphPad Prism.

Les expériences de détachement cellulaire ont été réalisées dans des puits traités avec de la fibronectine à 0,1µg/ml. Les cellules sont placées dans les puits pendant deux heures avant ajout de l'antagoniste pendant quatre heures. Les puits sont ensuite lavés au PBS pour éliminer les cellules détachées puis fixés et colorés au cristal violet. Les 100% d'adhérence correspondent aux puits ne contenant pas d'antagonistes.

4) Agents chimiothérapeutiques et autres inhibiteurs

L'ellipticine (5,11-diméthyl-6*H*-pyrido[4,3-*b*]carbazole) est un alcaloïde naturel tétracyclique. Il s'agit d'un agent anti-néoplasique exerçant son activité par intercalation entre les bases de l'ADN et inhibition de la topoisomérase II. L'ellipticine est métabolisée par le cytochrome P450 et ses dérivés peuvent alkyler l'ADN. La solution mère d'ellipticine (Sigma) est réalisée à 10mM ou 1mM dans du DMSO.

La pifithrin- α (2-(4-nitrophényl)imidazo[2,1-*b*]-5,6,7,8-tetrahydrobenzothiazole, Calbiochem) est diluée dans du DMSO et utilisée à une concentration finale de 20µM.

Les irradiations ont été réalisées au Centre Paul Strauss. Les cellules sont placées à température ambiante dans le champ de l'appareil (PRIMUS) et exposées à une dose unique de rayons X de 6MV (de 0 à 12Gy). La dose est appliquée à un débit de 2Gy/min et mesurée par un dosimètre.

5) Expression protéique

a. PCR

L'extraction des ARN cellulaires est réalisée par lyse des cellules dans le TriReagent. Après centrifugation, les ARN sont précipités par ajout d'isopropanol puis le culot d'ARN est lavé à l'éthanol, dissout dans l'eau et dosé par spectrophotométrie à 206nm. Deux µg d'ARN sont convertis en ADN codant par transcription réverse (High Capacity cDNA RT Kit, Applied Biosystems). L'amplification par PCR s'effectue par SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) et le nombre de cycles calculé par le logiciel ABI prism 7000 (Applied Biosystems). La quantification relative du gène cible s'effectue en rapportant son signal à celui de la cyclophilin en utilisant la méthode $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ (Livak et Schmittgen, 2001).

Les amorces utilisées proviennent de InVitrogen.

p53 (102pb) : sens 5'-CCCAGGGAGCACTAAGCGA-3' et anti-sens 5'-CCACGGATCTGAAGGGTGAA-3' ; Mdm2 (103pb) : sens 5'-AGACCCTGGTTAGACCAAAGCC-3' et anti-sens 5'-TGGCCAA GATAAAAAGAACCTCT-3' ; p21 (78pb) : sens 5'-GGCAGACCAGCATGACAGATT-3' et anti-sens 5'-TGTGGGCGGA TTAGGGCT-3' ; Fas (104pb) : sens 5'-CCCTCCTACCTCTGGTTCTTACG-3' et anti-sens 5'-AGTCTTCCTCAATTCCAATCCCTT-3' ; Bax (101pb) : sens 5'-TGGAGCTGCAGAGGATGATTG-3' et anti-sens 5'-CCAGTTGAAG TTGCCGTCAGA-3' ; Bad (60pb) : sens 5'-TCCGGAGGATGAGTGACGAG-3' et anti-sens 5'-TCCGGAGGATG AGTGACGAG-3' ; Cyclophilin (150pb) : sens 5'-CAGGTCCTGGCATCTTGTC-3' et anti-sens 5'-TTGCTGGTCTTGCCATTCCT -3'.

b. Western Blot

Après détachement, les cellules sont lavées au PBS puis reprises dans du tampon de lyse (1% Triton, 100mM NaF, 10mM NaPPi, 1mM Na₃VO₄, cocktail d'inhibiteurs de protéases dans PBS) pendant 1h à 4°C. Après sonication et centrifugation à 12000g pendant 10min à 4°C, le surnageant est récupéré et les protéines dosées selon le protocole DC Protein Assay (BioRad) sont séparées en conditions dénaturantes sur un gel de polyacrylamide à 8% puis transférées sur une membrane de PVDF (Amersham Bioscience). Les sites libres de la membrane sont ensuite saturés par de la caséine (I-Block, Tropic) pendant 1h et l'anticorps primaire spécifique des protéines d'intérêt est incubé durant la nuit à 4°C. Après lavage, l'anticorps secondaire couplé à la HRP (Promega) est mis en présence pendant 1h puis on révèle les protéines marquées sur les membranes à l'aide d'un substrat chimioluminescent. On effectue

une vérification de la quantité de protéines déposée dans chaque puits en réalisant un marquage de la GAPDH.

c. Immunocytochimie

Les cellules sont mises en culture dans des boîtes d'imagerie à fond en verre recouvert préalablement de fibronectine (10µg/ml). Elles sont fixées au PFA 4% puis un blocage des sites libres est effectué grâce à de la BSA (4%/PBS). L'anticorps primaire (1µg/ml) est mis à incuber pendant la nuit à 4°C. Suite aux lavages au PBS, l'anticorps secondaire couplé à la rhodamine RedX ($\lambda_{\text{ex}}=560\text{nm}$, $\lambda_{\text{ém}}=580\text{nm}$) ou à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC, $\lambda_{\text{ex}}=495\text{nm}$, $\lambda_{\text{ém}}=525\text{nm}$) est mis en présence pendant 1h. Les cellules sont ensuite observées au microscope confocal (Biorad). Le marquage non spécifique est testé par l'incubation avec l'anticorps secondaire et aucun marquage n'a été mis en évidence dans ces conditions.

Les fibres d'actine sont marquées par la phalloïdin-rhodamine (Interchim) et l'anticorps contre la paxilline provient de Biosource.

d. Cytométrie en flux

Les cellules sont détachées par action de trypsine-EDTA puis lavées au TBS contenant 5% de BSA et 0,1% d'azide de sodium. Des aliquots contenant $5 \cdot 10^5$ cellules sont ensuite incubés pendant 30min sur glace en présence de l'anticorps primaire à une concentration de 10µg/ml. Les cellules sont alors lavées et incubées pendant 30min sur glace et dans l'obscurité avec l'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome : l'isothiocyanate de fluorescéine ($\lambda_{\text{ex}}=495\text{nm}$, $\lambda_{\text{ém}}=525\text{nm}$) ou la R-phycoérythrine ($\lambda_{\text{ex}}=565\text{nm}$, $\lambda_{\text{ém}}=578\text{nm}$). Après fixation pendant 5 min avec du PFA 1% dans du PBS, environ $2 \cdot 10^4$ cellules sont analysées au cytomètre de flux (Becton Dickinson, CA). La fluorescence témoin est mesurée avec des cellules incubées uniquement avec l'anticorps secondaire.

La quantification de l'intégrine en conformation active est effectuée par détection de l'apparition de l'épitope 9EG7 après incubation des cellules avec les cations divalents ou le SJ749 pendant 15min à 37°C dans du TBS-BSA. Les cellules sont ensuite marquées comme décrit ci-dessus et analysées par cytométrie en flux. La moyenne de fluorescence observée suite aux différents traitements est rapportée au contrôle pour déterminer un pourcentage.

6) Réponse cellulaire

a. Prolifération

La prolifération cellulaire est évaluée par la méthode au MTS (Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega) qui quantifie la dégradation du sel de tétrazolium en formazan par les enzymes de la chaîne de respiration mitochondriale. Un millier de cellules sont déposées dans les puits contenant les molécules d'intérêt ou préalablement traités par la fibronectine (10µg/ml) ou le polyHEMA (Sigma) puis placées à 37°C pendant le temps souhaité. Le MTS est ajouté pendant 3h puis l'absorbance est mesurée à 492nm. L'absorbance au jour d'intérêt et rapportée à celle mesurée le jour de l'ensemencement pour calculer un rapport de prolifération.

Pour la détermination de la CI50, les puits sans drogue représentent le 100% de prolifération et le calcul est effectué par le logiciel GraphPad prism.

b. Soft Agar

Les plaques 6 puits sont additionnées de 2ml/puits de milieu EMEM 2 fois concentré (EMEM 2X) mélangé à de l'agar 1,2% afin d'obtenir une première couche d'agar à 0,6% au fond des puits. Une fois solidifié, 2ml de milieu EMEM/agar 0,3% contenant $4 \cdot 10^4$ cellules sont déposées dans chaque puits en présence et en absence de 10µM SJ749. Les plaques sont incubées à 37°C et colorées au cristal violet à 0,005% après 14 jours. Le nombre de colonies ayant poussé dans des conditions non adhérentes est déterminé grâce au logiciel GeneTool.

c. Tests clonogéniques

Les cellules sont placées à faible densité dans des plaques 6 puits (250 cellules/puit) puis traitées par la drogue d'intérêt pendant 24 ou 48h en milieu contenant 2% de sérum. Le milieu est alors remplacé par du milieu à 10% de sérum et sans drogue. Les plaques sont placées à l'incubateur pendant une semaine avant coloration des colonies au cristal violet 0.1%. Le nombre de clones est quantifié par comptage manuel.

Le nombre moyen de cellules par colonies a été déterminé par comptage dans 30 clones par condition et par expérience.

Dans le cas des irradiations, 72h après le traitement les cellules sont placées à faible densité dans des plaques 6 puits (250 cellules/puit). Les colonies sont colorées au cristal violet après 10 jours de croissance. La fraction de survie est le rapport entre l'efficacité de l'ensemencement du puits traité et du puits contrôle (Nombre de clones/Nombre de cellules ensemencées).

d. Cycle cellulaire

Les cellules sont placées en plaque 24 puits et traitées pendant 12, 24, 48 ou 72h avec la drogue souhaitée. Le milieu est récupéré dans un eppendorf et les cellules détachées par une solution de trypsine. Les cellules et le milieu sont ensuite centrifugés et lavés au PBS. Le culot est alors repris dans une solution hypotonique contenant 50µg/ml d'iodure de propidium, 3.4mM de citrate de sodium et 0.1% de triton X-100 dans du PBS. Le contenu en ADN des cellules est analysé par cytométrie en flux (FACSCalibur, BD Bioscience) et la répartition dans les différentes phases du cycle déterminée par le logiciel ModFit.

e. Apoptose

Les cellules sont placées sur des lamelles de verre et traitées pendant 3 ou 5 jours avec 1µM d'ellipticine. Les lamelles sont fixées au PFA 4% puis marquées au Hoechst 33342 (1/1000 dans PBS, Sigma). Après lavage, la morphologie nucléaire est analysée sous un microscope à fluorescence. Le taux d'apoptose représente le pourcentage de noyaux fragmentés.

De façon alternative, l'apoptose est quantifiée par analyse de la fraction de cellules en subG1 après marquage à l'iodure de propidium et cytométrie en flux.

f. Sénescence

Les cellules sont placées en plaque 6 puits et traitées pendant différents temps avec la drogue d'intérêt. Les puits sont lavés au PBS et les cellules fixées par un mélange glutaraldéhyde/formaldéhyde pendant 15min. Le marquage de l'activité β -galactosidase à pH6.0 est effectué pendant une nuit à 37°C comme décrit dans le kit Cell Signaling. Des clichés représentatifs sont pris au grossissement x200 sous un microscope Leica afin de quantifier au minimum 200 cellules par condition. Le pourcentage de cellules sénescents représente le rapport entre le nombre de cellules positives au marquage SA- β -Gal et le nombre total de cellules.

g. Multinucléation

La quantification des cellules multinucléées est réalisé sur des cellules fixées et dont le noyau est marqué au Hoechst 33258 (Sigma, 1µg/ml). Les cellules sont observées au microscope à fluorescence et le pourcentage de cellules multinucléées par champ est déterminé (> 200 cellules).

7) Statistiques

Les résultats représentent la moyenne \pm l'écart standard à la moyenne de N expériences. Les analyses statistiques sont effectuées à l'aide du logiciel GraphPad Prism par le test de Student en considérant $P < 0.05$ comme significatif (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$).

PARTIE III : RESULTATS

PARTIE III : RESULTATS

A) L'INTEGRINE $\alpha 5\beta 1$ DANS LES GLIOMES

Au début de ma thèse très peu de données étaient connues sur l'implication de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans les cellules tumorales elles-mêmes alors que son importance dans l'angiogenèse était largement décrite. Nous nous intéressons dans ce travail au rôle de cette intégrine $\alpha 5\beta 1$ également nommée récepteur à la fibronectine dans les tumeurs cérébrales.

Dans un premier temps nous avons étudié des lignées cellulaires établies à partir de glioblastomes humains : les cellules A172, U87MG et U373. Nous avons exploré l'importance de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans les cellules tumorales en nous intéressant à l'expression endogène de l'intégrine et aux effets de la modulation de son taux d'expression sur la tumorigénicité.

1) L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans les gliomes

a. Expression endogène de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$

Nous avons analysé l'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans trois lignées de glioblastomes : les cellules A172, U87MG et U373. En utilisant des anticorps dirigés contre les parties cytoplasmiques (AB1928 pour $\alpha 5$ et AB1952 pour $\beta 1$) des deux sous-unités nous avons révélé la présence de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans les trois lignées par Western Blot. Les anticorps utilisés dans cette partie révèlent toutes les formes (matures et immatures) de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ quelques soient leurs localisations. Le taux d'intégrine détecté correspond à la totalité de la protéine synthétisée. Les taux d'expressions endogènes de $\alpha 5$ et $\beta 1$ sont plus élevés dans les cellules U87MG par rapport aux deux autres lignées cellulaires (Figure 13A). Par quantification nous observons une expression de la sous-unité $\alpha 5$ de l'intégrine deux fois plus faible dans les cellules A172 que dans les U87MG et cinq fois plus faible dans les cellules U373. Les cellules A172 expriment deux fois moins de sous-unité $\beta 1$ que les cellules U87MG et les cellules U373 expriment un taux de $\beta 1$ équivalent à celui des U87MG.

b. Localisation de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$

Pour assurer sa fonction de protéine d'adhérence, l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ doit être localisée à la membrane des cellules. Nous avons donc analysé le taux d'intégrine membranaire par cytométrie en flux en utilisant des anticorps dirigés contre la partie extracellulaire du dimère (snaka51 pour $\alpha 5$ et TS2/16 pour $\beta 1$). Ces deux anticorps sont spécifiques de la forme activée

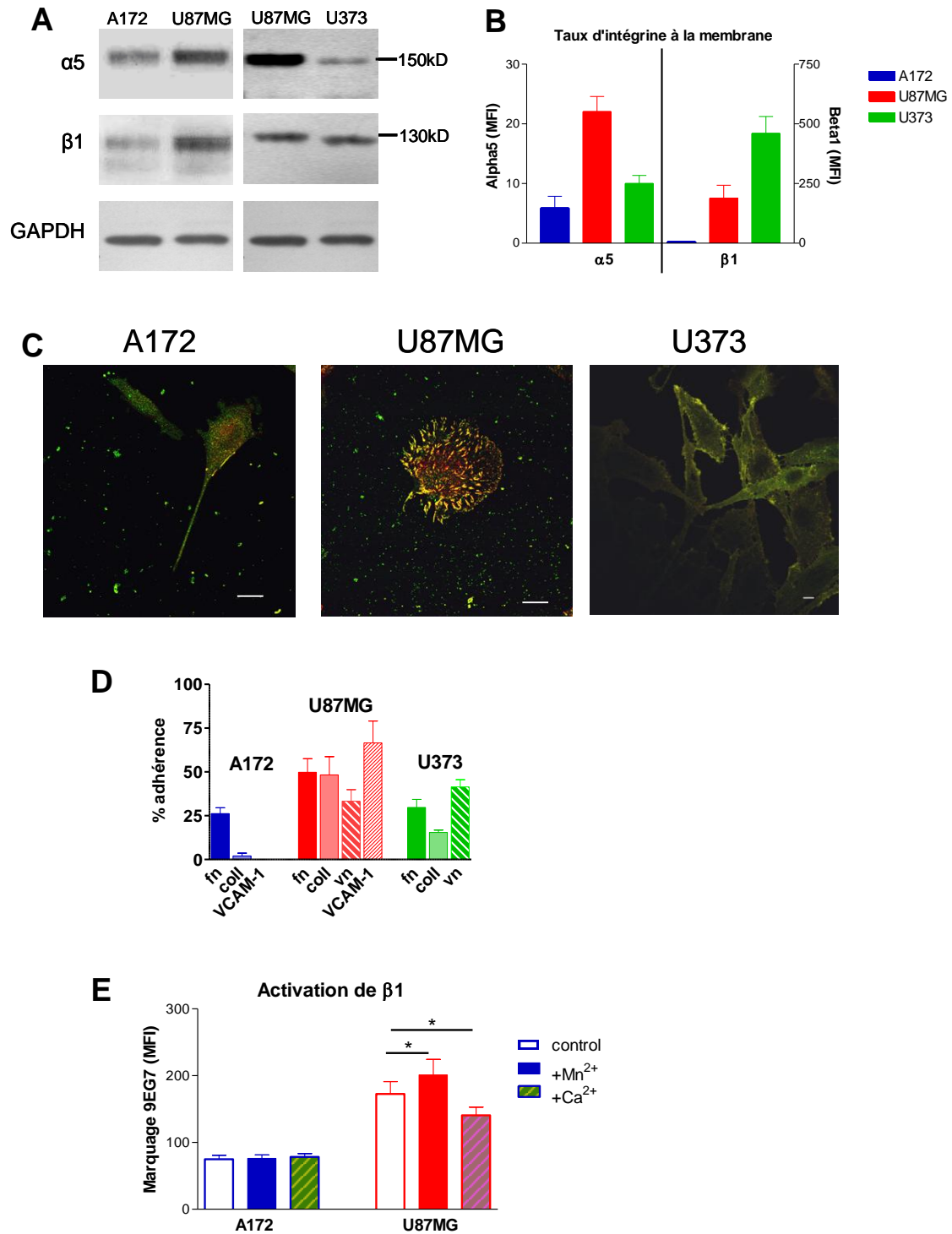


Figure 13 : Expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans les glioblastomes (lignées A172, U87MG et U373).

A) Analyse par western blot de l'expression des sous-unités $\alpha 5$ et $\beta 1$ sur des extraits protéiques totaux des trois lignées de glioblastomes (Anticorps dirigés contre la partie cytoplasmique, Ab1928 et Ab1952). La GAPDH sert de référence pour la quantité de protéines déposée. B) Analyse par cytométrie en flux de la quantité d'intégrine exprimée à la membrane ($\alpha 5$: snaka51, $\beta 1$: TS2/16, $N=2-8$). C) Co-localisation par immunocytochimie des deux sous-unités de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ ($\alpha 5$: Ab1928-FITC, $\beta 1$: 9EG7-rhodamine, barre=10 μ m). D) Adhérence cellulaire à différents substrats (FN=fibronectine, COLL=collagène de type I, VN=vitronectine, VCAM-1=vascular cell adhesion molecule, $N=2-5$). E) Evaluation de l'état d'activation de la sous-unité $\beta 1$ sous l'action de deux cations divalents par apparition de l'épitope 9EG7, analyse par cytométrie en flux ($N=3-6$).

de l'intégrine. Le taux d'intégrine $\alpha 5\beta 1$ détecté par cette méthode correspond à la proportion de dimère activé situé à la membrane de la cellule. La sous-unité $\alpha 5$ de l'intégrine est exprimée fortement dans les cellules U87MG et à un taux deux fois plus faible dans les deux autres lignées. En ce qui concerne la sous-unité $\beta 1$, elle est exprimée à un niveau deux fois plus élevé dans les cellules U373 par rapport aux cellules U87MG (Figure 13B).

Dans les cellules A172 l'anticorps utilisé ne révèle pas la présence de la sous-unité $\beta 1$ à la membrane. Nous avons mis en évidence dans ces cellules une forme atypique d'intégrine $\beta 1$ présentant une altération de la glycosylation qui compromet sa reconnaissance par certains anticorps. Le seul anticorps reconnaissant la sous-unité $\beta 1$ dans ces cellules est l'anticorps 9EG7 qui a permis sa caractérisation biochimique. Cette intégrine $\beta 1$ atypique est cependant capable d'interagir avec la sous-unité $\alpha 5$ pour former un dimère comme le révèle les expériences d'immunoprécipitation (Bartik *et al.*, 2008).

Pour compléter l'étude de la localisation de l'intégrine nous avons réalisé un marquage immunocytochimique des deux sous-unités par microscopie confocale (Figure 13C). Les cellules A172 présentent une répartition hétérogène de l'intégrine à la membrane avec un marquage plus prononcé dans les prolongements cellulaires et dans certaines portions de membrane. Dans les cellules U87MG l'intégrine se localise dans des points focaux d'adhérence (marquage ponctiforme caractéristique), ces structures constituent une plateforme de signalisation reliant la matrice extracellulaire au cytosquelette. Les cellules U373, quant à elles, présentent une répartition membranaire ponctiforme de l'intégrine avec un marquage plus intense aux extrémités des cellules. La répartition membranaire de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ diffère dans les trois lignées cellulaires.

En reliant les observations en cytométrie et en microscopie nous notons que les cellules U87MG exprimant le taux le plus élevé d'intégrine $\alpha 5\beta 1$ présentent le niveau le plus élevé d'intégrine à la membrane et la localisation la plus hiérarchisée.

c. L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ est fonctionnelle : adhérence

La fonction primaire d'un dimère d'intégrine étant l'adhérence cellulaire et le ligand quasi unique de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ étant la fibronectine, nous avons évalué l'adhérence cellulaire à la fibronectine pour nous assurer de la fonctionnalité de l'intégrine exprimée. Les cellules A172 adhèrent exclusivement à la fibronectine parmi les substrats testés. Les cellules U87MG se fixent au collagène, à la vitronectine et au VCAM-1 ce qui révèle un large panel d'expression d'intégrines dans ces cellules. Les cellules U373 se fixent à la fibronectine, au collagène et à la vitronectine (Figure 13D).

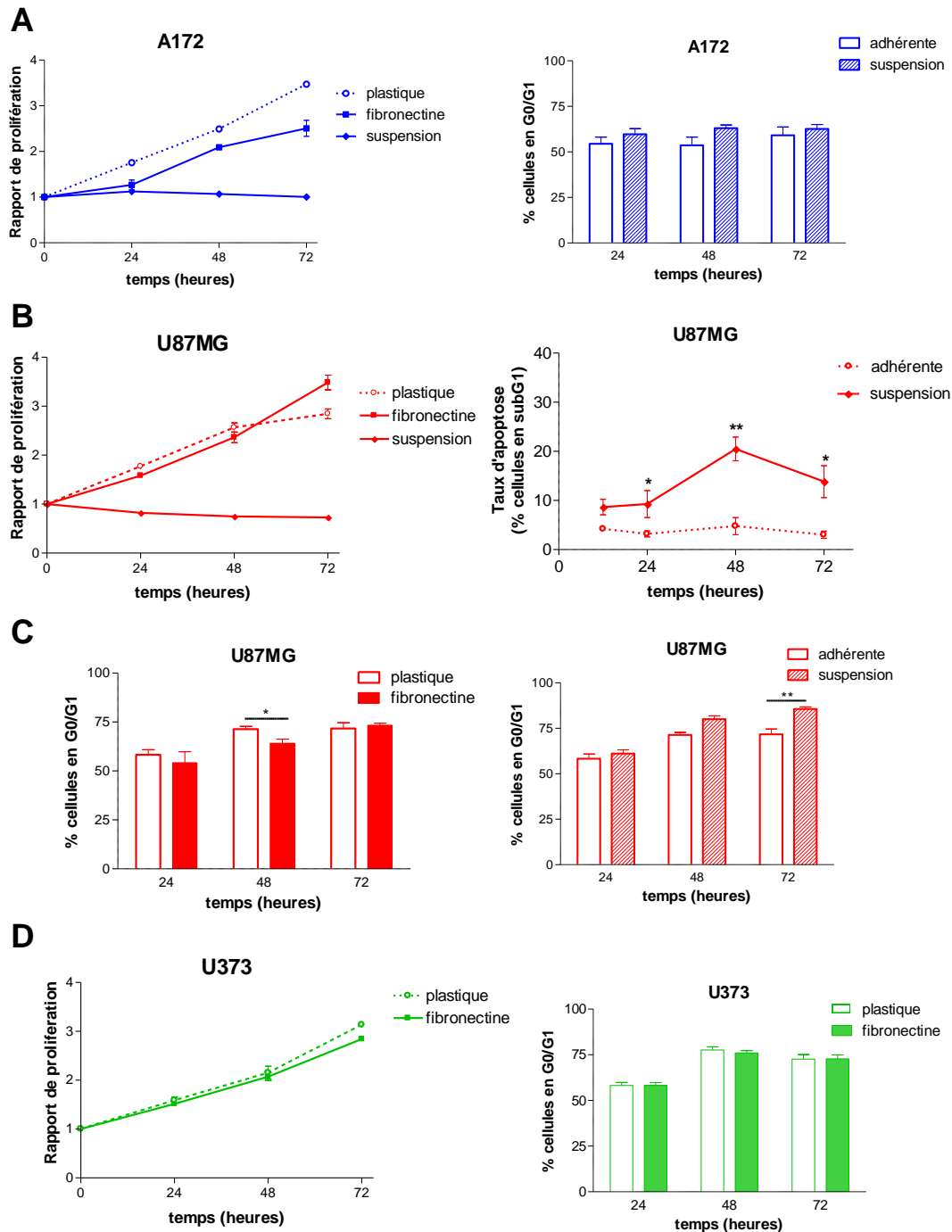


Figure 14 : Etude de la prolifération et de la progression dans le cycle cellulaire des lignées de glioblastomes.

A) Evaluation de la prolifération cellulaire par la méthode au MTS en milieu contenant 2% de sérum sur des cellules A172 adhérentes à un substrat neutre ou à la fibronectine ou placées en suspension ($N=2-7$) et analyse de la répartition en phase G0/G1 par cytométrie en flux des cellules A172 adhérentes ou en suspension. B) Evaluation de la prolifération cellulaire par la méthode au MTS en milieu contenant 2% de sérum sur des cellules U87MG adhérentes à un substrat neutre ou à la fibronectine ou placées en suspension ($N=2-7$) et analyse de l'apoptose dans les cellules U87MG adhérentes ou en suspension (pourcentage de cellules en subG1 déterminé par cytométrie en flux, $N=3-5$). C) Analyse de la répartition en phase G0/G1 par cytométrie en flux des cellules U87MG adhérentes à un substrat neutre ou à la fibronectine ou placées en suspension ($N=2-6$). D) Evaluation de la prolifération cellulaire par la méthode au MTS en milieu contenant 2% de sérum sur des cellules U373 adhérentes à un substrat neutre ou à la fibronectine ($N=2-7$) et analyse de la répartition en phase G0/G1 par cytométrie en flux des cellules U373 adhérentes à un substrat neutre ou à la fibronectine ($N=4$).

Les trois lignées de glioblastomes testées adhèrent à la fibronectine. Les cellules U87MG présentent le taux d'adhérence le plus élevé. Les cellules A172 et U373 adhèrent à la fibronectine à un taux deux fois plus faible que les cellules U87MG ce qui est en adéquation avec le niveau d'expression deux fois plus faible de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans ces cellules. L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ exprimée à des taux différents et possédant une localisation spécifique au type cellulaire est fonctionnelle dans les trois lignées de glioblastomes testées.

d. Modulation de la conformation de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$

L'intégrine peut se trouver dans différentes conformations selon son état d'activation, les ions présents ou les protéines avec lesquelles elle interagit. Les cations divalents sont capables de modifier la conformation de l'intégrine. L'ajout de Ca^{2+} induit la forme inactive et l'ajout de Mn^{2+} induit la forme active. Nous avons étudié l'effet de ces ions sur la conformation de la sous-unité $\beta 1$ exprimée dans les glioblastomes par cytométrie en flux en utilisant un anticorps spécifique de la forme active, le 9EG7. L'ajout de cations divalents permet de moduler la conformation de la sous-unité $\beta 1$ exprimée dans les cellules U87MG : activation par le Mn^{2+} et inhibition par le Ca^{2+} (Figure 13E). L'intégrine $\beta 1$ atypique exprimée par les cellules A172 n'est pas modulable par les cations divalents.

2) Etude de la prolifération cellulaire dans différentes conditions

Nous avons étudié le pouvoir prolifératif des trois lignées de glioblastomes dans différentes conditions : cellules adhérentes de façon non-spécifique, cellules adhérentes à la fibronectine et cellules en suspension formant des sphéroïdes. Ces conditions mettent en jeu les divers états conformationnels de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$: liée et active, libre et non-active, le comportement des cellules cultivées en sphéroïdes se rapproche des observations *in vivo*. Cette étude comparative nous permettra de mettre en évidence l'implication de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans la prolifération des glioblastomes.

a. Cellules A172

Dans le cas des cellules A172, la prolifération cellulaire n'est pas statistiquement différente dans les cellules adhérentes de manière non-spécifique et sur fibronectine (Figure 14A). Par contre la mise en suspension des cellules ralentit leur prolifération. L'inhibition de prolifération peut être liée à un ralentissement du cycle cellulaire ou à de l'apoptose. Nous avons donc analysé la progression dans le cycle cellulaire de ces cellules par cytométrie en flux. Nous n'observons pas de blocage en phase G0/G1 dans les cellules placées en

suspension. Les cellules A172 ne présentent pas de mort cellulaire par apoptose lorsqu'elles sont en suspension. La réduction de prolifération observée en suspension peut s'expliquer par un ralentissement du cycle cellulaire.

b. Cellules U87MG

Les cellules U87MG présentent également un pouvoir prolifératif identique sur plastique ou sur fibronectine (Figure 14B). Ces mêmes cellules placées en suspension ne prolifèrent pas et révèlent au contraire une induction d'apoptose de 20% ainsi qu'un blocage du cycle cellulaire en phase G0/G1 significatif après 72h de culture (Figure 14C). Les cellules U87MG meurent par apoptose lorsqu'elles sont détachées.

c. Cellules U373

Les cellules U373 prolifèrent de manière identique sur plastique et sur fibronectine (Figure 14D). Aucune différence n'est détectée par la méthode du MTS ni par l'analyse de la progression dans le cycle cellulaire.

Les trois lignées de glioblastomes étudiées ne démontrent pas d'effets de la fibronectine sur la prolifération cellulaire en conditions bidimensionnelles. L'occupation de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ par son ligand la fibronectine n'est pas indispensable à la croissance des cellules en deux dimensions. Ainsi ni l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ ni les autres intégrines à fibronectine ne jouent un rôle majeur dans la prolifération des glioblastomes *in vitro*. Mais la mise en suspension des cellules révèle une différence de comportement des cellules A172 et U87MG. Les cellules U87MG meurent par apoptose lorsqu'elles sont en suspension. Cette différence de sensibilité à l'attachement ne peut être reliée directement à l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. La capacité proliférative des trois lignées de glioblastomes étant similaire alors que leur taux d'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ est différent, une conclusion sur l'importance de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans la tumorigénicité des glioblastomes *in vitro* ne peut être donnée par ces expériences.

3) Manipulation de l'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans les gliomes

L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ étant surexprimée dans les tumeurs cérébrales elle pourrait participer à la progression tumorale. La sous-unité $\alpha 5$ ne s'associant qu'à la sous-unité $\beta 1$, en modifiant le taux de la sous-unité $\alpha 5$ nous agissons uniquement sur le dimère $\alpha 5\beta 1$. Nous avons modulé le taux d'expression de la sous-unité $\alpha 5$ dans les trois lignées de glioblastomes pour étudier l'implication de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans la tumorigénicité.

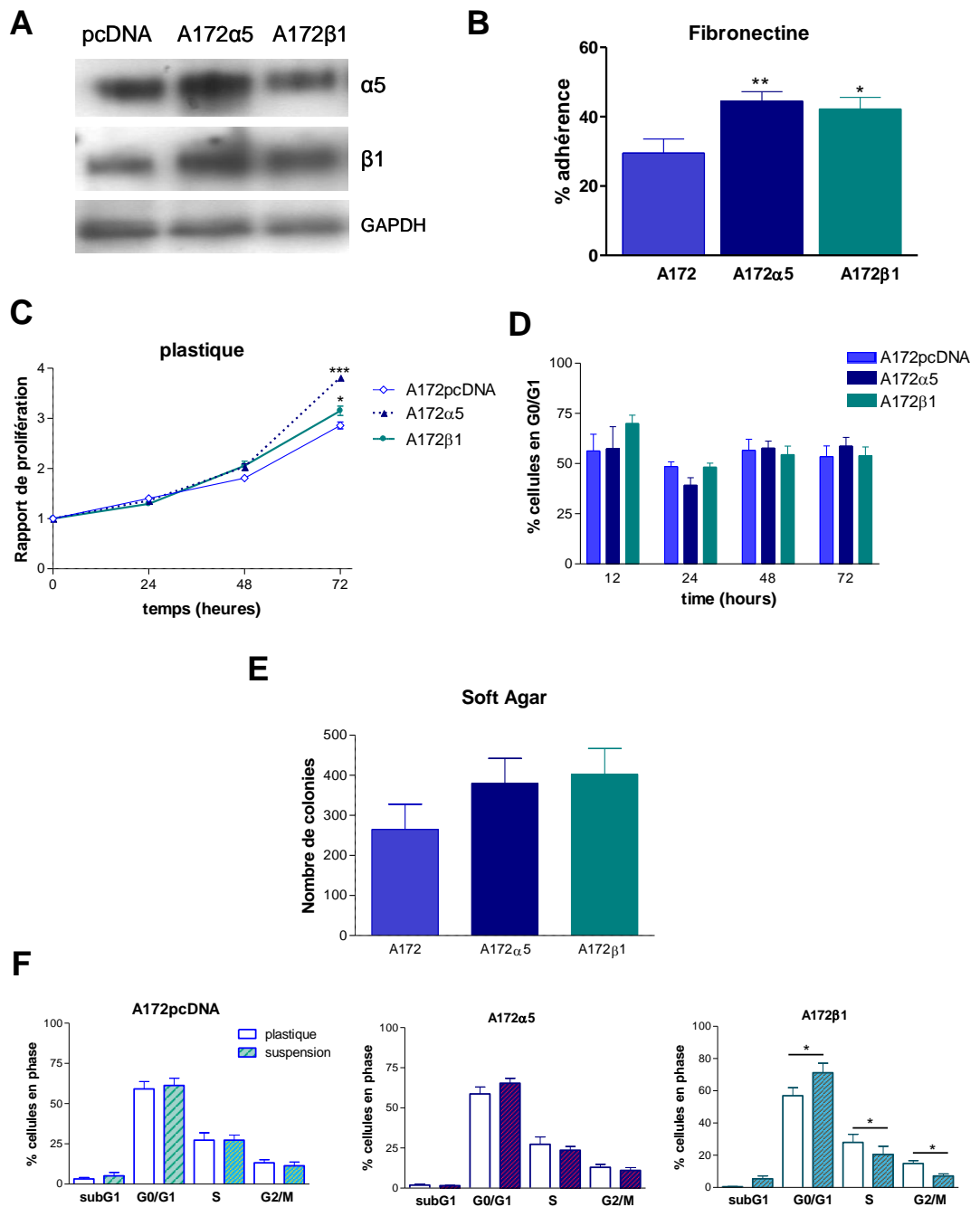


Figure 15 : Effets de la sur-expression de chacune des sous-unités de l'intégrine α 5 β 1 dans les cellules A172.

A) Analyse par western blot de l'expression des sous-unités α 5 et β 1 sur des extraits protéiques totaux des cellules A172 transfectées par le plasmide contrôle, α 5pcDNA ou β 1pIRES (Anticorps dirigés contre la partie cytoplasmique, Ab1928 et Ab1952). La GAPDH sert de référence pour la quantité de protéines déposée. B) Evaluation de l'adhérence à la fibronectine des cellules A172 sur-exprimant l'intégrine α 5 β 1 ($N=10$). C) Evaluation de la prolifération cellulaire par la méthode au MTS en milieu contenant 2% de sérum de cellules A172 sur-exprimant l'intégrine α 5 β 1 ($N=4$). D) Analyse de la répartition en phase G0/G1 par cytométrie en flux des cellules A172 sur-exprimant l'intégrine α 5 β 1 ($N=4$). E) Clonogénicité en milieu semi-solide, comptage du nombre de clones s'étant développés dans les cellules A172 sur-exprimant l'intégrine α 5 β 1 ($N=7-14$). F) Analyse de la progression dans le cycle cellulaire des cellules A172 sur-exprimant l'intégrine α 5 β 1 et leur contrôle placées en suspension pendant 72h ($N=4-8$).

a. Cellules A172 sur-exprimant $\alpha 5$ ou $\beta 1$

Nous avons sur-exprimé par transfection la sous-unité $\alpha 5$ de l'intégrine dans les cellules A172 exprimant un taux endogène faible d'intégrine $\alpha 5\beta 1$. Le niveau d'expression de la sous-unité $\alpha 5$ dans les cellules A172 transfectées est deux fois supérieur au contrôle soit comparable à celui observé dans les cellules U87MG (Figure 15A). Nous avons par ailleurs transfecté la sous-unité $\beta 1$ dans les cellules A172 qui expriment une forme atypique de cette intégrine. Cette intégrine exogène est glycosylée de manière normale ce qui rend possible sa reconnaissance par tous les anticorps.

La sur-expression de chacune des sous-unités entraîne une augmentation de l'adhérence cellulaire à la fibronectine par rapport au contrôle A172pcDNA ce qui prouve que l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ exogène est fonctionnelle (Figure 15B). L'analyse de la prolifération des cellules sur-exprimant $\alpha 5$ ou $\beta 1$ révèle une augmentation de celle-ci à 72h par rapport au contrôle (Figure 15C). La progression dans le cycle cellulaire n'est pas modifiée par la sur-expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ (Figure 15D).

Dans un modèle de croissance tridimensionnel en milieu semi-solide (soft-agar) rendant compte de la tumorigénicité des cellules, nous observons un nombre de clones légèrement plus élevé dans les cellules sur-exprimant la sous-unité $\beta 1$ (Figure 15E). Les cellules A172 $\beta 1$ semblent présenter un potentiel tumorigène plus élevé que leur contrôle. Un autre modèle utilisé pour se rapprocher du comportement cellulaire *in vivo* est la culture sous forme de sphéroïdes. La prolifération des cellules mises en suspension n'est pas affectée par le niveau d'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans les cellules A172. Mais les cellules A172 $\beta 1$ démontrent un blocage du cycle cellulaire en phase G0/G1 tout comme les cellules U87MG (Figure 15F).

La sur-expression de la sous-unité $\beta 1$ dans les cellules A172 modifie leur potentiel tumorigénique et leur sensibilité à l'attachement cellulaire. La sous-unité $\beta 1$ endogène de l'intégrine exprimée dans les cellules A172 présente une altération de la glycosylation due peut être à une/des mutations sur des sites de glycosylation. L'expression de $\beta 1$ sauvage restitue des caractéristiques « normales » à l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. Dans ce cas, la prolifération des cellules A172 en conditions non-adhérentes, se rapproche de celle obtenue dans les cellules U87MG (Figure 14C). L'interprétation des résultats obtenus quant à l'implication du taux d'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans le potentiel tumorigénique des cellules A172 est impossible dans l'état actuel de nos travaux. En effet, nous ne pouvons pas faire la différence entre une sur-expression effective de l'intégrine et une expression d'une intégrine normale par rapport à une intégrine atypique.

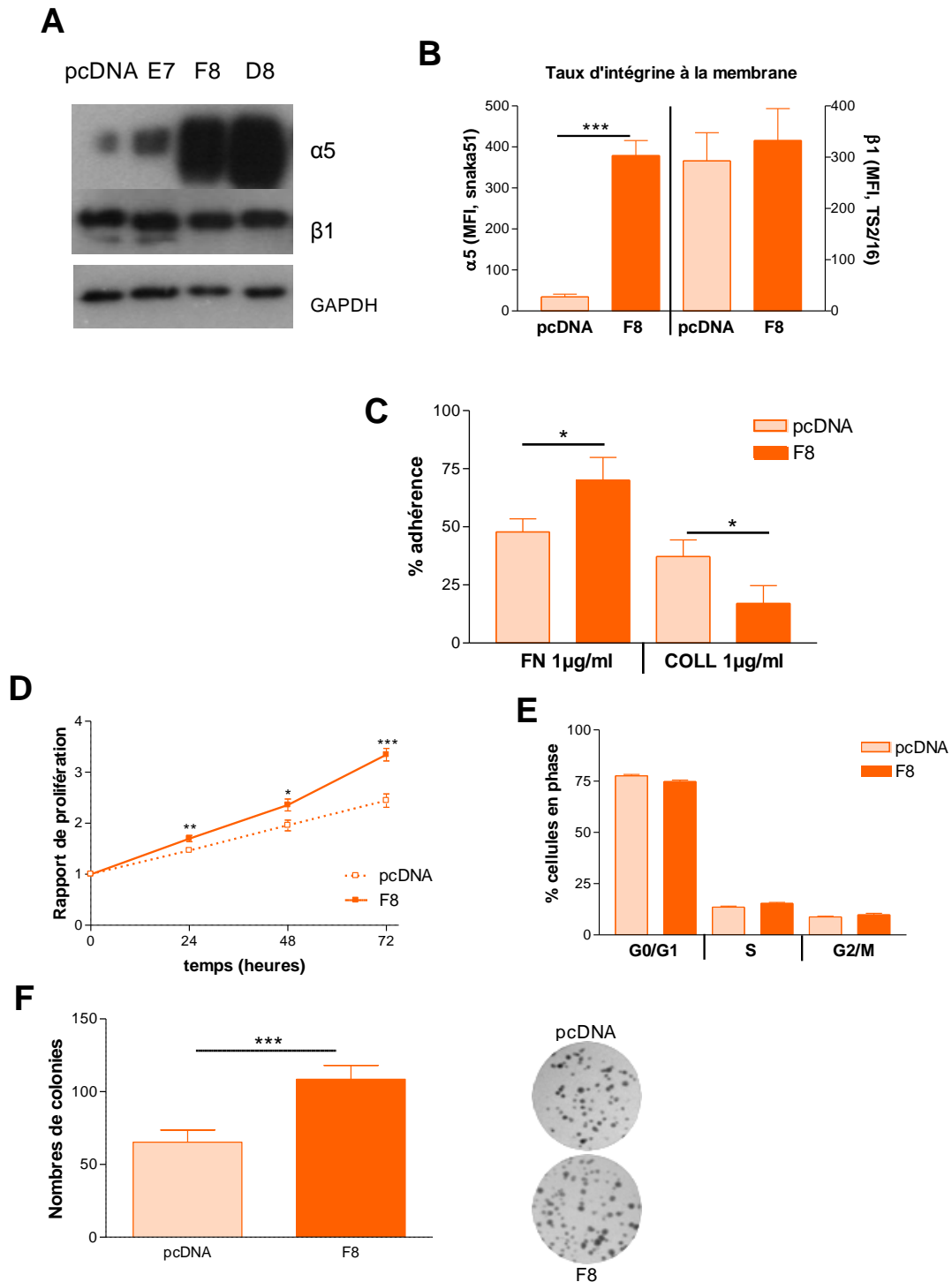


Figure 16: Effets de la sur-expression de l'intégrine $\alpha 5$ dans les cellules U87MG. Le clone F8.

A) Analyse par western blot de l'expression des sous-unités $\alpha 5$ et $\beta 1$ sur des extraits protéiques totaux des clones U87MG transfectés par le plasmide $\alpha 5$ pcDNA et leur contrôle (Anticorps dirigés contre la partie cytoplasmique, Ab1928 et Ab1952). La GAPDH sert de référence pour la quantité de protéines déposées. B) Analyse par cytométrie en flux de la quantité d'intégrine exprimée à la membrane dans le clone F8 et son contrôle ($\alpha 5$: snaka51, $\beta 1$: TS2/16, $N=9-10$). C) Evaluation de l'adhérence à la fibronectine et au collagène du clone F8 et son contrôle ($N=6-7$). D) Evaluation de la prolifération cellulaire par la méthode au MTS du clone F8 et son contrôle ($N=18$). E) Analyse de la progression dans le cycle cellulaire du clone F8 et son contrôle après 72h ($N=3$). F) Clonogénicité du clone F8 et son contrôle, nombre de colonies formées après 10 jours ($N=6$). Sur la droite, illustration du nombre de colonies formées.

b. Cellules U87MG sur-exprimant $\alpha 5$

Nous avons sur-exprimé la sous-unité $\alpha 5$ dans des cellules exprimant un taux endogène déjà important d'intégrine $\alpha 5\beta 1$.

