

Université de Strasbourg
Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé
*Laboratoire de Biophotonique et de Pharmacologie, UMR7213 CNRS,
Faculté de Pharmacie*

THÈSE

En vue d'obtenir le grade de :

Docteur de l'Université de Strasbourg

Discipline : Sciences du vivant-Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Par

Erika COSSET

Implication de la cavéoline-1 dans le phénotype des
glioblastomes

Soutenue publiquement le 01 octobre 2010

Membres du Jury

Dr. Monique DONTENWILL
Pr. Olivier FERON
Dr. Paula CASSONI
Dr. Christian GAIDDON
Pr. Elizabeth Cohen-Jonathan-Moyal
Dr. Sophie MARTIN

Directeur de thèse
Rapporteur Externe
Rapporteur Externe
Examineur Interne
Examineur
Examineur

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse, M. Olivier Feron, Mme Paola Cassoni, M. Christian Gaiddon et Mme Elizabeth Cohen-Jonathan-Moyal, d'avoir accepté de juger mon travail.

Je souhaite remercier le Dr. Sophie Martin de m'avoir encadré tout au long de ma thèse. Merci de m'avoir permis de m'exprimer sur ce sujet de recherche. Merci pour toutes ces discussions scientifiques mais aussi techniques. Encore toutes mes félicitations pour la naissance de ta fille : qu'elle t'apporte la sérénité et le bonheur ! Je remercie également ma directrice de thèse, le Dr. Monique Dontenwill, qui m'a accueilli dans son équipe et qui ma placé sous la tutelle de Sophie Martin. J'ai apprécié votre rôle de « chef » dans les situations scientifiques mais aussi humaines difficiles, vos conseils techniques avisés. J'ai particulièrement apprécié vos « brain-storming » qui m'ont permis de m'ouvrir sur d'autres perspectives. Je souhaitais aussi vous remercier de m'avoir soutenu, tout comme Sophie, dans ma candidature au monitorat ainsi que dans les différents projets menés au sein du laboratoire comme la création du journal club.

Je remercie également toutes les autres personnes appartenant ou ayant appartenu à mon équipe : le Dr. Anne Maglott qui a toujours été présente pour me donner des renseignements de quelques natures que ce soit, le Dr. Eva Martincova pour sa bonne humeur et sa ténacité : je pense que tu as fourni un travail immense et ardu. Je remercie Elmina Mammadova pour ses discussions scientifiques, sa gentillesse et son soutien. Je remercie le Dr. David Léger : merci pour ton soutien de tous les instants, de m'avoir prêté ton épaule au période les plus difficiles, merci pour tes conseils et ton esprit critique, merci pour tes encouragements et ta bonne humeur à toutes épreuves (je te souhaite que le meilleur dans ton nouveau poste de maître de conférence). Je remercie Ma tchèque adorée Hana, Anne-Marie (la touche-à-tout), Alexandra (Notre chère Russe-Heïdi), Aurélie (la géniale), Térésa (mon espagnole adorée) Anaïs (la meilleure), Isabelle (la rigoureuse) pour leur superbe personnalité, leur détermination et le soutien qu'elles m'ont apportées.

J'adresse des remerciements particulièrement expressifs au Dr. Estelle Woldt qui a été pour moi une amie plus qu'une collègue. Toujours souriante et de bonne humeur, toujours soucieuse du bien-être d'autrui, toujours à l'écoute et toujours fidèle à elle-même. Je te dis merci « Telle-telle » car grâce à toi ma thèse a été une grande aventure scientifique et humaine. Je te remercie pour ton soutien inébranlable, tes conseils techniques et tes produits (Anticorps, tampons...) ... UN GRAND MERCI !!!

Merci à tous les membres de l'équipe Boucher : Jérôme l'ancien, toujours présent, merci pour tes conseils, merci d'avoir partagé ton expérience, merci à Céline Gracia qui nous a quitté trop tôt pour une nouvelle aventure scientifique à Paris, ton amitié m'est précieuse. Merci à Zeina la « femme-enceinte », on a débuté notre thèse ensemble, tu es ma compagne de route, merci pour ces discussions sans fin, ton amitié, tu montres un courage et une ténacité considérable. Merci Mohamed pour ton enthousiasme qui fait plaisir à voir et la passion que tu montres pour la recherche, merci pour ton soutien, ton esprit critique et pour nos discussions sur la science. Merci à Emilie (la space) pour ses

conseils et son soutien. Merci à Sophie F. pour sa joie de vivre et ses conseils avisés (notamment pour mes post-docs) tes conseils m'ont été précieux, je te souhaite de trouver ton bonheur aussi bien dans ta vie professionnelle que dans ta vie personnelle. Merci à Véro pour son accéçibilité, sa générosité et son écoute attentive, je te souhaite le meilleur. Merci à Rachel pour ses conseils et son écoute. Merci Philippe d'avoir accepté de faire parti de mon jury de comité de thèse (et merci pour vos conseils notamment pour mon post-doc).

Je souhaite également remercier tous les membres de mon ancien labo U590 INSERM : Sandrine, Véro, Isabelle, Laury, Amandine, les deux Juliens, Stéphane, Elodie, Robert, Claude, Thibault ... Tout particulièrement, un grand merci à Sandrine, Laury et Isabelle pour leurs amitiés. Vous m'avez beaucoup manqué ! J'adresse mes sincères remerciements et toute ma reconnaissance au Dr. Véronique Maguer-satta pour ses conseils, sa présence et son soutien au cours des deux années passées au CLB mais également au cours de ma thèse. Un grand merci aussi à Franck Nicolini pour sa gentillesse et son temps.

Merci à Thérèse Kéravis, toutes les discussions qu'on a pu partager m'ont toujours enrichi. Je remercie nos secrétaires « de choc » Marlyse et Ingrid pour leur présence et leur assistance. Un grand merci à Thierry Chataignau et Nathalie Niederhoffer qui nous (les moniteurs) ont montré la voie et aidé au mieux au cours de ces deux années de monitorat, c'était un réel plaisir et une bouffée d'air frais d'avoir pu travailler avec vous main dans la main. Je remercie également le directeur de notre unité Dr. Yves Mely pour son soutien lors de la création de notre journal club et pour ses encouragements et discussions scientifiques. Je remercie également tous le comité d'organisation du journal club : Lucas, Zeina, Antoine, Lazarre, Nourédine et Issaka. Merci à Thérèse Dérameau, Evelyne, Fanny, Walid, Abdel, Abdu, Kaouther, Marie, Emilie, Caroline...et toutes les autres. Enfin, je souhaite remercier Allison Walter, Stéphanie Dal et Cyril Auger pour leurs amitiés.

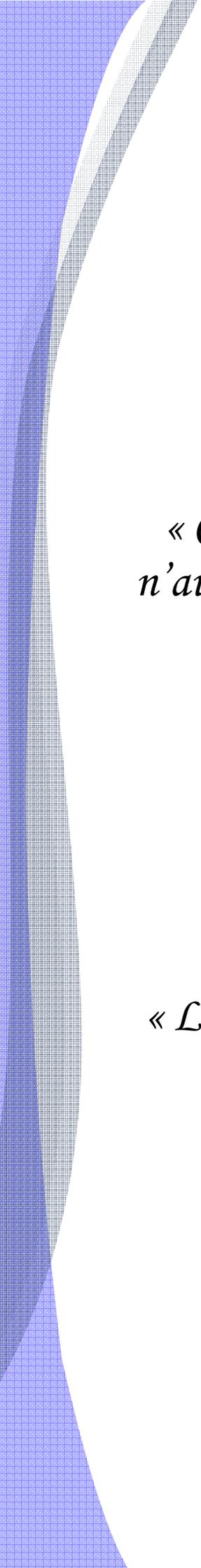
Je remercie bien évidemment toute ma famille et plus particulièrement ma maman sans qui cette aventure n'aurait jamais vu le jour. Merci pour ta présence, ton soutien moral, sentimental et financier, j'ai bien conscience de tes sacrifices, merci de m'avoir accompagné jusqu'au bout, merci d'être une maman aussi exceptionnel. Merci à mon grand frère dont les conseils et paroles me sont chères, merci à ma petite sœur à qui je souhaite du courage dans ses études et mon petit frère Ruddy qui me fait autant rire et merci à tous mes autres frères et sœurs (Hugues-Emile, Prislaine, Patrick, Keysha et Keyshan). Merci à mon Pa-jean qui nous a quitté trop vite, tu as toujours été un modèle de sagesse pour moi. Merci à mes mamies adorées, Prospère et Arlette, vos prières m'ont toujours accompagnées. Merci à mon père dont la personnalité est si proche de la mienne. Enfin, je remercie également Nicolas, mon bien-aimé, merci pour ton soutien depuis le début, plus de 10 années, tu m'as toujours accompagné et écouté autant que possible, merci pour ta présence.

Merci à tous mes amies : Leslie, Emeline, Christine, Solène, Katia, Cécile, Chéryl, Nath, Shirley, Géraldine, Laury, Isabelle, Sandrine..., mes co-équipières de Volley-ball (Lyon, Strasbourg) ...

Parce que j'oublie certainement beaucoup de personnes, et qu'il m'ait impossible de citer tout le monde, je souhaiterais dire :

« Merci à tous les personnes qui ont cru en moi et qui m'on soutenu ».

Ce travail de thèse a été financé par le Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur, par l'Université de Strasbourg, par l'Institut National du Cancer, La ligue contre le cancer et par l'Association pour la Recherche sur le Cancer.

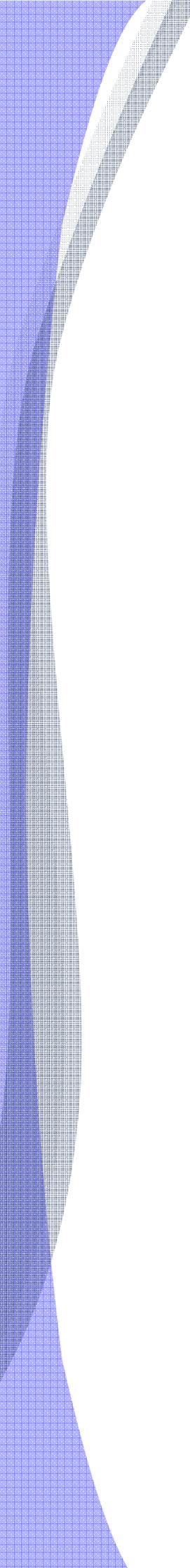


« Choisissez un travail que vous aimez et vous n'aurez pas à travailler un seul jour de votre vie »

Confucius

« Le temps révèle tout : c'est un bavard qui parle sans être interrogé »

Euripide



*A ma maman
A ma famille
A Nicolas*

Et à tous ceux qui ont soif d'espoir ...

SOMMAIRE

| | |
|--|-----------|
| SOMMAIRE | 1 |
| <i>ABRÉVIATIONS</i> | 7 |
| <i>Figures et Tables</i> | 9 |
| <i>INTRODUCTION</i> | 15 |
| <i>I/ <u>Présentation des gliomes et des glioblastomes</u></i> | <i>17</i> |
| I-1/ Les cellules gliales | 17 |
| I-2/ Les gliomes | 19 |
| I-3/ Classification des astrocytomes | 19 |
| I-3-1/ Astrocytomes de bas grade (OMS : grade I et II) | 19 |
| I-3-2/ Astrocytomes de haut grade (OMS : grade III et IV) | 21 |
| I-3-3/ Classification de Sainte-Anne (Daumas-Duport) | 23 |
| I-4/Prise en charge thérapeutique des glioblastomes | 25 |
| I-4-1/Exérèse chirurgicale | 25 |
| I-4-2/Un protocole standardisé | 25 |
| I-4-3/La radiothérapie | 27 |
| I-4-4/La chimiothérapie | 31 |
| I-4-5/ Marqueurs moléculaires | 33 |
| I-4-6/Hétérogénéité moléculaire intra-tumorale ou inter-tumorale | 35 |
| I-4-6a/Pronostic de la progression tumorale et de la survie | 35 |
| I-4-6b/Prédiction de la réponse aux traitements | 45 |
| I-5/Nouvelles pistes thérapeutiques | 49 |
| I-5-1/ Les anti-angiogéniques | 49 |
| I-5-1a/L'angiogenèse | 49 |
| I-5-1b/ Anti-VEGF | 51 |
| I-5-2/ Les inhibiteurs de tyrosine kinase (TKIs) | 53 |
| I-5-3/ Les anti-intégrines | 57 |
| <i>II/ <u>La cavéoline-1</u></i> | <i>71</i> |
| II-1/ Présentation des cavéoles | 71 |
| II-1-1/ Structure et distribution des cavéoles | 71 |
| II-1-2/ Internalisation des pathogènes par les cavéoles | 73 |
| II-1-3/ Les cavéoles et leur fonction de recyclage | 75 |
| II-1-4/ Cavéoles et cavéolines : des mécanocepteurs | 77 |
| II-2/ Présentation des cavéolines | 77 |

| | |
|---|------------|
| II-2-1/ La famille des cavéolines | 77 |
| II-2-2/ La cavéoline-1 : protéine de structure des cavéoles | 81 |
| II-2-3/ Synthèse et dynamique intra-cellulaire de la cavéoline-1 | 83 |
| II-3/ Les multiples fonctions de la cavéoline-1 | 87 |
| II-3-1/ Les souris cavéoline-1 KO | 87 |
| II-3-2/ Le transport du cholestérol | 89 |
| II-3-3/ La cavéoline-1 dans le noyau | 91 |
| II-3-4/ La cavéoline-1 est aussi une protéine sécrétée ! | 93 |
| II-3-5/ La cavéoline-1 et la signalisation intracellulaire | 97 |
| II-3-5a/ <i>p-cavéoline-1 et migration cellulaire</i> | 97 |
| II-3-5b/ <i>La cavéoline-1 dans la fonction des intégrines</i> | 99 |
| II-3-5c/ <i>Séquestration des protéines par la cavéoline-1 : exemple de la β-caténine</i> | 101 |
| II-3-5d/ <i>La cavéoline-1 : inhibiteur de protéines à activité tyrosine kinase</i> | 103 |
| II-3-5e/ <i>La cavéoline-1 est un régulateur de voie de signalisation : exemple de la voie TGFβ/Smad</i> | 105 |
| II-4/ La cavéoline-1 dans les cancers | 109 |
| II-4-1/ Le locus D7S522 | 109 |
| II-4-2/ Oncogène ou suppresseur de tumeurs ? | 109 |
| II-4-3/ La cavéoline-1 et le phénotype MDR | 115 |
| II-4-4/ Le mutant P132L de la cavéoline-1 | 117 |
| II-4-5/ La cavéoline-1 dans les gliomes | 119 |
| II-4-6/ La cavéoline-1 et les « cancer associated fibroblasts » (CAFs) | 123 |
| Objectif de l'étude | 129 |
| Matériels et Méthodes | 131 |
| <i>I/ Culture cellulaire</i> | 131 |
| I-1/ <u>Génération de lignées stables</u> | 131 |
| I-2/ <u>Inhibition transitoire de l'expression de la cavéoline-1, des sous-unités intégrines α5 et α2, de Smad2 et du TGFβR1 (siRNA)</u> | 132 |
| I-3/ <u>Inhibition des voies de signalisation</u> | 133 |
| I-4/ <u>Induction de l'expression de la sous-unité intégrine α5 par le TGFβ-1</u> | 134 |
| I-5/ <u>Sécrétion de PAI-1 en milieu conditionné</u> | 134 |
| I-6/ <u>Inhibiteurs, antagonistes et agents chimiothérapeutiques</u> | 135 |
| <i>II/ Western Blot</i> | 135 |
| II-1/ <u>Expression de la cavéoline-1, des sous unités intégrines α5 et β1 et du récepteur TGFβR1</u> | 136 |
| II-2/ <u>Expression de PAI-1</u> | 137 |
| II-3/ <u>Activation des protéines ERK, AKt, Smad2, FAK, p38 MAPK, SAP/JNK et p53</u> | 137 |
| <i>III/ RT-PCR quantitative</i> | 138 |

| | |
|--|------------|
| <u>III-1/ Expression de la cavéoline-1, des sous-unités intégrines $\alpha 5$ et $\beta 1$, de PAI-1 et de la cyclophiline-1</u> | 138 |
| <u>III-1-1/ Extraction des ARNs</u> | 138 |
| III-1-2/ Dosage des ARNs et rétrotranscription en ADNc | 140 |
| <u>III-1-3/ RT-PCR quantitative</u> | 140 |
| <i>IV/ Clonogénicité</i> | 142 |
| <u>IV-1/ Chimiosensibilité au Témzolomide et à l'ellipticine</u> | 142 |
| <u>IV-2/ Réponse aux antagonistes de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ et au SB-431542</u> | 143 |
| <i>V/ Prolifération cellulaire</i> | 143 |
| <i>VI/ Adhérence cellulaire</i> | 144 |
| <i>VII/ Transmigration cellulaire</i> | 144 |
| <i>VIII/ ELISA</i> | 145 |
| <i>IX/ PCR Array</i> | 146 |
| <i>X/ Le partitionnement des biopsies humaines de patients</i> | 146 |
| <i>XI/ Analyses statistiques</i> | 147 |
| RÉSULTATS | 151 |
| <u><i>I/ Effets modulateurs de la cavéoline-1 sur le phénotype des cellules de glioblastomes</i></u> | 151 |
| I-1/ Modulation de la prolifération cellulaire | 151 |
| I-2/ Modulation de la clonogénicité | 153 |
| I-3/ Modulation de la transmigration cellulaire | 153 |
| <u><i>II/ Effets modulateurs de la cavéoline-1 sur l'expression des gènes</i></u> | 159 |
| II-1/ La cavéoline-1 module principalement les gènes impliqués dans l'adhérence cellulaire | 159 |
| II-2/ L'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ est le médiateur des effets de la cavéoline-1 | 161 |
| II-3/ L'expression de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ et l'expression de la cavéoline-1 sont inversement corrélées dans différentes lignées de glioblastome | 169 |
| <u><i>III/ Modulation des voies de signalisation par la cavéoline-1 : régulation de l'expression de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ par la cavéoline-1</i></u> | 175 |
| III-1/ Activation et expression des protéines de signalisation | 175 |
| III-1-1/ La protéine p38-MAPK | 175 |
| III-1-2/ La protéine SAP/JNK | 177 |
| III-1-3/ Activation de p53 | 179 |

| | |
|--|------------|
| III-1-4/ La protéine FAK | 179 |
| III-1-5/ La protéine ERK | 179 |
| III-1-6/ La voie TGF β R/Smad | 181 |
| III-1-7/ La protéine AKt | 183 |
| III-2/ Modulation des voies de signalisation par l'intégrine α 5 β 1 | 185 |
| III-2-1/ Taux d'activation de ERK | 185 |
| III-2-2/ Modulation de la voie TGF β R/Smad2 | 185 |
| III-2-3/ Taux d'activation de AKt | 187 |
| III-3/ Implication des voies ERK-MAPK, PI3K-AKt et TGF β R/Smad dans la régulation de l'expression de l'intégrine α 5 β 1 | 189 |
| III-3-1/ Implication de la voie ERK-MAPK | 189 |
| III-3-2/ Implication de la voie PI3K-AKt | 191 |
| III-3-3/ Implication de la voie TGF β R/Smad | 191 |
| III-4/ Interconnexions des voies ERK-MAPK, PI3K-AKt et TGF β R/Smad | 193 |
| III-4-1/ La voie ERK-MAPK active Smad2 et AKt | 195 |
| III-4-2/ La voie PI3K-AKt active Smad2 | 195 |
| III-4-3/ La voie TGF β R/Smad active AKt | 197 |
| III-4-4/ La voie TGF β R/Smad régule l'expression de l'intégrine α 5 β 1 dans les cellules U373 | 197 |
| III-4-5/ La cavéoline-1, l'intégrine α 5 β 1 et le récepteur TGF β RI sont trois protéines interconnectées dans les glioblastomes | 199 |
| III-5/ Une boucle de TGF- β 1 contrôle l'expression de l'intégrine α 5 β 1 | 203 |
| III-5-1/ Sécrétion du TGF- β 1 par les cellules de glioblastome | 203 |
| III-5-2/ Le TGF- β 1 induit l'expression de l'intégrine α 5 β 1 | 205 |
| III-6/ Régulation de l'expression de PAI-1 par la cavéoline-1 | 209 |
| III-6-1/ L'expression de PAI-1 est inversement corrélée à celle de la cavéoline-1 | 209 |
| III-6-2/ Les voies ERK-MAPK et TGF β R/Smad2 contrôlent l'expression de PAI-1 dans les cellules de glioblastome | 211 |
| III-6-3/ La voie PI3K-AKt inhibe l'expression de PAI-1 | 213 |
| <u>IV/ Chimiorésistance des cellules de glioblastome au témozolomide (TMZ)</u> | 217 |
| IV-1/ Effet du TMZ sur la clonogénicité des cellules de glioblastomes | 217 |
| IV-2/ Effet de l'ellipticine sur la clonogénicité des cellules de glioblastome | 217 |
| IV-3/ <i>L'intégrine α5β1 et le récepteur TGFβRI en tant que cible thérapeutique</i> | 219 |
| IV-3-1/ Inhibition de la clonogénicité et de la trans-migration des cellules de glioblastome par le SJ749 | 221 |
| IV-3-2/ Inhibition de la clonogénicité des cellules de glioblastome par un nouvel antagoniste de l'intégrine α 5 β 1, le K34c | 221 |
| IV-3-3/ Inhibition de la clonogénicité des cellules de glioblastome par un inhibiteur du récepteur TGF β RI | 223 |

| | |
|--|------------|
| IV-3-4/ Inhibition de la clonogénicité des cellules de glioblastome par le co-traitement SB-431542 et K34c | 223 |
| <u>V/ Analyse des biopsies de patients</u> | <u>227</u> |
| V-1/ Corrélation entre l'expression de la sous-unité intégrine $\alpha 5$ et la survie des patients | 227 |
| V-2/ Corrélation entre l'expression de PAI-1 et la survie des patients | 229 |
| V-3/ L'expression de la cavéoline-1 est inversement corrélée à celles de l'intégrine $\alpha 5$ et du TGF β RI dans les échantillons de biopsies de patients | 229 |
| <u>Conclusion générale</u> | <u>235</u> |
| <u>Discussion et perspectives</u> | <u>241</u> |
| <u>I/ La cavéoline-1 module le phénotype des cellules de glioblastomes</u> | <u>241</u> |
| <u>II/ La cavéoline-1 module l'expression des gènes</u> | <u>245</u> |
| <u>III/ La cavéoline-1 module les voies de signalisation : régulation de l'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$</u> | <u>251</u> |
| <u>IV/ Les antagonistes de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et l'inhibiteur du TGFβRI représentent un fort potentiel thérapeutique dans les glioblastomes</u> | <u>255</u> |
| <u>Liste des publications et communications</u> | <u>261</u> |
| <u>Manuscrit n°1</u> | <u>262</u> |
| <u>Manuscrit n°2</u> | <u>263</u> |
| <u>C.V</u> | <u>264</u> |
| <u>BIBLIOGRAPHIE</u> | <u>267</u> |

| | |
|---------------|---|
| ADN (c) | Acide désoxyribonucléique (complémentaire) |
| AGT | <i>O</i> ⁶ -alkylguanine DNA |
| AKt | <i>Serine/threonine-specific protein kinase</i> |
| ARN (m) | Acide ribonucléique (messenger) |
| BCNU | 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea (carmustine) |
| BHE | Barrière hémato-encéphalique |
| BMP | <i>Bone morphogenetic protein</i> |
| BSA | Albumine bovine |
| Cav1 | Cavéoline-1 |
| CBD | <i>Caveolin Binding Domain</i> |
| CCNU | 1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea (lomustine) |
| CDC | <i>Cell Division Cycle</i> |
| CDKN2A | <i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i> |
| CHI3L1/YKL-40 | <i>Human cartilage glycoprotein-39</i> |
| (a)CGH | (array) <i>Comparative genomic hybridization</i> |
| G-CIMP | <i>Glioma-CpG island methylator phenotype</i> |
| CHIP | <i>Chromatin Immunoprecipitation</i> |
| COL | Collagène |
| CHN1 | Chimerin 1 |
| CSD | <i>Caveolin scaffolding domain</i> |
| DCC | <i>Deleted in colorectal cancer</i> |
| DEPC | <i>DiethylenePyrocarbonate</i> |
| DKK3 | <i>Dickkopf homolog 3</i> |
| DMSO | Diméthylsulfoxyde |
| EGFR | <i>Epidermal growth factor receptor</i> |
| EGR1 | <i>Early growth response 1</i> |
| EMEM | <i>Eagle's Minimum Essential Medium</i> |
| ELISA | <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> |
| EORTC | <i>European Organisation for Research and Treatment of Cancer</i> |
| ERK | <i>Extracellular signal-Regulated Kinase</i> |
| FAK | <i>Focal Adhesion Kinase</i> |
| FGFR3 | <i>Fibroblast growth factor receptor 3</i> |
| FN | Fibronectine |
| GADD153 | <i>Growth Arrest associated gene</i> |
| GBM | <i>Glioblastoma Multiforme</i> |
| G-CIMP | <i>Glioma-CpG island methylator phenotype</i> |
| GPR19 | <i>G protein-coupled receptor 19</i> |
| HDAC | <i>Histone desacetylase</i> |
| HIF-1 | <i>Hypoxia inducible factor 1</i> |
| HRP | <i>Horseradish peroxydase</i> |
| IDH1 | <i>Deshydrogenase isocitrate 1</i> |
| IGFBP | <i>Insulin-like growth factor binding protein</i> |
| IL | Interleukine |
| JAM(-B, -C) | <i>Jonction adhesion molecules</i> |
| JUNB | <i>Jun B protooncogene</i> |
| KO | Knock-out |
| KPS | <i>Karnofsky Performance Status</i> |
| LOH | <i>Loss of heterozygosity</i> |

| | |
|--------------|--|
| LOX | <i>Lysyl oxidase</i> |
| MAD | <i>Membrane attachment domain</i> |
| MAPK | <i>Mitogen activated protein kinase</i> |
| MDM2 | <i>Murine Double Minute 2</i> |
| MEC | <i>Matrice extracellulaire</i> |
| MGMT | <i>O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase</i> |
| MMP | <i>Métalloprotéase</i> |
| MMTV | <i>Mouse mammary tumor virus</i> |
| m-tor | <i>Mamalian target of rapamycin</i> |
| NTRK2 | <i>Neurotrophic tyrosine kinase receptor type 2</i> |
| OMS | <i>Organisation Mondiale de la Santé</i> |
| OPCML | <i>Opioid-binding protein/cell adhesion molecule-like</i> |
| PAI-1 | <i>Plasminogen Activator Inhibitor 1</i> |
| PBS | <i>Phosphate Buffer Saline</i> |
| PCNA | <i>Proliferating cell nuclear antigen</i> |
| PDGF(R) | <i>Platelet-derived growth factor receptor</i> |
| PI3K | <i>Phosphatidylinositol 3-Kinase</i> |
| PKC | <i>Protein kinase C</i> |
| PMA | <i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i> |
| PTEN | <i>Phosphate and tensin homolog deleted on chromosome 10</i> |
| PVDF | <i>Polyfluorure de vinylidène</i> |
| PYK2 | <i>Protein tyrosine kinase 2 beta</i> |
| PyMT | <i>Polyomavirus middle T antigen</i> |
| Ras | <i>Rat sarcoma virus oncogene</i> |
| Rb | <i>Retinoblastoma</i> |
| RGD | <i>Arginine Glycine Acide aspartique</i> |
| Rho | <i>Ras Homologous</i> |
| RTK | <i>Récepteur à activité tyrosine kinase</i> |
| RT-PCR | <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> |
| Rsv | <i>Rous Sarcoma Virus</i> |
| SARA | <i>Smad anchor for receptor activation</i> |
| Smad | <i>Small protein MAD related</i> |
| SDS-PAGE | <i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> |
| SH2 | <i>Src Homology region 2</i> |
| siRNA, shRNA | <i>small interfering, small hairpin RNA</i> |
| SNC | <i>Système nerveux central</i> |
| SPOCK | <i>Sparc/osteonectin, cwcv and kasal-like domains</i> |
| SVF | <i>Sérum de veau foetal</i> |
| SV40 | <i>Simian Virus 40</i> |
| TCGA | <i>The Cancer Genome Project</i> |
| TOP2A | <i>Topoisomerase II a</i> |
| TGFβ | <i>Transforming Growth Factor beta</i> |
| TMZ | <i>Témozolomide</i> |
| TNF | <i>Tumor necrosis factor</i> |
| TP53 | <i>Tumor protein 53 (ou p53)</i> |
| TSP 1 | <i>Thrombospondine 1</i> |
| Upa | <i>urokinase type plasminogen activator</i> |
| VCAM | <i>Vascular cell adhesion molecule</i> |
| VEGF | <i>Vascular endothelial growth factor</i> |
| VN | <i>Vitronectine</i> |

- Figure1.** Organisation des cellules gliales et neuronales.
- Figure2.** Evolution histopathologique des astrocytomes.
- Figure3.** Aberrations génétiques impliquées dans la genèse des glioblastomes.
- Figure4.** Evolution de la classification des tumeurs cérébrales.
- Figure5.** Aspects topographiques des glioblastomes.
- Figure6.** Action des rayonnements ionisants sur les cellules en fonction du temps.
- Figure7.** Modèle proposé par Park des voies de signalisation impliquées dans l'invasion cellulaire induite par des rayonnements ionisants.
- Figure8.** Schéma de référence de la prise en charge thérapeutique des glioblastomes.
- Figure9.** Mécanismes d'action du TMZ et de la MGMT.
- Figure10.** Exemples de marqueurs de mauvais pronostic dans les gliomes.
- Figure11.** Profil d'expression moléculaire des glioblastomes.
- Figure12.** Signature moléculaire des gliomes et mutation du gène IDH1 corrélé à un bon pronostic.
- Figure13.** Classification des GBM selon l'étude multiparamétrique de Noussmehr *et al.*
- Figure14.** Analyse par Kaplan-Meier de la survie de 38 patients atteints de glioblastome selon leur profil de méthylation du gène MGMT.
- Figure15.** Rehaussement de contraste en imagerie, évolution de la vascularisation suite au traitement par le Bevacizumab et survie moyenne et survie sans progression libre des patients sous traitement par des agents cytotoxiques ou anti-angiogéniques.
- Figure16.** Normalisation de la vascularisation tumorale.
- Figure17.** Spécificité des intégrines pour leurs ligands et signalisation des intégrines.
- Figure18.** Résultat de l'étude de phase I pour le traitement des glioblastomes récurrents par le cilengitide.
- Figure19.** Les différences morphologiques des cavéoles et la localisation de la cavéoline-1 au sein des cavéoles.
- Figure20.** La membrane plasmique présente des domaines hautement et faiblement organisés.
- Figure21.** La cavéoline-1 module différentes voies de signalisation dans les cellules endothéliales.
- Figure22.** La famille des gènes de la cavéoline.
- Figure23.** L'endocytose par les cavéoles.
- Figure24.** Génération des souris KO pour le gène de la cavéoline-1.
- Figure25.** Les souris déficientes en cavéoline-1 présentent de nombreuses affections.
- Figure26.** Polarisation de la cavéoline-1 durant la migration cellulaire.
- Figure27.** Implication de la cavéoline-1 dans la signalisation des intégrines.
- Figure28.** La voie de signalisation TGF β R/Smad.
- Figure29.** Signalisation du TGF β R à travers des voies de signalisation indépendantes de Smad.
- Figure30.** Modèle structural et fonctionnel de la cavéoline-1 au cours de la progression tumorale.
- Figure31.** Expression de la cavéoline-1 dans 60 lignées de cancers humains.

Figure32. Evolution dynamique de l'expression de la cavéoline-1 au cours de la progression tumorale.

Figure33. Le stade tumoral dépendrait de l'activation stromale.

Figure34. La sur-expression de la cavéoline-1 au niveau des cellules stromales est associée à un mauvais pronostic.

Figure35. L'expression de la cavéoline-1 module le phénotype des cellules de glioblastome.

Figure36. Les clones U87-MGshRNA_{cav1} présentent les mêmes caractéristiques que les cellules U87-MGsiRNA_{cav1}.

Figure37. Analyse par PCR Array du transcriptome des U87-MG siRNA_{cav1}, siRNA_{ctrl}, pEGFP_{cav1} et pEGFP_{ctrl}.

Figure38. L'expression de PAI-1 est inversement corrélée à celle de la cavéoline-1.

Figure39. Expression des sous-unités intégrines $\alpha 2$, $\alpha 5$ et $\beta 1$ dans les cellules U87-MG siRNA_{cav1}, siRNA_{ctrl}, pEGFP_{cav1} et pEGFP_{ctrl}.

Figure40. Etude de l'adhérence et de la clonogénicité des cellules U87-MG siRNA_{cav1} et siRNA_{ctrl} suite à l'inhibition des sous-unités intégrines $\alpha 2$ (siRNA $\alpha 2$) et $\alpha 5$ (siRNA $\alpha 5$).

Figure41. Expression de la cavéoline-1 et des sous-unités intégrines $\alpha 5$ et $\beta 1$ dans les cellules U87-MG sous- et sur-exprimant la cavéoline-1 (U87-MGsiRNA_{cav1}, siRNA_{ctrl}, pEGFP_{cav1} et pEGFP_{ctrl}) ou sous- et sur-exprimant la sous-unité intégrine $\alpha 5$ (U87-MGshRNA $\alpha 5$, U87-MGshRNA_{ctrl}, U87-MGpcDNA $\alpha 5$ et U87-MGpcDNA_{ctrl}).

Figure42. Implication de la sous-unité intégrine $\alpha 5$ dans le phénotype des cellules de glioblastome.

Figure43. L'inhibition de la cavéoline-1 induit l'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans différentes lignées de glioblastome.

Figure44. Corrélation inverse entre l'expression de la cavéoline-1 et celle de la sous-unité intégrine $\alpha 5$ dans les lignées de glioblastome.

Figure45. Les protéines p38-MAPK et SAP-JNK ne sont pas activées dans les cellules de glioblastome.

Figure46. Activation de p38 et de SAPJNK dans les cellules U87-MGshRNA_{cav1}.

Figure47. L'activation de p53 et de FAK n'est pas modulée dans les cellules de glioblastome.

Figure48. Corrélation inverse entre l'expression de la cavéoline-1 et l'activation de la protéine ERK.

Figure49. Corrélation inverse entre l'expression de la cavéoline-1 et l'activation de la voie TGF β R/Smad2 dans les cellules de glioblastome.

Figure50. Corrélation inverse entre l'expression de la cavéoline-1 et la phosphorylation de la protéine AKt dans les cellules de glioblastome.

Figure51. Inhibition de l'activation de la protéine ERK et de la protéine AKt dans les cellules U87-MGshRNA $\alpha 5$ sous-exprimant la sous-unité intégrine $\alpha 5$.

Figure52. Corrélation entre l'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et l'expression du TGF β RI.

Figure53. Implication de la voie ERK-MAPK dans la régulation de l'intégrine $\alpha 5$ dans les cellules de glioblastome.

Figure54. Implication de la voie PI3K-AKt dans la régulation de l'expression de la sous-unité intégrine $\alpha 5$ dans les cellules de glioblastome U87-MGshRNA_{cav1}.

Figure55. Implication de la voie TGF β R/Smad2 dans la régulation de l'expression de la sous-unité intégrine $\alpha 5$ dans les cellules de glioblastome U87-MGshRNA_{cav1}.

Figure56. Les voies de signalisation PI3K-Akt, TGF β R/Smad2 et ERK-MAPK sont interconnectées dans les cellules de glioblastome.

Figure57. L'inhibition de l'expression de la cavéoline-1 dans les cellules U373 induit une hyper-phosphorylation de Smad2.

Figure58. Corrélation inverse entre l'expression de la cavéoline-1 et du TGF β RI et la phosphorylation de Smad2 dans les lignées de glioblastome.

Figure59. Corrélation inverse entre la sécrétion du TGF- β 1 et l'expression de la cavéoline-1.

Figure60. L'expression de la sous-unité intégrine α 5 est induite par le TGF- β 1 dans les cellules U87-MGshRNA_{cav1}.

Figure61. Le TGF- β 1, mais pas l'activine, induit l'expression de la sous-unité intégrine α 5 dans les cellules U87-MGshRNA_{cav1}.

Figure62. L'expression de la protéine PAI-1 est inversement corrélée à celle de la cavéoline-1 sécrétée.

Figure63. Modulation de l'expression de PAI-1 par les voies TGFRI/Smad2, ERK-MAPK et PI3K-Akt.

Figure64. Le TMZ affecte moins la clonogénicité des cellules de glioblastome sous-exprimant l'intégrine α 5 β 1.

Figure65. L'ellipticine affecte moins la clonogénicité des cellules de glioblastome sous-exprimant l'intégrine α 5 β 1.

Figure66. Le SJ749 affecte beaucoup plus la clonogénicité et la trans-migration à travers la FN des cellules de glioblastome sur-exprimant l'intégrine α 5 β 1.

Figure67. La clonogénicité des cellules de glioblastome sous-exprimant la cavéoline-1 est affectée par le K34c, antagoniste sélectif de l'intégrine α 5 β 1 et par un inhibiteur de TGF β RI, le SB-431542.

Figure68. La clonogénicité des cellules de glioblastome sous-exprimant la cavéoline-1 est affectée par le co-traitement K34c et SB-431542.

Figure69. L'expression des sous-unités α 5 et β 1 et l'expression de la cavéoline-1 dans les échantillons de biopsies humaines des patients atteints de gliome.

Figure70. L'expression de PAI-1 est corrélée à un facteur de mauvais pronostic dans les gliomes.

Figure71. L'expression de la cavéoline-1 est inversement corrélée à l'expression de l'intégrine α 5 et au TGF β RI dans les biopsies humaines de patients atteints de gliome.

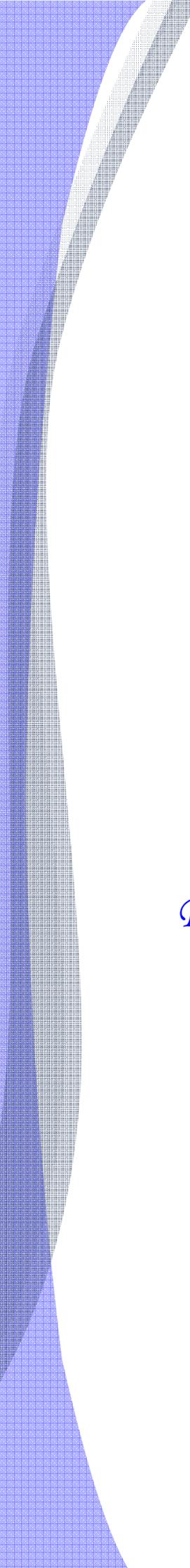
Figure72. Schéma générale.

Figure73. Balance entre angiogenèse/survie et invasion prolifération des cellules tumorales.

Figure74. Expression des intégrines α 5 β 1 et α v β 3 dans les glioblastomes.

Figure75. Corrélation inverse entre l'expression de la cavéoline-1 et l'expression de l'intégrine α 5 β 1 et du récepteur TGF β RI et l'activation des protéines ERK, Akt et Smad2.

- Tableau 1.** Extrait de la classification de l'OMS des gliomes et distribution des gliomes en France selon la classification de l'OMS.
- Tableau 2.** Syndromes familiaux associés à l'apparition d'une tumeur du SNC.
- Tableau 3.** Comparaison des classifications de l'OMS et de Daumas-Duport.
- Tableau 4.** Correspondance entre l'échelle de Karnofsky et les grades d'astrocytomes (OMS).
- Tableau 5.** Données sur les altérations génétiques dans les glioblastomes.
- Tableau 6.** Listes d'agents anti-angiogéniques en cours d'essais cliniques.
- Tableau 7.** Inhibiteurs de protéines à activité tyrosine kinase et anticorps monoclonaux.
- Tableau 8.** Différents antagonistes des intégrines décrits dans la littérature.
- Tableau 9.** Les cavéoles : une voie d'entrée pour les pathgènes dans les cellules eucaryotes.
- Tableau 10.** Les cavéoles, par l'intermédiaire de la cavéoline-1, concentrent de nombreuses protéines de la signalisation.
- Tableau 11.** Exemples de certaines protéines de signalisation régulées par la cavéoline-1.
- Tableau 12.** Liste des anticorps utilisés pour le western blot.
- Tableau 13.** Tableau des séquences des amorces utilisées pour la RT-PCR quantitative.



INTRODUCTION

PARTIE 1 :

Présentation des gliomes et des glioblastomes

Afin de mieux comprendre la complexité, les enjeux et le cadre de cette étude, l'introduction générale a été divisée en deux chapitres. Le premier vise à présenter, à décrire et à définir les tumeurs cérébrales et plus particulièrement, les gliomes. Cette présentation permettra de mieux appréhender la complexité et l'hétérogénéité de ces tumeurs ainsi que les différents axes thérapeutiques explorés ou en cours d'exploration à ce jour. Le second chapitre s'attachera à introduire la cavéoline-1 permettant ainsi de mieux comprendre pourquoi la cavéoline-1 présente un intérêt majeur dans l'étude de ces tumeurs, mais également de manière plus globale, dans le cancer (en considérant également ses différents partenaires qui jouent un rôle capital dans les processus cellulaires tumoraux).

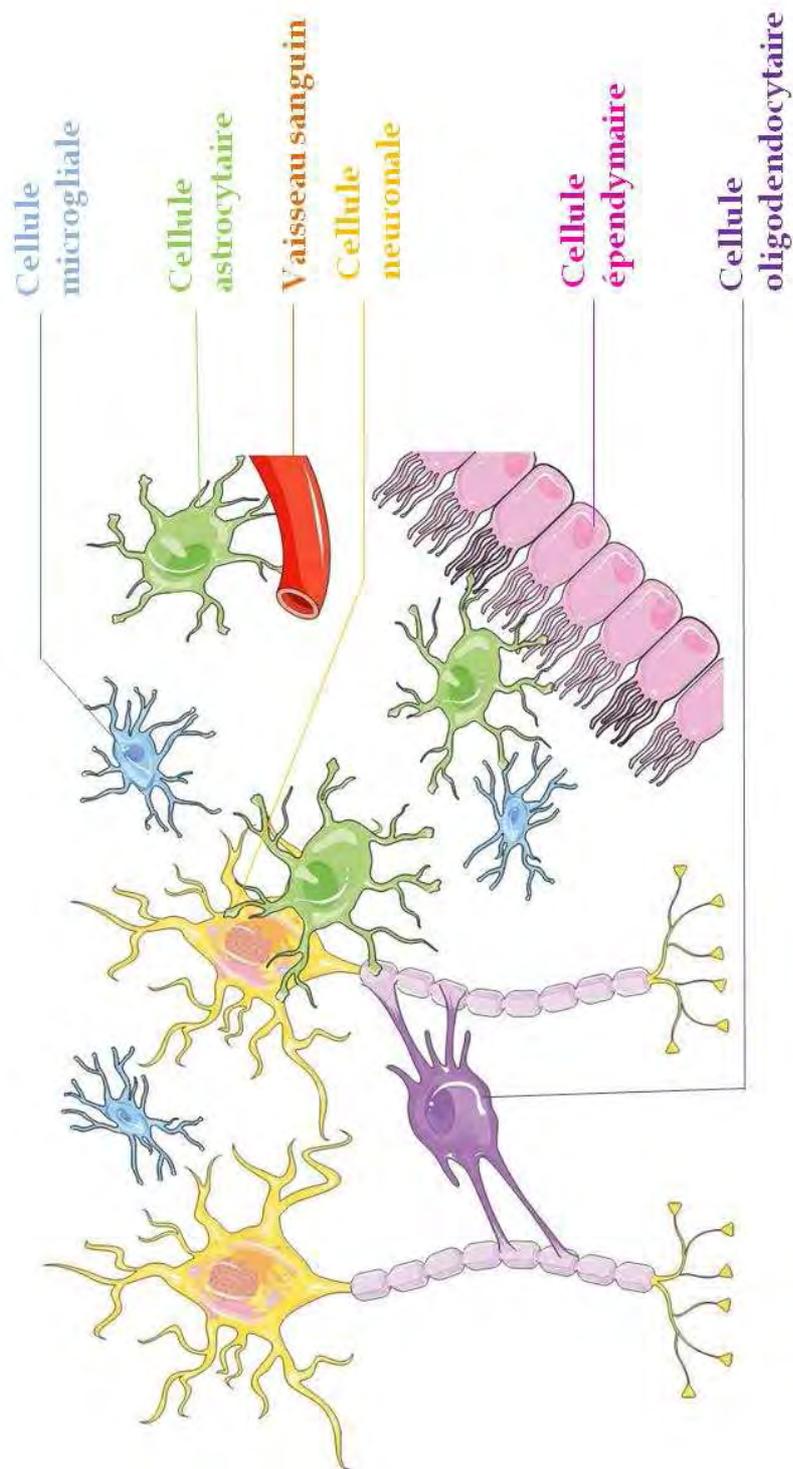


Figure1. Organisation des cellules gliales et neuronales. Adapté d'après [Servier Medical Art](#).

I/ Présentation des gliomes et des glioblastomes

I-1/ Les cellules gliales

Les cellules de soutien du SNC (Système Nerveux Central) sont appelées cellules gliales (littéralement, cellules « de colle »). Chez l'homme, les cellules gliales représentent à elles seules 90% des cellules du SNC (5 fois plus nombreuses que les neurones) et occupent environ 50% du volume du cerveau. A la différence des neurones, les cellules gliales sont toujours engagées dans le cycle cellulaire : elles alternent des phases de différenciation et de mitose. Elles assurent principalement un soutien structural et métabolique aux neurones et interviennent également dans l'émission et la transmission du signal nerveux (Ndubaku U, *Acta. Histochem.*, 2008). La glie (la « colle ») est formé de deux composants : la macroglie et la microglie. Cette dernière est constituée par les macrophages résidant au sein du SNC et représente entre 5 à 20% des cellules gliales. Contrairement aux cellules nerveuses qui dérivent du neurectoderme, les cellules microgliales dérivent du feuillet mésodermique et appartiennent, par conséquent, au système immunitaire. La macroglie est composée d'astrocytes, d'oligodendrocytes et d'épendymocytes.

Les oligodendrocytes possèdent des prolongements qui leurs permettent d'envelopper les axones des neurones. Ainsi, ces cellules ont pour principale fonction d'assurer la myélinisation des axones (Bradl M, *Acta Neuropathol*, 2010).

Dans le cadre d'une classification fonctionnelle, deux types d'astrocytes se distinguent : les astrocytes de type I et II. Les astrocytes de type I, sont en contact avec les capillaires sanguins et leurs pieds forment une barrière autour des capillaires (**Figure1**). Les astrocytes de type II entourent le neurone et la fente synaptique (évitant de ce fait la dispersion des neurotransmetteurs) (Abbott JN, *Nat Rev*, 2006). Les astrocytes sont impliqués dans de nombreuses fonctions de régulation des neurones telles que la régulation et l'optimisation de la neurotransmission synaptique (Nadkarni S, *PLoS Comp. Biol.*, 2008), la régulation de la concentration ionique, le contrôle de la neurogenèse et de la synaptogenèse (Slezak M, *Trends Neurosci.*, 2003).

Les cellules épendymaires ou épendymocytes permettent une séparation des tissus cérébraux centraux du liquide céphalo-rachidien contenu dans les ventricules (**Figure1**).

Classification de l'OMS

| | I | II | III | IV |
|-------------------------------------|---|----|-----|----|
| Astrocytic tumours | | | | |
| Subependymal giant cell astrocytoma | * | | | |
| Pilocytic astrocytoma | * | | | |
| Piloxyoid astrocytoma | | * | | |
| Diffuse astrocytoma | | * | | |
| Pleomorphic xanthoastrocytoma | | * | | |
| Anaplastic astrocytoma | | | * | |
| Glioblastoma | | | | * |
| Giant cell glioblastoma | | | | * |
| Gliosarcoma | | | | * |
| Oligodendroglial tumours | | | | |
| Oligodendroglioma | | * | | |
| Anaplastic oligodendroglioma | | | * | |
| Oligoastrocytic tumours | | | | |
| Oligoastrocytoma | | * | | |
| Anaplastic oligoastrocytoma | | | * | |
| Ependymal tumours | | | | |
| Subependymoma | * | | | |
| Myxopapillary ependymoma | * | | | |
| Ependymoma | | * | | |
| Anaplastic ependymoma | | | * | |

Distribution des gliomes En France

| Histology | N | % |
|--|--------------|------|
| Astrocytic tumors | 3,066 | 61.3 |
| Pilocytic astrocytoma | 249 | 5 |
| Subependymal giant cell astrocytoma | 13 | 0.3 |
| Fibrillary astrocytoma | 61 | 1.2 |
| Gemistocytic astrocytoma | 20 | 0.4 |
| Anaplastic astrocytoma | 140 | 2.8 |
| Glioblastoma | 2,421 | 48.3 |
| Giant cell glioblastoma | 48 | 1 |
| Gliosarcoma | 27 | 0.5 |
| Xanthoastrocytoma | 19 | 0.4 |
| all other astrocytoma | 68 | 1.4 |
| Oligodendroglial tumors | 1,061 | 21.2 |
| Oligodendroglioma | 470 | 9.4 |
| Anaplastic oligodendroglioma | 591 | 11.8 |
| Mixed gliomas | 542 | 10.8 |
| Oligoastrocytoma | 170 | 3.4 |
| Anaplastic oligoastrocytoma | 372 | 7.4 |
| Ependymomas | 273 | 5.5 |
| Myxopapillary ependymoma | 42 | 0.8 |
| Cellular, papillary and clear cell ependymomas | 18 | 0.4 |
| Anaplastic ependymoma | 52 | 1 |
| Subependymoma | 18 | 0.4 |
| all other ependymoma | 143 | 2.9 |
| All other gliomas | 68 | 1.4 |
| Total | 5,010 | |

Tableau 1. Extrait de la classification de l'OMS des gliomes (Louis DN, *Acta Neuropathol.*, 2007) et distribution des gliomes en France selon la classification de l'OMS (Bauchet L, J. *Neurooncol.*, 2007) : les données sont issues de la French Brain Tumor Data Bank (FBTDB).

| Syndrome | Gènes impliqués | Chromosomes impliqués | Tumeurs du CNS associées | Références |
|---|-------------------------------|------------------------|---|--|
| Neurofibromatose 1 | NF1 | 17q11 | Gliome optique, Astrocytome, Neurofibrome | <i>Seizinger BR, Cell, 1987</i> |
| Neurofibromatose 2 | NF2 | 22q12 | Schwannome, Méningiome, Ependymome, Astrocytome | <i>Rouleau GA, Science, 1993</i> |
| Sclérose tubéreuse (Bourneville) | TSC1, TSC2 | 9q34, 16p13 | Astrocytome subépendymaire à cellules géantes | <i>Carbonara C, Gen. Chrom. Cancer, 1996</i> |
| Rétinoblastome | RB1 | | | |
| Syndrome de Li-Fraumeri | TP53 | 17q13 | Astrocytome, Tumeurs neuroectodermale primitive | <i>Li FP, Cancer Res., 1988</i> |
| Syndrome de Turcot et hamartome multiple | APC, hMLH1, hMLH2, PMS2, PTEN | 3q21, 2p16, 7p22, 5q21 | Glioblastome, Médulloblastome | |
| von Hippel-Lindau | VHL | 3p25-26 | Hémangioblastome | <i>Latif F, Science, 1993</i> |
| Gorlin | PTCH | 9q31 | Médulloblastome | <i>Latif F, Science, 1994</i> |

Tableau 2. Syndromes familiaux associés à l'apparition d'une tumeur du SNC adapté d'après Prados MD, *CA Cancer J. Clin.*, 1998 ; Schwartzbaum JA, *Nat. Clin. Prac.*, 2006.

I-2/ Les gliomes

Le terme gliome englobe tous les types de tumeurs cérébrales ayant pour origine une cellule gliale. Les gliomes sont les tumeurs cérébrales les plus fréquentes avec une proportion de 70%. Ils se subdivisent en quatre types cellulaires et histologiques : les tumeurs astrocytaires (ou astrocytomes), qui représentent la majorité des gliomes (60 à 70%), les tumeurs oligodendrogiales (ou oligodendrogliomes) regroupant 5-30% des cas, les tumeurs épendymaires (ou épendymomes) soit environ 5% des cas et des tumeurs à composantes mixtes (oligoastrocytomes) soit 10% (Schwartzbaum JA, Nat. Clin. Prac., 2006 ; Bauchet L, J. Neurooncol., 2007) (Tableau 1). L'étiologie précise des gliomes reste encore inconnue sauf certains cas de tumeurs radio-induites ou des formes génétiques rares bien identifiées (Ohgaki A, Acta Neuropathol., 2005 ; Schwartzbaum JA, Nat. Clin. Prac., 2006) (Tableau 2). Bien que leur pourcentage reste faible (5% de l'ensemble des tumeurs solides chez l'adulte et 20% chez les enfants), les tumeurs cérébrales présentent un intérêt majeur car elles montrent un taux de mortalité et de morbidité élevé (Davis FG, Neoplasms., 2000). L'incidence des gliomes est légèrement plus élevée chez l'homme que chez la femme. La gradation de la malignité de ces tumeurs a longtemps fait appel à différents critères histologiques et cytologiques (Louis DN, Acta Neuropathol., 2007). Ainsi, la classification des gliomes (Tableau 1) proposée par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) établit les différents types de tumeurs d'origine gliale (astrocytomes, oligodendrogliomes, oligoastrocytomes et épendymomes) et leurs grades de malignité (de I à IV, du bénin au plus malin).

I-3/ Classification des astrocytomes

La classification histologique des tumeurs astrocytaires comprend différents critères tels que les atypies histologiques, l'anaplasie, l'activité mitotique, la prolifération micro-vasculaire et la nécrose (Figure2).

I-3-1/ Astrocytomes de bas grade (OMS : grade I et II)

Le grade I va ainsi regrouper les astrocytomes pilocytiques de même que les astrocytomes subépendymaires à cellules géantes (Louis DN, Acta Neuropathol., 2007) (Tableau 1).

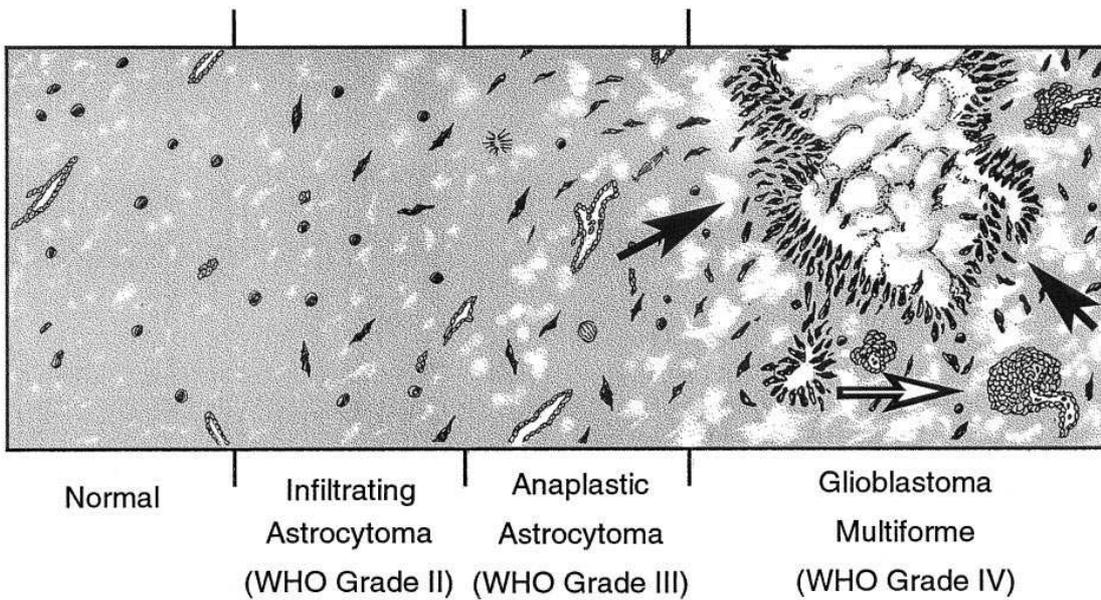


Figure 2. Evolution histopathologique des astrocytomes (Brat DJ, *Am. J. of Pathol.*, 2001). Les flèches noires indiquent des régions nécrotiques avec cellules pseudo-palisadiques alors que les blanches montrent des proliférations vasculaires gloméruloïdes.

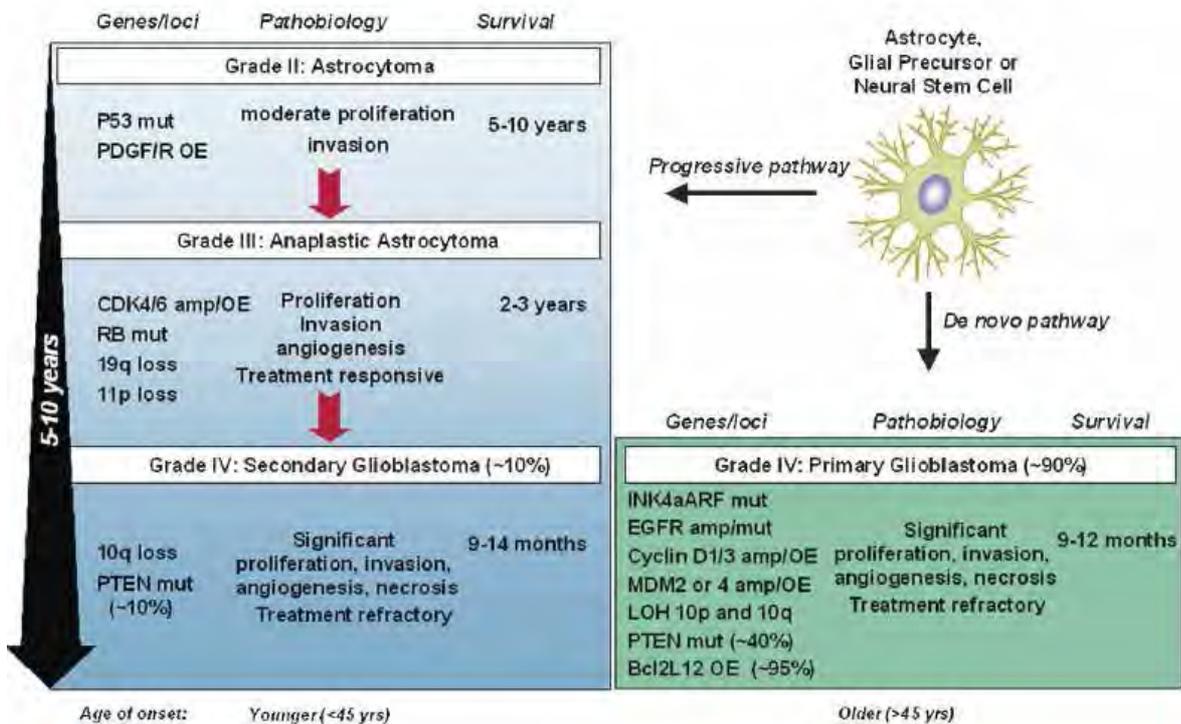


Figure 3. Aberrations génétiques impliquées dans la genèse des glioblastomes (Furnari F, *Genes & Dev.*, 2007). Les glioblastomes secondaires (en bleu) sont issus de la progression maligne d'un astrocytome de bas grade alors que le glioblastome primaire (en vert) apparaît *de novo*.

Ces tumeurs, très polymorphes, présentent une croissance lente et une localisation relativement circonscrite ; elles se développent majoritairement chez l'enfant et sont associées à un bon pronostic. L'astrocytome fibrillaire (ou astrocytome diffus, grade II) est le plus fréquemment rencontré au niveau des astrocytomes de bas grade (**Tableau 1**) ; il est associé à une survie de 5 à 10 ans environ. Ces tumeurs montrent une densité cellulaire faible avec la présence d'atypies cellulaires et nucléaires (**Figure2**).

I-3-2/ Astrocytomes de haut grade (OMS : grade III et IV)

Les $\frac{3}{4}$ des astrocytomes sont des tumeurs de haut grade : astrocytome anaplasique et glioblastome (GBM) (**Tableau 1**). L'astrocytome anaplasique se caractérise par une densité cellulaire élevée, des atypies cellulaires évidentes et de nombreuses mitoses ([Louis DN, Acta Neuropathol., 2007](#)). Ces tumeurs montrent des caractères diffus et infiltrant ne permettant pas une résection chirurgicale totale avec une survie de 2 à 3 ans. Les astrocytomes anaplasiques peuvent également être considérés comme une étape dans la progression tumorale entre le grade II et le glioblastome nommé, dans ce cas, glioblastome secondaire (**Figure3**). En effet, le glioblastome peut être issu de la progression maligne d'un astrocytome de bas grade ou il peut apparaître *de novo* : il est alors nommé glioblastome primaire. Glioblastomes secondaire et primaire se différencient donc de par leur origine mais aussi de par leurs caractéristiques moléculaires ([Furnari B, Genes & Dev., 2007](#) ; [Kheihues P, Neurooncol., 1999](#)) (**Figure3**).

Le glioblastome se démarque des astrocytomes anaplasiques par des proliférations vasculaires gloméruloïdes et/ou des nécroses en forme de guirlande (**Figure2**). En effet, la transition entre astrocytome anaplasique et glioblastome est marquée par l'apparition de ces deux caractéristiques majeures ([Louis DN, Acta Neuropathol., 2007](#) ; [Brat DJ, Am. J. Pathol., 2001](#)). Les glioblastomes primaires représentent la majorité des glioblastomes avec environ 90% des cas (**Figure3**). Ceux-ci surviennent avec une incidence plus importante chez les hommes (environ 1,4) par rapport au glioblastome secondaire où l'incidence est relativement équivalente entre les deux sexes. Les glioblastomes primaires et secondaires se distinguent donc non seulement sur le plan génétique mais également sur le plan clinique.

| | ASTROCYTOMES | OLIGODENDROGLIOMES | EPENDYMOMES |
|-------------------------------------|--|--|--|
| | <p>Atypies nucléaires</p> <p>Mitoses</p> <p>Nécrose</p> <p>CRITERES</p> <p>Prolifération endothélio-capillaire</p> | <p>Atypies nucléaires</p> <p>Mitoses, Nécrose</p> <p>Densité cellulaire, Hyperplasie vasculaire</p> <p>CRITERES</p> <p>Densité cellulaire, Hyperplasie vasculaire</p> <p>Prolifération endothélio-capillaire</p> | <p>Mitoses</p> <p>Nécrose</p> <p>Densité cellulaire</p> <p>Prolifération endothélio-capillaire</p> <p>CRITERES</p> |
| Classification de l'OMS | <p>Grade II: Atypies nucléaires discrètes</p> <p>Grade III: Atypies importantes avec mitoses</p> <p>Grade IV: Critères grade III + nécrose et/ou prolifération endothélio-capillaire</p> | <p>Grade II: Cellularité modérée, Atypies nucléaires discrètes nombreuses, ± nécroses, ± ou modérées</p> <p>Grade III: Cellularité importante, Atypies marquées, mitoses nombreuses, ± nécroses, ± prolifération endothélio-capillaire</p> | <p>Grade II: Densité cellulaire faible à modérée, pas de nécrose ni mitose</p> <p>Grade III: Grande cellularité, nombreuses mitoses ± prolifération endothélio-capillaire et nécrose</p> |
| Classification Daumas-Duport | <p>Glioblastome: astrocytomes de haut grade, dépourvus de différenciation oligodendrogliale évidente, structure mixte solide et infiltrante et angiogenèse, œdème péritumoral aspect en doigt de gant, prise de contraste en anneau</p> | <p>Grade A: Pas d'hyperplasie ni prise de contraste à l'IRM</p> <p>Grade B: Hyperplasie vasculaire et/ou prise de contraste à l'IRM</p> | |

Tableau 3. Comparaison des classifications de l'OMS et de Daumas-Duport. D'après Daumas-Duport C, J. Neuro-oncol., 1997 et Louis DN, Acta Neuropathol., 2007.