Nous avons sur-exprimé la sous-unité $\alpha 5$ dans les cellules U87MG en utilisant le plasmide $\alpha 5$ pcDNA puis nous avons effectué un clonage afin de sélectionner des populations homogènes de cellules exprimant un très fort taux d'intégrine. La quantification de la sous-unité $\alpha 5$ par Western Blot dans trois clones différents révèle un taux 1,5 fois plus élevé pour le clone E7, 4,5 pour F8 et 6 pour D8 (Figure 16A). La sur-expression de la sous-unité $\alpha 5$ n'entraîne pas de sur-expression de son partenaire $\beta 1$ dans les cellules U87MG.

Le clone F8 a été plus particulièrement exploré. L'analyse de l'expression membranaire de l'intégrine par cytométrie en flux révèle un taux de la sous-unité $\alpha 5$ 11 fois plus élevé dans le clone F8 que dans son contrôle pcDNA (Figure 16B). L'intégrine sur-exprimée est donc localisée à la membrane. Nous ne détectons pas d'augmentation significative du taux de la sous-unité $\beta 1$ à la membrane.

La sur-expression de la sous-unité $\alpha 5$ dans le clone F8 conduit à une augmentation du taux d'adhérence à la fibronectine (Figure 16C). Cette augmentation de l'adhérence à la fibronectine s'accompagne d'une diminution de l'adhérence au collagène. Il semble que le taux très élevé de la sous-unité $\alpha 5$ recrute une grande partie des sous-unités $\beta 1$ exprimées par les cellules U87MG. Ainsi le panel d'expression des intégrines contenant la sous-unité $\beta 1$ pourrait être modifié ce qui module leur adhérence au collagène.

L'analyse de la prolifération par la méthode du MTS révèle une prolifération plus importante du clone F8 par rapport à son contrôle (Figure 16D). La sur-expression de l'intégrine $\alpha 5$ augmente la capacité proliférative des cellules U87MG. L'étude du cycle cellulaire à différents temps ne montre aucune différence de la progression dans le cycle lorsque la sous-unité $\alpha 5$ est sur-exprimée (Figure 16E).

Nous avons également évalué la clonogénicité de ces cellules en les ensemençant à très faible densité dans une plaque 6 puits et en laissant les colonies se former pendant 10 jours. Le clone F8 présente un nombre de colonies plus important que son contrôle (pcDNA : 65 ± 8 colonies ; F8 : 108 ± 9 colonies). La sur-expression de l'intégrine $\alpha 5$ induit une augmentation du pouvoir clonogénique d'un facteur 1,7 dans les cellules U87MG (Figure 16F).

La sur-expression de la sous-unité $\alpha 5$ de l'intégrine augmente la prolifération et la clonogénicité des cellules U87MG.

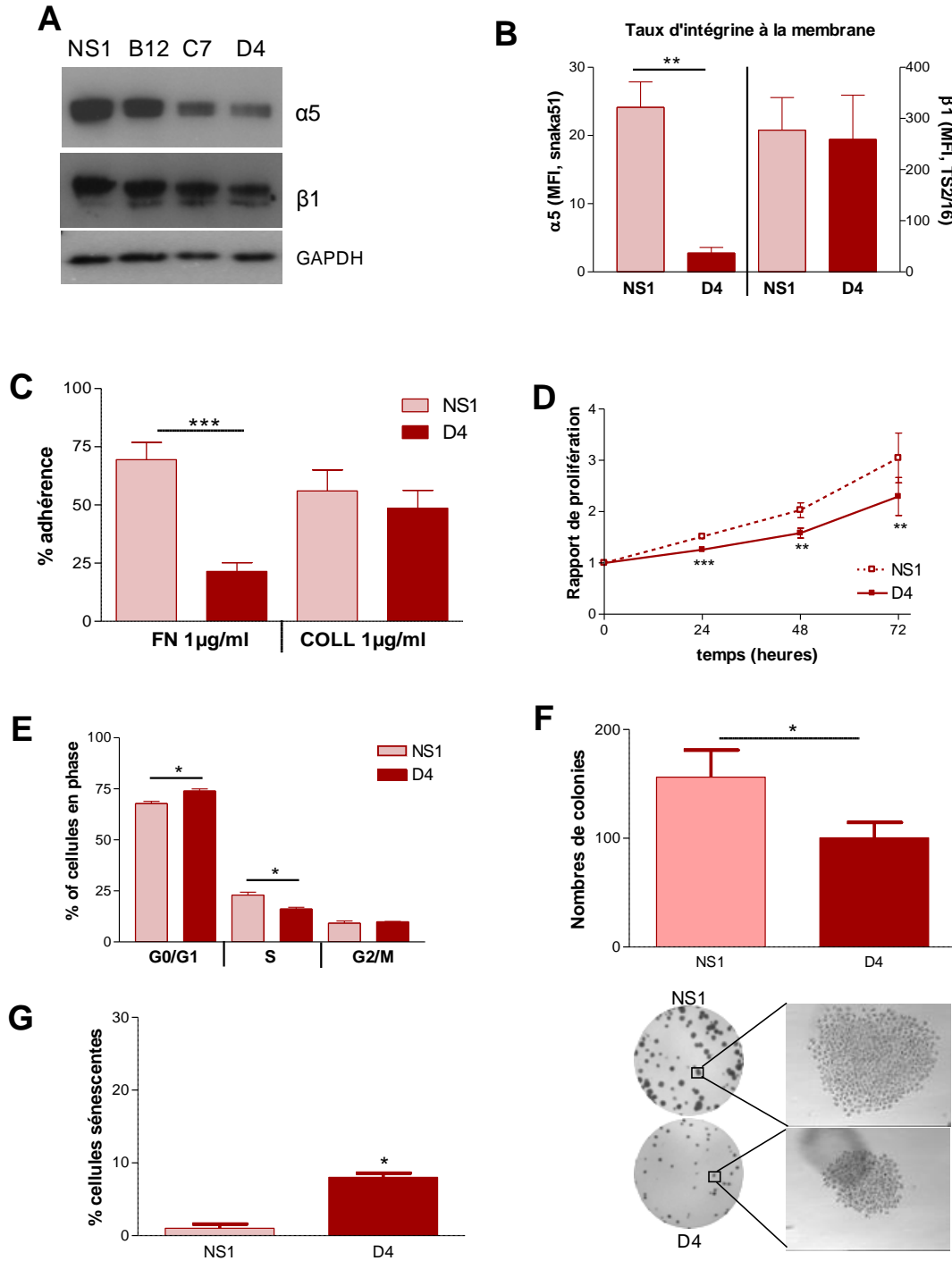


Figure 17: Effets de la sous-expression de l'intégrine $\alpha 5$ dans les cellules U87MG. Le clone D4.

A) Analyse par western blot de l'expression des sous-unités $\alpha 5$ et $\beta 1$ sur des extraits protéiques totaux des clones U87MG transfectés par le plasmide $\alpha 5$ pSM2 et leur contrôle (Anticorps dirigés contre la partie cytoplasmique, Ab1928 et Ab1952). La GAPDH sert de référence pour la quantité de protéines déposées. B) Analyse par cytométrie en flux de la quantité d'intégrine exprimée à la membrane dans le clone D4 et son contrôle ($\alpha 5$: snaka51, $\beta 1$: TS2/16, $N=4-5$). C) Evaluation de l'adhérence à la fibronectine et au collagène du clone D4 et son contrôle ($N=7$). D) Evaluation de la prolifération cellulaire par la méthode au MTS du clone D4 et son contrôle ($N=5$). E) Analyse de la progression dans le cycle cellulaire du clone D4 et son contrôle après 72h ($N=3$). F) Clonogénicité du clone D4 et son contrôle, nombre de colonies formées après 10 jours ($N=6$). En dessous, illustration du nombre et de la taille des colonies formées. G) Taux de sénescence basale après 72h en milieu contenant 2% de sérum dans le clone D4 et son contrôle (marquage SA- β -Gal, $N=3-4$).

c. Cellules U87MG sous-exprimant $\alpha 5$

Pour montrer une relation entre le taux d'expression de $\alpha 5\beta 1$ et la tumorigénicité, nous avons alors sous-exprimé la sous-unité $\alpha 5$ dans les cellules U87MG en utilisant le plasmide $\alpha 5pSM2$ codant pour un shRNA dirigé spécifiquement contre la sous-unité $\alpha 5$ de l'intégrine. Nous avons effectué un clonage afin de sélectionner des populations homogènes de cellules exprimant un taux très faible d'intégrine. Différents clones ont été sélectionnés, le clone B12 exprime 80% de la quantité de la sous-unité $\alpha 5$ du contrôle NS1, le clone C7 la moitié et le clone D4 moins de 15%. La sous-expression de la sous-unité $\alpha 5$ n'entraîne pas de sous-expression de son partenaire $\beta 1$ dans les cellules U87MG (Figure 17A).

Nous avons sélectionné le clone D4 pour les expériences ultérieures. L'analyse de l'expression membranaire du dimère d'intégrine par cytométrie en flux révèle un taux d'intégrine $\alpha 5$ 10 fois moins élevé dans le clone D4 que dans son contrôle NS1 (Figure 17B). Le peu d'intégrine $\alpha 5$ exprimée reste adressé à la membrane et le même taux d'intégrine $\beta 1$ est présent à la membrane de la cellule dans le clone D4 et son contrôle.

Nous avons étudié l'adhérence cellulaire à la fibronectine pour vérifier la fonction de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ restante. Nous observons une diminution de l'adhérence à la fibronectine dans le clone D4, $70\pm 7\%$ d'adhérence dans NS1 et $21\pm 4\%$ dans D4 (Figure 17C) et aucune modification de l'adhérence au collagène.

L'invalidation de l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ entraîne une perte du potentiel prolifératif des cellules U87MG. En effet, la courbe obtenue par la méthode au MTS pour le clone D4 est toujours inférieure de 20% à celle de son contrôle (Figure 17D). L'analyse du cycle cellulaire montre un blocage du cycle en phase G0/G1 ainsi qu'une diminution de la phase S dans le clone D4 après 72h (Figure 17E).

La sous-expression de l'intégrine $\alpha 5$ induit une diminution du pouvoir clonogénique de 40% dans les cellules U87MG (Figure 17F). Nous notons également que la taille des colonies du clone D4 est inférieure à celle du contrôle. L'arrêt prolongé de la croissance cellulaire par un blocage en phase G0/G1 et la perte du potentiel clonogénique sont des caractéristiques de la sénescence prématurée qui se traduit par une augmentation de l'activité β -galactosidase à pH acide. La mesure de cette activité montre que le taux de sénescence du clone D4 quoique faible est significativement plus élevé que celui observé dans son contrôle ($8\pm 0,6\%$ pour D4 et $1\pm 0,6\%$ pour NS1).

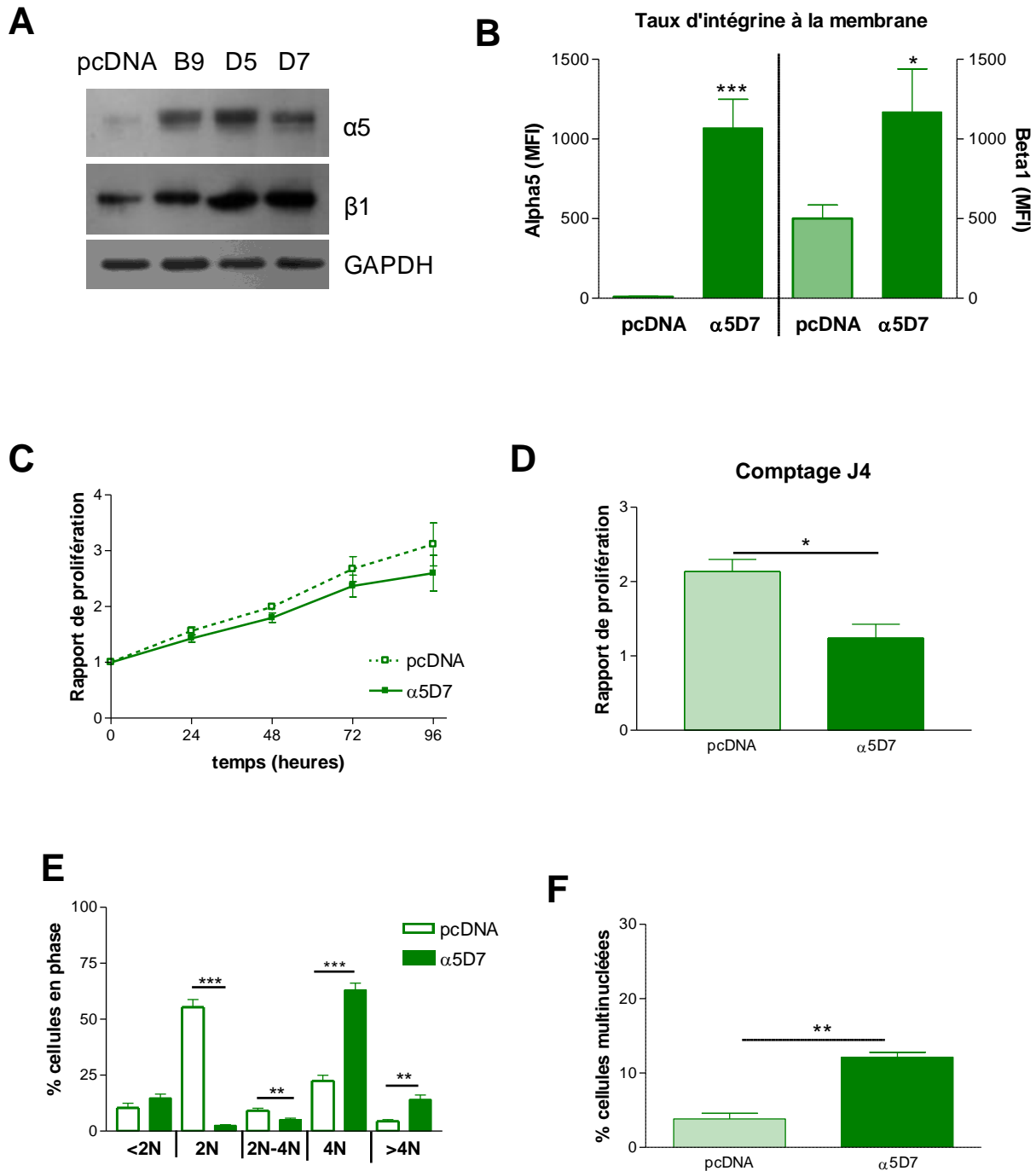


Figure 18: Effets de la sur-expression de l'intégrine $\alpha 5$ dans les cellules U373. Le clone D7.

A) Analyse par western blot de l'expression des sous-unités $\alpha 5$ et $\beta 1$ sur des extraits protéiques totaux des clones U373 transfectés par le plasmide $\alpha 5$ pcDNA et leur contrôle (Anticorps dirigés contre la partie cytoplasmique, Ab1928 et Ab1952). La GAPDH sert de référence pour la quantité de protéines déposée. B) Analyse par cytométrie en flux de la quantité d'intégrine exprimée à la membrane dans le clone D7 et son contrôle ($\alpha 5$: snaka51, $\beta 1$: TS2/16, $N=2-3$). C) Evaluation de la prolifération cellulaire par la méthode au MTS du clone D7 et son contrôle ($N=6$). D) Evaluation de la prolifération cellulaire par comptage du nombre de cellules après 4 jours du clone D7 et son contrôle ($N=4$). E) Analyse de la progression dans le cycle cellulaire du clone D7 et son contrôle après 72h ($N=7-10$). F) Evaluation du pourcentage de cellules multinucléées par marquage au Hoechst du clone D7 et son contrôle ($N=4$).

La répression de la sous-unité $\alpha 5$ de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ est suffisante pour diminuer la prolifération et la clonogénicité des cellules U87MG. Il semble donc bien y avoir une corrélation entre le taux d'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans les cellules U87MG et leur agressivité (pouvoir prolifératif, clonogénicité).

d. Cellules U373 sur-exprimant $\alpha 5$

Nous avons également sur-exprimé la sous-unité $\alpha 5$ dans les cellules U373. Les différents clones obtenus présentent une sur-expression de la sous-unité $\alpha 5$ de quatre fois pour le clone B9, cinq fois pour le clone D5 et trois fois pour le clone D7 comme le montrent les expériences de Western Blot (Figure 18A). Ces trois clones expriment deux fois plus de sous-unité $\beta 1$ que leur contrôle.

Le clone D7 a plus particulièrement été exploré. L'analyse de l'expression membranaire de l'intégrine par cytométrie en flux révèle une très forte sur-expression de la sous-unité $\alpha 5$. Le taux d'intégrine $\alpha 5$ est 110 fois plus élevé dans le clone D7 que dans son contrôle pcDNA (Figure 18B). L'expression de la sous-unité $\beta 1$ dans le clone D7 est également plus élevée (3,3 fois par cytométrie). Les résultats obtenus par western blot et cytométrie en flux donnent des valeurs de sur-expression de l'intégrine très différentes. Cela peut s'expliquer par le choix des anticorps, le snaka51 utilisé en cytométrie est spécifique de la forme active de l'intégrine $\alpha 5$ alors que le AB1928 utilisé en Western Blot est dirigé contre la partie cytoplasmique de l'intégrine et révèle toutes les sous-unités $\alpha 5$ présentes dans les cellules. Les cellules U373 transfectées par l'intégrine $\alpha 5$ expriment donc une très forte proportion de dimère activé à la membrane.

La prolifération du clone D7 est similaire à son contrôle par la méthode du MTS (Figure 18C). Or ce résultat ne reflète pas l'observation des cellules en culture où nous notons une multiplication très lente des cellules U373 sur-exprimant l'intégrine $\alpha 5$. Nous avons donc réalisé un comptage du nombre de cellules après 96h de culture. Par cette méthode nous notons un rapport de prolifération de 1,2 dans le clone D7 et de 2 dans son contrôle (Figure 18D). Les deux méthodes utilisées pour évaluer la prolifération cellulaire ne donnent pas les mêmes résultats. Le clone D7 présente des cellules de taille plus importante que son contrôle. Il est possible que cette différence de taille perturbe les résultats obtenus par la méthode du MTS. Les cellules sur-exprimant la sous-unité $\alpha 5$ sont plus grandes, elles possèdent peut-être plus de mitochondries par cellule. Le MTS évaluant l'activité des enzymes mitochondriales, cette méthode ne permet pas de faire la différence entre un doublement du nombre de cellules ou du nombre de mitochondries.

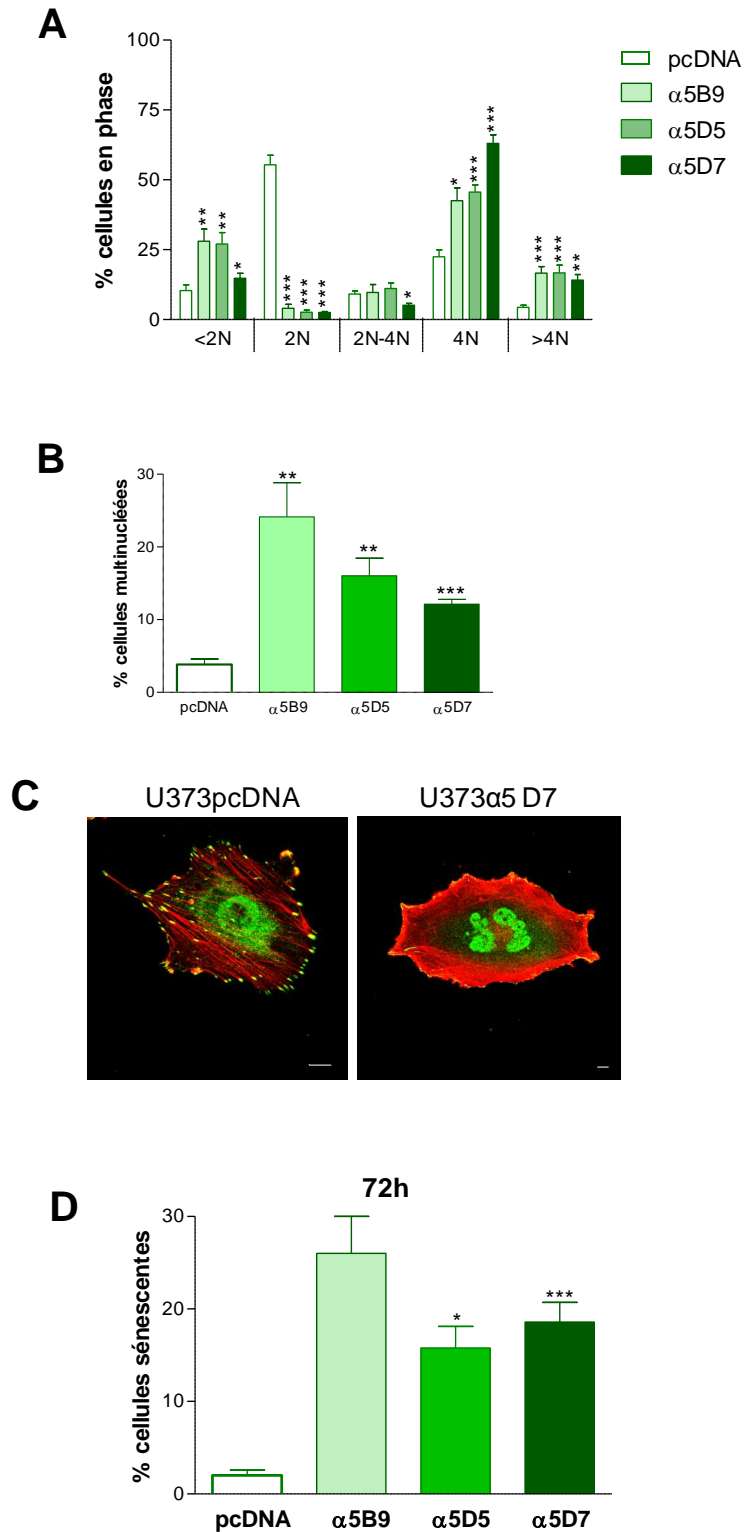


Figure 19: Effets de la sur-expression de l'intégrine $\alpha 5$ dans les cellules U373. Les clones B9, D5 et D7.

A) Analyse de la progression dans le cycle cellulaire des clones et leur contrôle après 72h ($N=5-10$). B) Evaluation du pourcentage de cellules multinucléées par marquage au Hoechst des clones et leur contrôle ($N=4$). C) Co-localisation par immunocytochimie des fibres d'actine (phalloïdine-rhodamine) et de la paxilline (FITC, barre=10 μ m). D) Taux de sénescence basale après 72h des clones et leur contrôle (marquage SA- β -Gal, pcDNA, $N=10$; B9, $N=2$; D5, $N=4$; D7, $N=10$).

La sur-expression de l'intégrine $\alpha 5$ et l'augmentation concomitante de son partenaire $\beta 1$ modifie profondément le comportement des cellules U373. L'analyse de leur progression dans le cycle cellulaire met en évidence une altération de la répartition dans les différentes phases et même un décalage complet du cycle vers un état tétraploïde (Figure 18E). L'analyse du taux de cellules présentant des noyaux multiples ne révèle que $12 \pm 0,6\%$ de cellules multinucléées dans le clone D7 contre $4 \pm 0,8\%$ dans les cellules U373pcDNA (Figure 18F). Pour confirmer que les effets observés sont liés à la sur-expression de la sous-unité $\alpha 5$ nous avons analysé deux autres clones. Les clones B9 et D5 présentent les mêmes caractéristiques que le clone D7, il ne s'agit donc pas d'un effet clonal (Figures 19A-B). La sur-expression de la sous-unité $\alpha 5$ dans les cellules U373 entraîne une altération de la mitose conduisant à l'apparition de cellules multinucléées et un cycle tétraploïde.

La morphologie du clone D7 est très différente de son contrôle, les cellules sont beaucoup plus grandes et possèdent plusieurs noyaux. Le réseau d'actine joue un rôle important dans la mitose, sa réorganisation est à l'origine des changements morphologiques indispensables à la division cellulaire. L'organisation du cytosquelette d'actine dans les cellules U373 sur-exprimant la sous-unité $\alpha 5$ a été caractérisée en utilisant la phalloïdine-rhodamine. Le réseau d'actine se trouve très altéré dans le clone D7 : les fibres d'actine forment un réseau très dense au niveau de la membrane en forme d'anneau. Dans les cellules U373pcDNA nous observons des fibres transversales au bout desquelles se situent les points focaux d'adhérence (co-marquage avec la paxilline-FITC). Dans le clone D7 les points focaux d'adhérence sont plus rares et la paxilline présente une localisation essentiellement nucléaire (Figure 19C).

Des expériences préliminaires montrent que les cellules U373 sur-exprimant $\alpha 5$ présentent une altération de la mitose. Or il a été montré que les cellules multinucléées peuvent être sénescents. Nous avons donc évalué le taux de sénescence prématurée dans ces cellules (Figure 19D). Il apparaît plus élevé dans les trois clones que dans leur contrôle ($26 \pm 4\%$ pour B9, $15,8 \pm 2,3\%$ pour D5, $18,6 \pm 2,1\%$ pour D7 et $2 \pm 0,6\%$ pour pcDNA).

La sur-expression de la sous-unité $\alpha 5$ dans les cellules U373 réduit la prolifération, induit de la sénescence et perturbe leur morphologie.

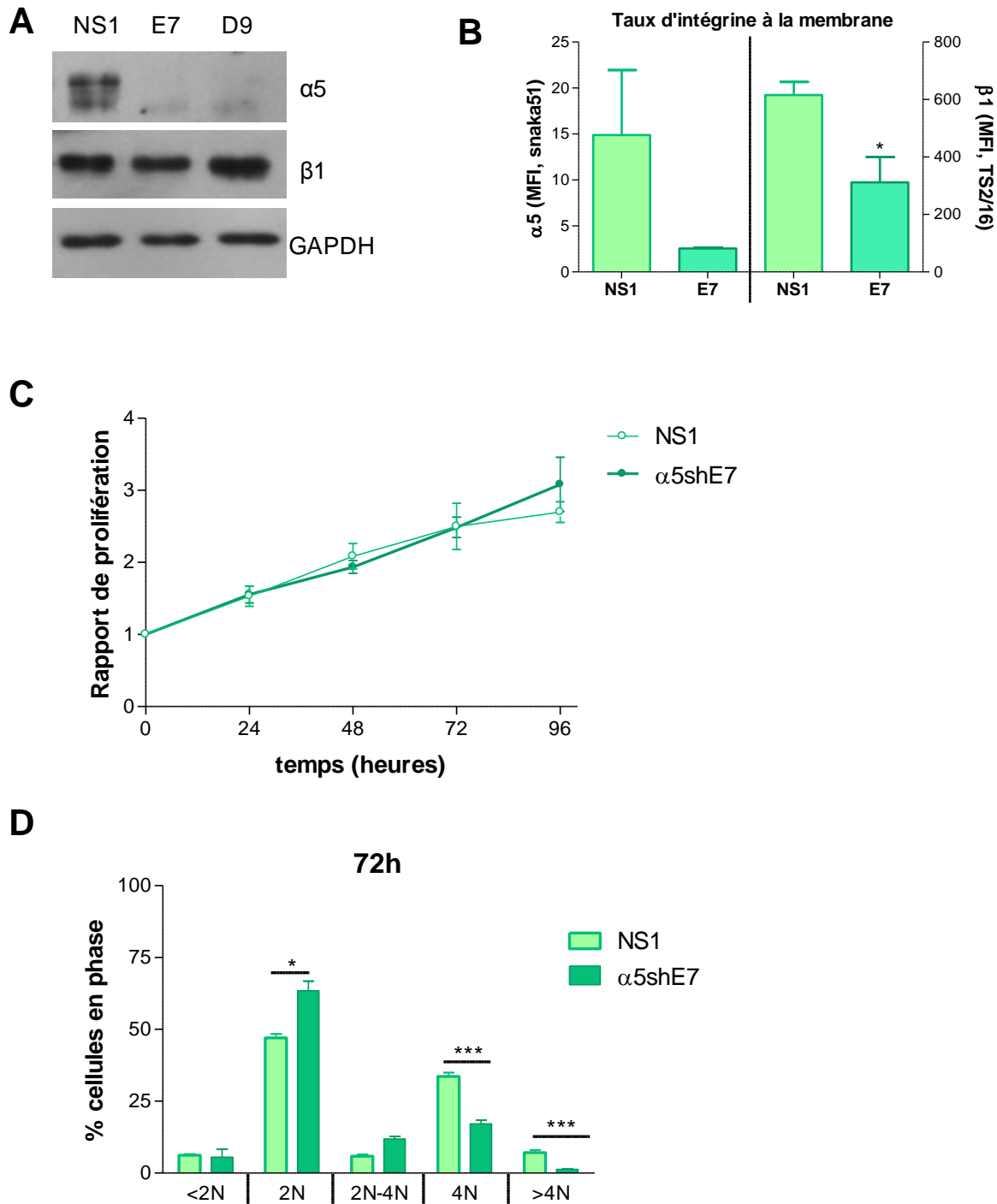


Figure 20: Effets de la sous-expression de l'intégrine $\alpha 5$ dans les cellules U373. Le clone E7.

A) Analyse par western blot de l'expression des sous-unités $\alpha 5$ et $\beta 1$ sur des extraits protéiques totaux des clones U373 transfectés par le plasmide $\alpha 5pSM2$ et leur contrôle (Anticorps dirigés contre la partie cytoplasmique, Ab1928 et Ab1952). La GAPDH sert de référence pour la quantité de protéines déposées. B) Analyse par cytométrie en flux de la quantité d'intégrine exprimée à la membrane dans le clone E7 et son contrôle ($\alpha 5$: snaka51, $\beta 1$: TS2/16, $N=4$). C) Evaluation de la prolifération cellulaire par la méthode au MTS du clone E7 et son contrôle ($N=4$). D) Analyse de la progression dans le cycle cellulaire du clone E7 et son contrôle après 72h ($N=4$).

e. Cellules U373 sous-exprimant $\alpha 5$

Puis nous avons réprimé l'expression de la sous-unité $\alpha 5$ dans les cellules U373. Nous avons sélectionné les clones D9 et E7 qui expriment un taux très faible de la sous-unité $\alpha 5$ comme le révèle les expériences de Western Blot (Figure 20A). Dans le clone E7 la répression de la sous-unité $\alpha 5$ conduit à une diminution du taux d'intégrine $\beta 1$ à la membrane (Figure 20B). La prolifération du clone E7 est identique à son contrôle (Figure 20C). L'analyse de la progression dans le cycle cellulaire révèle une augmentation de la proportion de cellules diploïdes et une diminution du taux de cellules tétraploïdes ou multiploïdes dans le clone E7 par rapport à son contrôle (Figure 20D). Cette modification du cycle cellulaire est inverse à celle observée dans les cellules U373 sur-exprimant la sous-unité $\alpha 5$. Ainsi le taux d'expression de la sous-unité $\alpha 5$ de l'intégrine joue un rôle dans la mitose des cellules U373. Nous ne notons pas de différence morphologique lorsque l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ est réprimée dans les cellules U373 ni d'induction de sénescence.

4) Discussion

Au cours de cette première partie de mon travail l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ endogène a été caractérisée dans trois lignées de glioblastomes *in vitro*. Nous avons ensuite établi de nombreux modèles cellulaires exprimant la sous-unité $\alpha 5$ à différents niveaux pour mettre en relation le taux d'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et l'agressivité des cellules. Cette étape préliminaire nous a permis d'obtenir les modèles d'études nécessaires à l'investigation du rôle de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et à son potentiel de cible thérapeutique dans les glioblastomes.

Taux d'intégrine $\alpha 5\beta 1$ endogène :

Nous avons mis en évidence la présence de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans les trois lignées de glioblastomes étudiées à des taux différents (U87MG>A172>U373). Le panel d'expression d'intégrines est très différent dans les trois lignées cellulaires comme le révèle leur adhérence à divers substrats. Les cellules A172 n'adhèrent qu'à la fibronectine. Les cellules U87MG et U373 expriment des récepteurs au collagène, au VCAM-1, à la vitronectine et à la fibronectine. Les intégrines se liant à la fibronectine sont $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 4\beta 7$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 8\beta 1$, $\alpha V\beta 1$, $\alpha V\beta 3$, $\alpha V\beta 5$, $\alpha V\beta 6$, $\alpha V\beta 8$ et $\alpha IIB\beta 3$. Celles se liant au collagène sont $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha V\beta 3$, $\alpha V\beta 8$, $\alpha 9\beta 1$, $\alpha 10\beta 1$, $\alpha 11\beta 1$ et $\alpha 1\beta 1$. Et le VCAM-1 interagit avec les intégrines $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 4\beta 7$, $\alpha 9\beta 1$ et $\alpha M\beta 2$. Les trois lignées de glioblastomes sont très différentes les unes des autres : panel d'intégrines exprimées, statut des gènes suppresseurs ou promoteurs de

tumeurs et de nombreux autres paramètres cellulaires. Il est donc difficile voire impossible de vouloir attribuer à la seule intégrine $\alpha 5\beta 1$ et à son taux d'expression un rôle prépondérant dans la tumorigénicité des lignées cellulaires explorées *in vitro*. Il nous a semblé judicieux de faire varier le taux d'expression de la sous-unité $\alpha 5$ dans chacune des lignées étudiées pour pouvoir en tirer des conclusions.

Relation entre le taux d'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et l'agressivité tumorale :

Cellules A172 : Au cours de l'exploration de ces cellules nous avons mis en évidence une forme d'intégrine $\beta 1$ atypique en terme de glycosylation, elle est hypersyalylée. J'ai participé à la caractérisation de cette intégrine et de ses propriétés biochimiques. L'expression de cette intégrine atypique complique les interprétations éventuelles quant à l'influence de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ sur la tumorigénicité. En effet, la sur-expression de $\beta 1$ entraîne l'expression d'une intégrine $\alpha 5\beta 1$ normale ainsi qu'une sensibilité des cellules A172 en conditions non-adhérentes. La sur-expression de la sous-unité $\alpha 5$ avec un partenaire atypique ne rend pas compte des effets potentiels de l'intégrine normale. Les cellules A172 se révèlent plus agressives que les cellules U87MG après injection *in vivo* (Belot *et al.*, 2001). Cette différence d'agressivité pourrait être liée à la forme atypique d'intégrine $\alpha 5\beta 1$ exprimée dans ces cellules.

Cellules U87MG : Dans les cellules U87MG, nous avons mis en évidence une relation entre la tumorigénicité *in vitro* et le taux d'intégrine $\alpha 5\beta 1$. Malgré une expression endogène relativement élevée, la sur-expression de la sous-unité $\alpha 5$ seule entraîne une augmentation de la prolifération et de la clonogénicité dans ces cellules. Inversement, la répression de l'expression de la sous-unité $\alpha 5$ induit une baisse de la prolifération et de la clonogénicité ainsi qu'une induction de sénescence. L'apparition spontanée d'un phénotype sénescence a été observée dans 10% des cellules en culture et semble lié à des changements subtils de l'environnement cellulaire. Dans les cellules U87MG, notre hypothèse d'un rôle pro-tumorigène pour l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ semble se confirmer (Figure 21).

Des travaux du laboratoire auxquels j'ai participé, nous ont permis de mettre en évidence une régulation inverse du taux d'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ par un de ces partenaires : la cavéoline-1. Cette protéine est le constituant majeur des cavéoles, elle intervient dans tous les processus du cancer et son expression varie au cours de la progression tumorale. En réduisant le taux de cavéoline-1 dans les cellules U87MG nous avons observé une augmentation du taux d'intégrine $\alpha 5\beta 1$ qui s'accompagne d'une augmentation de la prolifération et de la

clonogénicité. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus pour le clone F8 (U87MG sur-exprimant la sous-unité $\alpha 5$). Un faible taux de cavéoline-1, associé à un fort taux d'intégrine $\alpha 5$ semble représentatif d'une tumeur hautement proliférative et infiltrante. Inversement, la sur-expression de la cavéoline-1 entraîne une diminution de l'expression de la sous-unité $\alpha 5$ ainsi qu'une diminution de la prolifération et de la clonogénicité (Martin *et al.*, 2009). Nos résultats suggèrent donc que la modulation du taux d'expression de la sous-unité $\alpha 5$, de manière directe ou en manipulant la cavéoline-1, modifient l'agressivité tumorale des cellules U87MG *in vitro*.

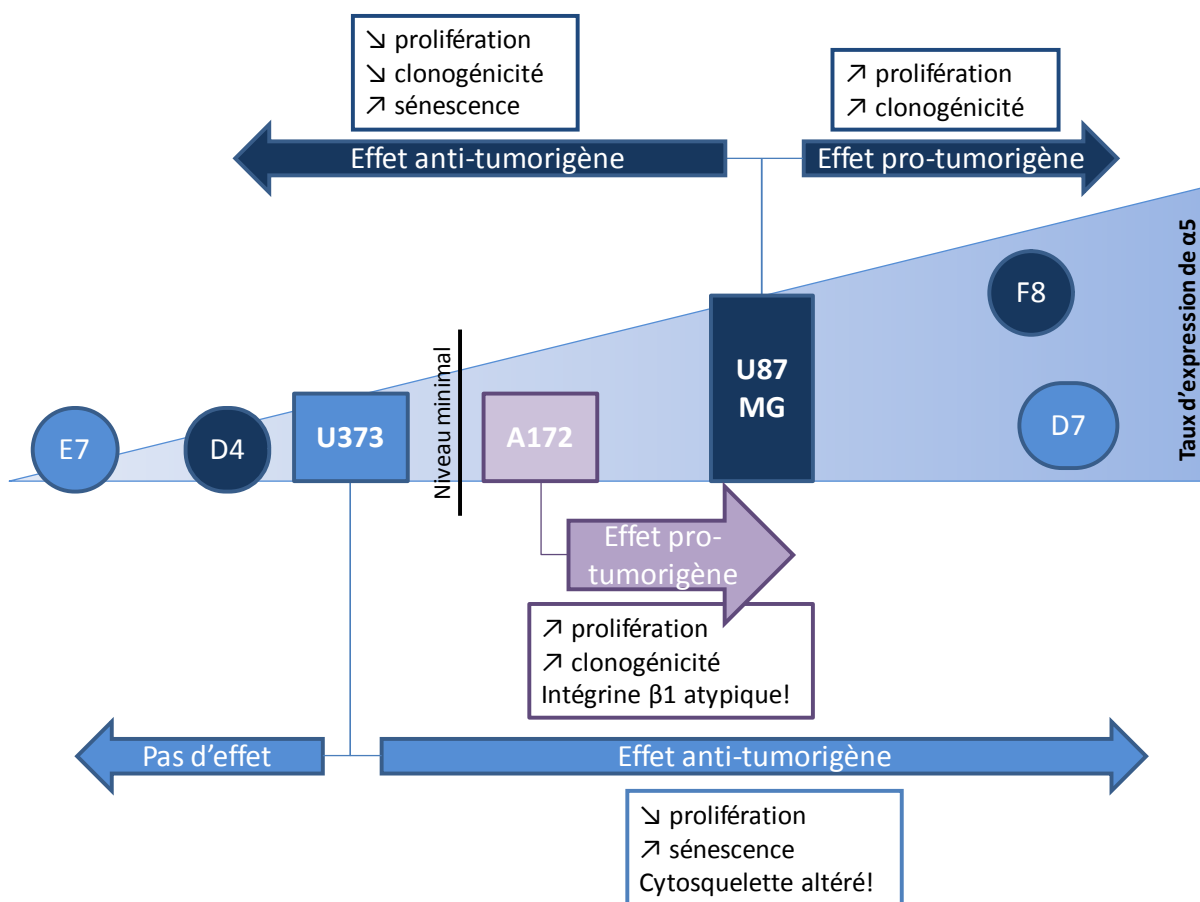


Figure 21 : Bilan des effets de la modulation de l'expression de la sous-unité $\alpha 5$ sur la tumorigénicité des glioblastomes *in vitro*.

Cette relation entre le taux d'intégrine $\alpha 5$ et l'agressivité tumorale a été mise en évidence récemment dans des tumeurs ovariennes (Sawada *et al.*, 2008). En réprimant l'expression de la cadhérine-E par siRNA, les auteurs observent une augmentation du taux d'intégrine $\alpha 5$ ainsi qu'une adhérence plus forte des cellules tumorales ovariennes à la fibronectine (4,7 fois)

et au collagène (1,7 fois). Le potentiel invasif des cellules sur-exprimant la sous-unité $\alpha 5$ est plus élevé. L'inhibition de l'intégrine $\alpha 5$ par un anticorps bloquant conduit à une diminution du nombre de métastases et une inhibition de la croissance tumorale. Ces données traduisent le potentiel pro-tumorigène de l'intégrine $\alpha 5$ dans les tumeurs ovariennes.

De plus, nos travaux suggèrent une relation entre intégrine $\alpha 5\beta 1$ et sénescence prématurée dans ces cellules. La répression de la sous-unité $\alpha 5$ dans les cellules U87MG entraîne une augmentation du taux de sénescence prématurée.

Une étude récente évalue les effets de la délétion de la sous-unité $\beta 1$ dans des cellules pancréatiques normales et tumorales (Kren *et al.*, 2007). Les auteurs démontrent que la perte de l'intégrine $\beta 1$ réduit la prolifération tumorale et la formation de métastases. Ils observent un blocage du cycle cellulaire en phase G0/G1 ainsi qu'une diminution de l'activité métabolique. Les cellules tumorales dont l'expression de la sous-unité $\beta 1$ est réprimée présentent une augmentation de l'activité SA- β -Gal et une induction de la protéine p21. Cette étude implique les intégrines $\beta 1$ dans la prolifération cellulaire et l'induction de sénescence de cellules tumorales pancréatiques. Le dimère $\alpha\beta 1$ régulant le phénomène de sénescence dans ces cellules n'a pas été identifié. Nous proposons l'implication de la sous-unité $\alpha 5$ dans cet effet. Cette sous-unité ne formant qu'un dimère avec la sous-unité $\beta 1$ nous proposons un rôle particulier de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans la sénescence prématurée des glioblastomes.

Cellules U373 : La manipulation des cellules U373 n'a pas confirmé les résultats obtenus dans les cellules U87MG. De façon intéressante la sur-expression de la sous-unité $\alpha 5$ dans les cellules U373 réduit drastiquement la prolifération cellulaire. Il semble d'après nos premiers résultats que ces cellules présentent une mitose altérée. Des travaux récents montrent que les intégrines participent aux différents processus de la division cellulaire (assemblage du fuseau mitotique et des centromères, cytokinèse). L'expression d'une sous-unité $\beta 1$ mutée dans sa queue cytoplasmique et rendue ainsi inactive provoque une augmentation du nombre de cellules bi- et multinucléées suite à des échecs de cytokinèse (Reverte *et al.*, 2006).

Les intégrines subissent un recyclage, une endocytose et un trafic spatial pendant la migration et la division cellulaires. Cette redistribution des intégrines permet de réguler l'activité de kinases et de petites protéines G impliquées dans ces processus. La sous-unité $\beta 1$ est localisée de manière diffuse à la membrane et dans des vésicules pendant la métaphase puis elle se concentre sur la face basale de la cellule pendant la télophase pour enfin atteindre l'anneau de

contraction et participer à la cytokinèse (Pellinen *et al.*, 2008). Les intégrines jouent un rôle mécanique pendant la division cellulaire et participent à l'activation des petites protéines G impliquées dans la réorganisation du cytosquelette.

Dans le clone D7 la sur-expression de la sous-unité $\alpha 5$ modifie profondément l'architecture cellulaire, induit la formation de cellules multinucléées et conduit à l'entrée des cellules en sénescence prématurée. Ce phénomène a déjà été décrit dans des mélanocytes traités par l'EGF. Ces cellules divisent leur contenu nucléaire mais la cytokinèse n'a pas lieu, elles deviennent alors binucléées. Des phénomènes de fusion cellulaire sont également observés. La grande majorité de ces cellules multinucléées se révèlent sénescents (Leikam *et al.*, 2008). Il semble y avoir un lien de causalité entre le phénotype multinucléé et le marquage SA- β -Gal. Ainsi l'induction de sénescence prématurée observée dans les clones U373 sur-exprimant la sous-unité $\alpha 5$ pourrait être liée à ce défaut de cytokinèse entraînant l'apparition de cellules multinucléées.

La modulation du taux d'expression de la sous-unité $\alpha 5$ dans les cellules U87MG et U373 entraîne donc des conséquences importantes sur le comportement des cellules (prolifération cellulaire, clonogénicité, mitose altérée et sénescence prématurée).

Dans la littérature, la participation des intégrines à la régulation du cycle cellulaire se fait de façon indépendante ou par interaction avec des récepteurs à activité tyrosine kinase. Les intégrines interviennent principalement dans le contrôle de la phase G1 en induisant l'expression de la cycline D1 et l'inhibition des protéines p21 et p27 favorisant l'entrée des cellules en phase S (Schwartz et Assoian, 2001 ; Fournier *et al.*, 2008). Dans les deux lignées de glioblastomes étudiées, la répression de l'expression de la sous-unité $\alpha 5$ de l'intégrine (clones U87MG D4 et U373 E7) conduit à un blocage du cycle cellulaire en phase G0/G1. Cela suggère que l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ favorise la transition vers la phase S, ce qui est en accord avec les données bibliographiques.

Outre cet effet sur le cycle cellulaire, nous avons obtenus des résultats apparemment contradictoires dans les deux lignées ce qui rend la relation entre le niveau d'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et l'agressivité cellulaire plus complexe que prévue. Des travaux du laboratoire ont permis de mettre en évidence une relation entre le taux d'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et le grade des tumeurs cérébrales *in vivo*. L'analyse par PCR quantitative des mRNA exprimés dans des biopsies humaines révèle une augmentation de la quantité d'intégrine $\alpha 5\beta 1$ en fonction du grade tumoral (Tableau 7).

| | mRNA/cyclophilin | |
|----------------|----------------------|---------------------|
| | Intégrine $\alpha 5$ | Intégrine $\beta 1$ |
| Cerveau normal | 0.7±0.1 | 0.7±0.0 |
| Oligo A | 1.1±0.2 | 1.4±0.1 |
| Oligo B | 4.5±1.4 | 2.1±0.4 |
| Glioblastomes | 6.7±1.8 | 2.8±0.4 |

Tableau 7 : Quantification de l'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans des biopsies humaines.

Moyenne de la quantité de mRNA par rapport à la cyclophiline dans les biopsies (9 contrôles, 7 OligoA, 9 OligoB et 8 Glioblastomes), détermination par PCR quantitative en temps réel.

En comparant le taux d'expression de la sous-unité $\alpha 5$ dans les lignées et les biopsies de tumeurs cérébrales, nous notons que les lignées se situent parmi les glioblastomes possédant un faible taux d'intégrine.

D'un point de vue *in vivo*, il est connu que l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ présente un taux d'expression plus élevé en périphérie de la tumeur dans les glioblastomes (Van Meter *et al.*, 2006). Il en est de même pour son ligand, la fibronectine, et plusieurs de ses partenaires dont la cavéoline-1. De plus l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ est exprimée sur les néovaisseaux tumoraux (Kim *et al.*, 2000b) et participe aux processus d'invasion et de métastase. Nous avons initié plusieurs collaborations avec les tumorothèques du canceropôle du Grand-Est et des cliniciens afin de confronter nos résultats *in vitro* au comportement tumoral *in vivo*.

Nos résultats obtenus *in vitro* soulèvent le problème de sous-populations différentes de glioblastomes répondant différemment à une variation de l'expression de $\alpha 5$. Les cellules U87MG expriment deux fois plus d'intégrine $\alpha 5\beta 1$ que les cellules U373. La sur-expression de la sous-unité $\alpha 5$ modifie la prolifération des deux lignées cellulaires. Mais la répression de la sous-unité $\alpha 5$ réduit la prolifération des cellules U87MG et n'a pas de conséquences sur les cellules U373. Il se pourrait que le taux d'expression basal de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ influence les conséquences de sa modulation. Cependant cette différence de comportement entre les deux lignées peut être liée à autre chose que l'intégrine $\alpha 5\beta 1$: la localisation du dimère, la composition du complexe membranaire ou l'expression d'une forme mutée d'un partenaire de l'intégrine. Dans cette optique nous envisageons de mener des expériences de transcriptomique à grande échelle (« gene arrays ») pour identifier les gènes modulés par l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. Nous chercherons également à identifier les kinases impliquées dans les effets de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ en utilisant la plateforme à cellules transfectées pour cribler la totalité du kinome par siRNA.

B) L'INTEGRINE $\alpha 5\beta 1$ EN TANT QUE CIBLE THERAPEUTIQUE DANS LES GLIOMES

Dans la partie précédente nous avons mis en évidence l'importance du taux d'expression de la sous-unité $\alpha 5$ sur le comportement des lignées de glioblastomes *in vitro*. Il est cependant plus difficile d'envisager une manipulation de l'expression de la sous-unité $\alpha 5$ dans des tumeurs *in vivo* que d'inhiber la fonction de l'intégrine exprimée dans les tumeurs. Les antagonistes des intégrines ont été développés jusqu'à présent pour leur propriété à inhiber l'adhérence cellulaire. Ils se révèlent efficaces sur l'angiogenèse car les cellules endothéliales meurent par anoïkis lorsqu'elles sont détachées. Les cellules tumorales étant résistantes à cette forme de mort cellulaire nous pouvons nous interroger sur les effets de tels antagonistes sur la croissance tumorale. Cela pose également la question de la relation entre l'adhérence et la prolifération dans les glioblastomes. Pour y répondre nous avons caractérisé les effets d'un antagoniste sélectif de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, le SJ749, et d'autres antagonistes potentiels sur les lignées de glioblastomes dont nous disposons.

1) Etude d'un antagoniste spécifique de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$: le SJ749

Lorsque nous avons débuté ce travail le SJ749 était le seul antagoniste non-peptidique décrit comme spécifique de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. Les données bibliographiques sur cet antagoniste ne sont pas nombreuses et elles concernent presque exclusivement les cellules endothéliales. Le SJ749 inhibe de manière spécifique l'adhérence cellulaire à la fibronectine des cellules endothéliales HUVECS avec une CI_{50} de 340nM et de 800nM pour des cellules tumorales HT29 (Kim *et al.*, 2000a). Cet antagoniste présente des valeurs de CI_{50} supérieures à 10 μ M pour l'adhérence au collagène et à la vitronectine (Tableau8). Il est également capable d'inhiber la migration de cellules endothéliales (Kim *et al.*, 2000b). *In vivo* il réduit l'angiogenèse stimulée par le bFGF et diminue également la croissance de fragments tumoraux placés sur la membrane chorioallantoïque d'œufs embryonnés de poules.

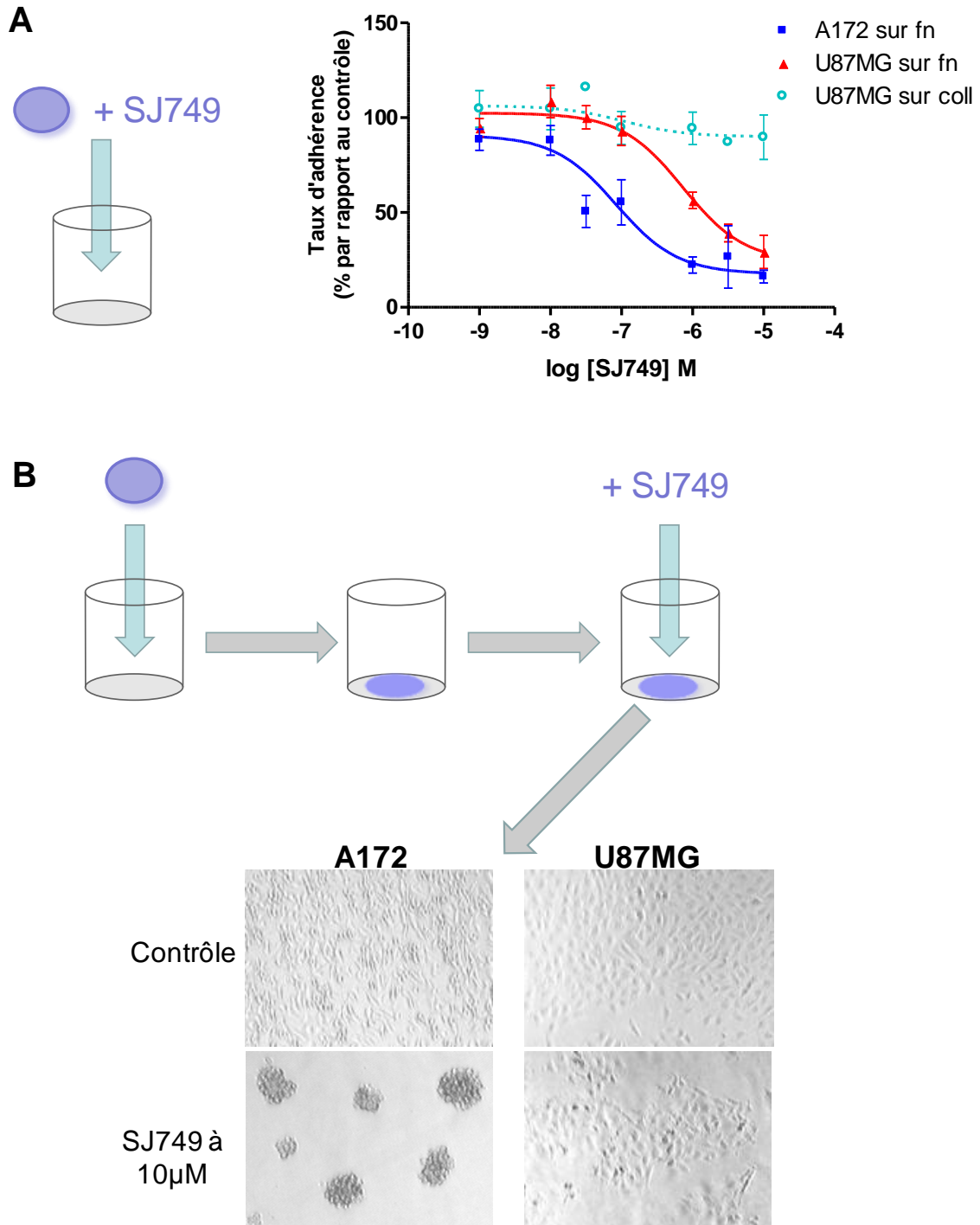


Figure 22: Effets du SJ749 sur l'adhérence cellulaire.

A) Courbe dose-réponse du SJ749 sur l'adhérence cellulaire des cellules A172 et U87MG ($N=3$ pour COLL et 6 pour FN). L'antagoniste est ajouté avant attachement des cellules. B) Illustration des effets morphologiques du SJ749 sur les cellules A172 et U87MG lorsqu'il est ajouté sur des cellules attachées.

a. Effets sur l'adhérence cellulaire

Nous avons étudié les effets du SJ749 sur l'adhérence cellulaire pour déterminer sa spécificité pour l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans nos modèles cellulaires. Le SJ749 inhibe de manière dose-dépendante l'adhérence des cellules A172 et U87MG à la fibronectine (Figure 22A). Les CI_{50} obtenues sont de 84nM pour les cellules A172 et 630nM pour les cellules U87MG. Par contre le SJ749 est incapable d'inhiber l'adhérence des cellules U87MG au collagène (substrat non reconnu par l'intégrine $\alpha 5\beta 1$). L'observation des cellules traitées par 10 μ M de SJ749 après leur adhérence dans les boîtes de culture, révèle un comportement différent des deux lignées. Les cellules A172 sont détachées par l'antagoniste et forment des sphéroïdes alors que les cellules U87MG restent adhérentes et bien étalées (Figure 22B).

Le SJ749, antagoniste spécifique de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ inhibe l'adhérence des lignées de glioblastomes à la fibronectine.

| | Affinité du SJ749 (CI_{50}) | | |
|---------------------|---------------------------------|-------------------------------|---------------------|
| | Protéine purifiée | Adhérence | Résultats |
| Fibronectine | 1,8nM | 800nM (HT29) | 84nM (A172) |
| | | 340nM (HUVEC) | 630nM (U87MG) |
| Vitronectine | 1 μ M | >10 μ M (HT29 et SK-BR-3) | ? |
| Collagène | | >10 μ M (HUVEC et HT29) | >10 μ M (U87MG) |

Tableau 8 : Bilan des données bibliographiques et des résultats obtenus pour l'affinité du SJ749 (Kim *et al.*, 2000a).

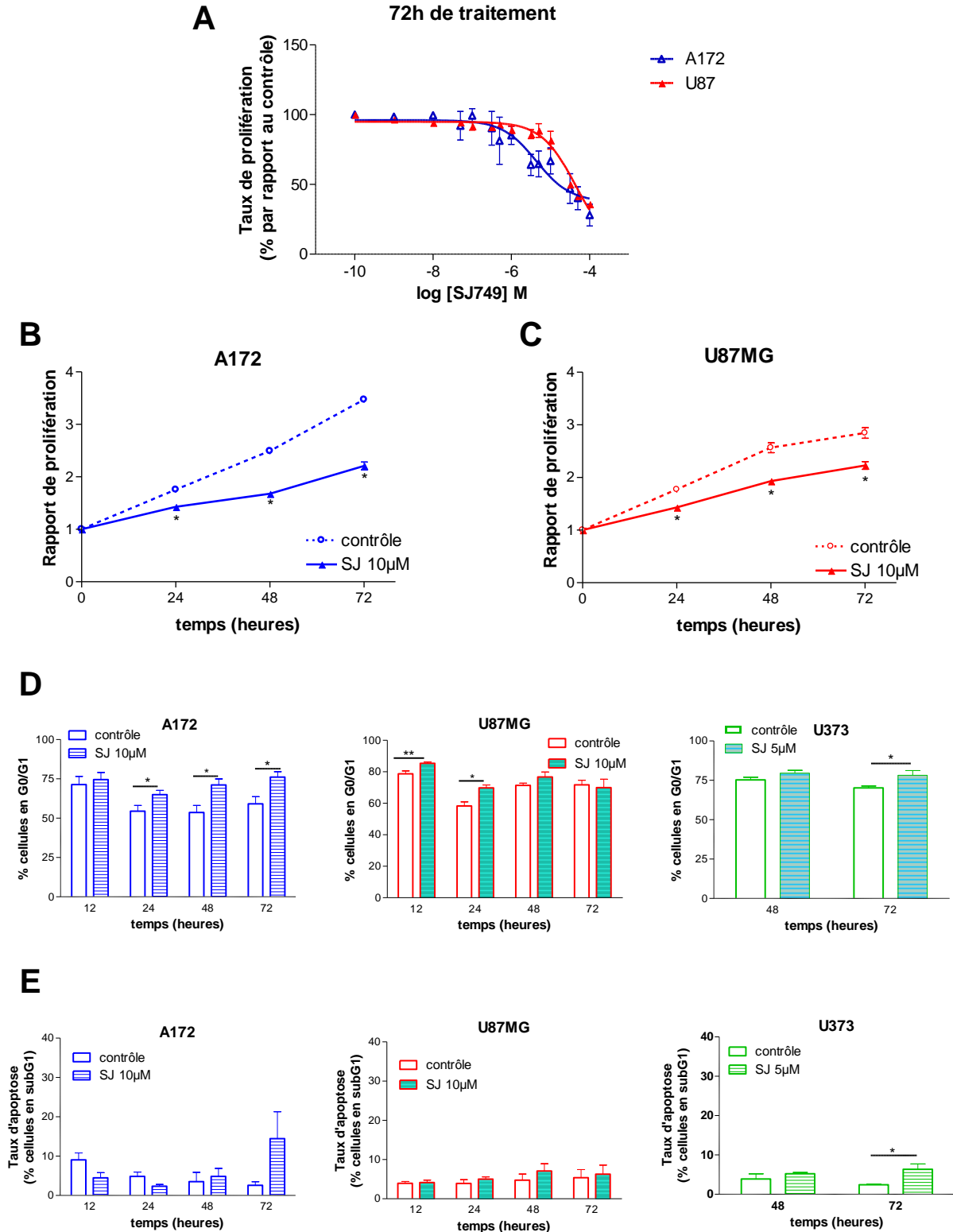


Figure 23: Effets cellulaires du SJ749.

A) Courbe dose-réponse du SJ749 sur la prolifération des cellules A172 et U87MG ($N=3$). B-C) Evaluation de la prolifération cellulaire par la méthode au MTS des cellules A172 (B) ou U87MG (C) traitées ou non par le SJ749 à $10\mu\text{M}$ ($N=3-9$). L'antagoniste est ajouté avant attachement des cellules. D) Analyse de la répartition en phase G0/G1 des cellules traitées ou non par le SJ749 à $10\mu\text{M}$: cellules A172 ($N=4$), cellules U87MG ($N=4$) et cellules U373 ($N=4$). E) Analyse de l'apoptose (pourcentage de cellules en subG1): cellules A172 ($N=4$), cellules U87MG ($N=4$) et cellules U373 ($N=4$).

b. Effets sur la prolifération cellulaire

Le SJ749 agit bien comme antagoniste de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ en terme d'adhérence cellulaire à la fibronectine dans nos modèles. Nous avons évalué ses effets sur la prolifération cellulaire. Dans un premier temps nous avons ajouté l'antagoniste sur des cellules en suspension. Pour les cellules A172 qui restent détachées par action du SJ749, la courbe dose-réponse obtenue est une sigmoïde avec une CI50 de $4,34\mu\text{M}$ (valeur 52 fois plus élevée que pour l'adhérence à la fibronectine). Et dans le cas des cellules U87MG qui adhèrent malgré la présence du SJ749 nous obtenons une CI50 de $42,8\mu\text{M}$ (Figure 23A). Le SJ749 est capable d'inhiber la prolifération cellulaire quelque soit l'état d'attachement des cellules mais les doses nécessaires pour obtenir un effet sont beaucoup plus fortes que dans le cas de l'adhérence. Nous notons cependant la même différence entre les CI50 obtenues dans les deux types cellulaires et dans les deux tests, les cellules U87MG présentent une CI50 dix fois plus élevée que les cellules A172.

A $10\mu\text{M}$, le SJ749 inhibe la prolifération des cellules A172 et U87MG de manière significative en fonction du temps (Figures 23B-C). Les effets de l'antagoniste augmentent dans le temps pour les cellules A172, 19% d'inhibition après 24h, 33% après 48h et 36% après 72h. Dans les cellules U87MG l'inhibition de prolifération est constante au cours du temps (environ 20%).

La méthode du MTS ne permet pas de faire la part des choses entre les différentes composantes de la croissance cellulaire (apoptose, quiescence, prolifération). Nous avons donc étudié les effets du SJ749 sur la progression dans le cycle cellulaire. Le SJ749 induit un blocage en phase G0/G1 dans les trois lignées cellulaires. Ce blocage est persistant dans les cellules A172, transitoire dans les cellules U87MG et U373 (Figures 23D). Cette différence de cinétique peut expliquer les effets obtenus en prolifération. En effet les cellules A172 démontrent un effet croissant du SJ749 sur la prolifération au cours du temps ce qui est corroboré par un blocage continu en phase G0/G1. Par opposition les cellules U87MG démontrent une inhibition constante de leur prolifération de 20% ce qui peut s'expliquer par le blocage du cycle par le SJ749 aux temps courts puis le rétablissement d'un cycle normal.

Nous avons également évalué les effets du SJ749 sur l'apoptose et nous notons que l'antagoniste est incapable d'induire la mort des glioblastomes comme le révèle l'analyse de la fraction de cellules en subG1 (Figure 23E). Dans les cellules U373 nous notons une faible induction d'apoptose après 72h de traitement. Le SJ749 inhibe la prolifération cellulaire des glioblastomes in vitro quelque soit leur état d'attachement et sans induire de mort cellulaire.

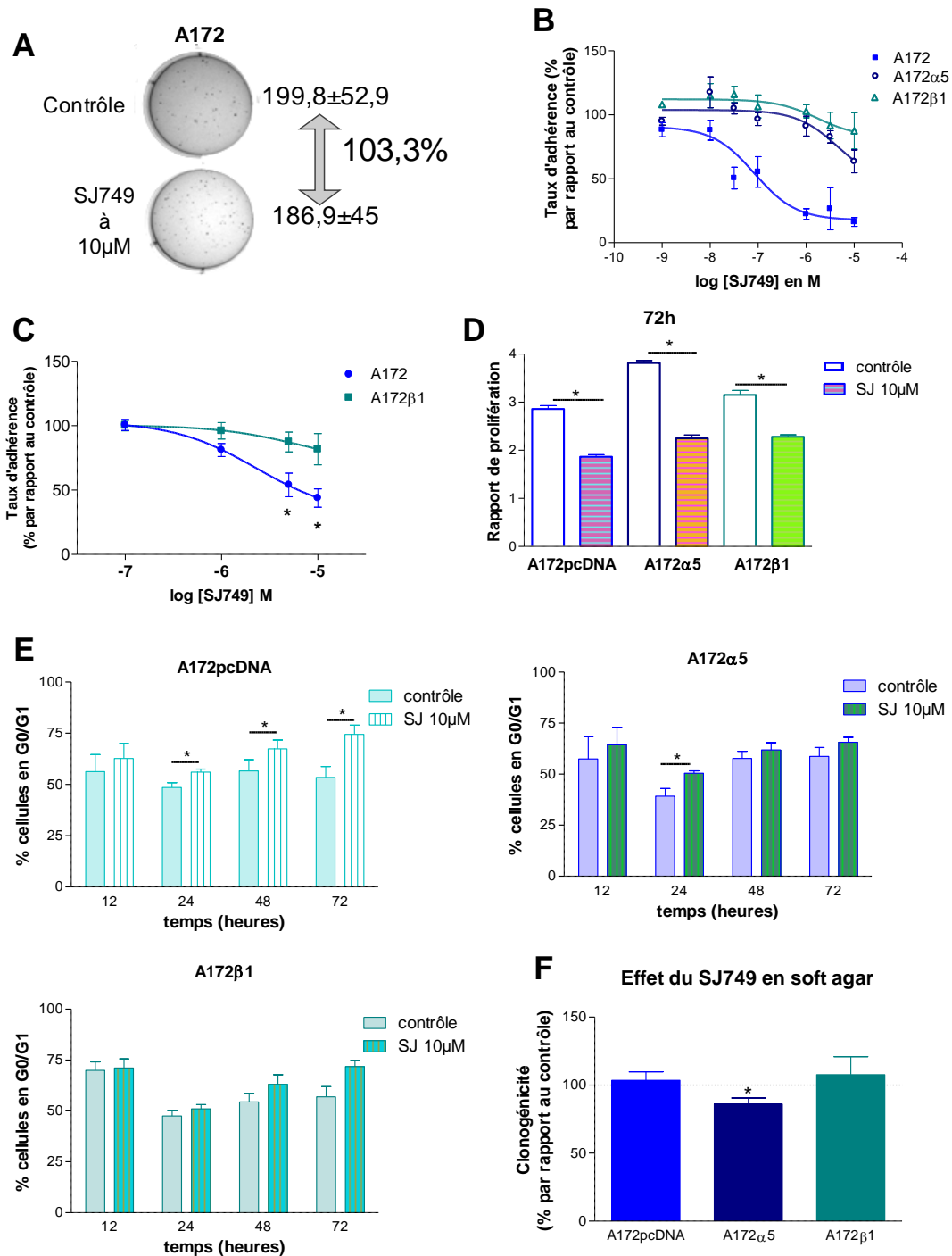


Figure 24: Effets cellulaires du SJ749 sur les cellules A172.

A) Clonogénicité en milieu semi-solide, pourcentage du nombre de clones dans les puits traités par le SJ749 à 10µM par rapport au contrôle ($N=11$). Illustration soft-agar. B) Courbe dose-réponse du SJ749 sur l'adhérence cellulaire à la fibronectine des cellules A172 sur-exprimant l'intégrine $\alpha5\beta1$ ($N=5$). C) Détachement cellulaire par le SJ749 des cellules A172 sur-exprimant la sous-unité $\beta1$ et leur contrôle attachées à la fibronectine ($N=5$). D) Evaluation de la prolifération cellulaire par la méthode au MTS des cellules A172 sur-exprimant l'intégrine $\alpha5\beta1$ traitées ou non par le SJ749 à 10µM pendant 72h ($N=2$). E) Analyse de la répartition en phase G0/G1 des cellules A172 sur-exprimant l'intégrine $\alpha5\beta1$ traitées ou non par le SJ749 à 10µM pendant 72h ($N=3-6$). F) Clonogénicité en milieu semi-solide des cellules A172 sur-exprimant l'intégrine $\alpha5\beta1$, pourcentage du nombre de clones dans les puits traités par le SJ749 à 10µM par rapport au contrôle ($N=6$).

2) Les cellules A172 et le SJ749

Nous avons approfondi l'étude des effets de l'antagoniste dans les cellules A172 exprimant peu d'intégrine $\alpha 5\beta 1$ (avec une sous-unité $\beta 1$ atypique) et étant détachées par le SJ749.

a. Culture tridimensionnelle

Précédemment nous avons montré que le SJ749 était capable d'inhiber la prolifération cellulaire dans un modèle bidimensionnel et ce en bloquant le cycle cellulaire en phase G0/G1. Nous avons évalué les effets de cette molécule dans un modèle de culture tridimensionnel plus représentatif des conditions *in vivo* : le soft agar. Les cellules sont placées dans un milieu semi-solide en présence ou en absence d'antagoniste et les colonies s'étant formées après deux semaines sont dénombrées. Le SJ749 n'a aucun effet sur la formation de colonies de cellules A172 en soft-agar (Figure 24A). Cette absence d'effet peut être liée à la faible quantité d'intégrine $\alpha 5\beta 1$ exprimée dans ces cellules.

b. Le SJ749 et le taux d'intégrine : adhérence

Nous avons analysé les effets du SJ749 dans les cellules A172 transfectées par l'une ou l'autre des sous-unités de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. En réalisant une courbe dose-réponse du SJ749 sur l'adhérence cellulaire à la fibronectine nous observons un déplacement de la courbe vers la droite dans les cellules A172 $\alpha 5$ et A172 $\beta 1$ par rapport à leur contrôle (Figure 24B). Ces cellules transfectées sont moins sensibles au SJ749. Cette perte de sensibilité s'explique par la plus grande quantité d'intégrine $\alpha 5\beta 1$ exprimée dans les cellules A172 $\alpha 5$ mais dans le cas des cellules A172 $\beta 1$ il est difficile de faire la part des choses entre la quantité d'intégrine et l'expression d'une sous-unité $\beta 1$ normale.

Après 24h de traitement les cellules A172 et les cellules transfectées sont détachées par le SJ749. Cependant il semble y avoir une différence de cinétique entre les cellules A172 et les cellules sur-exprimant l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. En quantifiant le nombre de cellules détachées après 4h de traitement par l'antagoniste nous notons que les cellules A172 $\beta 1$ sont moins sensibles au SJ749 (Figure 24C). Ceci peut être lié à l'expression d'une intégrine $\alpha 5\beta 1$ normale ou au taux d'intégrine.

c. Le SJ749 et le taux d'intégrine : prolifération

Les pourcentages d'inhibition de prolifération observés après 72h de traitement pas 10 μ M de SJ749 sont différents dans les cellules sur-exprimant l'intégrine par rapport aux cellules contrôles transfectées par le plasmide vide : -35% pour A172pcDNA, -41% pour A172 $\alpha 5$ et -

27% pour A172 β 1 (Figure 24D). Il semble que l'antagoniste ait plus d'effet sur les cellules A172 sur-exprimant la sous-unité α 5. La cinétique des effets du SJ749 sur la progression dans le cycle cellulaire était différente entre les cellules A172 et U87MG (Figure 23). Dans les cellules A172 sur-exprimant l'intégrine nous mettons en évidence une cinétique différente du contrôle (Figure 24E). Les cellules A172pcDNA, comme les cellules A172 non transfectées, sont bloquées en phase G0/G1 dès 24h et jusqu'à 72h. Les cellules A172 α 5 sont bloquées en phase G0/G1 après 24h puis retrouvent un cycle normal. Les cellules A172 β 1 ne présentent pas de blocage du cycle cellulaire. Ainsi les effets du SJ749 sur les cellules A172 α 5 se rapprochent de ceux observés dans les cellules U87MG. Le taux d'expression de la sous-unité α 5 de l'intégrine α 5 β 1 régit les effets du SJ749 dans un modèle de prolifération bidimensionnel.

d. Le SJ749 et le taux d'intégrine : clonogénicité

Le SJ749 affecte la prolifération des cellules A172 dans un modèle bidimensionnel mais pas dans un modèle tridimensionnel. Le SJ749 réduit la formation de colonies en soft-agar dans les cellules A172 sur-exprimant la sous-unité α 5 (Figure 24F). La sur-expression de la sous-unité β 1 n'a aucun effet. Le niveau d'expression de la sous-unité α 5 influence les effets du SJ749 dans un modèle de culture tridimensionnel.

La sur-expression de la sous-unité α 5 de l'intégrine dans les cellules A172 potentialise les effets anti-prolifératifs du SJ749. Le SJ749 détache les cellules A172 α 5 et A172 β 1 tout comme les cellules non transfectées. Il semble donc que les effets cellulaires de l'antagoniste sur la prolifération ne sont pas liés à ses effets sur l'adhérence.

3) Les cellules U87MG et le SJ749

Le SJ749 inhibe la prolifération des cellules U87MG dans un modèle bidimensionnel. Ces cellules expriment un fort taux d'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et ne sont pas détachées de leur matrice par l'antagoniste.

a. Clonogénicité

Nous avons comparé les effets du SJ749 sur la clonogénicité des cellules U87MG en utilisant deux modèles différents. Dans le modèle tridimensionnel (soft-agar), le SJ749 à 10 μ M inhibe la formation de colonies de cellules U87MG de 25% (Figure 25A). En plaçant les cellules à faible densité et en les traitant par le SJ749 dans un modèle bidimensionnel nous observons également une diminution de la clonogénicité de 45% (Figure 25B). Le SJ749 inhibe la clonogénicité des cellules U87MG dans les modèles bi- et tridimensionnels. Ces deux modèles d'étude ne mettent en jeu qu'une faible quantité de fibronectine car les cellules sont cultivées en faible taux de sérum ou dans un milieu semi-solide.

b. Le SJ749 et la fibronectine : prolifération

Toutes les expériences précédentes ont été réalisées dans des conditions de faible quantité de fibronectine or le ligand endogène de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ est exprimé dans le cerveau et pourrait donc interférer avec les effets de l'antagoniste.

L'inhibition de prolifération induite par le SJ749 diminue en présence de quantité croissante de fibronectine. En absence de fibronectine le SJ749 inhibe la prolifération des cellules U87MG de 20% après 72h de traitement. En présence de 1 μ g/ml de fibronectine le pourcentage d'inhibition est de 13% et en présence de 10 μ g/ml de fibronectine les effets du SJ749 sont abolis (Figure 25C). L'analyse de la progression dans le cycle cellulaire ne révèle aucun blocage en phase G0/G1 par le SJ749 lorsque les cellules U87MG sont placées sur fibronectine alors qu'en absence de substrat nous notons un blocage transitoire du cycle (Figure 25D).

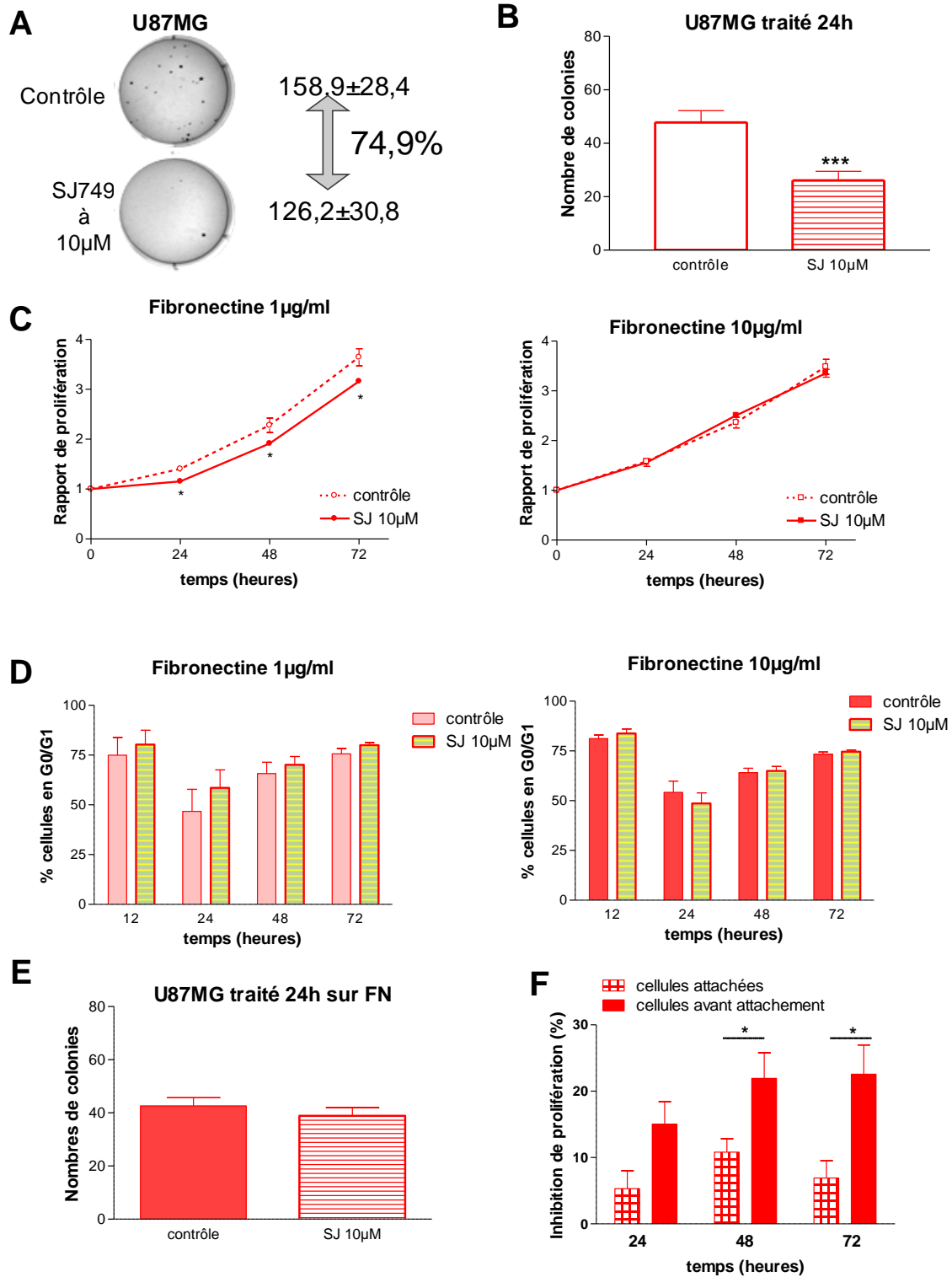


Figure 25 : Effets cellulaires du SJ749 sur les cellules U87MG.

A) Clonogénicité en milieu semi-solide, pourcentage du nombre de clones dans les puits traités par le SJ749 à 10µM par rapport au contrôle ($N=11$). Illustration soft-agar. B) Clonogénicité des cellules U87MG traitées 24h avec du SJ749 à 10µM, nombre de colonies ($N=11$). C) Evaluation de la prolifération cellulaire par la méthode au MTS des cellules sur fibronectine traitées ou non par le SJ749 à 10µM ($N=4$). D) Analyse de la répartition en phase G0/G1 des cellules sur fibronectine traitées ou non par le SJ749 à 10µM ($N=2-8$). E) Clonogénicité des cellules U87MG sur fibronectine traitées 24h avec du SJ749 à 10µM, nombre de colonies ($N=11$). F) Pourcentage d'inhibition de la prolifération en présence de 5µM de SJ749 en fonction de l'état d'attachement des cellules au moment de l'ajout de l'antagoniste ($N=5$).

c. Le SJ749 et la fibronectine : clonogénicité

La présence de fibronectine diminue également les effets du SJ749 sur la clonogénicité des cellules U87MG. En absence de fibronectine le nombre de colonies est diminué de 45% par le SJ749 à 10 μ M alors qu'en présence de 10 μ g/ml de fibronectine nous ne notons pas de différence de nombre de colonies entre le contrôle et le SJ749 à 10 μ M (Figure 25E).

Le SJ749 entre en compétition avec la fibronectine pour inhiber l'adhérence cellulaire. Cependant les effets cellulaires du SJ749 s'atténuent en présence de forte quantité de fibronectine. Il semble que le SJ749 ait moins d'affinité pour l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ que la fibronectine, il serait donc plus actif sur l'intégrine libre.

d. Le SJ749 et l'attachement cellulaire

Nous avons comparé les effets du SJ749 dans différentes conditions de culture. L'antagoniste est ajouté directement sur les cellules avant attachement ou sur des cellules attachées. Le SJ749 à 5 μ M exerce un effet anti-prolifératif plus important lorsqu'il est ajouté à des cellules avant leur attachement (Figure 25F). Aux différents temps de traitement, aucune cellule détachée n'est observée ce qui signifie que les cellules adhèrent malgré la présence de l'antagoniste.

Ce résultat suggère que le SJ749 stabilise la conformation inactive de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ ou induit la transition vers une conformation inactive. La conception d'antagonistes des intégrines est actuellement basée exclusivement sur leur capacité à inhiber l'adhérence ce qui ne serait pas le plus efficace dans le cadre des cellules tumorales. En effet les cellules tumorales, contrairement aux cellules endothéliales ne meurent en général pas par anoïkis et donc une molécule inhibant l'adhérence ne possédera pas forcément une activité anti-tumorale. Pour une thérapie anti-tumorale il serait plus avantageux de caractériser des antagonistes capables de bloquer les signaux de survie induits par l'intégrine et ainsi d'avoir une activité anti-proliférative.

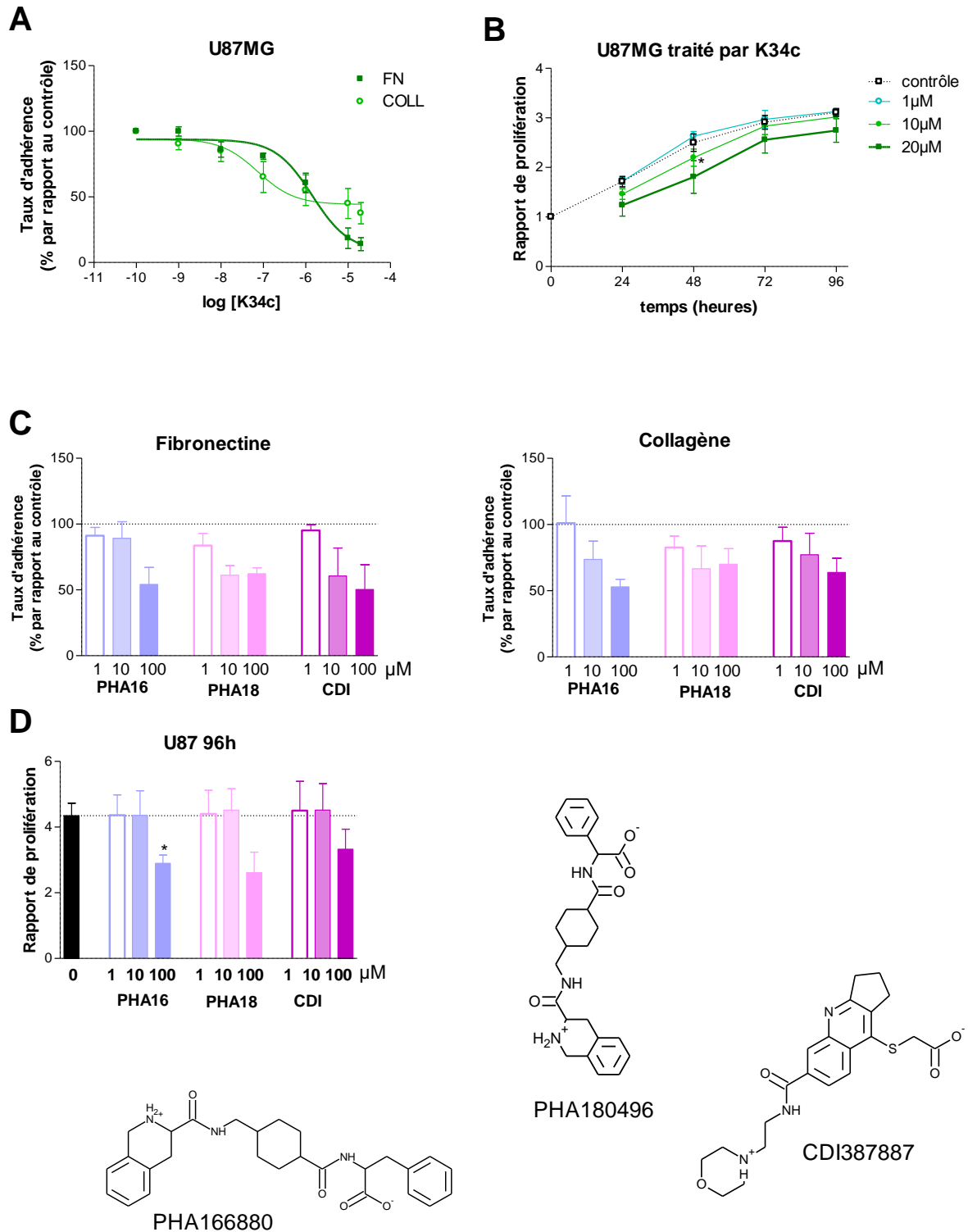


Figure 26: Effets d'autres antagonistes de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$.

A) Courbe dose-réponse du K34c sur l'adhérence cellulaire des U87MG à la fibronectine et au collagène ($N=3$). B) Evaluation de la prolifération cellulaire par la méthode au MTS des cellules U87MG traitées par différentes doses de K34c ($N=3$). C) Analyse de l'adhérence des cellules U87MG à la fibronectine et au collagène après incubation de 30min avec des doses croissantes de trois antagonistes de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ sélectionnés par criblage virtuel dans le site de liaison de l'intégrine dont les formules chimiques sont représentées sur la droite (PHA166880, PHA180496, CDI387887, $N=3-4$). D) Evaluation de la prolifération cellulaire par la méthode au MTS des cellules U87MG traitées par les trois antagonistes pendant 96h ($N=3$).

4) Etudes d'autres antagonistes spécifiques de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$

Au cours de ma thèse, l'intérêt pour l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ s'est accru et la caractérisation d'antagonistes spécifiques est en plein essor. Parmi les travaux récents dans ce domaine nous pouvons citer les molécules du groupe pharmaceutique Jerini et ceux du Pr Kessler.

a. Molécule K34c

Récemment une publication du groupe de Kessler a décrit une série de composés présentant des propriétés antagonistes des intégrines $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha v\beta 3$ (Heckmann *et al.*, 2008). Leur synthèse est basée sur un squelette tyrosine et sa spécificité sur les différences de résidus impliqués dans les sites de liaison des intégrines $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha v\beta 3$. Parmi les molécules décrites dans ce papier, le K34c (2-(S)-(2,6-diméthylbenzamido)-3-(4-[3-(pyridin-2-ylamino)-propoxy]phenyl) propionic acid) présente la plus forte sélectivité pour l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ par rapport à $\alpha v\beta 3$ (CI50=3,1nM pour $\alpha 5\beta 1$ /FN et 1624nM pour $\alpha v\beta 3$ /VN). Une collaboration avec des chimistes de la Faculté de Pharmacie (Dr D Bonnet) nous a permis d'obtenir ce composé K34c. Nous avons évalué son efficacité dans nos modèles cellulaires.

Le K34c inhibe l'adhérence des cellules U87MG à la fibronectine avec une CI50 égale à 1,4 μ M (Figure 26A). Cette valeur est deux fois supérieure à celle du SJ749. Au contraire des résultats obtenus avec le SJ749, ce composé inhibe l'adhérence des cellules U87MG au collagène. Les effets de la molécule sur les intégrines au collagène n'ont pas été explorés dans la publication initiale. Ce composé apparaît moins spécifique de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ que le composé de référence, le SJ749.