En effet, les glioblastomes secondaires sont associés à un meilleur pronostic que celui des glioblastomes primaires avec un âge médian plus faible (<45 ans) pour les patients atteints de glioblastome secondaire (**Figure3**) (Louis DN, *Acta Neuropathol.*, 2007 ; Furnari B, *Genes & Dev.*, 2007).

I-3-3/ Classification de Sainte-Anne (Daumas-Duport)

D'autres classifications des gliomes existent même si celle de l'OMS est la plus communément admise (**Figure4**) (Figarella-Branger D, *Rev. Neurol.*, 2008). En effet, malgré plusieurs évolutions (**Figure4**), la classification de l'OMS souffre encore de différentes lacunes : un manque de reproductibilité (Mittler MA, *J. Neurosurg.*, 1996 *abst*) et de distinction entre cellules tumorales et parenchyme résiduel infiltré. De plus, cette classification ne tient pas compte de l'hétérogénéité tumorale, des données cliniques et de l'imagerie. Ainsi, la classification de Daumas-Duport (classification française) ou classification de Sainte-Anne inclut de nouveaux critères (densité cellulaire, hyperplasie vasculaire, prise de contraste à l'IRM) par rapport à la classification de l'OMS (Daumas-Duport C, *J. Neuro-oncol.*, 1997). Elle a été établie sur la base des données obtenues par l'imagerie, les données cliniques et l'histologie (**Tableau 3**). Elle distingue trois catégories de gliomes infiltrants : les oligodendrogliomes ou oligo-astrocytomes de type A ou de type B et les glioblastomes (les tumeurs glioneurales malignes ont récemment été intégrées à cette classification) (Varlet P, *Neurosurg.*, 2004). Il est à noter que la classification de Sainte-Anne ne reconnaît pas l'astrocytome anaplasique ou l'astrocytome diffus. Dans cette classification, la définition de glioblastome est restreinte et ne s'applique qu'aux gliomes de haut grade sans différenciation oligodendrogliale patente. Les oligodendrogliomes sont ici composés de cellules tumorales arrondies à noyaux réguliers, à cytoplasmes clarifiés avec un aspect caractéristique dit en « nid d'abeille ». Ils comportent généralement des zones microkystiques, des calcifications et leurs vascularisations sont représentées par un réseau dense de capillaires fins et branchés (Varlet P, *Neurosurg.*, 2004). Néanmoins, cette classification n'est pas reconnue par la communauté internationale car elle souffre également du manque de reproductibilité avec des problèmes de corrélation par rapport aux données moléculaires (Figarella-Branger D, *Rev. Neurol.*, 2008).

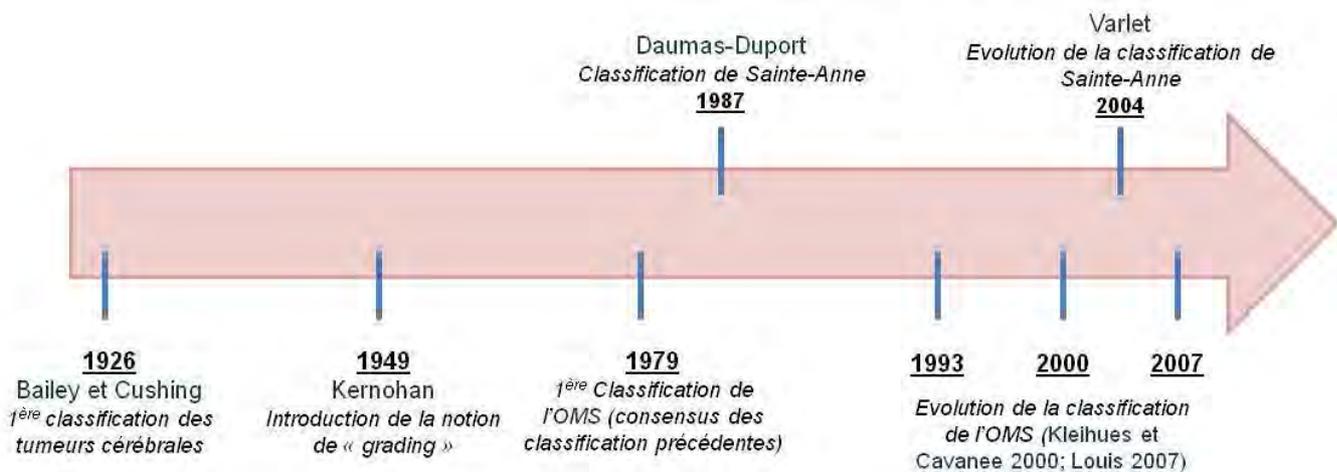


Figure 4. Evolution de la classification des tumeurs cérébrales adaptée selon Figarella-Branger D, Rev. Neurol., 2008.

| Grade (OMS) | KARNOSKY | DESCRIPTIONS |
|-------------|----------|---|
| 1 | 100 | Asymptomatique. Activité normale |
| 2 | 80-90 | Symptomatique mais ambulatoire |
| 3 | 60-70 | Alité moins de 50% du temps. Assistance minimale |
| 3 / 4 | 40-50 | Alité plus de 50% du temps. Assistance importante |
| 4 | 20-30 | Confiné au lit. Assistance complète |
| | 10 | Moribond |

Tableau 4. Correspondance entre l'échelle de Karnofsky et les grades d'astrocytomes (OMS). D'après Philippon J, Masson, 2004.

I-4/Prise en charge thérapeutique des glioblastomes

Dans les glioblastomes, un pronostic favorable inclut un jeune âge, un bon score KPS (Karnofsky performance status ; **Tableau 4**), l'absence de nécrose extensive et une faible tumeur résiduelle (si excérèse chirurgicale). Ce pronostic et, de manière plus large, la prise en charge thérapeutique, tendent désormais à prendre en compte des données moléculaires qui apparaissent tout à fait pertinentes.

I-4-1/Exérèse chirurgicale

Les glioblastomes se caractérisent souvent par des crises d'épilepsie, un déficit neurologique et une hypertension intracrânienne. Dans la majorité des cas, les glioblastomes ont une distribution cortico-sous-corticale étendue jusqu'à la paroi ventriculaire avec deux aspects topographiques assez spécifiques : en « pince de crabe » ou en « aile de papillon » (**Figure5**) ([Philippon J, Masson, 2004](#)). La chirurgie permet, lorsqu'elle est praticable, d'améliorer l'état neurologique général des patients. L'amélioration symptomatique immédiate obtenue suite à la chirurgie se traduit par une réduction de la pression intracrânienne et par une diminution de la fréquence des crises du patient. La baisse de la mortalité (inférieure à 5%) est due aux progrès de techniques en anesthésie et en chirurgie (neuronavigation, IRM per-opératoire...) ([Stupp A, New Engl. J. Med., 2005](#); [Louis DN, Acta Neuropathol., 2007](#)).

I-4-2/Un protocole standardisé

Suite à l'étude multicentrique réalisée de manière conjointe par l'Organisation Européenne pour la Recherche et le Traitement du Cancer (EORTC) et l'Institut National du Cancer Canadien (NCIC), la prise en charge des patients de moins de 70 ans atteints de glioblastome est à ce jour bien codifiée et appliquée ([Stupp A, New Engl. J. Med., 2005](#)). Cette étude a permis de mettre en évidence la supériorité du traitement associant radiothérapie et chimiothérapie (adjuvante et concomitante au témozolomide (TMZ)) en comparaison du traitement basé uniquement sur de la radiothérapie. 573 patients ont été inclus dans cette étude qui a regroupé près de 85 institutions et 15 pays. Les patients ont été séparés en deux groupes de 286 (radiothérapie seule) et 287 personnes (radiothérapie plus TMZ).

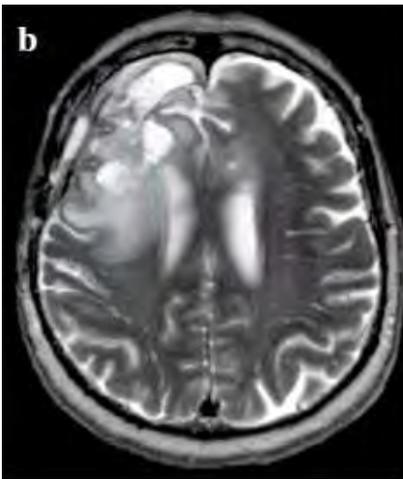


Figure 5. Aspects topographiques des glioblastomes. Glioblastome en forme de papillon (Ananthnarayan S, J. Neurooncol., 2008).

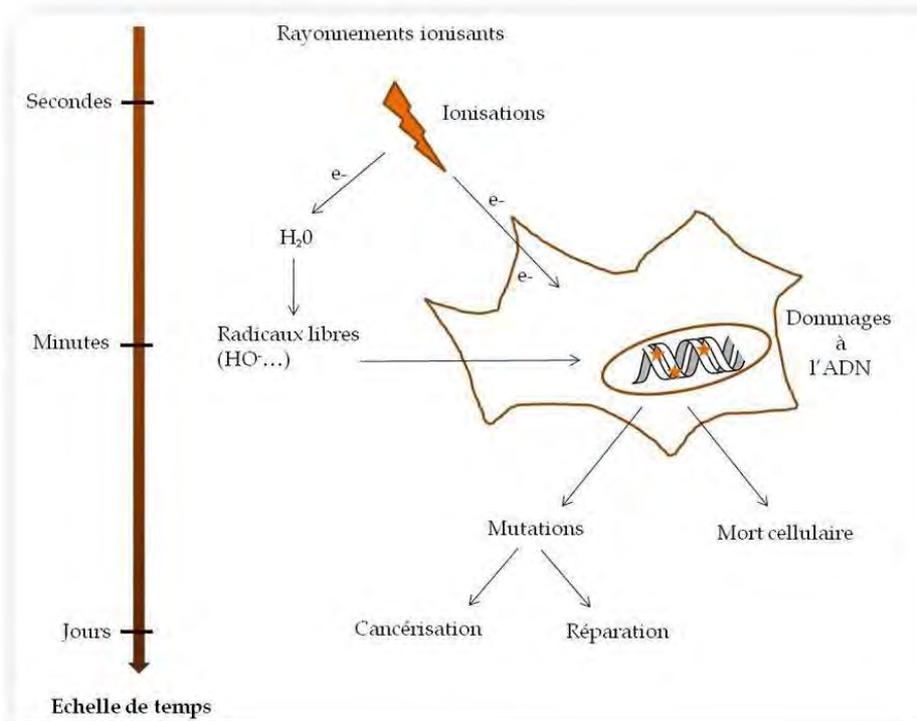


Figure 6. Action des rayonnements ionisants sur les cellules en fonction du temps. Les rayonnements ionisants peuvent avoir une action directe sur les cellules en induisant des dommages à l'ADN ou, grâce à l'action de l'oxygène, en produisant des radicaux libres.

28 mois après le début de l'étude, la médiane de survie des patients sous radiothérapie seule était de 12,1 mois alors que celle des patients sous radiothérapie plus témozolomide était de 14,6 mois. Une exérèse chirurgicale a été pratiquée dans 84% des cas et l'administration de corticostéroïdes (permet une diminution de la pression intracrânienne, augmenterait la clairance de l'œdème cérébral) a été un peu plus usitée dans le groupe de patients sous radiothérapie seule (Stupp A, *New Engl. J. Med.*, 2005). Cette étude a ainsi permis de proposer un protocole standardisé de la prise en charge thérapeutique actuelle des patients atteints de glioblastome basée sur l'association de la radiothérapie et de la chimiothérapie.

I-4-3/La radiothérapie

Différents types de rayonnements peuvent être utilisés en radiothérapie (les neutrons, les photons, les protons et les électrons); chacun possède des propriétés différentes et, par conséquent, des indications diverses (l'unité de dose est le gray, Gy). La radiothérapie est une technique basée sur l'utilisation de rayonnements ionisants : un rayonnement est dit ionisant s'il transporte une énergie suffisante pour ioniser une molécule organique. Le but d'une irradiation est toujours double : d'une part, l'élimination des cellules cancéreuses et d'autre part la préservation des cellules saines avoisinantes. La mise en œuvre de cette irradiation est réalisée par le positionnement de faisceaux irradiants autour du patient (Philippon J, *Masson*, 2004).

L'étude réalisée par Stupp propose également le schéma de référence pour la radiothérapie qui est réalisée à la dose de 60 Gy en six semaines à raison de 30 à 35 fractions de 1,8 à 2 Gy (**Figure6**). Les glioblastomes correspondent à des tumeurs dites radio-résistantes. D'ailleurs, un grand nombre de facteurs impacte directement sur la radio-sensibilité d'une tumeur :

-  L'oxygénation représente un facteur critique puisqu'elle augmente l'effet des rayonnements au niveau cellulaire car l'oxygène se combine aux radicaux libres pour former des peroxydes très actifs.
-  De même, les cellules en phase S du cycle cellulaire sont peu sensibles aux rayonnements contrairement aux cellules en phases G2 et M.

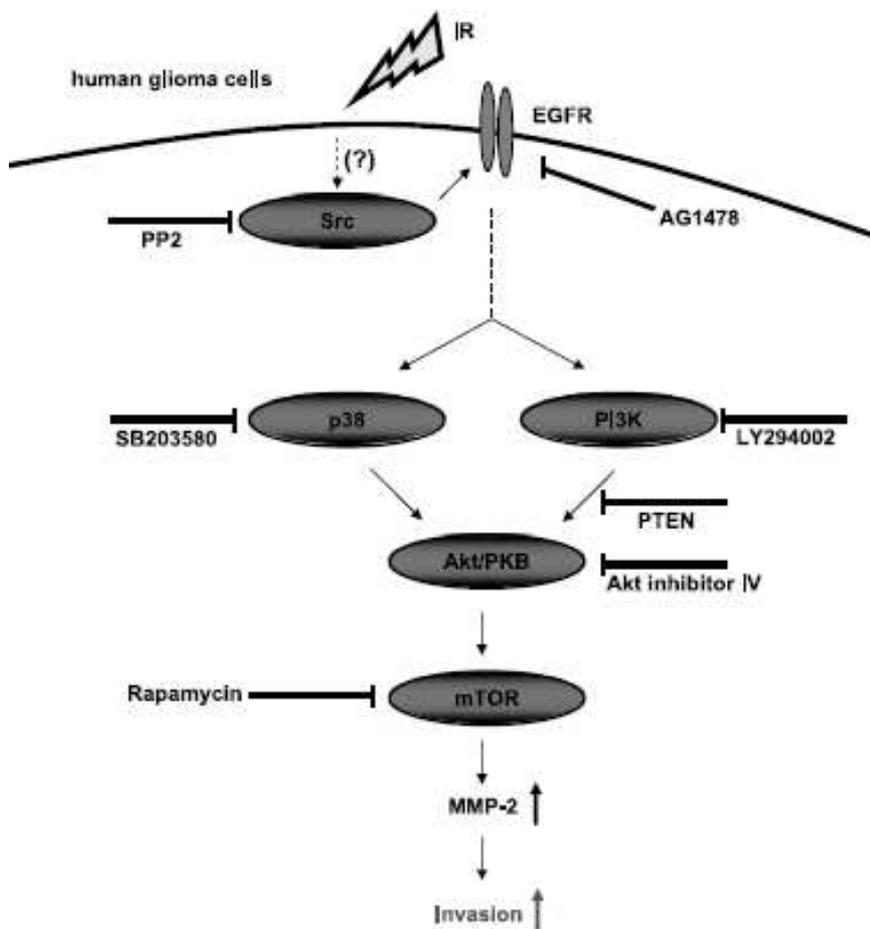


Figure 7. Modèle proposé par Park des voies de signalisation impliquées dans l'invasion cellulaire induite par des rayonnements ionisants (Park CM, *Cancer Res.*, 2006).

Malgré un bénéfice certain, la radiothérapie (Keime-Guibert F, *New Eng. J. Med.*, 2007) a des effets pervers. Les complications propres à l'utilisation de la radiothérapie sont nombreuses telles que les radionécroses, la démyélinisation, l'augmentation transitoire de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHE). De plus, l'étude de Wild-Bode a mis en évidence une augmentation dose dépendante de la migration et de l'invasion des cellules de glioblastome suite à une irradiation (Wild-Bode C, *Cancer Res.*, 2001). De même, l'étude réalisée par Zhai et ses collaborateurs rapporte une augmentation du potentiel invasif des cellules de glioblastome via l'activation de la voie Rho par des RTKs (tels que l'EGFR et IGFR1) suite à une exposition à des radiations (Zhai GG, *J. Neurooncol.*, 2006). Les expériences montrent que des cellules de glioblastome irradiées, proliférant dans un milieu sans sérum, voient leur sécrétion d'IGF1 augmenter (de 10 à 50µM). De plus, l'invasion des cellules de glioblastome augmente de manière dose dépendante sous IGF1. Néanmoins, en absence d'irradiation, les cellules perdent cette capacité d'invasion en présence d'IGF1. L'invasion des cellules irradiées est bloquée grâce à l'inhibition de l'IGFR1 (*insulin-like growth factor receptor*) ou à l'inhibition de l'EGFR (*epidermal growth factor receptor*) alors que l'inhibition des métalloprotéases (MMPs) et d'uPA (*urokinase type plasminogen activator*) n'a aucun effet sur leur capacité d'invasion (Zhai GG, *J. Neurooncol.*, 2006). Les auteurs mettent également en évidence une activation de la PI3K, de AKt et de ERK1/2 dans les cellules irradiées. Ils montrent que l'activation de la voie Rho (activation de RhoA et Rac1) par les RTK (récepteurs à activité tyrosine kinase) passe par la PI3K. Au contraire, l'étude réalisée par Park et ses collaborateurs montrent que les rayonnements ionisants augmentent l'invasion des cellules de glioblastomes ayant un gène PTEN muté par l'intermédiaire de l'augmentation de l'activité du promoteur de la MMP-2, de sa transcription et de sa sécrétion (Park CM, *Cancer Res.*, 2006). L'irradiation mène à l'activation de la PI3K, d'AKt et de m-tor (*mamalian target of rapamycin*). L'inhibition de l'activation de la protéine AKt (qui mène à la sécrétion de la MMP-2) est réalisée de différentes manières : utilisation d'inhibiteurs de l'EGFR (AG490 et AG1478) ou d'anticorps bloquants, un inhibiteur de Src (PP2), de p38 (SB203580) ou par la transfection de dominant négatif (DN), DN-Src et DN-p38 (Figure7).

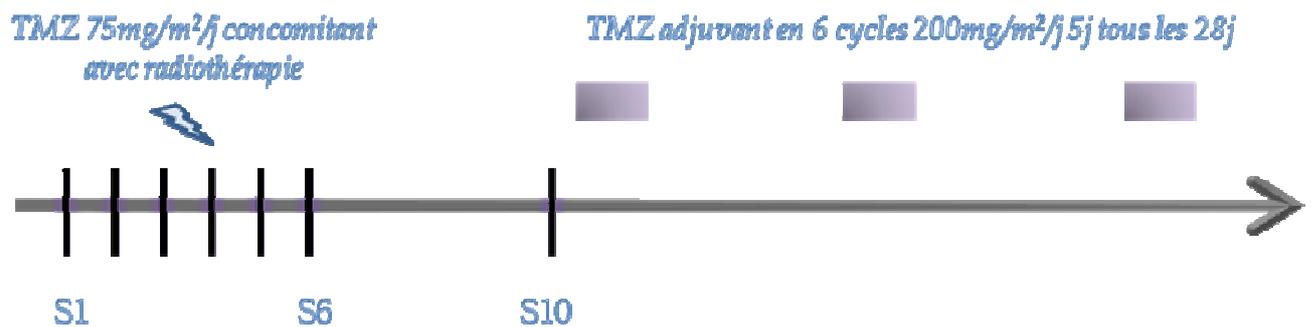


Figure 8. Schéma de référence de la prise en charge thérapeutique des glioblastomes rapporté par [Stupp A, New Engl. J. Med., 2005](#). S : semaine, la radiothérapie focalisée se décline en 30 fois 2Gy, 5j (j : jour) sur 7j sur 6 à 7 semaines. Une exérèse chirurgicale a pu être réalisée au préalable.

L'ensemble de ces données révèle le mode d'action des rayonnements ionisants sur l'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt induisant également une radiorésistance (Li HF, *Radiat. Oncol.*, 2009). De plus, ces différentes études soulignent l'importance de l'hétérogénéité moléculaire des cellules cancéreuses puisque différentes voies de signalisation (voie Rho ou voie des MMPs) peuvent être sollicitée pour un même processus cellulaire (l'invasion cellulaire).

I-4-4/La chimiothérapie

Les nitrosourées, telle que la carmusine (BCNU) et la lomustine (CCNU), ont longtemps constitué le traitement chimiothérapeutique de première intention dans les gliomes de haut grade en complément de la radiothérapie (Prados MD, *J. Clin. Oncol.*, 1999) et leur utilisation reste d'actualité. Le traitement chimiothérapeutique des glioblastomes s'appuie sur différentes molécules dont le témozolomide (TMZ) qui est rapidement devenu le traitement de première ligne des glioblastomes (Figure 8). Des données récentes ont pu confirmer la supériorité du TMZ sur ce type d'agents cytotoxiques (Vinjamuri N, *J. Neurooncol.*, 2009). Le BCNU, le CCNU et la procarbazine sont des agents alkylants qui inhibent la synthèse de l'ADN par l'ajout de groupement alkyl en position O⁶ de la guanine. Le témozolomide (TMZ, Temodar®, Schering-Plough) est également un agent alkylant, de la classe des imidazotétrazines, qui inhibe la synthèse d'ADN par l'ajout d'un groupement méthyl. La cytotoxicité est la conséquence du transfert de cet adduit O⁶-méthylguanine sur l'ADN (Friedman HS, *Clin. Cancer Res.*, 2000). Cet adduit est à l'origine d'un appariement aberrant des bases lors de la réplication de l'ADN ainsi méthylé entraînant une cassure du brin d'ADN puis une mort cellulaire par apoptose (Newlands ES, *Cancer Treat. Rev.*, 1997). L'apoptose induite par le TMZ fait suite à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G₂/M (Hirose Y, *Cancer Res.*, 2001), c'est-à-dire lorsque les cellules sont plus sensibles aux radiations ionisantes. Le TMZ est une molécule lipophile qui passe efficacement la BHE et qui présente une toxicité moins importante par rapport aux autres agents chimiothérapeutiques. La chimiothérapie basée sur le TMZ, suivant l'étude de Stupp, est réalisée dans le cadre d'un traitement radio-chimiothérapeutique concomitant et adjuvant avec du TMZ (75mg/m² en 6 semaines de radiothérapie, puis 150-200 mg/m² en six semaines).

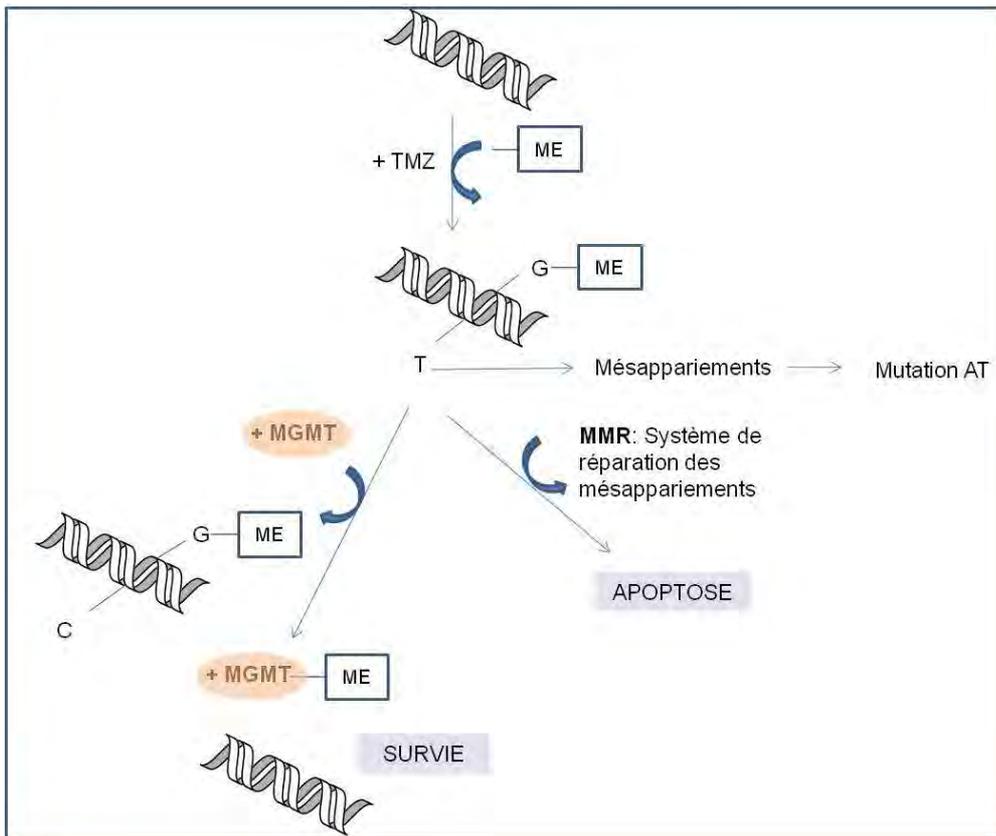


Figure 9. Mécanismes d'action du TMZ et de la MGMT. L'adduit O⁶-methylguanin généré par le TMZ sur l'ADN induit une erreur d'appariement, donc lors des réplifications suivantes, le système MMR est activé de manière répétitive ce qui déclenche l'apoptose. En présence de MGMT, cet adduit est éliminé par l'enzyme suicide.

| | Primary glioblastoma | Secondary glioblastoma |
|-------------------------------|---|---|
| Clinical onset | de novo | secondary |
| Preoperative clinical history | 1.7 months (Watanabe et al., 1996) | 53 months from low-grade astrocytoma (Watanabe et al., 1996) 25 months from anaplastic astrocytoma (Watanabe et al., 1996) |
| Sex ratio (M/W) | 1.4 (Watanabe et al., 1996) | 0.8 (Watanabe et al., 1996) |
| Age at diagnosis (years) | 55 (Watanabe et al., 1996) 56 ^a (von Deimling et al., 1993) | 39 (Watanabe et al., 1996) 41 ^b (von Deimling et al., 1993) |
| <i>p53</i> mutation | 2/19 (11%) (Watanabe et al., 1996) | 20/30 (67%) (Watanabe et al., 1996) |
| <i>MDM2</i> amplification | 2/29 (7%) (Biernat et al., 1997a) 6/75 ^c (8%) (Reifenberger et al., 1993) | 0/27 (0%) (Biernat et al., 1997a) |
| <i>EGFR</i> amplification | 11/28 (39%) (Tohma et al., 1998) | 0/22 (0%) (Tohma et al., 1998) |
| <i>p16</i> deletion | 10/28 (36%) (Biernat et al., 1997b) | 1/23 (4%) (Biernat et al., 1997b) |
| <i>PTEN</i> mutation | 9/28 (32%) (Tohma et al., 1998) | 1/25 (4%) (Tohma et al., 1998) |

Tableau 5. Données sur les altérations génétiques dans les glioblastomes répertoriées d'après Kleihues P, Neurooncol., 1999.

L'action cytotoxique du TMZ peut être contrecarrée par l'enzyme de réparation O⁶-alkylguanine DNA (AGT), également appelée O⁶-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT), qui répare les adduits O⁶-methylguanine transférés sur l'ADN par le TMZ. Une molécule de MGMT est nécessaire pour éliminer un adduit (**Figure9**).

I-4-5/ Marqueurs moléculaires

Comme nous l'avons précisé dans le sous chapitre « astrocytomes de haut grade », différentes altérations génétiques sont dénombrées au sein des glioblastomes ([Kleihues P, Neurooncol., 1999](#)) (**Tableau 5**). Les premières altérations décrites dans les tumeurs astrocytaires correspondent à l'amplification du proto-oncogène EGFR et à l'altération du suppresseur de tumeurs p53. Ces deux altérations sont rarement retrouvées dans les mêmes tumeurs ([Yoon KS, J. Korean Med. Sci., 2001](#)) suggérant des voies de tumorigenèse différentes.

D'un point de vue génétique, les glioblastomes primaires se distinguent par une amplification (>40% des cas) ou une surexpression (>60%) de l'oncogène EGFR (**Tableau 5**) ([Leenstra S, Br. J. Cancer, 1994](#) ; [Yoon KS, J. Korean Med. Sci., 2001](#)) fréquemment associée à l'expression du récepteur mutant EGFR^{vIII}. Ce mutant résulte de la délétion de 801 paires de bases dans la séquence codante du transcrit EGFR ([Wong AJ, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992](#)) et son rôle dans la tumorigénicité a été clairement démontré ([Nishikawa R, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994](#) ; [Wikstrand CJ, Cancer Res, 1997](#)). La protéine est détectée dans près de 60% des glioblastomes et environ 20% des astrocytomes anaplasiques. Une perte d'INK4a/ARF, nommé CDKN2a, ([Hegi M, Int. J. Cancer, 1997](#)) est observée ainsi qu'une amplification ou une sur-expression de MDM2 ([Reifenberger G, Cancer Res., 1993](#)) (**Tableau 5**). Les altérations génétiques conduisant à ce type de tumeurs incluent également une perte du chromosome 10 ([Leenstra S, Br. J. Cancer, 1994](#)) qui induit une délétion du gène PTEN qui peut également être muté ([Liu W, Cancer Res., 1997](#)) ainsi qu'une délétion de p16 ([Hegi M, Int. J. Cancer, 1997](#)) (**Tableau 5**). La perte de fonction de PTEN associée aux RTKs induit une activation de la protéine PI3K responsable de l'activation de la protéine AKt (qui joue un rôle important dans le développement et la progression tumorale).

Dans les glioblastomes secondaires, les caractéristiques génétiques présentes dans les astrocytomes de grade II et III seront retrouvées. Ainsi, la mutation de TP53 (Yoon KS, J. Korean Med. Sci., 2001 ; Nozaki M, Neurooncol., 1999) et la perte d'hétérozygotie au niveau du chromosome 17 seront retrouvées dans la majorité des cas (60%) associées à une surexpression du récepteur PDGFR- α (Hermanson M, Cancer Res., 1996) (Tableau 5). Le locus CDKN2A localisé en 9p21 code d'une part p16^{INK4} et p14^{ARF} d'autre part. Le produit de p14^{ARF} inhibe MDM2 qui à son tour inactive p53. Inversement, p53 régule négativement p14^{ARF}. La perte de fonction de p53 peut être la conséquence de différents phénomènes : une altération du gène TP53 (localisé en 17p13.1), une mutation ou une amplification de MDM2 ou encore d'une perte de p14^{ARF} (délétion homozygote du gène ou méthylation). p16^{INK4} est l'autre produit du gène CDKN2A codant la protéine p16. Cette dernière inhibe le complexe CDK4/cycline D1 qui ne peut alors phosphoryler Rb. L'altération de cette voie dans les gliomes est consécutive à la délétion de p16^{INK4A}, d'une mutation de Rb ou d'une amplification de CDK4. Ces altérations conduisent toutes à la perte de contrôle du cycle cellulaire en G₁/S.

Bien que très instructif, ce type d'approche ne permet qu'une caractérisation moléculaire de ces tumeurs. L'étape suivante était donc de trouver d'autres marqueurs moléculaires permettant de prédire l'évolution tumorale ou de pronostiquer la réponse au traitement. De plus, malgré les efforts constants réalisés dans le domaine, la classification des gliomes demeure contestée et contestable à cause de son manque de reproductibilité. Dans ce contexte, de nombreuses équipes se sont attachées à caractériser ces tumeurs selon des approches plus poussées et plus intégrées qui ont permis de relier des marqueurs moléculaires à la survie des patients, à un grade tumorale mais aussi à un type de réponse aux traitements.

I-4-6/Hétérogénéité moléculaire intra-tumorale ou inter-tumorale

I-4-6a/Pronostic de la progression tumorale et de la survie

De nombreuses études ont pu mettre en évidence une forte hétérogénéité entre les différents types de glioblastomes primaire et secondaire.

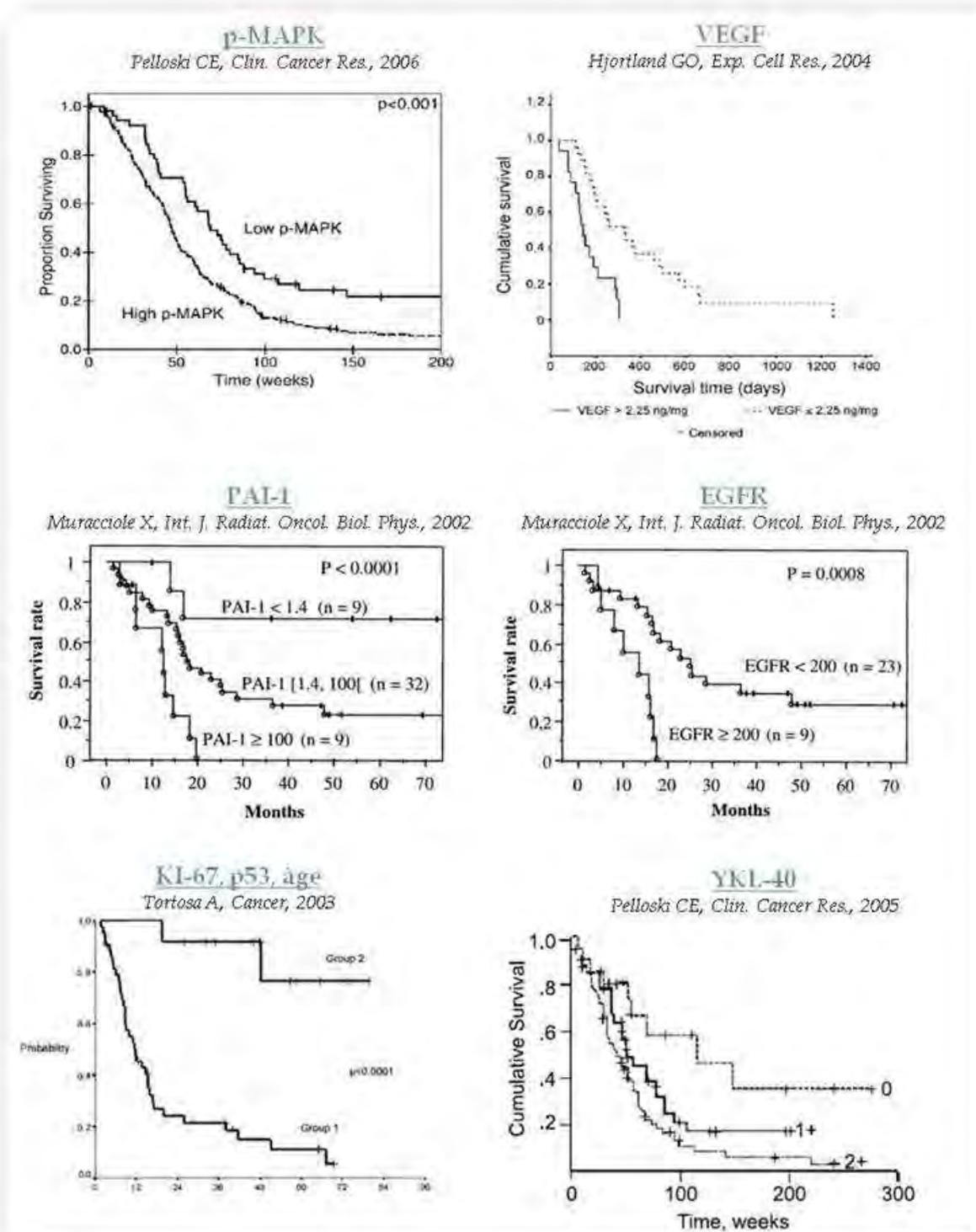
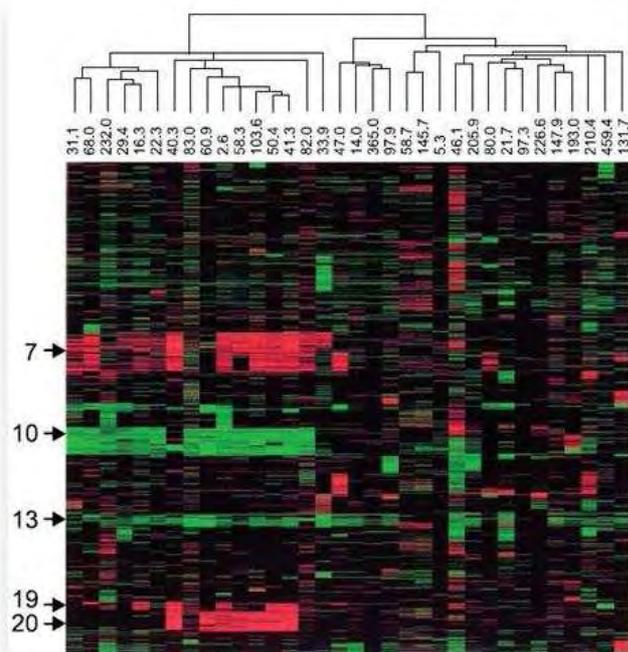


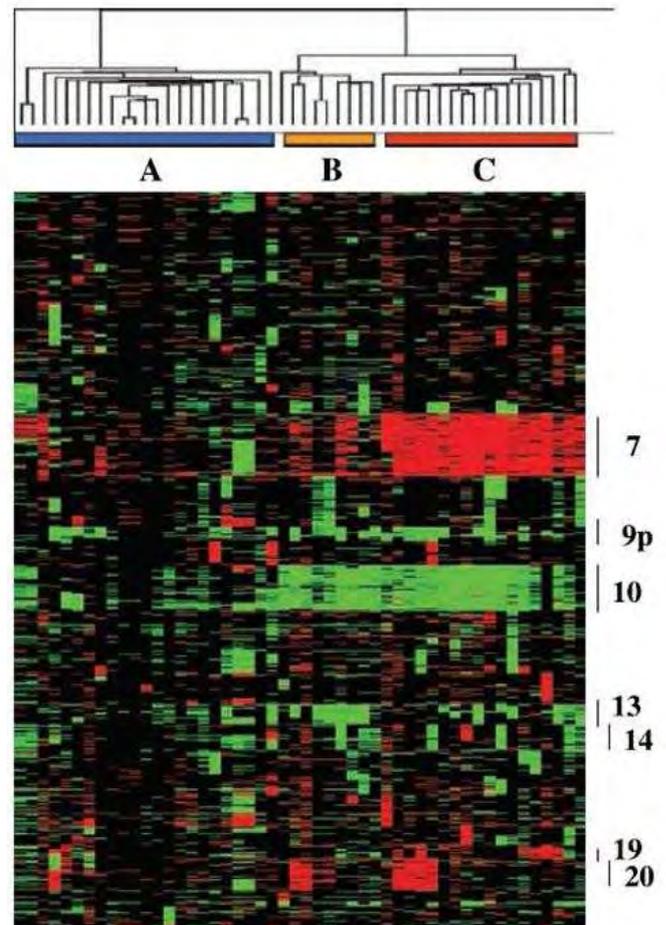
Figure 10. Exemples de marqueurs de mauvais pronostic dans les gliomes. De manière générale, la sur-expression des protéines (VEGF, PAI-1, EGFR, p53 ou YKL-40) ainsi que l'hyperphosphorylation des protéines (p-MAPK) sont associées à une diminution de la survie des patients.

Une forte hétérogénéité entre les patients ayant le même type de glioblastome, primaire ou secondaire, a également été mise en évidence. Différentes études basées sur l'analyse de l'expression d'un ou de plusieurs gènes avaient initialement mis en évidence des facteurs de mauvais pronostic. Murraciale et ses collaborateurs ont ainsi pu corrélérer la sur-expression de PAI-1 et du récepteur EGFR à un facteur de mauvais pronostic associé à une diminution de la survie des patients atteints de gliome de haut-grade ([Muracciale X, Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 2002](#)) (**Figure10**). Pour Hortland, c'est la sur-expression du VEGF qui est un facteur de mauvais pronostic ([Hortland GO, Exp. Cell Res., 2004](#)) alors que Tortosa et ses collègues associent l'index de prolifération (expression de KI-67 qui est également corrélée à une sur-expression de p53) à une meilleure survie des patients ([Tortosa A, Cancer, 2003](#)). La sur-expression d'autres protéines a également été associée à un facteur de mauvais ou de bon pronostic (PTEN, MDM2, PDGFA...). Il en va de même pour l'âge des patients et leur score KPS (**Figure10**). Bien que l'analyse de l'expression de ces gènes ait fourni certaines informations, de plus en plus d'études s'orientent aujourd'hui vers des profils moléculaires basés sur un degré beaucoup plus important de gènes analysés. Ces études font appel à des techniques telles que les microarrays ou encore l'hybridation génomique comparative (CGH).

Dans ce contexte, l'équipe de Misra a analysé par aCGH (*array comparative genomic hybridization*) 50 échantillons de patients atteints de glioblastome. En effet, l'analyse de l'altération du nombre de copies d'ADN est un bon indicateur de la progression tumorale ([Misra A, Clin. Cancer Res., 2005](#)). Dans cette étude, ils distinguent 3 sous-groupes de glioblastome. Le premier sous-groupe montre un gain du chromosome 7 avec une perte du chromosome 10, le deuxième montre uniquement une perte du chromosome 10 et le troisième sous-groupe ne présente aucun changement du nombre de copies de ces chromosomes ([Misra A, Clin. Cancer Res., 2005](#)) (**Figure11**). Cette étude souffre néanmoins de certaines lacunes puisque l'incidence de ces différents profils moléculaires sur la prise en charge thérapeutique, la survie ou le pronostic n'a pas été étudiée. De plus, les auteurs n'ont pas pu établir de relation entre leurs sous-groupes génétiques et les données anatomo-pathologiques (GBM primaire ou secondaire) qui étaient inconnues au moment de l'étude.



Nigro JM, Cancer Res., 2005



Misra A, Clin. Cancer Res., 2005

Figure11. Profil d'expression moléculaire des glioblastomes. Les aberrations génétiques sont détectées par aCGH. Les chromosomes 7, 10, 13, 19 et 20 ont ainsi été révélés comme des aberrations génétiques fréquentes.

L'étude réalisée par Nigro, alliant CGH et analyse de profil d'expression de gènes, a permis d'identifier des sous-types moléculaires de glioblastome pertinents au niveau clinique (Nigro JM, *Cancer Res.*, 2005) (**Figure11**). Cette approche intégrée a permis d'identifier les relations existant entre l'altération du nombre de copies ADN, l'expression de gènes et la survie de 34 patients atteints de GBM. Les analyses comparatives par CGH révèlent particulièrement une sur-expression d'un certain nombre de gènes connus (EGFR, VEGF, ténascine-C) et d'un autre gène, mis en évidence au cours de cette étude, CHI3L1/YKL-40. La sur-expression du gène CHI3L1/YKL-40 au sein d'astrocytes immortalisés entraîne une modification du profil d'expression des gènes similaire à celle observée dans les tumeurs humaines (sur-expression de VEGF, TGF β , PAI-1). De plus, la sur-expression du gène CHI3L1/YKL-40 confère une radio-résistance aux astrocytes ainsi qu'une augmentation de leur invasion (Nigro JM, *Cancer Res.*, 2005). Sa sur-expression a par ailleurs été associée dans les glioblastomes avec la perte du chromosome 10, à un facteur de mauvais pronostic (**Figure10**) et à une radio-résistance (Pelloski CE J, *Clin. Cancer Res.*, 2005).

De manière plus approfondie, l'étude réalisée par Freije et ses collaborateurs a permis de mettre en évidence 4 sous-groupes de patients portant des signatures moléculaires distincts. Cette étude confirme l'utilité du profil d'expression de gènes pour prédire la survie des patients (Freije WA, *Cancer Res.*, 2004). La première étude ayant montré la supériorité de ce type d'approche par rapport à la classification histologique était celle réalisée par Nutt (Nutt CL, *Cancer Res.*, 2003). L'étude de Freije établit 4 sous-ensembles de patients regroupés dans les clusters 1A, 1B, 2A et 2B. Le sous-groupe 1A est défini par la sur-expression d'un ensemble de gènes exprimés lors de la neurogenèse (BMP-2, HDAC4, NTRK2...) et les patients de ce groupe montrent la meilleure probabilité de survie, supérieure à 6 ans (Freije WA, *Cancer Res.*, 2004) (**Figure12**). A l'inverse, le cluster 2B regroupe les patients avec une faible probabilité de survie et comprend un ensemble de gènes appartenant aux composants de la matrice tels que LOX, la thrombospondine 1 et la fibronectine. Des facteurs de croissance sont également retrouvés sur-exprimés dans ce sous-groupe tel que le VEGF, IGFBP4, IGFBP6, TGF β 1.

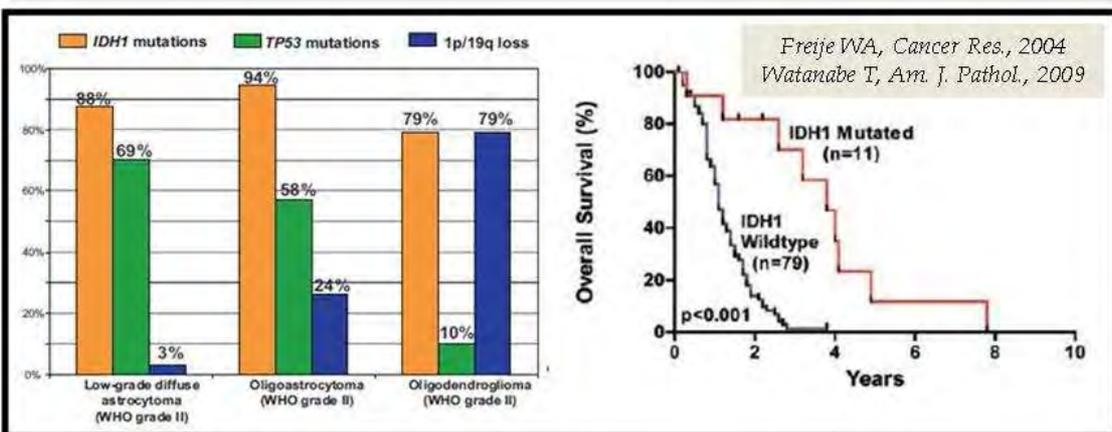
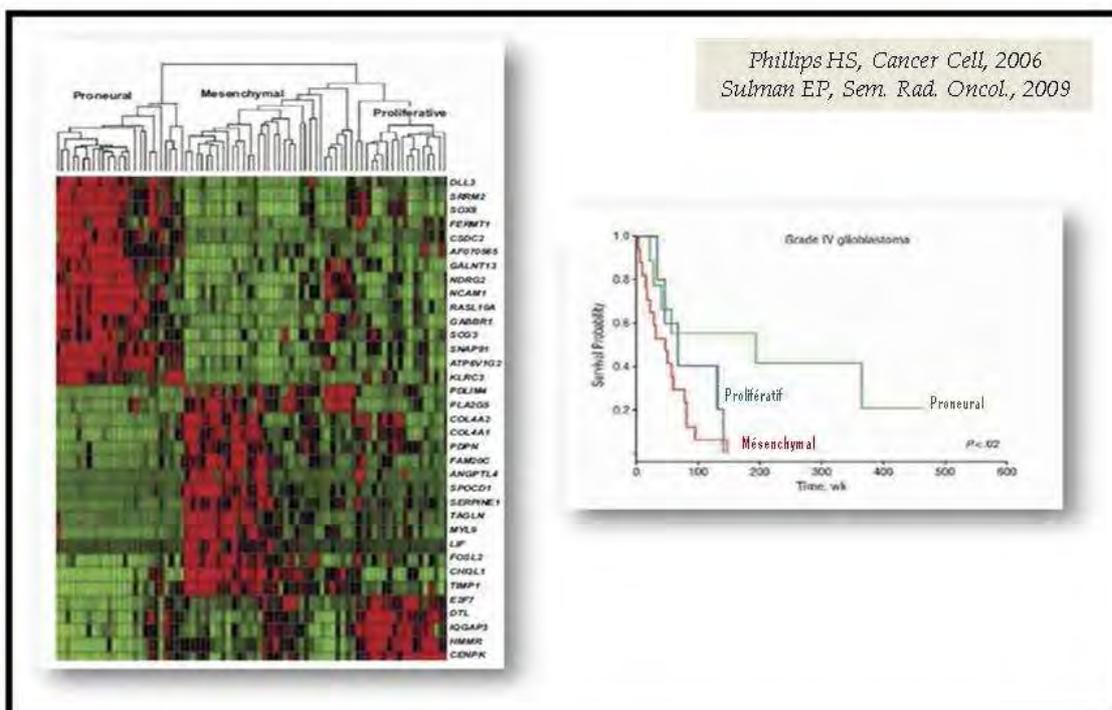
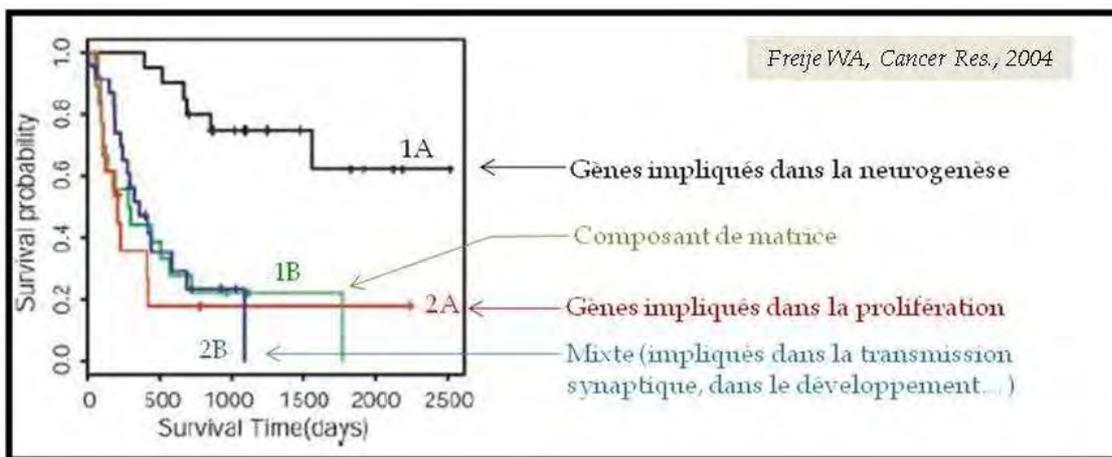


Figure 12. Classification moléculaire des gliomes et mutation du gène IDH1 corrélée à un bon pronostic. Un profil d'expression de gènes de type proneural et la mutation de IDH1 sont corrélés à une meilleure survie des patients.

Le sous-groupe 2A, également de mauvais pronostic, est caractérisé par la sur-expression de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire ou la mitose (Ki-67, PCNA, TOP2A). Enfin, le cluster 1B, de mauvais pronostic aussi, est le plus hétérogène et regroupe des gènes impliqués dans la transmission synaptique tel que la synaptotagmine V, dans le développement tel que la synucléine α ou encore dans la liaison des ions calcium (Freije WA, *Cancer Res.*, 2004) (Figure12). Dans la même manière, l'équipe de Phillips propose trois profils moléculaires des glioblastomes : un profil « prolifératif », « proneural » et « mésenchymal ». Les profils moléculaires de type mésenchymal ou prolifératif sont associés à une faible probabilité de survie (Phillips HS, *Cancer Cell*, 2006). Le sous-groupe mésenchymal correspond à des gènes de la MEC, le sous-groupe prolifératif regroupe des gènes associés au processus de mitose enfin le sous-groupe neural comprend des gènes du développement neural : il est de meilleur pronostic (Figure12).

Récemment, l'équipe de Parsons a mis en évidence une mutation (R132) du gène IDH1 (*déshydrogénase isocitrate 1*) qui est corrélée à un facteur de bon pronostic chez les patients atteints de gliome (Parsons WD, *Science*, 2008). Ils retrouvent cette mutation dans 12% des cas, plutôt chez les patients jeunes et la majorité d'entre eux est atteinte d'un GBM secondaire. Cette mutation est fréquente au sein des gliomes de bas grade, des astrocytomes anaplasiques, des oligodendrogliomes et des oligoastrocytomes (88%, 82%, 79% et 94% respectivement) (Watanabe T, *Am. J. Pathol.*, 2009). En analysant, la perte 1p/19q, la mutation de TP53 et celle de IDH1, les auteurs constatent que 63% des astrocytomes de bas grade portent la mutation IDH1 et la mutation TP53 alors que 64% des oligodendrogliomes portent la mutation IDH1 et la perte 1p/19q (Figure12). Au regard de l'ensemble des résultats, les auteurs émettent l'hypothèse que la mutation IDH1 serait un évènement génétique précoce survenant avant la mutation de p53 ou la perte 1p/19q suggérant que les tumeurs auraient pour origine une cellule gliale précurseur porteuse de cette mutation. Étant donné que la mutation de p53 et la perte 1p/19q sont deux altérations génétiques mutuellement exclusives dans les gliomes de bas grade, les auteurs postulent que la mutation p53 pourrait conduire à une différenciation astrocytaire alors que la perte 1p/19q serait en faveur de l'acquisition d'un phénotype oligodendrogial (Watanabe T, *Am. J. Pathol.*, 2009).

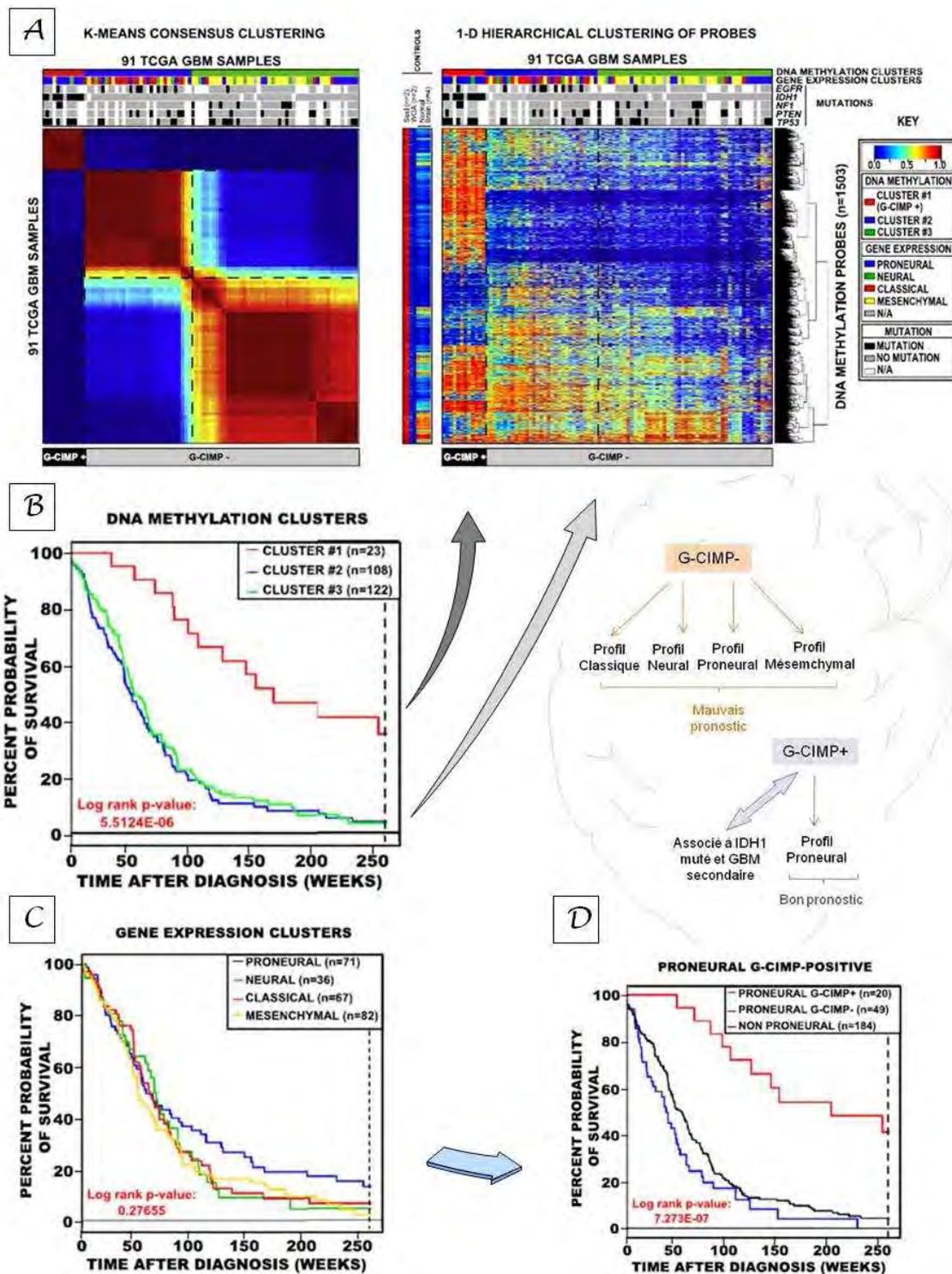


Figure 13. Classification des GBM selon l'étude multiparamétrique de Nourshmehr *et al.* A, 91 échantillons de glioblastome multiforme (GBM) ont été classés selon leur profil de méthylation (cluster 1, 2 et 3). B, le cluster 1, correspond au C-CIMP+ est de meilleur pronostic. C, le sous-groupe de patient présentant un profil proneural a une meilleure probabilité de survie par rapport aux sous-groupes neural, mésenchymal et classique. D, le sous-groupe proneural et C-GIMP+ (associé à IDH1 muté) est de meilleur pronostic. Adapté de Nourshmehr H, *Cancer Cell*, 2010.

Par ailleurs, le pronostic des oligodendrogliomes varie aussi en fonction de leur profil génétique : les patients dont la tumeur présente une délétion des bras chromosomiques 1p et 19q montrent une meilleure réponse à la chimiothérapie et une survie prolongée par rapport aux patients dépourvus de ces caractéristiques génétiques ([Cairncross GJ, J. Nat. Cancer Inst., 1998](#)).

Une étude très récente (Mai 2010) réalisée dans le cadre du projet pilote TCGA (*The Cancer Genome Project*), a permis d'identifier un nouveau sous-ensemble de gliomes, le groupe G-CIMP (*glioma-CpG island methylator phenotype*) ([Noushmehr H, Cancer Cell, 2010](#)) (**Figure13**). Le TCGA est une approche multiparamétrique intégrée qui tient compte des modifications génétiques dans la séquence de l'ADN, du nombre de copies, de la méthylation de l'ADN, de l'expression des gènes et des données cliniques des patients. A l'issue de cette analyse, les auteurs retrouvent, certaines altérations génétiques déjà connues (TP53, PTEN, EGFR, RB1, NF1, ERBB2, PIK3R1 et PIK3CA), les sous-familles proneurale, mésenchymale et neurale, déjà identifiées, ainsi que la mutation IDH1. Ils constatent que les échantillons G-CIMP positifs (G-CIMP+) représentent, en majorité, le sous-ensemble des tumeurs de type proneural. Ce sous-groupe, corrélé à un facteur de bon pronostic, est plutôt associé au GBM secondaire et à la mutation IDH1 (**Figure13**). De manière intéressante, deux patients, ayant un profil G-CIMP+ mais IDH1 non muté, ont montré une survie supérieure à 5 ans après diagnostic. Ces résultats indiquent que le statut G-CIMP+ peut conférer un pronostic favorable indépendamment du statut IDH1 ([Noushmehr H, Cancer Cell, 2010](#)).

L'équipe de Hoelzinger va plus loin dans la prise en compte de l'hétérogénéité intra-tumorale des tumeurs. En effet, ils comparent des cellules tumorales issues du corps de la tumeur et des cellules tumorales issues de la partie infiltrante de la tumeur grâce à une technique de capture par microdissection laser ([Hoelzinger DB, Neoplasia, 2005](#)). Leurs résultats mettent en évidence des profils d'expression de gènes radicalement différents entre ces deux populations ce qui traduit la forte hétérogénéité intra-tumorale de ces tumeurs.

En l'occurrence, les cellules appartenant au corps de la tumeur expriment des facteurs tels que IGFBP-2, IGFBP-5 (des marqueurs, entre autres, des GBM), VCAM-1, VEGF (marqueurs de la néo-vascularisation), JUNB, EGR1 (impliqués dans le contrôle de la croissance). L'expression de ces marqueurs et de la cavéoline-1 est réprimée au sein des cellules tumorales issues de la partie invasive de la tumeur qui sur-expriment des marqueurs d'adhésion cellulaire tels que SPOCK et OPCML, des gènes impliqués dans la transduction des signaux extra- et intra-cellulaire, EGFR, GPR19, FGFR3, DKK3 et dans le réarrangement du cytosquelette (PYK2, CHN1, EMAP2) (Hoelzinger DB, Neoplasia, 2005).

L'ensemble de ces études met en évidence l'hétérogénéité des glioblastomes et donc la nécessité d'une classification moléculaire. Les patients atteints de glioblastome sont ainsi répartis dans différents sous-groupes moléculaires qui sont pertinents pour l'évaluation de la probabilité de survie des patients. De plus, bien que plusieurs sous-groupes de patients présentent une faible probabilité de survie, ils ne seront pas à considérer de la même manière, en vue de la prise en charge thérapeutique, puisque leur profil moléculaire est différent.

I-4-6b/Prédiction de la réponse aux traitements

De plus en plus d'études s'intéressent à l'analyse de l'expression de certains gènes dans le but de prédire la réponse à certains traitements ciblés (l'erlotinib par exemple) ou non (le TMZ). Ainsi, Mellinghoff et ses collaborateurs ont montré qu'une co-expression du récepteur EGFR_{vIII} et de PTEN sensibilisait les patients à un traitement avec l'erlotinib, un inhibiteur du récepteur EGFR. Ces données expliqueraient le faible taux de réponse des patients, 10 à 20%, alors que l'EGFR est sur-exprimé dans le glioblastome (Mellinghoff IK, New Engl. J. Med., 2005). De même, l'étude réalisée par Haas-Hogan révèle que seuls 8 des 41 patients de l'étude (atteints de glioblastome) ont montré une réponse à l'erlotinib. Ici, la réponse au traitement est associée à une amplification de l'EGFR et à des taux faibles de la protéine PKB/Akt phosphorylée. En l'occurrence, aucune des 22 tumeurs présentant un taux élevé de p-PKB/Akt n'a répondu au traitement (Haas-Hogan DA, J. Nat. Cancer Inst., 2005). Par ailleurs, plusieurs études rapportent un bénéfice du traitement radio-chimiothérapeutique concomitants chez les patients ayant un profil MGMT méthylée (Hegi ME, New Engl. J. Med., 2005 ; Brandes AA, J. Clin. Oncol., 2008).