En terme de prolifération cellulaire, la molécule K34c inhibe la croissance des cellules U87MG à partir d'une dose de 10 μ M (Figure 26B). Cette molécule présente les mêmes effets que la molécule de référence (SJ749) sur la prolifération cellulaire à une dose deux fois plus élevée. Cette différence de dose efficace peut être liée à la différence d'affinité du K34c par rapport au SJ749 pour la fibronectine mesurée par l'adhérence cellulaire ou à sa moindre spécificité pour l'intégrine $\alpha 5\beta 1$.

La molécule K34c et le SJ749 feront l'objet d'études complémentaires dans la suite de ce travail.

b. Recherche d'antagonistes par criblage *in silico*

Nous avons collaboré avec un bioinformaticien (Dr D Rognan) pour trouver des antagonistes potentiels de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ par criblage *in silico* d'une banque de molécules commerciales.

Le criblage est basé sur un calcul de similarité de forme et de points pharmacophoriques avec la conformation du SJ749 lié dans la poche de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. Six molécules sont ressorties du criblage, elles ont tout d'abord été testées sur l'adhérence à la fibronectine et au collagène. Nous avons retenu trois molécules actives : PHA166880, PHA180496 et CDI387887. L'inhibition de l'adhérence des cellules U87MG sur la fibronectine et le collagène par ces molécules a été déterminée (Figure 26C). Nous notons que les trois molécules testées inhibent l'adhérence à la fibronectine à des doses supérieures ou égales à 10 μ M. Elles inhibent également l'adhérence au collagène. Ces molécules ne démontrent pas d'activité spécifique sur l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et sont actives uniquement à fortes doses.

Nous avons ensuite analysé leur effet sur la prolifération cellulaire. Seule la molécule PHA166680 réduit de manière significative la prolifération des cellules U87MG à la dose de 100 μ M (Figure 26D). Les deux autres molécules testées ne présentent aucun effet significatif. Ces molécules sélectionnées par criblage virtuel ne montrent pas de spécificité pour l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et sont inefficaces sur la prolifération cellulaire. Elles seront abandonnées pour la suite de l'étude.

5) Discussion

Dans cette deuxième partie nous avons montré que l'inhibition de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ par des antagonistes spécifiques aboutit à une inhibition de l'adhérence cellulaire à la fibronectine mais aussi à une diminution de la prolifération cellulaire des glioblastomes *in vitro*.

Dissociation des effets des antagonistes sur l'adhérence et la prolifération cellulaires :

Le SJ749 est capable d'inhiber la prolifération des cellules A172 et U87MG alors qu'il ne détache que les cellules A172. Il semble que l'effet anti-prolifératif du SJ749 soit indépendant de son effet sur l'adhérence cellulaire. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse qu'un antagoniste de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ efficace dans le cadre d'une thérapie anti-tumorale ne doit pas nécessairement inhiber l'adhérence des cellules.

Nous notons que les effets sur l'adhérence cellulaire diminuent lorsque le taux de la sous-unité $\alpha 5$ de l'intégrine augmente alors que les effets du SJ749 sur la prolifération et la clonogénicité semblent plus importants lorsque le taux d'intégrine exprimé par la cellule augmente (Maglott *et al.*, 2006 ; Bartik *et al.*, 2008). Ceci est particulièrement apparent dans le modèle de culture tridimensionnel. Le Tableau 8 récapitule l'évolution des effets du SJ749 en fonction du taux d'expression de la sous-unité $\alpha 5$. Les cellules A172 exprimant peu

d'intégrine $\alpha 5\beta 1$ de façon endogène sont moins sensibles au SJ749 que les cellules U87MG. La sensibilité au SJ749 est rétablie lorsque nous sur-exprimons la sous-unité $\alpha 5$ dans les cellules A172. Les travaux effectués au laboratoire sur les cellules U87MG déplétées en cavéoline-1 confirment cette hypothèse. En effet, la déplétion en cavéoline-1 induit une augmentation de l'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans ces cellules qui sont sensibilisées à l'effet anti-clonogénique du SJ749 (Martin *et al.*, 2009). Il semble donc y avoir une dissociation des deux actions de l'antagoniste. Pour inhiber l'adhérence cellulaire à la fibronectine le SJ749 entre en compétition avec la fibronectine et serait plus efficace lorsque la liaison met en jeu peu d'intégrine. Par contre, l'inhibition par le SJ749 de voies de signalisation dépendantes de l'intégrine et impliquées dans les phénomènes de prolifération est plus efficace lorsque le taux d'intégrine $\alpha 5\beta 1$ recruté est important.

La recherche actuelle d'antagonistes des intégrines se base sur leur capacité à inhiber l'adhérence. Cette méthode ne semble pas opportune dans le cas d'une thérapie anti-tumorale car les effets du SJ749 sur l'adhérence et la prolifération sont dissociés. Le SJ749 peut inhiber la prolifération des cellules tumorales sans les détacher. De plus, contrairement aux cellules endothéliales, les cellules tumorales ne meurent pas par anoïkis lorsqu'elles n'adhèrent pas à leur matrice (Frisch et Srean, 2001). Ainsi le test d'adhérence ne constitue pas le meilleur test pour évaluer le potentiel d'un antagoniste dans l'optique d'une thérapie anti-tumorale. Ce test est nécessaire pour déterminer la spécificité et l'affinité de l'antagoniste pour une intégrine mais ne permet pas de prédire sa capacité à inhiber les fonctions pro-tumorales de l'intégrine.

Modèles bi- et tridimensionnels :

D'autre part les expériences de prolifération menées en deux dimensions et les expériences de soft agar menées en trois dimensions ne donnent pas les mêmes résultats. La prolifération des cellules A172 et U87MG est inhibée dans le modèle bidimensionnel mais seules les cellules U87MG sont affectées par l'antagoniste dans le modèle tridimensionnel.

Une étude récente compare ces deux modèles de culture et s'intéresse aux différences de voie de signalisation (Pickl et Ries, 2009). En évaluant les effets du trastuzumab (un anticorps inhibant HER2) dans des carcinomes mammaires en deux ou trois dimensions, les auteurs mettent en évidence une sensibilité plus importante des cellules formant des sphéroïdes. L'organisation des récepteurs HER2 diffère selon le mode de culture. Dans le modèle bidimensionnel les récepteurs HER2 et HER3 s'associent en hétérodimères alors que dans les

sphéroïdes les récepteurs HER2 forment des homodimères. Ceci entraîne une plus grande activation de HER2 dans les sphéroïdes et modifie la transduction du signal. La voie de signalisation PI3K est inhibée dans les sphéroïdes au profit de la voie des MAPkinases. Le trastuzumab diminue l'activation des MAPkinases dans les cellules cultivées en trois dimensions. Cette étude démontre l'importance de l'utilisation des modèles tri-dimensionnels dans l'évaluation des effets thérapeutiques d'une molécule.

Dans le cas de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et de ces antagonistes dans les glioblastomes, la différence de sensibilité observée dans les cellules A172 selon le modèle de culture traduit également l'importance des conditions expérimentales. La transposition des résultats *in vitro* à la réalité clinique est souvent plus complexe que prévu. Il est possible que l'organisation membranaire de l'intégrine diffère entre les deux modèles de culture dans les cellules A172, rendant les sphéroïdes insensibles à l'antagoniste. L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ est impliquée dans la formation de sphéroïdes à partir de carcinomes ovariens (Casey *et al.*, 2001) et assure également l'attachement des sphéroïdes à la fibronectine.

Nos résultats mettent en évidence une grande importance des conditions de culture dans l'étude des effets cellulaires d'un antagoniste de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. Afin d'évaluer le potentiel thérapeutique des molécules anti-tumorales il est nécessaire de mettre au point des modèles se rapprochant le plus possible de la réalité clinique. Nous avons établi des collaborations avec les plateformes de xénogreffes et les tumorothèques du Grand-Est afin de comparer les résultats obtenus *in vitro* à la réalité du traitement *in vivo*. Nous souhaitons tester les antagonistes de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans des tumeurs cérébrales greffées en sous-cutané ou en intracrânial.

Définition d'un antagoniste d'une intégrine :

Les tests utilisés pour caractériser la spécificité des antagonistes des intégrines sont très souvent basés sur une mesure de leur affinité pour l'intégrine. Il s'agit soit d'une interaction entre la molécule et l'intégrine purifiée ou d'une inhibition de l'adhérence cellulaire à un substrat spécifique. Un antagoniste de l'intégrine doit être capable d'inhiber l'adhérence cellulaire et doit s'opposer aux signaux intracellulaires affectés par l'intégrine.

Très peu de données sur les voies de signalisation affectées par les antagonistes des intégrines sont connues. Dans le cas de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ seule une étude sur l'ATN-161 identifie des kinases impliquées dans la signalisation de l'intégrine. L'ATN-161, antagoniste peptidique se fixant sur la séquence synergique de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, n'a pas d'effet sur la prolifération ni la

migration d'adénocarcinomes mammaires *in vitro*. Cependant il inhibe la phosphorylation des MAPkinases dans ce modèle cellulaire. *In vivo*, ce peptide réduit de manière dose-dépendante le volume tumoral et inhibe la formation de métastases osseuses (Khalili *et al.*, 2006) en réduisant l'activité des MAPkinases. L'effet anti-angiogénique de ce peptide passe par l'activation de la PKA et la diminution du nombre de progéniteurs de cellules endothéliales circulants (Donate *et al.*, 2008).

Quelques travaux mettent en évidence les voies de signalisation affectées par l'intégrine $\alpha V\beta 3$. Une petite molécule non-peptidique antagoniste de l'intégrine αV , le S 34961, induit le détachement de carcinomes du colon sans affecter leur survie. Cette molécule inhibe la phosphorylation des kinases FAK, Akt et Erk (Burbridge *et al.*, 2003). Le peptide cyclique S247, antagoniste de l'intégrine $\alpha V\beta 3$, inhibe la phosphorylation de PI3K/Akt (Abdollahi *et al.*, 2005). Ces kinases participent à la régulation de la prolifération et de la survie cellulaires mais aussi à la migration.

Le SJ749 a un effet antagoniste sur l'adhérence cellulaire à la fibronectine. En ce qui concerne les effets sur la prolifération cellulaire nous avons mis en évidence des effets identiques pour la répression de l'expression de la sous-unité $\alpha 5$ et le traitement par l'antagoniste (Tableau 9). Les effets observés sur la progression dans le cycle cellulaire mettent en évidence un profil identique pour le clone D4 (U87MG sous-exprimant la sous-unité $\alpha 5$) et les cellules U87MG traitées par le SJ749 : blocage du cycle en phase G0/G1. Il en est de même pour le clone E7 (U373 sous-exprimant la sous-unité $\alpha 5$) et les cellules U373 traitées par le SJ749. Cela suggère que le SJ749 agit comme un antagoniste sur la signalisation cellulaire. Dans nos conditions expérimentales *in vitro*, il ne semble pas y avoir d'ambiguïtés quant à la nature antagoniste du SJ749 aussi bien pour l'adhérence que pour la prolifération. Le SJ749 et le K34c sont vraisemblablement des antagonistes de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ agissant comme antagonistes de l'adhérence cellulaire et de la signalisation.

| Comportement par rapport au contrôle | U87 α 5+ | U87 α 5- | U87+SJ | U373 α 5- | U373+SJ | U373 α 5+ |
|--------------------------------------|-----------------|-----------------|------------|------------------|------------|------------------|
| Prolifération | ↗ | ↘ | ↘ | ∅ | ? | ↘ |
| Clonogénicité | ↗ | ↘ | ↘ | ? | ? | ? |
| Cycle cellulaire | ∅ | Bloc G0/G1 | Bloc G0/G1 | Bloc G0/G1 | Bloc G0/G1 | Tétraploïde |
| Apoptose | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ |
| Sénescence | ∅ | ↗ | ∅ | ∅ | ∅ | ↗ |
| Cellules multinucléées | | | | | | ↗ |

Tableau 9 : Comparaison des effets de la modulation du taux de l'intégrine α 5 β 1 et de son inhibition par un antagoniste spécifique, le SJ749.

Nous avons cependant noté des différences d'efficacité de l'antagoniste selon les conditions expérimentales. Les effets cellulaires du SJ749 s'atténuent en présence de fibronectine et l'antagoniste est plus efficace lorsqu'il est ajouté sur des cellules avant attachement. Cela suggère que le SJ749 se fixe mieux sur une intégrine libre ou que son affinité pour l'intégrine est inférieure à celle de la fibronectine. Nous pouvons également émettre l'hypothèse que les effets du SJ749 sur la fibronectine sont masqués par les signaux de survie induits par les autres intégrines à fibronectine.

Une étude portant sur un antagoniste de l'intégrine α 4 β 1 décrit des effets cellulaires différents selon la conformation de l'intégrine (Parsons *et al.*, 2008). L'antagoniste inhibe l'interaction entre l'intégrine et la paxilline nécessaire à l'initiation des voies de signalisation lorsque les cellules sont placées sur fibronectine (conformation active). Inversement il augmente cette interaction lorsque l'intégrine n'est pas activée et donc agit comme la fibronectine. Une même molécule peut donc avoir des effets opposés sur la signalisation cellulaire selon la conformation de l'intégrine. Un peptide RGD, antagoniste de l'intégrine α V β 3, est capable de potentialiser ou d'inhiber l'adhérence cellulaire à la vitronectine selon la dose utilisée (Legler *et al.*, 2001). Ainsi les antagonistes des intégrines décrits comme inhibiteurs de l'adhérence entrent en compétition avec le ligand endogène. Mais ils peuvent également agir en tant

qu'agonistes ou antagonistes de la signalisation cellulaire en s'opposant aux effets du ligand endogène ou en activant des signaux dépendants de l'intégrine. Les effets intracellulaires générés par les antagonistes semblent dépendre de la conformation de l'intégrine ainsi que de leur affinité.

La contortrostatine appartient à la famille des désintégrines et inhibe l'invasion, l'angiogénèse et la progression tumorale *in vivo*. Dans deux lignées de gliomes ce peptide se révèle non cytotoxique mais il induit la phosphorylation de FAK et toute la signalisation qui en découle. La contortrostatine présente les mêmes effets que la fibronectine soluble en terme de transduction du signal (Schmitmeier *et al.*, 2005). Mais lorsque celle-ci est ajoutée à des cellules attachées à la fibronectine, elle joue le rôle d'un antagoniste en inhibant la signalisation de l'intégrine et en détachant les cellules. La contortrostatine est capable de bloquer l'invasion et la migration cellulaire en empêchant l'interaction entre l'intégrine et sa matrice.

Vers le développement d'antagonistes plus efficaces en cancérologie :

Nous avons montré que deux antagonistes de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ présentaient des activités anti-prolifératives *in vitro*. Nos résultats décrivent une dissociation des effets des molécules sur l'adhérence et sur la prolifération et conduisent à une nouvelle stratégie de découverte d'antagonistes possédant un potentiel thérapeutique plus important. Un antagoniste de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ actif dans une thérapie anti-tumorale ne doit pas forcément inhiber l'adhérence cellulaire à la fibronectine ni se restreindre à une activité anti-angiogénique mais plutôt exercer une action anti-proliférative sur les cellules cancéreuses en empêchant l'induction de signaux de survie par l'intégrine.

Les tests les plus utilisés pour évaluer l'affinité et la spécificité des antagonistes des intégrines sont les mesures d'interactions des antagonistes avec la protéine purifiée ou l'inhibition de l'adhérence cellulaire (Smallheer *et al.*, 2004 ; Farber *et al.*, 2008 ; Heckmann *et al.*, 2008). Les tests d'affinité sur la protéine purifiée ne rendent pas compte des effets sur la cellule entière. D'après nos résultats, l'effet anti-prolifératif des antagonistes ne dépend pas de leur capacité à inhiber l'adhérence cellulaire. La découverte de nouveaux antagonistes peut donc se baser sur d'autres tests que l'adhérence pour caractériser la spécificité de la molécule. Parmi eux nous pouvons citer le Biacore pour mettre en évidence une interaction entre la molécule et la protéine purifiée. D'autre part, il existe des antagonistes des intégrines qui ne se fixent pas dans la poche de liaison du ligand et donc n'inhibent pas l'adhérence cellulaire

(Donate *et al.*, 2008). L'ATN-161 est un peptide mimant la séquence synergique de la fibronectine. Cet antagoniste n'inhibe pas l'adhérence cellulaire mais possède une activité anti-tumorale.

Les anticorps dirigés contre l'intégrine se divisent en trois classes : activateurs, neutres et inhibiteurs selon leur effet sur la conformation du dimère. Les épitopes ciblés par les anticorps inhibiteurs sont situés dans la poche de liaison du ligand et dans certaines régions impliquées dans le changement de conformation de l'intégrine. Nous pouvons donc supposer qu'un antagoniste de la signalisation de l'intégrine peut interagir avec différentes régions du dimère autre que la poche de liaison du ligand. Pour identifier de nouveaux antagonistes de l'intégrine $\alpha5\beta1$ plus efficaces dans le cadre d'une thérapie anti-tumorale il serait judicieux de mettre au point un test fonctionnel pour évaluer les effets de la molécule sur la signalisation cellulaire. Ce test nécessite l'identification d'une protéine intracellulaire dont l'activité est affectée par l'intégrine $\alpha5\beta1$. Les antagonistes ainsi découverts agiraient comme antagonistes de la signalisation cellulaire sans forcément inhiber l'adhérence cellulaire.

C) L'INTEGRINE $\alpha 5\beta 1$: MEDiateur DE LA CHIMIORESISTANCE DES GLIOMES ?

Nous avons démontré dans la partie précédente que des antagonistes de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ possèdent une action anti-proliférative dans les glioblastomes in vitro. Le SJ749 se révèle moyennement actif utilisé seul car il entraîne un blocage du cycle cellulaire mais pas d'apoptose. Les stratégies thérapeutiques actuelles s'orientent vers des multithérapies alliant une thérapie classique de type chimio- ou radiothérapie à une thérapie ciblée. Dans ce cadre l'agent ciblant potentialise les effets de l'agent chimiothérapeutique. Les antagonistes de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ pourraient faire partie d'une telle multithérapie. Pour explorer cette hypothèse, nous avons étudié les effets des molécules SJ749 et K34c en combinaison avec une drogue chimiothérapeutique : l'ellipticine.

1) Effets de l'ellipticine

L'ellipticine est un alcaloïde naturel tétracyclique. Il s'agit d'un agent anti-néoplasique exerçant son activité par intercalation entre les bases de l'ADN et inhibition de la topoisomérase II. Sa dégradation par le cytochrome P450 forme des dérivés capables d'alkyler l'ADN (Stiborova *et al.*, 2007b ; Stiborova *et al.*, 2008). D'après une étude du NCI, cet agent cytotoxique présente une certaine sélectivité pour les tumeurs cérébrales (Shi *et al.*, 1998). Nous avons étudié les effets de cette molécule chimiothérapeutique dans nos modèles cellulaires.

a. Effets cellulaires de l'ellipticine

Cellules U87MG :

Les effets de l'ellipticine sur la viabilité cellulaire ont été évalués dans les cellules U87MG en réalisant une courbe dose-réponse par la méthode du MTS. La CI50 trouvée est d'environ 1 μ M. Nous avons donc utilisé cette concentration dans toutes les expériences réalisées. En analysant l'inhibition de prolifération observée dans ces cellules nous remarquons que l'effet de l'ellipticine augmente avec le temps, passant d'une inhibition de 7% à 24h, 16% à 48h, 28% à 72h et 50% à 96h (Figure 27A). La progression dans le cycle des cellules U87MG est altérée par l'ellipticine. Nous notons un blocage persistant en phases G0/G1 et G2/M et une diminution concomitante de la phase S (Figure 27B). Dans ce modèle cellulaire, l'ellipticine inhibe fortement la prolifération cellulaire et ces effets peuvent être liés à une induction d'apoptose ou à un ralentissement de la croissance cellulaire.

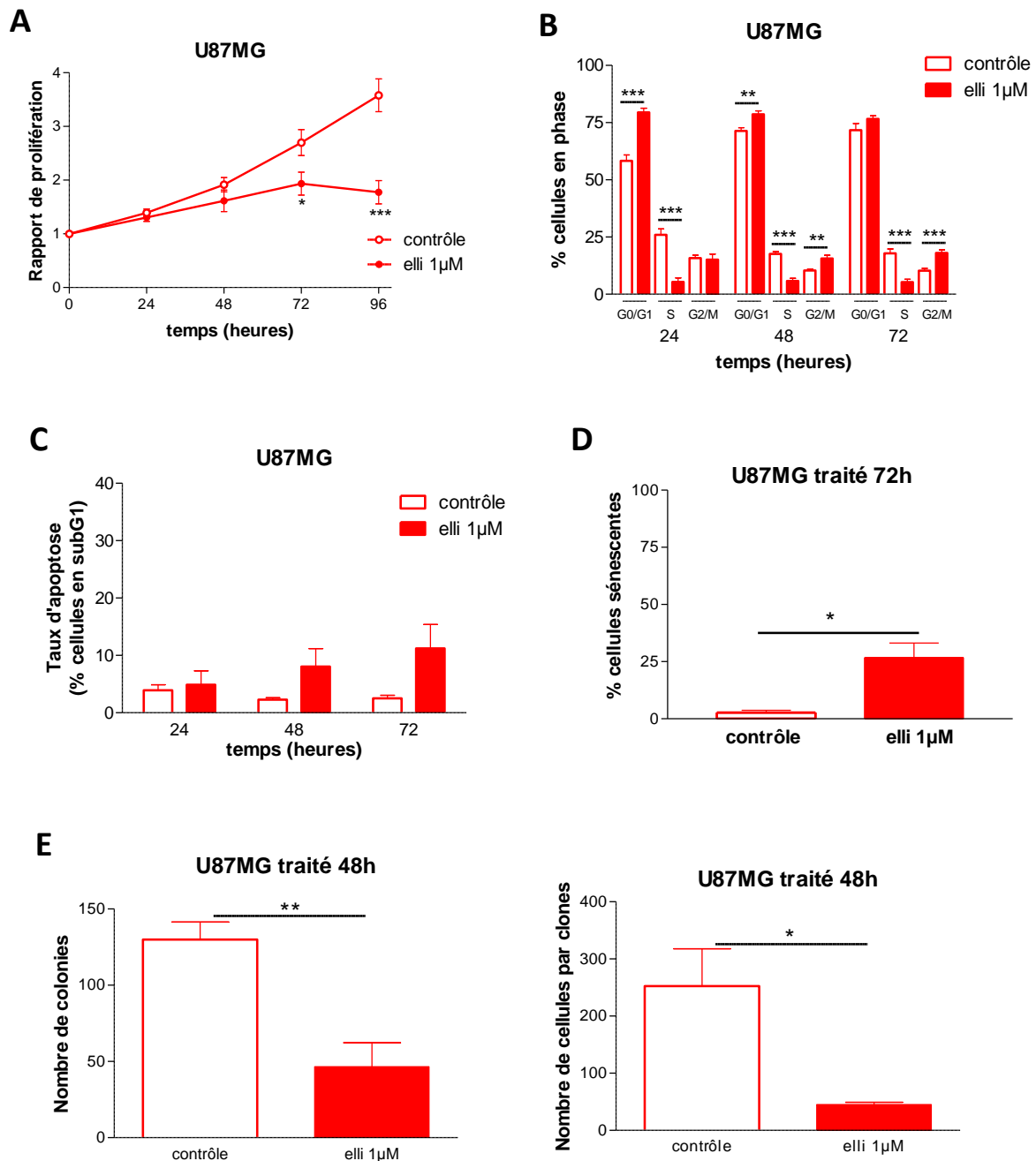


Figure 27 : Effets de l'ellipticine dans les cellules U87MG.

A) Evaluation de la prolifération cellulaire par la méthode au MTS des cellules U87MG traitées par l'ellipticine à 1 μ M ($N=10$). B) Analyse de la répartition dans le cycle cellulaire des cellules U87MG traitées par l'ellipticine à 1 μ M ($N=6$). C) Analyse de l'apoptose dans les cellules U87MG traitées ou non par l'ellipticine à 1 μ M (pourcentage de cellules en subG1, $N=5$). D) Taux de sénescence des cellules U87MG après 72h de traitement par l'ellipticine à 1 μ M (marquage SA- β -Gal, $N=6$). E) Clonogénicité des cellules U87MG traitées 48h à l'ellipticine à 1 μ M, nombre de colonies ($N=7$). Comptage du nombre de cellules par colonies ($N=3$).

Nous avons exploré la capacité de l'ellipticine à induire de l'apoptose. A la dose utilisée dans nos expériences l'ellipticine n'induit pas d'apoptose comme le révèle le faible pourcentage de cellules en phase subG1 après 72h de traitement (Figure 27C). Par contre le traitement par l'ellipticine augmente le taux de sénescence dans les cellules U87MG traitées ; 25% des cellules sont sénescents après un traitement de 72h par l'ellipticine à 1 μ M (Figure 27D). Les effets anti-prolifératifs de l'ellipticine sur les cellules U87MG ne sont pas liés à une réponse apoptotique mais à une induction de sénescence.

Nous avons également évalué les effets de l'ellipticine sur la tumorigénicité en traitant des cellules à faible densité pendant 48h avec 1 μ M de drogue et en laissant les colonies se former pendant 10 jours dans un milieu frais. Le nombre de colonies observé dans les puits traités est fortement réduit par rapport au contrôle, 130 contre 47 soit une perte de 64% (Figure 27E gauche). Les colonies résiduelles après traitement sont formées d'un nombre de cellules inférieur à celui des colonies non traitées (250 \pm 65 et 45 \pm 4 respectivement, Figure 27E droite). L'ellipticine inhibe la prolifération et la tumorigénicité des cellules U87MG *in vitro* en induisant de la sénescence.

Clones U87MG α 5+ ou α 5-:

Nous avons analysé la réponse cellulaire à l'ellipticine dans les différents clones obtenus par sur-expression ou répression de la sous-unité α 5 (voir chapitre III.A.3) dans les cellules U87MG afin de déterminer l'influence du taux d'expression de cette sous-unité dans les effets de l'ellipticine.

Effet de l'ellipticine sur les cellules U87MG sous-exprimant α 5 (clone D4) :

Le clone D4 (U87MG sous-exprimant α 5) présente une inhibition de la prolifération par l'ellipticine plus forte que son contrôle après 48h de traitement (44 \pm 6 et 23 \pm 6% respectivement, Figure 28A). La répression de l'expression de la sous-unité α 5 sensibilise les cellules U87MG à l'ellipticine.

Aucune différence n'a été détectée sur la progression dans le cycle cellulaire ni pour l'induction d'apoptose par l'ellipticine entre le clone D4 et son contrôle. L'ellipticine induit 25% de sénescence dans les cellules U87MG. Le clone D4 présente une sénescence basale de 8 \pm 0,6%. La sénescence induite par l'ellipticine dans le clone D4 est très élevée : 74 \pm 4% après 72h de traitement contre 25 \pm 1% dans le contrôle (Figure 28B).

Nous avons étudié la sensibilité à différentes doses d'ellipticine dans un test clonogénique (Figure 28C). Nous n'observons pas de différences de pouvoir clonogénique entre le clone D4 et son contrôle.

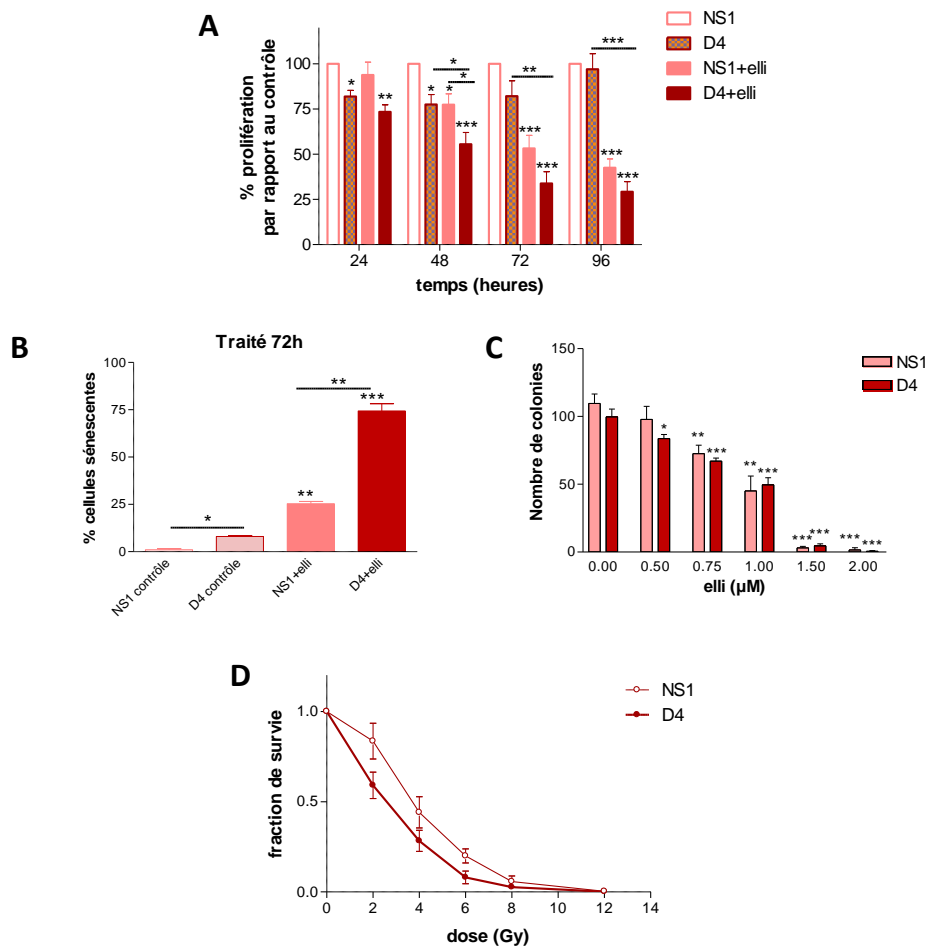


Figure 28: Répression de la sous-unité $\alpha 5$ et effets de l'ellipticine dans les cellules U87MG.

A) Pourcentage de prolifération du clone D4 traité ou non par l'ellipticine ($1\mu\text{M}$) par rapport à son contrôle ($N=6-14$). B) Taux de sénescence du clone D4 et son contrôle après 72h de traitement par l'ellipticine à $1\mu\text{M}$ (marquage SA- β -Gal, $N=3$). C) Clonogénicité du clone D4 et son contrôle après 72h de traitement par l'ellipticine à différentes doses, nombre de colonies ($N=6$). D) Clonogénicité après irradiation aux rayons X exprimée en fraction de survie ($N=4$).

La répression de l'expression de la sous-unité $\alpha 5$ de l'intégrine provoque une augmentation de l'induction de sénescence en réponse à l'ellipticine.

Après irradiation à différentes doses nous avons étudié la sensibilité du clone D4 et son contrôle dans un test de clonogénicité. La fraction de survie du clone D4 est inférieure à celle de son contrôle (Figure 28D). La répression de l'expression de la sous-unité $\alpha 5$ de l'intégrine sensibilise les cellules aux rayons X.

Effet de l'ellipticine sur les cellules U87MG sur-exprimant $\alpha 5$ (clone F8) :

Le clone F8 exprimant un fort taux d'intégrine $\alpha 5$ ne semble pas affecté de manière différente par l'ellipticine que son contrôle. Aucune différence de viabilité cellulaire suite au traitement

par l'ellipticine à 1µM n'est détectée entre le clone F8 et son contrôle (Figure 29A). Nous ne notons pas de différence sur la progression dans le cycle cellulaire ni sur l'induction d'apoptose.

Le taux de sénescence induit par l'ellipticine n'est pas significativement différent entre les cellules transfectées par le plasmide vide pcDNA et le clone F8 après 72h de traitement (Figure 29B). La sur-expression de la sous-unité $\alpha 5$ ne module pas les effets à court terme de l'ellipticine.

Cependant, en évaluant la clonogénicité des cellules sur-exprimant l'intégrine (clone F8) nous avons mis en évidence une différence de sensibilité à l'ellipticine (Figure 29C). Le clone F8 forme un nombre plus important de clones en conditions basales et aux différentes doses d'ellipticine testées. La sur-expression de la sous-unité $\alpha 5$ conduit à une diminution de la sensibilité des cellules à l'ellipticine. A la dose de 1µM d'ellipticine il subsiste 40% des clones dans les pcDNA et 67% dans le clone F8.

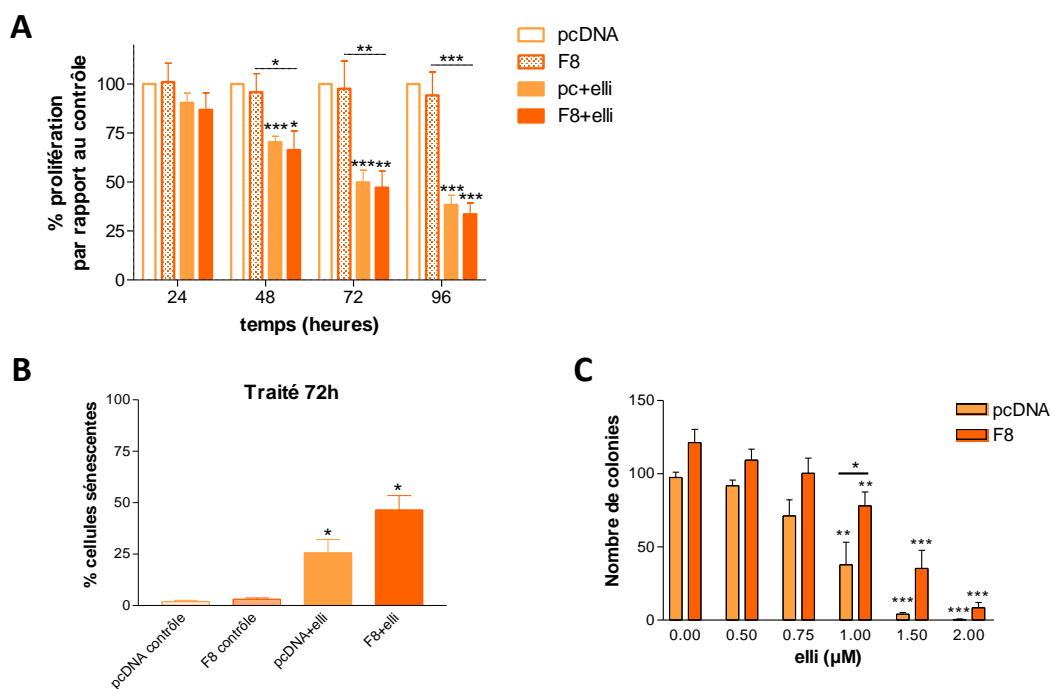


Figure 29: Sur-expression de la sous-unité $\alpha 5$ et effets de l'ellipticine dans les cellules U87MG.

A) Pourcentage de prolifération du clone F8 traité ou non par l'ellipticine (1µM) par rapport à son contrôle ($N=7-8$). B) Taux de sénescence du clone F8 et son contrôle après 72h de traitement par l'ellipticine à 1µM (marquage SA- β -Gal, $N=4$). C) Clonogénicité du clone F8 et son contrôle après 72h de traitement par l'ellipticine à différentes doses, nombre de colonies ($N=5-8$).

La sur-expression de la sous-unité $\alpha 5$ ne modifie pas les effets cellulaires de l'ellipticine à court terme mais réduit la sensibilité des cellules dans un test clonogénique.

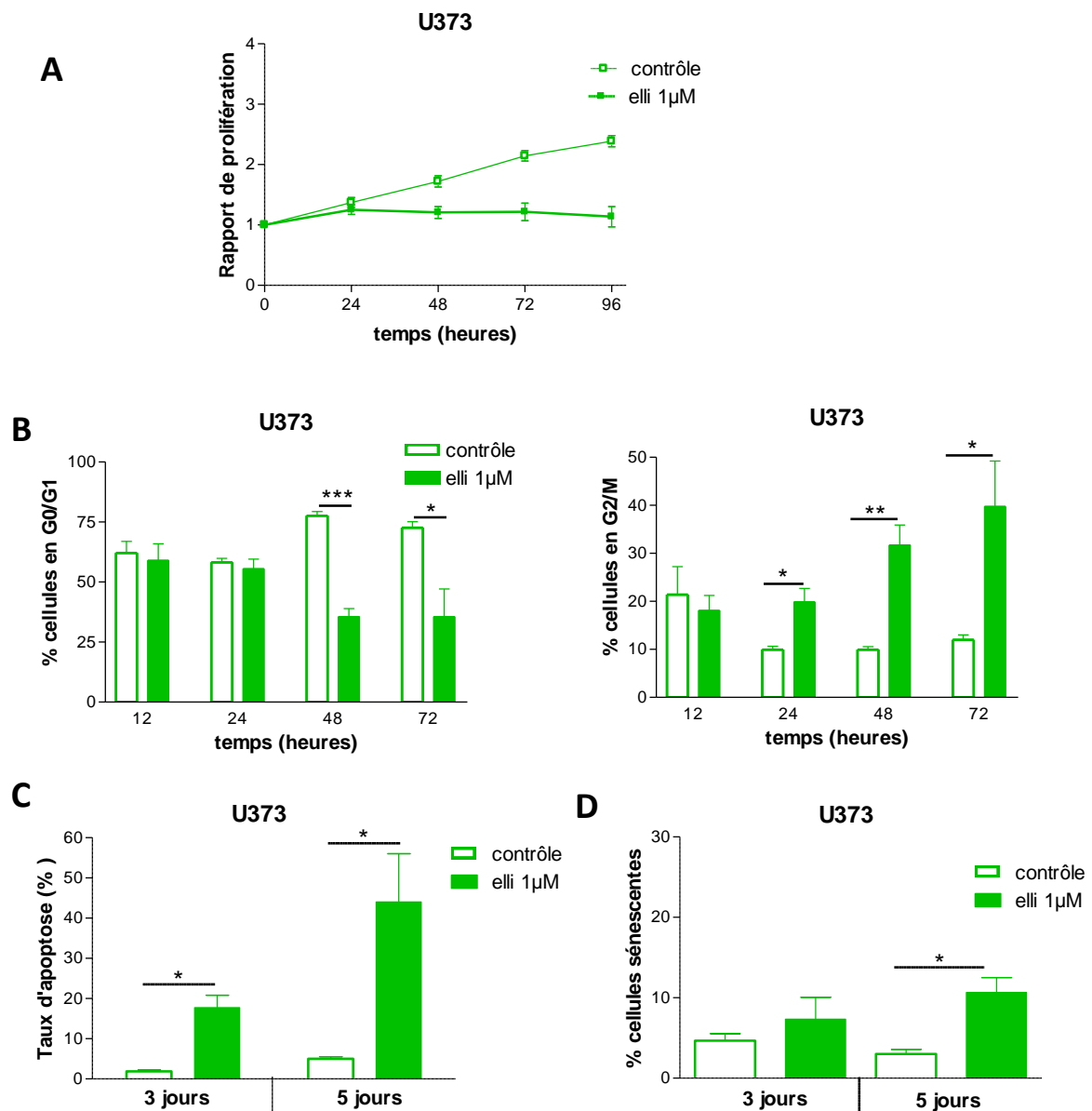


Figure 30: Effets de l'ellipticine dans les cellules U373.

A) Evaluation de la prolifération cellulaire par la méthode au MTS des cellules U373 traitées par l'ellipticine à 1μM ($N=7$). B) Analyse de la répartition des cellules U373 traitées par l'ellipticine à 1μM dans les phases G0/G1 et G2/M ($N=4$). C) Analyse de l'apoptose dans les cellules U373 traitées ou non par l'ellipticine à 1μM (pourcentage de noyau fragmenté, $N=5$). D) Taux de sénescence des cellules U373 après 3 et 5 jours de traitement par l'ellipticine à 1μM (marquage SA-β-Gal, $N=3$). Figure 31

Nous avons montré que la modulation de l'expression de la sous-unité $\alpha 5$ de l'intégrine dans les cellules U87MG régule la réponse cellulaire à l'ellipticine et modifie la sensibilité cellulaire à la drogue.

Cellules U373 :

Nous avons déterminé les effets de l'ellipticine sur la prolifération des cellules U373 en utilisant la méthode du MTS (Figure 30A). Nous observons une inhibition de la prolifération augmentant avec le temps de traitement (9% à 24h, 30% à 48h, 43% à 72h et 52% à 96h). Ces effets sont similaires à ceux obtenus dans les cellules U87MG exprimant p53 fonctionnel (Figure 27A). L'analyse de la progression dans le cycle cellulaire révèle un comportement différent des cellules U373. Elles présentent un fort blocage en G2/M et une réduction de la phase G0/G1 (Figure 30B). Les cellules U87MG présentaient un blocage en G0/G1 et G2/M et une réduction de la phase S (Figure 27B). Dans les cellules U87MG l'ellipticine induit de la sénescence mais pas d'apoptose (Figures 27C-D). Le même traitement appliqué aux cellules U373 provoque une augmentation d'apoptose, $17,7 \pm 3,1\%$ contre $1,9 \pm 0,3\%$ dans le contrôle après trois jours de traitement et jusqu'à $44 \pm 12\%$ après cinq jours (Figure 30C). Le taux de sénescence est de $10,7 \pm 1,8\%$ après 5 jours de traitement par l'ellipticine contre $3 \pm 0,6\%$ dans le contrôle (Figure 30D).

L'ellipticine induit de l'apoptose et pas de sénescence dans les cellules U373. La réponse cellulaire à l'ellipticine est très différente entre les cellules U87MG et U373.

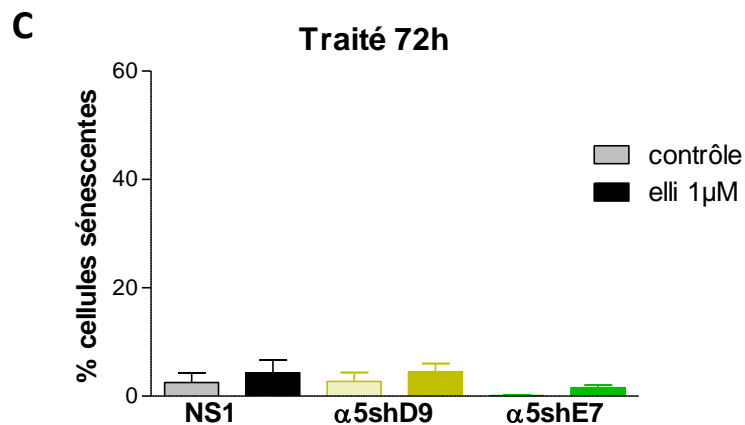
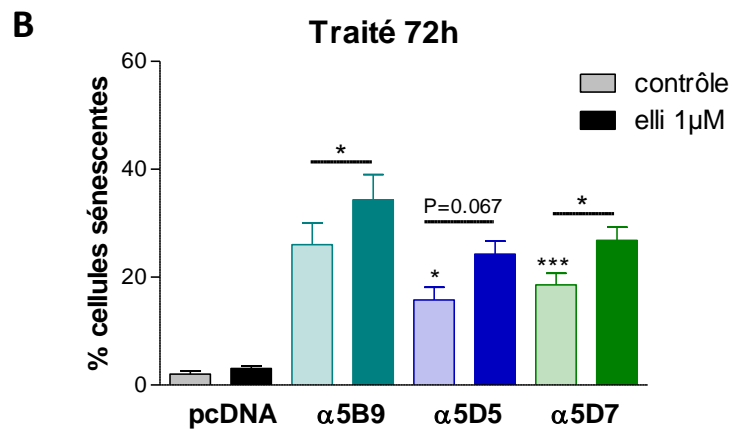
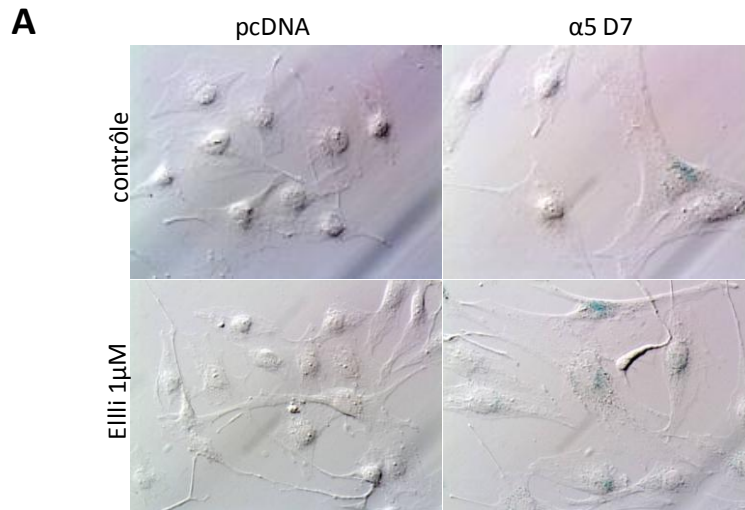


Figure 31: Modulation de l'expression de la sous-unité $\alpha 5$ et effets de l'ellipticine dans les cellules U373.

A) Illustration du marquage SA- β -Gal dans le clone D7 sur-exprimant $\alpha 5$ et son contrôle traités ou non par l'ellipticine à 1 μ M pendant 72h. B) Taux de sénescence des clones sur-exprimant $\alpha 5$ B9 ($N=2$), D5 ($N=5$) et D7 ($N=10$) et leur contrôle ($N=10$) après 72h de traitement par l'ellipticine à 1 μ M (marquage SA- β -Gal). C) Taux de sénescence des clones sous-exprimant $\alpha 5$ D9 et E7 et leur contrôle après 72h de traitement par l'ellipticine ($N=3$).

Clones U373 $\alpha 5+$ ou $\alpha 5-$:

Le traitement des cellules U373 sur-exprimant l'intégrine $\alpha 5$ par l'ellipticine à $1\mu\text{M}$ pendant 72h révèle une augmentation de la proportion de cellules positives au marquage SA- β -Gal en réponse à l'ellipticine (Figure 31A). Les cellules contrôle traitées dans les mêmes conditions ne sont pas sénescents. Il semble que la sur-expression de la sous-unité $\alpha 5$ permet à l'ellipticine d'induire de la sénescence dans les cellules U373. Nous avons vérifié ce résultat dans deux autres clones sur-exprimant la sous-unité $\alpha 5$. Les trois clones testés présentent un taux de sénescence basal plus élevé que le contrôle et l'ellipticine augmente le taux de sénescence de manière significative (26 ± 4 à $34,3\pm 4,6\%$ pour B9, $15,8\pm 2,3$ à $24,3\pm 2,4\%$ pour D5 et $18,6\pm 2,1$ à $26,8\pm 2,5\%$ pour D7, Figure 31B).

La sur-expression de la sous-unité $\alpha 5$ dans les cellules U373 rétablit la capacité de l'ellipticine à induire de la sénescence. La répression de l'expression de la sous-unité $\alpha 5$ ne modifie pas la réponse cellulaire à l'ellipticine dans les cellules U373. Les trois clones réprimés pour $\alpha 5$ ne présentent pas d'induction de sénescence (Figure 31C).

b. Ellipticine et voies de la protéine p53

Nous avons mis en évidence des effets différents de l'ellipticine dans les deux lignées cellulaires utilisées. Il a été montré que l'ellipticine induit l'activation de la voie p53 dans des hépatocarcinomes (YC Kuo *et al.*, 2006). Nous savons que les cellules U87MG et U373 diffèrent dans le statut de la protéine p53. Les cellules U87MG expriment une forme fonctionnelle de p53 et les cellules U373 expriment une forme mutée et non-fonctionnelle de la protéine p53 (p53^{R273H}). Ces cellules expriment un taux basal de p53 plus élevé que les cellules U87MG, ce qui est courant pour les formes mutées de p53. Nous pouvons nous demander si les effets différentiels de l'ellipticine sont liés au statut de la protéine p53.

Cellules U87MG :

Nous avons réalisé une cinétique de traitement par l'ellipticine (3 à 48h) et analysé par western blot la quantité de p53 présente dans les cellules U87MG (Figure 32A). Après quantification de l'expression de la protéine p53 par rapport à la GAPDH (protéine de référence), nous notons une induction de la protéine p53 dès 3h de traitement avec un maximum au bout de 12h de traitement puis l'induction diminue mais reste forte après 48h de traitement (Figure 32B).

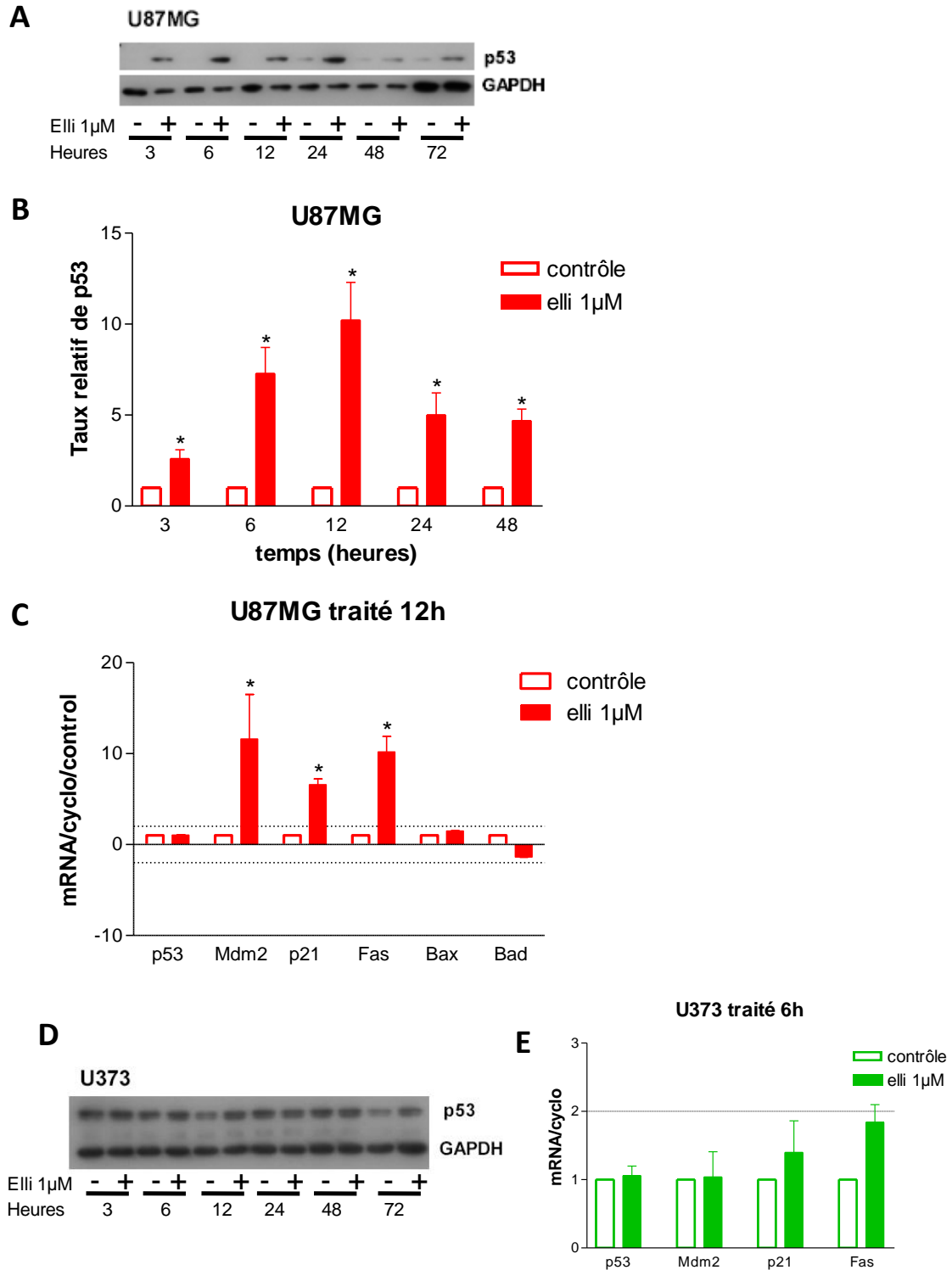


Figure 32: Effets de l'ellipticine sur la protéine p53.

A) Analyse par western blot de l'expression de la protéine p53 dans les cellules U87MG traitées par 1μM d'ellipticine (3h à 72h de traitement). B) Densitogramme de la quantité relative de protéine p53 par rapport à la GAPDH dans des cellules U87MG traitées par l'ellipticine ($N=3-5$). C) Analyse quantitative de la transcription de gènes impliqués dans la signalisation p53 par PCR en temps réel dans les cellules U87MG. Quantité de mRNA après 12h de traitement par l'ellipticine à 1μM rapportée au contrôle non-traité et à la cyclophiline ($N=2$). D) Analyse par western blot de l'expression de la protéine p53 dans les cellules U373 traitées par 1μM d'ellipticine (3h à 72h de traitement). E) Analyse quantitative de la transcription de gènes impliqués dans la signalisation p53 par PCR en temps réel dans les cellules U373. Quantité de mRNA après 6h de traitement par l'ellipticine à 1μM rapportée au contrôle non-traité et à la cyclophiline ($N=2$).

L'augmentation de l'expression de p53 passe par une stabilisation de la protéine ou une induction de sa transcription. Les effets du traitement par l'ellipticine pendant 6h sur la transcription de mRNA codant pour p53 et certains de ces gènes cibles ont été explorés par PCR quantitative en temps réel (Figure 32C). La transcription du gène codant pour la protéine p53 n'est pas affectée par le traitement par l'ellipticine. Nous pouvons en déduire que l'induction de la protéine p53 est liée à une stabilisation de celle-ci.

Nous avons testé différents gènes cibles de la protéine p53 pour vérifier son activité transcriptionnelle. Parmi les gènes testés nous notons une forte induction de Mdm2, p21 et Fas après traitement par l'ellipticine (Figure 32C). La transcription des gènes codant pour Bax et Bad n'est pas modulée par l'ellipticine. Mdm2 est une E3 ligase se liant à p53, elle inhibe son activité transcriptionnelle et favorise sa dégradation par le protéasome. Mdm2 est un régulateur négatif de la protéine p53 et fait partie des gènes cibles de p53. La protéine p21 inhibe la progression dans le cycle cellulaire et a été impliquée dans l'induction de sénescence alors que Fas participerait plutôt à l'induction d'apoptose. L'activation de la protéine p53 en réponse aux dommages à l'ADN peut conduire à l'apoptose ou à l'arrêt du cycle cellulaire. Les mécanismes orientant la réponse cellulaire vers l'une ou l'autre des voies sont encore méconnus. Le traitement par l'ellipticine des cellules U87MG active p53 et régule la transcription de gènes dépendants de p53 impliqués dans la sénescence et l'apoptose.

Cellules U373 :

Nous avons vérifié la non-fonctionnalité de la protéine p53 exprimée dans les cellules U373. Le traitement des cellules U373 par l'ellipticine ne modifie pas le taux d'expression de la protéine p53 comme le montre le western blot décrivant la cinétique du traitement (Figure 33D). Ni le gène codant pour la protéine p53 ni ces gènes cibles Mdm2, p21 et Fas ne sont induits par l'ellipticine dans les cellules U373 (Figure 32E). La protéine p53 exprimée dans ces cellules étant donc non-fonctionnelle, les effets cellulaires de l'ellipticine observés dans les U373 ne sont pas p53-dépendants.

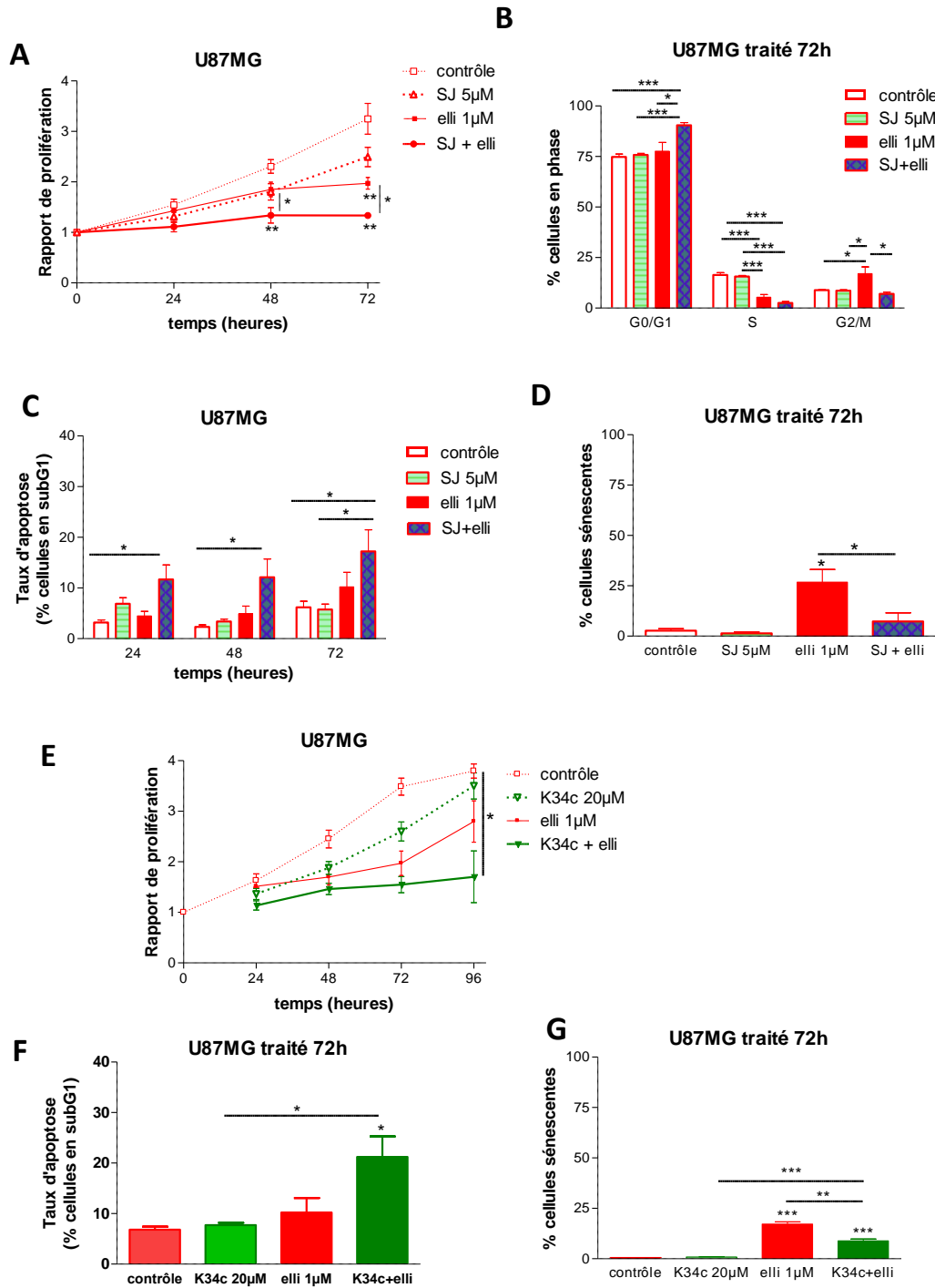


Figure 33: Inhibition de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ par un antagoniste et effets de l'ellipticine sur les cellules U87MG.

A) Evaluation de la prolifération cellulaire par la méthode au MTS des cellules U87MG traitées par l'ellipticine à 1µM, le SJ749 à 5µM ou la combinaison des deux drogues ($N=4$). B) Analyse de la répartition dans le cycle cellulaire des cellules U87MG traitées par l'ellipticine à 1µM, le SJ749 à 5µM ou la combinaison des deux drogues pendant 72h ($N=6$). C) Analyse de l'apoptose dans les cellules U87MG traitées par l'ellipticine à 1µM, le SJ749 à 5µM ou la combinaison des deux drogues (pourcentage de cellules en subG1, $N=6$). D) Taux de sénescence des cellules U87MG après 72h de traitement par l'ellipticine à 1µM, le SJ749 à 5µM ou la combinaison des deux drogues (marquage SA- β -Gal, $N=3-6$). E) Evaluation de la prolifération cellulaire par la méthode au MTS des cellules U87MG traitées par l'ellipticine à 1µM, le K34c à 20µM ou la combinaison des deux drogues ($N=5$). F) Taux de sénescence des cellules U87MG après 72h de traitement par l'ellipticine à 1µM, le K34c à 20µM ou la combinaison des deux drogues (marquage SA- β -Gal, $N=4$).

2) Thérapie combinée : ellipticine + antagoniste de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$

Afin de déterminer si l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ régule la réponse de la cellule à l'ellipticine nous avons utilisé différentes approches : la modulation de son état d'activation et les modèles cellulaires caractérisés précédemment.

a. Dans les cellules U87MG

Antagonistes de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$:

Nous avons inhibé la fonction de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ en utilisant les deux antagonistes décrits précédemment. Le SJ749 présente une plus forte activité anti-proliférative sur des cellules traitées avant attachement. Nous avons donc réalisé un co-traitement des cellules U87MG par le SJ749 à une dose de $5\mu\text{M}$ et l'ellipticine à $1\mu\text{M}$ avant attachement des cellules. Ces deux drogues présentent des effets additifs sur la viabilité cellulaire (Figure 33A). Comme montré précédemment chaque drogue indépendamment inhibe la prolifération. Lorsque les deux drogues sont appliquées simultanément la prolifération des cellules U87MG est quasiment totalement inhibée.

En analysant la progression dans le cycle cellulaire des cellules traitées pendant 72h par le SJ749 et l'ellipticine nous observons un important blocage en phase G0/G1 avec plus de 90% de la population cellulaire dans cette phase. Le blocage en G0/G1 s'accompagne d'une forte réduction de la phase S. Le blocage en G2/M provoqué par l'ellipticine seule est aboli si le SJ749 est appliqué en même temps (Figure 33B).

La forte inhibition de la prolifération cellulaire observée après co-traitement par le SJ749 et l'ellipticine peut être liée à une induction d'apoptose. L'analyse de la fraction apoptotique révèle une induction d'apoptose dès 24h de co-traitement (Figure 33C). Aucune des deux molécules appliquée seule ne déclenche d'apoptose de manière significative. L'association de l'antagoniste et de l'agent chimiothérapeutique provoque $17\pm 4\%$ d'apoptose après 72h de traitement.

Nous avons montré précédemment que l'ellipticine induit de la sénescence prématurée dans les cellules U87MG. Le SJ749 n'induit pas de sénescence prématurée. Le co-traitement par l'antagoniste de l'intégrine et l'ellipticine présente un taux de sénescence inférieur à celui induit par l'ellipticine seul ($7\pm 4\%$ et $27\pm 6\%$ respectivement, Figure 33D). Ainsi l'inhibition de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ module la réponse cellulaire à l'ellipticine en favorisant l'apoptose par rapport à la sénescence prématurée.

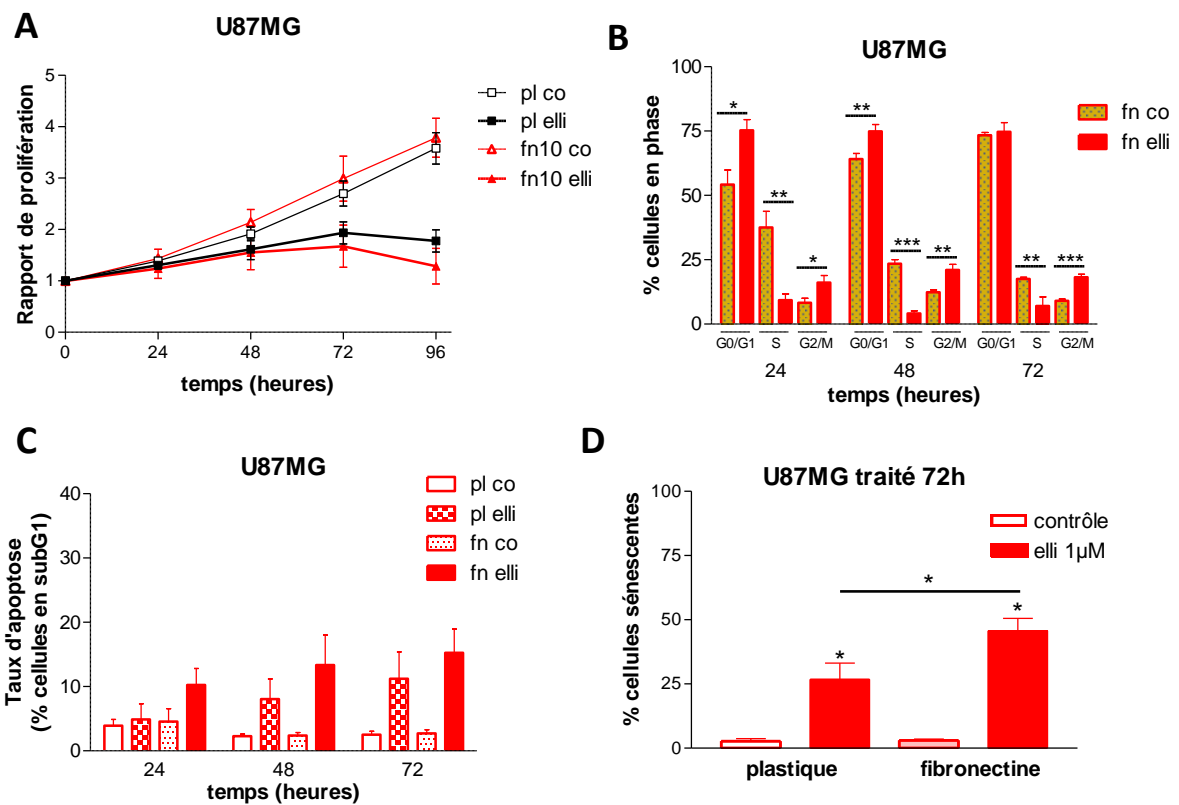


Figure 34: Activation de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et effets de l'ellipticine dans les cellules U87MG.

A) Evaluation de la prolifération cellulaire par la méthode au MTS des cellules U87MG sur plastique ou fibronectine traitées par l'ellipticine à $1\mu\text{M}$ ($N=6$). B) Analyse de la répartition dans le cycle cellulaire des cellules U87MG sur fibronectine traitées par l'ellipticine à $1\mu\text{M}$ ($N=6$). C) Analyse de l'apoptose dans les cellules U87MG sur fibronectine traitées ou non par l'ellipticine à $1\mu\text{M}$ (pourcentage de cellules en subG1, $N=6$). D) Taux de sénescence des cellules U87MG sur plastique ou fibronectine après 72h de traitement par l'ellipticine à $1\mu\text{M}$ (marquage SA- β -Gal, $N=3-6$).

Pour confirmer les effets obtenus avec le SJ749 nous avons utilisé le K34c dans les mêmes expériences. Comme le SJ749, le K34c présente des effets additifs à ceux de l'ellipticine sur la viabilité cellulaire (Figure 33E). Alors que les effets du K34c seul s'atténuent avec le temps, l'application simultanée des deux drogues réduit de manière soutenue la prolifération des cellules U87MG. Le co-traitement par l'antagoniste et l'ellipticine provoque de l'apoptose dans les cellules U87MG après 72h de traitement (Figure 33F). Comme le SJ749, la molécule K34c réduit de manière significative la sénescence induite par l'ellipticine dans les cellules U87MG (Figure 33G).

Activation de l'intégrine sur fibronectine :

Les cellules U87MG placées sur fibronectine ne voient pas leur prolifération modifiée. Le traitement par l'ellipticine dans ces conditions révèle une inhibition de prolifération similaire à celle observée en absence de fibronectine (13% à 24h, 27% à 48h, 44% à 72h et 66% à 96h, Figure 34A). Les effets de l'ellipticine sur la progression dans le cycle cellulaire sont identiques que les cellules soient placées ou non sur fibronectine. L'ellipticine induit un blocage en phase G2/M et une réduction de la phase S (Figure 34B à comparer avec la figure 29B). La présence du ligand endogène de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ ne semble pas modifier la sensibilité des cellules U87MG à l'ellipticine.

L'analyse de la fraction apoptotique après traitement par l'ellipticine ne dévoile pas de différence que les cellules soient placées sur plastique ou sur fibronectine. Dans les deux cas l'ellipticine n'induit pas d'apoptose (Figure 34C). Par contre nous notons une augmentation significative de l'induction de sénescence par l'ellipticine lorsque les cellules sont placées sur fibronectine (22% sur plastique contre 46% sur fibronectine, Figure 34D).

La présence de fibronectine module la réponse cellulaire à l'ellipticine en favorisant la sénescence. Il semble donc que l'activation de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ (ou d'autres intégrines à fibronectine) modifie la réponse des cellules aux agents chimiothérapeutiques.

L'ellipticine induit de la sénescence prématurée dans les cellules U87MG. L'activation de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ par la fibronectine augmente ce taux de sénescence et l'inhibition de l'intégrine par des antagonistes le réduit. Ainsi l'état d'activation de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ module la réponse cellulaire à l'ellipticine en régulant l'induction de sénescence.

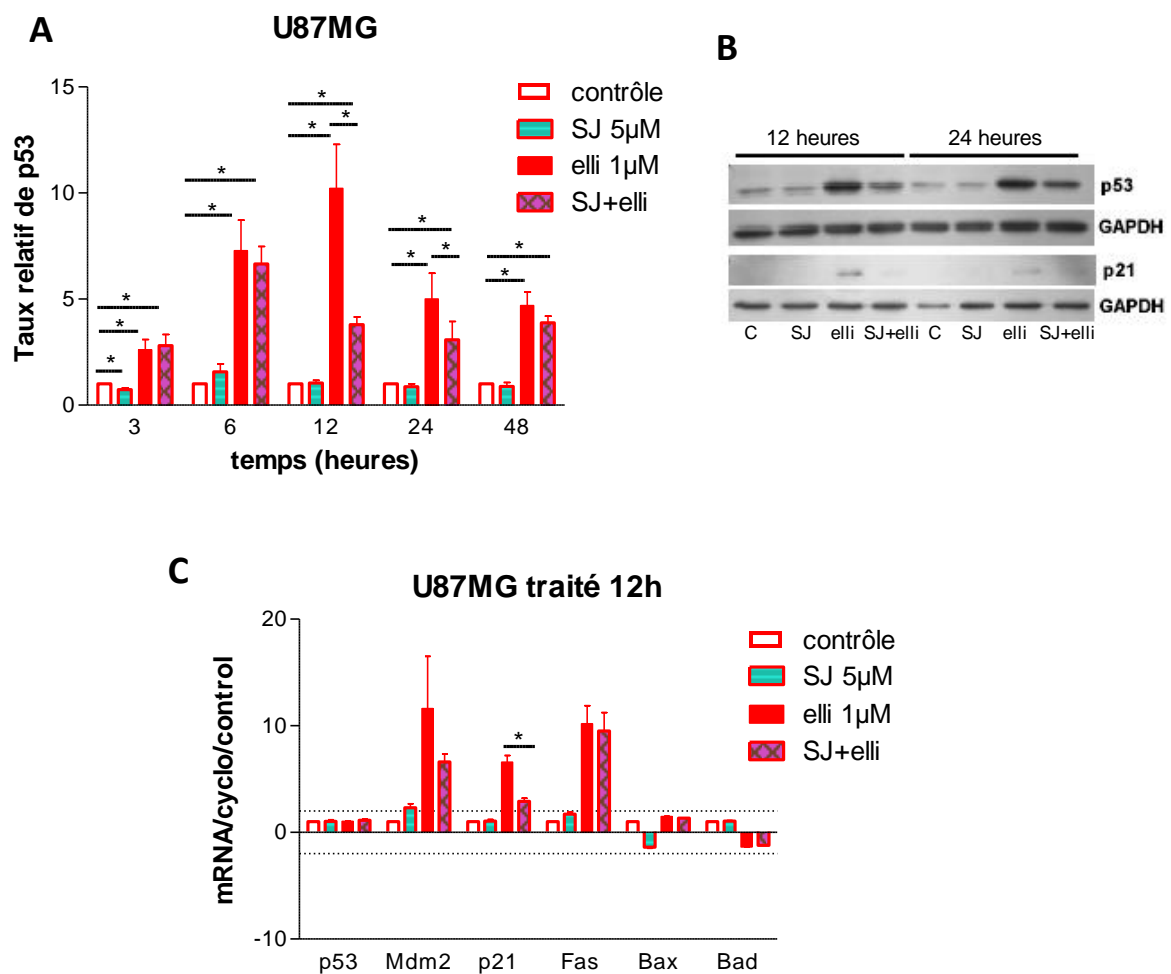


Figure 35: Effets de la modulation de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ sur l'activation de la voie p53 par l'ellipticine.

A) Densitogramme de la quantité relative de protéine p53 par rapport à la GAPDH dans des cellules U87MG traitées par l'ellipticine, le SJ749 ou les deux (3h à 48h de traitement, $N=4$). B) Analyse par western blot de l'expression des protéines p53 et p21 dans les cellules U87MG traitées par l'ellipticine à 1µM. C) Analyse quantitative de la transcription de gènes impliqués dans la signalisation p53 par PCR en temps réel dans les cellules U87MG. Quantité de mRNA après 12h de traitement par l'ellipticine à 1µM, le SJ749 à 5µM ou les deux rapportée au contrôle non-traité et à la cyclophiline ($N=2$).

Gènes cibles de la protéine p53 :

Nous avons vu précédemment que l'ellipticine active la protéine p53 dans les cellules U87MG. Or l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ module la réponse cellulaire à l'ellipticine. Nous avons exploré la signalisation p53-dépendante dans les différents modèles utilisés et évalué l'implication de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans la réponse cellulaire des glioblastomes *in vitro*.

Le co-traitement des cellules U87MG par l'antagoniste de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ (SJ749) et l'ellipticine entraîne une modification de la balance sénescence/apoptose (Figures 33C-D). Nous avons analysé l'activation de p53 et de ses gènes cibles dans ces conditions. La quantification du taux d'expression de p53 à différents temps indique que l'antagoniste seul ne modifie pas le taux de p53 mais que l'ellipticine induit p53 dès 3h de traitement. L'application simultanée des deux drogues conduit à une réduction de l'augmentation d'expression de p53 induite par l'ellipticine à 12 et 24h (Figure 35A). L'antagoniste inhibe la stabilisation de p53 par l'ellipticine dans les cellules U87MG. Nous observons une diminution de la protéine p53 et une diminution concomitante de la protéine p21 à 12 et 24h (Figure 35B).

Nous avons analysé les effets du co-traitement sur l'activité transcriptionnelle de la protéine p53 sur certains gènes cibles par PCR quantitative en temps réel (Figure 35C). Le gène codant pour la protéine p53 n'est pas affecté par le co-traitement SJ749 et ellipticine. Parmi les gènes cibles de p53 testés, la transcription des gènes Mdm2 et p21 est modulée par le SJ749 (Figure 35D). En effet la transcription de ces deux gènes est moins forte en présence des deux drogues que dans le cas de l'ellipticine seule. Comme la protéine p21 participe à l'induction de la sénescence nous pouvons émettre l'hypothèse que la répression de son expression par l'antagoniste de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ entraîne une baisse du taux de sénescence. La protéine Mdm2 agit comme un régulateur négatif de la protéine p53. L'inhibition de sa transcription par le SJ749 favorise l'activité transcriptionnelle de p53 et oriente la réponse cellulaire vers l'apoptose. L'induction des mRNA de Fas, Bax et Bad ne sont pas modifiées par l'antagoniste en présence d'ellipticine. Or Fas est impliquée dans l'apoptose et ce phénomène est augmenté lors du co-traitement.

Le SJ749, en bloquant l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, augmente la fraction apoptotique et réduit la sénescence induite par l'ellipticine en inhibant partiellement l'activation de la protéine p53. Il semble donc que l'état d'activation de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ module l'activité transcriptionnelle de la protéine p53 et influence la réponse cellulaire à l'ellipticine.

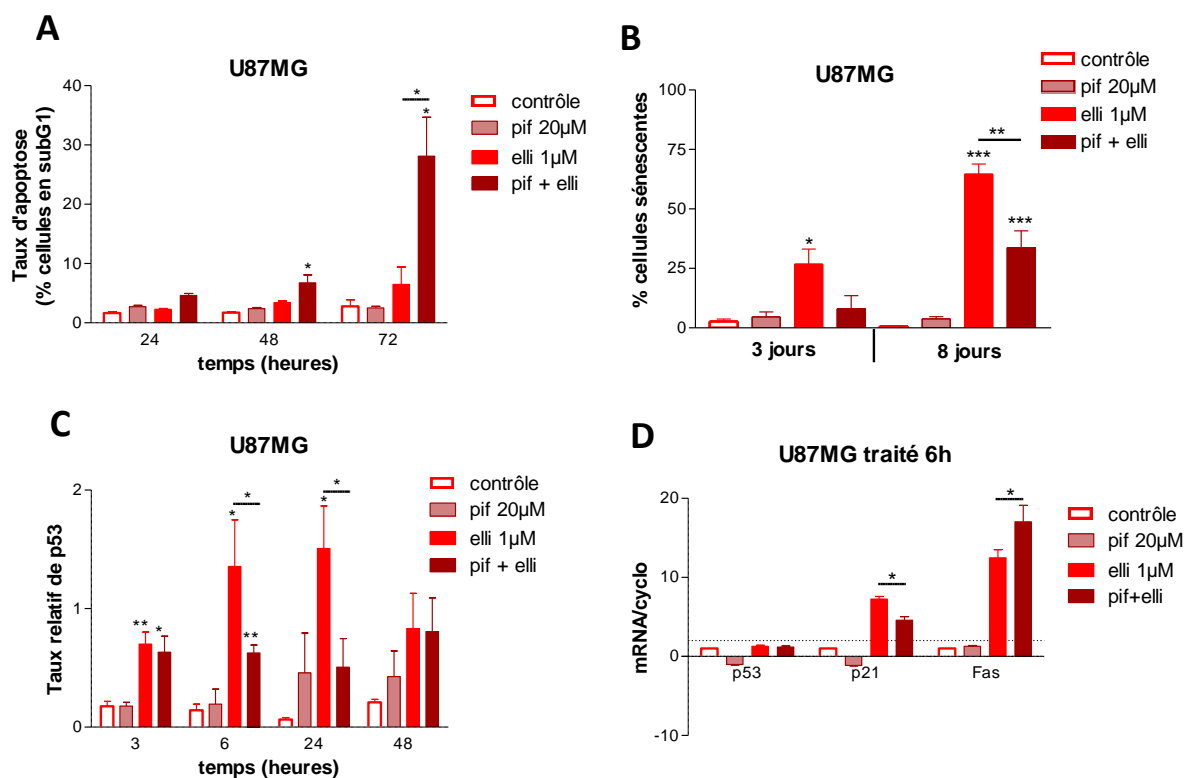


Figure 36: Inhibition de p53 et effets de l'ellipticine dans des cellules U87MG.

A) Analyse de l'apoptose dans les cellules U87MG traitées par l'ellipticine à 1μM, la pifithrin-α à 20μM ou la combinaison des deux drogues (pourcentage de cellules en subG1, $N=3$). B) Taux de sénescence des cellules U87MG après 3 et 8 jours de traitement par l'ellipticine à 1μM, la pifithrin-α à 20μM ou la combinaison des deux drogues (marquage SA-β-Gal, $N=3-4$). C) Densitogramme de la quantité relative de protéine p53 par rapport à la GAPDH dans des cellules U87MG traitées par l'ellipticine, la pifithrin-α ou les deux (3h à 48h de traitement, $N=3-4$). D) Analyse quantitative de la transcription de gènes impliqués dans la signalisation p53 par PCR en temps réel dans les cellules U87MG. Quantité de mRNA après 12h de traitement par l'ellipticine à 1μM, la pifithrin-α à 20μM ou les deux rapportée au contrôle non-traité et à la cyclophiline ($N=3-4$).

Nous avons montré que le SJ749 présente des effets différentiels sur certains gènes cibles de p53. Ainsi même si le SJ749 inhibe l'activité de p53, tous les gènes ne sont pas affectés ce qui suggère que le SJ749 a besoin d'un niveau basal de p53 activé pour avoir un effet sur la réponse cellulaire à l'ellipticine.

Importance de l'activité de la protéine p53 :

Pour vérifier si une inhibition partielle de l'activité de p53 obtenue avec le SJ749 peut rendre compte d'une modulation des effets de l'ellipticine sur la sénescence et l'apoptose nous avons utilisé un inhibiteur spécifique de l'activité transcriptionnelle de p53, la pifithrin- α . L'inhibition de l'activation de p53 par le SJ749 conduit à une diminution de la sénescence et une augmentation de l'apoptose induite par l'ellipticine. La pifithrin- α étant un inhibiteur de l'activité de la protéine p53 nous devrions obtenir le même résultat. L'analyse de la fraction de cellules apoptotiques démontre un effet potentialisateur de la pifithrin- α . Le co-traitement par les deux drogues provoque $28\pm 6\%$ d'apoptose alors que l'ellipticine seule n'en induit que $6\pm 3\%$ (Figure 36A). Nous notons une réduction du taux de sénescence induite par l'ellipticine lorsque la pifithrin- α est appliquée de façon concomitante (Figure 36B). Après 8 jours de traitement, l'ellipticine induit $65\pm 4\%$ de sénescence en absence et $34\pm 7\%$ en présence de pifithrin- α . Ainsi l'inhibition directe de l'activité de la protéine p53 module la balance sénescence/apoptose en réponse à l'ellipticine de manière similaire aux antagonistes de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$.

La pifithrin- α réduit de manière significative l'augmentation de la protéine p53 induite par l'ellipticine à 6h et 24h de traitement (Figure 36C). L'inhibiteur de l'activité de p53 diminue l'induction de l'expression de la protéine par l'ellipticine. En analysant la transcription des gènes cibles de p53 nous observons une diminution de l'induction de p21 par la pifithrin- α ainsi qu'une potentialisation de l'augmentation de Fas (Figure 36D). Ces deux résultats sont en accord avec la réduction du taux de sénescence et l'induction d'apoptose observés lors du co-traitement par la pifithrin- α et l'ellipticine.

L'inhibition partielle de l'activité de la protéine p53 module la réponse cellulaire à l'ellipticine en favorisant l'apoptose par rapport à la sénescence. Les effets de la pifithrin- α sur l'activation de p53 et de ces gènes cibles sont similaires à ceux obtenus avec les antagonistes de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. Il semble donc que l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ participe à la réponse cellulaire aux agents chimiothérapeutiques en intervenant dans l'activation de la protéine p53.

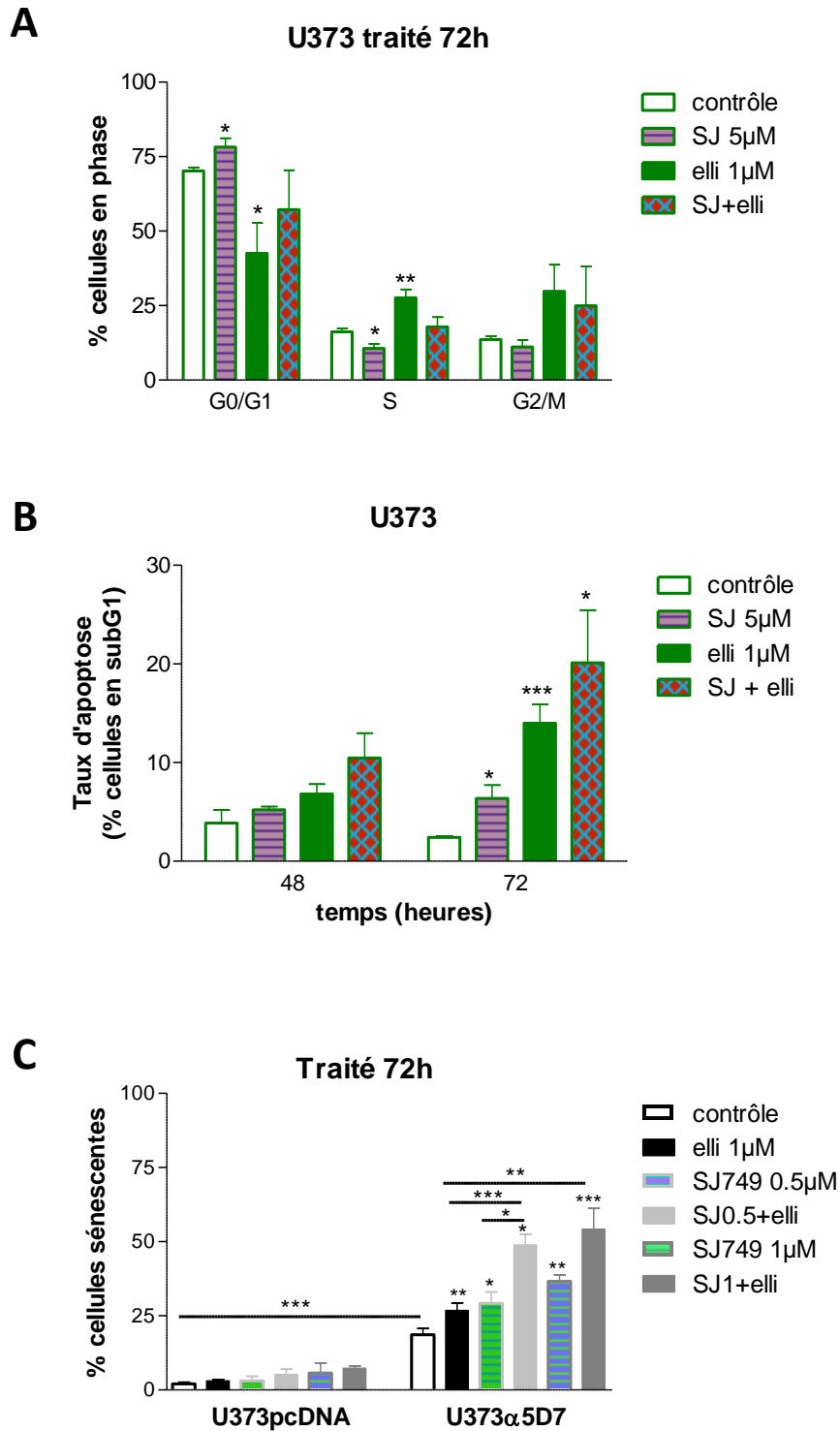


Figure 37: Inhibition de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ par un antagoniste et effets de l'ellipticine sur les cellules U373.

A) Analyse de la répartition dans le cycle cellulaire des cellules U373 traitées par le SJ749 à 5µM et l'ellipticine à 1µM pendant 72h ($N=4$). B) Analyse de l'apoptose dans les cellules U373 traitées par le SJ749 à 5µM et l'ellipticine à 1µM (pourcentage de cellules en subG1, $N=4$). C) Taux de sénescence du clone D7 sur-exprimant $\alpha 5$ et son contrôle traités pendant 72h par l'ellipticine, le SJ749 ou la combinaison des deux drogues ($N=3$).

b. Dans les cellules U373

Antagonistes de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$:

Nous avons analysé les effets du SJ749 sur la réponse cellulaire à l'ellipticine dans ces cellules exprimant une protéine p53 non-fonctionnelle. Comme dans les cellules U87MG, le SJ749 bloque la progression dans le cycle cellulaire en phase G0/G1 et réduit la phase S (Figure 37A). Les effets de l'ellipticine sur le cycle cellulaire sont abolis en présence de l'antagoniste de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. Ainsi l'inhibition de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans les cellules U373 s'oppose aux effets de l'ellipticine sur le cycle cellulaire.

Le SJ749 seul augmente faiblement la fraction apoptotique des cellules U373 après 72h de traitement (Figure 37B). Le co-traitement par l'antagoniste et l'ellipticine provoque une induction d'apoptose identique à celle induite par l'ellipticine seule. Le SJ749 n'augmente pas l'apoptose induite par l'ellipticine dans les cellules U373. Ni chacune des deux drogues seule ni le co-traitement par le SJ749 et l'ellipticine n'induisent de sénescence après 72h de traitement dans les cellules U373. Des résultats similaires ont été obtenus avec le K34c au laboratoire. Il semble donc que, pour moduler la balance sénescence/apoptose en réponse à l'ellipticine, le SJ749 requiert la présence d'une forme fonctionnelle de la protéine p53.

Activation de l'intégrine :

Nous avons montré précédemment que la sur-expression de la sous-unité $\alpha 5$ de l'intégrine dans les cellules U373 entraîne une augmentation du taux d'intégrine $\alpha 5\beta 1$ activée à la membrane. Ces cellules peuvent être considérées comme un modèle d'activation de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. Nous avons exploré les effets de l'antagoniste de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, le SJ749 dans les cellules U373 sur-exprimant la sous-unité $\alpha 5$ (Figure 37C). Le SJ749 appliqué seul 1 μ M induit une augmentation de sénescence de manière dose-dépendante après 72h de traitement dans le clone D7 (29,2 \pm 3,8% à 0,5 μ M, 36,6 \pm 2% à 1 μ M contre 18,6 \pm 2,1% dans les cellules non-traitées). L'application simultanée de l'antagoniste et de l'ellipticine aboutit à une induction de sénescence plus élevée que chacune des deux drogues seule (48,8 \pm 3,5 et 54,2 \pm 7% à 0,5 et 1 μ M de SJ749 en présence d'ellipticine à 1 μ M contre 26,8 \pm 2,4% pour l'ellipticine seule). Aucun de ces traitements ne provoque de sénescence dans les cellules contrôle.