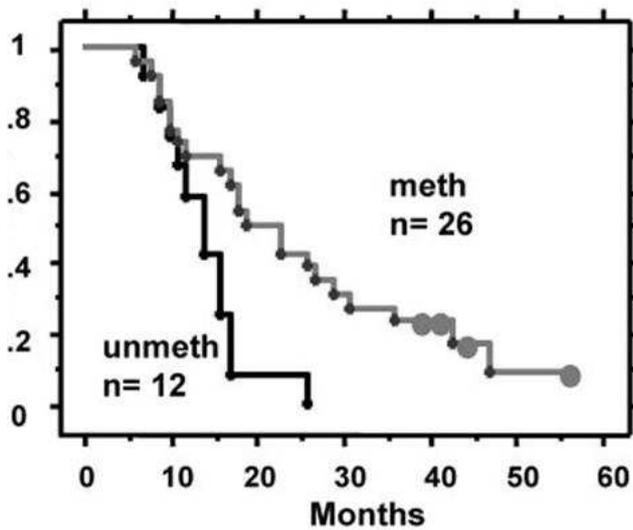


Figure14. Analyse par Kaplan-Meier de la survie de 38 patients atteints de glioblastome selon leur profil de méthylation du gène MGMT. Essai clinique de phase II avec exérèse chirurgicale, radiothérapie avec chimiothérapie concomitante et adjuvante au TMZ. Extrait de [Hegi ME, Clin. Cancer Res., 2004.](#)

En effet, Hegi et ses collaborateurs avaient observé que l'inactivation du gène codant la MGMT était associée à un allongement de la probabilité de survie des patients (**Figure14**) après chimioradiothérapie concomitante au TMZ : probabilité de survie à 18 mois de 62% pour les patients dont le MGMT était inactivé contre 8% pour ceux dont le MGMT était activé (Hegi ME, *New Engl. J. Med.*, 2005 ; Hegi ME, *Clin. Cancer Res.*, 2004). La méthylation du promoteur du gène MGMT conduit à une inactivation de la transcription du gène.

La MGMT est une enzyme qui répare les adduits O⁶-methylguanine transférés sur l'ADN par le TMZ ce qui explique pourquoi les patients présentant un profil MGMT méthylée ont une meilleure probabilité de survie que les patients avec un profil MGMT non méthylée.

La synthèse de nouvelles molécules découle de l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques et de l'analyse du profil moléculaire des patients comme différentes études ont pu le souligner. Dans ce contexte, il apparaît que la prise en charge thérapeutique de demain devra tenir compte du profil moléculaire (qui définit des « sous-groupes thérapeutiques » de patients) afin d'administrer aux patients les molécules qui auront un effet optimal : une chimiothérapie « à la carte ». Ainsi, bien que ces patients soient atteints de la même tumeur (par exemple, un GBM secondaire) ils ne recevront pas les mêmes molécules. Ce type d'approche a déjà montré sa pertinence dans d'autres cancers.

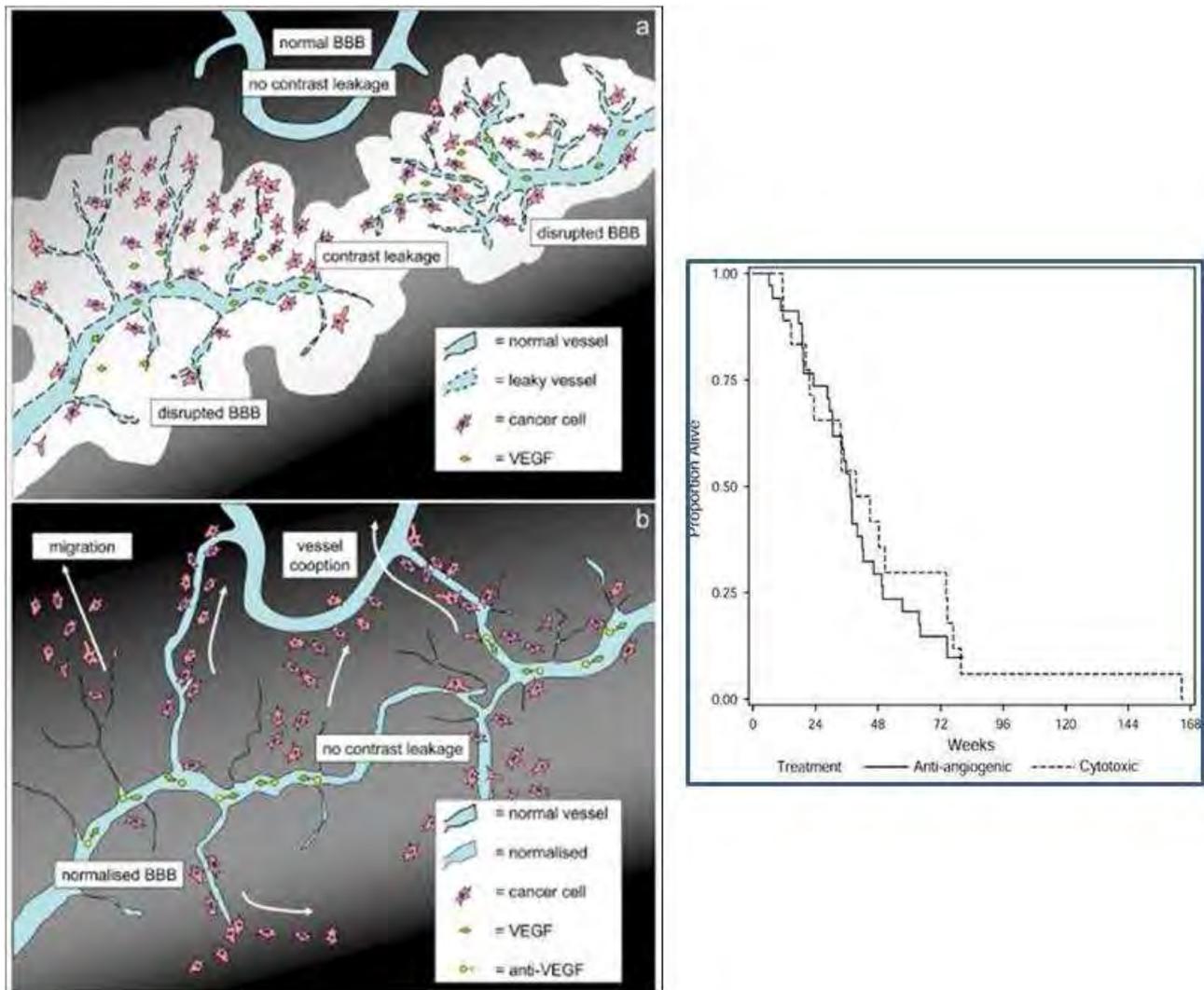


Figure 15. Rehaussement de contraste en imagerie (a), évolution de la vascularisation consécutive au traitement par le Bevacizumab (b) et survie moyenne et survie sans progression libre des patients traités par des agents cytotoxiques ou anti-angiogéniques. a. Lésion de la BHE (ou BBB pour Blood-Brain barrier) qui devient très perméable d'où la prise de contraste à l'IRM. b. Le Bevacizumab normalise la BHE qui redevient moins perméable. (Tableau de droite) A l'image des agents cytotoxiques, les anti-angiogéniques ne parviennent pas à améliorer la survie des patients. Adapté de [Verhoeff J, BMC Cancer, 2009](#) et de [Norden AD, J. Neurooncol., 2009](#).

I-5/Nouvelles pistes thérapeutiques

Dans le cadre des glioblastomes, de nombreuses nouvelles pistes thérapeutiques sont en cours d'exploration. Ces nouvelles cibles sont variées (vaccination, anti-ténascine C, anti-JAM-B/JAM-C, anti-VEGF, anti-EGFR, anti-PDGF, anti-IGFR...). Un effort considérable est réalisé dans le but de tester ces molécules et dans la recherche et la synthèse de nouvelles cibles. Parmi les plus étudiés, on trouve les anti-angiogéniques, les inhibiteurs de tyrosine kinase et les intégrines.

I-5-1/ Les anti-angiogéniques

I-5-1a/ L'angiogenèse

L'angiogenèse est caractéristique des tumeurs gliales de haut grade puisque les tumeurs de bas grade ne nécessitent pas de néo-vascularisation pour leur développement.

L'angiogenèse résulte de la mise en place de ramifications vasculaires à partir de vaisseaux pré-existants mais également de la modification de vaisseaux normaux englobés et modifiés par la tumeur (Shibuya M, *BMP Rep.*, 2008). L'angiogenèse est un processus complexe nécessitant la protéolyse de la MEC, la prolifération et la migration des cellules endothéliales et la synthèse de nouveaux composants de la MEC. Cette prolifération, dite endothéliale, s'organise en néo-vaisseaux (Tate MG, *Neurotherapeutics*, 2009). Par ailleurs, la prolifération « directionnelle » qui permet d'augmenter la longueur des vaisseaux co-existe avec une prolifération en épaisseur, dite intraluminaire, caractéristique histologique fondamentale de la gradation des tumeurs gliales. De plus, ces vaisseaux montrent un défaut dans la régulation du flux sanguin car l'ensemble de ces irrégularités conduit à des agrégations plaquettaires, des thromboses et des foyers de nécrose tumorale (autre élément de gradation de la malignité) et à des hémorragies intratumorales. Ces néo-vaisseaux sont anormalement perméables et laissent donc diffuser le liquide plasmatique ce qui augmente la teneur en eau du tissu tumoral et les tissus avoisinants (risque d'œdème). La barrière hémato-encéphalique défectueuse des patients contribue également au rehaussement du contraste en imagerie (Verhoeff J, *BMC Cancer*, 2009) (Figure15).

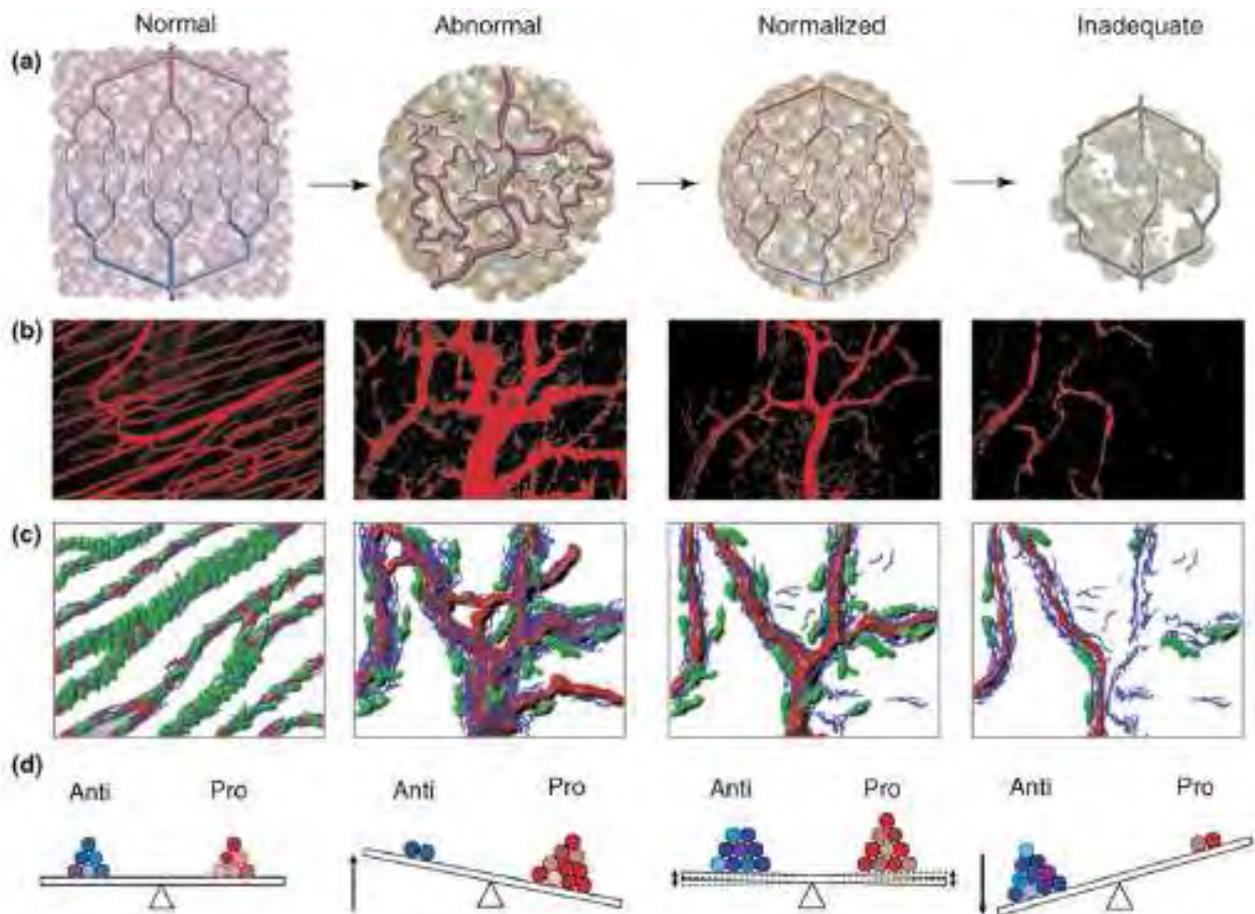


Figure 16. Normalisation de la vascularisation tumorale. Le système vasculaire normal est mis à profit par la tumeur, se désorganise alors et se déforme. Une normalisation de cette vascularisation peut être obtenue par l'utilisation d'anti-angiogéniques. (a) évolution de la vascularisation, (b) dynamique de la normalisation de la vascularisation suite à l'inhibition du VEGFR2, (c) les péricytes sont présentés en rouge et la membrane basale en bleu, (d) balance des facteurs pro- et anti-angiogéniques. Extrait de [Duda DG, Trends Mol. Med., 2007](#).

I-5-1b/ Anti-VEGF

Les gliomes de haut grade, et particulièrement les glioblastomes, sont connus pour être des tumeurs particulièrement vascularisées. Cette forte vascularisation est corrélée à un facteur de mauvais pronostic chez les patients (Hjorland GO, *Exp. Cell. Res.*, 2004). Dans les glioblastomes, l'ARNm de VEGF est 50 fois augmenté en comparaison du tissu cérébral normal (Machein MR, *J. Neurooncol.*, 2000). L'utilisation d'anti-angiogénique permet d'obtenir une normalisation de la vascularisation tumorale mais l'équilibre entre agents anti- et pro-angiogéniques est précaire (**Figure16**).

Le Bevacizumab (Avastin™, Genentech/Roche), anticorps dirigé contre le VEGF-A, a été la première thérapie anti-angiogénique qui a été approuvée dans les cancers humains. Il est généralement administré en combinaison avec d'autres agents cytotoxiques dans les tumeurs solides. L'Irinotecan, un inhibiteur de topoisomérase I, est l'un de ces agents cytotoxiques utilisés en combinaison avec le Bevacizumab (**Tableau 6**). L'essai de phase II rapporté par Vredenburg et ses collègues sur l'utilisation conjointe du Bevacizumab et de l'Irinotecan a montré une majorité de réponses partielles chez les patients atteints de glioblastome récurrents avec un tiers des patients qui présentent une maladie stable (Vredenburg JJ, *Clin. Cancer Res.*, 2007 ; Vredenburg JJ, *J. Clin. Oncol.*, 2007). D'autres agents ont également montré une activité anti-angiogénique tel que le thalidomide ou le vatalanib (Fine HA, *J. Clin. Oncol.*, 2000,2003 ; D'Amato RJ, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994).

L'aflibercept est aussi un anticorps dirigé contre le VEGF-A et-B qui a été testé au cours d'une étude de phase II chez les patients atteints de gliome de haut grade. Les patients ont montré des taux satisfaisants de réponses radiographiques mais leur survie n'est pas améliorée pour autant (Ahluwalia MS, *J. Oncol.*, 2010) (**Tableau 6**).

Le cediranib, un inhibiteur de tyrosine kinase ciblant le VEGFR (mais aussi le PDGFR β et le c-kit), a également induit une réponse radiographique dans la majorité des cas (56%) mais sans prolongement de la survie des patients (Batchelor TT, *Cancer Cell*, 2007). D'autres inhibiteurs sont actuellement en cours d'essais cliniques ou d'études précliniques (**Tableau 7**) tel que le Sunitinib ou le sorafenib.

| ESSAIS THÉRAPEUTIQUES | | Cibles | Phase; Diagnostic | Nombre de patients et Histologie | Taux de réponse |
|-----------------------------------|--|---|--------------------------|----------------------------------|--|
| Anti-angiogéniques: Anticorps | | | | | |
| Bevaciximab (+ irinotecan) | | VEGFA | II; AG et GBM récurrents | 68 (33 AG et 35 GBM) | |
| Aflibercept | | VEGFA-B, PIGF | II; AG et GBM récurrents | 48 (16 AG et 32 GBM) | 50% AG et 30% GBM |
| Anti-angiogéniques: TKI | | | | | |
| Cediranib | | VEGFR1-3, PDGFRβ, c-kit | II; GBM récurrent | 16 GBM | 56% |
| Vatalanib | | VEGFR1-3, PDGFRβ, c-kit | I/II; GBM récurrent | 55 GBM | Réponse partielle 4%, Maladie stable 56% |
| XL-184 | | VEGFR2, Met, RET, c-kit, | II; GBM récurrent | 26 GBM | Réponse partielle 38% |
| Autres anti-angiogéniques | | | | | |
| Cilengitide | | Intégrines αvβ3 et αvβ5 | II; GBM récurrent | 81 GBM | |
| Thalidomide | | Activité anti-angiogénique <i>in vivo</i> | II; AG et GBM récurrents | 39 (14 AG et 25 GBM) | Réponse partielle 6%, Maladie stable 33%, Réponse mineure 6% |
| ÉTUDES PRÉCLINIQUES | | | | | |
| Anti-angiogéniques: TKI | | Cibles | ÉTUDES PRÉCLINIQUES | | Cibles |
| Sumitinib | | VEGFR2, c-kit, Flt3, PDGFRβ | Anti-angiogéniques: TKI | CT-322 | VEGFR1-3 |
| Sorafenib | | VEGFR2-3, c-kit, BRAF, PDGFRβ, Ras, p38α | | Pazopanib | VEGFR1-3, c-kit, PDGFRβ |
| Brivanib | | VEGFR2, FGFR | | | |

Tableau 6. Listes d'agents anti-angiogéniques en cours d'essais cliniques. D'après Ahluwalia MS, J. Oncol., 2010 et <http://www.clinicaltrials.gov>.

A l'image du Bevacizumab, les agents anti-angiogéniques sont capables d'augmenter l'efficacité d'autres agents cytotoxiques selon différents mécanismes : (1) effets anti-angiogéniques directs du Bevacizumab et des agents sur les cellules endothéliales et les éléments du stroma, (2) effet direct du Bevacizumab sur les cellules tumorales, (3) normalisation de la vascularisation permettant une meilleure délivrance des autres agents (**Figure16**).

Malheureusement, ce type de traitement montre aussi certaines limites et la polémique est alimentée par les résultats obtenus lors des essais cliniques :

- ❏ Pas d'amélioration de la survie globale des patients (**Figure15**) (même si la progression semble meilleure pendant les 22 premières semaines) ([Norden AD, J. Neurooncol., 2009](#)).
- ❏ Les vaisseaux co-optés sont réfractaires aux traitements anti-angiogéniques ([Leenders WP, Clin. Cancer Res., 2004](#)).
- ❏ Les astrocytomes de haut grade sont des tumeurs particulièrement infiltrantes et l'invasion du parenchyme sain par les cellules tumorales ne nécessite pas de néo-vascularisation.
- ❏ Ces tumeurs montrent une forte capacité d'adaptation aux traitements anti-angiogéniques et développent un phénotype extrêmement invasif suite aux traitements.

I-5-2/ Les inhibiteurs de tyrosine kinase (TKIs)

Compte tenu de l'importance des voies de signalisation dans le processus de tumorigenèse, l'EGFR a fait l'objet de nombreuses études particulièrement dans les glioblastomes où son expression est augmentée et associée à un facteur de mauvais pronostic ([Muracciole X, Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 2002](#)). Le gène de l'EGFR est communément amplifié (40-60%) dans les glioblastomes, particulièrement dans le sous type glioblastome *de novo* et certains astrocytomes anaplasiques ([Watanabe K, Brain. Pathol., 1996](#) ; [Wikstrand CJ, J. Neurovirol., 1998](#)). Dans certains cas, le gène de l'EGFR subit des réarrangements au cours du processus d'amplification ce qui aboutit à la synthèse du transcrit variant EGFR_{vIII}. Ce mutant de l'EGFR résulte de la délétion de l'exon 2-7 (délétion de 801 paires de base dans le cadre de lecture de la séquence codante) qui conduit à la synthèse d'un récepteur possédant un domaine extra-cellulaire tronqué ([Wikstrand CJ, Curr. Opin. Oncol., 1999](#)).

| | Cibles | Phase; Nombre de patients; taux de réponse | Références |
|---|-----------------------|--|---|
| Anticorps monoclonaux | | | |
| Cetuximab (Erbix) | HER1/EGFR | | Eller JL, Neurosurg., 2005 Abst |
| Nimotuzumab | HER1/EGFR | | Diaz Miquel A, Br. J. Cancer, 2009 |
| Inhibiteurs tyrosine kinase | | | |
| Gefitinib (Iressa) | HER1/EGFR | II; 38 GBM et 17AA; 12% de réponse | Kreis TN, J. Neurooncol, 2009 |
| Erlotinib (Tarceva) | HER1/EGFR, EGFRvIII | II; 30 GBM et 15 AA; 13% Maladie stable (GBM) et 13% AA | Mellinghoff IK, New Engl. J. Med., 2005; Haas-Kogan DA, J. Natl. Cancer Inst., 2005 |
| Lapatinib (Tykerb) | HER1/EGFR, HER2 | | Giannopoulos E, Invest. New Drugs, 2009 |
| ZD6474 (Zactima) | HER1/EGFR, VEGFR | | Rich JN, Clin. Cancer Res., 2005 |
| Inhibiteurs tyrosine kinase | | | |
| Everolimus | m-tor | | |
| Temsirolimus | m-tor | II; 65 GBM récurrents; 0% de taux de réponse objective | Galanis E, J. Clin. Oncol, 2005; Chang SM, Invest. New Drugs, 2005 |
| Imatinib | PDGFR, c-kit, BCR-ABL | I/II; 36 GBM et 21 AA; 2 réponse partielle et 6 maladie stable (GBM) | Wen PY, Clin. Cancer Res., 2005 |
| Enzastaurin | PKCβ | | Graff JR, Cancer Res., 2005 |
| SAHA (Suberoylanilide hydroxamate acide) | HDAC | | Ugur HC, J. Neurooncol, 2007 |
| Tipifarnib | Farnesyltransférase | II; 28 GBM; 29% Maladie stable | Lustig R, Neuro-oncol, 2008 |

Tableau 7. Inhibiteurs de protéines à activité tyrosine kinase et anticorps monoclonaux. Pour certaines molécules, les essais cliniques de phase II sont achevés, pour d'autres, les études précliniques sont encore en cours.

La protéine EGFR_{vIII} est détectée dans 60% des glioblastomes et dans 20% des astrocytomes anaplasiques mais également dans les cancers du poumon, du sein et de la prostate mais pas dans les tissus sains. Les patients ayant un glioblastome exprimant le récepteur mutant ont une faible espérance de vie de même que les patients qui présentent une amplification de l'EGFR (Schlegel J, *Int. J. Cancer.*, 1994).

L'erlotinib (Tarceva®) et le gefitinib (Iressa®) constituent les principaux inhibiteurs de l'EGFR actuellement évalués en clinique (Halatsch ME, *Cancer Treat. Rev.*, 2006). Ces molécules présentent des caractéristiques particulièrement attractives dans le cadre des glioblastomes : ils ciblent l'activité kinase de l'EGFR et leur faible poids moléculaire permet leur passage à travers la BHE. Le gefitinib a montré un effet anti-prolifératif et anti-invasif au niveau des cellules de glioblastome notamment sur le récepteur muté (exons 19 et 21).

Contrairement au gefitinib, l'erlotinib inhibe l'EGFR_{vIII}. Différents inhibiteurs tyrosine kinases de l'EGFR ont été testés dans le traitement des glioblastomes ; pour autant, ces traitements ne montrent pas la même efficacité (Griffero F, *J. Biol. Chem.*, 2009) (Tableau 7). Ce type de traitement montre néanmoins certaines limites :

- ❏ Radiorésistance et chimiorésistance des tumeurs possédant un EGFR activé (Chakravarti A, *Cancer Res.*, 2002 ; Li B, *Cancer Res.*, 2003)
- ❏ Toutes les tumeurs ne sur-expriment pas le récepteur
- ❏ Variation des réponses aux traitements en fonction de l'activation de MAPK et de la protéine AKt (Cappuzzo F, *J. Natl. Cancer Inst.*, 2004)

De nombreuses molécules ciblant récepteurs et voies de signalisation ont été et sont encore développées avec des effets minimes à modérés sur la croissance tumorale (Tableau 7). Parmi ces molécules, on peut citer l'imatinib (ciblant le PDGF) ou le Temsirolimus qui cible m-tor. Pour autant, l'ensemble de ces données conduit toujours à la même conclusion : les molécules ayant été testées ou en cours d'essais cliniques ne permettent pas d'obtenir une amélioration significative de la survie des patients (Kreisl TN, *J. Neurooncol.*, 2009).

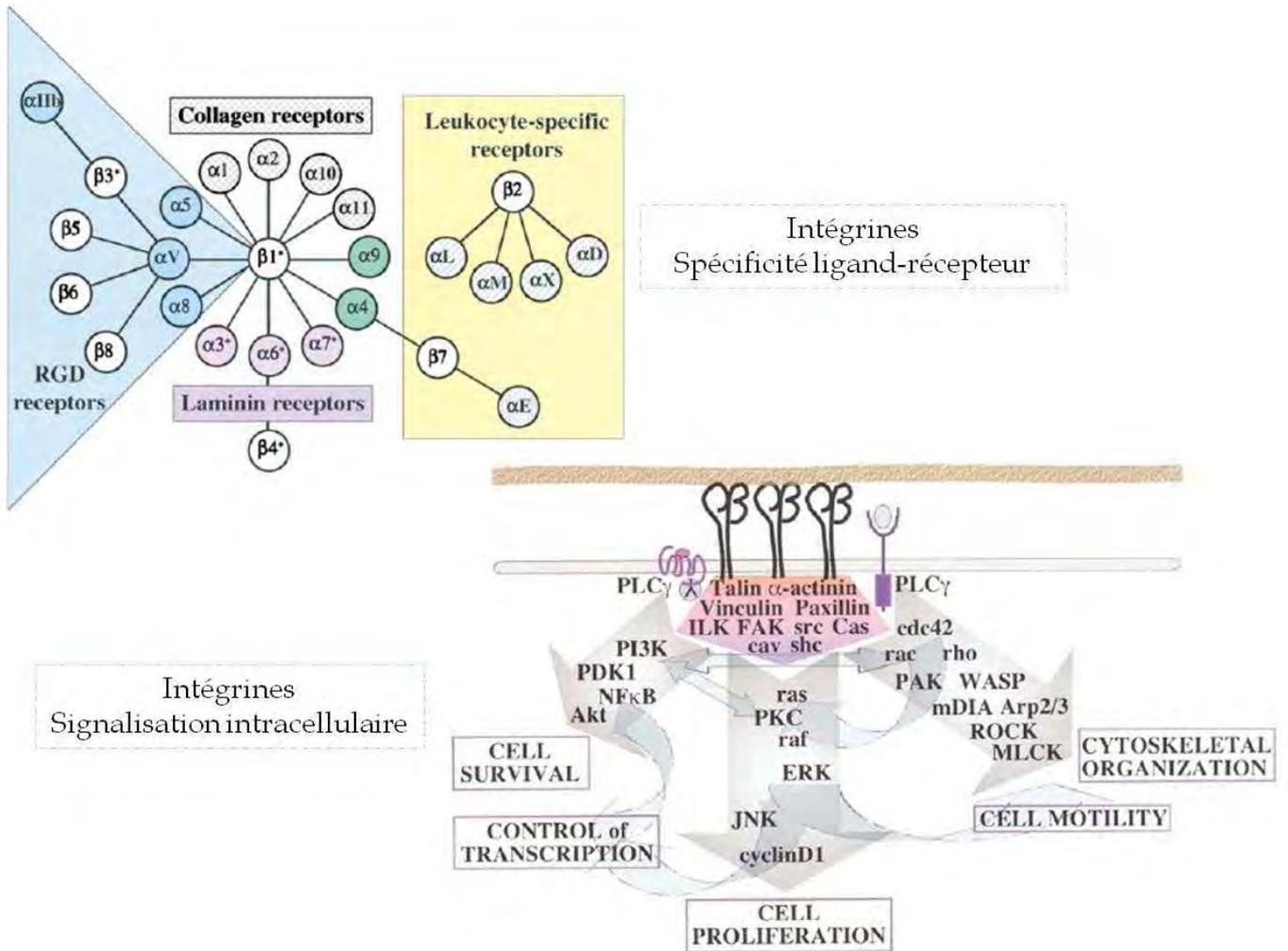


Figure17. Spécificité des intégrines pour leurs ligands et signalisation des intégrines. Les intégrines reconnaissent différents types de récepteurs. Elles régulent également différents processus cellulaires à travers l'activation de nombreuses protéines de signalisation et de protéines du cytosquelette. Adapté d'après Hynes RO, Cell, 2002.

I-5-3/ Les anti-intégrines

Les intégrines appartiennent à une grande famille de récepteurs d'adhésion hétérodimériques transmembranaires constitués de deux sous-unités α et β liées de façon non covalente (**Figure17**) (Hynes RO, Cell, 2002). Ce sont des glycoprotéines avec une extrémité N-terminale extra-cellulaire, un domaine court et une partie C-terminale cytoplasmique sans activité enzymatique. Près de 25 hétérodimères, de masse allant de 90 à 160 KDa, sont actuellement décrits. La nature de la chaîne β permet de classer les intégrines en trois sous familles: les intégrines $\beta 2$, caractéristiques des leucocytes, sont impliquées dans l'interaction fonctionnelle avec l'endothélium, les intégrines $\beta 1$ (famille la plus représentée) et les intégrines $\beta 3$ sont principalement impliquées dans l'adhésion des cellules avec la MEC. Les intégrines ne reconnaissent pas les mêmes ligands ; certaines sont des récepteurs de la lamine, d'autres du collagène et d'autres reconnaissent le peptide RGD (présent dans la fibronectine ou la vitronectine par exemple) (**Figure17**). La liaison de l'intégrine à son ligand provoque l'activation de l'intégrine. L'organisation des intégrines en cluster (regroupement des intégrines au niveau de la membrane plasmique) et stimule différentes voies de signalisation intra-cellulaire (**Figure17**). Contrairement aux récepteurs de facteurs de croissance, les intégrines ne possèdent pas d'activité enzymatique intrinsèque ou d'activité kinase mais elles sont capables d'activer un ensemble de kinases ou de protéines adaptatrices (Hynes RO, Cell, 2002). La cascade d'activation conduisant à l'activation des voies de signalisation par la liaison de l'intégrine à son ligand est nommée « outside-in » (Giancotti FG, Nat. Cell Biol., 2000). Au contraire, l'activation de l'intégrine peut être réalisée par l'intermédiaire de signaux intra-cellulaires : ce processus est appelé « inside-out » (Giancotti FG, Nat. Cell Biol., 2000). Les voies PI3-K/Akt et MAPK sont les voies de signalisation majeures engagées par l'activation des intégrines (**Figure17**). Par conséquent, les intégrines régulent un grand nombre de processus cellulaires tels que l'invasion, la migration, la survie ou encore la prolifération cellulaire (Hynes RO, Cell, 2002). Compte tenu du rôle joué par les intégrines dans la régulation de différents processus cellulaires (fréquemment dérégulés dans les cancers), différentes études se sont attachées à déterminer quelle était l'implication de ces intégrines dans les cancers, plus particulièrement, dans les gliomes. L'intégrine $\alpha\beta 3$ fut l'une des premières intégrines étudiées.

Les premières données, rapportées par l'étude de Gladson, révélèrent que l'expression de la vitronectine (VN), ligand de l'intégrine $\alpha\beta_3$, était corrélée avec le grade tumoral (Gladson CL, *J. Clin. Invest.*, 1991 ; Gladson CL, *J. Cell Sci.*, 1995). Dans les glioblastomes, où elle est la plus abondante, l'intégrine $\alpha\beta_3$ est largement représentée au niveau de l'interface tumeur/parenchyme sain où le processus de migration/invasion est le plus actif. La VN comme les deux récepteurs de la VN sont exprimés par les cellules tumorales. Ces premières indications révélant une expression et une co-localisation du ligand et de son récepteur suggéraient l'implication de l'intégrine $\alpha\beta_3$ dans les processus de migration et d'invasion cellulaires. Le rôle de l'intégrine $\alpha\beta_3$ dans ces processus a pu être vérifié *in vitro* (Berens ME, *Clin. Exp. Metast.*, 1994). De plus, l'intégrine $\alpha\beta_3$ serait impliquée dans la promotion de l'invasion des cellules tumorales car il a la capacité de concentrer des MMPs (Brooks PC, *Cell*, 1996) à la surface des cellules tumorales et il peut également interagir avec la protéine PAI-1 qui peut stabiliser l'interaction intégrine-ligand ou induire l'internalisation du récepteur (Kost C, *J. Biol. Chem*, 1992). L'intégrine $\alpha\beta_3$ joue également un rôle dans la survie des cellules tumorales et l'angiogénèse (Avraamides CJ, *Nat. Rev. Cancer*, 2008). En effet, la liaison de l'intégrine à son ligand induit une augmentation de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 et une diminution de la protéine pro-apoptotique Bax favorisant ainsi la survie cellulaire (Stromblad S, *J. Clin. Invest*, 1996 ; Lee BH, *J. Cell Biochem.*, 2005). *In vitro*, Brooks et ses collaborateurs ont pu montrer que l'inhibition de l'intégrine $\alpha\beta_3$ par un anticorps monoclonal LM609 conduisait à une inhibition de l'angiogénèse et à l'induction massive de l'apoptose des cellules endothéliales (Brooks PC, *Cell*, 1994). A cet égard, différentes molécules ont été développées, dont le cilengitide actuellement en essai clinique de phase II.

Le cilengitide (EMD 121974 ; Merck KGaA), peptide cyclique appartenant à la famille des peptides RGD, est le premier antagoniste des intégrines testé chez l'homme. Le cilengitide exerce son activité inhibitrice sur deux intégrines, $\alpha\beta_3$ et $\alpha\beta_5$. Les études précliniques menées sur le cilengitide avaient pu mettre en évidence une inhibition de la croissance tumorale dans des souris nude (Yamada S, *Neurosurg.*, 2006 Abst). Il agit non seulement sur l'angiogénèse mais aussi sur la prolifération des cellules tumorales grâce à son action pro-apoptotique (Tentori L, *Oncol. Rep.*, 2008).

| Efficacité du cilengitide chez 81 patients atteints de GBM | | |
|---|--|---|
| | N = 41 Dose: 500mg/jour | N = 40 Dose: 2000mg/jour |
| Réponse radiographique: | 5% | 13% |
| Survie (moyenne): | 6,5 mois | 9,9 mois |
| PFS à 6 mois: | 10 mois | 15 mois |



Réponse radiographique (IRM + Gadolinium) chez un patient avec une réponse partielle

Figure18. Résultat de l'étude de phase I pour le traitement des glioblastomes récurrents par le cilengitide. Adapté d'après [Reardon DA, J. Clin. Oncol., 2008.](#)

L'efficacité du cilengitide a été démontrée au cours d'études précliniques et cliniques. Néanmoins, son utilisation dans le glioblastome, dans le cadre d'une monothérapie, montre une bonne tolérance du traitement mais aucun bénéfice sur la survie globale des patients ([Reardon DA, J. Clin. Oncol., 2008](#)) (**Figure18**). Cette étude de phase I n'ayant montré que peu de toxicité, elle a été prolongée par une étude de phase II dont les résultats ont été récemment publiés ([Stupp R, J. Clin. Oncol., 2010](#)). Le Cilengitide (500mg) a été administré à des patients nouvellement diagnostiqués (contrairement à la phase I où le glioblastome était récurrent) de manière concomitante au TMZ et à la radiothérapie. Le taux de PFS (*progression free survival*) s'élève à 63% à 6 mois ce qui représente une amélioration de 15% par rapport à l'étude de référence réalisée par Stupp sur le protocole TMZ et radiothérapie ([Stupp R, New Engl. J. Med., 2005](#)). Les auteurs indiquent que l'effet du cilengitide pourrait être limité chez les patients ayant un profil MGMT méthylée et suggèrent donc, à l'avenir, de réaliser des sous-groupes de patients selon le statut de la méthylation de MGMT afin d'obtenir de meilleurs taux de réponse.

D'autres antagonistes de l'intégrine $\alpha\beta3$ existent tel que le S247 (peptidomimétique des intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$). Ils ont montré une inhibition intéressante de la vascularisation tumorale, du nombre de métastases et de la croissance tumorale ([Reinmuth N, Cancer Res., 2003](#)).

A l'image de l'intégrine $\alpha\beta3$, d'autres intégrines présentent un potentiel particulièrement intéressant. En effet, un certain nombre d'études ont révélé le potentiel de l'intégrine $\alpha5\beta1$ dans la prise en charge thérapeutique des tumeurs solides. L'étude réalisée par Sawada et ses collègues met en évidence que l'expression de l'intégrine $\alpha5\beta1$, qui est inversement corrélée à celle de la E-cadhérine, promeut l'invasion et la formation de métastases dans les cancers ovariens ([Sawada K, Cancer Res., 2008](#)). L'inhibition de la E-cadhérine dans les cellules RMUG-S conduit à la sur-expression de l'intégrine $\alpha5\beta1$ via l'activation de FAK et de la voie ERK1-MAPK. Les auteurs proposent d'utiliser la sur-expression de l'intégrine $\alpha5\beta1$ comme marqueur pronostic et comme cible thérapeutique dans les cancers ovariens ([Sawada K, Cancer Res., 2008](#)). Dans le cancer du poumon, l'expression de l'intégrine $\alpha5\beta1$ est très forte alors qu'elle n'est pas exprimée dans les tissus sains ([Adachi M, Clin. Cancer Res., 2000](#)).

| | | Nature de l'antagoniste | Activité <i>in vitro</i> / <i>in vivo</i> | Références |
|---|-------------|---------------------------------|---|---|
| Antagonistes de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ | | | | |
| | SI749 | Pentapeptide séquence RGD | <i>Inhibition de la prolifération, de la clonogénicité et de la migration cellulaire</i> | Kim S, Am, J. Pathol., 2003; Maglott A, Cancer Res., 2006 |
| | K34c | Pentapeptide séquence RGD | <i>Inhibition de l'adhérence à la fibronectine</i> | Heckmann D, ChemBioChem., 2008 |
| | ATN-161 | Pentapeptide séquence PHSRN | <i>Inhibition de la croissance tumorale, des métastases et des voies de signalisation</i> | Khalili P, Mol. Cancer Ther., 2006; Stoelzing O, Int. J. Cancer, 2003 |
| | Volociximab | Anticorps monoclonal chimérique | <i>Inhibition de la croissance tumorale, de l'angiogénèse et de l'induction de l'apoptose</i> | Bhaskar V, Invest. New Drugs, 2008; Bhaskar V, J. Transl. Med., 2007 |
| Antagonistes de l'intégrine $\alpha v \beta 3 / \alpha v \beta 5$ | | | | |
| | Cilengitide | Pentapeptide séquence RGD | <i>Inhibition de l'angiogénèse, de la croissance tumorale et des voies de signalisation</i> | Narbers LD, J. Clin. Oncol., 2007; Yamada S, Neurosurg., 2006 |
| | S247 | Peptidomimétique | | Reinmuth N, Cancer Res., 2003 |
| Autres Antagonistes | | | | |
| | E7820 | Dérivé sulfonamide aromatique | <i>Inhibition de la croissance et de l'angiogénèse</i> | Funahashi Y, Cancer Res., 2002 |

Tableau 8. Différents antagonistes des intégrines décrits dans la littérature.

La sur-expression de l'intégrine est associée à un phénotype plus malin, à la formation de métastases et à la survie des cellules tumorales (Saito T, *Br. J. Cancer*, 1996). Récemment, les travaux de Roman et de ses collègues ont révélé que l'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ était essentielle à la progression tumorale (Roman J, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2010). Dans les glioblastomes, l'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ (Reimenschneider T, *Am. J. Pathol.*, 2005) est clairement impliquée dans l'invasion et la migration des cellules tumorales (Uhm JH, *Front. Biosci.*, 1999).

L'ensemble de ces données a conduit au développement de différentes molécules ciblant l'intégrine $\alpha 5\beta 1$: des antagonistes peptidiques (ATN-161), des antagonistes non peptidiques (SJ739, K34, JSM6427) ou encore des anticorps (Volociximab) (Tableau 8).

Le Volociximab (M200, PDL BioPharma/BiogenIdec) est le premier anticorps monoclonal chimérique (82% humain et 18% murin) dirigé contre l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. D'ailleurs, il présente une forte affinité pour cette intégrine ($K_d = 0,3nM$). Le Volociximab inhibe la prolifération des cellules endothéliales et induit leur apoptose. *In vivo*, il inhibe la croissance tumorale dans un modèle de carcinome implanté chez le lapin (VX2) et diminue l'angiogenèse (Bhaskar V, *J. Transl. Med.*, 2007 ; Bhaskar V, *Invest. New Drugs*, 2008). Des essais cliniques sont actuellement en cours dans le cancer du poumon non à petites cellules mais pas dans les gliomes.

L'ATN-161 est un pentapeptide linéaire N-acétylé (Ac-PHSCN-NH₂), non RGD mimétique, antagoniste de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. C'est un inhibiteur non compétitif de la région synergique de la fibronectine (FN) établi à partir de la séquence PHSRN ; cette région a pour fonction d'augmenter l'affinité et la spécificité de la liaison réalisée par le domaine RGD rendant l'interaction intégrine $\alpha 5\beta 1$ -FN plus forte. L'implication de la séquence PHSRN dans l'induction de l'invasion cellulaire a conduit à la synthèse de molécules comme l'ATN-161 (Livant DL, *J. Clin. Invest.*, 2000). Toutefois, différentes études ont pu démontrer la liaison de l'ATN-161 à la sous-unité β de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et à l'intégrine $\alpha v\beta 3$ ce qui conduit à une activité anti-tumorale et anti-métastatique dans différents types de cellules cancéreuses (Tableau 8).

L'ATN-161 est également capable d'inhiber la phosphorylation des protéines de la voie des MAPK (Khalili P, *Mol. Cancer Ther.*, 2006 ; Stoeltzing O, *Int. J. Cancer*, 2003). L'ATN-161 est actuellement en cours d'essais cliniques de phase II, associé au carboplatine dans le traitement des glioblastomes récurrents. Les résultats obtenus à l'issue de l'essai clinique de phase I dans les tumeurs solides (prostate, colon, rein ...) avaient mis en évidence une bonne tolérance de la molécule quelles que soit les doses utilisées et un prolongement de la phase de stabilisation de la maladie chez un tiers des patients (Cianfrocca ME, *Br. J.Cancer.*, 2006).

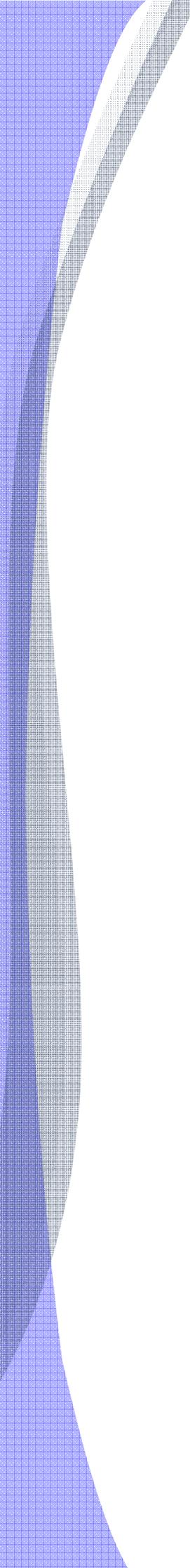
Le SJ749 est le premier antagoniste, RGD mimétique, non-peptidique de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ (**Tableau 8**). Il exerce son activité sur les cellules endothéliales en inhibant leur migration et il inhibe leur adhérence cellulaire à la fibronectine (Kim S, *Am. J. Pathol.*, 2000 ; Smalheer JM, *Bioorg. Med. Chem. Letters*, 2004). Les études réalisées au laboratoire ont mis en évidence que le SJ749 était capable d'inhiber la prolifération, l'adhérence à la FN et la formation de colonies de cellules de glioblastome exprimant l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ (Maglott A, *Cancer Res.*, 2006). De plus, l'utilisation de cet antagoniste (au même titre que l'antagoniste K34c ; voir ci-dessous) conduit à l'inhibition de la sénescence prématurée induite par le traitement chimiothérapeutique et facilite l'apoptose des cellules de glioblastomes exprimant la protéine p53 sauvage (Martinkova E, *Int. J. Cancer*, 2010).

Le JSM6427 est un antagoniste très affiné de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, basé sur un châssis tyrosine mimétique RGD. Son activité *in vivo* et *in vitro* sur les cellules endothéliales a été décrite dans différentes études. Il induit l'apoptose des cellules endothéliales, inhibe leur prolifération et la lymphangiogenèse (Dietrich T, *Am. J.Pathol.*, 2007) (**Tableau 8**). Le JSM6427 est capable d'inhiber *in vivo* la croissance des gliomes, diminue la densité des cellules microgliales retrouvées à la périphérie de la tumeur et inhibe la phosphorylation de la protéine ERK induite par la liaison à la FN (Farber K, *Mol. Cell Neurosci.*, 2008 ; Umeda N, *Mol. Pharmacol.*, 2006). Cette molécule fait l'objet d'un essai clinique de phase I dans le cadre de la dégénérescence maculaire avancée.

Le K34c fait partie des nouvelles molécules non-peptidiques antagonistes sélectives de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ révélées par les études du groupe Kessler.

Cette molécule, comme le SJ749, est un mimétique de la séquence RGD qui montre une bonne affinité pour l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ [avec une IC_{50} (*half maximal inhibitory concentration*) de 3,1nM contre 1,8nM pour le SJ749] ([Heckmann D, ChemBioChem., 2008](#)).

Des antagonistes combinés des intégrines $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha v\beta 3$ ont récemment fait leur apparition dans une étude réalisée par Gentilucci et ses collaborateurs. Certaines de ces molécules montrent des effets intéressants sur l'inhibition de l'angiogenèse (testée sur des cellules HUVEC) et inhibent l'adhésion à la FN et à la VN ([Gentilucci L, J. Med. Chem., 2010](#)). L'intérêt de ce type d'approche est de pouvoir combiner les effets thérapeutiques obtenus avec des antagonistes de ces différentes intégrines.



INTRODUCTION

PARTIE 2 :

La cavéoline-1

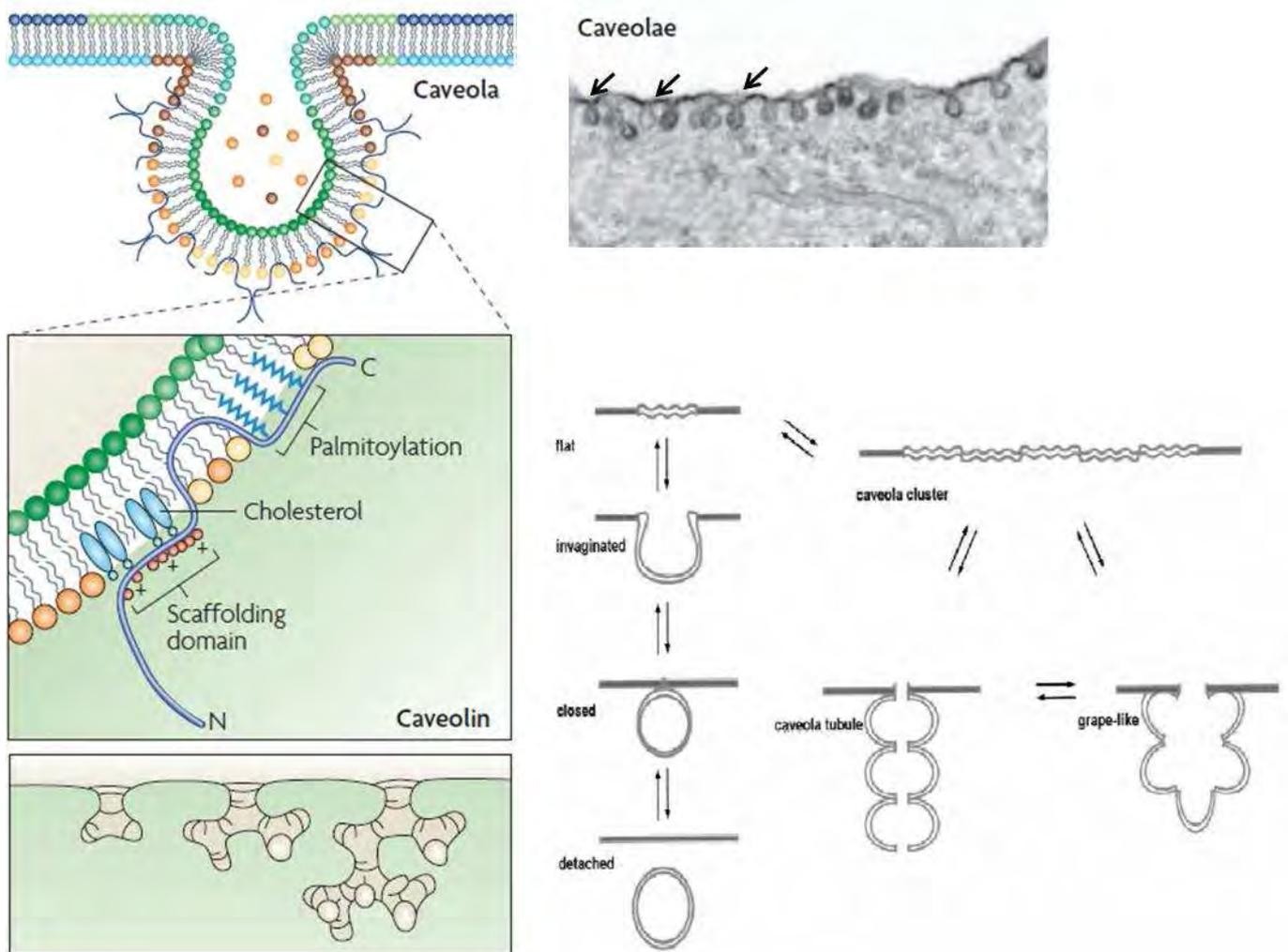


Figure 19. Les différentes morphologies des cavéoles et la localisation de la cavéoline-1 au sein des cavéoles (adapté de [Parton RG, Nat. Mol. Cell Biol., 2007](#) ; [Matveev S, Adv. Drug Deliv. Rev., 2001](#)). Les cavéoles ont une structure en forme Ω et sont constituées de cavéoline (partie gauche de la figure). Elles peuvent aussi adopter d'autres formes (partie droite). Les cavéoles peuvent atteindre une taille de 300nm en fonction de leur contenu en cavéoline et en cholestérol : ce sont des microdomaines membranaires dynamiques qui changent de forme en réponse aux forces exercées.

II/ La cavéoline-1

II-1/ Présentation des cavéoles

II-1-1/ Structure et distribution des cavéoles

Décrites et nommées pour la première fois dans les années 1950 (Palade GE, *J. Appl Phys.*, 1953 Abst ; Yamada E, *J. Biophys. Biochem.*, 1955 Abst) grâce à la microscopie électronique, les cavéoles (ou petites « caves ») sont des invaginations de la membrane plasmique de 50 à 100 nm (**figure19**). Les cavéoles sont impliquées dans différents processus cellulaires tels que le processus d'endocytose, de transcytose (Schubert W, *J. Biol. Chem.*, 2001) et de potocytose (Anderson RG, *Science*, 1992), dans le transport du cholestérol (Smart EJ, *J. Biol. Chem.*, 1996), dans la transduction des signaux intracellulaires mais également dans les processus d'oscillations calciques (Isshiki M, *J. Cell Sci.*, 2002). Ces structures, en forme d'omega (Ω), sont présentes dans la plupart des tissus mais sont les plus abondantes au sein des adipocytes, des cellules endothéliales, des pneumocytes de type 1, des fibroblastes et des cellules musculaires lisses et striées (Anderson RG, *Annu. Rev. Biochem.*, 1998 ; Parton RG, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2007). En fait, la présence et la proportion des cavéoles dans les cellules et, par extension, dans les tissus dépendent de la présence de la cavéoline : si le tissu contient beaucoup de cavéoline il contiendra aussi beaucoup de cavéoles (Parton RG, *J. Cell Sci.*, 2006). Les cavéoles sont retrouvées au niveau de la membrane plasmique mais également dans le cytosol où elles forment des vésicules discrètes de formes différentes. Malgré certaines discordances bibliographiques, il est communément admis que les cavéoles sont capables de se détacher de la membrane plasmique (Anderson RG, *Science*, 1992 ; Chang WJ, *J. Cell Biol.*, 1992 ; Schnitzer JE, *J. Cell Biol.*, 1994). Les cavéoles sont des microdomaines membranaires constitués de molécules lipidiques et de protéines. La composition lipidique exacte des cavéoles n'est pas complètement dévoilée mais elles sont riches en cholestérol et en sphingomyéline (et la plupart des phospholipides en sont absents ou en faible quantité). L'importance du cholestérol dans la structure et la fonction des cavéoles a été établie grâce à l'utilisation de différents composés capables de dépléter le cholestérol (oxydase du cholestérol, la filipine, nystatin et méthyl- β -cyclodextrine) (Smart EJ, *J. Cell Biol.*, 1994 ; Orlandi PA, *J. Cell Biol.*, 1998 ; Rothberg KG, *Cell*, 1992).

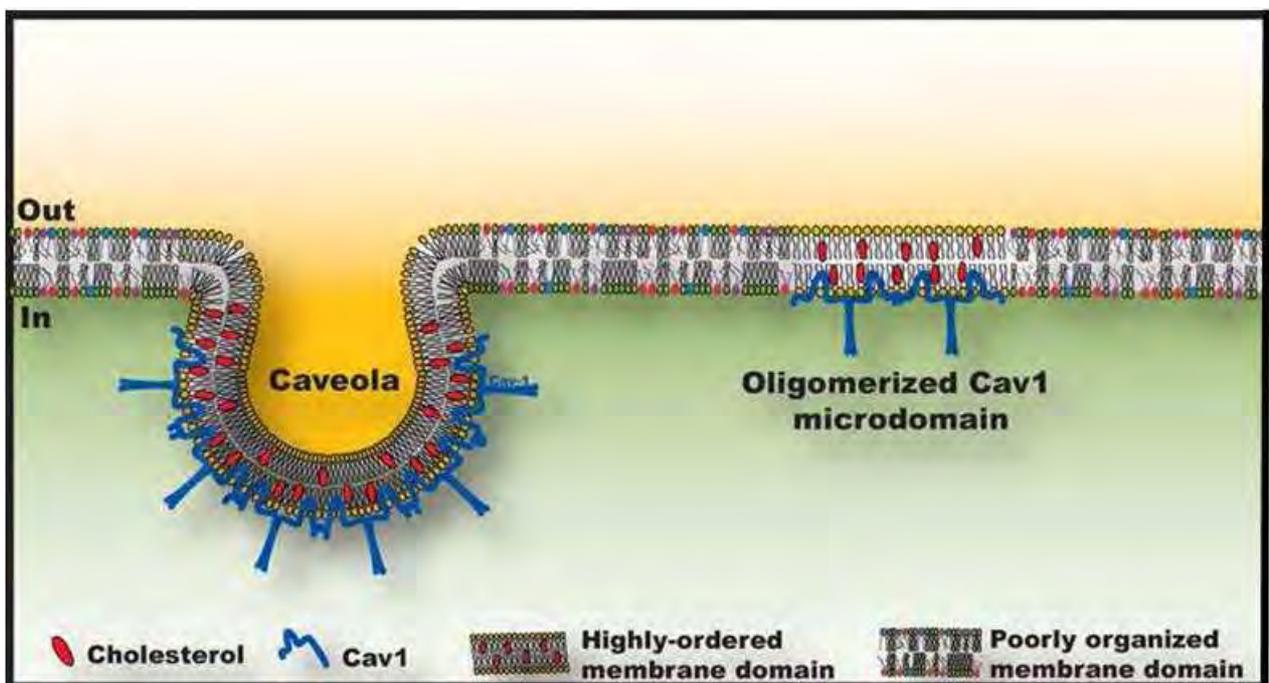


Figure20. La membrane plasmique présente des domaines hautement et faiblement organisés (adapté d'après [Goetz J, Cancer Metast. Rev., 2008](#)). Les cavéoles, en forme de Ω , sont des domaines membranaires hautement organisés (highly-ordered membrane domain) riches en cholestérol.

Le transport du cholestérol est bloqué par un traitement des fibroblastes humains ou des cellules MA104 avec de la progestérone : la cavéoline est alors accumulée au niveau du lumen du réticulum endoplasmique (RE). Le traitement des cellules par des agents déplaçant le cholestérol conduit à un aplatissement de la membrane plasmique avec une disparition des cavéoles et de la cavéoline qu'elle contient. Les cavéoles sont des organites cellulaires relativement mobiles de par leurs interactions avec le cytosquelette. De ce fait, la réorganisation du cytosquelette d'actine engendre une redistribution des cavéoles à l'intérieur de la cellule. Ce processus est particulièrement visible lors d'un traitement cellulaire par de la cytochalasine D (drogue dépolymérisant l'actine) induisant une augmentation de la motilité de la cavéoline-1 visualisée par un marquage membranaire par la GFP (Head BP, *J. Biol. Chem.*, 2006 ; Pelksmans L, *Science*, 2002). Au contraire, la dépolymérisation des microtubules par le nocodazole diminue cette mobilité (Mundy DI, *J. Cell Sci.*, 2002). D'autres agents induisent la mobilité des cavéoles tels que les inhibiteurs de phosphatases comme l'acide okadaïque ou le vanadate qui vont promouvoir non seulement leur mobilité mais aussi leur internalisation et leur agrégation au niveau des régions péri-nucléaires (Stahlhut M, *Exp. Cell Res.*, 2000). Les inhibiteurs de kinases tels que la staurosporine ou la cytochalasine D inhibent leur internalisation alors que les esters de phorbol (Anderson HA, *Mol. Biol. Cell.*, 1996) et les activateurs de la PKC (PMA) induisent leur disparition (Parton RG, *J. Cell Biol.*, 1994 ; Smart EJ, *J. Cell Biol.*, 1994). Les cavéoles appartiennent à la famille des rafts (ou radeaux) lipidiques qui correspondent à des domaines lipidiques riches en glycosphingolipides, en sphingomyéline, en protéines et en cholestérol (**figure20**). Ces domaines sont assimilés à des domaines membranaires dits organisés (**figure20**). Des domaines dits désorganisés co-existent avec ces domaines organisés et les lipides peuvent aisément circuler d'un domaine à l'autre. C'est leur résistance à une extraction aux détergents qui a conduit à l'idée que les cavéoles appartenaient à la famille des rafts lipidiques.

II-1-2/ Internalisation des pathogènes par les cavéoles

Certains virus non-enveloppés comme le virus SV40 (*Simian Virus 40*) utilisent l'endocytose par les cavéoles afin de pénétrer à l'intérieur des cellules (Anderson HA, *Mol. Biol. Cell.*, 1996 ; Pelksmans L, *Science*, 2002).

| | Affinité pour les cavéoles | Récepteurs | Type cellulaire | Références |
|---|----------------------------|----------------------------------|---------------------------------|---|
| Toxines | | | | |
| Choléra | ++ | GM1 gangliosides | Caco-2, Hela, BHK | <i>Torgersen ML, J. Cell Sci., 2001</i> |
| Tétanos | ++ | Protéines GPI | PC12 | <i>Herreros J, Mol. Biol. Cell, 2001</i> |
| Virus | | | | |
| SV40 | ++ | MHC1 (TM), ND | CV-1, Hela | <i>Anderson HA, Mol. Biol. Cell, 1996; Pelkmansl, Science, 2002</i> |
| Polyomavirus | ++ | Acide sialique, GM1 gangliosides | NIH3T6, NMUMG | <i>Richterova Z, J. Virol., 2001; Mackay RL, J. Virol., 1976</i> |
| Echovirus | + | Intégrine $\alpha 2\beta 1$ | SAOS (wt et $\alpha 2\beta 1$) | <i>Marjomaki V, J. Virol., 2002</i> |
| Virus respiratoire syncytial | + | ? | NM7 | <i>Werling D, J. Leukoc. Biol., 1999</i> |
| Bactéries | | | | |
| Bactéries exprimant FimH (E. Coli) | ++ | CD48 | BMMCs | <i>Shin JS, Science, 2000</i> |

Tableau9. Les cavéoles : une voie d'entrée pour les pathogènes dans les cellules eucaryotes (adapté d'après [Pelkmans L, Traffic, 2002](#)). MHC1 : *major histocompatibility complex I antigen* ; TM : transmembranaire ; ND : non déterminée ; Caco-2 : *human epithelial colorectal adenocarcinoma* ; Hela : cellules du cancer du col de l'utérus ; BHK : *baby hamster kidneys* ; CV-1 : *african green monkey kidney cells* ; NIH3T3 : fibroblastes embryonnaires de souris ; SAOS : *human osteosarcoma cells* ; NM7 : *nasal epithelial cells* ; BMMCs : *Mouse bone marrow-derived mast cells*.

L'expression d'un mutant dominant négatif de la cavéoline-1 abolit l'internalisation et l'infection des cellules par le SV40 alors que l'inhibition de la voie d'endocytose dépendante de la clathrine n'affecte ni l'internalisation, ni l'infection par la SV40. Les vésicules cavéolaires, contenant des particules virales, ont un diamètre de 60 à 70nm environ. La dépolymérisation de l'actine corticale semble nécessaire au détachement de ces vésicules de la membrane vers le cytosol (Pelkmans L, Nat. Cell Biol., 2001). Ces vésicules sont nommées cavéosomes : elles sont caractérisées par leur contenu riche en cholestérol et en glycosphingolipides et par leur pH neutre contrairement aux endosomes et aux lysosomes qui possèdent un pH acide. Les anticorps dirigés contre des marqueurs spécifiques de différentes vésicules tels que les endosomes, les lysosomes, le complexe de golgi ou les vésicules trans-golgiennes ou le réticulum endoplasmique ne marquent pas les cavéosomes.

Certes, les cavéoles ont été impliquées dans l'endocytose de virus (Werling D, J. Leukoc. Biol., 1999 ; Mackay RL, J. Virol., 1976 ; Marjomaki V, J. Virol., 2002) mais également dans celle de toxines (Herreros J, Mol. Biol. Cell, 2001 ; Torgersen ML, J. Cell Sci., 2001) de bactéries (Shin JS, Science, 2000), de parasites (*plasmodium falciparum*) (Lauer S, EMBO J., 2000), de champignons (*pneumocytis carinii*) et de protéines du prion (Vey M, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996) (Tableau 9). Cette voie d'entrée dans les cellules évite aux pathogènes d'être dégradés (par la voie lysosomale par exemple).

II-1-3/ Les cavéoles et leur fonction de recyclage

Certaines protéines requièrent la cavéoline-1 pour leur adressage membranaire comme le récepteur de l'angiotensine II de type I ou le récepteur de l'insuline (dans les adipocytes, *in vivo*) (Wyse BD, J. Biol. Chem., 2003; Cohen AW, Am. J. Physiol. Cell Physiol., 2003). De manière similaire, le récepteur du TGF β est constitutivement endocyté par deux mécanismes dépendants et indépendants (par l'intermédiaire des cavéosomes) des puits coatés de clathrine. Alors que le premier mécanisme conduit à promouvoir la signalisation issue du récepteur, le second conduit au « turnover » (ou renouvellement) du récepteur. Par exemples, certaines protéines impliquées dans la transduction du signal (SARA, Smad2) sont retrouvées dans les endosomes et les protéines conduisant le récepteur vers la dégradation sont retrouvées dans les cavéosomes (Di Guglielmo GM, Nat. Cell Biol., 2003).

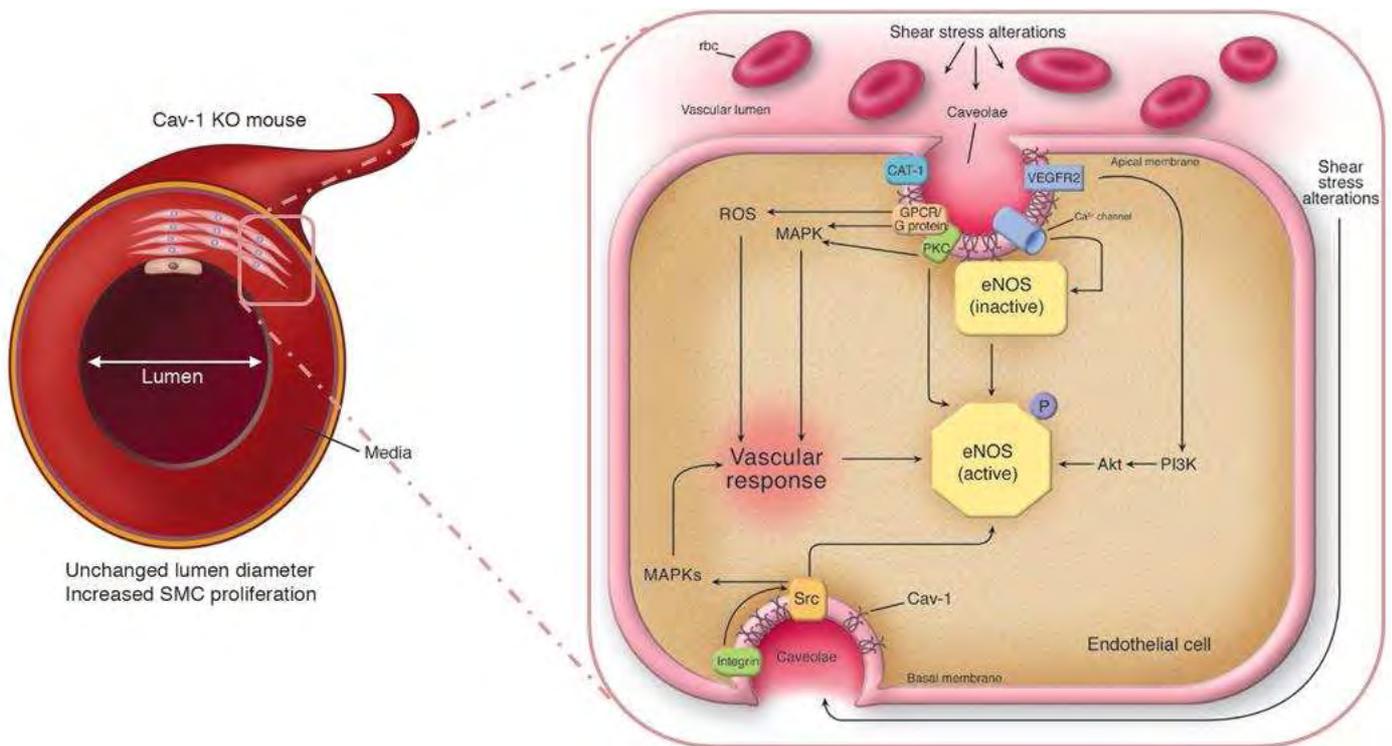


Figure 21. La cavéoline-1 module différentes voies de signalisation dans les cellules endothéliales (adapté de Frank PG, *J. Clin. Invest.*, 2006). En absence de stimuli, la eNOS est maintenue dans un état inactif. Après stimulation (shear stress) la eNOS peut être activée selon différentes voies de signalisation : VEGFR2 active la voie PI3K-Akt, les récepteurs des protéines G activent la voie des MAPK

Les cavéoles sont également capable, avec l'aide des protéines membranaires associées aux GPI, de concentrer certaines petites molécules telles que le récepteur du folate (FR). Ces récepteurs sont regroupés, grâce à des interactions avec la partie lipidique des protéines GPI, au niveau de la membrane en cluster (soit 30 000 molécules par μm^2). Les cavéoles peuvent alors se détacher de la membrane et le folate est libéré de son récepteur grâce à un gradient de protons. Les protéines peuvent être libérées puisqu'elles ne sont pas dégradées (Anderson RG, Science, 1992). Ce mécanisme, nommé potocytose, concerne d'autres types de protéines ou de molécules : il offre à la cellule une possibilité différente de contrôler la biodisponibilité des ligands ou des récepteurs.

II-1-4/ Cavéoles et cavéolines : des mécanocepteurs

L'implication de la cavéoline-1 et des cavéoles dans les processus de mécanoception cellulaire a été mise en évidence grâce à des études *in vivo* menées sur des souris Cav1^{-/-}. Le flux sanguin exerce une force aux niveaux des cellules endothéliales (les *shear stress*) qui provoque une augmentation du taux de cavéoline-1 membranaire et une redistribution de la protéine (Yu J, J. Clin. Invest., 2006 ; Park H, Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., 2000). Certaines voies de signalisation sont également activées (eNOS et MAPK) et la phosphorylation de la cavéoline-1, dépendante de l'intégrine $\beta 1$, est augmentée (Figure 21). Ici, la cavéoline-1 participe à la mécanotransduction via les intégrines (Radel C, Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., 2005).

II-2/ Présentation des cavéolines

II-2-1/ La famille des cavéolines

La cavéoline-1 a été initialement identifiée comme étant une protéine de 22kDa dont la phosphorylation des tyrosines était corrélée à la transformation des fibroblastes par le virus du sarcome de roux (rsv) (Gleney JR, J. Cell Biol., 1989). En 1992, Kurzchalia et ses collaborateurs identifient un certain nombre de protéines insolubles au détergent CHAPs dont la protéine VIP-21, dans les cellules de mammifères (Kurzchalia TV, J. Cell Biol., 1992).

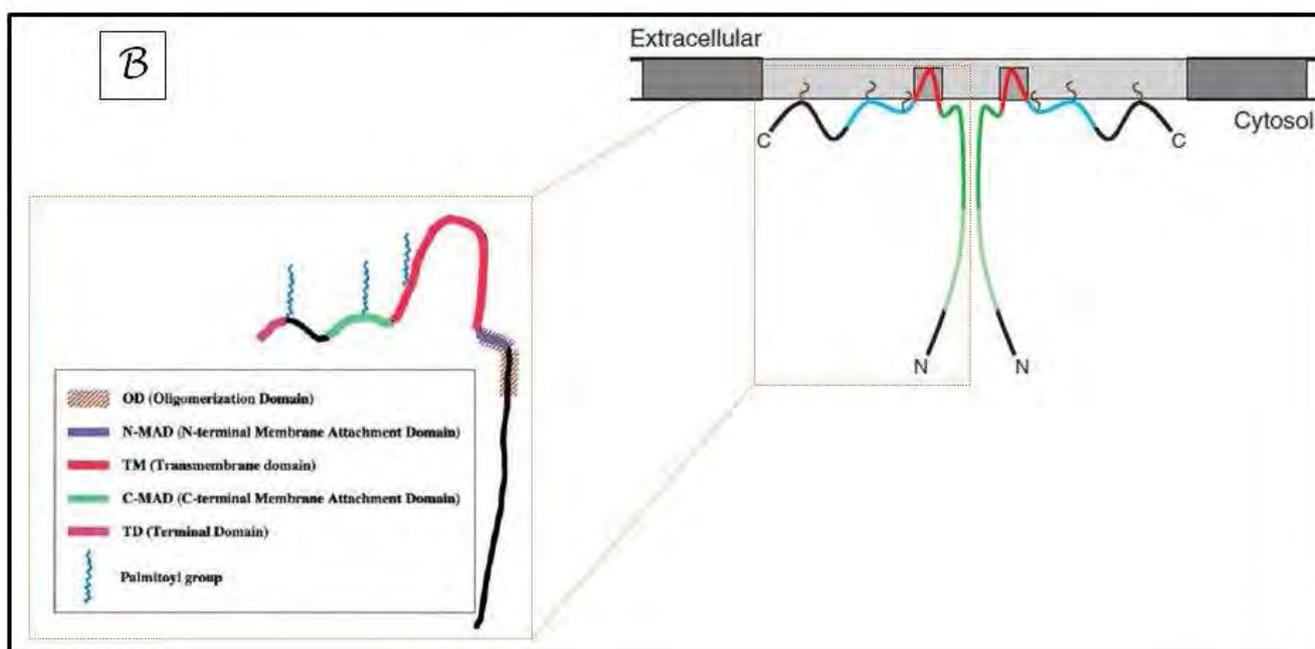
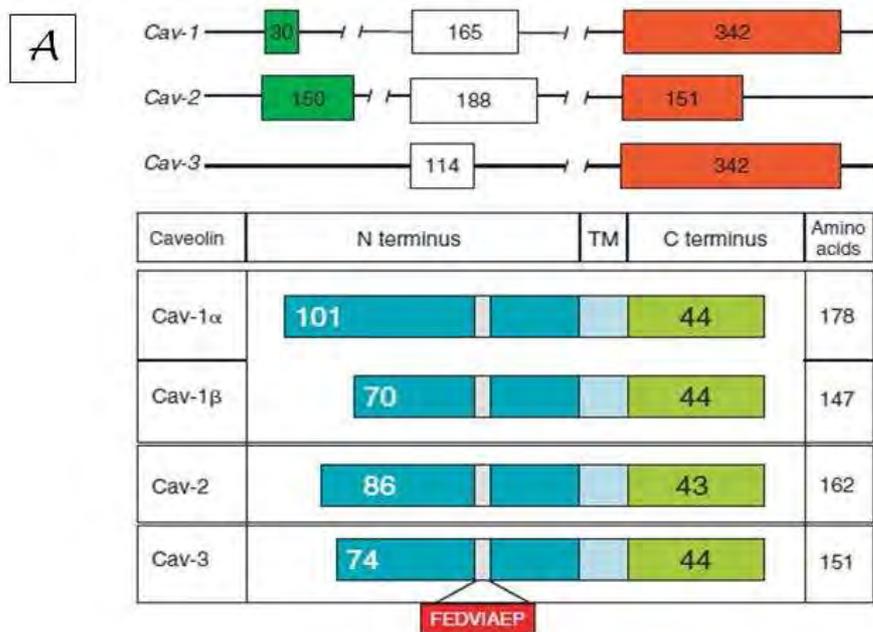


Figure 22. La famille des gènes de la cavéoline (adapté de [Razani B, Pharmacol. Rev., 2002](#) et de [Hnasko R, Mol. Interv., 2003](#)). A, position des différents exons et la taille des protéines (*amino acids*, acides aminés) et position du motif FEDVIAEP. B, topologie de la cavéoline-1 avec ces différents domaines membranaires (N-MAD, C-MAD), TM : domaine trans-membranaire).

Les travaux de Glenney montrèrent alors que les séquences de la protéine VIP-21 et de la cavéoline-1 étaient identiques et qu'il s'agissait, par conséquent, de la même protéine (Glenney JR, *FEBS Lett.*, 1992). La cavéoline-1 possède des domaines hydrophobes qui sont insérés au niveau de la membrane plasmique et ses extrémités N et C-Termiales sont cytoplasmiques (**figure22**). La stabilisation de la protéine à la membrane plasmique est réalisée par trois résidus cystéine palmitoylés. Deux isoformes de la cavéoline-1 ont été identifiées : l'isoforme Cav-1 α et Cav-1 β . L'isoforme α est prédominante et est constituée de 178 résidus alors que l'isoforme β , de 147 résidus, provient de l'épissage alternatif du site d'initiation Met32). La cavéoline-2 (Cav-2 α) est également composée de trois exons codant une protéine de 162 résidus avec une séquence proche de celle de la cavéoline-1(**figure22**). Des isoformes tronquées de la cavéoline-2 (Cav-2 β et Cav-2 γ) ont pu être identifiées mais pas encore caractérisées (Scherer PE, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996). La cavéoline-3 a été identifiée, en recherchant des gènes homologues à la cavéoline-1, grâce à l'analyse de bases de données et l'analyse de banques d'ADNc. La cavéoline-3 est composée de deux exons et code pour une seule protéine mature de 151 résidus (**figure22**). Les cavéolines 1 et 2 ont une distribution quasi ubiquitaire alors que l'expression de la cavéoline-3 est presque exclusivement restreinte au tissu musculaire, où elle est impliquée dans la formation des tubules T. Par ailleurs, les cavéoline-1 et -2 n'étant pas ou peu exprimées par les cellules trophoblastiques, les lymphocytes ou encore les cellules transformées, l'endocytose par les cavéoles ne peut avoir lieu dans ces cellules (Fra AM, *J. Biol. Chem.*, 1994 ; Koleske AJ, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995). Les cavéolines 1 et 2 forment des hétérodimères dans la plupart des types cellulaires alors que la cavéoline-3 forme des homodimères dans les myocytes des muscles striés. La cavéoline-1 a une fonction structurale et peut former des homo- ou des hétéro-oligomères avec la cavéoline-2. Néanmoins, la cavéoline-1 est requise pour le transport de la cavéoline-2 à la membrane (Parolini I, *J. Biol. Chem.*, 1999 ; Mora R, *TBC*, 1999).

Le pourcentage d'homologie entre la cavéoline humaine et celle retrouvée chez *Caenorhabditis elegans* est très élevé augurant d'une grande conservation au cours de l'évolution et par conséquent une fonction essentielle.

Par ailleurs, les cavéolines présentes toutes un motif structural identique FEDVIAEP, une signature hautement conservée au cours de l'évolution (**figure22A**). La cavéoline-1 fut le premier membre de la famille des cavéolines à avoir été identifié ; elle a donc servi de modèle pour l'étude de la fonction des cavéolines et des cavéoles. La région centrale de la protéine contient 33 acides aminés hydrophobes qui agissent comme un point d'ancrage à la membrane et permettent à la protéine d'adopter une configuration « hairpin » avec ses domaines C et N-terminaux faisant face à la membrane (**figure22B**).

Des études basées sur la délétion des régions N-MAD et C-MAD de la cavéoline-1 ont révélé le rôle de ces régions dans l'attachement de la cavéoline-1 à la membrane ([Schlegel A, J. Biol. Chem., 1999](#)). Le domaine C-MAD (*C-terminal membrane attachment domain*) permet la localisation trans-golgienne de la cavéoline-1 alors que le domaine N-MAD (*N-terminal membrane attachment domain*) localise la cavéoline-1 au niveau de la membrane (**figure22B**). De plus, la cavéoline-1 est palmitoylée au niveau de trois résidus cystéine (Cys133, Cys143 et Cys 156) qui jouent un rôle dans l'oligomérisation et la stabilisation de la cavéoline-1 ([Das K, J. Biol. Chem., 1999](#) ; [Dietzen DJ, J. Biol. Chem., 1995](#) ; [Monier S, FEBS Letter, 1996](#)). Les résidus 61 à 101 correspondent à la région d'auto-oligomérisation. La cavéoline-1 possède un domaine CSD (*Caveolin Scaffolding Domain*) identifié au niveau des résidus 82 à 101. Ce domaine hydrophobe permet à la cavéoline-1 d'interagir avec de nombreuses protéines possédant un domaine CBD (pour *Caveolin Binding Domain*) reconnaissant le domaine CSD de la cavéoline-1. D'après Couet et ses collaborateurs, ce domaine CSD reconnaît une série de séquence consensus $\Phi X \Phi X X X X \Phi$, $\Phi X X X X \Phi X X$ ou encore $\Phi X \Phi X X X X \Phi X X \Phi$ où Φ représente un résidu aromatique (Tryptophane, Phénylalanine ou Tyrosine) ([Couet J, J. Biol. Chem., 1997](#)).

II-2-2/ La cavéoline-1 : protéine de structure des cavéoles

La cavéoline-1 est une protéine nécessaire à la formation des cavéoles. Récemment, une autre protéine cytosolique, la cavine (PTRF, *polymerase transcript release factor*) a été impliquée dans la formation et l'organisation des cavéoles ([Lui L, J. Biol. Chem., 2008](#) ; [Vinten J, Biochim. Biophys. Acta, 2005](#)) mais également dans la fonction de ces organites ([Hill MM, Cell, 2008](#)). Le rôle de la cavéoline-1 dans la formation et la fonction des cavéoles a longtemps été controversé.

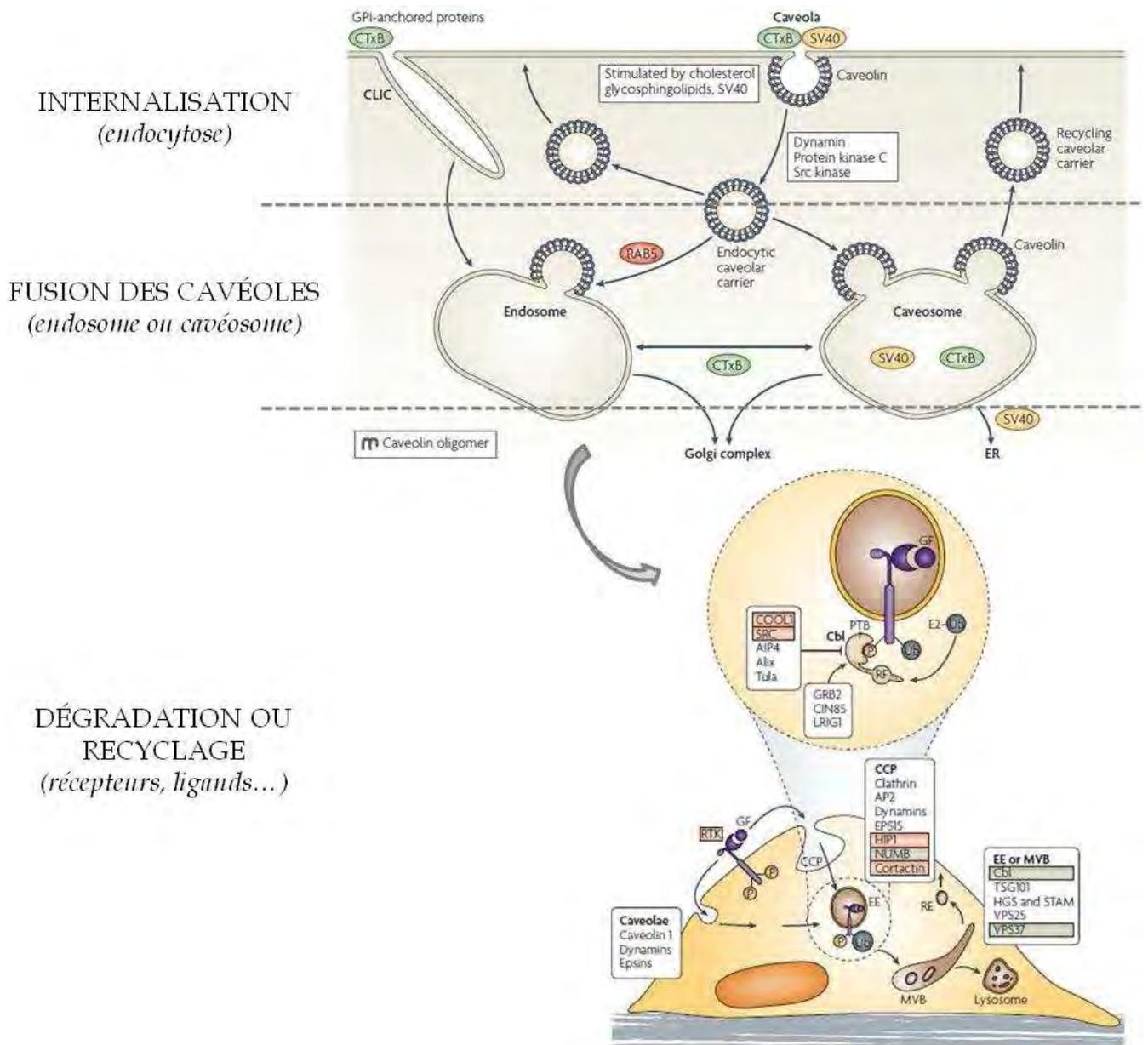


Figure 23. L'endocytose par les cavéoles (adapté de Parton RG, *Nat. Mol. Cell Biol.*, 2007 et de Mosesson Y, *Nat. Rev. Cancer*, 2008). Les molécules endocytées par les cavéoles fusionnent avec les endosomes ou les cavéosomes. Elles sont alors dégradées ou recyclées.

D'une part, l'expression de la cavéoline-1 est suffisante pour générer les cavéoles dans les lymphocytes (Fra A, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 1995) ou dans les cellules FRT (*Fisher Rat Thyroid*) (Lipardi C, *J. Cell Biol.*, 1998). De plus, les souris Knock-out pour le gène de la cavéoline-1 montrent une disparition totale de l'organite ce qui met en évidence la nécessité absolue de la cavéoline-1 dans la formation des cavéoles (Drab M, *Science*, 2001). En revanche, des expériences de siRNA dirigé contre la cavéoline-1 suggèrent une endocytose tout à fait normale en absence de la cavéoline-1 (Nichols BJ, *Nat. Cell Biol.*, 2002). De surcroît, la sur-expression de la cavéoline-1 conduit à l'inhibition de l'endocytose (Minshall RD, *J. Cell Biol.*, 2000 ; Le PU, *J. Cell Sci.*, 2003). Dans ce contexte, la formation des cavéoles dépendrait effectivement de la cavéoline-1 mais l'importance de la cavéoline-1 dans le processus d'endocytose, la fonction première des cavéoles, demeure incertaine et les travaux parus dans ce domaine alimentent la controverse (figure23).

Les cavéoles sont capable de fusionner avec des cavéosomes mais aussi avec des endosomes par un mécanisme dépendant de Rab5 (figure23). Les termes de membranes résistantes aux détergents (DRM) ou de DIG (pour *detergent-insoluble glycolipid-rich membrane*) sont utilisés afin de définir biochimiquement les radeaux lipidiques et donc les cavéoles. Un pool de cavéoline-1 nouvellement synthétisé est observé dans différents types cellulaires et ce pool n'est pas associé au DRM (Parton RG, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2007) indiquant que la cavéoline-1 ne serait pas uniquement associée aux cavéoles. Ces données suggèrent que la cavéoline-1 existe en dehors des cavéoles et qu'elle possède d'autres fonctions indépendamment de son rôle dans l'endocytose.

II-2-3/ Synthèse et dynamique intra-cellulaire de la cavéoline-1

La cavéoline-1 est une protéine membranaire qui est synthétisée au sein du RE selon un processus dépendant du signal SRP (*signal recognition particle*) (Monier S, *Mol. Biol. Cell*, 1995). Suite à une première étape d'oligomérisation au sein même du RE, la cavéoline-1 est transportée du RE vers l'appareil de golgi où les propriétés de la protéine sont modifiées (Monier S, *FEBS*, 1996).

La sortie de la cavéoline-1 de l'appareil de Golgi est associée au processus d'oligomérisation de la cavéoline-1 qui se retrouve associée au cholestérol et à des domaines lipidiques riches en glycosphingolipides. Le cholestérol régule par ailleurs le trafic golgien de la cavéoline-1 dont il accélère la sortie (Pol A, Mol. Biol. Cell, 2005). Le transit de la cavéoline-1 à travers l'appareil de Golgi est relativement lent ce qui permet de visualiser par microscopie la cavéoline-1, marquée (anticorps anti-Go-cav), nouvellement synthétisée (Pol A, Mol. Biol. Cell, 2005). De nombreuses protéines, récemment identifiées, jouent un rôle important dans ce processus d'adressage des complexes cavéoline-1/cholestérol à la membrane. Le trafic du cholestérol entre les cavéoles et les membranes intra-cellulaires peut s'effectuer grâce aux protéines de transport SNAPs et SNAREs (Schnitzer JE, J. Biol. Chem., 1995). D'ailleurs, la syntaxine-6 (protéine SNAREs pour *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors*) est également impliquée dans le processus d'adressage de la cavéoline-1 à la membrane tout comme des protéines associées aux GPI (glucosyl phosphatidylinositol) et des gangliosides (GM1) (Choudhury A, Nat. Cell Biol., 2006). Par ailleurs, la cavéoline-1 est palmitoylée sur différentes cystéines au niveau des derniers compartiments de l'appareil de Golgi mais cette modification ne joue aucun rôle dans le transport et la localisation de la cavéoline-1 (Dietzen D, J. Biol. Chem., 1995). Enfin, au cours des différentes étapes de sa synthèse, la cavéoline-1 passe d'une forme monomérique (soluble aux détergents) à une forme oligomérique (insoluble aux détergents). Cette dernière suggère l'association de la cavéoline-1 avec des radeaux lipidiques (Parton RG, J. Cell Sci., 2006).

Différentes études ont mis en évidence un pool cytosolique de cavéoline-1 appartenant à un complexe de protéines chaperonnes comprenant la cavéoline-1, la hsp56, la cyclophiline 40, la cyclophiline A mais aussi le cholestérol (Uittenbogaard A, J. Biol. Chem, 1998). Liu et ses collaborateurs mettent également en évidence la sécrétion de cavéoline-1 dans le milieu extracellulaire (Liu P, Nat. Cell Biol., 1999). Cette cavéoline-1 sécrétée, co-fractionnée avec l'apolipoprotéine, pourrait faire partie de complexe lipidique sécrété par les cellules pancréatiques.

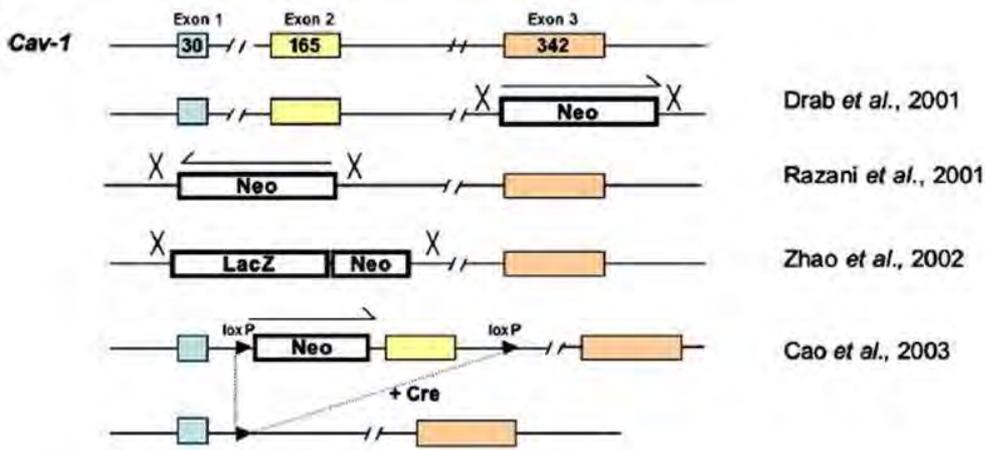


Figure24. Génération des souris KO pour le gène de la cavéoline-1. Une cassette néomycine a été utilisée dans toutes les constructions. Adaptée de [Le Lay S, Biochim. Biophys. Acta, 2005](#).

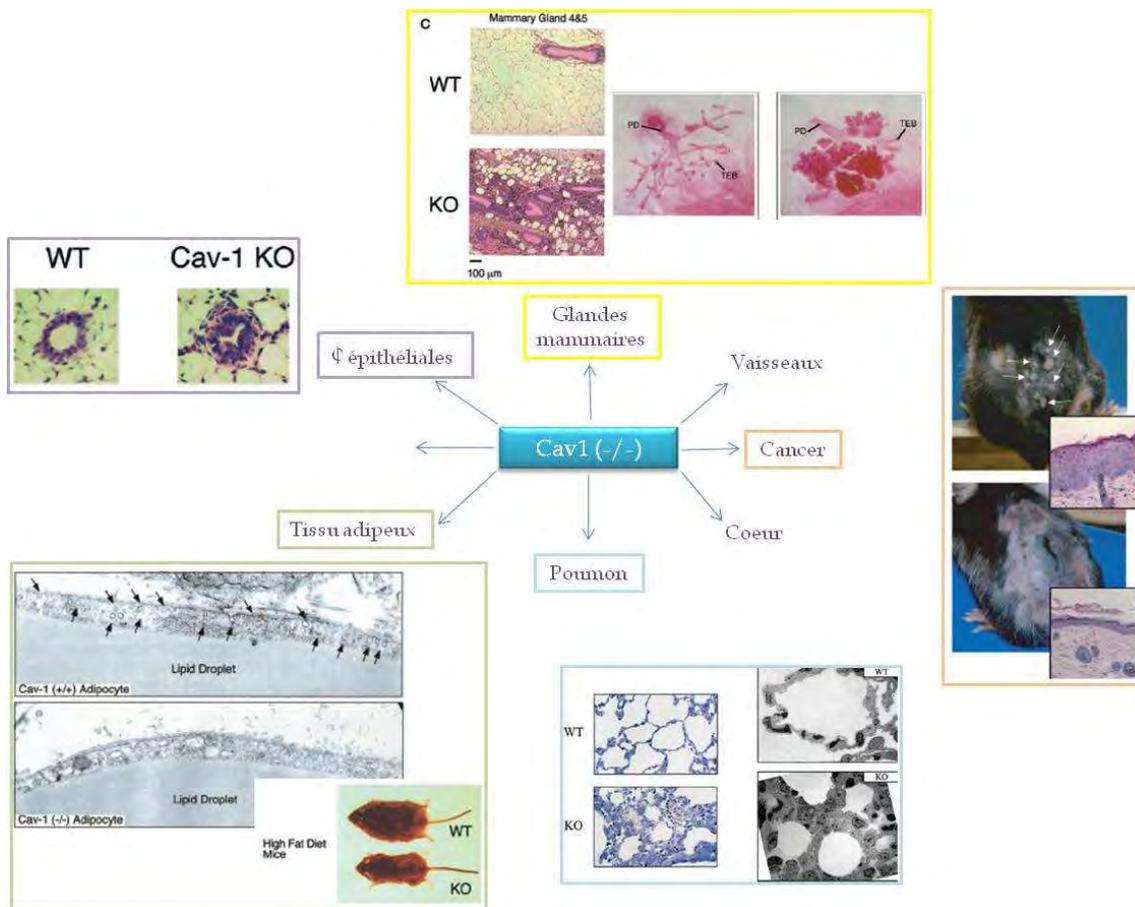


Figure25. Les souris déficientes en cavéoline-1 présentent de nombreuses affections (adapté d'après [Hnasko R, Mol. Interv., 2003](#) ; [Razani B, J. Biol. Chem., 2001](#) ; [Lee H, Am. J. Pathol., 2002](#)). Les souris *cav1*^{-/-} possèdent un taux normal de HDL mais présentent: un dysfonctionnement pulmonaire, une résistance à l'insuline, une lactation prématurée, un dysfonctionnement urinaire, une hypertrophie cardiaque et une diminution de la durée de vie. φ pour cellules.

La cavéoline-1 est une protéine particulièrement dynamique qui se retrouve dans tous les compartiments cellulaires et dans le milieu extra-cellulaire ; elle joue un rôle décisif dans la régulation de différents gènes, protéines et voies de signalisation.

II-3/ Les multiples fonctions de la cavéoline-1

II-3-1/ Les souris cavéoline-1 KO

L'étude des animaux KO pour le gène de la cavéoline-1 a apporté beaucoup de réponses sur le rôle de la cavéoline-1 dans différentes pathologies, notamment dans le cancer. La génération de souris déficientes en cavéoline-1 a été réalisée de manière simultanée dans deux équipes, américaine (Razani B, *J. Biol. Chem.*, 2001) et allemande (Drab M, *Science*, 2001) selon des stratégies expérimentales proches (insertion d'une cassette néomycine) (**Figure24**). Ces deux équipes rapportent une absence de cavéoles identifiables dans les cellules endothéliales ou adipeuses où la cavéoline-1 est normalement exprimée. Ces données semblent donc indiquer que la cavéoline-1 est le principal médiateur de la formation des cavéoles. Ces souris présentent une hyper-prolifération endothéliale et une augmentation de la perméabilité microvasculaire *in vivo* (Razani B, *J. Biol. Chem.*, 2001) (**Figure25**). De plus, ces animaux souffrent d'un grave dysfonctionnement du système cardiovasculaire avec une dérégulation de la voie calcique et de celle du NO (Drab M, *Science*, 2001). L'injection d'un peptide contenant le domaine CSD de la cavéoline-1 dans ces souris conduit à une diminution de l'hyper-perméabilité vasculaire et de la vasodilatation induite par le NO avec une inhibition de l'activation de la eNOS (Bucci M, *Nat. Med.*, 2000). Les souris cavéoline-1 déficientes (vierges et âgées de 6 semaines) montrent également une hyperplasie des cellules épithéliales mammaires (Lee H, *Am. J. Pathol.*, 2002) (**Figure25**). Ces souris développent également une hypertrophie cardiaque avec une hyper-activation de la protéine ERK observée dans les fibroblastes cardiaques (Cohen AW, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2003). Bien que la cavéoline-1 ne soit pas exprimée dans les myocytes cardiaques, les auteurs observent dans ces souris un élargissement du ventricule droit aux dépens du gauche avec une diminution de la fonction systolique cardiaque. L'atteinte cardiaque pourrait s'expliquer ici par la présence de la cavéoline-1 au niveau des fibroblastes et des cellules endothéliales cardiaques.

Bien que la délétion de la cavéoline-1 dans ces souris n'induit pas l'apparition de tumeurs spontanées, elle conduit à l'augmentation de la tumorigénicité (Capozza F, *Am. J. Pathol.*, 2003). En effet, l'application répétée d'un carcinogène, le DMBA (7, 12-dimethylbenzanthracene), induit une augmentation de l'incidence, du nombre et de la taille des tumeurs au niveau de la peau de ces souris avec une augmentation des taux de cycline D1 et de ERK-p. Les souris Cav-1^{-/-} croisées avec une souche transgénique MMTV-PyMT (Maglione JE, *Cancer Res.*, 2001) montrent, dès la troisième semaine, une augmentation drastique du nombre, de la taille et du grade des lésions mammaires dysplasiques (Williams TM, *Mol. Cell Biol.*, 2003). Les souris PyMT/Cav-1^{-/-} montrent également une augmentation de la cycline D1, une hyper-activation de ERK et une hyper-phosphorylation de Rb. Ces études ont mis en évidence le rôle inhibiteur de la cavéoline-1 dans la tumorigénèse mammaire et la formation de métastases *in vivo* (Figure 25). La perte de la cavéoline-1 altère la composition et l'organisation du cholestérol au sein des radeaux lipidiques membranaires *in vitro* (Sotgia F, *Mol. Cell Biol.*, 2002). Toutefois, ni la composition en lipides des radeaux lipidiques, ni le profil des protéines associées aux GPI ne varient dans les souris déficientes pour le gène de la cavéoline-1 par rapport aux souris sauvages (Drab M, *Science*, 2001).

A travers ces différentes études menées *in vivo*, on remarque que la cavéoline-1 contrôle la plupart des processus cellulaires fréquemment dérégulés dans les cancers. Les résultats obtenus à partir de ces études laissent déjà présager du rôle polyvalent joué par la cavéoline-1 dans les différents systèmes et fonctions biologiques. Bien que les études menées sur les animaux cav-1^{-/-} aient été ciblées sur certaines de ces fonctions biologiques (cardiaque, pulmonaire, endothéliale ou adipeuse) ou sur certains types de cancers (cancer du sein, de la peau mais aussi de la prostate (Williams TM, *J. Biol. Chem.*, 2004)) il était aisé d'imaginer que l'absence de la cavéoline-1 touche d'autres organes notamment le cerveau.

II-3-2/ Le transport du cholestérol

Historiquement, la cavéoline-1 a été identifiée comme étant la protéine de structure des cavéoles ; par conséquent son rôle dans l'endocytose fut longtemps considéré comme son unique fonction.

En effet, de nombreuses études ont démontré l'implication des cavéoles dans l'endocytose et le recyclage de protéines, molécules et récepteurs membranaires. Les cavéoles sont hautement enrichies en cholestérol et la cavéoline-1 fixe le cholestérol (Murata M, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995) car elle contient une séquence consensus d'acides aminés de liaison au cholestérol (Li H, *Endocrinol.*, 1998). La cavéoline-1 est impliquée dans le transport du cholestérol synthétisé à partir du réticulum endoplasmique vers la membrane plasmique. Ce processus est réalisé grâce à un complexe cytosolique de protéines chaperonnes, de cholestérol et de cavéoline-1 (Uittenbogaard A, *J. Biol. Chem.*, 1998). La palmitoylation des résidus cystéines en C-terminale est nécessaire à la formation de ce complexe et au transport du cholestérol vers les cavéoles (Uittenbogaard A, *J. Biol. Chem.*, 2000). Des études de FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*) ont révélé une immobilité relative de la cavéoline-1 au sein des cavéoles. Néanmoins, la mobilité de la cavéoline-1 est induite par une déplétion en cholestérol. La cavéoline-1 peut lier deux molécules de cholestérol (Dietzen D, *J. Biol. Chem.*, 1995) et une cavéole peut contenir jusqu'à 20000 molécules de cholestérol et jusqu'à 144 molécules de cavéoline-1 \pm 39 molécules. Par ailleurs, le cholestérol régule l'expression de la cavéoline-1 au niveau transcriptionnel à travers deux sites de liaisons SRE (*sterol response element*) présents sur le promoteur du gène de la cavéoline-1. De plus, l'oxydation du cholestérol induit une relocalisation de la cavéoline-1, de la membrane vers le RE et l'appareil de Golgi. Au-delà de son rôle dans la stabilisation de la cavéoline-1, le taux de cholestérol contrôle l'expression et la localisation intracellulaire de la cavéoline-1. La relation existant entre le cholestérol et la cavéoline-1 est complexe.

II-3-3/ La cavéoline-1 dans le noyau

La cavéoline-1 est préférentiellement et majoritairement présente au niveau de la membrane cellulaire. Néanmoins, elle est également retrouvée dans d'autres compartiments cellulaires, comme le noyau. Dans une étude réalisée par Sanna et ses collaborateurs, la cavéoline-1 a été localisée au niveau du noyau des cellules de carcinomes ovariens SKOV3 (Sanna E, *Exp. Cell Res.* 2007).

Ils ont mis en évidence son association à la matrice nucléaire par fractionnement cellulaire et sa liaison aux promoteurs de la cycline D1 et au FR (*Folate Receptor*) grâce à des expériences de supershift et d'immunoprécipitation de la chromatine (CHIP). L'association de la cavéoline-1 à de la matrice nucléaire inactive transcriptionnellement (c'est-à-dire de l'hétérochromatine) est corrélée à l'inhibition de l'expression de la cycline D1 et de FR. Ces auteurs ont donc ainsi précisé le mécanisme de régulation de l'expression de la cycline D1 et donc de la prolifération cellulaire par la cavéoline-1 au niveau transcriptionnel (Hulit J, *J. Biol. Chem.*, 2000). De même, la cavéoline-1 régulerait l'expression du récepteur de l'IGF (*Insulin-like growth factor*) au niveau transcriptionnel dans les cellules MCF7 exprimant la cavéoline-1 de manière stable, MCF7/Cav1 (Glait C, *Exp. Cell Res.*, 2006). L'activation transcriptionnelle du gène de l'IGFRI par la cavéoline-1 nécessite la voie p53 et les effets de la cavéoline-1 sont associés à l'augmentation du niveau de Sp1 (facteur de transcription à doigt de zinc transactivant l'expression du gène de IGFRI). L'utilisation de la mithramycine, un inhibiteur de Sp1, conduit à la diminution de l'activité du promoteur de IGFRI dans les cellules MCF7/Cav1 et donc à une diminution de son expression. Bien que les mécanismes moléculaires associés à la régulation des gènes par la cavéoline-1 ne soient pas totalement élucidés, les études récentes parues à ce sujet rapportent clairement une régulation de l'expression de gènes par la cavéoline-1 au niveau transcriptionnel avec liaison de la cavéoline-1 à l'ADN (Glait, C, *Exp. Cell Res.*, 2006).

II-3-4/ La cavéoline-1 est aussi une protéine sécrétée !

La cavéoline-1 se retrouve donc au niveau de différents compartiments cellulaires ; elle est également sécrétée dans le milieu extracellulaire. L'équipe de Thompson a mis en évidence le rôle de cette cav-1 sécrétée dans la migration cellulaire et dans la croissance tumorale *in vivo* par l'intermédiaire de l'activation de la voie PI3-K/Akt/eNOS (Tahir SA, *Cancer Res.*, 2008). Cette équipe s'est attachée à comprendre le mode d'action paracrine et autocrine de la cavéoline-1 sécrétée au sein du micro-environnement de cellules du cancer de la prostate. Ils ont mis en évidence que la sécrétion de la cavéoline-1 par les cellules du cancer de la prostate, caractérisées par leur insensibilité aux androgènes, était régulée par les hormones stéroïdes.

Les auteurs ont observé que l'utilisation de milieu conditionné issu de cellules de cancer de la prostate, LNCaP, de passage élevé permettait d'augmenter la viabilité et la croissance clonale des cellules LNCaP issues d'un faible passage *in vitro*. Cet effet est bloqué par l'addition, dans le milieu de culture, d'anticorps dirigés contre la cavéoline-1 (Tahir SA, *Cancer Res.*, 2001). L'injection par voie intra-péritonéale de cet anticorps à des souris malades, insensibles aux androgènes et sécrétant la cavéoline-1, a inhibé la croissance orthotopique et la formation spontanée de métastases dans ces souris. Bartz et ses collaborateurs ont également mené une étude sur un modèle de cellules de cancer de la prostate, LNCaP (Bartz R, *Int. J. Cancer*, 2008). L'expression de la cavéoline-1 dans ces cellules entraîne une augmentation de leur prolifération et de leur croissance dans les souris nude. De manière remarquable, l'injection sous-cutanée de cellules LNCaP^{Cav-1+} de la souris induit une augmentation de croissance tumorale des cellules LNCaP cavéoline-1 déficientes, injectées sur l'autre flanc de l'animal. Ces tumeurs se révèlent alors Cav-1+ alors qu'elles sont initialement déficientes en cavéoline-1 : ceci s'explique par la sécrétion de cavéoline-1, au sein de particules lipoprotéiques avec une densité similaire au HDL (*low-density lipoprotein*), par les tumeurs LNCaP^{Cav-1+}.

Dans le cancer de la prostate, la cavéoline-1 est retrouvée à des concentrations très élevées et l'inactivation de l'un ou des deux allèles de la cavéoline-1 induit une réduction significative du volume tumoral et des métastases (Tahir SA, *Cancer Res.*, 2008). En effet, la protéine est plus fortement détectée dans la sous-fraction lipoprotéique HDL3 du sérum des patients en phase avancée de la maladie par rapport aux donneurs sains. Toujours dans le cancer de la prostate, l'équipe du Dr Thompson a développé un test immunologique basé sur la détection de la cavéoline-1 dans le sérum des patients (Tahir SA, *Cancer Res.*, 2001). Dans ce contexte, la cavéoline-1 est utilisée avec succès comme un marqueur permettant de différencier les formes malignes et bénignes du cancer de la prostate (Tahir SA, *Clin. Cancer Res.*, 2003).

Le potentiel de la cavéoline-1 en tant que marqueur pronostic et diagnostic reste encore incertain.

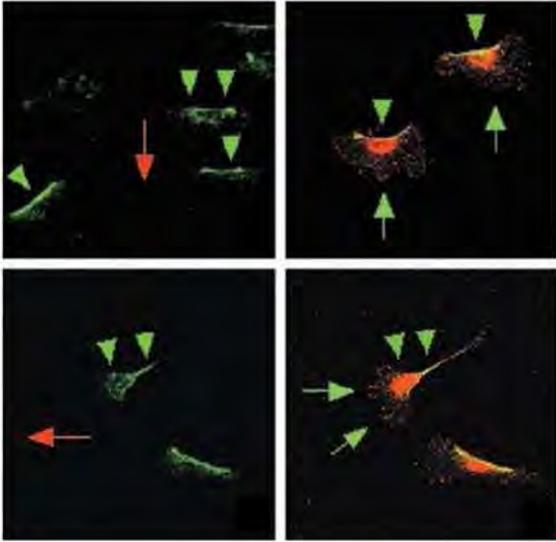
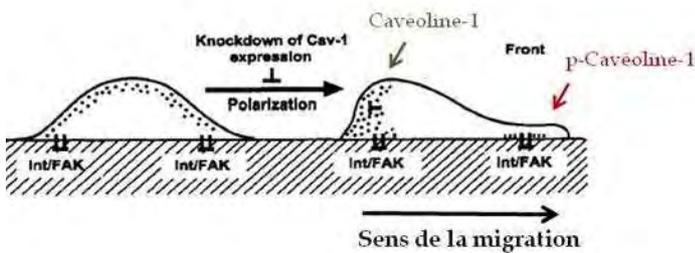
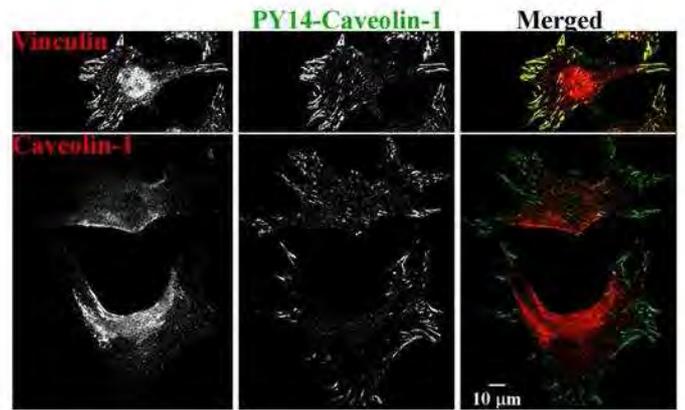
A**B**

Figure26. Polarisation de la cavéoline-1 durant la migration cellulaire (adapté de [Beardsley A, J. Biol. Chem., 2005](#)). A, La cavéoline-1-FITC (coloration verte) est localisée à l'arrière du front de migration. Elle est, en partie, co-localisée avec l'intégrine β 1-Rhodamine Red-X (coloration rouge). B, La cavéoline-1Y14 (vert) est co-localisée avec la vinculine (rouge) au niveau des FAKs et est « virtuellement » absente des cavéoles car elles ne co-localisent pas avec la cavéoline-1 (rouge). Au cours du processus de migration, la cavéoline-1 et la phospho-cavéoline-1 sont donc polarisées.

II-3-5/La cavéoline-1 et la signalisation intracellulaire

II-3-5a/ *p*-cavéoline-1 et migration cellulaire

Moins de 1% de la cavéoline-1 cellulaire totale est phosphorylée au niveau de sa tyrosine 14 (Y14). De plus, cette cavéoline-1 semble « virtuellement » absente des cavéoles, marquées par la cavéoline-1 dans les cellules NIH₃T₃ (del Pozo MA, *Nat. Cell Biol.*, 2005) (**Figure26**). Lors du processus de migration cellulaire, la cavéoline-1 et les cavéoles se retrouvent localisés à l'arrière du front de migration (Beardsley A, *J. Biol. Chem.*, 2005) alors que la cavéoline-1-Y14, nécessaire à ce processus, se localise à l'avant de la cellule au niveau du front de migration au même titre que les protéines FAK, l'intégrine β 1 et la phospho-paxilline auxquelles elle est associée au niveau des points d'adhérence focale (FAs) (Beardsley A, *J. Biol. Chem.*, 2005 ; Isshiki M, *J. Cell Sci.*, 2002 ; Parat MO, *Mol. Biol. Cell*, 2003) (**Figure26**). La cavéoline-1 phosphorylée au niveau de sa tyrosine 14 génère des sites de liaison aux protéines kinases possédant des domaines SH2 comme Grb7 (Lee H, *Mol. Endocrinol.*, 2000) ou au domaine C-Terminal de la kinase Csk qui inhibe l'activité de Src en la phosphorylant (Cao H, *J. Biol. Chem.*, 2002). L'activation des intégrines semble essentielle à la phosphorylation de la cavéoline-1 puisque l'utilisation d'anticorps bloquant de la sous-unité intégrine β 1 conduit à l'inhibition de la genèse des fibres de stress induite par la cavéoline-1-Y14 et de la réorganisation de l'actine dans les cellules endothéliales aortiques bovines (Raden C, *Am. J. Physiol. Heart Circ.*, 2005). Cependant, la désorganisation du cytosquelette, l'architecture des FAs, la polarisation et la migration directionnelle des fibroblastes déficients en cavéoline-1 est restaurée par la réintroduction de la cavéoline-1 sauvage et pas par celle du mutant Y14F (Grande-Garcia A, *J. Cell Biol.*, 2007). Par ailleurs, la cavéoline-1-Y14 est également impliquée dans le processus d'internalisation de microdomaines membranaires riches en cholestérol (CEMM qui correspondent aux radeaux lipidiques et aux cavéoles) par l'intermédiaire des intégrines. Au cours de ce processus, la cavéoline-1-Y14 est délocalisée des points d'adhérence focale, où elles se situent (Gaus K, *J. Cell Biol.*, 2006) vers les cavéoles ce qui provoque l'internalisation des CEMM suite à un détachement cellulaire ; ceci conduit à l'inhibition de la protéine ERK, de la PI3K et de Rac (del Pozo MA, *Nat. Cell Biol.*, 2005). Ce processus est également régulé par la dynamine-2, un régulateur de la dynamique des cavéoles.

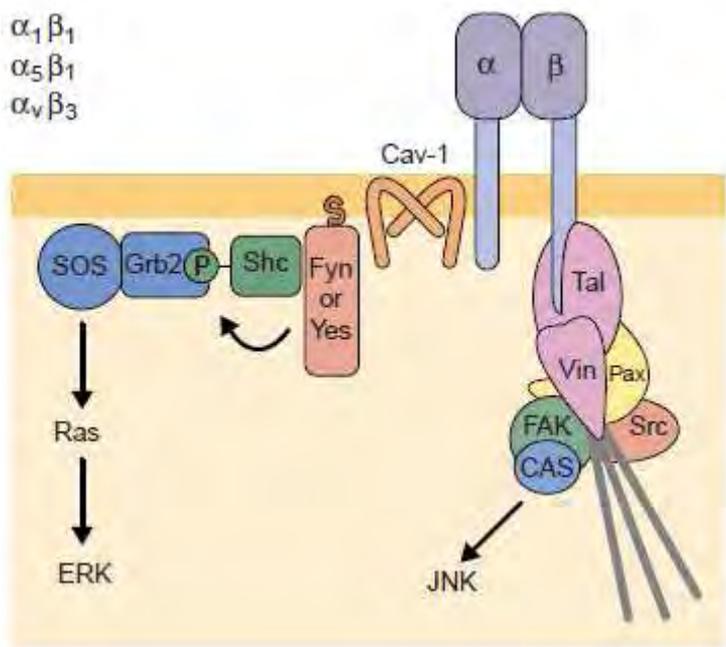


Figure 27. Implication de la cavéoline-1 dans la signalisation des intégrines (selon [Giancotti FG, Nat. Cell Biol., 2000](#)). La cavéoline-1 agit comme un adaptateur membranaire liant la sous-unité intégrine à la tyrosine kinase Fyn. Suite à son activation Fyn se lie au domaine SH2 de Shc qui, phosphorylé au niveau de la tyrosine 317, recrute la protéine adaptatrice Grb2. Cette séquence d'activation est nécessaire afin de coupler l'intégrine à la signalisation Ras-ERK et de promouvoir la progression du cycle cellulaire. Pax : paxilline ; Tal : taline ; FAK : *focal-adhesion kinase* ; Vin : vinculine ; CAS : p130CAS ; Cav1 : cavéoline-1 ; SOS : *guanine-nucleotide-exchange factor for RAS* ; ERK : *Extracellular signal regulated kinase* ; JNK : *Jun amino-terminal kinase*.

L'ensemble de ces données met en évidence la dualité fonctionnelle de la cavéoline-1-Y14 qui régule la migration cellulaire et l'endocytose.

II-3-5b/ La cavéoline-1 dans la fonction des intégrines

Les liens existants entre la cavéoline-1 et les intégrines se déclinent à plusieurs niveaux car la cavéoline-1 est capable d'interagir directement avec les intégrines (Warry KK, Cell, 1998) et différentes études relatent l'importance du taux de cholestérol sur l'adhérence et la signalisation par les intégrines (Green JM, J. Cell Biol., 1999). En effet, la cavéoline-1 permet la liaison de la sous-unité $\alpha 5$ de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ à la tyrosine kinase Fyn et/ou l'interaction de la sous-unité $\beta 1$ à la protéine FAK (Warry KK, Cell, 1998 ; Giancotti FG, Nat. Cell Biol., 2000). L'ensemble de ces processus conduit à l'activation de la cascade de signalisation intra-cellulaire Ras-ERK (Figure 27). En revanche, la cavéoline-1 peut séquestrer ces kinases lorsque l'intégrine n'est pas liée à son ligand, la fibronectine. Les travaux menés par Warry et ses collaborateurs ont mis en évidence une interaction physique et fonctionnelle de la fraction Triton X-100 de la cavéoline-1 avec l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et la protéine Fyn (Warry KK, Cell, 1998) (Figure 27). De façon similaire, la signalisation de la protéine Fyn (dépendante de la fibronectine via l'intégrine et conduisant à l'activation de la kinase MAP) requiert la présence de la cavéoline-1. Cette dernière se fixe aux kinases de la famille de Src, les rendant inactives. L'ensemble de ces données conduit donc à un modèle où le regroupement au niveau de la membrane cellulaire (ou clusterisation) de l'intégrine induite par son ligand, événement central de l'activation de l'intégrine, promeut l'oligomérisation de la cavéoline-1 provoquant un relargage et donc une activation des kinases de la famille de Src et initie la signalisation des intégrines. La perte d'interaction de la cavéoline-1 et de l'intégrine conduit à la déphosphorylation de FAK, dépendante du ligand, et provoque la génération anormale de sites d'adhésion focale. La cavéoline-1 est partiellement co-localisée avec l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et semble contrôler le ciblage de celle-ci en permettant son recyclage et sa dégradation. L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ se retrouve ainsi associée avec la cavéoline-1 par l'intermédiaire de sa sous-unité α et au récepteur uPAR via sa sous-unité β (Wei Y, J. Cell Biol., 1999).

La présence du récepteur uPAR promeut la transduction du signal grâce à son domaine extra-cellulaire qui interagit avec la sous-unité $\beta 1$ et son domaine GPI qui se lie aux domaines membranaires riches en cholestérol présents dans les cavéoles. Les protéines uPAR, intégrine et cavéoline-1 forment par conséquent un complexe fonctionnel interdépendant (Chapman HA, *Thromb. Haemost.*, 1999 ; Wei Y, *J. Cell Biol.*, 1999). En bref, la cavéoline-1 agit comme un adaptateur membranaire qui promeut la signalisation des intégrines, à travers les kinases Src et FAK et qui permet la liaison des kinases Fyn et Yes à la voie Shc/Grb2/Sos/Ras/ERK (Figure 27). Cette séquence d'activation permet la progression des cellules à travers la phase G₁ du cycle cellulaire.

II-3-5c/ Séquestration des protéines par la cavéoline-1 : exemple de la β -caténine

Grâce à son domaine CSD, la cavéoline-1 lie de nombreuses protéines telles que la β -caténine. Des études menées par l'équipe de Torrès montrent l'implication de la E-cadhérine dans la co-localisation et la co-immunoprécipitation de la cavéoline-1 avec la β -caténine (Torrès VA, *Mol. Cell Biol.*, 2007). C'est à l'équipe de Galbiati que revient la mise en évidence de l'inhibition exercée par la cavéoline-1 sur la voie Wnt/ β -caténine/Lef-1 via une séquestration de la β -caténine au niveau des cavéoles (Galbiati F, *J. Biol. Chem.*, 2000). Dans ce contexte, la β -caténine ne s'accumule plus et ne peut plus former le complexe transcriptionnel β -caténine-Tcf/Lef. Ainsi, ce dernier ne pourrait plus réguler la transcription de gènes comme la cycline D1 ou la survivine, impliqués dans la progression du cycle cellulaire et l'apoptose. L'équipe de Torrès a également souligné l'importance de la E-cadhérine dans le contrôle de l'expression de la survivine par la cavéoline-1. Ils ont montré que l'augmentation de l'expression de la E-cadhérine dans les cellules HEK293T (*human embryonic kidney*) favorisait l'interaction cavéoline-1/ β -caténine et provoquait une perte de l'activité transcriptionnelle du complexe β -caténine-Tcf/Lef (Torrès VA, *J. Cell Sci.*, 2006).

La β -caténine fournit une illustration du mécanisme de séquestration des protéines par la cavéoline-1 qui conduit à une diminution de la biodisponibilité intra-cellulaire de ces protéines.

| Récepteurs | Références |
|------------------------------|--|
| PDGF | <i>Smart EJ, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995; Abulrob A, Oncogene, 2004</i> |
| Insuline | <i>Liu P, J. Biol. Chem., 1996</i> |
| EGF | <i>Couet J, J. Biol. Chem., 1997; Liu P, J. Biol. Chem., 1997</i> |
| Cholecystokinine | <i>Roettger BF, J. Biol. Chem., 1995</i> |
| β -adrénergique | <i>Dupree P, EMBO J., 1993</i> |
| Transduction du signal | |
| Heterodimeric G α and | <i>Li S, J. Biol. Chem., 1996</i> |
| Src, Fyn, Hck, Lck | <i>Li S, J. Biol. Chem., 1996; Parolini I, Blood, 1995</i> |
| H-Ras | <i>Song KS, J. Biol. Chem., 1996</i> |
| Raf-1 | <i>Mineo C, J. Biol. Chem., 1996</i> |
| PKC- α | <i>Smart EJ, J. Cell Biol., 1995</i> |
| PKCA | <i>Razani B, Am. J. Physiol., 2001</i> |
| Shc | <i>Liu PJ, J. Biol. Chem., 1994; Liu PS, J. Biol. Chem., 1996</i> |
| m-sos-1 | <i>Liu PJ, J. Biol. Chem., 1994</i> |
| Grb2 | <i>Liu PJ, J. Biol. Chem., 1994</i> |
| eNOS | <i>Engelman JA, J. Biol. Chem., 1998; Okamoto T, J. Biol. Chem., 1998; Ghosh S, J. Biol. Chem., 1998</i> |
| ERK-2 | <i>Liu PJ, J. Biol. Chem., 1994</i> |
| MAPK | <i>Lisanti MP, J. Cell Biol., 1994; Liu PS, J. Biol. Chem., 1996</i> |

Tableau10. Les cavéoles, par l'intermédiaire de la cavéoline-1, concentrent de nombreuses protéines de la signalisation. Les cavéoles accumulent un grand nombre de protéines : des récepteurs, des transporteurs membranaires, des protéines de structures, des protéines de signalisation.... D'après [Anderson RD, Annu. Rev. Biochem., 1998.](#)

Le plus souvent, la séquestration des protéines par la cavéoline-1 conduit à la perte de l'activité enzymatique des protéines : c'est le cas de la eNOS et de la protéine ERK, deux exemples développés dans le paragraphe suivant.

II-3-5d/ La cavéoline-1 : inhibiteur de protéines à activité tyrosine kinase

Dans les années 90, de nombreuses études, et particulièrement celle menée par l'équipe de Lisanti, se sont intéressées au rôle de la cavéoline-1 dans la signalisation intra-cellulaire. En effet, les cavéoles concentrent de nombreuses protéines et la cavéoline1, grâce à son domaine CSD, peut lier des protéines de signalisation (comme H-Ras, c-Src, le récepteur de l'insuline, la synthétase endothéliale de l'oxide nitrique (e-NOS) ou encore les protéines $G_{\alpha, \beta, \gamma}$ avec lesquelles elle forme des complexes catalytiques inactifs (**Tableau 10**). Ceci provoque une inhibition des signaux médiés par la protéine séquestrée comme l'illustre l'inhibition de la e-NOS par la cavéoline-1 (Feron O, *J. Biol. Chem.*, 1996 ; Ju H, *J. Biol. Chem.*, 1997 ; Garcia-Gardena G, *J. Biol. Chem.*, 1997). En effet, en l'absence de la cavéoline-1, la eNOS est activée et par conséquent le niveau de NO reste constitutivement élevé. Felley-Bosco et ses collaborateurs ont montré que l'expression de la cavéoline-1 dans les cellules de carcinomes de colon induisait la dégradation de la iNOS (*Inductible Nitric Oxide Synthase*) par la voie du protéasome (Feley-Bosco E, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000). La majorité de la eNOS fonctionnelle étant retrouvée au niveau des cavéoles, elle entretient des interactions dynamiques avec la cavéoline-1 (Ghosh S, *J. Biol. Chem.*, 1998). Différents agonistes, comme la bradykinine, sont capables de promouvoir la liaison de la calmoduline à la eNOS (en augmentant la concentration de Ca^{2+}) ce qui provoque la dissociation du complexe cavéoline-1/eNOS en faveur du complexe activé eNOS/calmoduline. Par ailleurs, des travaux menés sur l'interaction de la protéine hsp90 avec la eNOS et AKt ont conduit à l'élaboration d'un modèle où la calmoduline, la hsp90, la cavéoline-1 et la eNOS appartiendraient à un complexe de signalisation dynamique (Fontana J, *Circ. Res.*, 2002). De nombreuses protéines appartenant à la voie de signalisation ERK-MAPK sont concentrées à l'intérieur des cavéoles : Ras, Raf-1, MEK-1/2 et ERK-1/2 (il en est de même pour les récepteurs de facteurs de croissance comme Neu/Erb-B2) (**Tableau 11**).

| Récepteurs | Références |
|-------------------------------|---|
| PDGF-R | <i>Yamamoto M, Exp., Cell Res., 1999</i> |
| IGFR | <i>Glaud C, Exp., Cell Res., 2006</i> |
| Protéine G | <i>Carman CV, J. Biol. Chem., 1999</i> |
| Insuline | <i>Yamamoto M, Exp., Cell Res., 1998</i> |
| TGF β R | <i>Razani B, J. Biol. Chem., 2001</i> |
| Transduction du signal | |
| p42-44 MAPK | <i>Engelman J, FEBS Letters, 1998</i> |
| Survivin | <i>Torres VA, Mol. Cell Biol., 2007</i> |
| β -caténine | <i>Torres VA, Mol. Cell Biol., 2007; Galbiati F, J. Biol. Chem., 2000</i> |
| PP1, PP2A | <i>Li L, Mol. Cell Biol., 2003</i> |
| Cycline D1 | <i>Hulit J, J. Biol. Chem., 2000</i> |

Tableau11. Exemples de certaines protéines de signalisation régulées par la cavéoline-1.

De plus, la relation existant entre la cavéoline-1 et ERK-1/2 semble réciproque puisque, d'une part la cavéoline-1 inhibe directement l'activation de ERK1/2 *in vivo* et *in vitro* et d'autre part, l'activation de la cascade Ras-p42/44 MAPK dans les cellules NIH₃T₃ induit une inhibition de l'expression de la cavéoline-1 (Engelman JA, J. Biol. Chem., 1998 ; Engelman JA, FEBS Letters., 1998 ; Engelman JA, J. Biol. Chem., 1999). En effet, une activation constitutive de la protéine ERK est suffisante pour inhiber l'expression de la cavéoline-1, au niveau de son ARNm et au niveau protéique. L'expression de la cavéoline-1 dans les cellules CHO (CHO GRC+LR73, *chinese hamster ovary*) conduit à l'inhibition de la signalisation issue des protéines EGFR, Raf, MEK1 et ERK2. L'activité inhibitrice exercée par la cavéoline-1 a pu être localisée, par l'utilisation de mutants, au niveau des résidus 32 à 95 correspondant au domaine CSD de la cavéoline-1. De plus, des peptides réalisés à partir de cette région ont montré une inhibition directe de l'activité kinase de MEK1 et de ERK2 purifiés (Engelman JA, J. Biol. Chem., 1998 ; Engelman JA, FEBS Letters., 1998).