La sur-expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans les cellules U373 rétablit la sénescence induite par l'ellipticine. L'inhibition de l'intégrine dans ces cellules potentialise les effets de l'ellipticine sur la sénescence.

3) Discussion

Les lignées de glioblastomes répondent différemment à un agent chimiothérapeutique si la protéine p53 est mutée ou fonctionnelle :

Le traitement par l'ellipticine stabilise et active la protéine p53 dans les cellules U87MG. La transduction des gènes cibles de p53 est augmentée et la réponse cellulaire s'oriente vers l'induction de sénescence prématurée. Les cellules U373 présentent une forte inhibition de leur pouvoir prolifératif après traitement par l'ellipticine, reliée à un blocage du cycle cellulaire en phase G2/M. L'ellipticine induit de l'apoptose et très peu de sénescence dans ces cellules.

L'implication de la protéine p53 dans la réponse cellulaire aux situations de stress et plus particulièrement les dommages à l'ADN est effective dans de nombreux types cellulaires et pour de nombreux agents cytotoxiques. Selon le statut (muté ou fonctionnel) de la protéine p53, les cellules présentent souvent une différence de sensibilité aux thérapies. Les gliomes exprimant p53wt se révèlent moins sensibles que ceux avec p53muté en terme de mort cellulaire (Batista *et al.*, 2007). Les cellules U87MG dont l'expression de la protéine p53 est inhibée par un siRNA sont plus sensibles au Témzolomide (Hermisson *et al.*, 2006). L'inhibition de la protéine p53 par la pifithrin- α permet de sensibiliser les cellules au Témzolomide *in vitro* et *in vivo* (Xu *et al.*, 2005 ; Dinca *et al.*, 2008). La croissance de gliomes injectés *in vivo* est fortement ralentie par le traitement associant la pifithrin- α et le Témzolomide lorsque ceux-ci expriment la forme fonctionnelle de p53. Cette sensibilisation passe par une induction d'apoptose. Une publication décrit des résultats inverses : les gliomes exprimant p53wt sont plus sensibles au Témzolomide (Roos *et al.*, 2007). Ainsi le statut de la protéine p53 constitue un facteur important dans la réponse cellulaire aux agents chimiothérapeutiques. Nos résultats confirment les données de la littérature indiquant que p53wt induit un arrêt du cycle et l'entrée en sénescence alors que p53 muté induit l'apoptose et la catastrophe mitotique (Y Wang *et al.*, 2004 ; Xue *et al.*, 2007).

La sénescence a été définie initialement dans des fibroblastes humains en culture par Hayflick comme la fin de la capacité proliférative des cellules (Hayflick, 1965). Les cellules sénescents ne prolifèrent plus mais conservent un métabolisme actif. L'arrêt du cycle cellulaire et la sénescence constituent un mécanisme suppresseur de tumeurs mais ils peuvent également être considérés comme des mécanismes de protection de la cellule. En effet ces phénomènes permettent la réparation de l'ADN. D'autre part, les cellules sénescents

secrètent un grand nombre de facteurs de croissance qui possèdent des propriétés anti-apoptotiques, angiogéniques ou mitogènes et modulent la prolifération des cellules avoisinantes ainsi que leur sensibilité aux agents chimiothérapeutiques (Schmitt, 2007). Ce phénotype sécrétoire associé à la sénescence est présent aussi bien dans les cellules normales que les cellules tumorales. Il influence la différenciation cellulaire, module l'invasion et la malignité des cellules avoisinantes (Coppe *et al.*, 2008). Dans le cadre d'une thérapie anti-tumorale, les agents chimiothérapeutiques induisant de la sénescence présentent des effets positifs sur la survie des patients mais ils ne permettent pas l'élimination de la tumeur. La croissance de la tumeur est interrompue mais elle ne régresse pas. Dès l'arrêt du traitement, les cellules sénescents peuvent induire la transformation des cellules avoisinantes et engendrer une récurrence. Il a également été montré que des cellules sénescents peuvent ré-entrer dans le cycle après acquisition de certaines mutations (Sage *et al.*, 2003). La sortie de l'état de sénescence *in vivo* joue un rôle essentiel dans la réponse au traitement. Une thérapie conduisant majoritairement à l'induction de sénescence prématurée pose de nombreuses questions sur le devenir des cellules tumorales et leurs effets sur l'environnement de la tumeur. Ainsi l'induction de sénescence ne semble pas constituer le moyen le plus efficace pour éradiquer les tumeurs cérébrales.

La protéine p53 est un facteur de transcription sophistiqué composé de domaines fonctionnels complexes. Son activation par un même stimulus peut induire des réponses différentes dans deux lignées distinctes. L'orientation de la réponse cellulaire est sous la dépendance de mécanismes en amont et en aval de p53 qui restent mal connus. C'est l'induction de certains gènes cibles de la protéine p53 qui oriente la réponse cellulaire vers la sénescence ou l'apoptose. Il existe deux modèles permettant d'expliquer la sélectivité de p53 pour certains gènes (Espinosa, 2008). Dans le premier modèle, la sélectivité est apportée par l'affinité de la protéine p53 pour ces séquences cibles d'ADN. L'affinité est régulée par les co-facteurs présents et les modifications post-traductionnelles de la protéine p53. Par exemple, les co-facteurs du type doigt zinc (Hzf) favorisent la transcription de gènes menant à l'arrêt du cycle cellulaire. La spécificité de p53 peut également être modulée après liaison de la protéine sur les gènes cibles. Dans ce cas, ce sont les co-activateurs, l'état d'acétylation des histones et l'activité de l'ARN polymérase II qui déterminent la nature des gènes cibles transcrits. Outre ces mécanismes transcriptionnels, la signalisation p53-dépendante peut également être régulée en modulant la dégradation des ARNm transcrits ou l'activité des protéines cibles.

Dans les cellules U87MG, nous notons une induction préférentielle des gènes codant pour Mdm2, p21 et Fas suite à l'activation de la protéine p53 par l'ellipticine. D'autres gènes cibles tels que Bax et Bad ne sont pas induits. La transcription de ces gènes oriente la réponse cellulaire vers la sénescence.

Rôle de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans la réponse aux traitements :

Dans les tumeurs à p53wt (modèle U87MG) :

La modulation du taux d'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ module la chimiosensibilité des cellules U87MG (Tableau 10). Les cellules sur-exprimant l'intégrine (clone F8) révèlent une résistance à la drogue dans un test de clonogénicité. Nous avons par ailleurs au laboratoire exploré la sensibilité de ces cellules à d'autres thérapies (Témozolomide et rayons X). Les résultats obtenus mettent en évidence une sensibilisation du clone D4 (U87MG sous-exprimant $\alpha 5$) au Témozolomide et aux radiations ainsi qu'une résistance du clone F8 au Témozolomide (agent chimiothérapeutique de référence pour les glioblastomes). Il a été montré que le taux d'expression de l'intégrine $\beta 1$ et de ces différents partenaires régule la radiosensibilité des cellules tumorales. Une étude sur des cellules cancéreuses pancréatiques démontre que la répression de l'expression de la cavéoline-1 ou de l'intégrine $\beta 1$ sensibilise les cellules aux radiations ionisantes (Cordes *et al.*, 2002). Alors que les données bibliographiques impliquent la sous-unité $\beta 1$ sans identification de la sous-unité α associée, nous proposons un rôle particulier de la sous-unité $\alpha 5$ (et donc de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$) dans la chimiosensibilité des cellules U87MG.

| Effets des thérapies sur la clonogénicité | U87 | U87 $\alpha 5+$ | U87 $\alpha 5-$ | U87+SJ |
|---|-----|-----------------|-----------------|------------|
| Ellipticine | ↘ | résistance | idem U87 | + sensible |
| Témozolomide | ↘ | résistance | + sensible | idem U87 |
| RayonsX | ↘ | idem U87 | + sensible | ? |

Tableau 10 : Modulation de la sensibilité aux thérapies par l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans les cellules U87MG.

Non seulement le taux d'expression mais aussi l'état d'activation de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ peuvent jouer un rôle dans la réponse des cellules aux traitements. L'ajout d'antagonistes de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ (SJ749 ou K34c) conduit à une augmentation de l'induction d'apoptose et une réduction de la sénescence en réponse à l'ellipticine (Tableau 11). A l'opposé, l'activation de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ par la fibronectine aboutit à une potentialisation de l'induction de sénescence. Nous pouvons émettre l'hypothèse que l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ favorise la sénescence lors d'un traitement. Nous nous attendions à ce que la répression de la sous-unité $\alpha 5$ donne les mêmes résultats que les antagonistes, c'est-à-dire une induction d'apoptose. Mais la répression de l'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans les cellules U87MG favorise la sénescence. Pour expliquer cette différence nous avons émis l'hypothèse suivante : alors que l'antagoniste inhibe une voie de signalisation activée par l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, dans le clone D4 nous avons une non-activation de cette voie. Des investigations complémentaires sont en cours au laboratoire pour explorer cette hypothèse et identifier les acteurs de cette signalisation.

| Effets ellipticine | U87 | U87 $\alpha 5+$ | U87 $\alpha 5-$ | U87+SJ | U87+FN |
|--------------------|--------------------|-----------------|-----------------|--------------|----------|
| Prolifération | ↘ | idem U87 | ↘↘ | ↘↘ | idem U87 |
| Clonogénicité | ↘ | résistance | idem U87 | ↘ | ? |
| Cycle cellulaire | Bloc G0/G1 et G2/M | idem U87 | idem U87 | ↗ bloc G0/G1 | idem U87 |
| Apoptose | ∅ | idem U87 | idem U87 | ↗ | idem U87 |
| Sénescence | ↗↗ | idem U87 | ↗↗↗ | ↗ | ↗↗↗ |
| Activité p53 | ↗↗ | idem U87 | ↗ | ↗ | ? |

Tableau 11 : Bilan de la modulation des effets de l'ellipticine par l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans les cellules U87MG.

Nous avons montré que le co-traitement par le SJ749 et l'ellipticine oriente la réponse cellulaire vers l'apoptose au dépend de la sénescence. Il semble donc que l'inhibition de la fonction de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans les glioblastomes présente des effets bénéfiques sur la chimiosensibilité. La majorité des essais cliniques menés actuellement pour le traitement des glioblastomes associent une thérapie classique du type chimio- ou radiothérapie à une molécule ciblant une voie de signalisation constitutivement activée. Le Bevacizumab (anticorps humanisé dirigé contre le VEGF) fait l'objet d'études pour le traitement de plusieurs tumeurs solides y compris les gliomes (Shih et Lindley, 2006). Son association avec différents agents chimiothérapeutiques permet d'augmenter la durée moyenne de survie, le temps sans progression et le taux de réponse des patients. L'enzastaurin (inhibiteur de PKC β) a démontré son efficacité en monothérapie ou en association avec une radiothérapie pour le traitement des gliomes (Sathornsumetee et Rich, 2008). Le vorinostat (inhibiteur des HDAC) présente également une activité anti-tumorale contre les glioblastomes. Malgré les nombreuses cibles explorées, les thérapies utilisées donnent des résultats modestes par rapport à la rapidité d'évolution de ce type de cancer. D'après nos résultats, un co-traitement utilisant un antagoniste de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et une thérapie classique pourrait se révéler pertinent.

Le SJ749 module la réponse cellulaire à l'ellipticine en régulant de manière fine l'activité de la protéine p53 : la transcription du gène cible p21 induite par l'ellipticine est réduite par le SJ749 mais les autres gènes cibles testés ne sont pas affectés. L'inhibition de l'activité de p53 par la pifithrin- α module la balance sénescence/apoptose de la même façon que le SJ749. Nos résultats démontrent donc l'implication de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans la régulation de la balance sénescence/apoptose via la modulation de la signalisation p53-dépendante en réponse à l'ellipticine. Ces résultats ont été confirmés dans le laboratoire en utilisant le Témzolomide en combinaison avec les deux antagonistes de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. Il semble donc que l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ modifie la balance sénescence/apoptose en réponse aux agents chimiothérapeutiques.

Les intégrines et plus particulièrement $\beta 1$ et $\alpha V\beta 3$ régulent la réponse apoptotique aux dommages à l'ADN en modulant l'activation de la protéine p53 (Lewis *et al.*, 2002). Les fibrosarcomes adhérents sont plus sensibles au 5-arabino-furanosylcytosine que ceux placés en suspension. L'induction d'apoptose par cette molécule dans des cellules non-adhérentes est rétablie par l'ajout d'anticorps dirigés contre $\beta 1$ ou $\alpha V\beta 3$. Et les cellules délétées pour p53 sont insensibles au 5-arabino-furanosylcytosine quelque soit leur état d'attachement. Alors que dans cette étude l'intégrine sensibilise les cellules à l'agent chimiothérapeutique en activant p53, une autre étude démontre que l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ rend les cellules leucémiques résistantes à

la fludarabine en réduisant le taux de p53 (de la Fuente *et al.*, 2003). La relation entre les intégrines en général et la protéine p53 n'est pas claire et dépend largement de l'intégrine étudiée, du modèle tumoral utilisé et de la drogue utilisée.

La simvastatin, inhibiteur de la biosynthèse du cholestérol, modifie la morphologie et l'organisation du cytosquelette de carcinomes de la tête et du cou. Elle inhibe la prolifération cellulaire, induit un blocage du cycle cellulaire en phase G1 et réduit la migration et l'invasion de ces cellules. Il a été montré que cette statine réduisait le taux d'intégrine $\beta 1$, diminuait la phosphorylation de FAK et Erk et augmentait l'expression des CDKI p21 et p27 (Takeda *et al.*, 2007). Cette étude relie de manière indirecte l'intégrine $\beta 1$ et la protéine p21. Dans des cellules cancéreuses hépatiques la sur-expression de l'intégrine $\beta 1$ induit une augmentation de la transcription de la protéine p21. L'intégrine active le promoteur de p21 de manière p53-indépendante (Fang *et al.*, 2007). Dans ces deux études, une augmentation de $\beta 1$ et une diminution de $\beta 1$ induisent une augmentation de p21. Encore une fois les résultats obtenus montrent la complexité de la relation entre intégrines, p53 et p21.

Dans notre modèle, nous avons montré que l'application simultanée d'un antagoniste de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et d'un agent chimiothérapeutique réduit l'activation de la protéine p21 et favorise l'induction d'apoptose. La sur-expression de p21 dans des glioblastomes rend les cellules moins sensibles au BCNU et au cis-platine (Ruan *et al.*, 1998). Inversement sa répression les sensibilise en induisant de l'apoptose (Ruan *et al.*, 1999). La diminution de la transcription de cette protéine par différentes voies conduit à l'induction d'apoptose. Un inhibiteur de mTOR, le RAD001, potentialise l'apoptose induite par le cis-platin dans des cellules tumorales en réduisant l'expression de p21 (Beuvink *et al.*, 2005). Il existe des petites molécules capables d'activer la protéine p53 et d'induire de manière préférentielle une réponse apoptotique dans les cellules tumorales. La petite molécule RITA active la transcription de gènes cibles de p53 impliqués dans l'apoptose alors que l'exposition des mêmes cellules à des conditions de stress conduit à la transcription de gènes cibles de p53 impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire (Enge *et al.*, 2009). L'induction d'apoptose par RITA est due à la dégradation par Mdm2 d'un co-facteur transcriptionnel de p53, ce qui prévient l'augmentation de la transcription de p21. Ces données suggèrent que l'induction d'apoptose en réponse au co-traitement par le SJ749 et l'ellipticine est liée à l'inhibition de la transcription de la protéine p21.

La protéine p53 régule la balance sénescence/apoptose en réponse aux agents chimiothérapeutiques. La connaissance des mécanismes p53-dépendants orientant la réponse

cellulaire vers l'apoptose permettrait le développement de stratégies anti-cancéreuses plus efficaces. D'après nos résultats, les antagonistes de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ pourraient avoir un rôle modulateur sur l'activité transcriptionnelle de p53 en favorisant les gènes pro-apoptotiques. Ils constitueraient donc des agents originaux pour une thérapie anti-tumorale.

Dans les tumeurs à p53 non fonctionnel (modèle U373) :

Les résultats obtenus dans les cellules U373 sont pour le moment moins étoffés que ceux des cellules U87MG. Cependant nous avons pu mettre en évidence dans ces cellules exprimant une forme mutée non-fonctionnelle de p53 des effets inattendus de la sur-expression de la sous-unité $\alpha 5$ de l'intégrine : le clone D7 (U373 sur-exprimant $\alpha 5$) présente des mitoses altérées, un cycle tétraploïde et une induction basale de sénescence. Ce comportement pourrait permettre un réarrangement chromosomique et éventuellement rendre les tumeurs plus agressives. Il s'agira maintenant de comprendre les mécanismes moléculaires sous-tendant ces effets qui restent énigmatiques.

Le taux d'intégrine $\alpha 5\beta 1$ modifie la réponse cellulaire à l'ellipticine dans les cellules U373 (Tableau 12). Nous observons une restauration de la capacité de l'ellipticine à induire de la sénescence dans des cellules suite à la sur-expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. Une nouvelle fois l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ se révèle impliquée dans l'orientation de la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN. Cette induction de sénescence passe par un mécanisme indépendant de la protéine p53. Il a été montré que la sur-expression de la kinase Chk2 induit un arrêt de prolifération, de l'apoptose et de la sénescence dans des cellules exprimant ou non la protéine p53. Ce mécanisme met en jeu une induction de p21 de manière indépendante de p53 (Aliouat-Denis *et al.*, 2005). D'autres protéines telles que p16, Hsp72 et ARF peuvent induire l'entrée des cellules en sénescence sans activation de la protéine p53. Des travaux complémentaires vont être entrepris pour comprendre la relation entre l'augmentation de l'expression d' $\alpha 5$ et l'induction de sénescence dans ces cellules.

Dans les cellules U373 sur-exprimant la sous-unité $\alpha 5$, l'inhibition de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ par le SJ749 conduit à l'augmentation de la sénescence chimio-induite. L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ exprimée dans ces cellules est activée et induit un taux basal de sénescence. Dans ce modèle cellulaire, le SJ749 semble se comporter comme un agoniste de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans la voie de la sénescence. Dans les cellules contrôle, le SJ749 agit comme un antagoniste de l'intégrine sur le cycle cellulaire et n'a aucun effet sur la sénescence. Le caractère bivalent des effets du SJ749 dans ces cellules peut être lié à un effet différentiel de la molécule selon l'état d'activation de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. Le SJ749 se comporterait comme un antagoniste sur

l'intégrine non-activée et comme un agoniste sur l'intégrine activée. Un comportement inverse a été décrit pour un antagoniste de l'intégrine $\alpha 4\beta 1$: il agirait comme un antagoniste lorsque l'intégrine est activée et comme un agoniste lorsque celle-ci se trouve dans sa conformation inactive (Parsons *et al.*, 2008)

| Effets ellipticine | U373 | U373 $\alpha 5+$ | U373 $\alpha 5-$ | U373+SJ | U373 $\alpha 5+$ +SJ |
|--------------------|----------------------|------------------|------------------|--------------|----------------------|
| Prolifération | ↘ | idem U373 | idem U373 | ? | ? |
| Cycle cellulaire | ↘ G0/G1 et bloc G2/M | Tétraploïde | idem U373 | cycle normal | Tétraploïde |
| Apoptose | ↗ | idem U373 | idem U373 | idem U373 | ? |
| Sénescence | ↗ | ↗↗ | idem U373 | idem U373 | ↗↗↗ |
| Activité p53 | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ |

Tableau 12 : Bilan de la modulation des effets de l'ellipticine par l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans les cellules U373.

La moitié des tumeurs expriment une forme mutée de la protéine p53 et une large majorité des cellules exprimant une forme fonctionnelle de cette protéine présente des altérations ou des mutations d'autres gènes impliqués dans sa signalisation. Comme les glioblastomes semblent sur-exprimer l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, les résultats observés dans les cellules U373 sur-exprimant la sous-unité $\alpha 5$ sont peut-être les plus proches de la réalité clinique. La sénescence prématurée constitue la réponse majoritaire aux dommages à l'ADN dans ces cellules. Il se pose encore une fois la question des bénéfices d'une telle réponse dans une thérapie anti-tumorale.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les thérapies anti-cancéreuses actuelles se révèlent souvent inefficaces contre les tumeurs hautement agressives et fortement vascularisées. Dans le cas des glioblastomes, la durée moyenne de survie dépasse rarement les 12 mois quelque soit le traitement utilisé. Les oncologues sont en attente de thérapies plus efficaces. Les intégrines, de par leur implication dans de nombreuses étapes de la tumorigenèse, constituent une cible de choix dans le cadre d'une thérapie anti-tumorale. Récemment, l'importance de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans certaines tumeurs solides a été mise en évidence.

Les travaux réalisés au cours de ma thèse nous ont permis de caractériser le rôle de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans les glioblastomes et son potentiel en tant que cible thérapeutique.

Les antagonistes de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, outre leur capacité à inhiber l'adhérence cellulaire à la fibronectine, possèdent également un effet inhibiteur de la prolifération et la clonogénicité des glioblastomes. Nous avons mis en évidence une dissociation des effets de ces antagonistes sur l'adhérence et la prolifération. Dans le cadre d'une thérapie anti-tumorale, les antagonistes pourraient inhiber la prolifération sans avoir d'effet sur l'adhérence cellulaire. Cette nouvelle stratégie de développement d'antagonistes nécessite la mise au point d'un test d'efficacité anti-proliférative. Ce test pourrait se baser sur la mesure de l'état d'activation d'une kinase affectée par l'intégrine $\alpha 5\beta 1$.

La corrélation entre le taux d'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et l'agressivité tumorale s'est révélée plus complexe que prévue dans les lignées de glioblastomes étudiées. L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ est surexprimée dans les tumeurs cérébrales et son taux d'expression augmente avec le grade tumoral. Nous avons montré que cette protéine régule la progression dans le cycle cellulaire, la prolifération et l'induction de sénescence. La répression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et son inhibition par un antagoniste induisent un blocage du cycle cellulaire en phase G0/G1. Cela signifie que l'intégrine favorise la transition G1/S certainement en régulant la cycline D1 (Fournier *et al.*, 2008). En ce qui concerne la prolifération et la sénescence, les effets sont différents dans les deux lignées. Alors que pour les cellules U87MG nous observons une corrélation entre le taux d'intégrine et l'agressivité, dans les cellules U373 le profil s'inverse. Il en est de même pour l'induction de sénescence prématurée. Le statut de la protéine p53 pourrait être à l'origine de cette différence de comportement. Nous avons mis en évidence que le SJ749 module l'activation de p53. Cela suggère l'existence d'un lien fonctionnel entre l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et la protéine p53 qui reste à élucider.

Dans les cellules exprimant une forme mutée de la protéine p53, la sur-expression de la sous-unité $\alpha 5$ provoque une évolution des cellules vers un état tétraploïde et une induction de sénescence prématurée. L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ participe à de nombreux processus clés régulant la progression tumorale, elle constitue donc à la fois une cible thérapeutique mais également un marqueur pronostic.

L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ oriente la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN vers la sénescence ou l'apoptose en régulant l'activité de la protéine p53. L'inhibition de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ par le SJ749 favorise l'apoptose au dépend de la sénescence en réponse à l'ellipticine dans les cellules U87MG. Par contre dans les cellules U373 sur-exprimant la sous-unité $\alpha 5$, le traitement par un antagoniste de l'intégrine potentialise l'induction de sénescence en réponse à un agent chimiothérapeutique. L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ régule la chimiosensibilité quelque soit le statut p53 des cellules. Le statut de la protéine p53 et le taux d'expression de la sous-unité $\alpha 5$ constituent donc des marqueurs déterminants de la sensibilité aux thérapies.

Alors que l'intérêt de l'apoptose dans une thérapeutique anti-tumorale ne fait aucun doute, les bénéfices de la sénescence sont plus controversés. Les cellules sénescents peuvent ré-entrer dans le cycle et secrètent des facteurs de croissance modifiant l'environnement tumoral. De nombreux agents thérapeutiques induisent de la sénescence *in vivo*. Après l'élucidation des gènes et des mécanismes de régulation responsables de l'orientation de la réponse cellulaire nous pourrions élaborer une nouvelle stratégie pour développer des thérapies plus efficaces.

Nous avons montré que l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ constitue une cible thérapeutique pour le traitement des glioblastomes. Cette hypothèse doit être confirmée *in vivo* avant de pouvoir faire l'objet d'applications cliniques. Grâce aux tumorothèques et aux plateformes de xénogreffes du Grand-Est, nous sommes en possession de biopsies de tumeurs exprimant des taux élevés ou faibles de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. Ces modèles nous permettront d'évaluer le rôle de la sous-unité $\alpha 5$ dans des xénogreffes *in vivo*. Nous allons évaluer l'importance du taux d'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans l'agressivité et la sensibilité aux thérapies des xénogreffes. Nous devons également vérifier le statut de la protéine p53 dans ces tumeurs avant de pouvoir transposer notre hypothèse à la réalité clinique.

Nos résultats mettent en évidence l'importance des sous-populations tumorales dans les effets thérapeutiques. En effet le taux d'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et le statut de la protéine p53 constituent des marqueurs déterminants de l'agressivité et de la réponse cellulaire chimio-induite. Dans cette optique la thérapie devra être adaptée au profil génétique de la tumeur pour être le plus efficace possible.

PUBLICATIONS

A) **MANUSCRIT N°1**: *Cancer Res* (2006) 66 : 6002-7

The small $\alpha 5\beta 1$ integrin antagonist, SJ749, reduces proliferation and clonogenicity of human astrocytoma cells

Cette publication décrit les effets d'un antagoniste de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, le SJ749 sur les glioblastomes *in vitro*. L'inhibition de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ par le SJ749 conduit à une réduction de la prolifération cellulaire via un blocage du cycle en phase G0/G1 dans les cellules A172 et U87MG. Le SJ749 réduit la clonogénicité des cellules U87MG mais pas des cellules A172 en milieu semi-solide. Les effets du SJ749 sur la clonogénicité augmentent avec le taux d'expression de la sous-unité $\alpha 5$ alors que les effets sur l'adhérence diminuent. Ces résultats mettent en évidence la dissociation des effets de l'antagoniste sur l'adhérence et la prolifération et montrent pour la première fois qu'un antagoniste spécifique de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ a une action anti-tumorale *in vitro*.

Signalement bibliographique ajouté par le :

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
Service Commun de Documentation

The Small $\alpha_5\beta_1$ Integrin Antagonist, SJ749, Reduces Proliferation and Clonogenicity of Human Astrocytoma Cells

Anne MAGLOTT, Petr BARTIK, Sedat COSGUN, Philippe KLOTZ, Philippe RONDE, Guy FUHRMANN, Kenneth TAKEDA, Sophie MARTIN, and Monique DONTENWILL

Cancer Research, 2006, vol. 66, pages 6002-6007

Manuscrit 1 : pages 152-157 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs de l'UdS peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4105>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

B) MANUSCRIT N°2 : *Int J Oncol (2008) 32 : 1021-31*

Detection of a hypersialylated $\beta 1$ integrin endogenously expressed in the human astrocytoma cell line A172

Cette publication présente la caractérisation de l'intégrine $\beta 1$ atypique exprimée de manière endogène dans les cellules A172. Cette sous-unité est hypersialylée, forme des hétérodimères avec la sous-unité $\alpha 5$ et est localisée à la membrane. La sur-expression de la sous-unité $\beta 1$ dans les cellules A172 conduit à l'augmentation de la forme hypersialylée et à l'apparition de l'intégrine $\beta 1$ normalement glycosylée et adressée à la membrane. Les cellules A172- $\beta 1$ se révèlent moins sensibles au SJ749 en terme d'adhérence et leur progression dans le cycle dépend de l'attachement à la matrice. Ainsi la fonction de l'intégrine $\beta 1$ est modulée par son état de glycosylation/sialylation.

Signalement bibliographique ajouté par le :

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
Service Commun de Documentation

Detection of a hypersialylated β 1 integrin endogenously expressed in the human astrocytoma cell line A172

Petr BARTIK, Anne MAGLOTT, Gustav ENTLICHER, Dietmar VESTWEBER, Ken TAKEDA, Sophie MARTIN and Monique DONTENWILL

International Journal of Oncology, 2008, vol. 32, n° 5, pages 1021-1031

Manuscrit 2 : pages 159-169 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

C) MANUSCRIT N°3 : *BBA (2008) 1793 : 354-67*

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

Cette publication relate les effets l'implication de la cavéoline-1 dans l'agressivité des glioblastomes. La sur-expression de la cavéoline-1 inhibe l'expression de certaines intégrines dont $\alpha 5\beta 1$ dans les cellules U87MG et réduit leur prolifération et leur pouvoir clonogénique. Les cellules sous-exprimant la cavéoline-1 (et sur-exprimant $\alpha 5$) se révèlent plus sensibles à l'antagoniste de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, le SJ749, en terme d'invasion et de clonogénicité. Ces changements phénotypiques sont principalement liés à la modulation de l'expression de la sous-unité $\alpha 5$. Ainsi les résultats présentés dans cette publication peuvent être mis en relation avec ceux obtenus dans les cellules U87MG sur- ou sous-exprimant la sous-unité $\alpha 5$.

Signalement bibliographique ajouté par le :

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
Service Commun de Documentation

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

Sophie MARTIN, Erika C. COSSET, Jérôme TERRAND, Anne MAGLOTT, Ken TAKEDA, Monique DONTENWILL

Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2009, vol. 1793, n° 2, pages 354-367

Manuscrit 3 : pages 171-184 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs de l'UdS peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.09.019>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

D) MANUSCRIT N°4 : *Soumis*

$\alpha 5\beta 1$ integrin antagonists sensitize human glioblastoma cells to chemotherapy through the modulation of p53 pathway

Cette publication présente les effets d'un co-traitement associant un antagoniste de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et un agent chimiothérapeutique (ellipticine ou Témazolomide) sur les glioblastomes. La réponse cellulaire à la chimiothérapie dépend du statut p53 des cellules : alors que les cellules U87MG exprimant p53wt entrent en sénescence, les cellules U373 exprimant une forme mutée de p53 deviennent apoptotiques. L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ module la réponse cellulaire aux agents chimiothérapeutiques en régulant l'activité de la protéine p53. Le blocage de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ par un antagoniste favorise l'apoptose au dépend de la sénescence chimio-induite. Ces résultats suggèrent qu'une thérapie combinant un antagoniste de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ avec une chimiothérapie classique serait bénéfique pour traiter des glioblastomes à fort taux d'intégrine et ayant une protéine p53 fonctionnelle.

$\alpha 5\beta 1$ integrin antagonists sensitize human glioblastoma cells to chemotherapy through the modulation of the p53 pathway

Eva MARTINKOVA^{1,3}, Anne MAGLOTT¹, David Y. LEGER¹, Dominique BONNET², Marie STIBOROVA³, Ken TAKEDA¹, Sophie MARTIN¹ and Monique DONTENWILL^{1,*}

¹ Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, UMR 7213 CNRS, ² Laboratoire d'Innovation Thérapeutique, UMR 7200 CNRS, Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, 67401 Illkirch, France. ³ Department of Biochemistry, Charles University, Faculty of Science, 12843 Prague, Czech Republic.

***Corresponding author:** Dr Monique DONTENWILL, Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, UMR 7213 CNRS, Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, 67401 Illkirch, France. Tel. 0033390244267 ; Fax 0033390244313; Email: monique.dontenwill@unistra.fr

Running title: $\alpha 5\beta 1$ integrin antagonists in glioblastoma therapy

Keywords: $\alpha 5\beta 1$ integrin, SJ749, ellipticine, human glioblastoma, senescence, apoptosis, chemotherapy, p53.

ABSTRACT

The $\alpha 5\beta 1$ integrin represent a new therapeutic target for glioblastoma, which are malignant brain tumors difficult to cure with conventional therapies. We have recently shown that the $\alpha 5\beta 1$ integrin antagonist, SJ749, inhibited glioblastoma proliferation and clonogenicity *in vitro*. SJ749 potency is dependent on the level of the $\alpha 5$ subunit. Glioblastoma are known to be highly resistant to chemotherapy. We therefore investigated whether blocking $\alpha 5\beta 1$ integrin pathways concomitantly with chemotherapy (ellipticine and temozolomide) may improve the therapeutic effect in human glioblastoma cell lines (U87MG and U373). Here we show that inhibiting $\alpha 5\beta 1$ integrin with two selective ligands sensitizes cells to chemotherapy-induced apoptosis over premature senescence. A functional p53 is needed to achieve the antagonist effects. When p53 is mutated and inactive, chemotherapy provoked p53-independent cell apoptosis which was not improved by the integrin antagonists. The inhibition of the function of $\alpha 5\beta 1$ integrin modulates rather than inhibits the p53 signaling. Transcriptional activity of p53 is selectively modified to shift the cell answer from senescence towards apoptosis. Our results highlight a new role of the $\alpha 5\beta 1$ integrin in the control of glioblastoma aggressiveness and responsiveness to chemotherapy which may have a crucial impact in the clinical management of patients suffering from brain tumors.

INTRODUCTION

Gliomas are the most abundant adult brain tumors nowadays treated with conventional therapies (surgery, radiotherapy and/or chemotherapy). These therapeutic strategies have demonstrated only modest survival benefits. Grade IV astrocytomas (glioblastoma multiforme or GBM) account for about half of all astrocytic tumors. The median survival of patients diagnosed with GBM is less than a year whatever the treatment chosen. Therefore new alternatives are highly needed. In recent years there has been significant progress in understanding the molecular biology of gliomas. Specific signaling pathways or cellular functions commonly altered in highly heterogeneous malignant gliomas were described. Altogether, it resulted in new targeted therapies translated into the clinic such as those aiming for growth factor ligands and receptors (EGF/EGFR, PDGF/PDGFR, VEGF/VEGFR) and intracellular effectors (RAS, AKT, mTOR...) (1, 2). Integrins, $\alpha\beta$ transmembrane heterodimers, which constitute a family of adhesion receptors, were recently identified as potential therapeutic targets. Engagement of integrins with the extracellular matrix (ECM) is crucial for biological processes such as differentiation, proliferation, survival and motility. Integrins take part in various cancer stages such as malignant transformation, tumor growth and progression, invasion and metastasis and angiogenesis. Particular emphasis has been given to $\alpha v\beta 3/\beta 5$ integrins which are overexpressed in neovessels nourishing the tumour. An $\alpha v\beta 3/\beta 5$ antagonist, cilengitide, is currently undergoing clinical trials for malignant glioma (3). Another integrin emerged recently as a potential anti cancer target, the $\alpha 5\beta 1$ integrin, also known as the fibronectin receptor. The $\alpha 5\beta 1$ integrin is overexpressed in both tumoral neovessels (4, 5) and tumoral cells and appears now as an interesting therapeutic target for brain (6, 7), lung (8) and ovarian tumors (9). The expression of the $\alpha 5\beta 1$ integrin is related to the tumor stage of gliomas (6) and the integrin signaling pathways were identified as being part of functional networks of GBM (10). We have previously shown that the most specific non peptidic $\alpha 5\beta 1$ integrin antagonist, SJ749, decreased proliferation and clonogenicity of human glioma cell lines *in vitro* by blocking cell cycle progression in G_0/G_1 without inducing apoptosis (7, 11). SJ749 potency seems correlated to the level of the $\alpha 5$ integrin subunit. In addition, we demonstrated that the expression of the $\alpha 5\beta 1$ integrin in glioma was under the control of caveolin-1 that acted as a repressor of integrin expression. Interestingly, $\alpha 5$ integrin subunit was identified as the specific mediator of the

phenotypic changes induced by caveolin-1 in these cells. Our results also showed that low caveolin/high $\alpha 5\beta 1$ integrin-expressing cells were more sensitive to the anti-proliferative and anti-invasive action of SJ749 (11). These results pointed out a pro-tumoral role of $\alpha 5\beta 1$ integrin in glioblastoma and suggested that functional inhibition of this integrin may be an interesting way to block tumor progression.

Attempts to improve the effectiveness of targeted molecular therapies include their use in combination with radio/chemotherapies. Recent data attributed a role to $\beta 1$ integrins in mediating the resistance towards therapies in several human cancers including glioma (12-14). However as $\beta 1$ can dimerize with several α subunits, different heterodimers of $\beta 1$ integrin may be implicated and no work, to our knowledge, has specifically addressed the role of the $\alpha 5$ integrin subunit (and hence the $\alpha 5\beta 1$ heterodimer) in the response of GBM to chemotherapy. Experiments were thus designed to explore the chemosensitivity of human glioblastoma cell lines, U87MG and U373, in the absence or presence of specific $\alpha 5\beta 1$ integrin non peptidic antagonists. We used ellipticine and temozolomide as chemotherapeutic drugs. Ellipticine has been described as a chemotherapeutic agent exerting specificity towards brain tumors (15) which intercalates into DNA, inhibits Topoisomerase II and forms DNA adducts after its cytochrome P450-dependent or peroxidases-dependent enzymatic activation (16, 17). Temozolomide forms methyl adducts in DNA and is currently used as a new standard of care for patients with newly diagnosed GBM (18).

In the current study, we show that $\alpha 5\beta 1$ integrin antagonists sensitize glioma cells to chemotherapy by favoring cell apoptosis over premature senescence in a manner that is dependent of a functional p53 pathway.

MATERIAL AND METHODS

Material

SJ749 ((S)-2-[(2,4,6-trimethylphenyl) sulfonyl] amino-3-[7-benzyloxycarbonyl-8-(2-pyridinylaminomethyl)-1-oxa-2,7-diazaspiro-(4,4)-non-2-en-3-yl]carbonylamino] propionic acid) was synthesized in our laboratory according to the procedure described in the patent WO 97/33887. The compound 34c (2-(S)-2,6-dimethylbenzamido)-3-[4-(3-pyridin-2-ylaminopropoxy)-phenyl]propionic acid) first synthesized by the group of Pr Kessler (Munich, Germany), named K34c throughout the paper, was synthesized in our laboratory according to the procedure described in (19). Mouse monoclonal anti-p53 antibodies were from BD Biosciences Pharmingen (Le Pont de Claix, France); mouse monoclonal anti-p21 antibody was from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Tebu Bio, France); mouse monoclonal anti-GAPDH antibody was from Millipore (Molsheim, France); propidium iodide, paraformaldehyde, Hoechst 33342 and ellipticine were from Sigma (L'Isle d'Abeau Chesnes, France); CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell proliferation assay was from Promega (Charbonnières les Bains, France); and pifithrin- α (2-(4-nitrophenyl)imidazo[2,1-b]-5,6,7,8-tetrahydrobenzothiazole) was from Calbiochem (Fontenay sous Bois, France). Temozolomide was a kind gift of Schering-Plough (Levallois Perret, France).

Cell culture and transfections. U87MG cell line was from ATCC (Manassas, VA); U373 cell line was from European Cell ECACC Collection (Sigma). Cells were cultured in Eagle's MEM supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 0.6 mg/mL glutamine, 200 IU/mL penicillin, 200 IU/mL streptomycin, and 0.1 mg/mL gentamicin in humidified 5% CO₂ at 37°C. All experiments were performed in 2% FBS containing medium. pcDNAp53wt was kindly provided by Dr Blattner (Heidelberg, Germany). U373 cell line expressing transiently p53wt was obtained by transfecting cells 24 hours prior experiments with 1 μ g plasmid using Lipofectamine2000.

Proliferation assays. Cells were plated onto 96-well plates at a density of 1500 cells/well in 2% FBS containing medium and treated with respective solvents (50% methanol/50% H₂O for SJ749 and DMSO for ellipticine), SJ749 (5 μ M), ellipticine (1 μ M), or both drugs at the time of plating. Cell proliferation was determined after 0, 24,

48, and 72 hours growth using CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) according to the manufacturer's instructions. At the indicated time periods, MTS reagent (10 μ L) was added to quantify living cells. Wells of the plating controls were quantified directly following plating on day 0. The relative number of living cells (as the combined effect of proliferation and survival) represents the portion of living cells at the given time point expressed as a multiple of the number of cells plated at day 0.

Cell cycle analysis. Cells were plated in 24-well plates (30,000 cells/well) and co-treated for 24, 48, and 72 hours with solvent, SJ749 or K34c, ellipticine or both. Harvested cells were resuspended in 300 μ L hypotonic fluorochrome solution (5 μ g propidium iodide, 3.4 mM sodium citrate, and 0.1% Triton X-100 in PBS). DNA content was analyzed by flow cytometry (Becton Dickinson FACScan). Ten thousand events per sample were acquired, and cell cycle repartition was determined using the ModFit software.

Western blot. Cells were detached with trypsin, centrifuged at 2,000 rpm for 5 minutes, washed with PBS and lysed 30 minutes on ice in ice-cold lysis buffer (1% Triton X-100, 100 mM NaF, 10 mmol/L NaPPi, 1 mM Na₃VO₄ in PBS supplemented with Complete anti-protease cocktail; Roche, Meylan, France). Proteins were electrophoresed by SDS-PAGE (BioRad) (25 μ g protein and 12% polyacrylamide for p53, 60 μ g protein and 15% polyacrylamide for p21). Separated proteins were transferred to PVDF membranes (Amersham; Orsay, France). Blots were probed with anti-p53 (1/1,000), anti-p21 (1/500) followed by HRP-conjugated anti-mouse antibodies (1/10,000). Chemiluminescence reaction followed by exposure to CL-Xposure films (Sigma) was used to visualize proteins. Band intensity was quantified using the GeneTools software.

Apoptosis assays. Cells were plated onto 24-well plates (30,000 cells/well) on glass cover slips and treated as indicated for different length of time. Cells were washed with PBS and fixed using 4% paraformaldehyde. Cells were washed twice with PBS and stained with Hoechst 33342 dye (1:1,000 in PBS). Staining solution was washed out and the nuclei morphology was examined by fluorescence microscopy. Results are expressed as a percent of cells with fragmented nuclei. Alternatively, subG1 cell

population was determined by FACS analysis after propidium iodide staining. Ten thousand events per sample were acquired and the percentage of cells in the subG1 phase was quantified by CellQuest computer software.

Senescence assay. Cells were plated onto 6-well plates (50,000 to 200,000 cells/well), treated as indicated for different length of time and the β -galactosidase activity at pH 6 was determined using the Senescence β -Galactosidase Staining Kit (Cell Signalling Technology, Ozyme, France) according to the manufacturer's instructions. The results are presented as a percent of β -galactosidase positive cells versus total cells (at least 200 cells counted per condition).

RT PCR assay. RNA was extracted with Trizol (Sigma) and was transcribed into cDNA using high capacity cDNA kit (Applied Biosystems; Courtaboeuf, France). Real-time quantitative PCR was performed using the ABI7000 SYBRGreen PCR detector with the following probes (Invitrogen): cyclophilin forwards 5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3' and reverse 5'-CCTGCTTCACCACCTTCTTGAT-3'; p53 forwards 5'-CCCAGGGAGCACTAAGCGA-3' and reverse 5'-CCACGGATCTGAAGGGTGAA-3'; p21 forwards 5'-GGCAGACCAGCATGACAGATT-3' and reverse 5'-TGTGGGCGGATTAGGGCT-3'; Fas forwards 5'-CCCTCCTACCTCTGGTTCTTACG-3' and reverse 5'-AGTCTTCCTCAATTCCAATCCCT-3'; Human mdm-2 forwards 5'-AGACCCTGGTTAGACCAAAGCC-3' and reverse 5'-TGGCCAAGATAAAAAAGAACCTCT-3'. Relative levels of mRNA gene expression were calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method as described previously (39).

Statistical analysis. Data are represented as mean \pm SEM. In all cases, *n* refers to the number of independent experiments. Statistical analyses were performed by the Student's *t* test. *P* < 0.05 was considered significant.

RESULTS

$\alpha 5\beta 1$ integrin inhibition sensitizes U87MG glioma to chemotherapy.