II-3-5e/ La cavéoline-1 est un régulateur de voie de signalisation : exemple de la voie TGFβ/Smad

La superfamille TGFβ correspond à un groupe de cytokines comprenant une quarantaine de membres regroupés en 4 familles : les TGFβ, les activines/inhibines, les BMPs (*Bone Morphogenetic Proteins*) et les facteurs distants. Les molécules de la famille TGFβ, solubles et sécrétées, agissent en se fixant aux récepteurs TGFβ de type I ou II (TGFβR1 et TGFβRII) à activité sérine-thréonine kinase (von Bubnoff A, Dev. Biol., 2001). La fixation du ligand à son récepteur se déroule selon un mode dit séquentiel. En effet, les TGFβs et les activines se fixent d'abord au récepteur de type II puis le complexe récepteur de type II /ligand s'associe au récepteur de type I ; dans ce mode de liaison, le récepteur de type I ne se lie au ligand que si ce dernier est préalablement associé au récepteur de type II (**Figure28**). La signalisation de la voie TGFβ est médié au niveau intra-cellulaire par les protéines Smad. Les protéines Smad peuvent être subdivisées en différentes catégories : les Smad-2 et -3 transduisent les signaux induits par les TGFβs et les activines alors que les Smad-1, -5 et -8 transduisent préférentiellement les signaux induits par les BMPs.

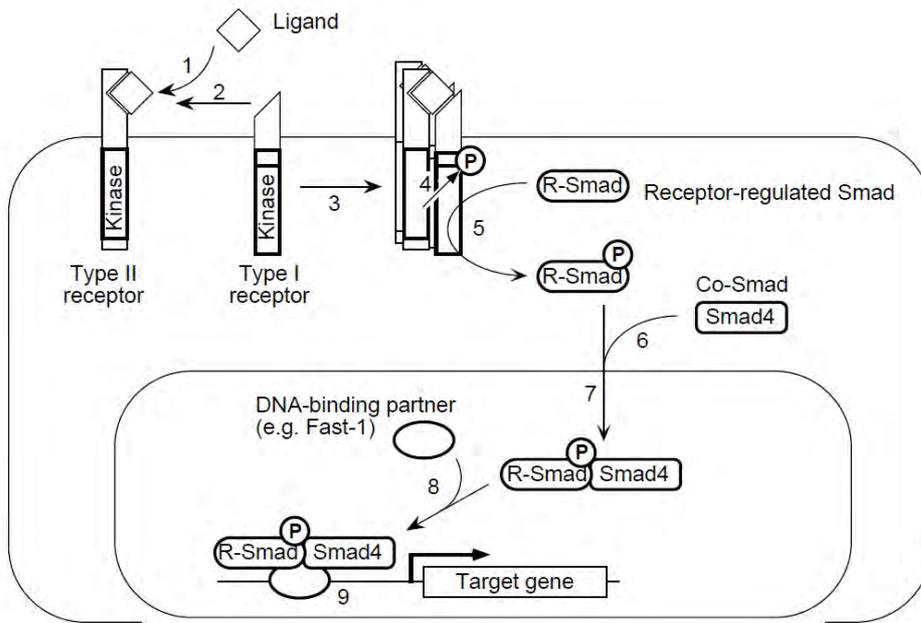


Figure 28. La voie de signalisation TGFβ/Smad (Massague J, Annu. Rev. Biochim., 1998).

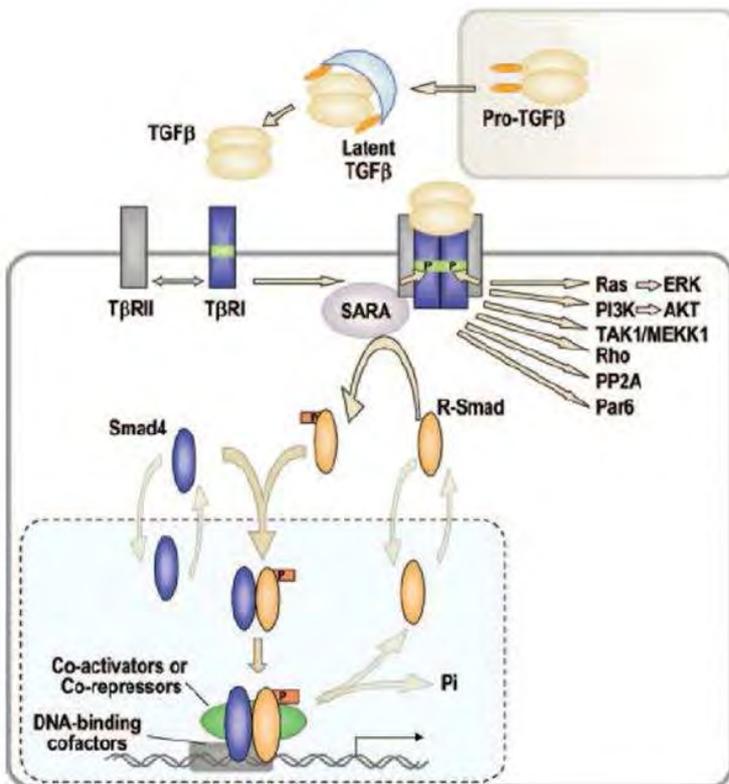


Figure 29. Signalisation du TGFβR à travers des voies de signalisation indépendantes de Smad. Extrait de Seoane J, Carcinogenesis, 2006.

Suite à leur phosphorylation par le récepteur de type I, les Smad-2 et -3 se dissocient du récepteur pour former un complexe avec la protéine Smad-4 (co-Smad) qui est transloqué dans le noyau afin de réguler l'expression de gènes cibles ([Massague J, Annu. Rev. Biochim., 1998](#)) (**Figure28**). Toutefois, la voie TGFβR/Smad est capable d'activer d'autres voies de signalisation indépendamment de Smad ([Derynck R, Nature, 2003](#) ; [Seoane J, Cancinogenesis, 2006](#)) (**Figure29**).

Razani et ses collaborateurs ont été les premiers à mettre en évidence une interaction directe entre la cavéoline-1 (domaine CSD) et le récepteur TGFβRI ([Razani B, J. Biol. Chem., 2001](#)). Cette interaction conduit à l'inhibition de la phosphorylation de Smad2 et, par conséquent, de l'ensemble de la signalisation TGFβR/Smad dans les cellules NIH₃T₃.

De plus, le récepteur TGFβRI et la cavéoline-1 sont co-localisés au niveau de la membrane et les récepteurs TGFβRI et TGFβRII et Smad2 (mais pas Smad4) sont co-fractionnés avec la cavéoline-1 au niveau des micro-domaines enrichis en cavéoles. L'inhibition de la cavéoline-1 (par un siRNA) conduit à une augmentation de l'activation de la voie TGFβR/Smad ([Razani B, J. Biol. Chem., 2001](#)). Par ailleurs, la sur-expression de la cavéoline-1 dans les cellules NIH₃T₃ induit une diminution de la réponse au TGF-β1 dans ces cellules qui semble liée à la répression de l'expression du récepteur TGFβRII au niveau transcriptionnel par la cavéoline-1 ([Lee EK, Biochem. Biophys. Res. Com., 2007](#)).

La cavéoline-1 exercerait donc un contrôle sur la voie TGFβR/Smad à plusieurs niveaux : au niveau transcriptionnel comme au niveau de l'activité des récepteurs.

L'ensemble de ces travaux met en évidence la présence de la cavéoline-1 dans tous les compartiments cellulaires (au niveau de la membrane, du cytosquelette, du noyau et du cytosol) où elle joue différents rôles (inhibition enzymatique, modulation de la signalisation, transport du cholestérol, régulation de gènes). Dans les différents systèmes normaux et pathologiques, la cavéoline-1 est donc un acteur central.

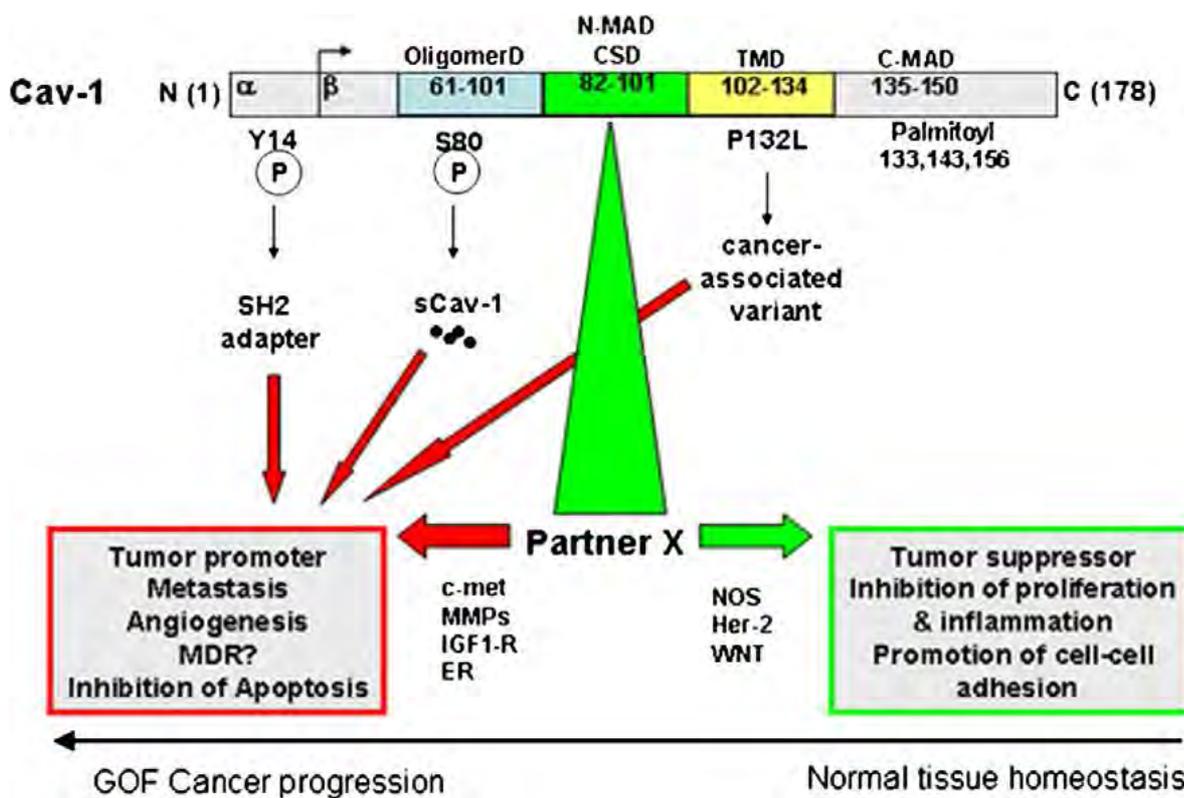


Figure30. Modèle structural et fonctionnel de la cavéoline-1 au cours de la progression tumorale (selon [Burgermeister E, Cancer Lett., 2008](#)). Dans les cellules non-néoplasiques, le domaine CSD de la cavéoline-1 se lie à différents partenaires protéiques (*Partner X*) ce qui contribue au maintien d'un métabolisme et d'une homéostasie normale. Durant l'initiation de la tumeur, l'interaction de la cavéoline-1 avec les protéines suppresseur de tumeur (*Tumor suppressor*) est perdue et substituée aux protéines promoteur de tumeur (*Tumor promoter*) qui facilite alors la progression tumorale. Des modifications post-transcriptionnelles et une altération de la compartimentalisation subcellulaire de la cavéoline-1 facilite cet échange entre protéines promoteur ou suppresseur de tumeur.

II-4/ La cavéoline-1 dans les cancers

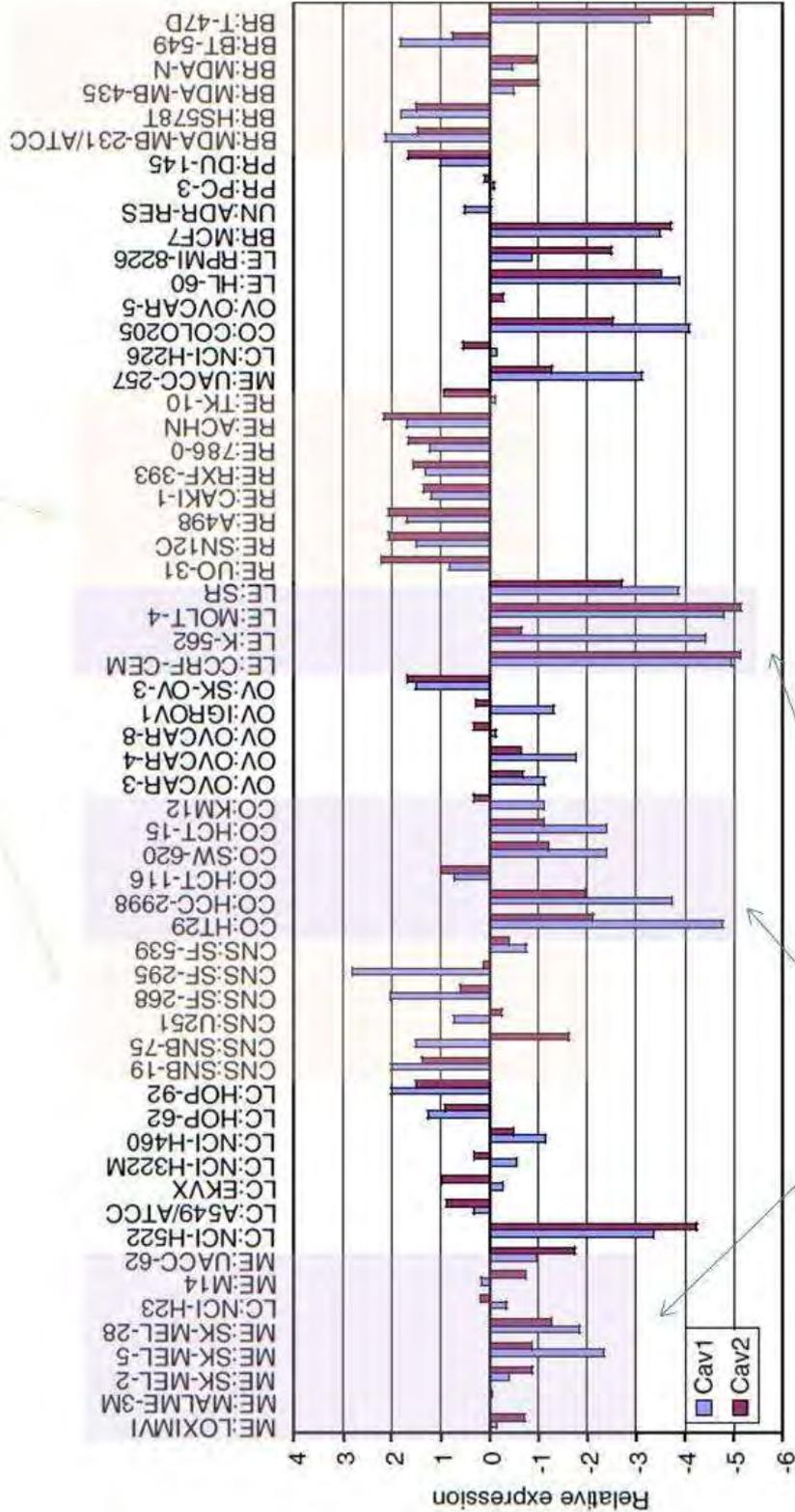
II-4-1/ Le locus D7S522

Le gène de la cavéoline-1 est localisé au niveau du bras du chromosome 7q31.1, proche du locus D7S522 souvent délété dans de nombreux cancers humains (cancer du sein, du colon, du rein, de la prostate, des ovaires...); ce locus fragile est également nommé FRA7G (Engelman JA, FEBS, 1998 ; Fra AM, Genomics, 1999). Ces premières données ont conduit à émettre l'hypothèse selon laquelle la région FRA7G contiendrait et coderait un ou plusieurs gène(s) suppresseur(s) de tumeur. Le fait que la cavéoline-1 se situe à proximité du locus FRA7G et que son expression soit souvent inhibée dans des cellules cancéreuses et dans les cellules transformées par des oncogènes ont conduit à l'hypothèse selon laquelle la cavéoline-1 agirait comme une protéine suppresseur de tumeur (Schatz M, Leuk. Res., 2004).

II-4-2/ Oncogène ou suppresseur de tumeurs ?

Plusieurs études suggèrent que la cavéoline-1 agirait telle une protéine suppresseur de tumeur (Figure30). Ainsi, le niveau de la protéine et de l'ARNm cavéoline-1 est fortement réduit dans les fibroblastes NIH₃T₃ transformés par différents oncogènes (Koleske AJ, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995) alors que l'inhibition de son expression conduit à la transformation de ces cellules (Galbiati F, EMBO J., 1998) provoquant une hyper-activation de la protéine ERK. Particulièrement, l'inhibition de la cavéoline-1 dans des fibroblastes embryonnaires de souris MEF cav-1^{-/-} induit une augmentation de la prolifération cellulaire et de la proportion des cellules en phase S du cycle cellulaire. De manière intéressante, l'inhibition de l'expression de la cavéoline-1 dans des cellules transformées permet la réversion de ce phénoype cellulaire (Engelman JA, J. Biol. Chem., 1997). Pour autant, la cavéoline-1 n'a pas un rôle direct dans le processus d'immortalisation ; la perte du locus INK4a (codant pour des régulateurs du cycle cellulaire p16^{INK4a} et p19^{ARF}) est elle suffisante pour l'immortalisation des cellules. La perte concomitante de la cavéoline-1 et de INK4a dans les cellules leur confère un avantage prolifératif (Williams TM, J. Biol. Chem., 2004).

Sur-expression de la cavéoline-1



Sous-expression de la cavéoline-1

Figure31. Expression de la cavéoline-1 dans 60 lignées de cancers humains (selon [Ravid D, Advan. Enzyme Regul., 2006](#)). ME : Mélanome ; LC : carcinome du poumon ; CNS : système nerveux central ; CO : cancer du colon ; OV : cancer ovarien ; LE : leucémie ; RE : cancer du rein ; PR : cancer de la prostate ; BR : cancer du sein ; UN : non identifié.

Ces résultats suggèrent un modèle où la perte de la cavéoline-1 ferait partie d'un mécanisme coopératif et synergique avec des mutations génétiques qui conduirait à la perte d'INK4a. De plus, la transformation de fibroblastes INK4a (-/-)/Cav-1 (-/-) par des oncogènes (H-Ras (G12V) ou v-src) rendrait les cellules plus néoplasiques en générant des tumeurs 40 fois plus grosses dans les souris nude.

L'ensemble de ces données indiquent, d'une part, une perte d'expression de la cavéoline-1 lors du processus de transformation et que, d'autre part, la perte d'expression de la cavéoline-1 peut conduire à la transformation cellulaire. Au contraire, la sur-expression de la protéine, dans des fibroblastes embryonnaires de souris, entraîne une inhibition de la prolifération due à un arrêt du cycle cellulaire en phase G₀/G₁ et promeut la sénescence cellulaire (Galbiati F, *Mol. Cell Biol.*, 2001 ; Volonte D, *Mol. Cell Biol.*, 2002). Normalement, la cavéoline-1 agit comme un répresseur transcriptionnel de la cycline D et bloque la progression du cycle cellulaire selon une voie dépendante de p53/p21^{Cip1} (Galbiati F, *Mol. Cell Biol.*, 2001).

Le rôle pro-apoptotique de la cavéoline-1 demeure controversé. En l'occurrence, sa sur-expression dans des cellules humaines de cancer de la prostate (LNCaP, insensibles aux androgènes) provoque une résistance de ces cellules à l'apoptose induite par c-myc (Timme TL, *Oncogene*, 2000). En outre, différentes études ont pu apporter les preuves de l'inhibition de la cavéoline-1 par des oncogènes tels que c-myc, N-myc, Bcr-Abl, v-Abl, H-ras, N-ras, c-src, v-scr, c-Neu/ErbB2, PDK1 (Williams TM, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2005).

Néanmoins, le rôle de la cavéoline-1 en tant que protéine suppresseur de tumeur est très controversé puisque de plus en plus d'études rapportent une augmentation de son expression dans certaines tumeurs (Ravid D, *Advan. Enzyme Regul.*, 2006) (**Figure31**). Par exemple, son expression est largement augmentée dans les lignées cellulaires métastatiques de cancer de la prostate (Yang G, *Clin. Cancer Res.*, 2000).

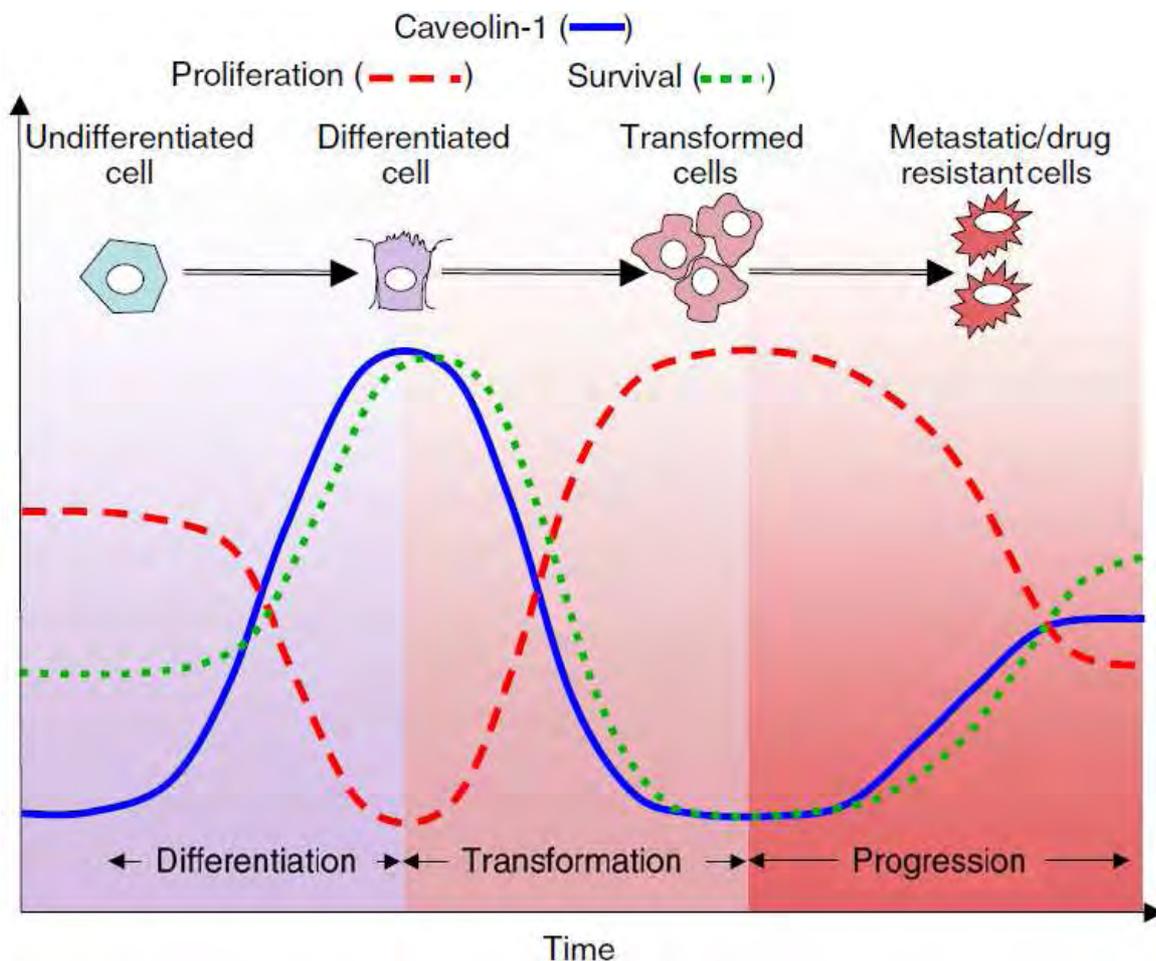


Figure32. Evolution dynamique de l'expression de la cavéoline-1 au cours de la progression tumorale (selon Ravid D, *Advan. Enzyme Regul.*, 2006). L'expression de la cavéoline-1 est corrélée à la survie cellulaire (*Survival*) et inversement corrélée à la prolifération cellulaire (*Prolifération*). L'expression de la cavéoline-1 est faible dans les cellules épithéliales indifférenciées (*Undifferentiated cell*) et augmentée suite à une induction de la différenciation (*Differentiated cell*). Lorsque les cellules épithéliales sont transformées par un oncogène, l'expression de la cavéoline-1 est diminuée ce qui permet une augmentation de la prolifération. La formation de tumeurs est le résultat d'une faible expression de la cavéoline-1 qui sensibilise les cellules, entre autres, aux carcinogènes. La progression des cellules tumorales des stades précoces aux stades avancés dépend de l'accumulation de modifications génétiques, due, en partie, à l'instabilité génomique. A ce stade, l'expression de la cavéoline-1 pourrait contribuer à la survie cellulaire permettant une sélection positive des clones exprimant la cavéoline-1 : ces clones dominent dans les hauts grades et les tumeurs métastatiques (*Metastatic*).

Des résultats obtenus dans un modèle de cancer de la prostate mettent en évidence l'absence de la cavéoline-1 dans les tissus sains et sa forte expression dans les cellules tumorales dont elle promeut l'activité métastatique. Ainsi, chez des patients atteints du cancer de la prostate, l'expression de la cavéoline-1 au sein des tumeurs est corrélée avec un potentiel métastatique élevé et un mauvais pronostic de survie. De même, dans le cancer du poumon une corrélation entre l'expression de la cavéoline-1 et le stade (et le grade) tumoral a pu être mise en évidence (Ho CC, *Am. J. Pathol.*, 2002 ; Kato M, *Cancer Lett.*, 2004).

Dans une étude réalisée par Li et ses collaborateurs, la sur-expression de la cavéoline-1 conduit à la survie cellulaire par l'intermédiaire du maintien de l'activation d'AKt. La modulation de l'activité d'AKt est réalisée par la liaison et l'inhibition des sérine/thréonine phosphatases PP1 et PP2A (Li L, *Mol. Cell Biol.*, 2003). La sensibilité à l'apoptose induite par les céramides des fibroblastes sur-exprimant la cavéoline-1 (mécanisme dépendant de la PI3K) alimente la controverse puisque les céramides induisent l'apoptose en inhibant la voie PI3K-AKt et la cavéoline-1 interagit avec la PI3K (Zundel W, *Mol. Cell Biol.*, 2000). Par ailleurs, l'expression de la cavéoline-1 par des cellules de cancer du sein les protège de l'anoikis (apoptose induite par le détachement cellulaire) (Fiucci G, *Oncogene*, 2002) et inhibe l'activation de p53 induite par le détachement cellulaire (Ravid D, *Oncogene*, 2005). D'autres études ont confirmé cette activité de la cavéoline-1 en faveur de la survie cellulaire. En l'occurrence, l'inhibition de l'expression de la cavéoline-1 (KO) dans un modèle murin TRAMP stimule l'apoptose et freine la progression des tumeurs vers un phénotype hautement invasif et métastatique (Williams TM, *J. Biol. Chem.*, 2005).

L'ensemble de ces données met clairement en évidence la dualité de la cavéoline-1 au cours de la progression tumorale (**Figure32**). La cavéoline-1 agirait tantôt comme une protéine suppresseur de tumeur (activité inhibitrice de la croissance) tantôt comme un promoteur de tumeur (activité en faveur de la survie). Ceci pourrait expliquer ces différences de profils d'expression de la cavéoline-1 au cours de la progression tumorale.

En effet, l'expression de la cavéoline-1 serait inhibée dans les phases précoces du cancer empêchant son activité inhibitrice de la croissance au moment de l'expansion clonale alors que son expression serait augmentée dans les stades avancés du cancer favorisant la survie des cellules tumorales (Schatz M, *Leuk. Res.*, 2001).

Les effets contradictoires de la cavéoline-1 peuvent évidemment s'expliquer par la différence des modèles *in vivo* et *in vitro* et les partenaires intracellulaires de la protéine (Figure30).

II-4-3/ La cavéoline-1 et le phénotype MDR

La glycoprotéine P (PgP) est une pompe membranaire capable d'exporter hors de la cellule (tumorale ou saine) un grand nombre de xénobiotiques. Elle est localisée au niveau de la BBB (*blood-brain barrier*) et impliquée dans la cytoprotection du cerveau. La résistance à de nombreux agents chimiothérapeutiques telles que la vincristine, l'étoposide ou encore la doxorubicine est associée à l'expression de la PgP (Gottesman MM, *Annu. Rev. Biochem.*, 1993).

La PgP est fréquemment sur-exprimée dans les cancers (Demeule M, *Int. J. Cancer*, 2001). Sa co-localisation partielle avec la cavéoline-1 au niveau des domaines membranaires riches en cholestérol a pu être révélée par fractionnement sur gradient de sucrose (Demeule M, *FEBS Lett.*, 2000 ; Lavie Y, *J. Biol. Chem.*, 1998). La cavéoline-1 et la PgP sont donc co-localisées aux niveaux des cavéoles et des radeaux lipidiques et leurs taux d'expression sont corrélés. Barakat et ses collaborateurs avaient mis en évidence que la cavéoline-1 régule l'activité de transport de la PgP dans les cellules endothéliales de cerveau de rat RBE4 (Barakat S, *J. Neurochem.*, 2007). L'inhibition de l'expression de la cavéoline-1 entraîne une diminution de l'accumulation du taxol et de la vinblastine dans ces cellules. Par ailleurs, l'inhibition de la cavéoline-1 dans ces cellules endothéliales conduit à l'augmentation de leur migration et de l'angiogenèse. De même, l'inhibition de l'interaction PgP/cavéoline-1 induit une diminution de la formation de tubes par les cellules endothéliales (Barakat S, *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 2008).

La sur-expression de la PgP conduit à l'augmentation du taux de cholestérol intracellulaire et de l'expression de la cavéoline-1 (Lavie Y, *J. Biol. Chem.*, 1998).

L'expression de la cavéoline-1 pourrait ainsi favoriser la survie des cellules cancéreuses résistantes sur-exprimant la PgP. Chez les patients atteints de cancer du poumon non petites cellules (NSCLC) l'expression de la cavéoline-1 est corrélée à une résistance aux traitements et à un facteur de mauvais pronostic. En effet, la cavéoline est sur-exprimée dans de nombreuses cellules cancéreuses possédant un phénotype MDR : les cellules de cancer du poumon A549-T24 résistantes au taxol et les cellules de carcinomes ovariens SKVLB1 résistantes à la vinblastine. Dans la leucémie aiguë myéloblastique également, une corrélation entre la cavéoline-1 et PgP a été révélée (Ravid D, *Advan. Enzyme Regul.*, 2006).

Toutefois, des données contradictoires provenant d'études fonctionnelles mettent en évidence l'action inhibitrice de la cavéoline-1 sur l'expression et l'activité de la PgP (Cai C, *Int. J.Cancer*, 2004).

II-4-4/ Le mutant P132L de la cavéoline-1

L'analyse de la séquence de la cavéoline-1 dans des tumeurs humaines a révélé un certain nombre de mutations sporadiques du gène cav-1 (Hayashi K, *Cancer Res.*, 2001). Il existe en effet différents mutants de la cavéoline-1, clairement caractérisés, impliqués dans la transformation tumorale. Notamment, la mutation P132L du gène de la cavéoline-1 est retrouvée dans 16% des cancers du sein (Hayashi K, *Cancer Res.*, 2001). Cette mutation somatique convertissant une proline en leucine est associée au statut ER- α positif chez les patientes atteintes de cancer du sein (Hayashi K, *Cancer Res.*, 2001). La mutation P132L conduit à la transformation des cellules NIH₃T₃, à l'augmentation de la croissance de ces cellules en soft agar, à l'augmentation de leur invasion et du chimiotaxisme. La morphologie cellulaire est également altérée (Lee H, *Am. J. Pathol.*, 2002). Par ailleurs, l'étude réalisée par Shatz et ses collaborateurs a pu mettre en évidence qu'une diminution de l'expression de la cavéoline-1 conduisait à l'inhibition de la prolifération des cellules de cancer du poumon H1299 ainsi qu'à une diminution de la phosphorylation de FAK. L'inhibition de la cavéoline-1 comme la sur-expression des mutants P132L et Y14F provoque une inhibition de l'invasion, de la migration et de l'activité des métalloprotéases (MMP-2 et MMP-9) (Shatz M, *Exp. Cell Res.*, 2010). Ces mutants agiraient par conséquent comme des dominants négatifs.

II-4-5/ La cavéoline-1 dans les gliomes

La présence des trois cavéolines a été mise en évidence dans le cerveau (Cameron PL, J. Neurosci., 1997), notamment par purification sur colonne d'affinité et par immunohistochimie (Ikezu T, Brain Res., 1998). Les cavéoline-1 et -2 sont exprimées au niveau des micro-vaisseaux et de manière prédominante dans les cellules endothéliales. Elles sont également retrouvées au niveau des péricytes et des astrocytes alors que l'expression de la cavéoline-3 est restreinte aux astrocytes (Ikezu T, Brain Res., 1998). La cavéoline-1 est également exprimée au niveau des micro-vaisseaux du cerveau. Elle est retrouvée au niveau des péricytes et des astrocytes vasculaires. Cette localisation indique que la cavéoline-1 pourrait jouer un rôle au niveau des échanges ayant lieu à l'interface sang/cerveau (Virgintino D, Neurosci., 2002).

Cameron et ses collaborateurs ont étudié l'expression de la cavéoline-1 dans cinq lignées humaines de glioblastome (U87-MG, T98G, U118MG, U138MG et U373MG) ayant un statut p53 sauvage ou muté (Cameron PL, Glia, 2002). L'analyse de l'expression de la cavéoline-1, normalisée par rapport aux cellules U87-MG (p53 sauvage), a révélé une diminution de l'expression de la cavéoline-1 dans les cellules T98G (p53 muté), une expression de la cavéoline-1 similaire aux cellules U87-MG pour les U373MG (p53 muté) et une augmentation de l'expression de la cavéoline-1 pour les U118MG et les U138MG (p53 muté). De plus, il s'est avéré que la cavéoline-1 n'était pas mutée dans ces cellules de glioblastomes (Cameron PL, Glia, 2002).

Une étude de l'expression de la protéine dans les méningiomes a indiqué que la cavéoline-1 était un marqueur de mauvais pronostic (Barresi V, Acta Neuropathol., 2006). Dans les gliomes, les premières observations avaient mis en évidence une expression de la cavéoline-1 au sein des cellules néoplasiques alors que les cellules non-néoplasiques ne l'expriment pas. Ces données suggèraient alors une implication de la cavéoline-1 dans la gliomagenèse.

Dans les glioblastomes, l'expression de la cavéoline-1 est fortement augmentée ceci s'expliquerait par le gain du chromosome 7 dans près de 60% de ces tumeurs (Ichimura K, Am. J. Neurooncol., 2004).

Bien que l'expression de la cavéoline-1 soit la plus élevée dans les gliomes, une étude récente menée par une équipe italienne a mis en évidence une expression différentielle de la cavéoline-1 selon le grade de la tumeur (Cassoni P, *Am. J. Surg. Pathol.*, 2007). En effet, une forte expression de la cavéoline-1 est retrouvée dans 53% des cas, la majorité des cellules néoplasiques exprimant la cavéoline-1 (plus de 75%). Dans l'autre moitié des tumeurs, la situation est complètement différente puisqu'un plus faible pourcentage de cellules néoplasiques montre une immunoréactivité pour la cavéoline-1 (de 25 à 75% des cellules). Cette étude met, pour la première fois, en évidence une hétérogénéité tumorale de l'expression de la cavéoline-1 que l'on considérerait sur-exprimée de manière homogène dans l'ensemble des glioblastomes. Une étude très récente, publiée par Barresi et ses collaborateurs, va à l'encontre de certains résultats avancés par Cassoni qui proposait que la cavéoline-1 soit utilisé comme un marqueur diagnostique permettant de discriminer les oligodendrogliomes (n'exprimant pas la cavéoline-1) des astrocytomes de grade II (Barresi V, *Human Pathol.*, 2009). Afin d'étayer leur hypothèse, ils montrent que l'expression de la cavéoline-1 n'est pas corrélée avec le statut 1p/19q dans les oligodendrogliomes ou les oligoastrocytomes. Par ailleurs, dans cette étude, aucune différence significative de l'expression de la cavéoline-1 n'a pu être révélée entre les astrocytomes, les oligodendrogliomes et les oligoastrocytomes. Les auteurs mettent aussi en évidence que les glioblastomes, expriment faiblement la cavéoline-1, présentent un taux de KI-67LI (*KI-67 Labeling Index*) élevé. Ces données indiquent que la cavéoline-1 agirait comme un régulateur négatif de la prolifération dans les glioblastomes. Aucune corrélation entre le taux d'expression de la cavéoline-1 et celui de l'EGFR n'a pu être mise en évidence dans les glioblastomes alors que l'EGFR est sur-exprimé et significativement associé à un faible taux de cavéoline-1 dans les astrocytomes anaplasiques. En outre, la sur-expression de la protéine p53 est corrélée à une forte expression de la cavéoline-1 (Barresi V, *Human Pathol.*, 2009). L'expression de la cavéoline-1 n'a pas pu être mise en évidence dans les tumeurs de bas grade tel que les oligodendrogliomes alors qu'elle est exprimée dans tous les astrocytomes de grade II et III. Son expression dans les glioblastomes est très hétérogène comme l'étude de Cassoni avait déjà pu mettre en évidence (Barresi V, *Human Pathol.*, 2009).

L'expression de la cavéoline-1 n'est pas modulée uniquement au niveau des cellules tumorales mais aussi au niveau des cellules endothéliales du cerveau ce qui conduit à des changements phénotypiques. L'équipe de Régina a mis en évidence une inhibition de l'expression de la cavéoline-1 dans les cellules endothéliales de cerveau de rat (RBE4) placées dans des conditions angiogéniques (traitement au VEGF et au bFGF) ou en conditions hypoxiques *in vitro* (Régina A, J. Neurosci. Res., 2004). Ces cellules endothéliales placées en co-culture avec des cellules tumorales ont montré une modulation similaire de l'expression de la cavéoline-1 avec une activation de la protéine kinase ERK. La purification sur la base du marquage par PECAM-1 ou CD31 de cellules endothéliales issues d'un modèle *in vivo* de tumeur cérébrale met également en évidence une diminution de l'expression de la cavéoline-1 avec une augmentation de la proportion de cavéoline-1 phosphorylée. L'augmentation de l'expression de la cavéoline-1 est également induite par une irradiation avec une augmentation des cellules migrant le long des néo-vaisseaux. L'augmentation de l'expression de la cavéoline-1 est également corrélée à une augmentation de l'angiogenèse (Régina A, J. Neurosci. Res., 2004). Les auteurs proposent donc d'utiliser le taux d'expression de la cavéoline-1 comme le reflet de l'état de vascularisation de la tumeur.

II-4-6/ La cavéoline-1 et les « cancer associated fibroblasts » (CAFs)

Les cellules tumorales prolifèrent au sein d'un micro-environnement complexe composé de fibroblastes, de péricytes, de cellules endothéliales, de composants de la MEC et de facteurs de croissance, de molécules sécrétées ou encore de cytokines. Dans les conditions normales ce stroma agit comme un frein à la transformation maligne mais son rôle change durant la transformation néoplasique. En effet, le stroma joue un rôle clef au cours de l'invasion et de la progression tumorale (Kim JB, Breast Cancer Res. Treat., 2004). Il a récemment été démontré que des fibroblastes isolés de stroma tumoral étaient capables de promouvoir la croissance tumorale (Bhowmick NA, Nature, 2004 ; Bissell MJ, Nat. Rev. Cancer, 2001).

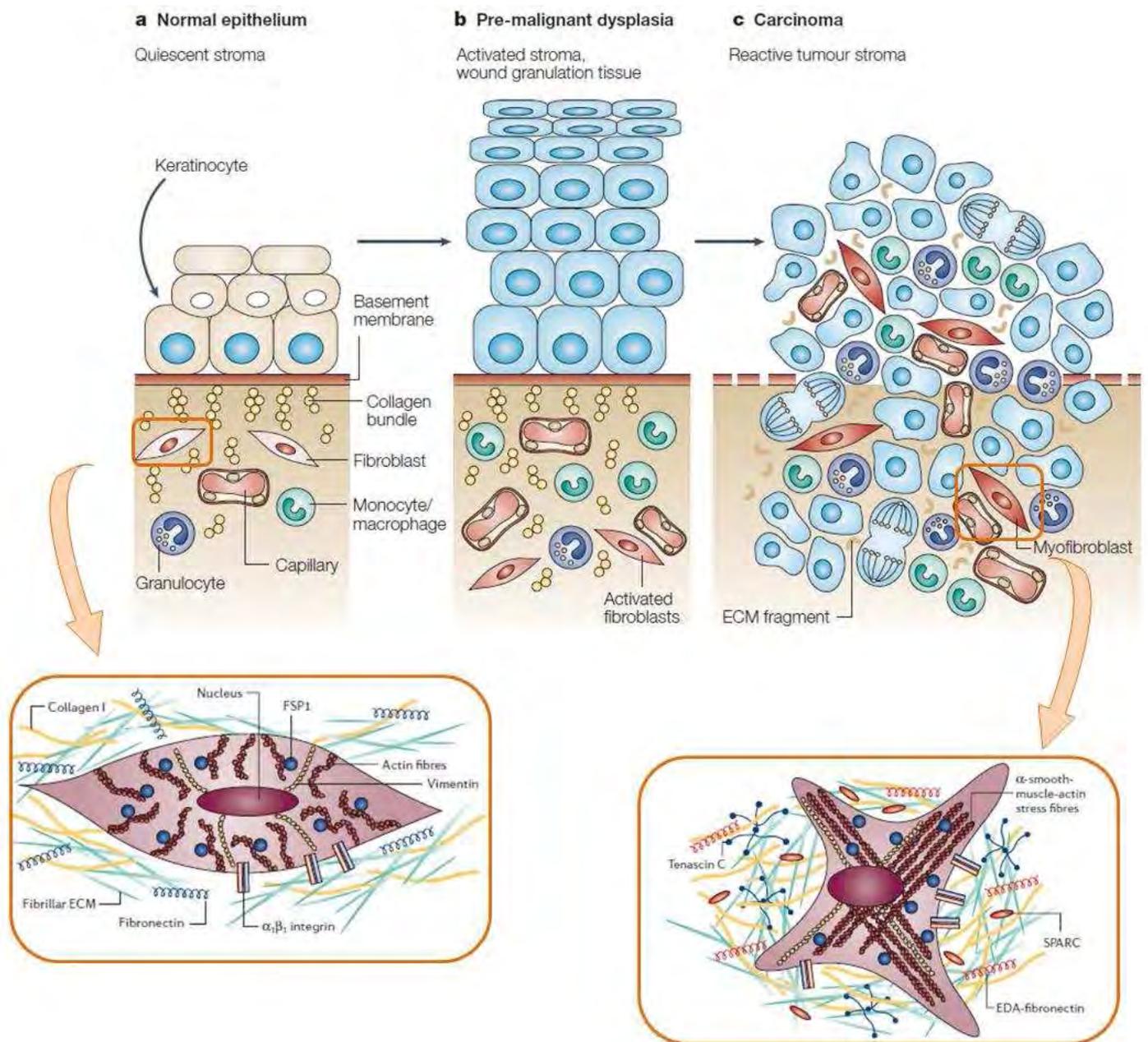


Figure 33. Le stade tumoral dépendrait de l'activation stromale. Adapté de [Mueller MM, Nat. Rev. Cancer, 2004](#) et [Kalluri R, Nat. Rev. Cancer, 2006](#). a) épithélium normal avec un stroma quiescent, b) stade pré-néoplasique : le stroma est alors activé avec une hyperplasie des cellules épithéliales et des fibroblastes activés, c) la transition vers le carcinome est associée à la prolifération des cellules épithéliales, accroissement des cellules de l'inflammation, des fibroblastes différenciés en myofibroblastes.

Cette population de fibroblastes nommée CAFs (*cancer associated fibroblasts*) est caractérisée par un phénotype hyper-prolifératif, par sa capacité à sécréter des facteurs de croissance, des composants de la MEC et les métalloprotéases matricielles (Mueller MM, *Nat. Rev. Cancer*, 2004 ; Kalluri R, *Nat. Rev. Cancer*, 2006) (Figure 33). Ils inhibent également l'apoptose des cellules cancéreuses, induisent leur prolifération et stimulent l'angiogenèse (Serini G, *Exp. Cell Res. Treat.*, 1999). Pour autant, les mécanismes gouvernant la transformation des fibroblastes normaux en CAFs était méconnue.

De nombreuses études avaient déjà mis en évidence que la perte d'expression de la cavéoline-1 par les fibroblastes conduisait à leur transformation oncogénique. De plus, *in vivo*, l'expression de la cavéoline-1 est diminuée au niveau des CAFs isolés à partir de tumeur du sein alors qu'elle est préservée dans les fibroblastes sains isolés de la même patiente (Mercier I, *Cancer Biol. Ther.*, 2008). De plus, la transplantation orthotopique de ces cellules tumorales Cav1^{+/+} dans un stroma Cav1^{-/-} conduit à un doublement de la masse tumorale (Williams TM, *Am. J. Pathol.*, 2006).

Récemment, les travaux de Martinez-Outschoorn ont dévoilé les mécanismes qui conduisent les fibroblastes à un phénotype de CAFs (Martinez-Outschoorn UE, *Cell Cycle*, 2010) : en utilisant un modèle de co-culture de cellules MCF7 (cancer du sein) et de fibroblastes immortalisés (hTERT-BJ1), ils ont observé une diminution de l'expression de la cavéoline-1 dans ces fibroblastes. L'inhibition de l'expression de la cavéoline-1 est également obtenue lors de l'utilisation de fibroblastes primaires humains placés dans ce système de co-culture avec les MCF7. L'hypothèse selon laquelle l'inhibition de la cavéoline-1 serait réalisée selon une dégradation lysosomale est vérifiée par l'utilisation de la chloroquine (inhibiteur des lysosomes). L'acquisition du phénotype CAFs par les fibroblastes est caractérisée par la diminution de l'expression de la cavéoline-1 mais aussi par l'augmentation de l'expression de marqueurs myofibroblastiques (α -SMA, calponine et vimentine) et des protéines de MEC (Ténascine-C et Collagène de type I) et par l'activation constitutive de la voie TGF β /Smad2 (Martinez-Outschoorn UE, *Cell Cycle*, 2010).

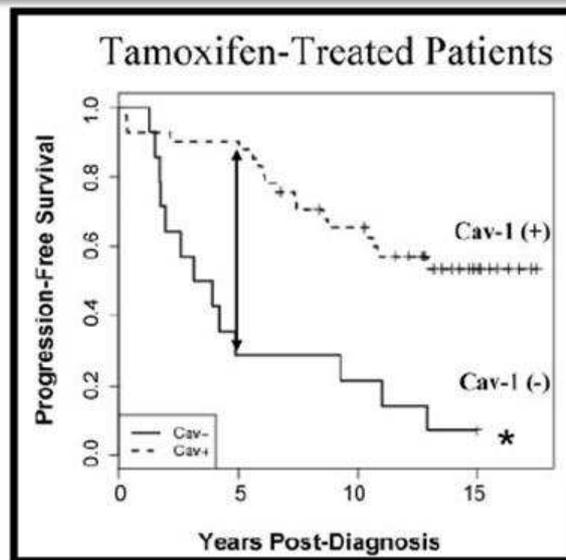
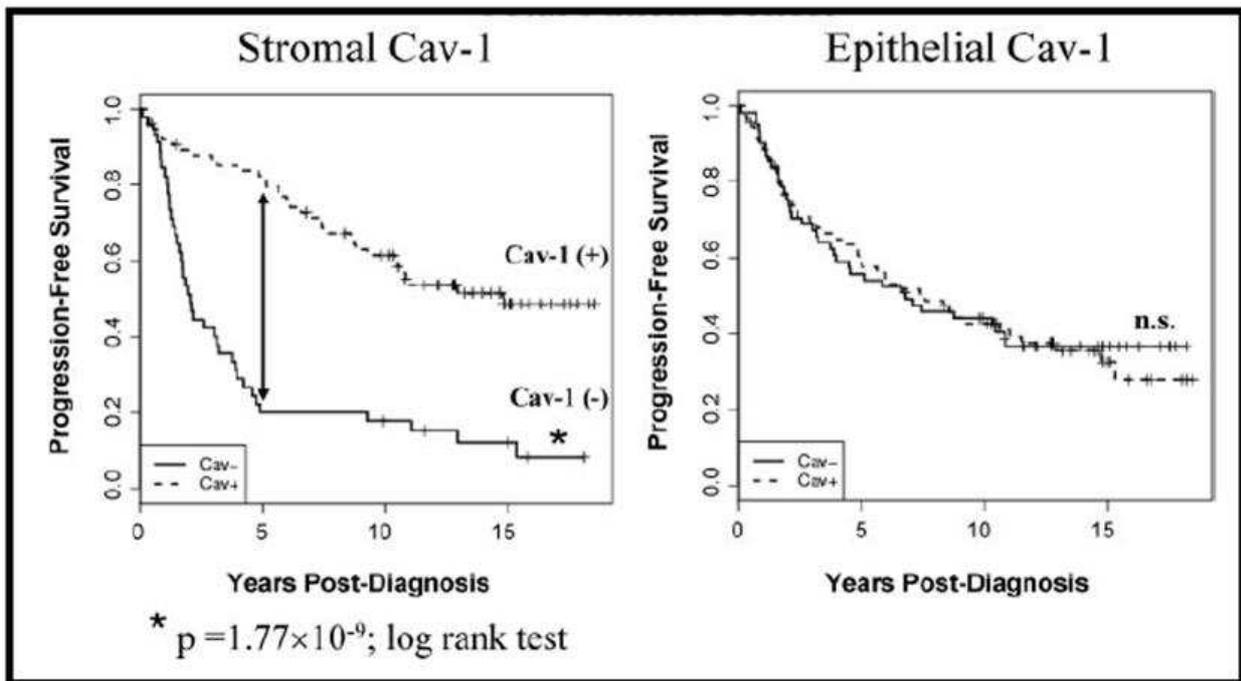


Figure 34. La sur-expression de la cavéoline-1 au niveau des cellules stromales est associée à un mauvais pronostic. Adapté de [Witkiewicz AK, Am. J. Pathol., 2009](#). L'expression de la cavéoline-1 dans les cellules épithéliales n'est pas prédictive de la PFS (*progression free-survival*) (Courbes Kaplan-Meier, haut). L'absence d'expression de la cavéoline-1 au niveau des cellules stromales prédit de faibles réponses au tamoxifène chez les patients.

Les auteurs proposent d'utiliser ce modèle de co-culture afin d'obtenir des CAFs synthétiques qui pourraient alors servir à identifier de nouvelles molécules thérapeutiques ciblant des micro-environnements tumoraux Cav1^{-/-}. Ils suggèrent également l'utilisation de la chloroquine, ou d'autres inhibiteurs des lysosomes, comme agent thérapeutique permettant de restaurer l'expression stromale de la cavéoline-1 dans les CAFs ([Martinez-Outschoorn UE, Cell Cycle, 2010](#)).

Au contraire, Sloan et ses collègues ont mis en évidence qu'une forte expression de la cavéoline-1 dans le tissu stromal environnant la tumeur était fortement associée à la diminution des métastases et à une amélioration de la survie ([Sloan EK, Am. J. Pathol., 2009](#)).

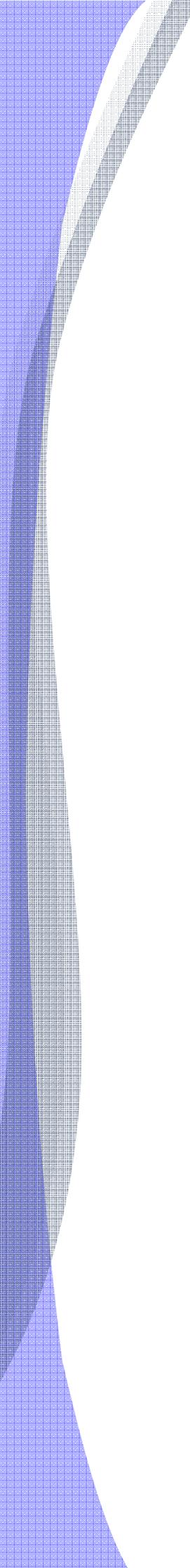
L'expression de la cavéoline-1 est donc récemment apparue comme un biomarqueur dans le cancer du sein ([Witkiewicz AK, Am. J. Pathol., 2009](#)). Son expression au niveau des cellules stromales prédit de manière précoce la rechute, les métastases, la survie et la résistance du tamoxifène ([Witkiewicz AK, Am. J. Pathol., 2009](#)) (**Figure34**).

Le rôle de la cavéoline-1 est controversé car, selon le type de cancer et selon ses partenaires protéiques, elle agit tantôt comme un oncogène et tantôt comme un gène suppresseur de tumeur. Compte tenu du rôle exercé par la cavéoline-1 sur de nombreux processus cellulaires dérégulés dans les cancers et de l'hétérogénéité de son expression dans les glioblastomes, nous nous sommes demandés qu'elle était la contribution de ces cellules sur-exprimant et sous-exprimant la cavéoline-1 au sein de ces tumeurs.

Le premier objectif de cette étude était donc d'évaluer quelles étaient les conséquences d'une variation du taux d'expression de la cavéoline-1 dans les cellules de glioblastomes.

Le deuxième objectif était de mettre en évidence les médiateurs et les mécanismes moléculaires des effets de la cavéoline-1 dans ces cellules.

Le dernier objectif était de proposer une ou plusieurs cibles thérapeutiques dans le traitement des glioblastomes.



*MATÉRIELS
ET
MÉTHODES*

I/ Culture cellulaire

Les lignées cellulaires de glioblastome utilisées dans notre étude sont maintenues en culture dans le milieu EMEM supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal (SVF) et de 0,6mg/ml d'ultraglutamine 1 (Lonza). Les lignées U87-MG et U373-MG proviennent de l'ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, USA) alors que les lignées LN-18, LNT-229, LNZ-308 et LN-319 ont été généreusement fournies par le Dr. Heigi (Université de Lausanne, Suisse).

I-1/ Génération de lignées stables

La technique du siRNA comme celle du shRNA repose sur le processus d'ARN interférence qui correspond à l'introduction d'ARN double brin dans une cellule eucaryote induisant une dégradation spécifique d'un ARNm cible et donc une inhibition de l'expression de la protéine correspondante. Le siRNA correspond à une inhibition transitoire (quelques jours) de l'expression de la protéine cible alors que le shRNA permet d'obtenir une inhibition prolongée (plusieurs mois). Différents agents de transfection ont été utilisés à cet effet ; la lipofectamine 2000 (Invitrogen) ou l'Interferin (Polyplus Transfection) pour les siRNA et l'Arrest-In (OpenBiosystems) pour les shRNA. Deux vecteurs d'expressions nous ont permis de sur-exprimer les protéines cibles dans les cellules U87-MG.

L'inhibition de l'expression de la cavéoline-1 et de la sous-unité intégrine $\alpha 5$ dans la lignée U87-MG a été réalisée par la transfection du plasmide pSM2 (pSHAG-MAGICS2 ; OpenBiosystems) contenant le shRNA ciblant la cavéoline-1 et la sous-unité intégrine $\alpha 5$ (shRNA_{cav-1} et shRNA _{$\alpha 5$}). La sur-expression de la cavéoline-1 dans cette lignée a la particularité d'avoir été obtenue par ajout d'un tag EGFP permettant une évaluation directe de l'efficacité de la transfection par microscopie. Cette construction a été obtenue par l'introduction de sites de restriction HindIII et BamHI au niveau 5'-3' du domaine CDS de la cavéoline-1 par PCR. Le sous-clonage de ce fragment HindIII/cav-1/BamHI a été réalisé dans le vecteur d'expression pEGFP-N3_{ctrl} (BD Biosciences Clontech). La lignée sur-exprimant la sous-unité intégrine $\alpha 5$ a été créée par sous-clonage de l'ADNc humain de

cette sous-unité intégrine à partir d'un plasmide intégrine pEGE α 5 (don du Dr. Ruoslahti, Burnham Institute, La Jolla, CA) au niveau des sites XbaI/NotI du vecteur d'expression pcDNA3.1 (Invitrogen). Les transfections ont été réalisées avec 1 μ g (pEGFP et pcDNA) ou 2,5 μ g (shRNA) de plasmide puis les cellules transfectées ont été sélectionnées par l'utilisation d'antibiotiques : la G418 pour les plasmides pEGFP et pcDNA et la puromycine pour le plasmide shRNA.

Les cellules ont étéensemencées à 75 000 cellules par puits dans 2ml de milieu EMEM supplémenté de 10% de SVF dans une plaque 6 puits. Après 24 heures d'incubation, les cellules sont transfectées par le shRNA et un changement de milieu est réalisé (1,5ml EMEM + 10% SVF). Brièvement, le milieu OPTIMEM (200 μ l) est placé dans deux tubes Eppendorf de 1,5ml ; 10 μ l d'agent de transfection (Arrest-In) sont ajoutés dans l'un des tubes et le volume de shRNA correspondant à 2 μ g est ajouté dans l'autre tube. Après 5 minutes d'incubation, le mélange OPTIMEM/agent de transfection est ajouté au mélange OPTIMEM/shRNA. Après remise en suspension du mélange, une incubation de 20 minutes est réalisée puis le mélange OPTIMEM/shRNA/agent de transfection est ajouté aux cellules. Après 72 heures d'incubation, les cellules sont transférées dans une flask T80 avec 10ml de milieu EMEM + 10% SVF puis, après reprise de la croissance cellulaire, les cellules sont sélectionnées. L'expression des protéines d'intérêt et l'analyse de l'activation des voies de signalisation sont réalisées par Western Blot (WB) et RT-PCR quantitative.

I-2/ Inhibition transitoire de l'expression de la cavéoline-1, des sous-unités intégrines α 5 et α 2, de Smad2 et du TGF β R1 (siRNA)

L'inhibition de la cavéoline-1, des sous-unités intégrines α 5 et α 2, Smad2 et TGF β R1 a été réalisée par transfection de siRNA_{cav-1}, siRNA _{α 5}, siRNA _{α 2}, siRNA_{Smad2} et siRNA_{TGF β R1} durant 72 heures avec 100nM de siRNA suivant les recommandations du fabricant (Dharmacon Research). Différents agents de transfection ont été utilisés : la lipofectamine 2000 (Invitrogen) ou l'Interferin (Polyplus Transfection).

Les cellules sontensemencées à 50 000 cellules par puits dans 2ml de milieu EMEM supplémenté de 10% de SVF dans une plaque 6 puits. Après 24 heures d'incubation, les cellules sont traitées par le siRNA et un changement de milieu est réalisé (1,5ml EMEM + 10% SVF). Brièvement, le milieu OPTIMEM (200 μ l) est placé dans deux tubes Eppendorf

de 1,5ml ; 5µl d'agent de transfection sont ajoutés dans l'un des tubes et 10µl de siRNA dans l'autre. Après 5 minutes d'incubation, le mélange OPTIMEM/agent de transfection est ajouté au mélange OPTIMEM/siRNA. Après une remise en suspension du mélange, une incubation de 20 minutes est réalisée puis le mélange OPTIMEM/siRNA/agent de transfection est ajouté aux cellules. Après 72 heures d'incubation, la prolifération et la clonogénicité des cellules ont été testées et le reste des cellules a été récupéré et l'expression des protéines d'intérêt et l'analyse de l'activation des voies de signalisation ont été réalisées par Western Blot (WB).

I-3/ Inhibition des voies de signalisation

Au cours de cette étude, nous avons eu recours à différentes molécules chimiques, le LY294002, le SB-431542 et le UO126 afin d'inhiber respectivement les voies de signalisation PI3-K/Akt, TGFβR1/Smad et MAPK. Plus précisément, le LY294002 est un inhibiteur spécifique de la PI3K, le SB-431542 inhibe l'activité du récepteur TGFβR1 et le UO126 est un inhibiteur de MEK1. Les cellules sont mises en culture dans un milieu EMEM + 10% SVF à 200 000 cellules par puit et sont incubées 24 heures avec l'inhibiteur correspondant. Les cellules sont ensuite incubées durant 24, 48 et/ou 72 heures avec les inhibiteurs dans du milieu EMEM + 10% SVF préparé extemporanément. Les cellules sont ensuite récupérées puis l'expression des protéines d'intérêt et l'analyse de l'activation des voies de signalisation sont évaluées par WB.

Le SB-431542 (4-[4-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-5-(2-pyridinyl)-1H-imidazol-2-yl]-benzamide ; 4-[4-(3,4-Methylenedioxyphenyl)-5-(2-pyridyl)-1H-imidazol-2-yl]-benzamide ; 4-(5-benzol[1,3]dioxol-5-yl-4-pyridin-2-yl-1H-imidazol-2-yl)-benzamide hydrate ; SIGMA) est un inhibiteur des récepteurs du TGFβ (des récepteurs kinases activine-like, ALK-4, ALK-5 et ALK-7). Cette molécule inhibe la signalisation endogène du TGFβ et de l'activine sans altérer la signalisation des BMP et des récepteurs ALK-1, -2, -3 et -6 (Inman GJ, *Mol. Pharmacol.*, 2002). La solution mère est réalisée dans du DMSO (SIGMA) à 10mM et conservée à -20°C.

Le LY294002 (2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one hydrochloride; SIGMA) est un inhibiteur spécifique de la PI3-K (IC₅₀ = 0,43mg/ml) (Vlahos DJ, *J. Cell Biol.*, 1994).

La solution mère a été reconstituée dans du DMSO à une concentration stock de 10mM et conservée à 4°C.

Le UO126 (1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio]butadiène ; Cell Signaling) est un inhibiteur sélectif des MEK 1 et MEK2 avec une affinité supérieure pour MEK1. Le UO126 n'exerce pas son activité inhibitrice sur les protéines kinases c-Abl, Raf, MEKK, Erk, JNK, MKK3, MKK4/SEK1, MKK6, CDK2 ou CDK4 (Favata MF, J. Cell Biol., 1998). La solution de UO126 a été reconstituée dans du DMSO à une concentration stock de 10mM et conservée à -20°C.

I-4/ Induction de l'expression de la sous-unité intégrine $\alpha 5$ par le TGF β -1

Les cellules ont été mises en culture à 200 000 cellules par puits dans une plaque 6 puits dans un milieu EMEM + 10% SVF. Après une incubation sur la nuit, les cellules ont ensuite été traitées par 1, 2, 5 et 10ng de TGF- β 1 (SIGMA) ou d'activine (Miltenyi Biotec) durant 24 ou 72 heures. Les cellules sont ensuite récupérées puis l'expression de la sous-unité intégrine $\alpha 5$, de la cavéoline-1 et de la GAPDH a été évaluée par WB. L'expression des résultats est obtenue par analyse densitométrique (logiciel ScionImage) et l'expression de l'intégrine et de la cavéoline-1 est rapportée à celle de la GAPDH pour chaque échantillon. Le rapport $\alpha 5$ /GAPDH (ou cavéoline-1/GAPDH) est ramené à 1 pour l'échantillon contrôle (solvant H₂O) et tous les échantillons sont comparés à ce contrôle par une analyse basée sur la règle de trois.

I-5/ Sécrétion de PAI-1 en milieu conditionné

La sécrétion de PAI-1 par les différentes lignées tumorales est obtenue par la mise en culture de 500 000 cellules dans une boîte de pétri de diamètre 60mm dans 3ml de milieu EMEM + 10% SVF. Après une incubation sur la nuit, les cellules sont lavées 2 à 3 fois par du milieu EMEM seul afin d'enlever le SVF. Ensuite, les cellules sont incubées dans 1ml de milieu EMEM seul pendant de 24 ou 48 heures. Le surnageant est alors récupéré dans des tubes Eppendorf puis centrifugé à 2500g pendant 10 minutes à 4°C pour éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est ensuite transféré dans un nouveau tube Eppendorf et la sécrétion de PAI-1 est analysée par WB.

I-6/ Inhibiteurs, antagonistes et agents chimiothérapeutiques

Différentes molécules chimiques ont été utilisées au cours de cette étude : des inhibiteurs de protéines de signalisation [le SB-431542, le LY294002 et le UO126 [voir paragraphe I-3/)] deux antagonistes de l'intégrine (le K34c et le SJ749), un agent chimiothérapeutique [le témozolomide (TMZ)] et une molécule cytotoxique (l'ellipticine).

Le SJ749 ((S)-2-[(2,4,6-triméthylphényl-sulfonyl] amino-3-([7-benzoyloxycarbonyl-8-(2-pyridinylaminométhyl)-1-oxa-2, 7-diazaspiro-(4,4)-non-2-ène-yl]-carbonylamino]-propionique acid) est un antagoniste non peptidique sélectif de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ qui a été synthétisé comme décrit dans le brevet WO97/33887 par le Dr. Klotz. La solution mère est réalisée à 10mM dans un mélange méthanol/eau (50/50).

Le K34c (2-(s)-(2,6-diméthylbenzamido)-3-(4-[3-(pyridin-2-ylamino-propoxy]phényl)propionique acid) est un antagoniste sélectif de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ identifié récemment par l'équipe du Prof. Kessler (Heckmann D, ChemBioChem., 2008). Cette molécule a été synthétisée et fournie par l'équipe de D. Bonnet (UMR7200 CNRS) et la solution stock a été réalisée dans du DMSO à une concentration de 10mM, conservée à -20°C.

Le témozolomide (TMZ ; Schering-Plough) est un agent chimiothérapeutique dont le mode d'action a été décrit précédemment (Friedman HS, Clin. Cancer Res., 2000). Il est dissout à l'aide d'une solution ethanol/eau (50/50) à la concentration stock de 1mM.

L'ellipticine (5,11-diméthyl-6H-pyrido[4,3-b]carbazole ; SIGMA) est une molécule tétracyclique issue d'un alcaloïde naturel. C'est un agent intercalant capable d'inhiber la topoisomérase de type II. La solution stock est réalisée dans du DMSO à une concentration de 1mM.

II/ Western Blot

L'analyse de l'expression des protéines est réalisée par Western Blot (WB). Cette analyse est effectuée dans les différents modèles cellulaires afin de déterminer leur taux d'expression protéique après transfection par siRNA ou shRNA mais également suite à un

traitement ou afin de déterminer l'expression des protéines d'intérêt ou l'activation des voies de signalisation analysées.

II-1/ Expression de la cavéoline-1, des sous unités intégrines $\alpha 5$ et $\beta 1$ et du récepteur TGF β R1

Les cellules sont lysées dans la glace à l'aide du tampon de lyse (1% Triton X-100, NaF 100mM, NaPPi 10mM, Na₃VO₄ 1mM dans du PBS 1X) supplémenté extemporanément d'un cocktail anti-protéase (Roche). La lyse cellulaire est réalisée à 4°C (sur de la glace) durant 30 minutes puis une sonication de 5 secondes est effectuée. Le lysat protéique est alors centrifugé à 14 000rpm (Centrifugeuse 56565, Eppendorf) durant 10 minutes à 4°C. Le lysat protéique est ensuite transféré dans un autre tube Eppendorf puis les échantillons sont dosés. Le dosage protéique est réalisé selon les recommandations du fabricant (DC Protein Assay, Biorad).

L'analyse de la concentration protéique est réalisée par la lecture de la D.O. (densité optique) au spectrophotomètre, à 595 nm, de la gamme étalon d'albumine sérique bovine (BSA : 0 à 2 mg/ml) et des échantillons. 0,5 à 10 μ g de protéines ont été préparées et déposées sur un gel de polyacrylamide (de 8 à 12%) dénaturant (SDS-PAGE). La migration est effectuée dans un tampon d'électrophorèse (Tris-Glycine 1X, 5ml SDS 20%, q.s.p 1 litre) à 60V durant 30 minutes puis à 100V durant 2h00 environ. Le transfert est réalisé sur une membrane de PVDF (Amersham) durant 2h00 à 2h30 à 100V. Un blocage des sites aspécifiques est effectué par incubation d'une heure dans un tampon de blocage (PBS 1X, caséine, 0,3% Tween20). Les membranes sont ensuite incubées toute la nuit à 4°C, sous agitation, avec l'anticorps primaire (voir **Tableau 12**). Les membranes sont ensuite lavées dans le tampon de lavage correspondant (PBS 1x/Tween 0,3%) durant 15 minutes puis 3 fois 5 minutes afin d'éliminer l'anticorps primaire, puis incubées 1 heure à température ambiante, sous agitation douce, dans le tampon de blocage contenant l'anticorps secondaire anti-rabbit Ig à 1/5000 ou anti-mouse Ig à 1/10000. Les membranes sont ensuite lavées dans le tampon de lavage durant 15 minutes puis 6 fois 5 minutes afin d'éliminer l'anticorps secondaire. L'anticorps secondaire reconnaît l'anticorps primaire et est couplé à la peroxydase (*Horseradish peroxydase*, HRP). La révélation est réalisée par la préparation des solutions A et B (Solution A : Eau, Tris, Luminol, Acide coumarique ;

solution B : Eau, Tris, H₂O₂). Après avoir mélangé les deux solutions dans un ratio 1/1, la solution est répartie sur les membranes et incubée deux minutes. La réduction en condition alcaline du peroxyde d'hydrogène par la peroxydase présente sur l'anticorps secondaire catalyse l'oxydation du luminol libérant ainsi de la chimiluminescence. La membrane est exposée sur un film autoradiographique qui est développé par le passage successif dans un bain de produit révélateur, d'eau puis de fixateur. L'expression des résultats est obtenue par analyse densitométrique (logiciel ScionImage) et l'expression des sous-unités intégrines $\alpha 5$ et $\beta 1$, de la cavéoline-1 et du récepteur TGF β RI est rapportée à celle de la GAPDH pour chaque échantillon. Le rapport protéine/GAPDH est ramené à 1 pour l'échantillon contrôle (solvant H₂O) et tous les échantillons sont comparés à ce contrôle par une analyse basée sur la règle de trois.

II-2/ Expression de PAI-1

PAI-1 étant une protéine sécrétée, sa détection est réalisée à partir de la préparation d'un milieu conditionné. Après avoir récupéré le surnageant (SN) dans des tubes Eppendorf, ces derniers sont centrifugés à 2500g à 4°C durant 10 minutes pour éliminer les cellules flottantes. Le SN est ensuite transféré dans un autre tube Eppendorf. Ensuite, 120 μ l de SN sont additionnés de 24 μ l de Laemli 6X (0,03% de bleu de bromophénol, 6% de SDS 20%, 30% de glycérol, 300mM de tris HCl à pH 6,8) puis les protéines sont dénaturées en chauffant la préparation à 95°C durant 7 minutes. Les résultats sont exprimés grâce à une analyse densitométrique (logiciel ScionImage) étant donné que PAI-1 est une protéine sécrétée son expression ne peut pas être rapportée à celle de la GAPDH. Par conséquent, les cellules ayant sécrétées PAI-1 sont récupérées, par trypsination, numérées sur cellule de Neubauer puis lysées. L'expression de PAI-1 est alors rapportée au nombre de cellules (cellules/ml) mais aussi à la concentration protéique (mg/ml). Le rapport PAI-1/(cellules/ml) (ou PAI-1/(mg/ml)) est ramené à 1 pour l'échantillon contrôle (U87MG) et tous les échantillons sont comparés à ce contrôle par une analyse basée sur la règle de trois.

II-3/ Activation des protéines ERK, AKt, Smad2, FAK, p38 MAPK, SAPJNK et p53

Le protocole d'extraction protéique pour le western blot des protéines phosphorylées a été réalisé sur la glace afin de préserver au maximum la phosphorylation des protéines

étudiées. Les plaques 6 puits ou les boîtes de pétri sont placées sur la glace et le milieu est aspiré. Chaque puits ou boîte est lavé à l'aide de PBS 1X froid puis le PBS 1X est aspiré. Les cellules sont ensuite lysées par addition d'un mélange Laemli 2X/ β -mercaptoéthanol (dans un ratio 950/50). Les cellules sont alors scrappées dans ce mélange et le lysat est collecté dans un tube Eppendorf après plusieurs séries d'aspirations-refoulements. Les protéines sont dénaturées par un chauffage de 7 minutes à 95°C.

Brièvement, 5 à 40 μ l de lysat protéique (voir **tableau 12**) sont déposés sur un gel de polyacrylamide dénaturant. Les tampons de blocage ainsi que les tampons utilisés pour les anticorps primaires et secondaires sont précisés dans le **tableau 12** de même que toutes les dilutions. Le tampon de lavage correspond à du TBS 1x/Tween 0,1%

L'expression des résultats est obtenue par analyse densitométrique (logiciel ScionImage) et l'expression des protéines phosphorylées est rapportée à celle de la protéine totale pour chaque échantillon (par exemple p-ERK/ERK). Le rapport protéine phosphorylée/protéine totale est ramené à 1 pour l'échantillon contrôle (solvant H₂O) et tous les échantillons sont comparés à ce contrôle par une analyse basée sur la règle de trois. Afin de s'assurer que la quantité de protéine totale ne varie pas, la même analyse a été réalisée avec la GAPDH (par exemple p-ERK/GAPDH et ERK/GAPDH).

III/ RT-PCR quantitative

III-1/ Expression de la cavéoline-1, des sous-unités intégrines α 5 et β 1, de PAI-1 et de la cyclophiline-1

La variation de l'expression des différents transcrits (ARN) a également été analysée. Sauf mention contraire, les cellules ont été récupérées après culture durant 24 heures ou suite à un traitement de 24, 48 ou 72 heures.

III-1-1/ Extraction des ARNs

Les plaques ou boîtes de pétri sont placées sur la glace puis le milieu est aspiré à l'aide d'une pipette pasteur stérile. Un volume de TRI Reagent (Sigma) est ajouté (1ml pour une aire de 10cm² soit 200 μ l pour un puits d'une plaque 6 puits) puis les cellules sont récupérées.

| | Blocage de la membrane | Anticorps primaire | Tampon (pour Ac primaire) | Anticorps secondaire | Hôte | Tampon (pour Ac secondaire) | Poids moléculaire (en kDa) | Quantité de protéines (en µl ou en µg) | Type d'extraction | % (gel séparation) |
|---|------------------------------|--------------------|------------------------------|----------------------|--------|------------------------------|----------------------------|--|-----------------------|--------------------|
| Alpha 5 (Clone 1928; Millipore) | I-Block | 1 / 3000 | I-Block | 1 / 5000 | Lapin | I-Block | 150 | 0,5µg | Triton 0,1% | 8-10% |
| Beta 1 (Clone 1952; Chemicon) | I-Block | 1 / 1000 | I-Block | 1 / 5000 | Lapin | I-Block | 130 | 0,5µg | Triton 0,1% | 8-10% |
| Cavéoline-1 (Santa Cruz Biotechnology) | I-Block | 1 / 1000 | I-Block | 1 / 5000 | Lapin | I-Block | 22, 24 | 1µg | Triton 0,1% | 12% |
| TGFβRI (Santa Cruz Biotechnology) | I-Block (ou BSA) | 1 / 1000 | I-Block (ou BSA) | 1 / 5000 | Lapin | I-Block (ou BSA) | 53 | 20µl | Triton 0,1% ou Laemli | 10% |
| PAI-1 (Santa Cruz Biotechnology) | I-Block | 1 / 1000 | I-Block | 1 / 5000 | Lapin | I-Block | 50 | 60µl | φ | 10-12% |
| GAPDH (Millipore) | I-Block | 1 / 50000 | I-Block | 1 / 10000 | Souris | I-Block | 36 | φ | Triton 0,1% ou Laemli | φ |
| ERK-p (T202/Y204; Cell Signaling) | BSA 3% / TBSIX / Tween 0,1% | 1 / 1000 | BSA 3% / TBSIX / Tween 0,1% | 1 / 5000 | Lapin | BSA 3% / TBSIX / Tween 0,1% | 42, 44 | 5-10µl | Laemli + βme | 10% |
| ERK (Cell Signaling) | BSA 3% / TBSIX / Tween 0,1% | 1 / 1000 | BSA 3% / TBSIX / Tween 0,1% | 1 / 5000 | Lapin | BSA 3% / TBSIX / Tween 0,1% | 42, 44 | 5-10µl | Laemli + βme | 10% |
| Akt-p (Thr 308; Cell Signaling) | BSA 3% / TBSIX / Tween 0,1% | 1 / 1000 | BSA 3% / TBSIX / Tween 0,1% | 1 / 5000 | Lapin | BSA 3% / TBSIX / Tween 0,1% | 60 | 10-20µl | Laemli + βme | 10% |
| Akt (Cell Signaling) | BSA 3% / TBSIX / Tween 0,1% | 1 / 1000 | BSA 3% / TBSIX / Tween 0,1% | 1 / 5000 | Lapin | BSA 3% / TBSIX / Tween 0,1% | 60 | 10-20µl | Laemli + βme | 10% |
| p38-p (Thr180/Tyr182; Cell Signaling) | BSA 3% / TBSIX / Tween 0,1% | 1 / 1000 | BSA 3% / TBSIX / Tween 0,1% | 1 / 5000 | Lapin | BSA 3% / TBSIX / Tween 0,1% | 38 | 10-20µl | Laemli + βme | 10% |
| p38 (Cell Signaling) | BSA 3% / TBSIX / Tween 0,1% | 1 / 1000 | BSA 3% / TBSIX / Tween 0,1% | 1 / 5000 | Lapin | BSA 3% / TBSIX / Tween 0,1% | 38 | 10-20µl | Laemli + βme | 10% |
| SAP-JNK-p (Thr183/Tyr185; Cell Signaling) | BSA 3% / TBSIX / Tween 0,1% | 1 / 1000 | BSA 3% / TBSIX / Tween 0,1% | 1 / 5000 | Lapin | BSA 3% / TBSIX / Tween 0,1% | 54, 46 | 10-20µl | Laemli + βme | 10% |
| SAP-JNK (Cell Signaling) | BSA 3% / TBSIX / Tween 0,1% | 1 / 1000 | BSA 3% / TBSIX / Tween 0,1% | 1 / 5000 | Lapin | BSA 3% / TBSIX / Tween 0,1% | 54, 46 | 10-20µl | Laemli + βme | 10% |
| FAK-p (pY397; Biossante) | BSA 3% / TBSIX / Tween 0,1% | 1 / 1000 | BSA 3% / TBSIX / Tween 0,1% | 1 / 5000 | Lapin | BSA 3% / TBSIX / Tween 0,1% | 125 | 10-20µl | Laemli + βme | 10% |
| FAK (Upstate) | BSA 3% / TBSIX / Tween 0,1% | 1 / 1000 | BSA 3% / TBSIX / Tween 0,1% | 1 / 5000 | Lapin | BSA 3% / TBSIX / Tween 0,1% | 125 | 10-20µl | Laemli + βme | 10% |
| p53-p (S15; Cell Signaling) | Lait 5% / TBSIX / Tween 0,1% | 1 / 1000 | Lait 5% / TBSIX / Tween 0,1% | 1 / 5000 | Lapin | Lait 5% / TBSIX / Tween 0,1% | 53 | 40µl | Laemli + βme | 10% |
| p53 (Cell Signaling) | I-Block | 1 / 1000 | I-Block | 1 / 5000 | Souris | I-Block | 53 | 40µl | Laemli + βme | 10% |
| Smad2-p (S465/467; Cell Signaling) | Lait 5% / TBSIX / Tween 0,1% | 1 / 500 | Lait 5% / TBSIX / Tween 0,1% | 1 / 5000 | Lapin | Lait 5% / TBSIX / Tween 0,1% | 60 | 40µl | Laemli + βme | 10% |
| Smad2-3 (Cell Signaling) | BSA 3% / TBSIX / Tween 0,1% | 1 / 1000 | BSA 3% / TBSIX / Tween 0,1% | 1 / 5000 | Lapin | BSA 3% / TBSIX / Tween 0,1% | 60, 52 | 40µl | Laemli + βme | 10% |

Tableau 12. Liste des anticorps utilisés pour le western blot.

Le lysat est collecté dans un tube Eppendorf stérile puis les échantillons sont placés à -20°C durant au moins 24 heures. Les échantillons sont ensuite décongelés sur la glace puis le chloroforme est ajouté (200µl de chloroforme pour 1ml de TRI Reagent).

Les échantillons sont ensuite vortexés durant 15 secondes puis incubés à température ambiante durant 5 minutes. Une centrifugation à 12 000g durant 15 minutes à 4°C est effectuée. La phase aqueuse est récupérée dans un autre tube Eppendorf stérile puis de l'isopropanol est ajouté (500µl pour 1ml de TRI Reagent). Les échantillons sont de nouveau vortexés 15 secondes puis incubés à température ambiante durant 10 minutes. Une centrifugation à 12 000g durant 15 minutes à 4°C est réalisée. Le surnageant est aspiré (le culot d'ARN est parfois visible à cette étape) et le culot est lavé avec de l'éthanol à 75% (1ml pour 1ml de TRI Reagent). Après avoir oté l'éthanol, le culot est séché à l'air libre puis repris dans 15 à 25µl d'eau DEPC. Les échantillons sont dosés ou placés à -20°C en vue d'une analyse ultérieure.

III-1-2/ Dosage des ARNs et rétrotranscription en ADNc

Le dosage des ARNs est réalisé à l'aide d'un Biophotomètre (Eppendorf). L'eau DEPC (99µl) est placée dans des Uvettes (Eppendorf) puis 1 µl d'ARNs est ajouté. Le blanc est effectué en plaçant 100µl d'eau DEPC. Après une agitation douce, les ARNs sont dosés. La reverse transcription (RT) des ARNs en ADNc est réalisée grâce au High Capacity cDNA RT Kit (Applied Biosystems). 2µg d'ARN sont disposés dans des tubes PCR q.s.p 20µl d'eau osmosée (18Ohm) puis 20µl de mix de RT (Buffer 10X, dNTP 100mM, Randoms Hexamers 10X, Reverse transcriptase 50 unités par µl, H2O) sont ajoutés. La RT est réalisée dans un thermocycleur selon le programme suivant : 10 minutes à 25°C puis 2 heures à 37°C et 15 minutes à 4°C. Pour la PCR quantitative, les ADNc sont dilués au 1/5 (50ng par puits).

III-1-3/ RT-PCR quantitative

La technique de RT-PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) permet l'analyse de l'expression d'un gène au niveau de l'ARN messenger (ARNm).

| Amorces (Invitrogen) | Sens | Antisense |
|----------------------|------------------------------|-------------------------------|
| Cyclophiline | 5'-CAGGTCTGGCATCTTGCC-3' | 5'-TTGCTGGTCTTGCCATTCT-3' |
| ITGA5 | 5'-GGGCAGCAGGACAGGGTTAC-3' | 5'-GCCTTGCCAGAAATAGCTTCC-3' |
| ITGB1 | 5'-CAAATTGTGGGTGGTGCACA-3' | 5'-TGGAGGGCAACCCTTCTTT-3' |
| Cav1 | 5'-ACCGCGACCCTAAACACCTC-3' | 5'-CCTTCAAATGCCGTCAAAA-3' |
| TGF β RI | 5'-CCACAGAGTGGGAACAAAAAGG-3' | 5'-GTCAGCACGTTTGAAGGATTCA-3' |
| PAI-1 | 5'-GGCTGACTTCACGAGTCTTCA-3' | 5'-GTTACCTCGATCTTCACTTTCTG-3' |

Tableau 13. Tableau des séquences des amorces utilisées pour la RT-PCR quantitative.

La technique est celle d'une PCR classique à la différence que la RT-PCR quantitative permet une amplification massive des ADNc qui sont détectés grâce à un fluorophore, le Syber Green (1X SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), incorporé dans les transcrits amplifiés à chaque cycle. Le mix de qPCR contient de l'eau, le syber green et les amorces (**Tableau 13**). L'analyse de l'amplification des transcrits étudiés est donnée par la valeur des Ct (nombre de cycles d'amplification) : plus la valeur des Ct est grande (32 par exemple) moins le transcrit est exprimé. La cyclophiline est utilisée comme gène de référence comme la GAPDH pour l'analyse des WB. L'analyse des résultats est donc obtenue par le rapport des Ct du transcrit étudié par rapport au Ct de la cyclophiline selon le calcul suivant : $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak KJ, Methods, 2001). Le mix est ajouté à raison de 20µl par puits dans une plaque 96 puits avec 5µl d'ADNc. La plaque est recouverte d'un film plastique transparent et autocollant afin de pallier l'évaporation des échantillons au cours de l'amplification. Le programme d'amplification du volume réactionnel est réalisé de la façon suivante : 10 min à 95°C (dénaturation) suivi de 40 cycles de 15 s à 95°C (hybridation) puis 1 min à 65°C (élongation). Les amorces sens et antisens sont à une concentration finale de 300µM, les ADNc sont utilisés à la concentration de 50ng/ml.

IV/ Clonogénicité

Le test de clonogénicité mesure la capacité d'une cellule cancéreuse à former des colonies. Pour ce faire, les cellules sont mises en culture en très faible quantité afin qu'une colonie provienne d'une seule cellule.

IV-1/ Chimiosensibilité au Témazolomide et à l'ellipticine

La clonogénicité des cellules U87-MGshRNA_{cav1} ou U87-MGshRNA_{ctrl} ainsi que les cellules pEGFP_{cav1/ctrl} est évaluée en présence ou non de témazolomide (TMZ) et d'ellipticine. Le TMZ est dilué dans une solution éthanol/eau (50/50) et utilisé à 100, 200, et 300µM alors que l'ellipticine est reprise dans du DMSO et utilisée à 0,5 1 et 2µM. Ce test est réalisé de manière séquentielle avec une mise en culture en EMEM + 2% SVF durant 3 jours puis un changement de milieu EMEM + 10%SVF pendant 7 jours.

Les cellules sontensemencées à 250 cellules par puits dans 2ml de milieu puis les drogues sont ajoutées. Après une incubation de 3 jours, le changement de milieu est réalisé et la

repousse s'effectue en absence de drogues. Au bout des 10 jours, les colonies sont lavées avec du PBS 1X (2ml), puis colorées à l'aide d'une solution de crystal violet/éthanol (0,1% ; 2ml par puits). Chaque puits est ensuite rincé 2 fois avec de l'eau osmosée. Les colonies sont ensuite comptées et photographiées. Les résultats sont exprimés en rapportant tout d'abord le nombre de colonies compté à 250 (nombre de cellules au départ) : ce calcul correspond à la plating efficiency (PE). Ensuite, le rapport nombre de colonies/250 est ramené à 1 pour le contrôle (solvant) et tous les échantillons sont comparés à ce contrôle selon le rapport $([\text{nombre de colonies}/250]_{\text{ctrl}} / [\text{nombre de colonies}/250]_{\text{échantillon}})$. Ce rapport correspond à la fraction survivante (ou *surviving fraction*).

IV-2/ Réponse aux antagonistes de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et au SB-431542

La clonogénicité des cellules U87-MGshRNA_{cav1} et de leurs contrôles U87-MGshRNA_{ctrl} ainsi que les cellules pEGFP_{cav1/ctrl} a été évaluée en présence de deux antagonistes sélectifs de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, le K34c et le SJ749, et du SB-431542, un inhibiteur spécifique du récepteur TGF β RI. Les cellules ont étéensemencées à 250 cellules par puits dans 1ml de EMEM + 2% SVF. Le K34c est utilisé à deux concentrations 10 et 30 μ M et le SB-431542 est utilisé à 5 et 10 μ M.

V/ Prolifération cellulaire

Le CellTiter96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) est une méthode colorimétrique permettant de déterminer le nombre de cellules viables en prolifération. Le kit contient un agent tétrazolium, le MTS ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tétrazolium], qui est un composé bioréduit par les cellules en un produit coloré, le formazan, soluble dans le milieu de culture. Cette conversion est accomplie par le NADPH (ou le NADH) produit par les déhydrogénases des cellules métaboliquement actives.

Brièvement, les cellules sontensemencées à 1000 cellules par puits dans une plaque 96 puits. La viabilité cellulaire est ensuite déterminée en ajoutant 100 μ l de MTS par puit. Après 3 heures d'incubation à 37°C sous 5% de CO₂, l'absorbance est mesurée à 490nm.

Les résultats sont exprimés en pourcentage : la D.O. du contrôle correspondant à 100%. Les échantillons sont comparés à ce contrôle par une analyse basée sur la règle de trois.

VI/ Adhérence cellulaire

L'adhérence des cellules a été évaluée sur différentes matrices : poly-L-Lysine (PL), collagène de type I (COL) et fibronectine (FN). La capacité des cellules à adhérer à l'une ou l'autre de ces matrices dépend de la présence et de la quantité des récepteurs membranaires de ce ligand. La PL, le COL et la FN sont incubés durant 1 heure dans une plaque 96 puits. Les cellules (20 000 cellules par puits) sont ensuite placées dans les puits recouverts de ces différentes matrices. Après 2 lavages au PBS (excepté les puits PL), les cellules sont fixées à l'aide d'une solution de glutaraldéhyde (5%). Les cellules sont ensuite colorées, après un lavage au PBS 1X, à l'aide d'une solution de crystal violet (0,25%) durant 1 heure. Après 3 lavages avec de l'eau, les cellules sont lysées et le crystal violet libéré grâce à une solution d'acide acétique à 10%. Après une agitation de 5 à 10 minutes, l'absorbance est lue à 595nm. Les résultats sont exprimés en pourcentage : la D.O. du contrôle correspondant à 100%. Les échantillons sont comparés à ce contrôle par une analyse basée sur la règle de trois.

VII/ Transmigration cellulaire

Le test de transmigration cellulaire mesure la capacité des cellules à migrer au travers d'un tamis (*Transwell*). La migration de ces cellules est réalisée par chimio-attraction à l'aide d'un milieu additionné de sérum ou d'une molécule chimio-attractive.

Les tamis sont coatés à l'aide d'une solution de PBS1X contenant de la fibronectine (10µg/ml) ou du collagène (10µg/ml). Après une incubation d'une heure, les cellules sont placées dans la chambre supérieure à raison de 500 000 cellules par transwell dans 100µl de milieu EMEM seul. La chambre inférieure est préalablement remplie de milieu EMEM+ 10% SVF. Après une incubation de 24 heures, la chambre supérieure est lavée et les cellules sont enlevées par plusieurs lavages au PBS1X à l'aide d'un coton-tige. Les cellules ayant transmigré, présentes au niveau de la partie inférieure du transwell, sont ensuite fixées durant 10 minutes à température ambiante dans une solution de PFA 4%. Après lavages, les transwell sont placés dans une solution de crystal violet/éthanol afin de

colorer les cellules ayant transmigré. Les tamis subissent ensuite plusieurs lavages avec de l'eau osmosée puis les cellules sont comptées. Les résultats sont exprimés en pourcentage et le contrôle correspondant à 100%. Les échantillons sont comparés à ce contrôle par une analyse basée sur la règle de trois.

VIII/ ELISA

L'ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) est une technique de biochimie permettant de détecter la présence d'un anticorps ou d'un antigène (dans le cas qui nous occupe, il s'agit du facteur de croissance TGF- β 1). Ce dosage immunoenzymatique est réalisé sur les surnageants cellulaires.

Le dosage du TGF- β 1 a été réalisé sur les surnageants des cellules U87-MGpEGFP_{cav1}, U87-MGpEGFP_{ctrl}, U87-MGpSM2_{cav1} et U87-MGpSM2_{ctrl}. Les cellules sontensemencées à 300 000 cellules par boîte de pétri de diamètre 60mm dans 3ml de milieu EMEM + 10% SVF. Après une incubation sur la nuit, les cellules subissent plusieurs lavages avec du milieu EMEM seul (afin d'éliminer le SVF) puis sont incubées 24 ou 72 heures dans 1,5ml de milieu EMEM. Le surnageant est alors collecté dans des tubes en polypropylène puis centrifugé pour éliminer les cellules flottantes. Les surnageants sont transférés dans de nouveaux tubes en polypropylène. 100 μ l de surnageant sont prélevés en vue de la procédure d'activation réalisée à l'aide de 20 μ l de HCl 1N. Après remise en suspension et une incubation de 10 minutes à température ambiante, le surnageant est neutralisé à l'aide d'une solution de NaOH (12N)/Hepes (0,5M). Après plusieurs aspirations et refoulements la mesure du pH est réalisée à l'aide d'une sonde de pHmètre. Le pH doit être compris entre 7,2 et 7,6 (sinon une solution acide ou basique est ajoutée en conséquence) afin de pouvoir procéder au test à l'aide du kit TGF β 1 R&D Biosystems. 50 μ l de la solution RD5-53 (1X) sont déposés dans chaque puit puis 50 μ l de la gamme TGF β -1 et 50 μ l d'échantillon. Les échantillons sont incubés durant 2 heures à température ambiante puis les surnageants sont éliminés par retournement de la plaque et tapotement. Les puits sont lavés avec la solution de lavage puis 100 μ l de la solution de TGF- β 1 conjugué (anticorps polyclonale dirigé contre le TGF- β 1 couplé à HRP) sont ajoutés. Après une incubation de 2 heures à température ambiante, les puits sont lavés 5 fois avec la solution de lavage. La solution de substrat est ajoutée à raison de 100 μ l par puits [mélange volume/volume des

solutions A (solution de peroxyde d'hydrogène) et B (solution de tetramethylbenzidine)]. Après une incubation de 30 minutes à l'abri de la lumière, la réaction est arrêtée à l'aide de 100µl de solution STOP (solution d'acide hydrochlorique). La lecture est réalisée à 540nm. L'expression des résultats est obtenue en reportant les valeurs de D.O. de chaque échantillon sur la gamme étalon de TGFβ-1.

IX/ PCR Array

La PCR Array permet de réaliser une analyse du transcriptome à grande échelle en analysant le niveau d'expression de nombreux gènes pour plusieurs échantillons donnés.

La PCR Array (SuperArray) a été réalisée selon les recommandations du fabricant. 1µg d'ADNc (obtenu à partir des ARNs convertis en ADNc par le kit RT² PCR Array first Strand ; SuperArray) a été mélangé au mix, prêt à l'emploi, RT2 Real-Time SYBR Green PCR master mix (SuperArray). Les échantillons sont aliquotés dans une plaque 96 puits contenant les différentes amorces ciblant les gènes d'intérêt (RT2 ProfilerTM PCR Array, Human Cancer PathwayFinderTM). La RT-PCR et l'analyse ont été réalisées suivant le protocole du fabricant.

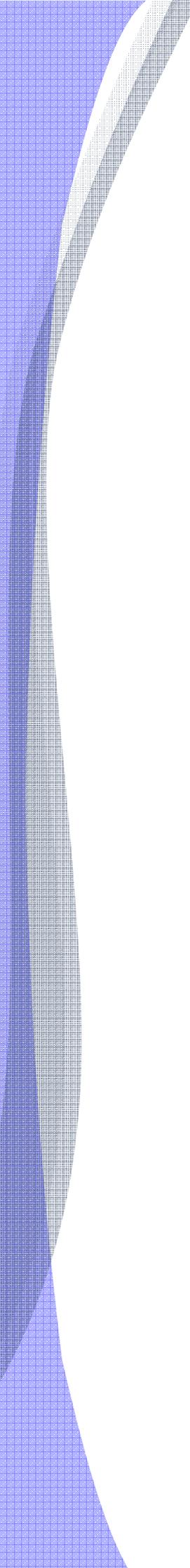
X/ Le partitionnement des biopsies humaines de patients

Le partitionnement des échantillons de biopsies des patients a été réalisé par une analyse « K-means clustering ». C'est une méthode d'analyse statistique des données qui vise à diviser et à regrouper les données analysées selon des groupes homogènes. Les sous-groupes ainsi identifiés partagent des caractéristiques communes qui correspondent généralement à des critères de proximité. Dans le cadre de notre étude, ces critères correspondent aux différents taux d'expression en cavéoline-1, en intégrine α5 et TGFβRI évalués par RT-PCR quantitative. Ces analyses ont été obtenues grâce à une collaboration avec Julien Godet (équipe Mély UMR 7213 CNRS, Strasbourg). Les échantillons de biopsies de patients ont été obtenus par des collaborations avec les chercheurs et les cliniciens du CHRU de Hautepierre (Strasbourg): Natacha Ent-Werlé, Eric Guerin, Madeleine Jaillet, Erwan Pencreach, Michèle Legrain (EA4438 Physiopathologie et recherche translationnelle) et Sébastien Froelich (Service de Neurochirurgie, hôpital de Hautepierre, CHRU Strasbourg).

Les analyses de survie ont également été réalisées grâce à la méthode de Kaplan-Meier qui permet d'étudier la chronologie des apparitions d'un évènement particulier dans le temps au sein d'une population. Ici, cet évènement correspond au décès d'un patient. Nous avons ainsi établi les courbes de survie entre différents groupes de patients en fonction de leur taux d'expression de la sous-unité intégrine et de leur taux de PAI-1. Les courbes se construisent sous la forme d'escaliers dont les paliers indiquent les intervalles de temps durant lesquels il n'y a pas de décès. Les marches indiquent les décès et leurs hauteurs correspondent à la proportion des survivants à un temps donné.

XI/ Analyses statistiques

Les analyses statistiques effectuées dans cette étude ont été réalisées à partir de la moyenne de plusieurs expériences indépendantes. Ces moyennes sont représentées \pm l'écart type à la moyenne. L'analyse densitométrique des résultats obtenus à partir des WB a été réalisée grâce au logiciel ScionImage (*Macintosh program*). Les analyses statistiques ont été réalisées par le test de Student et le test ANOVA avec une significativité atteinte pour un $p < 0,05$ correspondant à * ; $p < 0,01$ à ** et $p < 0,001$ à ***.



RÉSULTATS

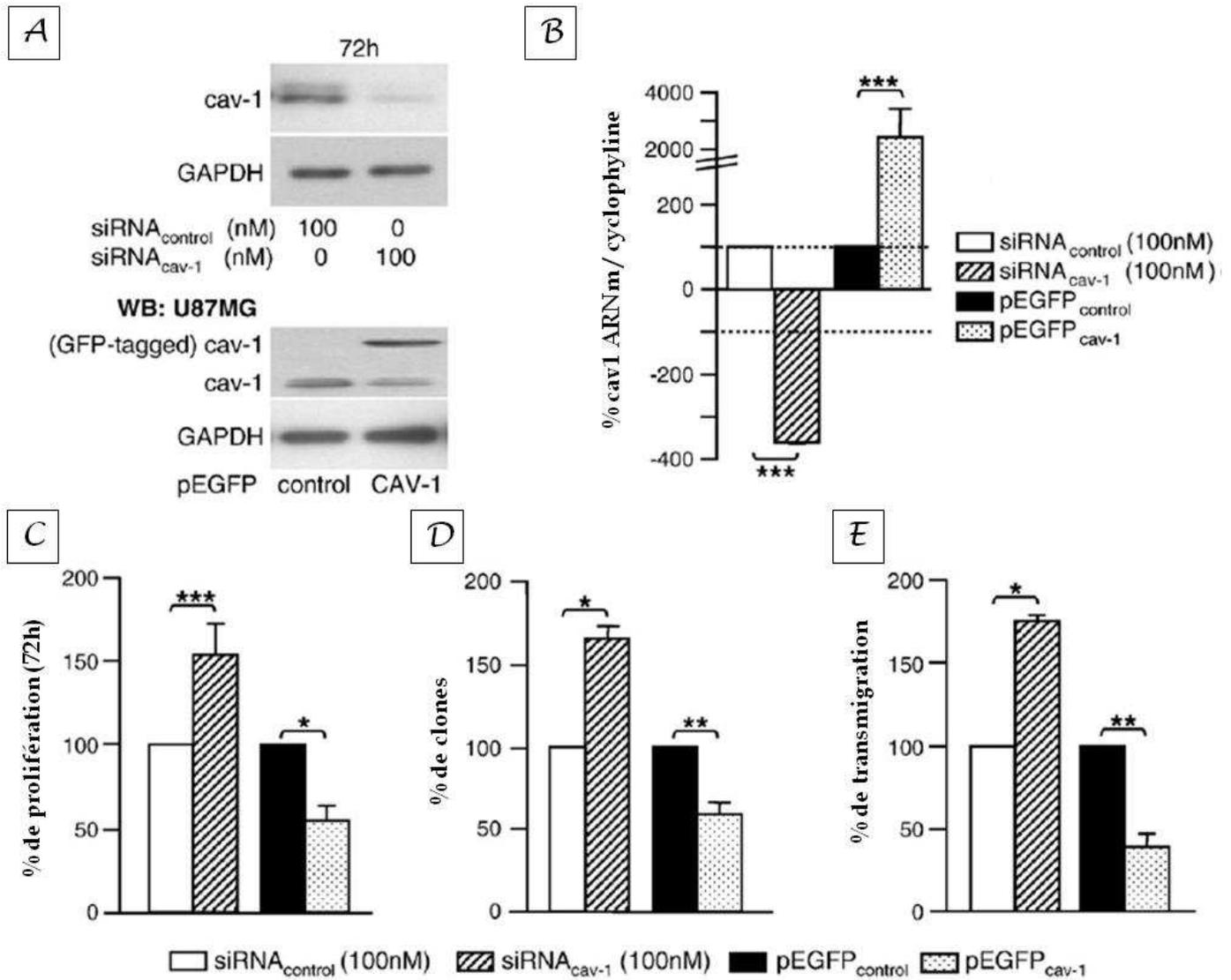


Figure 35. L'expression de la cavéoline-1 module le phénotype des cellules de glioblastome. Validation des modèles de sur- et sous-expression de la cavéoline-1 dans les cellules U87-MG par Western blot (A) et par RT-PCR quantitative (B). C, Test de prolifération cellulaire (MTS, 72 heures); D, Test de clonogénicité; E, Test de transmigration cellulaire. Les résultats, exprimés en pourcentage, correspondent à la moyenne de plusieurs expériences indépendantes ($n = 3-5$) \pm SEM avec * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ et *** pour $p < 0,001$.

I/ Effets modulateurs de la cavéoline-1 sur le phénotype des cellules de glioblastomes

La sur-expression de la cavéoline-1 a été clairement mise en évidence dans les tumeurs cérébrales. Particulièrement, dans les glioblastomes, la cavéoline-1 est fortement exprimée et détectée par immunohistochimie dans toutes les tumeurs de type astrocytaires (Cassoni P, *Am. J. Surg. Pathol.*, 2007). Néanmoins, deux populations co-existantes, l'une sur-exprimant la cavéoline-1 et l'autre la sous-exprimant, ont pu être mises en évidence dans la moitié des glioblastomes (Cassoni P, *Am. J. Surg. Pathol.*, 2007). Malheureusement, la contribution de chacune de ces populations dans le phénotype des glioblastomes était encore inconnue au début de cette étude.

Notre étude a tout d'abord consisté à déterminer la contribution de la modulation de l'expression de la cavéoline-1 dans le phénotype des cellules de glioblastomes en utilisant la lignée cellulaire U87-MG comme modèle. L'expression de la cavéoline-1 a été modulée dans cette lignée et l'inhibition de son expression a été obtenue par l'utilisation d'un siRNA ou d'un shRNA dirigé contre la cavéoline-1 (U87-MGsiRNA_{cav1} ou U87-MGshRNA_{cav1}). La sur-expression de la cavéoline-1 a été obtenue grâce à un vecteur d'expression contenant la cavéoline-1 (U87-MGpEGFP_{cav1}).

I-1/ Modulation de la prolifération cellulaire

Après avoir validé les différents modèles de sur- et sous-expression de la cavéoline-1 dans les cellules U87-MG (**Figure35A** et **35B**), nous avons pu constater que la modulation de l'expression de la cavéoline-1 dans les cellules U87-MG conduisait à de profonds changements phénotypiques (**Figure35C, D** et **E**). L'analyse de la prolifération cellulaire des cellules de glioblastomes U87-MGsiRNA_{cav1} et des cellules U87-MGpEGFP_{cav1} (en comparaison avec leurs témoins respectifs U87-MGsiRNA_{ctrl} et U87-MGpEGFP_{ctrl}) a révélé des taux de prolifération différents. En effet, les cellules sous-exprimant la cavéoline-1 ont montré un taux de prolifération plus important que leurs témoins (1,5 fois plus) alors que les cellules sur-exprimant la cavéoline-1 ont vu leur prolifération diminuer de moitié par rapport à leurs témoins ($47 \pm 8\%$ de diminution) (**Figure35C**).

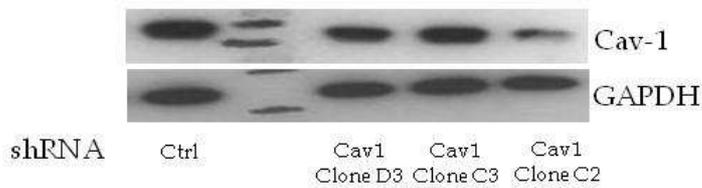
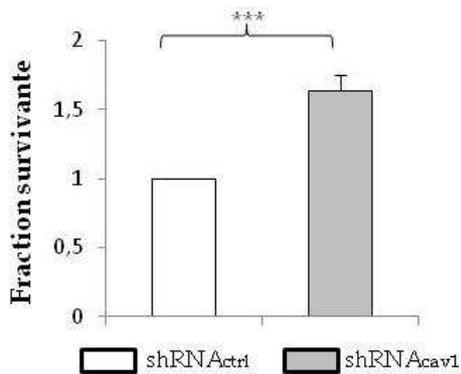
A**B**

Figure36. Les clones U87-MGshRNA_{cav1} présentent les mêmes caractéristiques que les cellules U87-MGsiRNA_{cav1}. L'expression de la cavéoline-1 est évaluée (A) ainsi que la clonogénicité des cellules (B). Les histogrammes représentent la moyenne de différentes expériences indépendantes (n = 6-9) ± SEM et correspondent à la fraction des cellules ayant survécu (fraction survivante). Avec *** pour p<0,001.

I-2/ Modulation de la clonogénicité

L'analyse de la clonogénicité des cellules de glioblastome U87-MGsiRNA_{cav1} et des cellules U87-MGpEGFP_{cav1} (en comparaison avec leurs contrôles respectifs U87-MGsiRNA_{ctrl} et U87-MGpEGFP_{ctrl}) a également été menée.

Nos résultats ont mis en évidence, à l'instar des résultats obtenus lors de l'étude de la prolifération cellulaire, que les cellules U87-MGsiRNA_{cav-1} avaient un pouvoir clonogénique plus important que leurs témoins U87-MGsiRNA_{ctrl} ($75 \pm 3\%$) (**Figure35D**). A l'inverse, les cellules U87-MGpEGFP_{cav1} ont montré une capacité clonogénique moins importante ($42 \pm 8\%$) que leurs témoins U87-MGpEGFP_{ctrl} (**Figure35D**).

L'ensemble des résultats obtenus sur les cellules U87-MG sous-exprimant la cavéoline-1 a été réalisé en inhibant de manière transitoire l'expression de la cavéoline-1 (siRNA_{cav1}). Afin de disposer au laboratoire de lignées stables, nous avons généré des cellules sous-exprimant la cavéoline-1 : U87-MGshRNA_{cav1} et leurs contrôles U87-MGshRNA_{ctrl} (**Figure36A**). Afin de vérifier le phénotype des cellules U87-MGshRNA_{cav1}, nous avons étudié leur clonogénicité par rapport à leurs contrôles U87-MGshRNA_{ctrl}. L'analyse des résultats a révélé une clonogénicité plus élevée des clones U87-MGshRNA_{cav1} par rapport à celle des cellules témoins (**Figure36B**). Ces résultats rejoignent ceux obtenus les cellules U87-MGsiRNA_{cav1} qui montraient également une clonogénicité plus importante que celle des cellules témoins U87-MGsiRNA_{ctrl}. Ces résultats indiquent que les cellules U87-MGshRNA_{cav1} et U87-MGsiRNA_{cav1} peuvent être utilisées indifféremment.

I-3/ Modulation de la transmigration cellulaire

L'analyse de la transmigration cellulaire des U87-MGsiRNA_{cav1} et des cellules U87-MGpEGFP_{cav1} (en comparaison avec leurs contrôles respectifs U87-MGsiRNA_{ctrl} et U87-MGpEGFP_{ctrl}) a fourni le même profil que ceux livrés par l'étude de la prolifération et de la clonogénicité. En effet, les cellules U87-MGsiRNA_{cav1} ont montré une forte capacité à migrer ($75 \pm 3\%$ d'augmentation) en comparaison avec les cellules témoins U87-MGsiRNA_{ctrl} (**Figure35E**). Au contraire, les cellules U87-MGpEGFP_{cav1} ont une faible capacité de transmigration (2 fois moins) que leurs témoins U87-MGpEGFP_{ctrl} (**Figure35E**).

Conclusions:

Les résultats obtenus ont mis en évidence que:

- ✚ La modulation de l'expression de la cavéoline-1 dans les cellules U87MG entraîne de profonds changements phénotypiques
- ✚ L'inhibition de l'expression de la cavéoline-1 conduit à un phénotype plus agressif (en termes de prolifération, de clonogénicité et de trans-migration)
- ✚ Au contraire, la sur-expression de la cavéoline-1 conduit à un phénotype moins agressif
- ✚ Les modèles U87-MGsiRNA_{cav1} et U87-MGshRNA_{cav1} présentent le même phénotype

Ces résultats ont mis en évidence la contribution de la cavéoline-1 dans le phénotype des cellules de glioblastome.

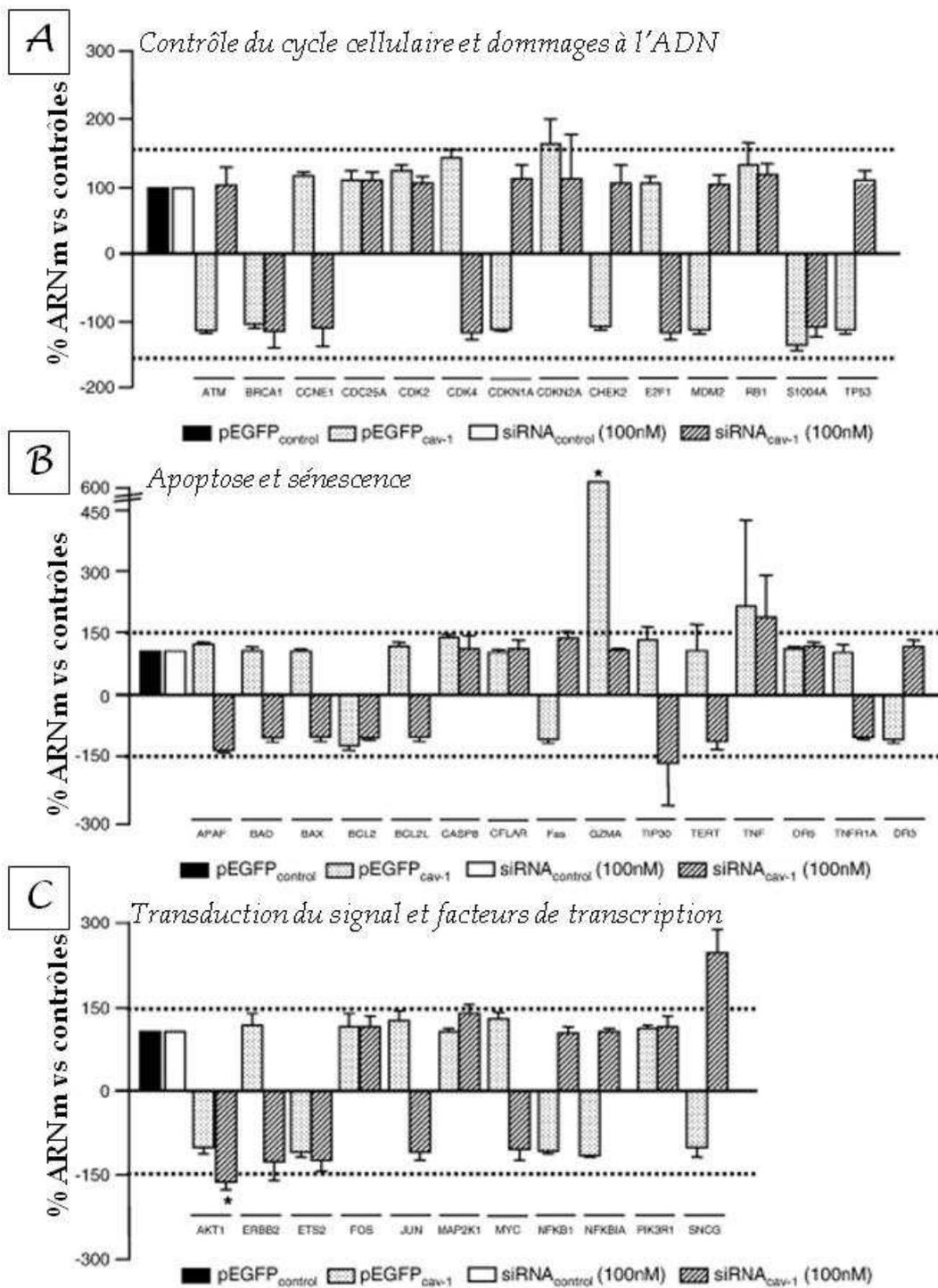


Figure 37. Analyse par PCR Array du transcriptome des U87-MG siRNA_{cav1}, siRNA_{ctrl}, pEGFP_{cav1} et pEGFP_{ctrl}. A, gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire et les dommages à l'ADN ; B, apoptose et sénescence ; C, transduction du signal et facteurs de transcription ; D, angiogenèse ; E, invasion et métastases ; E, adhérence. (suite)

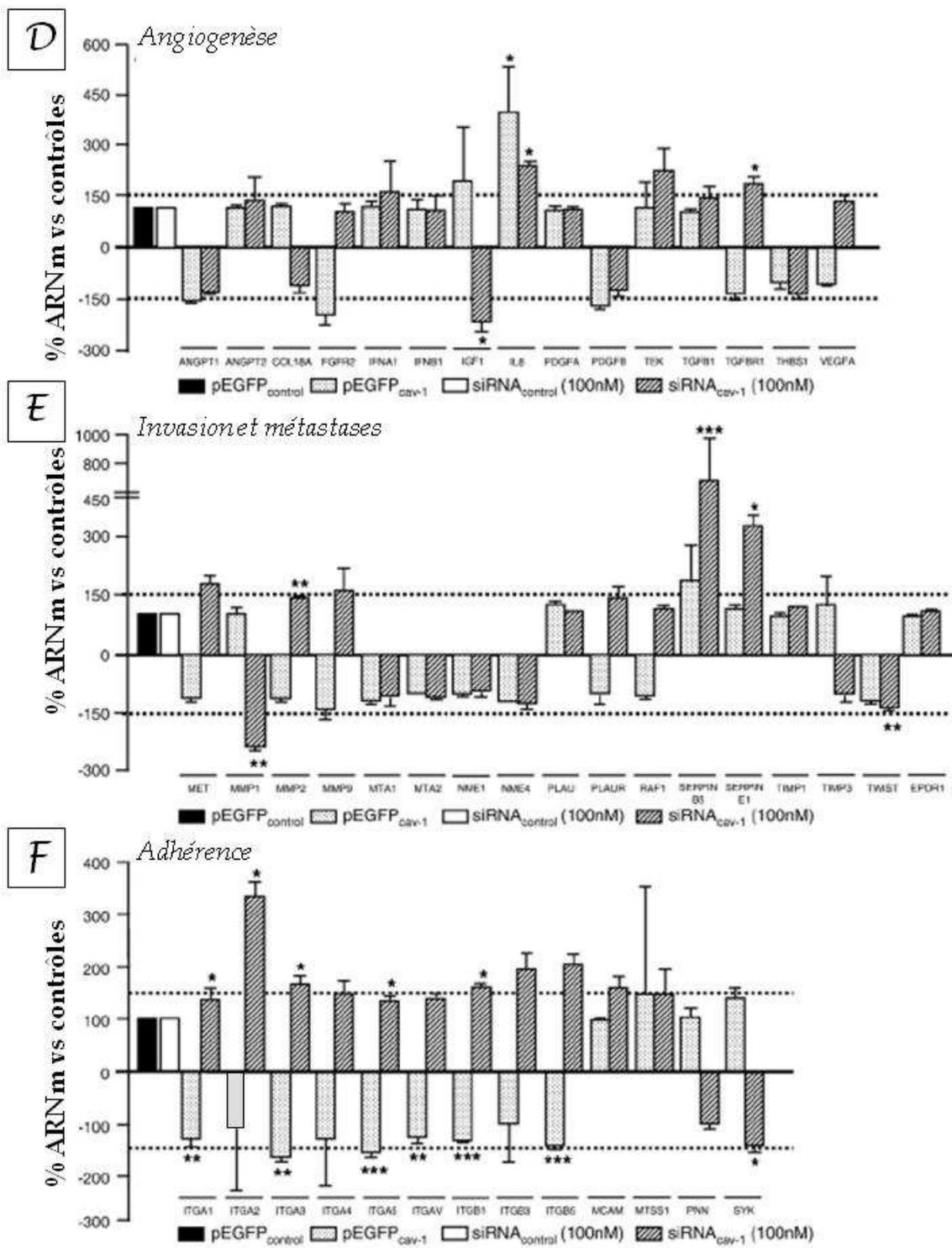


Figure37 (suite). Analyse par PCR Array du transcriptome des U87-MG siRNA_{cav1}, siRNA_{ctrl}, pEGFP_{cav1} et pEGFP_{ctrl}. Les histogrammes représentent le pourcentage d'augmentation ou de diminution des cellules transfectées par rapport à leurs contrôles respectifs. L'expression des gènes est normalisée à celle des gènes de ménage B2M, HGPRT/HPRT, RPL13A, G3PD/GAPD et β-actine. Les résultats correspondent à la moyenne de plusieurs expériences indépendantes (n = 3-5) ± SEM avec * p<0,05 ; ** p<0,01 et *** pour p<0,001 ; vs pour versus.

II/ Effets modulateurs de la cavéoline-1 sur l'expression des gènes

Afin de déterminer les mécanismes par lesquels la cavéoline-1 modulait le phénotype des cellules de glioblastome U87MG, nous avons tout d'abord réalisé une analyse par PCR Array (SuperArray) d'un ensemble de gènes connus pour leur implication dans la tumorigénèse.

II-1/ La cavéoline-1 module principalement les gènes impliqués dans l'adhérence cellulaire

L'analyse des résultats a montré que 20% des gènes était affectés par la modulation de l'expression de la cavéoline-1 dans les cellules U87-MGsiRNA_{cav1} et des cellules U87-MGpEGFP_{cav1} (par rapport à leurs témoins respectifs U87-MGsiRNA_{ctrl} et U87-MGpEGFP_{ctrl}) (**Figure37**). Pour autant, deux familles de gènes sont principalement touchées par la modulation de la cavéoline-1 : la famille des gènes impliqués dans l'invasion cellulaire et les métastases (**Figure37E**) et la famille des gènes impliqués dans l'adhérence cellulaire (**Figure37F**). Dans la famille « **invasion et métastases** », des métalloprotéases (MMP-1 et MMP-2), des SERPIN (SERPINE1 et SERPINB5) ainsi que le gène Twist sont modulés (**Figure37E**). Toutefois, ces modulations ne sont observées que dans les cellules sous-exprimant la cavéoline-1, les cellules U87-MGsiRNA_{cav1}, qui ont le phénotype le plus agressif. L'expression de MMP-1 et de Twist est diminuée alors que celle des SERPIN est fortement augmentée (7 fois pour la SERPINB5 et 3 fois pour la SERPINE1) (**Figure37**). La validation de la sur-expression de ces transcrits au niveau protéique a été effectuée sur l'analyse de l'expression de PAI-1 (par WB et par RT-PCR quantitative). L'analyse de l'expression de PAI-1 a été réalisée sur les surnageants des cellules U87-MG transfectées par le shRNA_{cav1} et les cellules U87-MGpEGFP_{cav1} ainsi que leurs témoins respectifs (U87-MGshRNA_{ctrl} et U87-MGpEGFP_{ctrl}) (**Figure38**). L'analyse des résultats a permis de confirmer la sur-expression de PAI-1 dans les cellules sous-exprimant la cavéoline-1 (4 fois plus exprimée par rapport aux contrôles U87-MGsiRNA_{ctrl}).

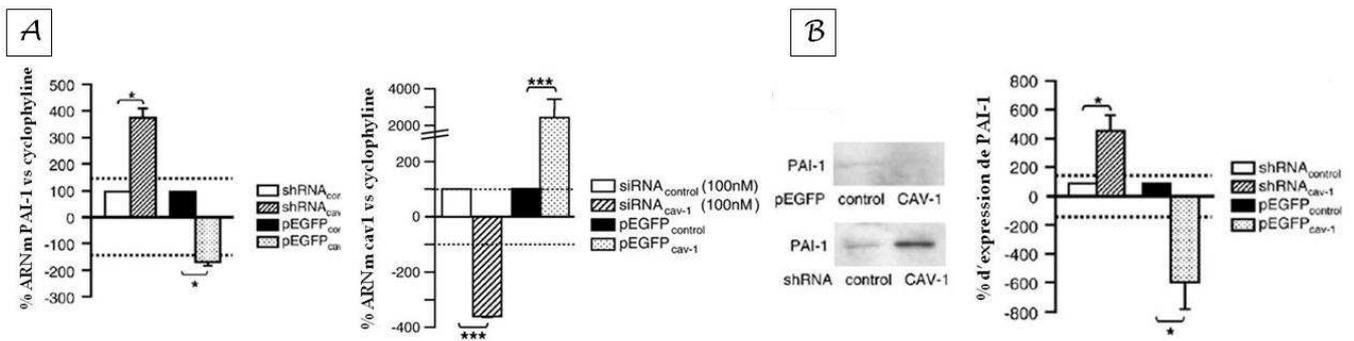


Figure 38. L'expression de PAI-1 est inversement corrélée à celle de la cavéoline-1. L'analyse de l'expression de PAI-1 et de la cavéoline-1 a été menée par RT-PCR quantitative (A) et l'expression de PAI-1 a été analysée à partir des surnageants cellulaires (B). Les résultats correspondent à la moyenne de plusieurs expériences indépendantes (n = 3-5) représentés \pm l'écart type à la moyenne (SEM) avec une significativité (*) atteinte pour $p < 0,05$ et *** pour $p < 0,001$; vs pour versus.

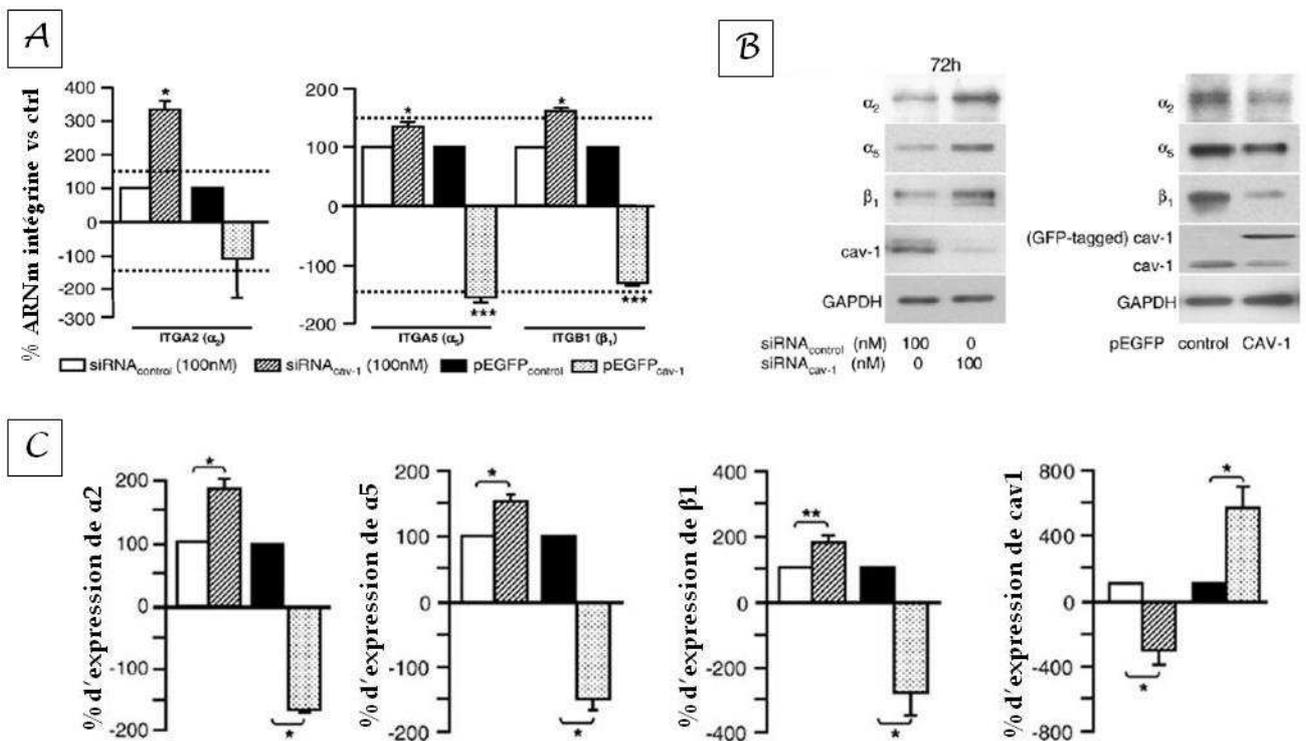


Figure 39. Expression des sous-unités intégrines α_2 , α_5 et β_1 dans les cellules U87-MG siRNA_{cav1}, siRNA_{ctrl}, pEGFP_{cav1} et pEGFP_{ctrl}. L'analyse de l'expression des sous-unités intégrines α_2 , α_5 et β_1 est réalisée par RT-PCR quantitative (A) et par WB (B). Les histogrammes représentent les pourcentages d'augmentation ou de diminution d'expression des protéines indiquées (C). Les résultats correspondent à la moyenne de plusieurs expériences indépendantes (n = 3-5) représentés \pm l'écart type à la moyenne (SEM) avec une significativité (*) atteinte pour $p < 0,05$ et *** pour $p < 0,001$; vs pour versus ; ctrl pour contrôle.

Bien que l'analyse par PCR Array n'ait pas révélé de modulation significative de son expression dans les cellules U87-MGpEGFP_{cav1} par rapport aux cellules U87-MGpEGFP_{ctrl}, l'analyse des résultats par WB et RT-PCR quantitative a révélé que l'expression de PAI-1 était significativement inhibée dans les cellules sur-exprimant la cavéoline-1 (**Figure38**). De manière intéressante, nous avons pu observer une corrélation inverse entre l'expression de PAI-1 et l'expression de la cavéoline-1 dans les cellules U87-MGshRNA_{cav1} et U87-MGpEGFP_{cav1} au niveau des transcrits par RT-PCR quantitative (**Figure38A**) et au niveau protéique par WB (**Figure38B**).