Ellipticine (1 μ moles/L) and SJ749 (5 μ moles/L) were both separately able to decrease cell proliferation (Figure 1A). We hypothesized that exposure of U87MG cells to both drugs might improve the overall inhibition of proliferation. Indeed, after 72 hours of co-treatment with ellipticine and SJ749, cell proliferation was inhibited more efficiently than with either drugs alone (Figure 1A).

The progression of U87MG cells throughout the cell cycle was determined in the presence of SJ749 (5 μ moles/L), ellipticine (1 μ moles/L) or both. No cell cycle changes were detectable with SJ749 alone after 72 hours treatment (Figure 1B). At this time point, ellipticine itself did not affect the proportion of U87MG cells in the G0/G1 phase but decreased the S phase and slightly increased the G2/M phase cell population when compared to control. However, association of both drugs significantly blocked the cells in the G0/G1 phase when compared to control (Figure 1B). In addition, only a concomitant treatment with both SJ749 and ellipticine led to a significant increase in apoptotic cell death (Figure 1C). Data confirm our previous results showing that inhibition of $\alpha 5\beta 1$ integrin by SJ749 in glioma cells does not induce apoptosis per se (7) but as shown here may sensitize cells to ellipticine by facilitating apoptosis. Instead of apoptosis, ellipticine-treated cells exhibit premature senescence as detected by senescence-associated acidic β -galactosidase (SA- β -Gal) blue staining. Blue perinuclear positive staining for SA- β -Gal activity was detected in 32 ± 3 and 54 ± 5 % of ellipticine-treated U87MG cells after 3 and 5 days respectively (Figure 1D). U87MG cells exhibit also morphological changes characteristic of senescence as they appear more flattened compared to control cells (not shown). SJ749 by itself did not trigger senescence but significantly inhibited that induced by ellipticine in these cells. As shown in the Figure 1D, SJ749 significantly decreased ellipticine-induced senescence after 3 days or 8 days treatment

To confirm these data, another recently described $\alpha 5\beta 1$ integrin selective ligand, K34c (19), was used in combination with ellipticine. As described for SJ749, K34c decreased ellipticine-induced senescence (Figure 2A) and shifted cell response towards apoptosis (Figure 2B). In addition, K34c also sensitized U87MG cells to Temozolomide (Figure 2C). These results show that blocking $\alpha 5\beta 1$ integrin by specific antagonists sensitize U87MG cells to two different chemotherapeutic drugs by shifting the response of cells from senescence to apoptosis.

Sensitization of cells to ellipticine by SJ749 is mediated by p53 inhibition.

p53 is a key regulator of cell cycle checkpoints, apoptosis and senescence. Induction of p53 is involved in the anti-proliferative and pro-apoptotic effects of ellipticine in human breast cancer cells and hepatocellular carcinoma (20, 21). Thus we examined the effects of SJ749, ellipticine or the combination of both drugs on p53 in U87MG cells. At the protein level (Figure 3A), ellipticine stabilized time-dependently p53 in U87MG cells starting at 3 hours and persisting up to 48 hours. Induction of p53 was accompanied by the increase of p21^{WAF1}, a target gene of p53, (Figure 3A) confirming the functionality of p53. Although SJ749 alone did not affect the basal level of p53 at any time tested it significantly reduced ellipticine-induced p53 expression after 12 or 24 hours co-treatment (Figure 3A). As a consequence the induction of p21^{WAF1} induced by ellipticine is significantly downregulated by SJ749 after 12 and 24 hours co-treatment as well (Figure 3A).

To determine if partial inhibition of p53 by SJ749 might be responsible for the apoptosis observed after ellipticine/SJ749 co-treatment, p53 was inhibited pharmacologically in U87MG cells by pifithrin- α prior to the treatment with ellipticine. Pifithrin- α alone had no effect on p53 by itself but significantly reduced the induction of p53 by ellipticine (Figure 3B). Co-treatment with pifithrin- α led to a marked increase in apoptosis (Figure 3C) and a decrease in the senescence induced by ellipticine (Figure 3D).

Thus the partial inhibition of ellipticine-induced p53 activation by SJ749 or by pifithrin- α led to a reduction of senescence and to a sensitization to apoptosis. Data suggest a role of $\alpha 5\beta 1$ integrin in the control of p53 activation.

A functional p53 is required for the $\alpha 5\beta 1$ integrin antagonist effects.

To determine if $\alpha 5\beta 1$ integrin antagonists need a functional p53 to induce apoptosis, the chemosensitivity of U373 glioma cells which express a mutated non-functional p53 (p53^{R273H}) was explored. In U373 cells, ellipticine itself increased apoptosis at 3 and 5 days as measured by Hoechst 33342 dye staining (Figure 4A). Similar results were obtained by quantifying the subG1 apoptotic population by flow cytometry (not shown). Inversely only a slight increase in SA- β -Gal activity (Figure 4B) was detected in U373 cells after 5 days exposure to ellipticine showing that they hardly senesce in response to ellipticine. We confirmed that ellipticine did not activate p53mut in U373

cells as no increase in p53 protein (Figure 4C) nor in the transcription of p53-targeted genes was induced (Figure 4D) in contrast with the effects of ellipticine in U87MG cells. Thus results show that ellipticine's primary effect in U373 cells is induction of p53-independent apoptosis and suggest that a functional p53 is needed to trigger premature senescence.

We next asked whether blocking $\alpha 5\beta 1$ integrin by SJ749 may affect the response of U373 cells (which endogenously express $\alpha 5\beta 1$ integrin –not shown) to ellipticine. Co-treatment with SJ749 and ellipticine did not significantly enhance the apoptotic population in these cells (Figure 5A). Similar results were obtained with the antagonist K34c (Figure 5B).. Thus integrin antagonists may need a functional p53 to sensitize cells to apoptosis.

To explore this hypothesis, U373 cells were transfected with a vector coding for p53wt. Expression of p53wt by itself induced the transcription of p53 target genes which was not further increased by ellipticine (Figure 5C, left). Under such condition (which recapitulates the activation of p53 induced by ellipticine in U87MG cells), treatment of cells with SJ749 increases cell apoptosis significantly more in U373 cells expressing a p53wt protein than in mock-transfected cells (Figure 5C, right).

Altogether, results suggest that blocking $\alpha 5\beta 1$ integrin in a functional and activated p53 background sensitize cell to chemotherapy by increasing cell apoptosis.

$\alpha 5\beta 1$ antagonists modulate selectively the drug-induced transcription of p53 target genes .

p53 controls the transcription of genes that induce either apoptosis, cell cycle arrest or senescence. As the chemosensitization by integrin antagonists requires activated p53 and predominantly favor apoptosis rather than senescence, we hypothesized that they may differently affect p53 target genes. mRNA levels of p21 and FAS involved respectively in senescence and apoptosis were analysed. After U87MG cell treatment by ellipticine (Figure 6A) or temozolomide (Figure 6B), mRNA levels of p21 and Fas were significantly increased. Although SJ749 by itself did not affect either p21 or FAS, its combination with ellipticine or temozolomide significantly decreased p21 mRNA level after 12 hours co-treatment but remained without effect on Fas mRNA level after 6 or 12 hours co-treatment (Figure 6A and B). Extending the experiments to human mdm2 and APAF1, two other p53 target genes, it could be observed that only mdm2 mRNA level was decreased by SJ749 in combination with

temozolomide without affecting APAF1 mRNA level (Figure 6B). Similar results were obtained when K34c was co-administered either with ellipticine (Figure 6C, left) or with temozolomide during 12 hours (Figure 6C, right).

Data suggest that $\alpha 5\beta 1$ integrin antagonists modulate the drug-induced transcriptional activity of p53 through a decrease in p21 and mdm2 gene transcription without affecting genes involved in the regulation of apoptosis.

DISCUSSION

The role of integrins in cancer has been largely explored in the last decade. Due to their implication in the control of multiple cellular functions, it appears clearly that integrins play a key role in different steps of tumorigenesis. Expression and functions of specific integrin heterodimers in normal and pathological conditions largely depend on tissues and cells under investigations. Recently an emerging role for $\alpha 5\beta 1$ integrin as an original therapeutic target in some solid tumors has been emphasized. We and others propose $\alpha 5\beta 1$ integrin as a diagnostic, prognostic and therapeutic marker in brain, lung or ovarian cancers. Due to the recent interest in $\alpha 5\beta 1$ integrin, design of specific non peptidic ligands has increased these last years (19, 22, 23). The prototypical drug, SJ749, specifically inhibits the adhesion of endothelial and tumoral cell adhesion to fibronectin mediated by $\alpha 5\beta 1$ integrin. Indeed SJ749 was shown to inhibit angiogenesis (24). Focusing on brain tumors, we have recently shown that perturbing specifically the function of the $\alpha 5\beta 1$ integrin with SJ749 in U87MG glioma cells triggers cell cycle arrest (7) and decreases cell aggressiveness (11). Other $\alpha 5\beta 1$ integrin selective ligands were rationally designed by the use of a computer-built 3D model of the integrin (22). Among them, K34c appears as an highly active ligand with a good selectivity for $\alpha 5\beta 1$ integrin over $\alpha v\beta 3$ integrin (23). The two ligands proved able to block glioma cells in the G0/G1 phase of the cell cycle ((7), this paper) and thus behave as true antagonists of the integrin-dependent cell progression from G1 to S phase (25, 26).

Using SJ749 and K34c, we investigated the specific role of the $\alpha 5\beta 1$ integrin in the response of glioma cell to chemotherapy. Our results show that the $\alpha 5\beta 1$ integrin is implicated in the response of glioma cell to chemotherapy through the modulation of p53-dependent pathways and more importantly that $\alpha 5\beta 1$ integrin plays a role in

balancing apoptosis and senescence in these cells. In a functional p53 background (U87MG cells), ellipticine-chemotherapy induces premature senescence instead of apoptosis. However, antagonising $\alpha 5\beta 1$ integrin by SJ749 and K34c shifted the response towards apoptosis instead of senescence. In contrast, when p53 pathways are inactive (U373 cells), chemotherapy induces p53-independent apoptosis which was not improved by integrin antagonists. Restoring p53 function in these cells allowed antagonist-induced apoptosis. Results thus revealed a functional link between integrin and p53. ECM-integrin signals were already shown to counteract p53 activation (27) and to enhance proteasomal degradation of p21 (28). However, reduced p53 activity resulting from integrin inactivation seemed to confer survival capacity to some transformed cell type grown in suspension (29). In this latter setting, it was recently shown that integrin agonists rather than antagonists may enhance chemotherapy in certain tumours such as melanoma (30). Thus, regulatory connections between integrins and p53 or integrins and chemoresistance remain unclear and sometimes contradictory and may be largely dependent on the cell context and the stress stimuli. Our results show for the first time that in glioblastoma cells $\alpha 5\beta 1$ integrin antagonists modulate the p53 transcriptional network by inhibiting predominantly transcription of p21 which is a key determinant of cell senescence and mdm2 which is a negative regulator of p53 function. The enhancement of the transcription of pro-apoptotic genes such as Fas and APAF1 by the chemotherapeutic drugs were not affected by the antagonists. Molecular mechanisms controlling the $\alpha 5\beta 1$ integrin-dependent input to the p53 pathway remain to be characterized and are currently under investigations.

Increasing evidences revealed that p53mut glioma cells are relatively more sensitive to radio- and chemotherapies than p53wt cells and that inactivating wild-type p53 sensitized cells to chemotherapeutic drugs currently used in the clinic (31-35). Our data confirm therefore previous works showing that the disruption of p53wt in human glioblastoma sensitize cell towards apoptosis after treatment with Temozolomide or BCNU (32-34). This hypothesis was recently confirmed *in vivo* in a study showing that a p53 inhibitor could enhance cytotoxicity mediated by chemotherapy with Temozolomide in intracranial glioblastoma xenografts (36). Interestingly, in this study it was shown that the protein level of p21 was decreased in the xenografts with a concomitant increase in apoptosis. According to our results, one original way to alter p53 signaling in glioblastoma is through the inhibition of the $\alpha 5\beta 1$ integrin which

modulates rather than completely inhibits p53 pathways. Thus genotoxic therapies with concomitant partial and selective inhibition of the transcriptional activity of p53 by $\alpha 5\beta 1$ integrin antagonists may be of great interest to treat glioblastoma.

Our results have potential implications. The status of p53 has hardly been demonstrated as a predictor of the chemotherapeutic response in glioblastoma (37, 38), but concomitant screening of tumors for $\alpha 5\beta 1$ integrin level and p53 status may be warranted in patients with brain cancer resistant to chemotherapy. We already have preliminary data showing that the levels of $\alpha 5$ and $\beta 1$ integrin subunit mRNAs are related to the tumor grade in glioma human biopsies (data not shown), with the highest level found in glioblastoma which are also the most chemoresistant brain tumours. Subpopulation of patients with glioblastoma expressing a functional p53 concomitantly with a high level of $\alpha 5\beta 1$ integrin, may benefit from therapies targeted on $\alpha 5\beta 1$ integrin. Therefore the combination of $\alpha 5\beta 1$ inhibitors with clinically relevant drugs deserves further testings and warrants *in vivo* preclinical studies.

In conclusion, strategies designed to suppress $\alpha 5\beta 1$ integrin function combined with classical chemotherapies may contribute to better therapeutic outcomes for subpopulation of patients with glioblastoma. Our results provide new insight into the still ill-defined role of $\alpha 5\beta 1$ integrins in the control of glioblastoma aggressiveness and responsiveness to chemotherapy which may have crucial impact in the clinical management of brain tumour patients.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Ligue contre le Cancer (comités du Haut-Rhin et du Bas Rhin), the Institut National du Cancer, Grant agency of the Czech Republic (grant 303/09/0472). EM is recipient of a Ministère des Affaires Etrangères PhD student fellowship, AM is recipient of a Ministère de la Recherche PhD student fellowship, DYL is recipient of a Institut National du Cancer postdoctoral fellowship.

We thank Dr C Blattner (Heidelberg, Germany) for providing pcDNA-p53wt plasmid.. We also acknowledge the technical assistance of Stéphanie Riché for the synthesis of K34c.

REFERENCES

1. Sathornsumetee S, Reardon DA, Desjardins A, Quinn JA, Vredenburgh JJ, Rich JN. Molecularly targeted therapy for malignant glioma. *Cancer* 2007;110(1):13-24.
2. Penas-Prado M, Gilbert MR. Molecularly targeted therapies for malignant gliomas: advances and challenges. *Expert Rev Anticancer Ther* 2007;7(5):641-61.
3. Nabors LB, Mikkelsen T, Rosenfeld SS, *et al.* Phase I and correlative biology study of cilengitide in patients with recurrent malignant glioma. *J Clin Oncol* 2007;25(13):1651-7.
4. Parsons-Wingerter P, Kasman IM, Norberg S, *et al.* Uniform overexpression and rapid accessibility of alpha5beta1 integrin on blood vessels in tumors. *Am J Pathol* 2005;167(1):193-211.
5. Magnussen A, Kasman IM, Norberg S, Baluk P, Murray R, McDonald DM. Rapid access of antibodies to alpha5beta1 integrin overexpressed on the luminal surface of tumor blood vessels. *Cancer Res* 2005;65(7):2712-21.
6. Kita D, Takino T, Nakada M, Takahashi T, Yamashita J, Sato H. Expression of dominant-negative form of Ets-1 suppresses fibronectin-stimulated cell adhesion and migration through down-regulation of integrin alpha5 expression in U251 glioma cell line. *Cancer Res* 2001;61(21):7985-91.
7. Maglott A, Bartik P, Cosgun S, *et al.* The small alpha5beta1 integrin antagonist, SJ749, reduces proliferation and clonogenicity of human astrocytoma cells. *Cancer Res* 2006;66(12):6002-7.
8. Adachi M, Taki T, Higashiyama M, Kohno N, Inufusa H, Miyake M. Significance of integrin alpha5 gene expression as a prognostic factor in node-negative non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6(1):96-101.
9. Sawada K, Mitra AK, Radjabi AR, *et al.* Loss of E-cadherin promotes ovarian cancer metastasis via alpha 5-integrin, which is a therapeutic target. *Cancer Res* 2008;68(7):2329-39.
10. Bredel M, Bredel C, Juric D, *et al.* Functional network analysis reveals extended gliomagenesis pathway maps and three novel MYC-interacting genes in human gliomas. *Cancer Res* 2005;65(19):8679-89.
11. Martin S, Cosset EC, Terrand J, Maglott A, Takeda K, Dontenwill M. 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* 2009;1793(2):354-67.
12. Cordes N, Park CC. beta1 integrin as a molecular therapeutic target. *Int J Radiat Biol* 2007;83(11-12):753-60.
13. Park CC, Zhang HJ, Yao ES, Park CJ, Bissell MJ. Beta1 integrin inhibition dramatically enhances radiotherapy efficacy in human breast cancer xenografts. *Cancer Res* 2008;68(11):4398-405.
14. Cordes N, Hansmeier B, Beinke C, Meineke V, van Beuningen D. Irradiation differentially affects substratum-dependent survival, adhesion, and invasion of glioblastoma cell lines. *Br J Cancer* 2003;89(11):2122-32.
15. Jurayj J, Haugwitz RD, Varma RK, Paull KD, Barrett JF, Cushman M. Design and synthesis of ellipticinium salts and 1,2-dihydroellipticines with high selectivities against human CNS cancers in vitro. *J Med Chem* 1994;37(14):2190-7.
16. Stiborova M, Poljakova J, Ryslava H, Dracinsky M, Eckschlager T, Frei E. Mammalian peroxidases activate anticancer drug ellipticine to intermediates forming deoxyguanosine adducts in DNA identical to those found in vivo and generated from 12-hydroxyellipticine and 13-hydroxyellipticine. *Int J Cancer* 2007;120(2):243-51.

17. Stiborova M, Sejbal J, Borek-Dohalska L, *et al.* The anticancer drug ellipticine forms covalent DNA adducts, mediated by human cytochromes P450, through metabolism to 13-hydroxyellipticine and ellipticine N2-oxide. *Cancer Res* 2004;64(22):8374-80.
18. Mrugala MM, Chamberlain MC. Mechanisms of disease: temozolomide and glioblastoma--look to the future. *Nature clinical practice* 2008;5(8):476-86.
19. Heckmann D, Meyer A, Laufer B, Zahn G, Stragies R, Kessler H. Rational design of highly active and selective ligands for the alpha5beta1 integrin receptor. *Chembiochem* 2008;9(9):1397-407.
20. Kuo PL, Hsu YL, Chang CH, Lin CC. The mechanism of ellipticine-induced apoptosis and cell cycle arrest in human breast MCF-7 cancer cells. *Cancer Lett* 2005;223(2):293-301.
21. Kuo YC, Kuo PL, Hsu YL, Cho CY, Lin CC. Ellipticine induces apoptosis through p53-dependent pathway in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Life Sci* 2006;78(22):2550-7.
22. Marinelli L, Meyer A, Heckmann D, Lavecchia A, Novellino E, Kessler H. Ligand binding analysis for human alpha5beta1 integrin: strategies for designing new alpha5beta1 integrin antagonists. *J Med Chem* 2005;48(13):4204-7.
23. Heckmann D, Meyer A, Marinelli L, Zahn G, Stragies R, Kessler H. Probing integrin selectivity: rational design of highly active and selective ligands for the alpha5beta1 and alphavbeta3 integrin receptor. *Angewandte Chemie (International ed)* 2007;46(19):3571-4.
24. Kim S, Bell K, Mousa SA, Varner JA. Regulation of angiogenesis in vivo by ligation of integrin alpha5beta1 with the central cell-binding domain of fibronectin. *Am J Pathol* 2000;156(4):1345-62.
25. Fournier AK, Campbell LE, Castagnino P, *et al.* Rac-dependent cyclin D1 gene expression regulated by cadherin- and integrin-mediated adhesion. *Journal of cell science* 2008;121(Pt 2):226-33.
26. Walker JL, Assoian RK. Integrin-dependent signal transduction regulating cyclin D1 expression and G1 phase cell cycle progression. *Cancer metastasis reviews* 2005;24(3):383-93.
27. Stromblad S, Becker JC, Yebra M, Brooks PC, Cheresh DA. Suppression of p53 activity and p21WAF1/CIP1 expression by vascular cell integrin alphaVbeta3 during angiogenesis. *J Clin Invest* 1996;98(2):426-33.
28. Bao W, Thullberg M, Zhang H, Onischenko A, Stromblad S. Cell attachment to the extracellular matrix induces proteasomal degradation of p21(CIP1) via Cdc42/Rac1 signaling. *Mol Cell Biol* 2002;22(13):4587-97.
29. Lewis JM, Truong TN, Schwartz MA. Integrins regulate the apoptotic response to DNA damage through modulation of p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(6):3627-32.
30. Schwartz MA, McRoberts K, Coyner M, *et al.* Integrin Agonists as Adjuvants in Chemotherapy for Melanoma. *Clin Cancer Res* 2008;14(19):6193-7.
31. Roos WP, Batista LF, Naumann SC, *et al.* Apoptosis in malignant glioma cells triggered by the temozolomide-induced DNA lesion O6-methylguanine. *Oncogene* 2007;26(2):186-97.
32. Batista LF, Roos WP, Christmann M, Menck CF, Kaina B. Differential sensitivity of malignant glioma cells to methylating and chloroethylating anticancer drugs: p53 determines the switch by regulating xpc, ddb2, and DNA double-strand breaks. *Cancer Res* 2007;67(24):11886-95.
33. Xu GW, Mymryk JS, Cairncross JG. Inactivation of p53 sensitizes astrocytic glioma cells to BCNU and temozolomide, but not cisplatin. *J Neurooncol* 2005;74(2):141-9.
34. Xu GW, Mymryk JS, Cairncross JG. Pharmaceutical-mediated inactivation of p53 sensitizes U87MG glioma cells to BCNU and temozolomide. *Int J Cancer* 2005;116(2):187-92.

35. te Poele RH, Okorokov AL, Jardine L, Cummings J, Joel SP. DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 2002;62(6):1876-83.
36. Dinca EB, Lu KV, Sarkaria JN, *et al.* p53 Small-molecule inhibitor enhances temozolomide cytotoxic activity against intracranial glioblastoma xenografts. *Cancer Res* 2008;68(24):10034-9.
37. Leuraud P, Taillandier L, Medioni J, *et al.* Distinct responses of xenografted gliomas to different alkylating agents are related to histology and genetic alterations. *Cancer Res* 2004;64(13):4648-53.
38. Weller M, Rieger J, Grimm C, *et al.* Predicting chemoresistance in human malignant glioma cells: the role of molecular genetic analyses. *Int J Cancer* 1998;79(6):640-4.
39. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25(4):402-8.

Titles and Legends to figures

Figure 1: Effect of ellipticine, SJ749 and their combination on U87MG cell proliferation, cell cycle, apoptosis and senescence.

A. U87MG cells were treated in 2% FBS medium either with solvent (∇), 5 μ moles/L SJ749 (\square), 1 μ moles/L ellipticine (\bullet) or with a combination of both drugs (\blacksquare). Proliferation was measured every 24 hours using the MTS assay. Results are expressed as the relative number of living cells versus cells at the time of plating. (n=3 in sextuplates). B. U87MG cells were treated 72 hours as in A), stained with propidium iodide and analysed for cell cycle progression by flow cytometry. Data represent the percentage of cells in G0/G1, S and G2/M phases determined with ModFit software. (n=10-20, *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.0001$). C. U87MG cells were treated 24, 48 or 72 hours with solvent, SJ749 (5 μ moles/L), ellipticine (1 μ moles/L) or both drugs and stained with propidium iodide. Apoptosis was detected by FACS analysis and represented as the percentage of cells in the subG1 phase (n=10-20). D. U87MG cells plated in 6-well plates were treated 3 or 8 days in 2% FBS medium with either solvent, 5 μ moles/L SJ749, 1 μ moles/L ellipticine or a combination of both drugs before the detection of β -galactosidase activity at pH 6. Data represent positive cells percentage of at least 200 total cell number per condition (n=3).

Figure 2: K34c antagonist decrease chemotherapy-induced senescence and increase apoptosis in U87MG cells.

A. U87MG cells plated in 6-well plates were treated 3 days in 2% FBS medium with either solvent, 20 μ moles/L K34c, 1 μ moles/L ellipticine or a combination of both drugs before the detection of β -galactosidase activity at pH 6. B. U87MG cells were treated 24, 48 or 72 hours with solvent, K34c (20 μ moles/L), ellipticine (1 μ moles/L) or both drugs and stained with propidium iodide. Apoptosis was detected by FACS analysis and represented as the percentage of cells in the subG1 phase (n=4). C. U87MG cells were treated 24 or 48 hours with solvent, K34c (20 μ moles/L), Temozolomide (200 μ moles/L) or both drugs and stained with propidium iodide. Apoptosis was detected by FACS analysis and represented as the percentage of cells in the subG1 phase (n=4).

Figure 3: Role of p53 in SJ749-induced apoptosis

A. Protein p53 expression in U87MG cells treated with SJ749 (5 μ moles/L) and/or ellipticine (1 μ moles/L) in 2% FBS medium for 3, 6, 12, 24 and 48 hours. Total protein extracts were resolved by SDS-PAGE, transferred to PVDF membranes and probed with anti-p53 or anti-p21 antibodies. GAPDH was used as a loading control. A representative blot is shown and the graph displays means of the p53/GAPDH ratios (n=3-4). Band intensities were quantified using GeneTools software. B. Protein p53 expression in U87MG cells treated with pifithrin- α (20 μ moles/L) alone or prior to ellipticine (1 μ moles/L) treatment. C. Effect of pifithrin- α on apoptosis . U87MG cells were treated 24, 48 or 72 hours with DMSO, pifithrin- α (20 μ moles/L), ellipticine (1 μ moles/L) or both drugs before propidium iodide staining. Apoptosis was quantified by FACS analysis and represented as the percentage of cells in the subG1 phase (n=3). D. Effect of pifithrin- α on senescence induced by ellipticine. U87MG cells plated in 6-well plates were treated 3 or 8 days in 2% FBS medium with either DMSO, pifithrin- α (20 μ moles/L), ellipticine (1 μ moles/L), or both drugs together before the detection of β -galactosidase activity at pH 6 (n=3).

Figure 4: Ellipticine induces apoptosis in U373 cells expressing a non functional p53 protein.

A. Apoptosis. U87MG and U373 cells were plated onto cover slips and treated with 1 μ moles/L ellipticine for 3 or 5 days in 2% FBS medium. Cells were fixed and stained with the Hoechst 33342 dye. Nuclei morphology was analyzed via fluorescence microscopy, data represent percentage of fragmented nuclei (n=3 in triplicates). B. Senescence. U87MG and U373 cells plated in 6-well plates and left untreated or treated for 3 or 5 days in 2% FBS medium with 1 μ moles/L ellipticine before the detection of β -galactosidase activity at pH 6. Data represent positive blue cells percentage of at least 200 total cell number per condition (n=3). C. Protein p53 expression in U373 cells treated with ellipticine (1 μ moles/L) in 2% FBS medium for 3, 6, 12, 24 and 48 hours. Total protein extracts were resolved by SDS-PAGE, transferred to PVDF membranes and probed with anti-p53 antibodies. GAPDH was used as a loading control. D. p53, p21 and Fas mRNA was determined by qPCR. Histograms represent the fold increase of mRNA in treated versus control cells normalised with the reporter gene, cyclophilin after 12 hours drug treatment (mean \pm SEM of 3 independent experiments).

Figure 5: SJ749 and K34c antagonists do not increase ellipticine-induced apoptosis in a non functional p53 background.

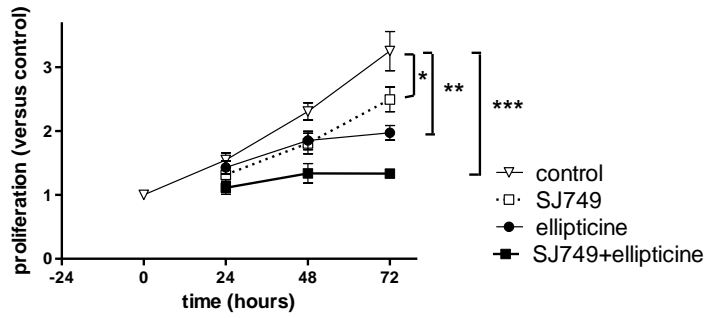
A. U373 cells were treated 48 and 72 hours with DMSO, SJ749 (5 μ moles/L), ellipticine (1 μ moles/L) or both drugs before propidium iodide staining. Apoptosis was quantified by FACS analysis and represented as the percentage of cells in the subG1 phase (n=3). B. Similar experiments with K34c (20 μ moles/L) instead of SJ749. C. p53-target gene transcription. p53, p21, Human mdm-2 and Fas mRNA were determined by qPCR in U373-mock and U373-p53wt cells. Scattergrams represent the fold increase of mRNA in U373 transfected cells treated with 1 μ moles/L ellipticine versus control cells normalised to the reporter gene, cyclophilin (mean \pm SEM of 3 independent experiments).

Figure 6: Integrin antagonists modulate p53 target genes transcription.

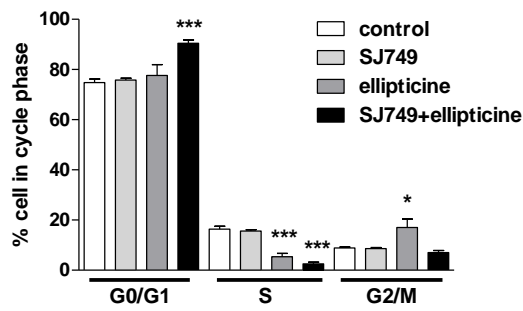
A. p21 (left) and FAS (right) mRNA levels were determined by qPCR. Scattergrams represent the fold increase of mRNA in U87MG cells treated with SJ749 (5 μ moles/L), ellipticine (1 μ moles/L) or a combination of SJ749 with ellipticine as compared to control cells and normalised with the reporter gene, cyclophilin (mean \pm SEM of 3 independent experiments). B. p21, FAS, human mdm2 and APAF1 mRNA levels were determined by qPCR. Scattergrams represent the fold increase of mRNA in U87MG cells treated during 12 hours with SJ749 (5 μ moles/L), temozolomide (200 μ moles/L) or a combination of both as compared to control cells and normalised with the reporter gene, cyclophilin (mean \pm SEM of 3 independent experiments). C. Similar experiments as in B with K34c either alone or in combination with ellipticine (left) or temozolomide (right).

Figure 1
Martinkova et al.

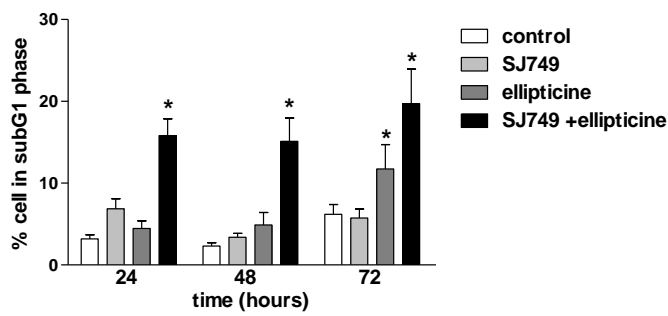
A.



B.



C.



D.

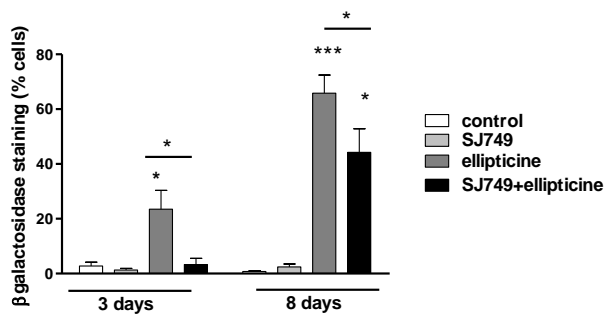
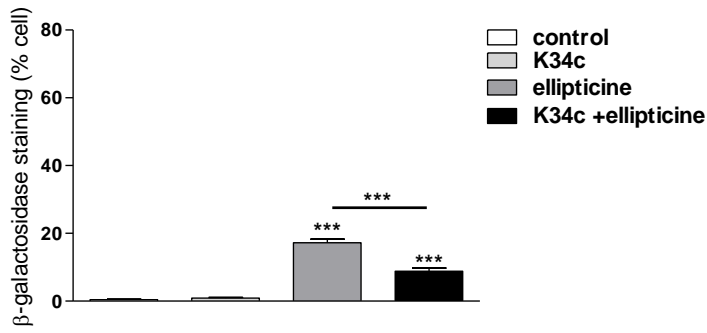
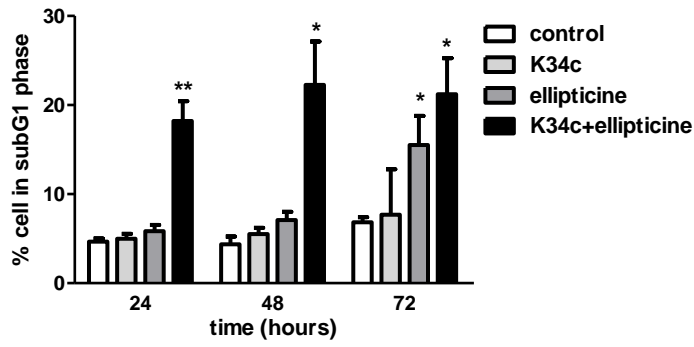


Figure 2
Martinkova et al.

A.



B.



C.

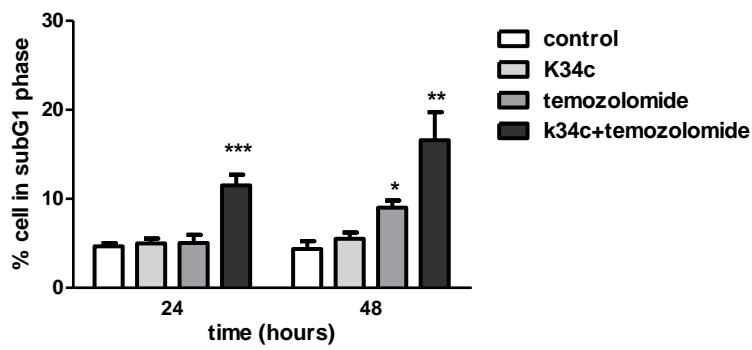
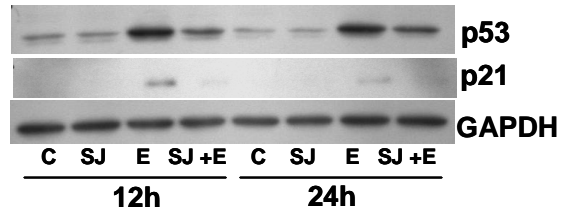
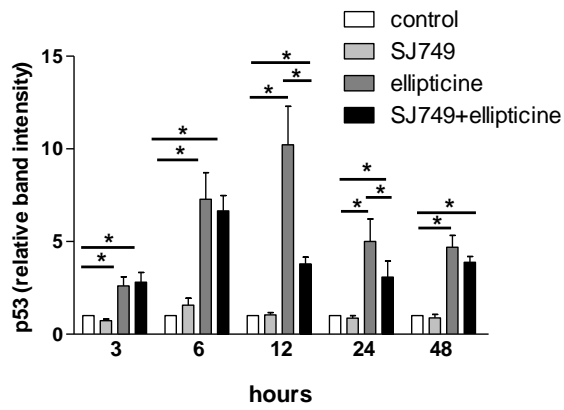
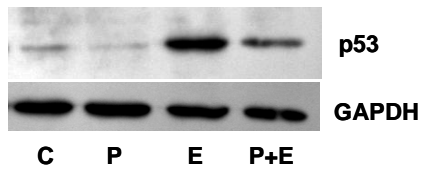


Figure 3
Martinkova et al.

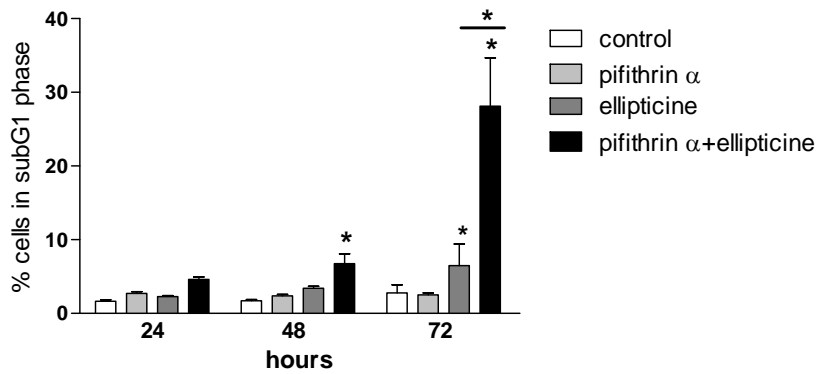
A.



B.



C.



D.

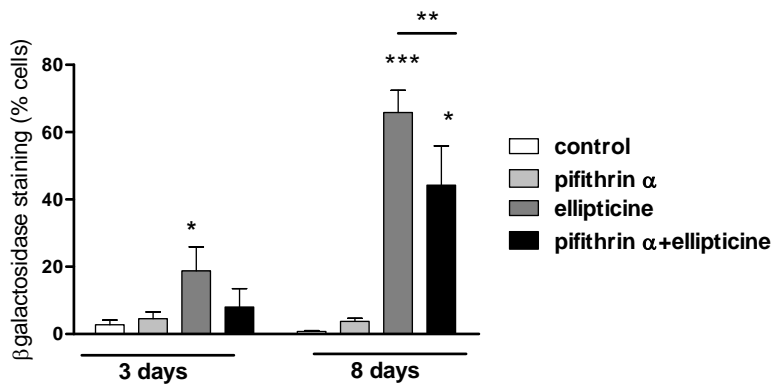
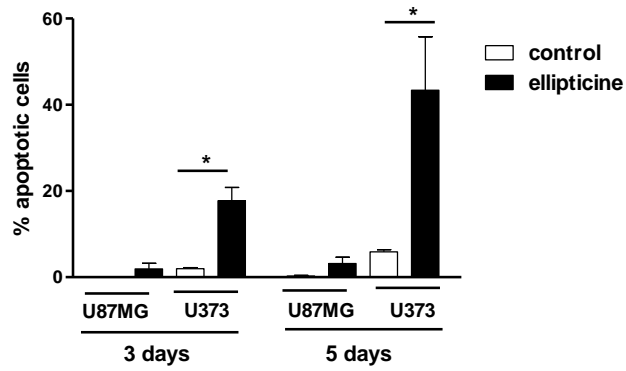
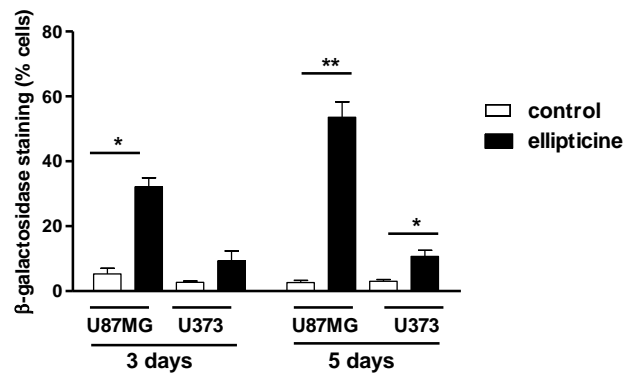


Figure 4
Martinkova et al.

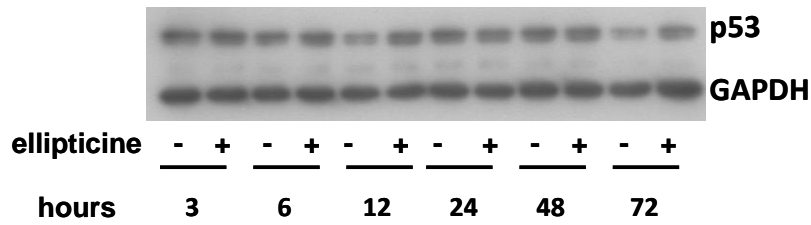
A.



B.



C.



D.

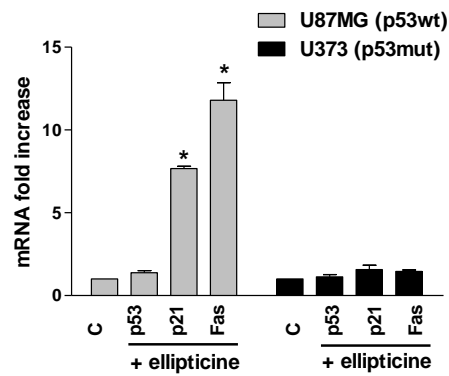
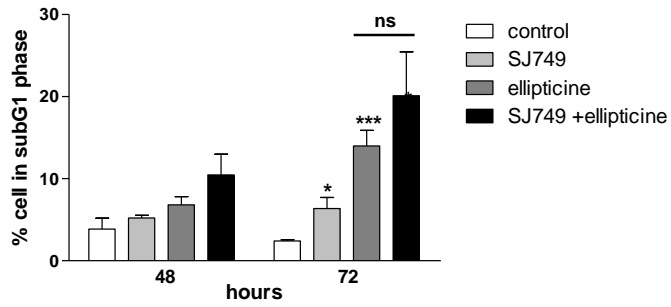
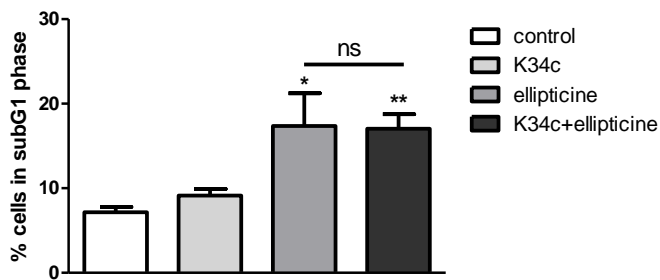


Figure 5
Martinkova et al.

A.



B.



C.

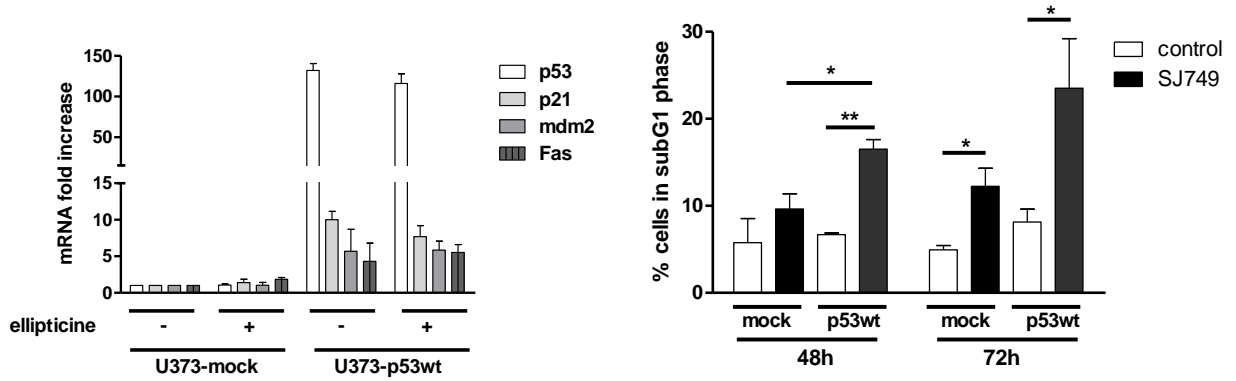
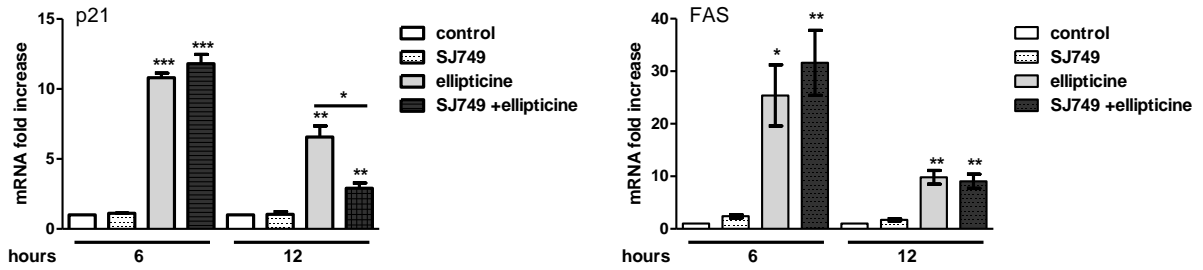
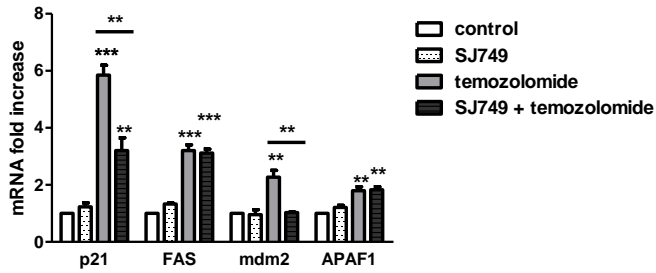


Figure 6
Martinkova et al.

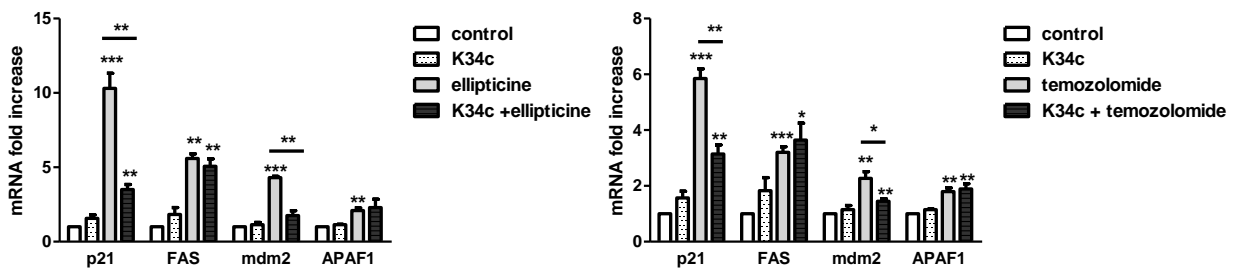
A.



B.



C.



Liste des publications et communications

PUBLICATIONS

1. **Maglott A**, Bartik P, Cosgun S, Klotz P, Rondé P, Fuhrmann G, Takeda K, Martin S et Dontenwill M. *The small alpha5beta1 integrin antagonist, SJ749, reduces proliferation and clonogenicity of human astrocytoma cells*. Cancer Res, 2006. 66(12): p. 6002-7.
2. Bartik P, **Maglott A**, Entlicher G, Vestwebber D, Takeda K, Martin S et Dontenwill M. *Detection of a hypersialylated $\beta 1$ integrin endogenously expressed in the human astrocytoma cell line A172*. J Int Oncol, 2008. 32: p. 1021-31.
3. Martin S, Cosset EC, Terrand J, **Maglott A**, Takeda K et Dontenwill M. *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*. BBA-Molecular Cell Research, 2009. 1793: p.354-367.

PUBLICATIONS EN PRÉPARATION

1. Martinkova E, **Maglott A**, Léger DY, Bonnet D, Stiborova M, Takeda K, Martin S et Dontenwill M. *$\alpha 5\beta 1$ integrin antagonists sensitize human glioblastoma cells to chemotherapy through the modulation of p53 pathway*. Soumis.
2. Léger DY, **Maglott A**, Martinkova E, Cosset EC, Stiborova M, Martin S et Dontenwill M. *The $\alpha 5\beta 1$ integrin is implicated in human glioblastoma tumorigenicity and chemoresistance*. En préparation.

COMMUNICATIONS ORALES

1. **Maglott A**, Bartik P, Klotz P, Cosgun S, Martin S, Fuhrmann G, Rondé P, Takeda K et Dontenwill M. *L'intégrine $\alpha 5\beta 1$, une cible pour le traitement des glioblastomes: Etude d'un antagoniste spécifique, le SJ749*. 33^{ème} Forum Jeunes chercheurs, 6 Septembre 2006, Clermont-Ferrand.
2. **Maglott A**, Bartik P, Klotz P, Cosgun S, Martin S, Fuhrmann G, Rondé P, Takeda K et Dontenwill M. *The small $\alpha 5\beta 1$ integrin antagonist, SJ749, reduces proliferation and clonogenicity of human astrocytoma cells*. Journées Campus, 20-21 Avril 2006, Illkirch.

POSTERS

1. **Maglott A**, Bartik P, Klotz P, Cosgun S, Martin S, Fuhrmann G, Rondé P et Dontenwill M. *Effets d'un antagoniste spécifique de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ sur des cellules tumorales*. Prix IGBMC. Journées Campus, 15-16 Septembre 2005, Illkirch.
2. Bartik P, **Maglott A**, Klotz P, Cosgun S, Martin S, Fuhrmann G, Rondé P et Dontenwill M. *Integrins as the targets in novel anti-cancer treatment : the integrin $\alpha 5\beta 1$, a fibronectin receptor*. Journées Campus, 15-16 Septembre 2005, Illkirch.
3. Bartik P, **Maglott A**, Klotz P, Cosgun S, Martin S, Fuhrmann G, Rondé P et Dontenwill M. *Integrins as the targets in novel anti-cancer treatment : the integrin $\alpha 5\beta 1$, a fibronectin receptor*. Journée ARC, 15 Octobre 2005, Paris.

4. Bartik P, **Maglott A**, Klotz P, Cosgun S, Martin S, Fuhrmann G, Rondé P et Dontenwill M. *Integrins as the targets in novel anti-cancer treatment : the integrin $\alpha_5\beta_1$, a fibronectin receptor*. 3^{ème} rencontre des Ecoles Doctorales Vie et Santé, Université Louis Pasteur Strasbourg et Charles Prague, 14 Novembre 2005, Strasbourg.
5. Martinkova E, **Maglott A**, Martin S, Stiborova M et Dontenwill M. *Sensitization of human glioblastoma to chemotherapy by the treatment with an $\alpha_5\beta_1$ integrin antagonist*. 1^{er} forum du Cancéropôle du Grand-Est, 19 Octobre 2007, Vittel.
6. Martin S, Terrand J, **Maglott A**, Froelich S et Dontenwill M. *Caveolin-1 regulated $\alpha_5\beta_1$ integrin glioblastoma responsiveness through the control of $\alpha_5\beta_1$ integrin expression and modulates glioblastoma responsiveness to SJ749*. EACR20, 6 Juillet 2008, Lyon.
7. Dontenwill M, Martinkova E, **Maglott A**, Stiborova M et Martin S. *The $\alpha_5\beta_1$ integrin predicts glioblastoma chemotherapy outcome through modulation of p53 pathways*. EACR20, 6 Juillet 2008, Lyon.
8. Martinkova E, **Maglott A**, Léger DY, Stiborova M, Martin S et Dontenwill M. *$\alpha_5\beta_1$ integrin expression level and p53 protein status both determine the chemotherapy outcome of human glioblastoma*. 1^{er} Colloque Inter-Régional Grand-Est de Recherche Translationnelle en Oncologie, 19-20 Mars 2009, Nancy.
9. Martin S, Cosset EC, Terrand J, **Maglott A**, Froelich S et Dontenwill M. *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*. 1^{er} Colloque Inter-Régional Grand-Est de Recherche Translationnelle en Oncologie, 19-20 Mars 2009, Nancy.
10. Martinkova E, **Maglott A**, Léger DY, Stiborova M, Martin S et Dontenwill M. *$\alpha_5\beta_1$ integrin expression level and p53 protein status both determine the chemotherapy outcome of human glioblastoma*. Journées Campus, 16-17 Avril 2009, Illkirch.

BIBLIOGRAPHIE

- Abdollahi, A. *et al.* (2005). "Inhibition of alpha(v)beta3 integrin survival signaling enhances antiangiogenic and antitumor effects of radiotherapy." Clin Cancer Res **11**(17): 6270-9.
- Aliouat-Denis, C. M. *et al.* (2005). "p53-independent regulation of p21Waf1/Cip1 expression and senescence by Chk2." Mol Cancer Res **3**(11): 627-34.
- Avraamides, C. J. *et al.* (2008). "Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis." Nat Rev Cancer.
- Balakrishnan, K. *et al.* (2009). "AT-101 induces apoptosis in CLL B cells and overcomes stromal cell-mediated Mcl-1 induction and drug resistance." Blood **113**(1): 149-53.
- Bartik, P. *et al.* (2008). "Detection of a hypersialylated beta1 integrin endogenously expressed in the human astrocytoma cell line A172." Int J Oncol **32**(5): 1021-31.
- Bates, R. C. *et al.* (2000). "Spheroids and cell survival." Crit Rev Oncol Hematol **36**(2-3): 61-74.
- Batista, L. F. *et al.* (2007). "Differential sensitivity of malignant glioma cells to methylating and chloroethylating anticancer drugs: p53 determines the switch by regulating xpc, ddb2, and DNA double-strand breaks." Cancer Res **67**(24): 11886-95.
- Bazzoni, G. et Hemler, M. E. (1998). "Are changes in integrin affinity and conformation overemphasized?" Trends Biochem Sci **23**(1): 30-4.
- Bello, L. *et al.* (2004). "Combinatorial administration of molecules that simultaneously inhibit angiogenesis and invasion leads to increased therapeutic efficacy in mouse models of malignant glioma." Clin Cancer Res **10**(13): 4527-37.
- Belot, N. *et al.* (2001). "Molecular characterization of cell substratum attachments in human glial tumors relates to prognostic features." Glia **36**(3): 375-90.
- Berrier, A. L. et Yamada, K. M. (2007). "Cell-matrix adhesion." J Cell Physiol **213**(3): 565-73.
- Beuvink, I. *et al.* (2005). "The mTOR inhibitor RAD001 sensitizes tumor cells to DNA-damaged induced apoptosis through inhibition of p21 translation." Cell **120**(6): 747-59.
- Bhaskar, V. *et al.* (2008). "Volociximab, a chimeric integrin alpha5beta1 antibody, inhibits the growth of VX2 tumors in rabbits." Invest New Drugs **26**(1): 7-12.
- Bhaskar, V. *et al.* (2007). "A function blocking anti-mouse integrin alpha5beta1 antibody inhibits angiogenesis and impedes tumor growth in vivo." J Transl Med **5**(1): 61.
- Boudreau, N. J. et Varner, J. A. (2004). "The homeobox transcription factor Hox D3 promotes integrin alpha5beta1 expression and function during angiogenesis." J Biol Chem **279**(6): 4862-8.
- Brandsma, D. et van den Bent, M. J. (2007). "Molecular targeted therapies and chemotherapy in malignant gliomas." Curr Opin Oncol **19**(6): 598-605.
- Bredel, M. *et al.* (2005). "Functional network analysis reveals extended gliomagenesis pathway maps and three novel MYC-interacting genes in human gliomas." Cancer Res **65**(19): 8679-89.
- Buckley, C. D. *et al.* (1999). "RGD peptides induce apoptosis by direct caspase-3 activation." Nature **397**(6719): 534-9.
- Burbridge, M. F. *et al.* (2003). "Decrease in survival threshold of quiescent colon carcinoma cells in the presence of a small molecule integrin antagonist." Mol Pharmacol **63**(6): 1281-8.
- Cascone, I. *et al.* (2005). "Stable interaction between alpha5beta1 integrin and Tie2 tyrosine kinase receptor regulates endothelial cell response to Ang-1." J Cell Biol **170**(6): 993-1004.
- Casey, R. C. *et al.* (2001). "Beta 1-integrins regulate the formation and adhesion of ovarian carcinoma multicellular spheroids." Am J Pathol **159**(6): 2071-80.
- Cheresh, D. A. et Stupack, D. G. (2002). "Integrin-mediated death: an explanation of the integrin-knockout phenotype?" Nat Med **8**(3): 193-4.

- Cianfrocca, M. E. *et al.* (2006). "Phase 1 trial of the antiangiogenic peptide ATN-161 (Ac-PHSCN-NH₂), a beta integrin antagonist, in patients with solid tumours." Br J Cancer **94**(11): 1621-6.
- Coppe, J. P. *et al.* (2008). "Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor." PLoS Biol **6**(12): 2853-68.
- Cordes, N. *et al.* (2002). "Ionizing radiation induces up-regulation of functional beta1-integrin in human lung tumour cell lines in vitro." Int J Radiat Biol **78**(5): 347-57.
- Cue, D. *et al.* (2000). "A nonpeptide integrin antagonist can inhibit epithelial cell ingestion of *Streptococcus pyogenes* by blocking formation of integrin alpha 5beta 1-fibronectin-M1 protein complexes." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(6): 2858-63.
- Damiano, J. S. *et al.* (1999). "Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines." Blood **93**(5): 1658-67.
- Damsky, C. H. *et al.* (2002). "Integrin signaling: it's where the action is." Curr Opin Cell Biol **14**(5): 594-602.
- Danen, E. H. *et al.* (2001). "Fibronectin, integrins, and growth control." J Cell Physiol **189**(1): 1-13.
- Davey, G. *et al.* (1999). "Reduced expression of (alpha)5(beta)1 integrin prevents spreading-dependent cell proliferation." J Cell Sci **112** (Pt **24**): 4663-72.
- de la Fuente, M. T. *et al.* (2003). "Involvement of p53 in alpha4beta1 integrin-mediated resistance of B-CLL cells to fludarabine." Biochem Biophys Res Commun **311**(3): 708-12.
- Dedhar, S. *et al.* (1996). "Integrin cytoplasmic interactions and bidirectional transmembrane signalling." Curr Opin Cell Biol **8**(5): 657-69.
- Dietrich, T. *et al.* (2007). "Inhibition of Inflammatory Lymphangiogenesis by Integrin {alpha}5 Blockade." Am J Pathol.
- Dinca, E. B. *et al.* (2008). "p53 Small-molecule inhibitor enhances temozolomide cytotoxic activity against intracranial glioblastoma xenografts." Cancer Res **68**(24): 10034-9.
- Donate, F. *et al.* (2008). "Pharmacology of the novel antiangiogenic peptide ATN-161 (Ac-PHSCN-NH₂): observation of a U-shaped dose-response curve in several preclinical models of angiogenesis and tumor growth." Clin Cancer Res **14**(7): 2137-44.
- Dunehoo, A. L. *et al.* (2006). "Cell adhesion molecules for targeted drug delivery." J Pharm Sci **95**(9): 1856-72.
- Enge, M. *et al.* (2009). "MDM2-dependent downregulation of p21 and hnRNP K provides a switch between apoptosis and growth arrest induced by pharmacologically activated p53." Cancer Cell **15**(3): 171-83.
- Espinosa, J. M. (2008). "Mechanisms of regulatory diversity within the p53 transcriptional network." Oncogene **27**(29): 4013-23.
- Fang, Z. *et al.* (2007). "Increased expression of integrin beta1 subunit enhances p21WAF1/Cip1 transcription through the Sp1 sites and p300-mediated histone acetylation in human hepatocellular carcinoma cells." J Cell Biochem **101**(3): 654-64.
- Farber, K. *et al.* (2008). "An alpha5beta1 integrin inhibitor attenuates glioma growth." Mol Cell Neurosci **39**(4): 579-85.
- Filardo, E. J. *et al.* (1995). "Requirement of the NPXY motif in the integrin beta 3 subunit cytoplasmic tail for melanoma cell migration in vitro and in vivo." J Cell Biol **130**(2): 441-50.
- Fine, H. A. *et al.* (1993). "Meta-analysis of radiation therapy with and without adjuvant chemotherapy for malignant gliomas in adults." Cancer **71**(8): 2585-97.

- Fournier, A. K. *et al.* (2008). "Rac-dependent cyclin D1 gene expression regulated by cadherin- and integrin-mediated adhesion." *J Cell Sci* **121**(Pt 2): 226-33.
- Frankel, A. *et al.* (1997). "Abrogation of taxol-induced G2-M arrest and apoptosis in human ovarian cancer cells grown as multicellular tumor spheroids." *Cancer Res* **57**(12): 2388-93.
- Frisch, S. M. et Screaton, R. A. (2001). "Anoikis mechanisms." *Curr Opin Cell Biol* **13**(5): 555-62.
- Furnari, F. B. *et al.* (2007). "Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment." *Genes Dev* **21**(21): 2683-710.
- Giancotti, F. G. et Ruoslahti, E. (1999). "Integrin signaling." *Science* **285**(5430): 1028-32.
- Gibson, R. M. *et al.* (2005). "Activation of integrin alpha5beta1 delays apoptosis of Ntera2 neuronal cells." *Mol Cell Neurosci* **28**(3): 588-98.
- Gilcrease, M. Z. (2006). "Integrin signaling in epithelial cells." *Cancer Lett.*
- Green, S. K. *et al.* (2002). "Disruption of cell-cell adhesion enhances antibody-dependent cellular cytotoxicity: implications for antibody-based therapeutics of cancer." *Cancer Res* **62**(23): 6891-900.
- Guo, H. B. *et al.* (2005). "Deletion of mouse embryo fibroblast N-acetylglucosaminyltransferase V stimulates alpha5beta1 integrin expression mediated by the protein kinase C signaling pathway." *J Biol Chem* **280**(9): 8332-42.
- Guo, W. et Giancotti, F. G. (2004). "Integrin signalling during tumour progression." *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(10): 816-26.
- Harburger, D. S. et Calderwood, D. A. (2009). "Integrin signalling at a glance." *J Cell Sci* **122**(Pt 2): 159-63.
- Hayflick, L. (1965). "The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains." *Exp Cell Res* **37**: 614-36.
- Hazlehurst, L. A. *et al.* (2006). "Cell adhesion to fibronectin (CAM-DR) influences acquired mitoxantrone resistance in U937 cells." *Cancer Res* **66**(4): 2338-45.
- Hazlehurst, L. A. *et al.* (2001). "Reduction in drug-induced DNA double-strand breaks associated with beta1 integrin-mediated adhesion correlates with drug resistance in U937 cells." *Blood* **98**(6): 1897-903.
- Heckmann, D. *et al.* (2008). "Rational design of highly active and selective ligands for the alpha5beta1 integrin receptor." *Chembiochem* **9**(9): 1397-407.
- Heckmann, D. *et al.* (2007). "Probing integrin selectivity: rational design of highly active and selective ligands for the alpha5beta1 and alphavbeta3 integrin receptor." *Angew Chem Int Ed Engl* **46**(19): 3571-4.
- Hehlgans, S. *et al.* (2007). "Signalling via integrins: implications for cell survival and anticancer strategies." *Biochim Biophys Acta* **1775**(1): 163-80.
- Hermisson, M. *et al.* (2006). "O6-methylguanine DNA methyltransferase and p53 status predict temozolomide sensitivity in human malignant glioma cells." *J Neurochem* **96**(3): 766-76.
- Hodivala-Dilke, K. M. *et al.* (2003). "Integrins in angiogenesis: multitasking molecules in a balancing act." *Cell Tissue Res* **314**(1): 131-44.
- Humphries, M. J. (2000). "Integrin structure." *Biochem Soc Trans* **28**(4): 311-39.
- Huveneers, S. *et al.* (2007). "Integrins: Signaling, disease, and therapy." *Int J Radiat Biol*: 1-9.
- Hynes, R. O. (2002). "Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines." *Cell* **110**(6): 673-87.
- Imanishi, Y. *et al.* (2007). "Angiopoietin-2 stimulates breast cancer metastasis through the alpha(5)beta(1) integrin-mediated pathway." *Cancer Res* **67**(9): 4254-63.

- Isaji, T. *et al.* (2006). "N-glycosylation of the beta-propeller domain of the integrin alpha5 subunit is essential for alpha5beta1 heterodimerization, expression on the cell surface, and its biological function." J Biol Chem **281**(44): 33258-67.
- Jones, J. L. et Walker, R. A. (1999). "Integrins: a role as cell signalling molecules." Mol Pathol **52**(4): 208-13.
- Juliano, R. L. (2002). "Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members." Annu Rev Pharmacol Toxicol **42**: 283-323.
- Juliano, R. L. *et al.* (2004). "Integrin regulation of cell signalling and motility." Biochem Soc Trans **32**(Pt3): 443-6.
- Jurayj, J. *et al.* (1994). "Design and synthesis of ellipticinium salts and 1,2-dihydroellipticines with high selectivities against human CNS cancers in vitro." J Med Chem **37**(14): 2190-7.
- Kamata, T. *et al.* (2005). "Membrane-proximal {alpha}/{beta} stalk interactions differentially regulate integrin activation." J Biol Chem **280**(26): 24775-83.
- Kato, K. *et al.* (2006). "Plasma-membrane-associated sialidase (NEU3) differentially regulates integrin-mediated cell proliferation through laminin- and fibronectin-derived signalling." Biochem J **394**(Pt 3): 647-56.
- Khalili, P. *et al.* (2006). "A non-RGD-based integrin binding peptide (ATN-161) blocks breast cancer growth and metastasis in vivo." Mol Cancer Ther **5**(9): 2271-80.
- Kim, S. *et al.* (2000a). "Regulation of angiogenesis in vivo by ligation of integrin alpha5beta1 with the central cell-binding domain of fibronectin." Am J Pathol **156**(4): 1345-62.
- Kim, S. *et al.* (2000b). "Regulation of integrin alpha vbeta 3-mediated endothelial cell migration and angiogenesis by integrin alpha5beta1 and protein kinase A." J Biol Chem **275**(43): 33920-8.
- Kita, D. *et al.* (2001). "Expression of dominant-negative form of Ets-1 suppresses fibronectin-stimulated cell adhesion and migration through down-regulation of integrin alpha5 expression in U251 glioma cell line." Cancer Res **61**(21): 7985-91.
- Kouniavsky, G. *et al.* (2002). "Stromal extracellular matrix reduces chemotherapy-induced apoptosis in colon cancer cell lines." Clin Exp Metastasis **19**(1): 55-60.
- Kren, A. *et al.* (2007). "Increased tumor cell dissemination and cellular senescence in the absence of beta1-integrin function." Embo J **26**(12): 2832-42.
- Kuo, P. L. *et al.* (2005). "The mechanism of ellipticine-induced apoptosis and cell cycle arrest in human breast MCF-7 cancer cells." Cancer Lett **223**(2): 293-301.
- Kuo, Y. C. *et al.* (2006). "Ellipticine induces apoptosis through p53-dependent pathway in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells." Life Sci **78**(22): 2550-7.
- Kuwada, S. K. et Li, X. (2000). "Integrin alpha5/beta1 mediates fibronectin-dependent epithelial cell proliferation through epidermal growth factor receptor activation." Mol Biol Cell **11**(7): 2485-96.
- Lafrenie, R. M. *et al.* (2007). "Cell adhesion and cancer: is there a potential for therapeutic intervention?" Expert Opin Ther Targets **11**(6): 727-31.
- Lee, J. W. et Juliano, R. L. (2000). "alpha5beta1 integrin protects intestinal epithelial cells from apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B-dependent pathway." Mol Biol Cell **11**(6): 1973-87.
- Lefranc, F. *et al.* (2005). "Possible future issues in the treatment of glioblastomas: special emphasis on cell migration and the resistance of migrating glioblastoma cells to apoptosis." J Clin Oncol **23**(10): 2411-22.
- Legler, D. F. *et al.* (2001). "Superactivation of integrin alphavbeta3 by low antagonist concentrations." J Cell Sci **114**(Pt 8): 1545-53.

- Leikam, C. *et al.* (2008). "Oncogene activation in melanocytes links reactive oxygen to multinucleated phenotype and senescence." *Oncogene* **27**(56): 7070-82.
- Leitinger, B. *et al.* (2000). "The regulation of integrin function by Ca(2+)." *Biochim Biophys Acta* **1498**(2-3): 91-8.
- Lewis, J. M. *et al.* (2002). "Integrins regulate the apoptotic response to DNA damage through modulation of p53." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(6): 3627-32.
- Liu, S. *et al.* (2000). "Integrin cytoplasmic domain-binding proteins." *J Cell Sci* **113** (Pt 20): 3563-71.
- Livak, K. J. et Schmittgen, T. D. (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods* **25**(4): 402-8.
- Livant, D. L. *et al.* (2000). "Anti-invasive, antitumorigenic, and antimetastatic activities of the PHSCN sequence in prostate carcinoma." *Cancer Res* **60**(2): 309-20.
- MacDonald, T. J. *et al.* (2001). "Preferential susceptibility of brain tumors to the antiangiogenic effects of an alpha(v) integrin antagonist." *Neurosurgery* **48**(1): 151-7.
- Maglott, A. *et al.* (2006). "The small alpha5beta1 integrin antagonist, SJ749, reduces proliferation and clonogenicity of human astrocytoma cells." *Cancer Res* **66**(12): 6002-7.
- Mahabeleshwar, G. H. *et al.* (2006). "Integrin signaling is critical for pathological angiogenesis." *J Exp Med* **203**(11): 2495-507.
- Marinelli, L. *et al.* (2005). "Ligand binding analysis for human alpha5beta1 integrin: strategies for designing new alpha5beta1 integrin antagonists." *J Med Chem* **48**(13): 4204-7.
- Martin, S. *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**(2): 354-67.
- Matter, M. L. et Ruoslahti, E. (2001). "A signaling pathway from the alpha5beta1 and alpha(v)beta3 integrins that elevates bcl-2 transcription." *J Biol Chem* **276**(30): 27757-63.
- Mattern, R. H. *et al.* (2005). "Glioma cell integrin expression and their interactions with integrin antagonists: Research Article." *Cancer Ther* **3A**: 325-340.
- Mizejewski, G. J. (1999). "Role of integrins in cancer: survey of expression patterns." *Proc Soc Exp Biol Med* **222**(2): 124-38.
- Mould, A. P. *et al.* (1997). "Defining the topology of integrin alpha5beta1-fibronectin interactions using inhibitory anti-alpha5 and anti-beta1 monoclonal antibodies. Evidence that the synergy sequence of fibronectin is recognized by the amino-terminal repeats of the alpha5 subunit." *J Biol Chem* **272**(28): 17283-92.
- Murillo, C. A. *et al.* (2004). "Inhibition of alpha5 integrin decreases PI3K activation and cell adhesion of human colon cancers." *Surgery* **136**(2): 143-9.
- Nabors, L. B. *et al.* (2007). "Phase I and correlative biology study of cilengitide in patients with recurrent malignant glioma." *J Clin Oncol* **25**(13): 1651-7.
- Nakagawa, H. *et al.* (1996). "Detailed oligosaccharide structures of human integrin alpha 5 beta 1 analyzed by a three-dimensional mapping technique." *Eur J Biochem* **237**(1): 76-85.
- Ohgaki, H. et Kleihues, P. (2007). "Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma." *Am J Pathol* **170**(5): 1445-53.
- Oz, B. *et al.* (2000). "The distribution of extracellular matrix proteins and CD44S expression in human astrocytomas." *Pathol Oncol Res* **6**(2): 118-24.
- Pamarthy, D. *et al.* (2007). "p27 degradation by an ellipticinium series of compound via ubiquitin-proteasome pathway." *Cancer Biol Ther* **6**(3): 360-6.

- Pankov, R. *et al.* (2000). "Integrin dynamics and matrix assembly: tensin-dependent translocation of alpha(5)beta(1) integrins promotes early fibronectin fibrillogenesis." J Cell Biol **148**(5): 1075-90.
- Parise, L. V. *et al.* (2000). "New aspects of integrin signaling in cancer." Semin Cancer Biol **10**(6): 407-14.
- Park, W. Y. *et al.* (2000). "Up-regulation of caveolin attenuates epidermal growth factor signaling in senescent cells." J Biol Chem **275**(27): 20847-52.
- Parsons, M. *et al.* (2008). "Quantification of integrin receptor agonism by fluorescence lifetime imaging." J Cell Sci **121**(Pt 3): 265-71.
- Paulus, W. *et al.* (1993). "Characterization of integrin receptors in normal and neoplastic human brain." Am J Pathol **143**(1): 154-63.
- Pellinen, T. *et al.* (2008). "Integrin trafficking regulated by Rab21 is necessary for cytokinesis." Dev Cell **15**(3): 371-85.
- Pickl, M. et Ries, C. H. (2009). "Comparison of 3D and 2D tumor models reveals enhanced HER2 activation in 3D associated with an increased response to trastuzumab." Oncogene **28**(3): 461-8.
- Porter, J. C. et Hogg, N. (1998). "Integrins take partners: cross-talk between integrins and other membrane receptors." Trends Cell Biol **8**(10): 390-6.
- Pramanik, D. *et al.* (2008). "Lipopeptide with a RGDK Tetrapeptide Sequence Can Selectively Target Genes to Proangiogenic alpha5beta1 Integrin Receptor and Mouse Tumor Vasculature." J Med Chem.
- Psimaras, D. et Delattre, J. Y. (2008). "[Perspectives in diagnosis and management of malignant gliomas]." Cancer Radiother **12**(6-7): 695-700.
- Reinmuth, N. *et al.* (2003). "Alphavbeta3 integrin antagonist S247 decreases colon cancer metastasis and angiogenesis and improves survival in mice." Cancer Res **63**(9): 2079-87.
- Reverte, C. G. *et al.* (2006). "Perturbing integrin function inhibits microtubule growth from centrosomes, spindle assembly, and cytokinesis." J Cell Biol **174**(4): 491-7.
- Roos, W. P. *et al.* (2007). "Apoptosis in malignant glioma cells triggered by the temozolomide-induced DNA lesion O6-methylguanine." Oncogene **26**(2): 186-97.
- Ruan, S. *et al.* (1999). "Attenuation of WAF1/Cip1 expression by an antisense adenovirus expression vector sensitizes glioblastoma cells to apoptosis induced by chemotherapeutic agents 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea and cisplatin." Clin Cancer Res **5**(1): 197-202.
- Ruan, S. *et al.* (1998). "Overexpressed WAF1/Cip1 renders glioblastoma cells resistant to chemotherapy agents 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea and cisplatin." Cancer Res **58**(7): 1538-43.
- Ruegg, C. *et al.* (2006). "Antiangiogenic peptides and proteins: from experimental tools to clinical drugs." Biochim Biophys Acta **1765**(2): 155-77.
- Ruoslahti, E. (1988). "Fibronectin and its receptors." Annu Rev Biochem **57**: 375-413.
- Sage, J. *et al.* (2003). "Acute mutation of retinoblastoma gene function is sufficient for cell cycle re-entry." Nature **424**(6945): 223-8.
- Sathornsumetee, S. et Rich, J. N. (2008). "Designer therapies for glioblastoma multiforme." Ann N Y Acad Sci **1142**: 108-32.
- Sawada, K. *et al.* (2008). "Loss of E-cadherin promotes ovarian cancer metastasis via alpha 5-integrin, which is a therapeutic target." Cancer Res **68**(7): 2329-39.
- Schmitmeier, S. *et al.* (2005). "Potent mimicry of fibronectin-induced intracellular signaling in glioma cells by the homodimeric snake venom disintegrin contortrostatin." Neurosurgery **57**(1): 141-53; discussion 141-53.

- Schmitt, C. A. (2007). "Cellular senescence and cancer treatment." Biochim Biophys Acta **1775**(1): 5-20.
- Schnell, O. *et al.* (2008). "Expression of integrin alphavbeta3 in gliomas correlates with tumor grade and is not restricted to tumor vasculature." Brain Pathol **18**(3): 378-86.
- Schwartz, M. A. (2001). "Integrin signaling revisited." Trends Cell Biol **11**(12): 466-70.
- Schwartz, M. A. et Assoian, R. K. (2001). "Integrins and cell proliferation: regulation of cyclin-dependent kinases via cytoplasmic signaling pathways." J Cell Sci **114**(Pt 14): 2553-60.
- Seales, E. C. *et al.* (2005). "Hypersialylation of beta1 integrins, observed in colon adenocarcinoma, may contribute to cancer progression by up-regulating cell motility." Cancer Res **65**(11): 4645-52.
- Serini, G. *et al.* (2008). "Integrins team up with tyrosine kinase receptors and plexins to control angiogenesis." Curr Opin Hematol **15**(3): 235-42.
- Serini, G. *et al.* (2006). "Integrins and angiogenesis: a sticky business." Exp Cell Res **312**(5): 651-8.
- Sethi, T. *et al.* (1999). "Extracellular matrix proteins protect small cell lung cancer cells against apoptosis: a mechanism for small cell lung cancer growth and drug resistance in vivo." Nat Med **5**(6): 662-8.
- Shi, L. M. *et al.* (1998). "Mining the National Cancer Institute Anticancer Drug Discovery Database: cluster analysis of ellipticine analogs with p53-inverse and central nervous system-selective patterns of activity." Mol Pharmacol **53**(2): 241-51.
- Shih, T. et Lindley, C. (2006). "Bevacizumab: an angiogenesis inhibitor for the treatment of solid malignancies." Clin Ther **28**(11): 1779-802.
- Smallheer, J. M. *et al.* (2004). "Synthesis and biological evaluation of nonpeptide integrin antagonists containing spirocyclic scaffolds." Bioorg Med Chem Lett **14**(2): 383-7.
- Soffietti, R. *et al.* (2007). "New chemotherapy options for the treatment of malignant gliomas." Anticancer Drugs **18**(6): 621-32.
- Spangenberg, C. *et al.* (2006). "ERBB2-mediated transcriptional up-regulation of the alpha5beta1 integrin fibronectin receptor promotes tumor cell survival under adverse conditions." Cancer Res **66**(7): 3715-25.
- Stein, W. D. *et al.* (2005). "Differential expression of cell adhesion genes: implications for drug resistance." Int J Cancer **113**(6): 861-5.
- Stiborova, M. *et al.* (2008). "Role of hepatic cytochromes P450 in bioactivation of the anticancer drug ellipticine: studies with the hepatic NADPH:cytochrome P450 reductase null mouse." Toxicol Appl Pharmacol **226**(3): 318-27.
- Stiborova, M. *et al.* (2003). "DNA adduct formation by the anticancer drug ellipticine in rats determined by ³²P postlabeling." Int J Cancer **107**(6): 885-90.
- Stiborova, M. *et al.* (2007a). "Mammalian peroxidases activate anticancer drug ellipticine to intermediates forming deoxyguanosine adducts in DNA identical to those found in vivo and generated from 12-hydroxyellipticine and 13-hydroxyellipticine." Int J Cancer **120**(2): 243-51.
- Stiborova, M. *et al.* (2007b). "Formation and persistence of DNA adducts of anticancer drug ellipticine in rats." Toxicology **236**(1-2): 50-60.
- Stoeltzing, O. *et al.* (2003). "Inhibition of integrin alpha5beta1 function with a small peptide (ATN-161) plus continuous 5-FU infusion reduces colorectal liver metastases and improves survival in mice." Int J Cancer **104**(4): 496-503.
- Stupack, D. G. (2005). "Integrins as a distinct subtype of dependence receptors." Cell Death Differ **12**(8): 1021-30.
- Stupack, D. G. et Cheresch, D. A. (2002). "Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival." J Cell Sci **115**(Pt 19): 3729-38.

- Stupack, D. G. *et al.* (2001). "Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins." *J Cell Biol* **155**(3): 459-70.
- Stupp, R. *et al.* (2007). "Chemoradiotherapy in malignant glioma: standard of care and future directions." *J Clin Oncol* **25**(26): 4127-36.
- Symington, B. E. (1990). "Fibronectin receptor overexpression and loss of transformed phenotype in a stable variant of the K562 cell line." *Cell Regul* **1**(9): 637-48.
- Takada, Y. *et al.* (2007). "The integrins." *Genome Biol* **8**(5): 215.
- Takagi, J. et Springer, T. A. (2002). "Integrin activation and structural rearrangement." *Immunol Rev* **186**: 141-63.
- Takeda, I. *et al.* (2007). "Simvastatin inactivates beta1-integrin and extracellular signal-related kinase signaling and inhibits cell proliferation in head and neck squamous cell carcinoma cells." *Cancer Sci* **98**(6): 890-9.
- Tang, C. H. et Wei, Y. (2008). "The urokinase receptor and integrins in cancer progression." *Cell Mol Life Sci*.
- Taylor, S. T. *et al.* (2000). "Epigenetic determinants of resistance to etoposide regulation of Bcl-X(L) and Bax by tumor microenvironmental factors." *J Natl Cancer Inst* **92**(1): 18-23.
- Tucker, G. C. (2002). "Inhibitors of integrins." *Curr Opin Pharmacol* **2**(4): 394-402.
- Tuettenberg, J. *et al.* (2006). "Angiogenesis in malignant glioma--a target for antitumor therapy?" *Crit Rev Oncol Hematol* **59**(3): 181-93.
- Uhm, J. H. *et al.* (1999). "Vitronectin, a glioma-derived extracellular matrix protein, protects tumor cells from apoptotic death." *Clin Cancer Res* **5**(6): 1587-94.
- van Golen, K. L. *et al.* (2002). "Suppression of tumor recurrence and metastasis by a combination of the PHSCN sequence and the antiangiogenic compound tetrathiomolybdate in prostate carcinoma." *Neoplasia* **4**(5): 373-9.
- Van Meter, T. *et al.* (2006). "Microarray analysis of MRI-defined tissue samples in glioblastoma reveals differences in regional expression of therapeutic targets." *Diagn Mol Pathol* **15**(4): 195-205.
- van Nimwegen, M. J. et van de Water, B. (2007). "Focal adhesion kinase: a potential target in cancer therapy." *Biochem Pharmacol* **73**(5): 597-609.
- Varner, J. A. et Cheresh, D. A. (1996). "Integrins and cancer." *Curr Opin Cell Biol* **8**(5): 724-30.
- Varner, J. A. *et al.* (1999). "Inhibition of angiogenesis and tumor growth by murine 7E3, the parent antibody of c7E3 Fab (abciximab; ReoPro)." *Angiogenesis* **3**(1): 53-60.
- Wang, L. H. (2004). "Molecular signaling regulating anchorage-independent growth of cancer cells." *Mt Sinai J Med* **71**(6): 361-7.
- Wang, Y. *et al.* (2004). "p53 disruption profoundly alters the response of human glioblastoma cells to DNA topoisomerase I inhibition." *Oncogene* **23**(6): 1283-90.
- Wei, Y. *et al.* (2007). "Urokinase receptors are required for alpha 5 beta 1 integrin-mediated signaling in tumor cells." *J Biol Chem* **282**(6): 3929-39.
- Westhoff, M. A. *et al.* (2008). "Identification of a novel switch in the dominant forms of cell adhesion-mediated drug resistance in glioblastoma cells." *Oncogene* **27**(39): 5169-81.
- Xiong, J. P. *et al.* (2001). "Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3." *Science* **294**(5541): 339-45.
- Xu, G. W. *et al.* (2005). "Pharmaceutical-mediated inactivation of p53 sensitizes U87MG glioma cells to BCNU and temozolomide." *Int J Cancer* **116**(2): 187-92.
- Xue, C. *et al.* (2007). "p53 determines multidrug sensitivity of childhood neuroblastoma." *Cancer Res* **67**(21): 10351-60.
- Zaidel-Bar, R. *et al.* (2007). "Functional atlas of the integrin adhesome." *Nat Cell Biol* **9**(8): 858-67.

- Zhang, Z. *et al.* (1995). "The alpha 5 beta 1 integrin supports survival of cells on fibronectin and up-regulates Bcl-2 expression." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(13): 6161-5.
- Zhao, H. *et al.* (2005). "Unoccupied alpha(v)beta3 integrin regulates osteoclast apoptosis by transmitting a positive death signal." Mol Endocrinol **19**(3): 771-80.

L'INTEGRINE $\alpha 5\beta 1$ DANS LES GLIOMES HUMAINS : UNE CIBLE THERAPEUTIQUE ET UN ACTEUR DE LA RESISTANCE A LA CHIMIOTHERAPIE.

Les intégrines, protéines transmembranaires de la famille des molécules d'adhérence cellulaire, participent à de nombreux processus physiologiques et physiopathologiques. L'implication des intégrines à différents stades de la tumorigénèse a été montrée dans de nombreux cancers et les positionne comme des cibles thérapeutiques intéressantes. Les tumeurs cérébrales constituent des tumeurs particulièrement agressives pour lesquelles les thérapies classiques se révèlent souvent inefficaces. Nous proposons une nouvelle cible thérapeutique pour les glioblastomes : l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. En effet, des données récentes de la littérature indiquent que cette intégrine est surexprimée dans les gliomes en fonction du grade tumoral, qu'elle est au centre d'un réseau fonctionnel dans les glioblastomes et participe à la formation de nouveaux vaisseaux. Ainsi les objectifs de mon travail de thèse ont consisté en (1) la caractérisation du rôle de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans les glioblastomes, (2) la démonstration de son intérêt en tant que cible thérapeutique et (3) son implication dans les phénomènes de résistance.

Les résultats obtenus montrent que la modulation du taux d'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans des lignées de glioblastomes humains (A172, U87MG et U373) modifie les paramètres cellulaires en relation avec leur agressivité (prolifération, clonogénicité). Le niveau d'expression de la sous-unité $\alpha 5$ et la tumorigénicité ne sont pas corrélés de manière identique dans les trois lignées étudiées. La répression de la sous-unité $\alpha 5$ dans les cellules U87MG ou sa sur-expression dans les cellules U373 entraîne une induction de sénescence prématurée. L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ est fortement impliquée dans l'agressivité des glioblastomes.

Les antagonistes de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ sont définis comme des molécules capables d'inhiber l'adhérence cellulaire à la fibronectine. Ces molécules sont également capables d'inhiber la prolifération et la clonogénicité indépendamment de leur effet sur l'adhérence. Les effets de ces antagonistes sur la tumorigénicité augmentent avec le taux d'intégrine $\alpha 5\beta 1$. Les antagonistes de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ présentent une activité anti-tumorale.

La réponse cellulaire aux agents chimiothérapeutiques est modulée par le taux d'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ ou son état d'activation. L'application d'un antagoniste de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ régule la balance sénescence/apoptose en réponse à l'ellipticine. Cette régulation passe par la modulation de l'activation de la protéine p53 et de ses gènes cibles. L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ se positionne comme un acteur de la chimiorésistance dans les glioblastomes humains.

Ces travaux nous ont permis de mettre en évidence un rôle primordial de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans la tumorigénicité des cellules mais également dans la résistance à une chimiothérapie des glioblastomes humains. La relation entre l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et la protéine p53 ouvre de nouvelles perspectives thérapeutiques pour le traitement de tumeurs cérébrales selon leur taux d'expression d'intégrine et le statut de la protéine p53.

$\alpha 5\beta 1$ INTEGRIN IN HUMAN GLIOMAS : A THERAPEUTIC TARGET AND AN ACTOR OF CHEMORESISTANCE.

Integrins are transmembrane proteins, part of cell adhesion molecules involved in various physiologic and pathophysiological processes. Their implications in different stages contributing to tumorigenesis is described in many types of cancer and make them interesting therapeutic targets. Malignant brain tumors are considered among the most aggressive cancers due to their poor responsiveness to classical therapies. We propose $\alpha 5\beta 1$ integrin as a target in the treatment of cerebral tumors. Recent works described a functional network in glioblastoma in which $\alpha 5\beta 1$ integrin play a central role. This integrin is overexpressed in brain tumors relatively to their grading and in newly formed blood vessels. Therefore aims of my study were (1) to characterize the role of $\alpha 5\beta 1$ integrin in glioblastomas, (2) to demonstrate its use as a therapeutic target and (3) to describe its implication in the mechanism of chemoresistance.

Our results showed that modulating $\alpha 5\beta 1$ integrin level in glioblastomas has some consequences in cellular parameters relative to tumoral aggressivity (proliferation, clonogenicity). $\alpha 5$ subunit expression and tumorigenicity are not correlated in the same way in the three cell lines studied. $\alpha 5$ repression in U87MG cells and overexpression in U373 cells lead to the induction of premature senescence. $\alpha 5\beta 1$ integrin is highly involved in glioblastomas aggressiveness.

$\alpha 5\beta 1$ integrin antagonists are molecules inhibiting cell adhesion to fibronectin. These molecules are able to inhibit proliferation and clonogenicity independently to their effect on cell adhesion. Effects of these antagonists on tumorigenicity increase with $\alpha 5\beta 1$ integrin level. $\alpha 5\beta 1$ integrin antagonists have some anti-tumoral activities.

Cell response to chemotherapeutic agents is modulated by $\alpha 5\beta 1$ integrin level and activation state. Treatment with integrin antagonists regulates the balance between senescence and apoptosis in response to ellipticine. This regulation involves modulation of p53 activation and target genes. $\alpha 5\beta 1$ integrin can be considered as an actor of the chemoresistance of human gliomas.

Information obtained here attribute a crucial role for $\alpha 5\beta 1$ integrin in tumorigenicity and control of chemosensitivity of glioblastomas. The relation between $\alpha 5\beta 1$ integrin level and p53 will help to develop new therapeutic strategies for brain tumors according to their $\alpha 5\beta 1$ integrin level and p53 status.