La deuxième famille, la famille « **adhérence** » qui était la plus touchée (14% sur les 20% de gènes dont l'expression est modulée), est majoritairement représentée par les intégrines avec ceci de remarquable : l'expression de pratiquement l'ensemble des intégrines était inversement corrélée à l'expression de la cavéoline-1 (**Figure37F**). En effet, les cellules sur-exprimant la cavéoline-1 (U87-MGpEGFP_{cav1}) sous-expriment les sous-unités intégrines $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ et αv ainsi que les sous-unités $\beta 1$ et $\beta 5$ par rapport à leur contrôle. Au contraire, les cellules U87-MGsiRNA_{cav1} ont montré une sur-expression des intégrines $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ et $\beta 1$. L'analyse de l'expression de ces intégrines au niveau protéique a révélé que la corrélation inverse entre l'expression de la cavéoline-1 et celle des intégrines n'était valable que pour les intégrines $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha 2\beta 1$ (**Figure39B** et **39C**). Il est à noter que, dans les cellules U87-MGpEGFP_{cav1}, l'expression de l'ARNm la sous-unité $\alpha 2$ n'est significativement inhibée bien que l'expression protéique de celle-ci soit diminuée de manière significative (**Figure39C**).

L'ensemble de ces résultats indique que l'expression de la cavéoline-1 est inversement corrélée à l'expression des intégrines $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha 2\beta 1$.

II-2/ L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ est le médiateur des effets de la cavéoline-1

Au regard des résultats révélés par la littérature (Farber K, Mol. Cell. Neurosci., 2008 ; Uhm JH, Front. Biosci., 1999) et de ceux obtenus au sein de notre laboratoire (Maglott A, Cancer Res., 2006) sur l'implication de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans l'agressivité des glioblastomes, notre intérêt s'est porté sur cette intégrine et son implication dans l'agressivité des cellules U87-MGsiRNA_{cav1} a été évaluée.

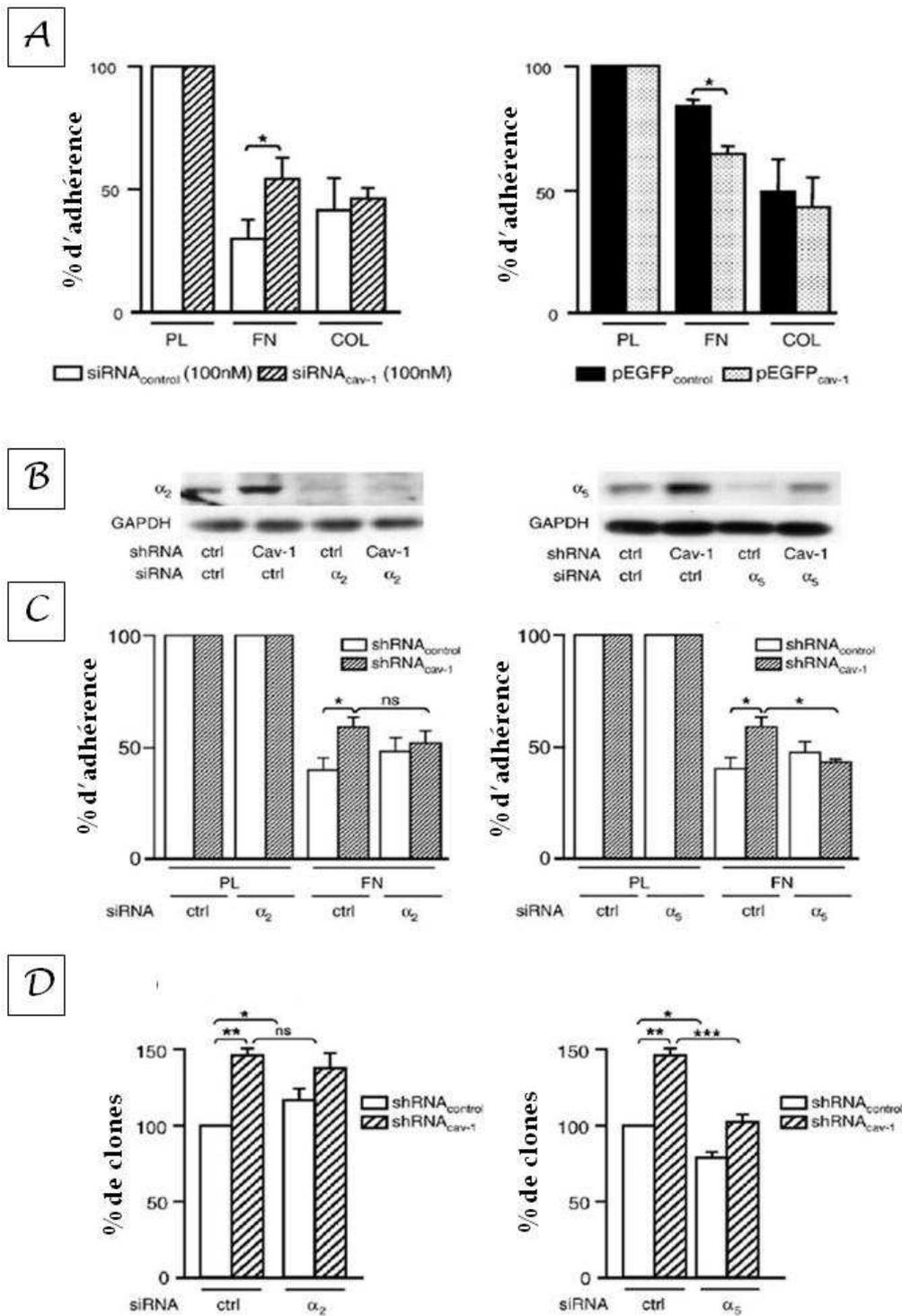


Figure 40. Etude de l'adhérence et de la clonogénicité des cellules U87-MG siRNA_{cav1} et siRNA_{ctrl} suite à l'inhibition des sous-unités intégrines α_2 (siRNA _{α_2}) et α_5 (siRNA _{α_5}). A, Adhérence sur poly-L-lysine (PL), Fibronectine (FN) et collagène (COL) des cellules U87-MG siRNA_{cav-1} U87-MG siRNA_{ctrl}, U87-MG pEGFP_{cav1} et U87-MG pEGFP_{ctrl}. Inhibition de l'expression des sous-unités intégrines α_2 et α_5 . Adhérence sur PL, FN et COL des cellules U87-MG siRNA_{cav-1} U87-MG siRNA_{ctrl} transfectées par le siRNA _{α_2} ou siRNA _{α_5} . Les résultats sont représentés \pm l'écart type à la moyenne (SEM) avec * p<0,05 ; ** p<0,01 et *** pour p<0,001 ; ns = non significatif.

Nous avons inhibé l'expression de la sous-unité intégrine $\alpha 5$ dans les cellules U87-MGsiRNA_{cav1} grâce un siRNA dirigé contre l'intégrine afin de déterminer l'implication de cette dernière dans l'agressivité des cellules U87-MGsiRNA_{cav1}. Etant donné que l'expression de la sous-unité intégrine $\alpha 2$ est également modulée dans ces cellules, son expression a aussi été inhibée (par siRNA). Suite à l'inhibition des sous-unités intégrines $\alpha 5$ et $\alpha 2$, la prolifération et la clonogénicité des cellules U87-MGsiRNA_{cav1} ont été évaluées.

Compte tenu du fait que les intégrines $\alpha 2\beta 1$ et $\alpha 5\beta 1$ ont respectivement pour ligand le collagène et la fibronectine, l'adhérence des cellules U87-MGsiRNA_{cav1} a été testée sur une matrice de fibronectine et de collagène.

L'inhibition de la cavéoline-1 a induit une augmentation de l'adhérence des cellules U87-MGsiRNA_{cav1} à la fibronectine, de 24% par rapport aux contrôles (**Figure40A**). Au contraire, les cellules U87-MGpEGFP_{cav1} ont montré une diminution de 20% de leur adhérence à la fibronectine en comparaison des cellules témoins U87-MGpEGFP_{ctrl}. En revanche, l'adhérence au collagène des cellules U87-MGsiRNA_{cav1} et U87-MGpEGFP_{cav1} n'a montré aucune variation en comparaison de leurs témoins respectifs (**Figure40A**).

Ces résultats indiquent que, malgré l'augmentation de l'expression de la sous-unité intégrine $\alpha 2$, l'adhérence des cellules U87-MGsiRNA_{cav1} au collagène n'est pas modulée alors que l'augmentation de l'expression de la sous-unité intégrine $\alpha 5$ induit une augmentation de l'adhérence des cellules U87-MGsiRNA_{cav1} à la fibronectine.

Nous avons ensuite évalué l'adhérence et la clonogénicité des cellules U87-MGsiRNA_{cav1} après avoir inhibé l'expression des sous-unités intégrines $\alpha 2$ (siRNA _{$\alpha 2$}) et $\alpha 5$ (siRNA _{$\alpha 5$}) (**Figure40B**). Nos résultats ont mis en évidence que l'inhibition de la sous-unité intégrine $\alpha 5$ induisait une diminution significative de l'adhérence à la fibronectine des cellules U87-MGsiRNA_{cav1} par rapport à leurs contrôles : l'adhérence des cellules U87-MGsiRNA_{cav1} à la fibronectine, plus importante que leurs témoins, est alors inhibé et revient au niveau de celle des cellules contrôles (**Figure40C**). En revanche, l'inhibition de la sous-unité intégrine $\alpha 2$ dans les cellules U87-MGsiRNA_{cav1} ne module pas leur adhérence à la fibronectine.

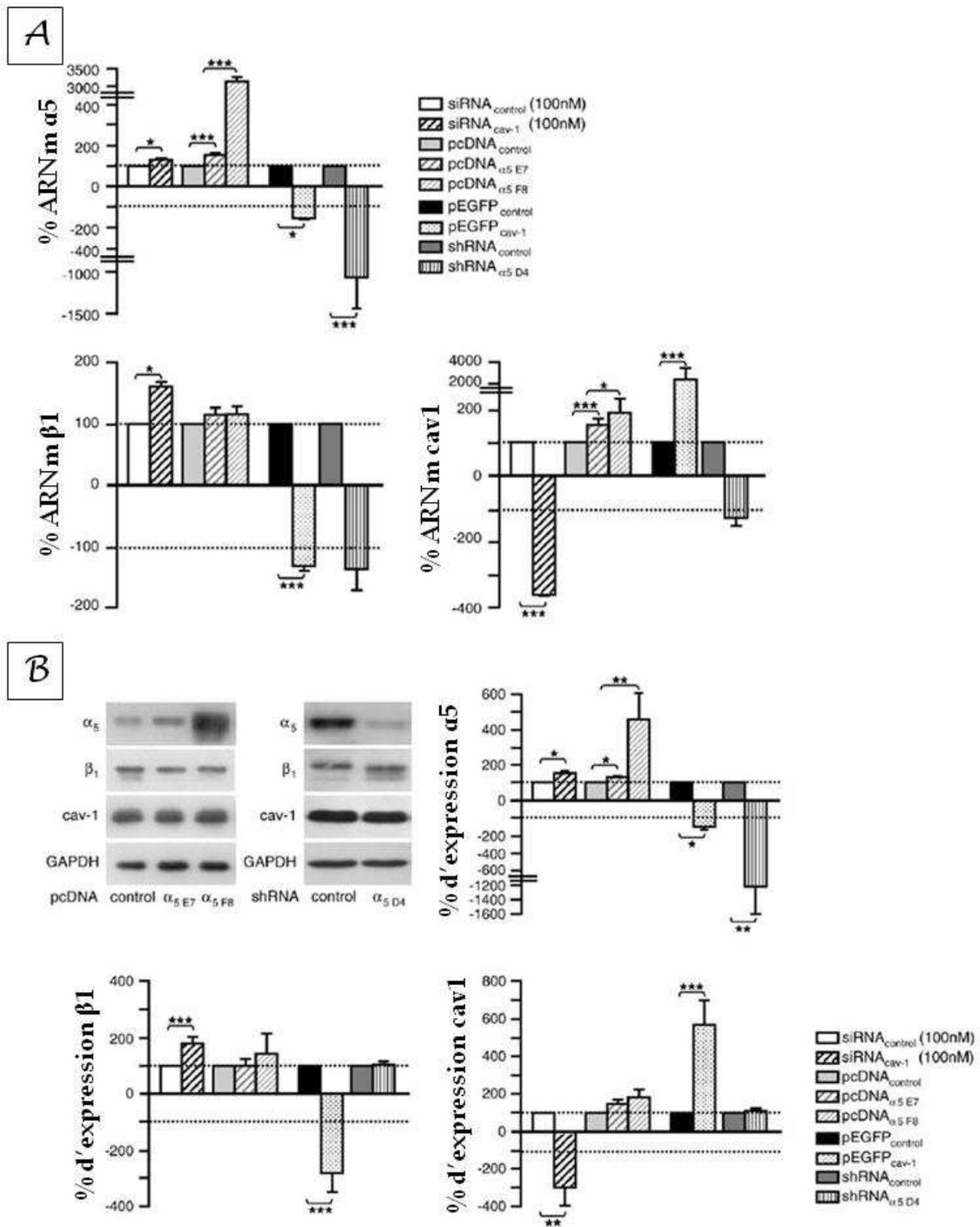


Figure 41. Expression de la cavéoline-1 et des sous-unités intégrines $\alpha 5$ et $\beta 1$ dans les cellules U87-MG sous- et sur-exprimant la cavéoline-1 (U87-MGsiRNA_{cav1}, siRNA_{ctrl}, U87-MGpEGFP_{cav1} et U87-MGpEGFP_{ctrl}) ou sous- et sur-exprimant la sous-unité intégrine $\alpha 5$ (shRNA _{$\alpha 5$} , shRNA_{ctrl}, pcDNA _{$\alpha 5$ E7}, pcDNA _{$\alpha 5$ F8} et pcDNA_{ctrl}). A, par RT-PCR quantitative et par WB (B). Les résultats sont représentés \pm l'écart type à la moyenne (SEM) avec * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ et *** pour $p < 0,001$.

De la même manière, l'inhibition de la sous-unité intégrine $\alpha 2$ dans les cellules U87-MGsiRNA_{cav1} ne module pas leur clonogénicité alors que la clonogénicité des cellules témoins est significativement légèrement augmentée par l'inhibition de la sous-unité intégrine $\alpha 2$ (**Figure40D**). Au contraire, l'inhibition de l'expression de la sous-unité intégrine $\alpha 5$ provoque une inhibition de la clonogénicité des cellules U87-MGsiRNA_{cav1} qui est alors comparable à celle des cellules contrôles U87-MGsiRNA_{ctrl}. De plus, la clonogénicité des cellules témoins diminue légèrement lorsqu'elles sont traitées par le siRNA _{$\alpha 5$} (**Figure40D**). Ces résultats indiquent que c'est l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, et non $\alpha 2\beta 1$, qui est responsable du phénotype des cellules de glioblastome U87-MGsiRNA_{cav1} et U87-MGpEGFP_{cav1}. L'intégrine est donc le médiateur des effets de la cavéoline-1 dans les cellules de glioblastome U87-MG. Etant donné que le phénotype des cellules U87-MGsiRNA_{cav1} pourrait cependant être indépendant de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, nous avons généré des cellules U87-MG exprimant des taux variables d'intégrine $\alpha 5\beta 1$ puis nous les avons comparé aux cellules U87-MGsiRNA_{cav1} et U87-MGpEGFP_{cav1}. Ainsi, nous avons obtenu des cellules U87-MG sur-exprimant la sous-unité intégrine $\alpha 5$ (pcDNA _{$\alpha 5$} E7 et pcDNA _{$\alpha 5$} F8) et des cellules sous-exprimant la sous-unité intégrine $\alpha 5$ (shRNA _{$\alpha 5$} D4). L'étude de l'expression, en ARN et en protéines, de la cavéoline-1, des sous-unités intégrine $\alpha 5$ et $\beta 1$ a été menée par RT-PCR quantitative et par WB (**Figure41**). Au niveau protéique, les cellules U87-MG pcDNA _{$\alpha 5$} E7 et pcDNA _{$\alpha 5$} F8 sur-expriment l'intégrine $\alpha 5$: le clone pcDNA _{$\alpha 5$} E7 sur-exprime de la sous-unité intégrine $\alpha 5$ à un niveau comparable à la sur-expression observée dans les cellules U87-MGsiRNA_{cav1} alors que le clone pcDNA _{$\alpha 5$} F8 l'exprime beaucoup plus fortement (4 fois plus que les cellules contrôles pcDNA_{ctrl}) (**Figure41B**). Le même profil d'expression de la sous-unité intégrine $\alpha 5$ a été retrouvé au niveau de l'ARN (**Figure41A**). Aucune variation d'expression de la sous-unité intégrine $\beta 1$ n'est retrouvée dans les clones sur- ou sous-exprimant la sous-unité intégrine $\alpha 5$ (pcDNA _{$\alpha 5$} E7, pcDNA _{$\alpha 5$} F8 ou shRNA _{$\alpha 5$} D4) par rapport à leurs contrôles au niveau de l'ARN comme au niveau protéique alors que, pour les clones cav-1 (U87-MGsiRNA_{cav-1} et U87-MGpEGFP_{cav1}), la variation du taux d'expression de la sous-unité intégrine $\beta 1$ allait dans le même sens que les variations observées pour la sous-unité intégrine $\alpha 5$.

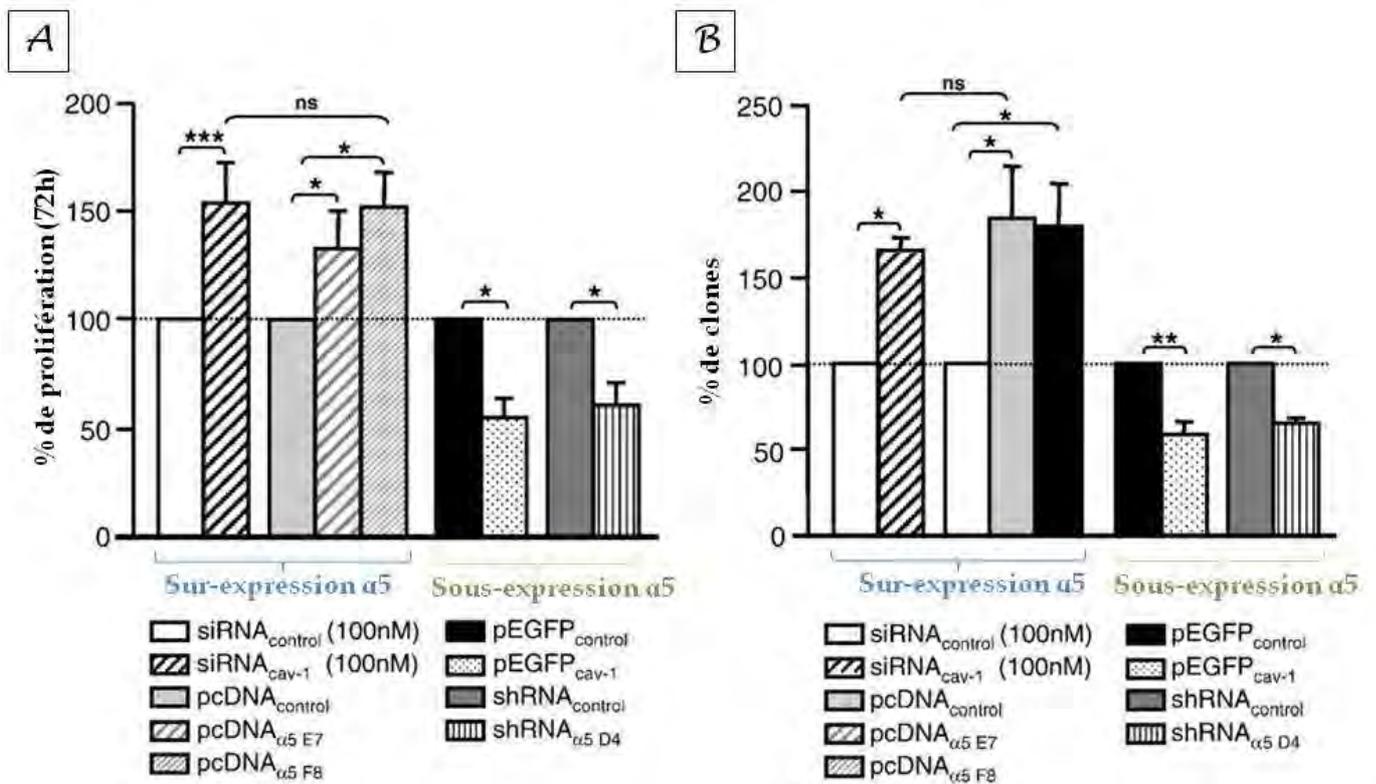


Figure 42. Implication de la sous-unité intégrine $\alpha 5$ dans le phénotype des cellules de glioblastome. La prolifération (A) et la clonogénicité (B) des cellules U87-MG sous- et sur-exprimant la cavéoline-1 (U87-MGsiRNA_{cav1}, siRNA_{ctrl}, U87-MGpEGFP_{cav1} et U87-MGpEGFP_{ctrl}) sous- et sur-exprimant l'intégrine $\alpha 5$ (shRNA _{$\alpha 5$} , shRNA_{ctrl}, pcDNA _{$\alpha 5$ E7}, pcDNA _{$\alpha 5$ F8} et pcDNA_{ctrl}) ont été évaluées. Les histogrammes correspondent à la moyenne de plusieurs expériences indépendantes (n = 3-5) représentées en pourcentage. Les résultats sont représentés \pm l'écart type à la moyenne (SEM) avec * p<0,05 ; ** p<0,01 et *** pour p<0,001 ; ns = non significatif.

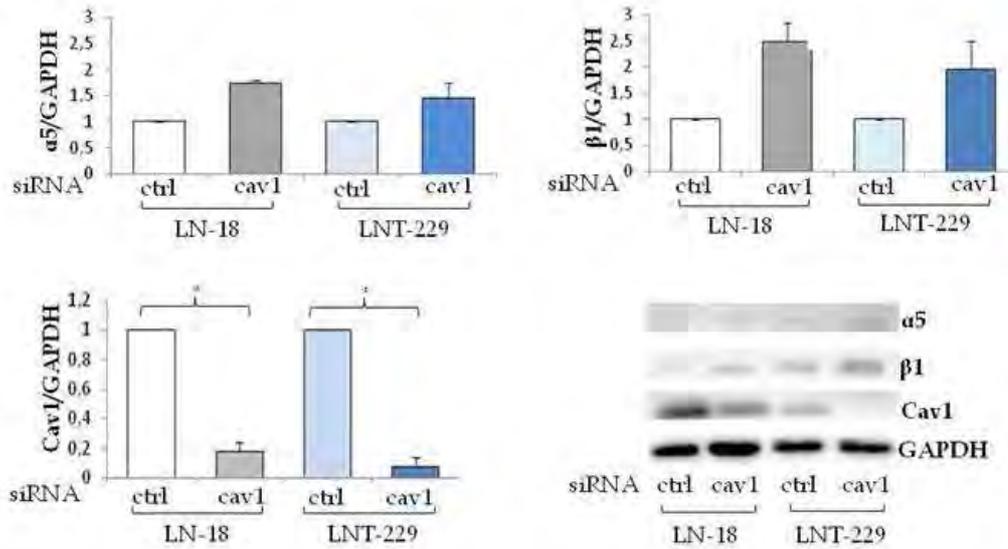
Au niveau de l'ARN, l'expression de la cavéoline-1 dans les cellules pcDNA α_5 E7 et pcDNA α_5 F8 est augmentée alors qu'elle ne varie pas dans les cellules shRNA α_5 D4 par rapport à leurs contrôles (**Figure41A**). Néanmoins, aucune variation d'expression de la cavéoline-1 n'a été mise en évidence dans ces cellules au niveau protéique (**Figure41B**).

Ces résultats mettent en évidence deux types de modèles cellulaires : l'un où l'expression de la cavéoline-1 a été modulé (U87-MGsiRNA $_{cav1}$ et U87-MGpEGFP $_{cav1}$) et où une modulation de l'expression de la cavéoline-1 et des sous-unités intégrines α_5 et β_1 est observée et l'autre où l'expression de la sous-unité intégrine α_5 a été modulée (pcDNA α_5 E7 / pcDNA α_5 F8 et shRNA α_5 D4) et où seule l'expression de cette sous-unité intégrine est modulée dans ces cellules (l'expression de la cavéoline-1 et de la sous-unité β_1 ne sont pas modulées).

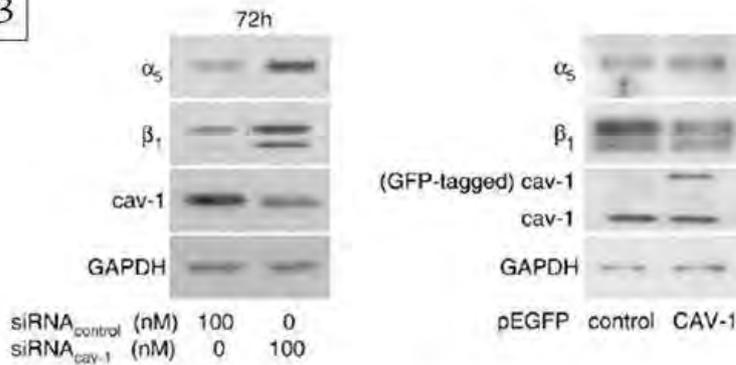
A l'aide de ces nouveaux modèles cellulaires, nous avons évalué la prolifération et la clonogénicité des cellules pcDNA α_5 E7, pcDNA α_5 F8 ou shRNA α_5 D4 (par rapport à leurs contrôles) puis nous les avons comparées aux cellules U87-MGsiRNA $_{cav1}$ et U87-MGpEGFP $_{cav1}$.

L'analyse des résultats a mis en évidence une augmentation de la prolifération des cellules pcDNA α_5 E7 ($32 \pm 18\%$) et pcDNA α_5 F8 ($52 \pm 16\%$) par rapport à leur contrôle pcDNA $_{ctrl}$ comme l'augmentation de prolifération ($53 \pm 19\%$) observée dans les cellules U87-MGsiRNA $_{cav1}$ par rapport à leur contrôle (**Figure42A**). De plus, l'augmentation de prolifération du clone pcDNA α_5 F8 est comparable à celle retrouvée dans les cellules U87-MGsiRNA $_{cav1}$. Au contraire, la prolifération des cellules sous-exprimant l'intégrine, shRNA α_5 D4, est diminuée ($39 \pm 11\%$) par rapport aux cellules contrôles shRNA $_{ctrl}$; cette diminution est également comparable à celle mise en évidence dans les cellules sur-exprimant la cavéoline-1, U87-MGpEGFP $_{cav1}$ (**Figure42A**). L'analyse de la clonogénicité des cellules a révélé le même type de profil que celui observé pour la prolifération. En effet, les cellules pcDNA α_5 E7 et pcDNA α_5 F8, qui sur-expriment la sous-unité intégrine α_5 , ont montré une capacité clonogénique plus importante ($85 \pm 30\%$ et $80 \pm 24\%$ respectivement) que leurs contrôles, une clonogénicité comparable à celle observée dans les cellules sous-exprimant la cavéoline-1, les cellules U87-MGsiRNA $_{cav1}$ (**Figure42B**).

A



B



C

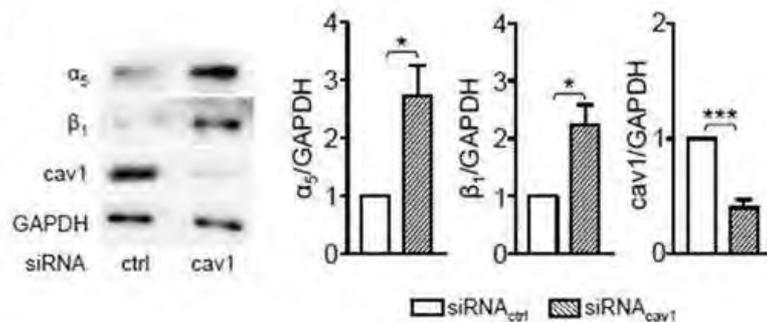


Figure 43. L'inhibition de la cavéoline-1 induit l'expression de l'intégrine α5β1 dans différentes lignées de glioblastome. L'inhibition de la cavéoline-1 a été réalisée par l'utilisation d'un siRNA dirigé contre la cavéoline-1 dans les cellules (A) LN-18, LNT-229, (B) A172 et (C) U373. L'analyse de l'expression des sous-unités intégrines α5 et β1 ainsi que de l'expression de la cavéoline-1 a été réalisée par WB. Les histogrammes représentent l'analyse, par densitométrie, de l'expression des sous-unités intégrines α5 et β1 et de la cavéoline-1 sur une moyenne de 2 à 3 expériences indépendantes ± SEM avec * quand $p < 0,05$.

A l'inverse, les cellules shRNA α_5 D4, qui sous-expriment la sous-unité intégrine α_5 , ont une clonogénicité moins importante (de moitié environ) par rapport aux contrôles shRNA $_{ctrl}$ (**Figure42B**). La même diminution de clonogénicité avait été mise en évidence dans les cellules U87-MGpEGFP $_{cav1}$ sur-exprimant la cavéoline-1.

L'ensemble des résultats obtenus à partir des clones pcDNA α_5 E7, pcDNA α_5 F8 et shRNA α_5 D4 a confirmé l'implication de l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ dans l'agressivité des cellules de glioblastome U87-MG.

Forts de ces résultats, nous avons alors cherché à savoir si la cavéoline-1 pouvait moduler l'expression de l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ dans d'autres modèles cellulaires de glioblastome et dans l'affirmative si la corrélation inverse existant entre l'expression de la cavéoline-1 et celle de l'intégrine $\alpha_5\beta_1$, dans les cellules U87-MG, était retrouvée dans ces modèles.

II-3/ L'expression de l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ et l'expression de la cavéoline-1 sont inversement corrélées dans différentes lignées de glioblastome

Afin de déterminer si la baisse de l'expression de la cavéoline-1 dans des lignées de glioblastome pouvait conduire à l'augmentation de l'expression de l'intégrine $\alpha_5\beta_1$, nous avons inhibé de façon transitoire l'expression de la cavéoline-1 dans les lignées A172, U373-MG, LN-18 et LNT-229. Les cellules ont été transfectées 72 heures avec 100mM de siRNA $_{cav1}$ ou de siRNA $_{ctrl}$ puis les cellules ont été lysées, les protéines dosées et l'expression des protéines d'intérêt a été évaluée par WB.

L'inhibition de l'expression de la cavéoline-1 a été confirmée par WB dans les différents modèles avec une diminution de son expression de l'ordre de 77% ($\pm 1\%$) pour la lignée LN-18, d'environ 93% ($\pm 7\%$) pour la lignée LNT-229 (**Figure43A**), de plus de 65% pour la lignée A172 (**Figure43B**) et de 60% pour la lignée U373-MG (**Figure43C**). Pour l'ensemble de ces lignées, l'inhibition de l'expression de la cavéoline-1 induit une augmentation de l'expression des sous-unités α_5 et β_1 de l'intégrine de 1,5 à 2,6 fois. N'ayant réalisé que deux expériences indépendantes, nous ne sommes pas en mesure de dire si l'induction de l'expression des sous-unités intégrines est significativement différente pour les lignées LN-18siRNA $_{cav1}$, LNT-229siRNA $_{cav1}$ et A172siRNA $_{cav1}$ par rapport à leurs contrôles respectifs (**Figure43A**).

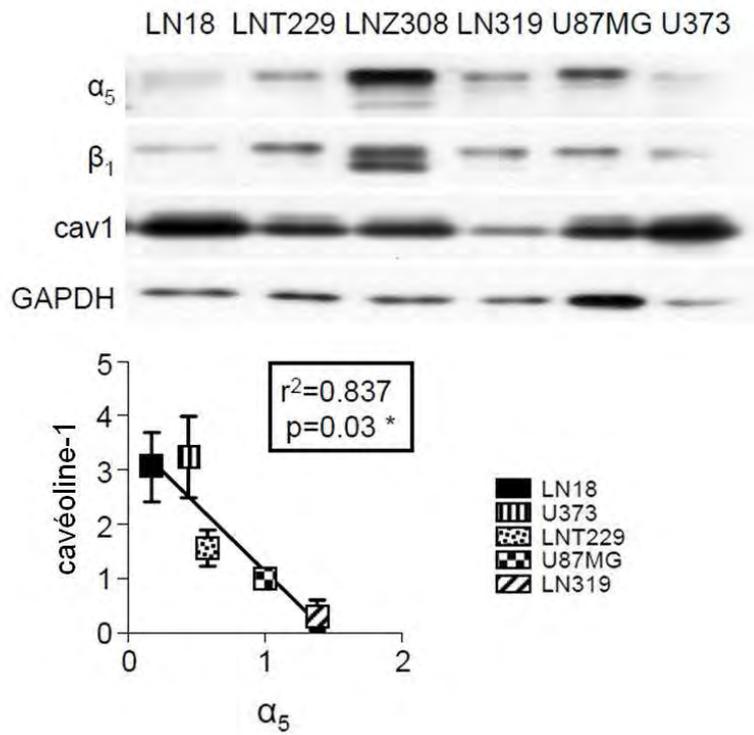


Figure44. Corrélation inverse entre l'expression de la cavéoline-1 et celle de la sous-unité intégrine α_5 dans les lignées de glioblastome. L'expression de la cavéoline-1 et des sous-unités intégrines α_5 et β_1 a été réalisée par WB sur les lignées LN18, U373, LNT229, U87MG et LN319. La droite de régression linéaire a été réalisée à partir d'expériences indépendantes ($n = 3$). Plus R^2 est proche de 1, plus la corrélation est forte avec $* p < 0,05$.

En revanche, dans les cellules U373siRNA_{cav1}, où trois expériences indépendantes ont pu être réalisées, une augmentation significative de l'expression des sous-unités intégrines $\alpha 5$ et $\beta 1$ a été mise en évidence (**Figure43D**). L'expression des sous-unités intégrines $\alpha 5$ et $\beta 1$ est augmentée de plus de 2 fois dans les cellules U373siRNA_{cav1} par rapport aux cellules contrôles U373siRNA_{ctrl}.

L'ensemble de ces résultats suggère donc que la cavéoline-1 serait capable de moduler l'expression des sous-unités intégrines $\alpha 5$ et $\beta 1$ dans différents modèles de cellules de glioblastome.

Compte tenu du fait que l'expression de la cavéoline-1 et celle de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ sont inversement corrélées dans les cellules de glioblastome, nous les avons analysées dans différents modèles de cellules de glioblastome. Ainsi, nos résultats ont mis en évidence une corrélation inverse significative ($p=0.03$) entre l'expression de la cavéoline-1 et celle de la sous-unité intégrine $\alpha 5$ dans l'ensemble des lignées de glioblastomes étudiées (**Figure44**).

Comme la cavéoline-1 régule l'expression de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$, nous nous sommes demandés comment la cavéoline-1 parvenait à moduler l'expression des gènes et plus particulièrement, l'expression de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ dans les cellules de glioblastome.

Conclusions:

Les résultats obtenus mettent en évidence que:

- ✚ La cavéoline-1 module l'expression des gènes dans les cellules de glioblastome et principalement les gènes appartenant à la famille des intégrines
- ✚ L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ est le médiateur des effets de la cavéoline-1
- ✚ La cavéoline-1 module l'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans différents modèles cellulaires de glioblastome
- ✚ L'expression de la cavéoline-1 et de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ sont inversement corrélées dans différents modèles de cellules de glioblastome

Ces résultats ont mis en évidence le moyen (l'intégrine $\alpha 5\beta 1$) par lequel la cavéoline-1 parvenait à moduler le phénotype des cellules de glioblastome.

III/ Modulation des voies de signalisation par la cavéoline-1 : régulation de l'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ par la cavéoline-1

Grâce à son domaine CSD, la cavéoline-1 lie de nombreuses protéines de la signalisation. Cette interaction a de nombreuses conséquences (*Partie II Chap II-3-5*) dont, notamment, l'inhibition de l'activité de la protéine liée et, par conséquent, l'inhibition d'une voie de signalisation et donc de différents processus cellulaires (prolifération, survie, migration...). Etant donné le rôle joué par la cavéoline-1 sur l'activation des voies de signalisation, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle elle pourrait réguler l'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ en modulant l'activation de certaines voies de signalisations dans les cellules de glioblastome.

Afin de comprendre comment la cavéoline-1 parvenait à réguler l'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans les cellules U87-MG, nous avons analysé les taux d'activation, l'expression et la localisation intra-cellulaire de différentes protéines de signalisation par WB. Au regard des différents sites de liaison des différents facteurs de transcription présents au niveau du promoteur de la sous-unité intégrine $\alpha 5$, nous avons évalué, au cours de cette étude, l'activation de la voie PI3K-AKt (à travers l'activation de AKt), de la voie des MAPK (à travers l'activation de ERK), de la voie SAPK (p38-MAPK et de SAP-JNK), de la protéine p53 et de FAK.

III-1/ Activation et expression des protéines de signalisation

III-1-1/ La protéine p38-MAPK

La voie des kinases induites par le stress (SAPK, *stress-activated protein kinase*) est une sous-famille de la super-famille des MAP kinases. Cette voie peut être induite par de nombreux stimuli comme le stress environnemental et les cytokines pro-inflammatoires. Cette voie peut-être dissociée en deux branches : la voie JNK et la voie p38 MAP kinase. Ces deux voies requièrent pour leur activation les mêmes protéines. L'activation des SAP kinases se fait par la phosphorylation de résidus tyrosine et thréonine comme dans la voie ERK. La voie p38-MAPK est une sous branche de la voie SAP.

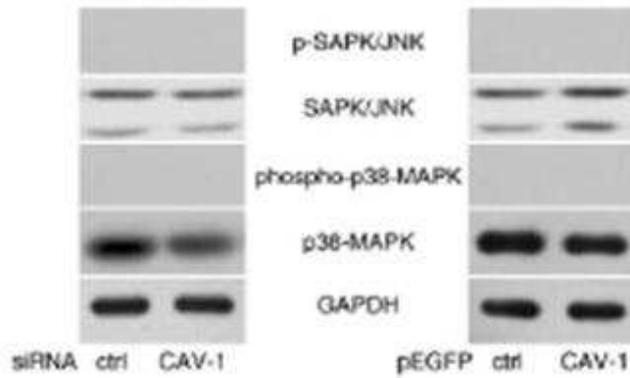


Figure45. Les protéines p38-MAPK et SAP-JNK ne sont pas activées dans les cellules de glioblastome.

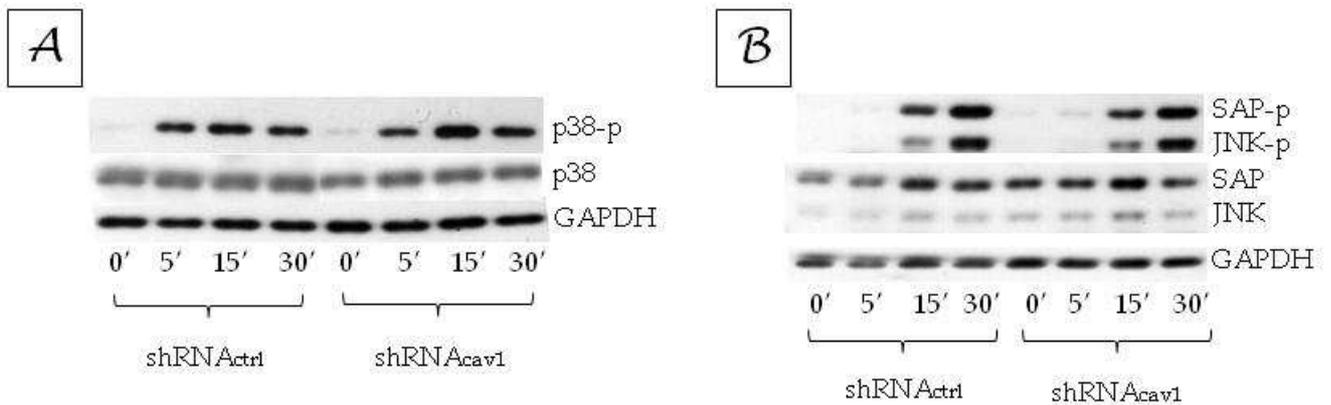


Figure46. Activation de p38-MAPK et de SAP-JNK dans les cellules U87-MGshRNA_{cav1}. L'activation de p38-MAPK et de SAP-JNK est réalisée par addition de sérum dans le milieu de culture après une déprivation en sérum de 24 heures. Une cinétique à court terme est réalisée (0 ; 5 ; 15 et 30 minutes) et la phosphorylation de p38 et de SAPJNK est évaluée par WB.

Les inducteurs de cette voie sont les mêmes que ceux de la voie JNK ; seules les protéines impliquées diffèrent : dans ce cas MEKK1 phosphorylera deux autres protéines MKK6 et MKK3.

L'analyse de l'activation de p38-MAPK dans les cellules U87-MGshRNA_{cav1} et U87-MGpEGFP_{cav1} a été réalisée au niveau basal, c'est-à-dire sans aucune stimulation. Ainsi, aucune activation de p38-MAPK n'a pu être révélée quelque soit le modèle cellulaire considéré U87-MGshRNA_{cav1} ou U87-MGpEGFP_{cav1} ainsi que leurs contrôles respectifs (**Figure45**).

Afin de s'assurer de l'activation de la p38-MAPK dans les cellules de glioblastome, nous avons induit la phosphorylation de p38-MAPK en condition de stress (déprivation en sérum). Ces conditions nous ont fourni des contrôles positifs de l'activation de la voie p38-MAPK qui évolue au cours du temps (**Figure46A**). L'activation de la protéine p38-MAPK est réalisée par l'ajout de sérum dans le milieu de culture des cellules U87-MGshRNA_{cav1}. Une cinétique a été réalisée sur des temps courts allant de 5 à 30 minutes (**Figure46A**).

III-1-2/ La protéine SAP/JNK

Les protéines JNK peuvent être activées par un grand nombre de stimuli extracellulaires incluant des cytokines et le stress induit par les rayons ultra-violets, le cycloheximide et l'anisomycine. La protéine Ras induit l'activation de cette voie à travers l'activation de la sérine thréonine kinase MEKK1. MEKK1 est impliquée dans la régulation des signaux de transduction dans les voies JNK et p38 MAP kinase. L'activation de JNK est réalisée par l'intermédiaire de MKK7 et de MKK4, substrats de MEKK1, grâce à une double phosphorylation sur les résidus thréonine et tyrosine.

Nous n'avons pas pu observer d'activation de la protéine SAP-JNK dans nos différents modèles cellulaires (**Figure45**). Comme pour p38-MAPK, l'activation de la protéine SAP-JNK a été induite par l'ajout de sérum dans le milieu de culture des cellules U87-MGshRNA_{cav1} (**Figure46B**).

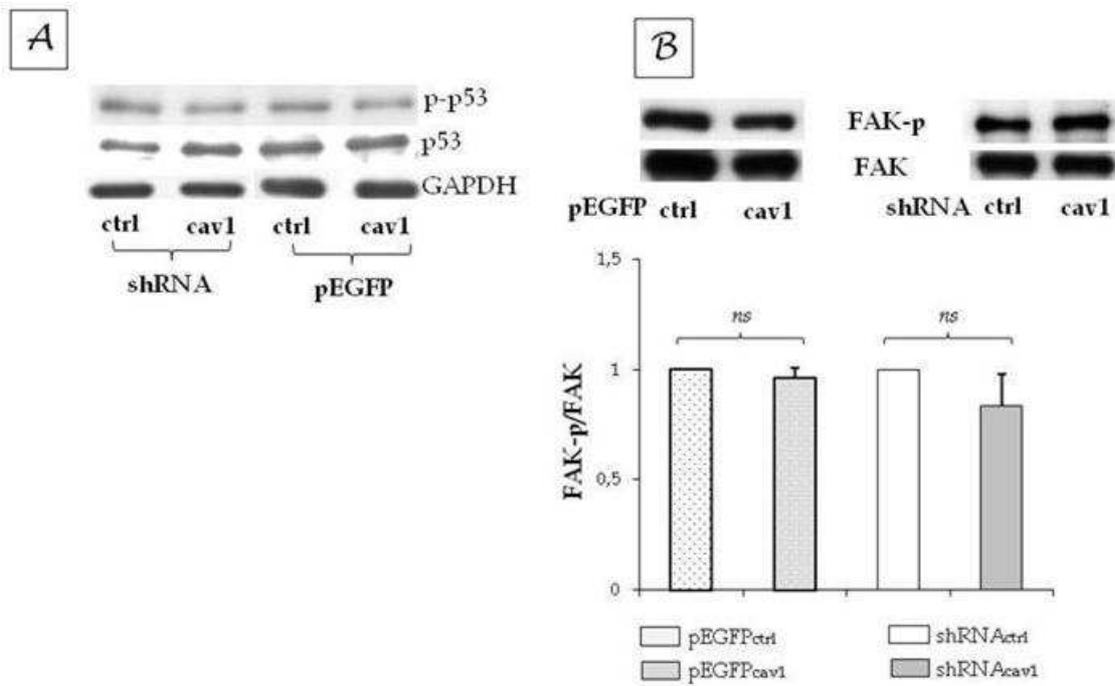


Figure 47. L'activation de p53 et de FAK n'est pas modulée dans les cellules de glioblastome. L'analyse de l'activation de p53 (A) et de FAK (B) a été réalisée par WB. Les histogrammes représentent l'analyse densitométrique de l'activation de FAK réalisée à partir de la moyenne de différentes expériences indépendantes ($n = 3$) \pm SEM et avec *ns* pour non significatif.

III-1-3/ Activation de p53

La protéine p53, suppresseur de tumeurs, régule l'expression de la cavéoline-1 (Bist A, *Biochem.*, 2000). Compte tenu du rôle de p53 dans différents processus cellulaires, nous avons évalué l'activation de la protéine p53 dans nos cellules.

L'étude de l'expression et de l'activation de p53 dans les cellules U87-MGshRNA_{cav1} et U87-MGpEGFP_{cav1} n'a pas révélé de différences d'expression ou d'activation dans ces différents modèles (Figure47A).

III-1-4/ La protéine FAK

La protéine FAK (*Focal Adhesion Kinase*) est une tyrosine kinase localisée au niveau des points focaux d'adhérence. L'activation de FAK, obtenue par une auto-phosphorylation au niveau de la tyrosine 397, intervient après l'activation des intégrines. Ainsi activée, FAK va s'associer aux domaines SH2 des Src qui phosphorylent à leur tour la paxilline et p130^{CAS}, des protéines adaptatrices recrutant de nombreuses protéines de signalisation. Compte tenu de la sur-expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans les cellules U87-MGshRNA_{cav1} et de la diminution de son expression dans les cellules U87-MGpEGFP_{cav1}, nous avons étudié l'activation de FAK dans ces cellules. Les résultats obtenus n'ont révélé aucune modulation de l'activation de FAK dans ces cellules (Figure47B). Ces résultats indiquent d'une part que la modulation de la cavéoline-1 n'affecte pas l'activation de FAK et que d'autre part l'augmentation de l'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ ne provoque pas non plus une hyper-phosphorylation de FAK dans nos conditions expérimentales.

III-1-5/ La protéine ERK

Galbiati et ses collègues avaient révélé qu'une inhibition de l'expression de la cavéoline-1 était suffisante pour conduire à la transformation des cellules NIH₃T₃ avec une hyper-phosphorylation de la protéine ERK (Galbiati F, *EMBO*, 1998). De manière plus générale, l'ensemble des travaux de cette équipe avait permis d'établir la nature de la relation réciproque existant entre le taux d'expression de la cavéoline-1 et l'activation de la protéine ERK (Engelman JA, *J. Biol. Chem.*, 1998 ; Engelman JA, *FEBS Letters.*, 1998).

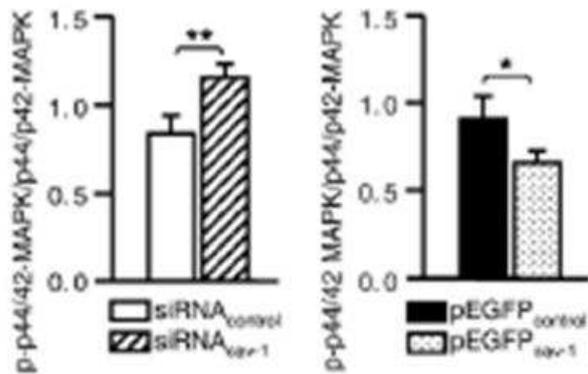
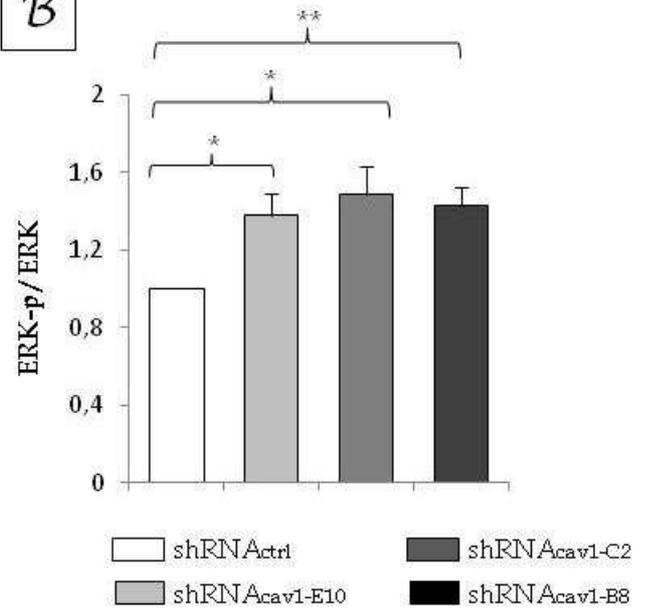
A**B**

Figure48. Corrélation inverse entre l'expression de la cavéoline-1 et l'activation de la protéine ERK. (A) dans les cellules U87-MGsiRNA_{cav1}, siRNA_{ctrl}, pEGFP_{cav1} et pEGFP_{ctrl} (B) et dans les cellules U87-MGshRNA_{cav1}, shRNA_{ctrl}. L'analyse de la phosphorylation de ERK (ou p44/42-MAPK) a été réalisée par WB et les histogrammes représentent l'analyse par densitométrie de la moyenne de plusieurs expériences indépendantes. (n = 6) ± SEM et avec * pour p<0,05 et ** pour p<0,01.

L'analyse de l'activation de la voie MAPK a été réalisée par une étude par WB de la phosphorylation de la protéine ERK dans les cellules sous-exprimant la cavéoline-1 (U87-MGsh/siRNA_{cav1}) et les cellules la sur-exprimant (U87-MGpEGFP_{cav1}).

Afin de pouvoir déterminer l'état d'activation de la protéine ERK dans les cellules sous- et sur-exprimant la cavéoline-1, les cellules ont étéensemencées dans un milieu complet puis lysées après une incubation sur la nuit. L'évaluation de l'activation basale (c'est-à-dire sans stimulation et sans traitement) de la protéine ERK a révélé une corrélation inverse entre l'expression de la cavéoline-1 et la phosphorylation de la protéine ERK (**Figure48**). En effet, les cellules sous-exprimant la cavéoline-1, U87-MGsiRNA_{cav1}, présentaient une hyper-phosphorylation de ERK par rapport à leurs contrôles ($1,1 \pm 0,1\%$ et $0,7 \pm 0,1\%$ respectivement) (**Figure48A**), comme les cellules U87-MGshRNA_{cav1} ($1,48 \pm 0,14$ fois d'augmentation par rapport aux contrôles U87-MGshRNA_{cav1}) (**Figure48B**) alors que ERK était hypo-phosphorylé dans les cellules U87-MGpEGFP_{cav1} rapport à leurs contrôles ($0,6 \pm 0,1\%$ et $0,9 \pm 0,1\%$)(**Figure48A**).

III-1-6/ La voie TGFβR/Smad

Razani et ses collègues avaient rapporté que la cavéoline-1 était capable de réguler la voie TGFβR/Smad à travers une liaison directe avec le récepteur TGFβRI et l'inhibition de Smad2 (Razani B, *J. Biol. Chem.*, 2001). La voie TGFβR/Smad étant capable de réguler de nombreux gènes à travers la translocation nucléaire du complexe R-Smad-p/Smad4 (Massague J, *Genes Dev.*, 2008), elle représentait une voie candidate dans la régulation de l'expression de l'intégrine α5β1 par la cavéoline-1. Par ailleurs, les résultats obtenus par PCR Array avaient révélé une sur-expression du récepteur TGFβRI dans les cellules U87-MGsiRNA_{cav1} par rapport à leurs contrôles (Chapitre II). Nous avons étudié l'expression du récepteur TGFβRI et de la phosphorylation de Smad2 dans les cellules U87-MGpEGFP_{cav1} et U87-MGshRNA_{cav1}.

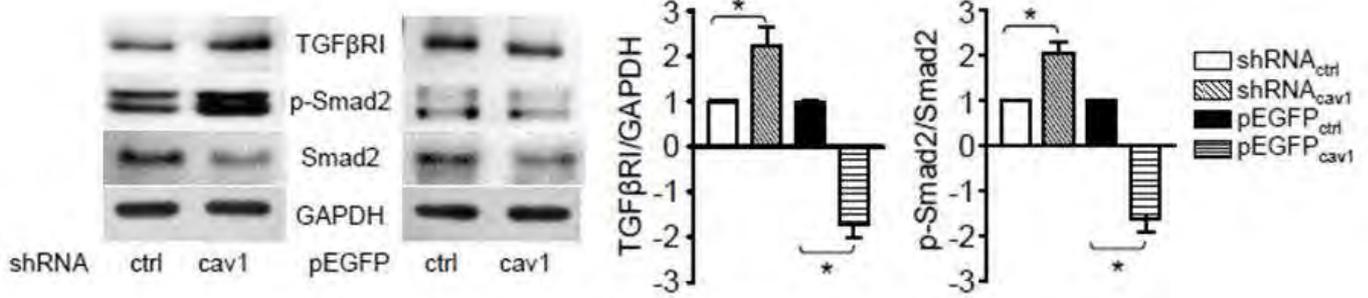


Figure49. Corrélation inverse entre l'expression de la cavéoline-1 et l'activation de la voie TGFβR/Smad2 dans les cellules de glioblastome. L'analyse de l'expression du récepteur TGFβRI, de la GAPDH, de Smad2 ainsi que la phosphorylation de Smad2 a été évaluée par WB. Les histogrammes représentent l'analyse densitométrique réalisée à partir de la moyenne de différentes expériences indépendantes (n = 3-6) ± SEM et avec * pour p<0,05.

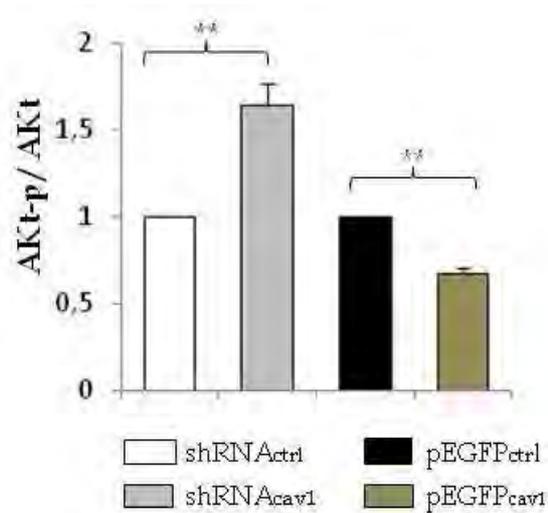


Figure50. Corrélation inverse entre l'expression de la cavéoline-1 et la phosphorylation de la protéine AKt dans les cellules de glioblastome. Les histogrammes représentent l'analyse densitométrique réalisée à partir de la moyenne de différentes expériences indépendantes (n = 3-6) ± SEM et avec **pour p<0,01.

L'analyse de l'expression du récepteur TGFβRI réalisée par WB sur les cellules U87-MGshRNA_{cav1} et les cellules U87-MGpEGFP_{cav1} et sur leurs contrôles respectifs a révélé une corrélation inverse entre l'expression du TGFβRI et celle de la cavéoline-1. En effet, les cellules U87-MGshRNA_{cav1} sur-expriment le récepteur d'environ deux fois par rapport aux cellules témoins U87-MGshRNA_{ctrl} alors que son expression est inhibée dans les cellules U87-MGpEGFP_{cav1} (**Figure49**). De manière similaire, Smad2 est hyper-phosphorylée dans les cellules U87-MGshRNA_{cav1} alors que sa phosphorylation est diminuée dans les cellules U87-MGpEGFP_{cav1} (diminution de deux fois environ par rapport à leurs contrôles) (**Figure49**). Ces résultats mettent en évidence une corrélation inverse entre l'activation de la voie TGFβR/Smad et l'expression de la cavéoline-1.

III-1-7/ La protéine AKt

Les résultats obtenus par l'analyse de PCR Array avaient également révélé une modulation d'AKt1 dans les cellules U87-MGsiRNA_{ctrl}. Par ailleurs, le taux d'activation de la PI3K, d'AKt et de p70s6k augmente avec le grade tumoral dans les gliomes et est inversement corrélée au niveau de caspase 3 clivée ([Chakravarti A, J. Clin. Oncol., 2004](#)). L'étude de l'activation de la PI3K-AKt a donc été menée par l'analyse de l'activation de la protéine AKt dans les cellules U87-MGshRNA_{cav1} et U87-MGpEGFP_{cav1} par rapport à leurs contrôles. Comme la voie TGFβR/Smad et de ERK, l'analyse de l'activation de la protéine AKt a révélé une corrélation inverse entre l'activation de la protéine AKt et l'expression de la cavéoline-1 (**Figure50**).

La protéine AKt est hyper-phosphorylé dans les cellules U87-MGshRNA_{cav1} ($1,63 \pm 0,12$ fois par rapport à leurs contrôles) alors que la phosphorylation de la protéine AKt est diminuée dans les cellules U87-MGpEGFP_{cav1} ($0,67 \pm 0,03$ fois diminuée) par rapport à leurs contrôles (**Figure50**).

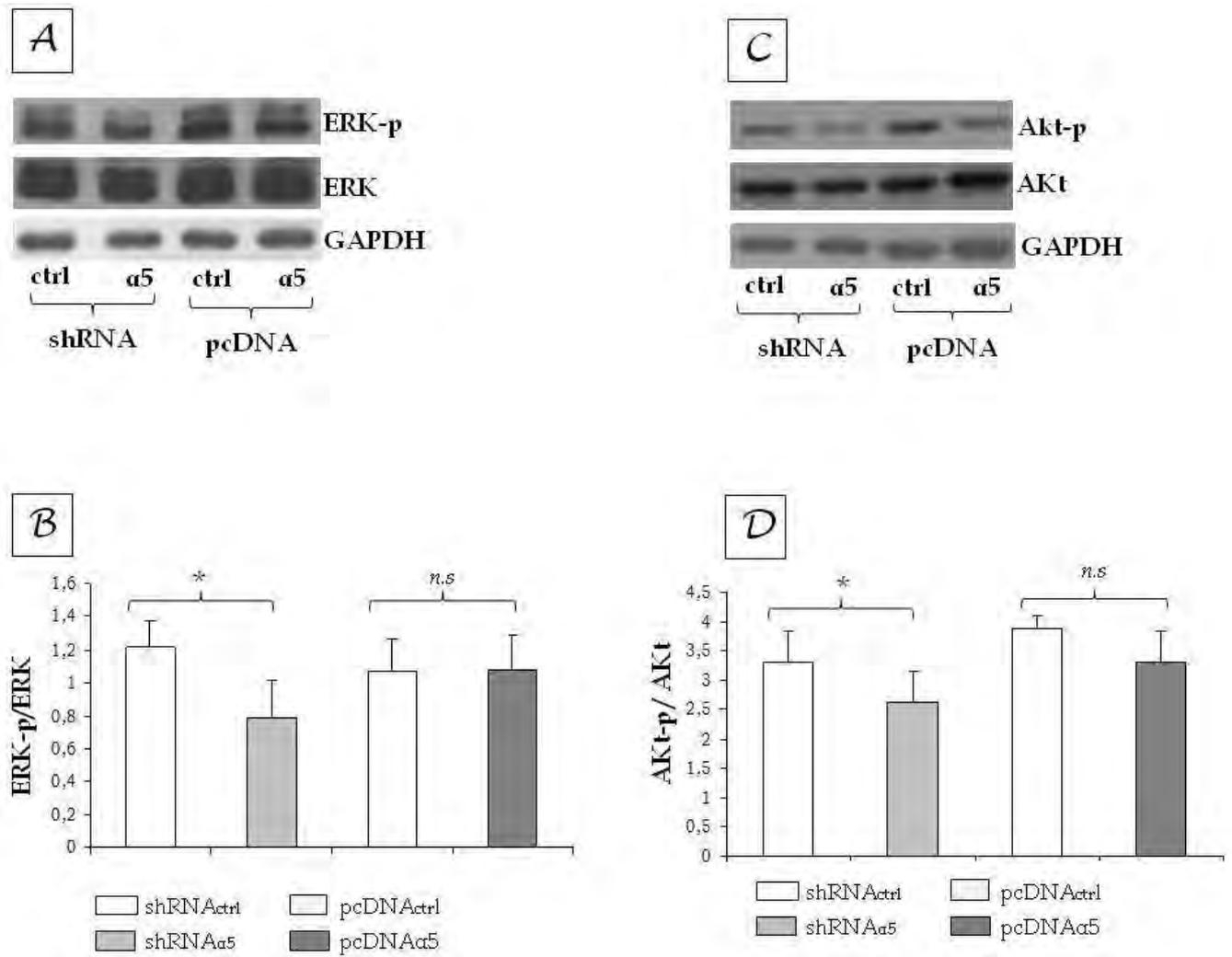


Figure 51. Inhibition de l'activation de la protéine ERK et de la protéine AKt dans les cellules U87-MGshRNA α_5 sous-exprimant la sous-unité intégrine α_5 . L'analyse de l'expression de ERK et de ERK-p a été réalisée par WB (A). Les histogrammes (B) représentent l'analyse densitométrique réalisée à partir de la moyenne de différentes expériences indépendantes ($n = 5$) \pm SEM et avec * pour $p < 0,05$ et ns pour non significatif. L'analyse de l'expression d'AKt et de AKt-p a été réalisée par WB (C). Les histogrammes (D) représentent l'analyse densitométrique réalisée à partir de la moyenne de différentes expériences indépendantes ($n = 5$) \pm SEM et avec * pour $p < 0,05$.

III-2/ Modulation des voies de signalisation par l'intégrine $\alpha 5\beta 1$

La modulation directe de l'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans les cellules U87-MG avait révélé une agressivité des cellules sur-exprimant cette intégrine (U87-MGpcDNA $\alpha 5$) par rapport à leurs contrôles (Chapitre 1). Au contraire, les cellules sous-exprimant cette intégrine (U87-MGshRNA $\alpha 5$) montraient une agressivité moindre. Ces modèles, générés au laboratoire, nous ont permis d'évaluer la modulation des protéines TGF β RI, Smad2, AKt et ERK dans un contexte cellulaire où l'expression de la sous-unité intégrine $\alpha 5$ variait alors que l'expression de la cavéoline-1 n'était pas modulée.

III-2-1/ Taux d'activation de ERK

L'analyse de l'activation de la protéine ERK menée sur les cellules sous-exprimant l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, U87-MGshRNA $\alpha 5$, et les cellules la sur-exprimant, U87-MGpcDNA $\alpha 5$, a révélé une modulation de l'activation de la protéine ERK uniquement dans les cellules U87-MGshRNA $\alpha 5$. En effet, dans ces cellules, la phosphorylation de la protéine ERK est diminuée par rapport à leurs contrôles ($0,78 \pm 0,24$ et $1,22 \pm 0,18$ fois) (**Figure51A, B**).

Ces résultats mettent en évidence une modulation de l'activation de la protéine ERK uniquement lorsque l'expression de la sous unité intégrine $\alpha 5$ est diminuée.

III-2-2/ Modulation de la voie TGF β R/Smad2

L'étude de l'expression du récepteur TGF β RI dans ces cellules a montré une corrélation entre l'expression du récepteur et l'expression de la sous-unité intégrine $\alpha 5$. En effet, les cellules U87-MGpcDNA $\alpha 5$ sur-exprimant l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ sur-expriment également le récepteur TGF β RI alors que l'expression de ce dernier est diminuée dans les cellules U87-MGshRNA $\alpha 5$ (**Figure52**). En revanche, la phosphorylation de Smad2 ne varie pas dans les cellules quel que soit leur taux d'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ (**Figure52**).

Ces résultats mettent en évidence une modulation de l'expression du récepteur TGF β RI dans le même sens que celle de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$: quand l'expression de l'intégrine augmente celle de TGF β RI augmente et lorsque l'expression de l'intégrine diminue, l'expression du récepteur diminue aussi.

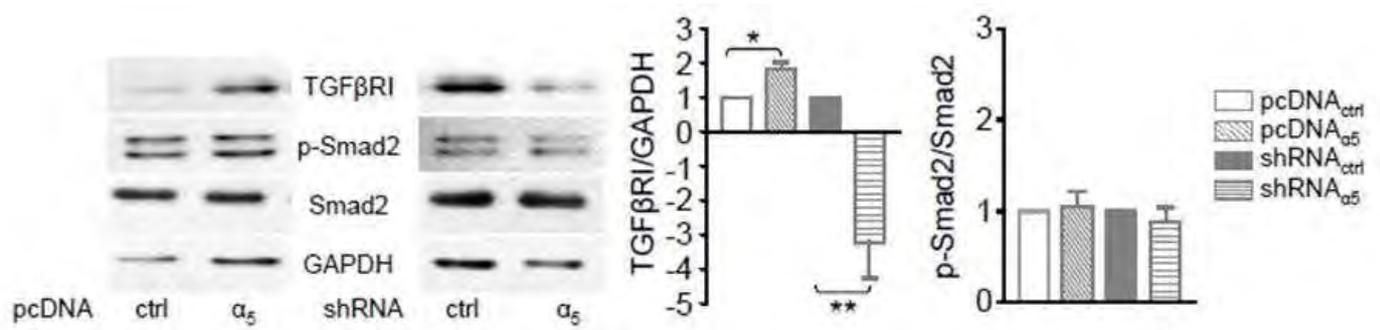


Figure52. Corrélation entre l'expression de l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ et l'expression du TGF β RI. L'analyse de l'expression du récepteur TGF β RI, de Smad2 et de la GAPDH ainsi que de Smad2-p a été réalisée par WB. Les histogrammes correspondent à l'analyse densitométrique réalisée à partir de la moyenne de différentes expériences indépendantes (n = 3-5) \pm SEM et avec * pour $p < 0,05$ et ** pour $p < 0,01$.

III-2-3/ Taux d'activation de AKt

L'étude de la phosphorylation de la protéine AKt a été réalisée dans les différents modèles cellulaires. Comme pour ERK, la phosphorylation de la protéine AKt dans les cellules sur-exprimant l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ ne varie pas comparativement aux cellules contrôles (**Figure51C, D**). En revanche, une inhibition de la phosphorylation de la protéine AKt est retrouvée dans les cellules sous-exprimant l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, U87-MGshRNA $\alpha 5$ par rapport à leurs contrôles U87-MGshRNA $_{ctrl}$ ($2,60 \pm 0,55$ et $3,30 \pm 0,65$ respectivement) (**Figure51C, D**).

Ces résultats mettent en évidence une modulation de l'activation de la protéine AKt uniquement lorsque l'expression de la sous-unité intégrine $\alpha 5$ est diminuée.

Conclusions:

Les résultats obtenus au cours de cette étude ont mis en évidence:

- ✚ Une activation de plusieurs protéines de signalisation (ERK, AKt et Smad2) dans les cellules de glioblastome les plus agressives et la sur-expression du TGF β RI
- ✚ L'expression de la cavéoline-1, inversement corrélée à l'activation de ces protéines et à l'expression du récepteur TGF β RI
- ✚ La modulation directe de l'expression de la sous-unité intégrine $\alpha 5$, dans les cellules U87-MG, qui ne conduit pas aux mêmes modulations de l'activation ou de l'expression des protéines indiquant que la cavéoline-1 est responsable de ces régulations

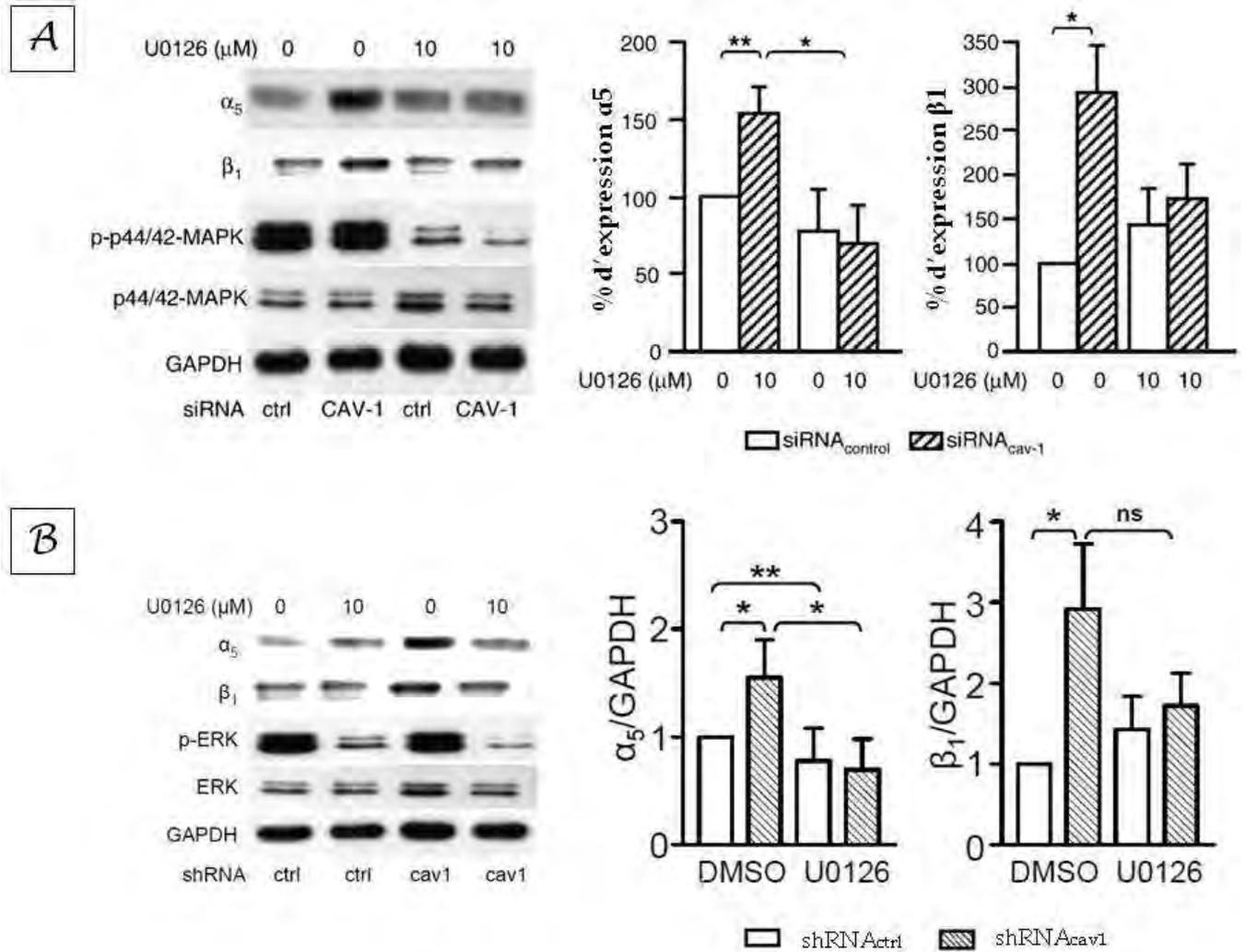


Figure 53. Implication de la voie ERK-MAPK dans la régulation de l'intégrine α_5 dans les cellules de glioblastome. L'inhibition de l'expression de la sous-unité intégrine α_5 dans les cellules U87-MGsiRNA_{cav1} (A) et U87-MGshRNA_{cav1} (B) est réalisée par un traitement avec du UO126 (10 μM) ou du DMSO (solvant) durant 24 heures. Les histogrammes représentent la moyenne de plusieurs expériences indépendantes basées sur l'analyse de l'expression des sous unités α_5 et β_1 par densitométrie ($n = 4$) \pm SEM avec * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$.

III-3/ Implication des voies ERK-MAPK, PI3K-Akt et TGFβR/Smad dans la régulation de l'expression de l'intégrine α5β1

L'étude de l'activation des différentes protéines et voies de signalisation avait mis en évidence une modulation en sens inverse de l'expression de la cavéoline-1 et de l'activation des protéines de signalisations. Afin de déterminer si ces voies de signalisation étaient impliquées dans la régulation de l'expression de l'intégrine α5β1 par la cavéoline-1, nous avons procédé à leur inhibition en ayant recours à des inhibiteurs spécifiques.

III-3-1/ Implication de la voie ERK-MAPK

Notre attention s'est tout d'abord portée sur la protéine ERK et la voie des MAPK sur laquelle la cavéoline-1 exerce un contrôle négatif. Compte tenu de l'hyperphosphorylation de la protéine ERK dans les cellules U87-MGsiRNA_{cav1} par rapport à leurs contrôles, nous l'avons inhibée. L'inhibition de la protéine MEK-1, capable d'activer la protéine ERK en la phosphorylant, a été obtenue grâce à l'utilisation du UO126, un inhibiteur spécifique de MEK-1.

L'analyse des résultats a montré une inhibition significative de l'expression de la sous-unité intégrine α5 par 10μM de UO126 pendant 24 heures. L'inhibition de la phosphorylation de la protéine ERK est observée dans les cellules U87-MGsiRNA_{cav1} et leurs contrôles U87-MGsiRNA_{ctrl} (**Figure53A**). Bien que l'expression de la sous-unité intégrine α5 ait diminué dans les cellules U87-MGsiRNA_{cav1} traitées par le UO126, l'expression la sous-unité intégrine β1 n'a pas été affectée (quoiqu'une tendance à la baisse ait été mise en évidence) (**Figure53A**). Dans les cellules contrôles U87-MGsiRNA_{ctrl}, le traitement avec le UO126 n'a pas affecté la faible expression des sous-unités intégrines α5 et β1 (qui sont déjà basses) alors que la phosphorylation de ERK était diminuée.

Ces résultats ont donc permis de révéler l'implication de la voie ERK-MAPK dans la régulation de l'expression de l'intégrine α5β1 par la cavéoline-1 dans les cellules U87-MGsiRNA_{cav1}.

Ces résultats ont également pu être validés dans les lignées stables U87-MGshRNA_{cav1} (**Figure53B**).

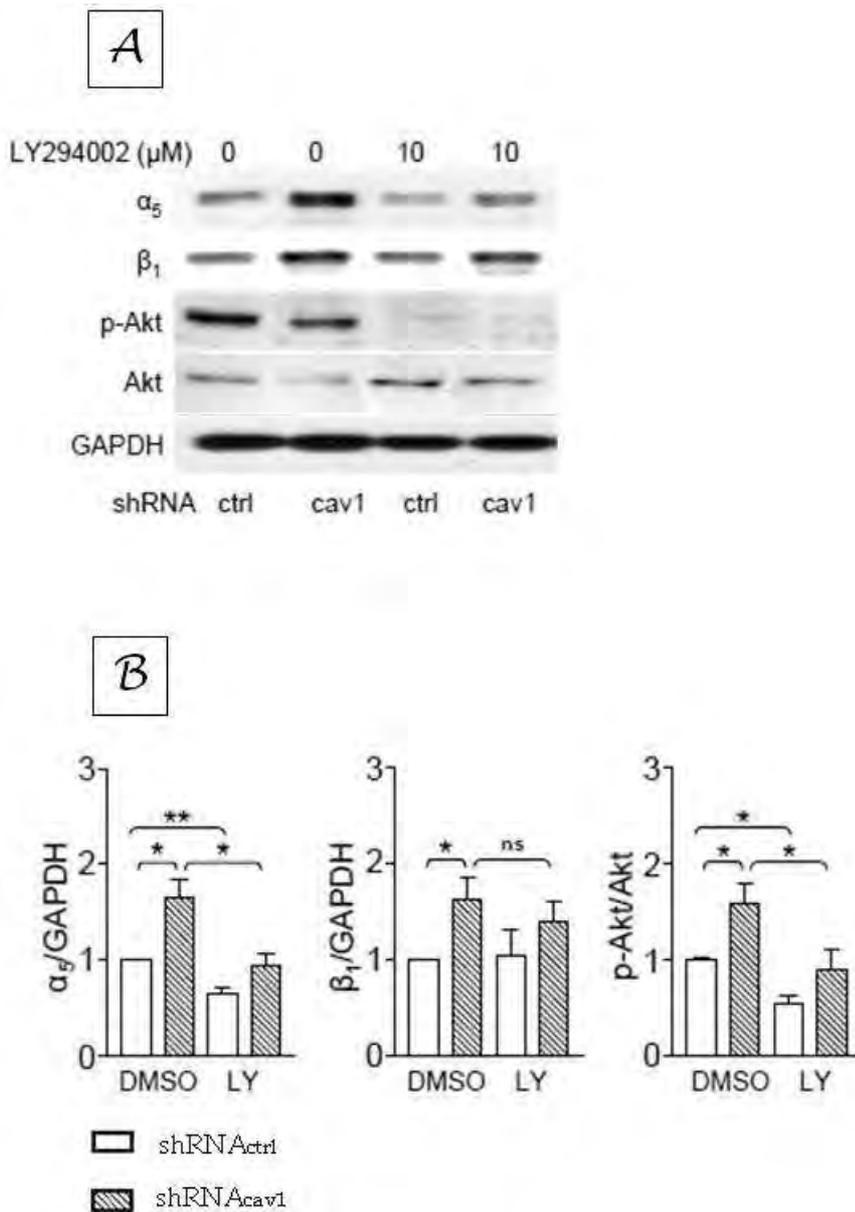


Figure 54. Implication de la voie PI3K-Akt dans la régulation de l'expression de la sous-unité intégrine α_5 dans les cellules de glioblastome U87-MGshRNA_{cav1}. L'inhibition de l'expression de la sous-unité intégrine α_5 dans les cellules U87-MGsiRNA_{cav1} est réalisée par un traitement avec du LY294002 (10 μM) ou du DMSO (solvant) durant 24 heures. L'analyse de l'expression des sous-unités α_5 et β_1 et de l'activation d'AKt a été réalisée par WB (A). Les histogrammes (B) représentent l'analyse densitométrique réalisée à partir de la moyenne de différentes expériences indépendantes ($n = 4-7$) \pm SEM et avec * pour $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ et ns pour non significatif.

III-3-2/ Implication de la voie PI3K-Akt

La voie de signalisation PI3K-Akt présentait également un intérêt particulier: tout d'abord, comme pour la protéine ERK, l'activation d'Akt est inversement corrélée à l'expression de la cavéoline-1 ensuite l'activation des intégrines conduisant à l'activation d'Akt pouvait laisser penser que la modulation de la phosphorylation d'Akt était la conséquence de la sur-expression de l'intégrine et non la cause.

Nous avons donc inhibé la PI3-K par le LY294002, un inhibiteur spécifique, dans les cellules U87-MGshRNA_{cav1}. Le traitement de ces cellules par le LY294002 durant 24 heures à une concentration de 10µM induit une diminution de la phosphorylation d'Akt dans les cellules témoins (**Figure54**). L'inhibition de l'activation de la protéine Akt par le traitement au LY294002 induit une inhibition significative de l'expression de la sous-unité intégrine α5 dans les cellules U87-MGshRNA_{cav1} et les cellules U87-MGshRNA_{ctrl}. Dans les cellules U87-MGshRNA_{ctrl}, l'expression de la sous-unité intégrine α5 atteint alors un niveau comparable à celui des cellules témoins U87-MGshRNA_{ctrl} non traitées (**Figure54**). L'expression de la sous-unité β1 ne semble pas être affectée par ce traitement dans les cellules U87-MGshRNA_{cav1} et les cellules U87-MGshRNA_{ctrl}.

Ces résultats impliquent donc la voie PI3K-Akt dans la régulation de l'expression de la sous-unité α5 au même titre que la voie ERK-MAPK dans les cellules U87-MGshRNA_{cav1}.

III-3-3/ Implication de la voie TGFβR/Smad

La voie TGFβR/Smad est l'une des plus intéressantes car l'expression du récepteur ainsi que l'activation de voie de signalisation, à travers son médiateur Smad2, est modulée par l'expression de la cavéoline-1. De plus, la voie TGFβR/Smad régule la transcription de nombreux gènes tels que le gène PAI-1 ([Hua X, Genes Dev., 1998](#)) dont l'expression est inversement corrélée à celle de la cavéoline-1 dans les cellules de glioblastome U87-MG (Chapitre [II-1](#)).

Nous avons inhibé le récepteur TGFβRI par l'utilisation d'un inhibiteur spécifique, le SB-431542 à la dose de 10µM durant 24 heures.

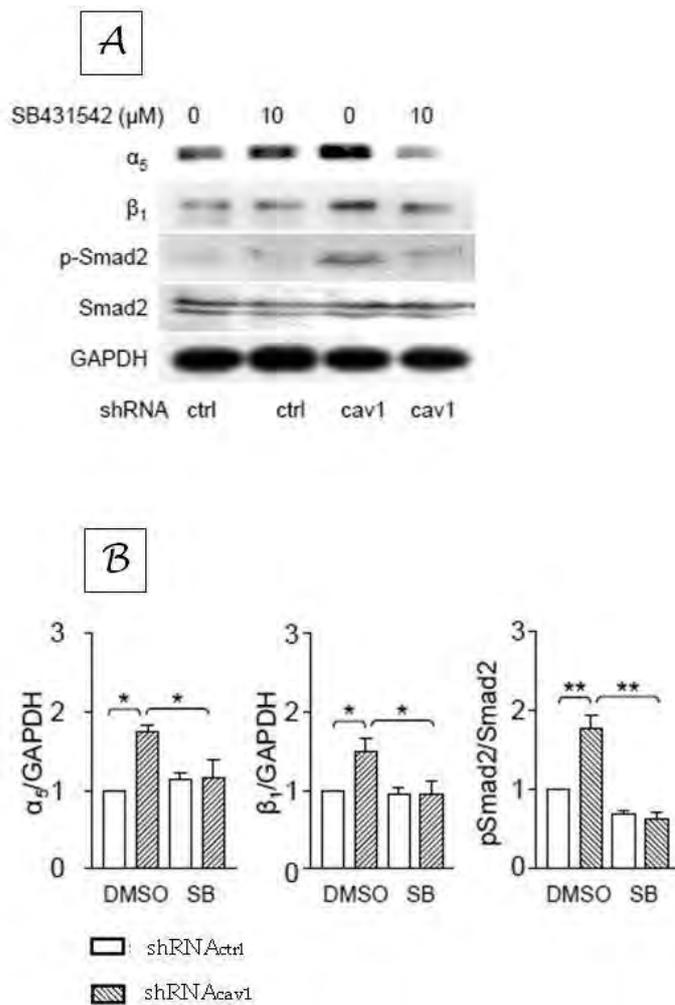


Figure 55. Implication de la voie TGF β R/Smad2 dans la régulation de l'expression de la sous-unité intégrine α_5 dans les cellules de glioblastome U87-MGshRNA_{cav1}. L'inhibition de l'expression de la sous-unité intégrine α_5 dans les cellules U87-MGsiRNA_{cav1} est réalisée par un traitement avec du SB-431542 (10 μ M) ou du DMSO (solvant) durant 24 heures. Les histogrammes représentent l'analyse de l'expression des sous unités α_5 et β_1 et de l'activation de Smad2 par densitométrie (n = 4) \pm SEM avec * p<0,05 ; ** p<0,01 et *** pour p<0,001.

Sous traitement, les cellules U87-MGshRNA_{cav1} (dans lesquelles Smad2 est normalement hyper-phosphorylé) ont montré une diminution significative de la phosphorylation de Smad2 (**Figure55**).

Le traitement des cellules U87-MGshRNA_{cav1} par le SB-431542 induit également une diminution de l'expression de la sous-unité intégrine $\alpha 5$ alors que l'expression de l'intégrine ne varie pas dans les cellules témoins. Une inhibition significative de l'expression de la sous unité $\beta 1$ est également induite par ce traitement dans les cellules U87-MGshRNA_{cav1} (**Figure55**).

L'ensemble de ces résultats a mis en évidence l'implication de différentes voies de signalisation dans la modulation de l'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ par la cavéoline-1 : les voies ERK-MAPK, PI3K-AKt et TGF β R/Smad. Pour autant ces voies ne montrent pas une régulation identique de l'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ puisque seul la voie TGF β R/Smad régule les deux sous-unités intégrines $\alpha 5$ et $\beta 1$ alors que les voies ERK-MAPK et PI3K-AKt modulent uniquement l'expression de la sous-unité $\alpha 5$ de l'intégrine. Toutefois, une tendance allant vers une diminution de l'expression de la sous-unité $\beta 1$ a été observée lors du traitement des cellules U87-MGshRNA_{cav1} par le LY294002 ou le UO126.

Les voies de signalisation intra-cellulaires étant interconnectées, particulièrement dans les cellules de glioblastome où les nombreuses voies de signalisation activées promeuvent la tumorigenèse, nous avons mené une analyse croisée de l'activation et de l'inhibition de ces trois voies les unes par rapport aux autres.

III-4/ Interconnections des voies ERK-MAPK, PI3K-AKt et TGF β R/Smad

Afin de déterminer à quels points les voies de signalisations s'interconnectent les unes avec les autres, nous avons procédé à l'analyse de chacune de ces voies après avoir inhibé une autre voie.

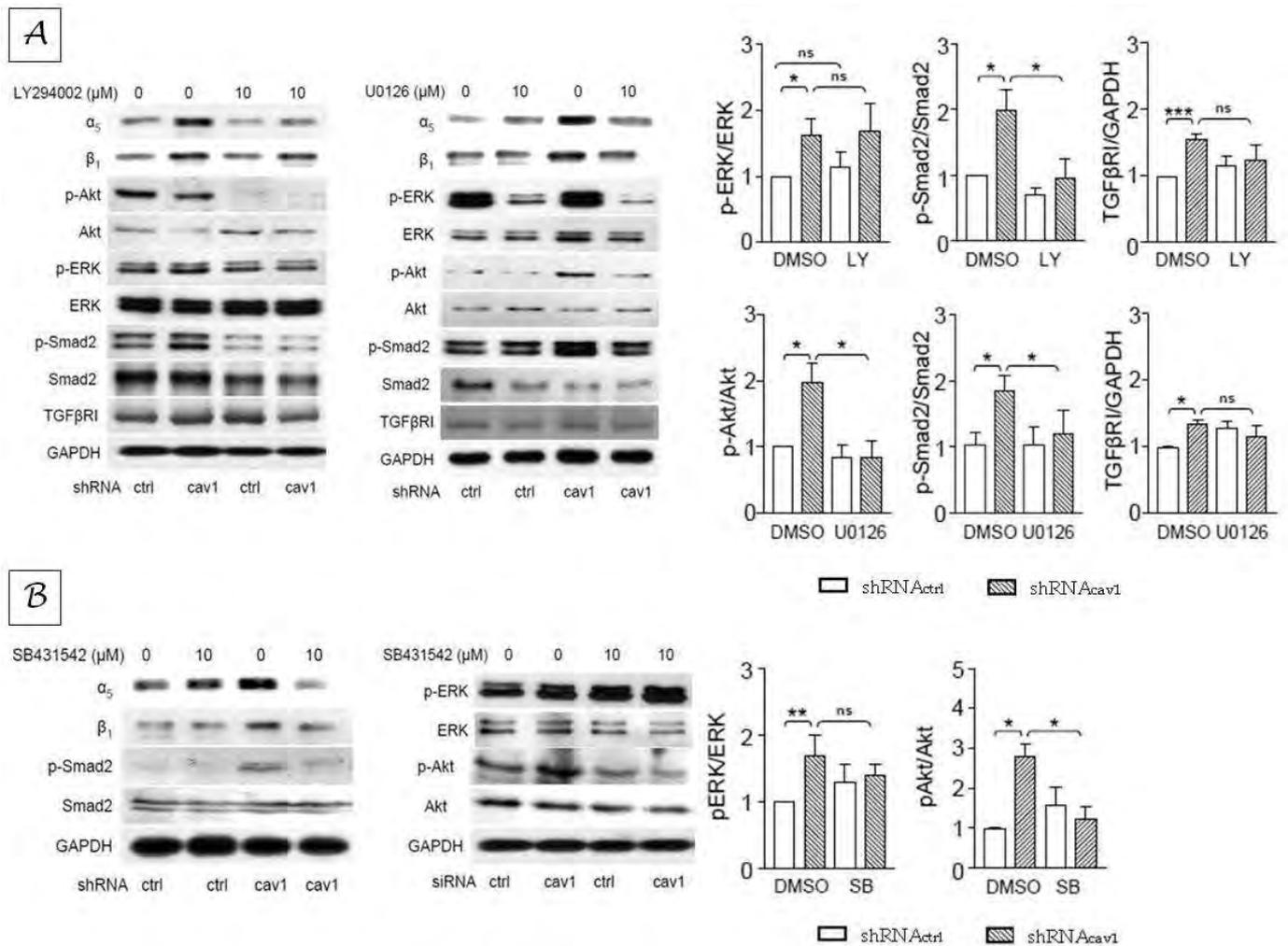


Figure56. Les voies de signalisation PI3K-Akt, TGF β R/Smad2 et ERK-MAPK sont interconnectées dans les cellules de glioblastome. L'analyse de l'activation de ERK, de Smad2 et de l'expression de TGF β RI est réalisée après un traitement par le LY294002 (A) ; l'analyse de l'activation de Smad2, d'AKt et de l'expression de TGF β RI est réalisée après un traitement par le UO126 (B) de même que l'analyse de l'activation de ERK et d'AKt a été évaluée après un traitement par le SB-431542 (C) dans les cellules U87-MGsiRNA_{cav1}. Les histogrammes représentent la moyenne de plusieurs expériences (n = 3-7) et correspondent à l'analyse par densitométrie \pm SEM avec * p<0,05 ; ** p<0,01 et *** pour p<0,001 ; ns pour non significatif.

III-4-1/ La voie ERK-MAPK active Smad2 et AKt

L'étude de l'activation des voies PI3K-AKt et TGF β R/Smad a tout d'abord été réalisée après traitement des cellules U87-MGshRNA_{cav1} par le UO126.

L'analyse de la phosphorylation de Smad2 après 24 heures de traitement par le UO126 a révélé une diminution de sa phosphorylation dans les cellules U87-MGshRNA_{cav1} à un niveau comparable à celui des cellules contrôles dans lesquelles l'activation de Smad2 n'est pas modulée (**Figure56A**). De même, la phosphorylation de la protéine AKt diminue lors du traitement par le UO126 dans les cellules U87-MGshRNA_{cav1} en le ramenant au même taux d'activation que les cellules témoins, dans lesquelles l'activation d'AKt n'est pas modulé (**Figure56A**). En outre, l'expression du récepteur TGF β RI n'est modulée par le traitement avec le UO126 ni dans les cellules U87-MGshRNA_{cav1} ni dans leurs contrôles.

L'ensemble de ces résultats met en évidence une régulation de l'activation des protéines Smad2 et AKt par la voie ERK-MAPK. Ces protéines semblent donc être situées en aval de la signalisation ERK-MAPK.

III-4-2/ La voie PI3K-AKt active Smad2

L'étude de l'activation des voies ERK-MAPK et TGF β R/Smad a été menée après traitement des cellules U87-MGshRNA_{cav1} par le LY294002. Les résultats obtenus ont pu mettre en évidence une diminution de la phosphorylation de Smad2 dans les cellules U87-MGshRNA_{cav1} comparable au niveau d'activation de Smad2 des cellules témoins dans lesquelles la phosphorylation de Smad2 n'est pas modulée par le LY294002 (**Figure56A**). En revanche, l'activation de la protéine ERK, comme l'expression du récepteur TGF β RI ne sont pas modulées par le traitement avec le LY294002 (**Figure56A**).

Ces résultats révèlent différents aspects de la cascade de signalisation menant à la régulation de l'expression de la sous-unité intégrine α 5. Tout d'abord, la protéine ERK régule AKt mais cette relation n'est pas réciproque puisque l'inhibition de la phosphorylation de la protéine AKt ne conduit pas à une inhibition de la phosphorylation de la protéine ERK. Ensuite, puisque l'inhibition de la phosphorylation d'AKt induit une diminution de celle de Smad2, Smad2 se situerait en aval de la signalisation d'AKt.

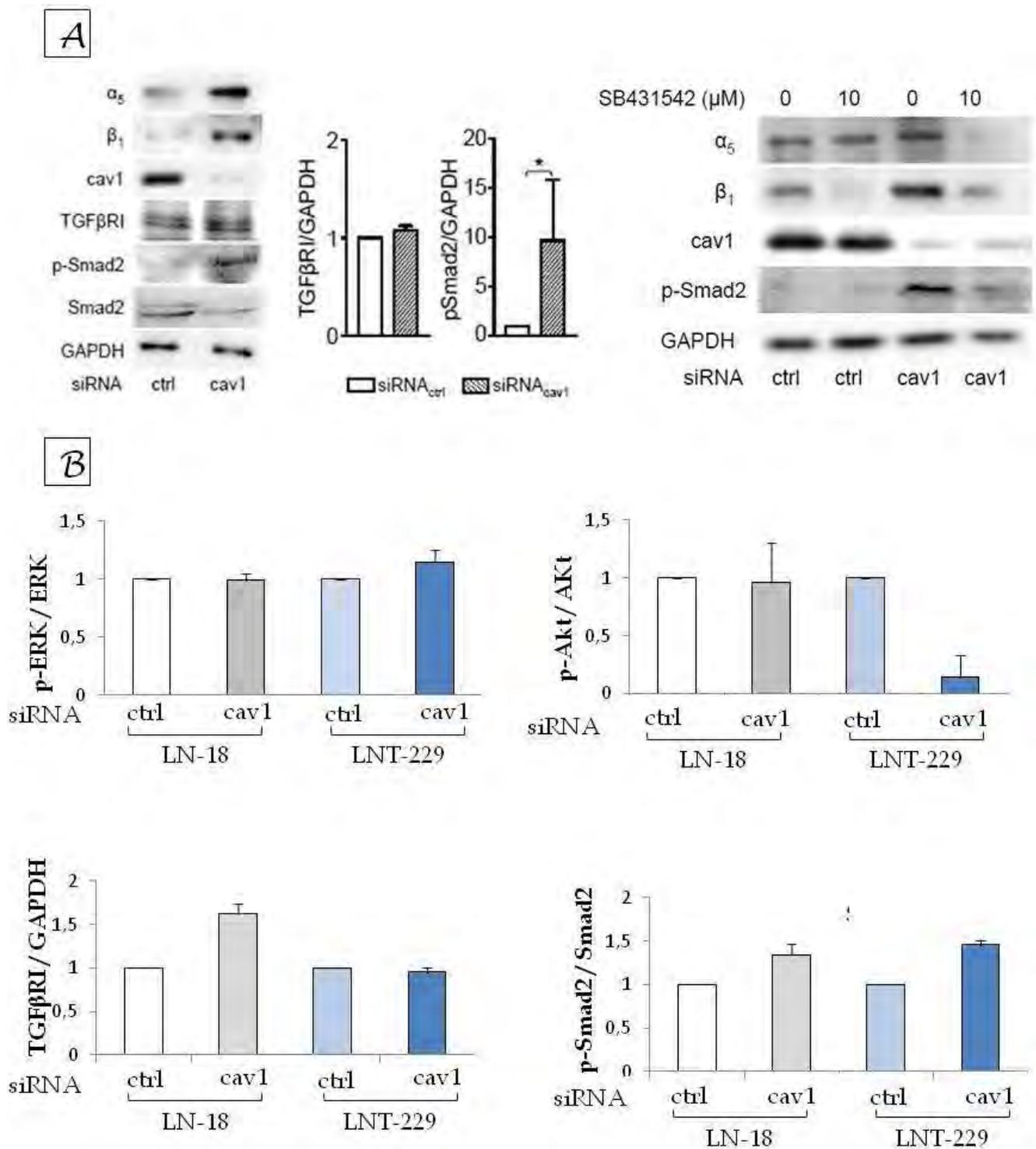


Figure 57. L'inhibition de l'expression de la cavéoline-1 dans les cellules U373 induit une hyper-phosphorylation de Smad2. L'analyse de l'expression des protéines a été réalisée par WB. Les histogrammes représentent l'analyse par densitométrie de l'expression des sous-unités intégrines α_5 et β_1 ainsi que la cavéoline-1, le TGF β RI et Smad2 sur une moyenne de 2 à 3 expériences indépendantes \pm SEM avec * quand $p < 0,05$.

III-4-3/ La voie TGFβR/Smad active AKt

Les résultats obtenus ont montré une régulation de l'activation de Smad2 par les voies ERK-MAPK et de la voie PI3K-Akt. Afin de pouvoir déterminer l'implication de la voie TGFβR/Smad dans l'activation des voies ERK-MAPK et PI3K-Akt, nous avons inhibé la voie TGFβR/Smad par un traitement avec le SB-431542 durant 24 heures. L'inhibition du récepteur TGFβRI par le SB-431542 a conduit à l'inhibition de la phosphorylation d'AKt au même titre que Smad2 dans les cellules U87-MGshRNA_{cav1}. La diminution de la phosphorylation de la protéine AKt dans ces cellules ramène AKt-p à un niveau comparable à celui des cellules contrôles (**Figure56C**). En revanche, l'activation de la protéine ERK n'est pas affectée par ce traitement.

Ces résultats indiquent que la voie PI3K-Akt est placée en aval de la signalisation TGFβR/Smad.

III-4-4/ La voie TGFβR/Smad régule l'expression de l'intégrine α5β1 dans les cellules U373

Etant donné le rôle joué par les voies de signalisation TGFβRI/Smad2, ERK-MAPK et PI3K-Akt dans la régulation de l'expression de la sous-unité intégrine α5, nous avons souhaité savoir si ces voies et ces protéines de signalisation étaient également modulées dans d'autres cellules de glioblastome. L'analyse de l'activation des protéines Smad2, ERK et AKt ainsi que de l'expression du récepteur TGFβRI a donc été poursuivie dans d'autres cellules de glioblastome dans lesquelles l'expression de la cavéoline-1 avait été inhibée, U373shRNA_{cav1}, LN-18shRNA_{cav1} et LN-229shRNA_{cav1}.

L'analyse des résultats n'a pas mis en évidence de modulation de la phosphorylation de ERK ou d'AKt dans nos différents modèles (**Figure57B**). En revanche, une hyperphosphorylation de Smad2 a été révélée dans les cellules U373shRNA_{cav1} par rapport aux témoins U373shRNA_{ctrl} alors que l'expression de TGFβRI n'était pas modulée (**Figure57A**). Bien que l'analyse statistique permette difficilement de conclure, nous avons constaté que la phosphorylation de Smad2 a tendance à augmenter (2 expériences indépendantes réalisées) dans les cellules LN-18shRNA_{cav1} et LN-229shRNA_{cav1} par rapport à leurs témoins respectifs (**Figure57B**).

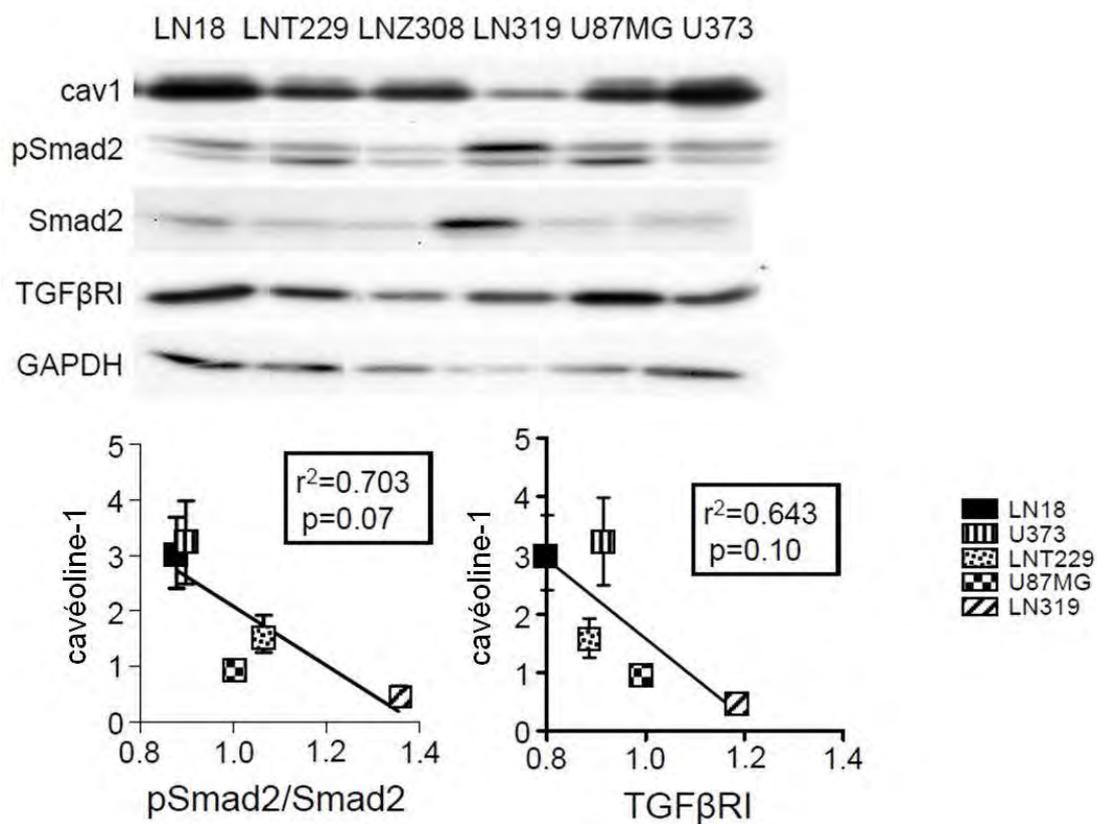


Figure 58. Corrélation inverse entre l'expression de la cavéoline-1 et du TGFβRI et la phosphorylation de Smad2 dans les lignées de glioblastome. L'expression de la cavéoline-1, de TGFβRI et de Smad2-p a été analysée par WB sur les lignées LN18, U373, LNT229, U87-MG et LN319. La droite de régression linéaire a été réalisée à partir d'expériences indépendantes (n = 3). Plus R² proche de 1, plus la corrélation est forte avec * p < 0,05.

De plus, dans les cellules U373shRNA_{ctrl} traitées par du SB-431542, nous avons mis en évidence une inhibition de l'expression des sous-unités intégrines $\alpha 5$ et $\beta 1$.

Ces résultats indiquent que la voie TGF β R/Smad est capable de réguler l'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans d'autres modèles de cellules de glioblastome et pas uniquement dans les cellules U87-MG.

III-4-5/ La cavéoline-1, l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et le récepteur TGF β RI sont trois protéines interconnectées dans les glioblastomes

Les résultats obtenus au laboratoire avaient déjà mis en évidence une corrélation inverse entre le taux d'expression de la cavéoline-1 et celle de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans différentes lignées humaines de glioblastome. De plus, l'expression de la cavéoline-1 est également inversement corrélée à celle du récepteur TGF β RI et à la phosphorylation de Smad2 (p-Smad2) dans la lignée de glioblastome U87-MG. L'hypothèse selon laquelle cette corrélation pourrait s'appliquer à d'autres lignées humaines de glioblastome a été vérifiée.

Nous avons donc analysé l'expression des protéines cavéoline-1, TGF β RI et p-Smad2 dans cinq lignées de glioblastome : LN-18, U373, LNT-229, U87-MG et LN319.

Bien que la corrélation inverse entre l'expression de la cavéoline-1 et celle du récepteur TGF β RI ne soit pas significative ($p=0,10$), une tendance a été dégagée avec une expression inversement corrélée entre ces deux protéines (**Figure58**) mais également entre la cavéoline-1 et p-Smad2 ($p=0,07$) (**Figure58**).

Ces résultats confirment les données obtenues avec les cellules de glioblastomes U87-MG dans lesquelles l'expression de la cavéoline-1 avait été modulée. En effet, la corrélation inverse existant entre l'expression de la cavéoline-1 et celle du récepteur TGF β RI (comme p-Smad2) semble être valable dans différentes cellules de glioblastome.

Conclusions :

Les résultats obtenus au cours de cette étude ont mis en évidence:

- ✚ Une corrélation inverse entre l'expression de la cavéoline-1 et celle du récepteur TGF β RI ainsi qu'entre l'expression de la cavéoline-1 et l'activation des protéines Smad2, ERK et AKt
- ✚ L'implication de plusieurs voies de signalisation (TGF β RI/Smad2, ERK-MAPK et PI3K-AKt) dans la régulation de l'expression de la sous-unité intégrine α 5 dans les cellules de glioblastome U87-MGshRNA_{cav1}
- ✚ Une interconnection de ces voies de signalisation (au niveau Smad2) dessinant alors une voie de régulation dépendante de TGF β RI (TGF β RI - PI3K-AKt - Smad2 - α 5) et une voie indépendante de TGF β RI (ERK-MAPK - AKt - Smad2 - α 5).

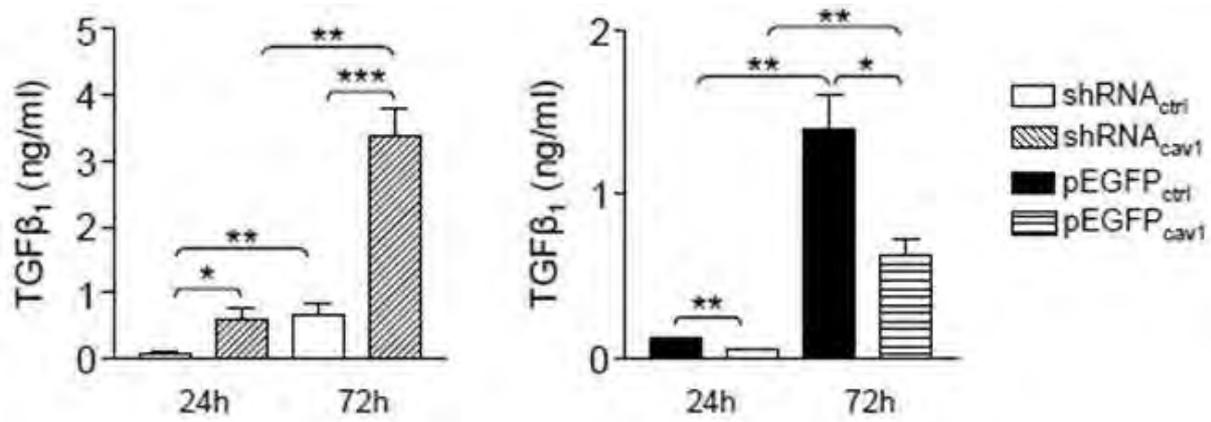


Figure59. Corrélation inverse entre la sécrétion du TGF-β1 et l'expression de la cavéoline-1. La mesure du TGF-β1 sécrété par les cellules de glioblastome a été réalisée par un test ELISA. Les valeurs de D.O sont rapportées à la concentration protéique. Les histogrammes représentent la moyenne de plusieurs expériences (n = 4) et correspondent à l'analyse par densitométrie ± SEM avec * p<0,05 ; ** p<0,01 et *** pour p<0,001.

III-5/ Une boucle de TGF- β 1 contrôle l'expression de l'intégrine α 5 β 1

III-5-1/ Sécrétion du TGF- β 1 par les cellules de glioblastome

Les travaux de Piek et ses collaborateurs avaient déjà identifié un grand nombre de lignées de glioblastome capables de sécréter du TGF- β 1 et du TGF- β 2 (Piek E, *Int. J. Cancer*, 1999 ; Olofsson A, *J. Biol. Chem.*, 1992 ; Constam DB, *J. Immunol.*, 1992). La lignée U87-MG sécrète également du TGF- β 1 à de faibles concentrations (de l'ordre de 150 pg/ml) (Hjelmeland MD, *Mol. Cancer Ther.*, 2004). Par ailleurs, l'équipe de Bruna avait également mis en évidence des taux élevés de TGF- β dans des échantillons de biopsies de patients atteints de glioblastome (Bruna A, *Cancer Cell*, 2007)

Compte tenu de l'activation de la voie TGF β R/Smad2 dans les cellules U87-MGshRNA_{cav1}, nous avons voulu savoir si ces cellules étaient capables de sécréter du TGF- β 1. L'analyse de la sécrétion de TGF- β 1 par les cellules U87-MGshRNA_{cav1} et les cellules U87-MGpEGFP_{cav1} a été réalisée par ELISA. La mesure de la concentration de TGF- β 1 sécrétée est effectuée après 24 et 72 heures de sécrétion. Les cellules sont placées dans un milieu EMEM déprivé en sérum (car ce dernier contient du TGF- β 1) puis le surnageant est activé (voir Matériels et Méthodes) et dosé.

L'analyse des résultats a révélé une forte sécrétion de TGF- β 1 par les cellules U87-MGshRNA_{cav1} par rapport à leurs contrôles (**Figure59**). En effet, les cellules U87-MGshRNA_{cav1} sécrètent environ 1ng/ml au bout de 24 heures et 3ng/ml après 72 heures alors que les cellules témoins, à 72 heures, ont une sécrétion 3 fois plus faible. En revanche, les cellules U87-MGpEGFP_{cav1} sécrètent peu de TGF- β 1 dans le milieu extracellulaire (**Figure59**). Après 72 heures, le taux de TGF- β 1 sécrété est de 0,5ng/ml environ dans ces cellules soit 2 fois moins que dans les cellules témoins.

Ces résultats mettent en évidence une corrélation inverse entre l'expression de la cavéoline-1 et le taux de sécrétion de TGF- β 1 dans les cellules de glioblastomes sur-exprimant (U87-MGpEGFP_{cav1}) et sous-exprimant (U87-MGshRNA_{cav1}) la cavéoline-1.

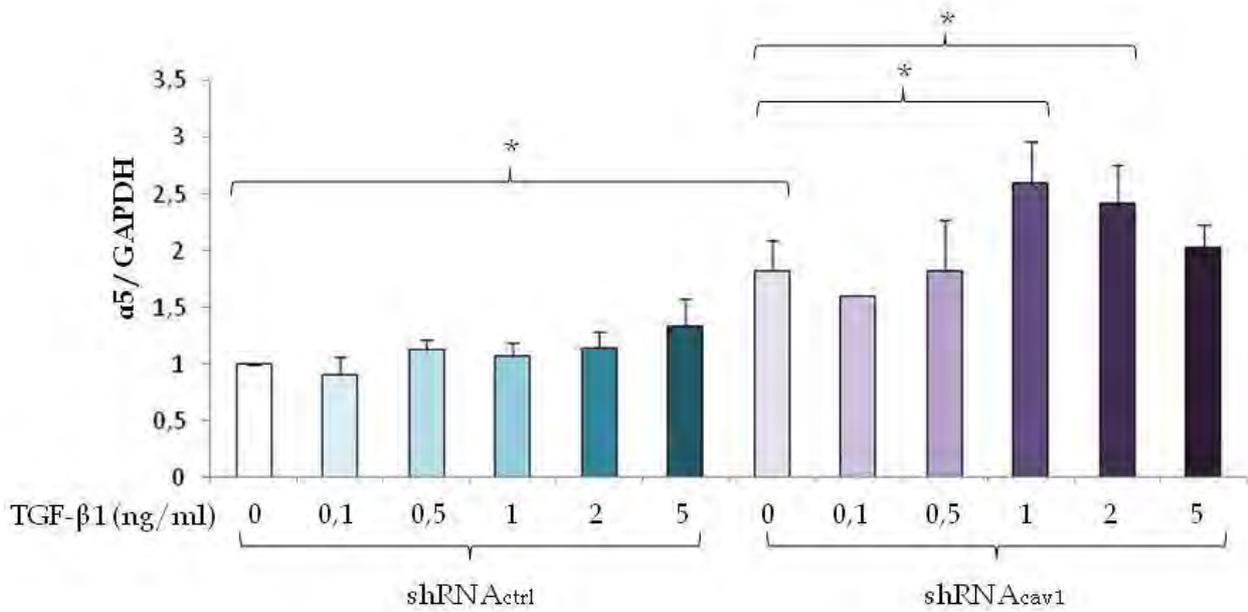


Figure60. L'expression de la sous-unité intégrine α_5 est induite par le TGF- β_1 dans les cellules U87-MGshRNA_{cav1}. Les cellules U87-MGshRNA_{ctrl} et U87-MGshRNA_{cav1} ont été traitées par des doses croissantes de TGF- β_1 (0,1 ; 0,5 ; 1 ; 2 et 5ng/ml). L'histogramme représente l'analyse par densitométrie réalisée à partir de la moyenne de plusieurs expériences indépendantes (n = 2-5) \pm SEM avec * p<0,05.

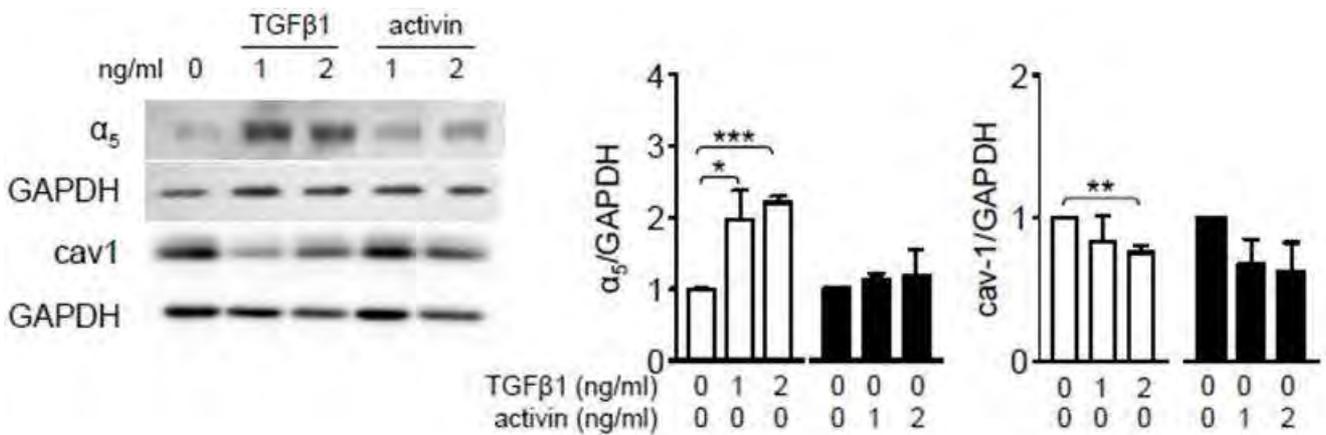


Figure61. Le TGF- β_1 , mais pas l'activine, induit l'expression de la sous-unité intégrine α_5 dans les cellules U87-MGshRNA_{cav1}. Les cellules U87-MGshRNA_{cav1} ont été traitées par différentes doses de TGF- β_1 et d'activine (1 et 2ng/ml) durant 24 heures. Les histogrammes représentent les analyses, par densitométrie, réalisées à partir de la moyenne de plusieurs expériences indépendantes (n = 2-5) \pm SEM avec * p<0,05 ; ** p<0,01 et *** p<0,001.

III-5-2/ Le TGF- β 1 induit l'expression de l'intégrine α 5 β 1

Les résultats obtenus ont révélé une sécrétion de TGF- β 1 par les cellules de glioblastome U87-MGshRNA_{cav1} et une activation de la voie TGF β R/Smad qui régule l'expression de la sous-unité intégrine α 5 dans ces cellules. L'ensemble de ces données nous a amené à formuler l'hypothèse selon laquelle le TGF- β 1, en activant, la voie TGF β R/Smad, régulerait l'expression de la sous-unité intégrine α 5. Afin de déterminer l'implication du TGF- β 1 dans l'induction de l'expression de la sous-unité intégrine α 5, nous avons traité, durant 24 heures, des cellules U87-MGshRNA_{cav1} et U87-MGshRNA_{ctrl} avec différentes concentrations de TGF- β 1 allant de 1ng/ml (quantité de TGF- β 1 retrouvée après 24 heures de sécrétion) à 5ng/ml. L'analyse de l'expression de la sous-unité intégrine α 5 a ensuite été réalisée par WB.

L'analyse de l'expression de la sous-unité intégrine α 5 après traitement par le TGF- β 1 a mis en évidence une induction significative de l'expression de l'intégrine dans les cellules U87-MGshRNA_{cav1} traitées par 1ng/ml de TGF- β 1 par rapport aux mêmes cellules non traitées ($1,58 \pm 0,17$ fois d'augmentation) ou par rapport aux cellules contrôles ($2,59 \pm 0,37$ fois d'augmentation) (**Figure60**). L'expression de l'intégrine est également induite à 2 et 5ng/ml de TGF- β 1 dans ces cellules ($1,46 \pm 0,13$ et $1,3 \pm 0,08$ fois augmentée par rapport aux cellules U87-MGshRNA_{cav1} non traitées) alors que son expression n'est pas modulée dans les cellules contrôles, quelle que soit la concentration de TGF- β 1. L'induction de l'expression de la sous-unité intégrine α 5 dans les cellules U87-MGshRNA_{cav1} par le TGF- β 1 n'est toutefois pas modulée entre 1 et 5 ng/ml indiquant qu'on atteint un plateau.

Nous avons ensuite voulu comparer les effets du TGF- β 1 à 1 et 2ng/ml par rapport à l'activine en utilisant le SB-431542 qui est capable d'inhiber d'autres récepteurs de la famille TGF β R tels que le récepteur ALK-4 (*activin receptor-like kinase*).

Nos résultats mettent en évidence une sur-expression de l'intégrine de l'ordre de deux fois dans les cellules U87-MGshRNA_{cav1} (**Figure61**). A la dose de 2ng/ml, une diminution significative de l'expression de la cavéoline-1 est observée.

En revanche, aucune modulation de l'expression de la sous-unité intégrine $\alpha 5$ dans les cellules U87-MGshRNA_{cav1} n'a pu être observée avec l'activine à 1 ou 2 ng/ml.

Conclusions:

Les résultats obtenus au cours de cette étude ont montré:

- ✚ Une sécrétion accrue de TGF- $\beta 1$ par les cellules de glioblastome les plus agressives, les U87-MGshRNA_{cav1}
- ✚ La régulation de l'expression de la sous-unité intégrine $\alpha 5$ par le TGF- $\beta 1$
- ✚ Une corrélation inverse entre l'expression de la cavéoline-1 et le taux de TGF- $\beta 1$ sécrété par les cellules de glioblastome

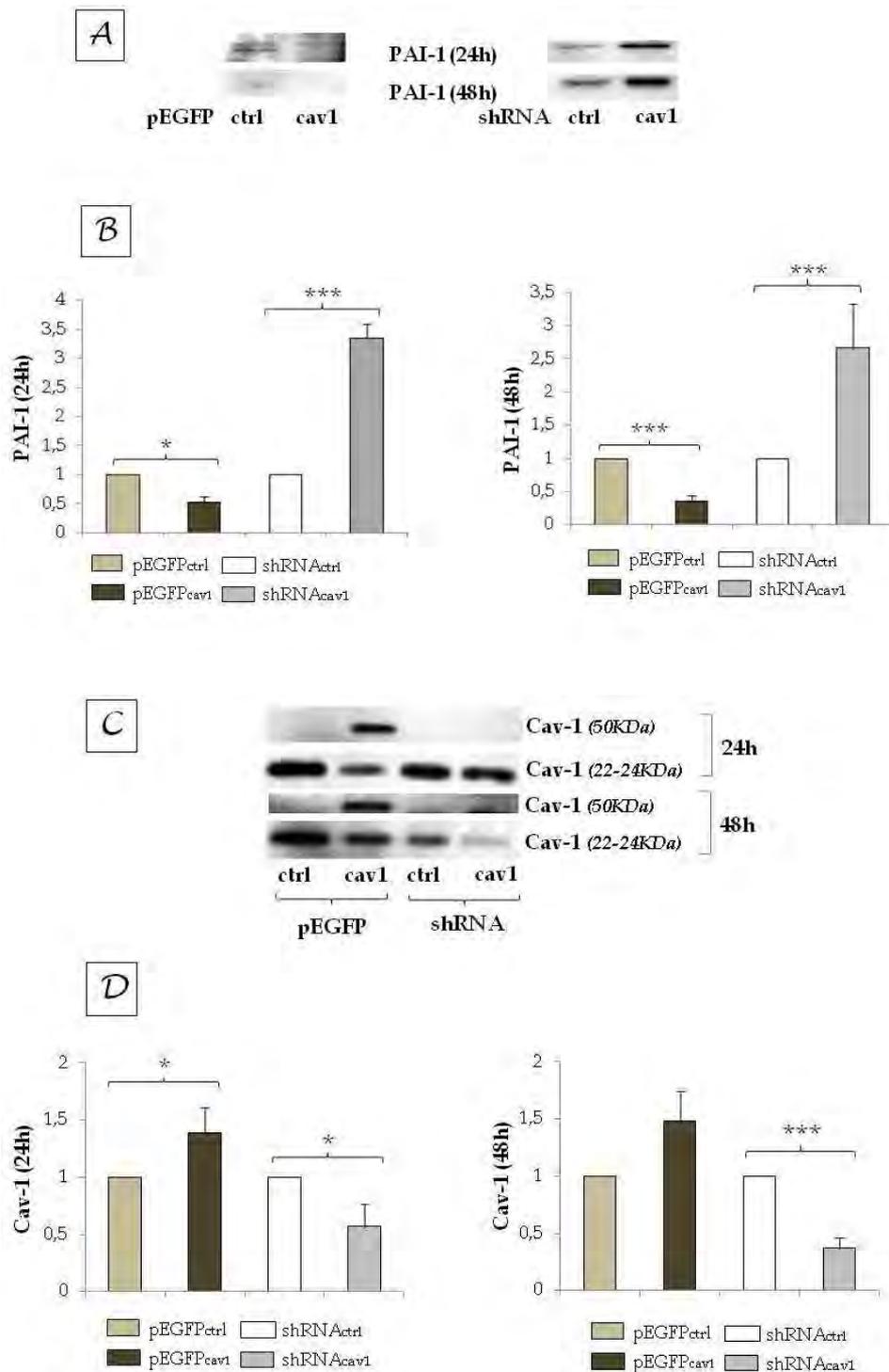


Figure62. L'expression de la protéine PAI-1 est inversement corrélée à celle de la cavéoline-1 sécrétée. Les protéines PAI-1 et cavéoline-1 ont été détectées par WB dans les surnageants des cellules U87-MGshRNA_{cav1}, U87-MGsiRNA_{ctrl}, U87-MGpEGFP_{cav1} et U87-MGpEGFP_{ctrl} à 24 et 48 heures. Les histogrammes représentent l'analyse par densitométrie de différentes expériences indépendantes (n = 4-7) ± SEM avec * p<0,05 et *** p<0,001.

III-6/ Régulation de l'expression de PAI-1 par la cavéoline-1

III-6-1/ L'expression de PAI-1 est inversement corrélée à celle de la cavéoline-1

PAI-1 (*Plasminogen Activator Inhibitor 1*) est le principal inhibiteur des activateurs du plasminogène tPA (*Tissu Plasminogen Activator*) et uPA (*urokinase*). Dans les gliomes, une forte expression de PAI-1 est associée à un facteur de mauvais pronostic (Muracciole X, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2002). De plus, sa localisation à la périphérie invasive de la tumeur en fait un excellent candidat pour l'étude de l'invasion tumorale (Sandström M, *Int. J. Dev. Neurosci.*, 1999). PAI-1 est une protéine sécrétée par les cellules cancéreuses dont l'expression est régulée via la voie de signalisation $TGFR\beta$ /Smad. Compte tenu des résultats obtenus sur la régulation de l'intégrine par la cavéoline-1 et par le TGF- β 1, nous avons également souhaité déterminer comment la cavéoline-1 régulait l'expression de PAI-1 dans les cellules de glioblastome. L'étude de son expression par les cellules U87-MGsh/siRNA_{cav1} et U87-MGsiRNA_{ctrl} et par les cellules U87-MGpEGFP_{cav1} et U87-MGpEGFP_{ctrl} a donc été réalisée dans les surnageants cellulaires de ces différents modèles.

Nos résultats avaient déjà montré une corrélation inverse entre l'expression de PAI-1 et celle de la cavéoline-1 dans les cellules U87-MGsiRNA_{cav1} par rapport à leurs contrôles. Dans les cellules U87-MGshRNA_{cav1}, l'inhibition de la cavéoline-1 a également induit la sur-expression de PAI-1 ($3,35 \pm 0,24$ fois augmentée) par rapport aux cellules contrôles après une sécrétion de 24h (**Figure62AB**). Des résultats similaires ont été retrouvés après 48h de sécrétion. Au contraire, la sur-expression de la cavéoline-1 dans les cellules U87-MGpEGFP_{cav1} a induit une diminution significative de l'expression de PAI-1 ($0,52 \pm 0,09$ fois augmentée) comparativement aux cellules contrôles après 24h de sécrétion (**Figure62AB**). De même, l'expression de PAI-1 est diminuée dans ces cellules après 48h de sécrétion ($0,35 \pm 0,09$ fois) par rapport à leurs contrôles. L'analyse de l'expression de PAI-1 au niveau de son ARN avait donné le même type de résultat avec une corrélation inverse entre l'expression de la cavéoline-1 et celle de PAI-1 (**Figure38**).

Les résultats obtenus au cours de ces analyses montrent pour la première fois, une régulation de l'expression de PAI-1 par la cavéoline-1.

Par ailleurs, différentes études avaient mis en évidence que la cavéoline-1 était également une protéine sécrétée (Tahir SA, *Cancer Res.*, 2001).

L'étude de la sécrétion de la cavéoline-1 a donc également été réalisée sur des surnageants cellulaires à 24h et 48h de sécrétion. L'analyse de ces surnageants a révélé la présence de la cavéoline-1 endogène et de la cavéoline-1-GFP dans les cellules U87-MGpEGFP_{cav1} (Figure62CD).

L'analyse des résultats met en évidence une sécrétion de la cavéoline-1 significativement plus importante dans les cellules U87-MGpEGFP_{cav1} par rapport aux cellules U87-MGpEGFP_{ctrl}. La sécrétion de cavéoline-1 par les cellules la sous-exprimant diminue à 24 et 48 heures de manière significative par rapport à leurs contrôles (Figure62CD). La corrélation inverse mise en évidence entre l'expression de PAI-1 et l'expression de la cavéoline-1 est donc valable pour la cavéoline-1 sécrétée comme pour la cavéoline-1 intracellulaire.

Les résultats obtenus sur la modulation de PAI-1 par la cavéoline-1 nous ont conduits à évaluer le rôle joué par les voies de signalisation TGF β R/Smad, ERK-MAPK et PI3K-Akt dans la régulation de l'expression de PAI-1.

III-6-2/ Les voies ERK-MAPK et TGF β R/Smad2 contrôlent l'expression de PAI-1 dans les cellules de glioblastome

De nombreuses études ont mis en évidence la régulation de l'expression de PAI-1 par la voie TGF β R/Smad (Piek E, *Int. J. Cancer*, 1999 ; Samarakoon R, *Thromb Haemost.*, 2008 ; Kutz SM, *Exp. Cell Res.*, 2008). Nous avons donc procédé à l'étude de l'implication de cette voie dans l'expression de PAI-1 dans les cellules de glioblastome. La voie ERK-MAPK a aussi été étudiée compte tenu de son activation dans les cellules de glioblastome mais aussi parce qu'elle est impliquée dans la régulation de l'expression de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ dans ces cellules.

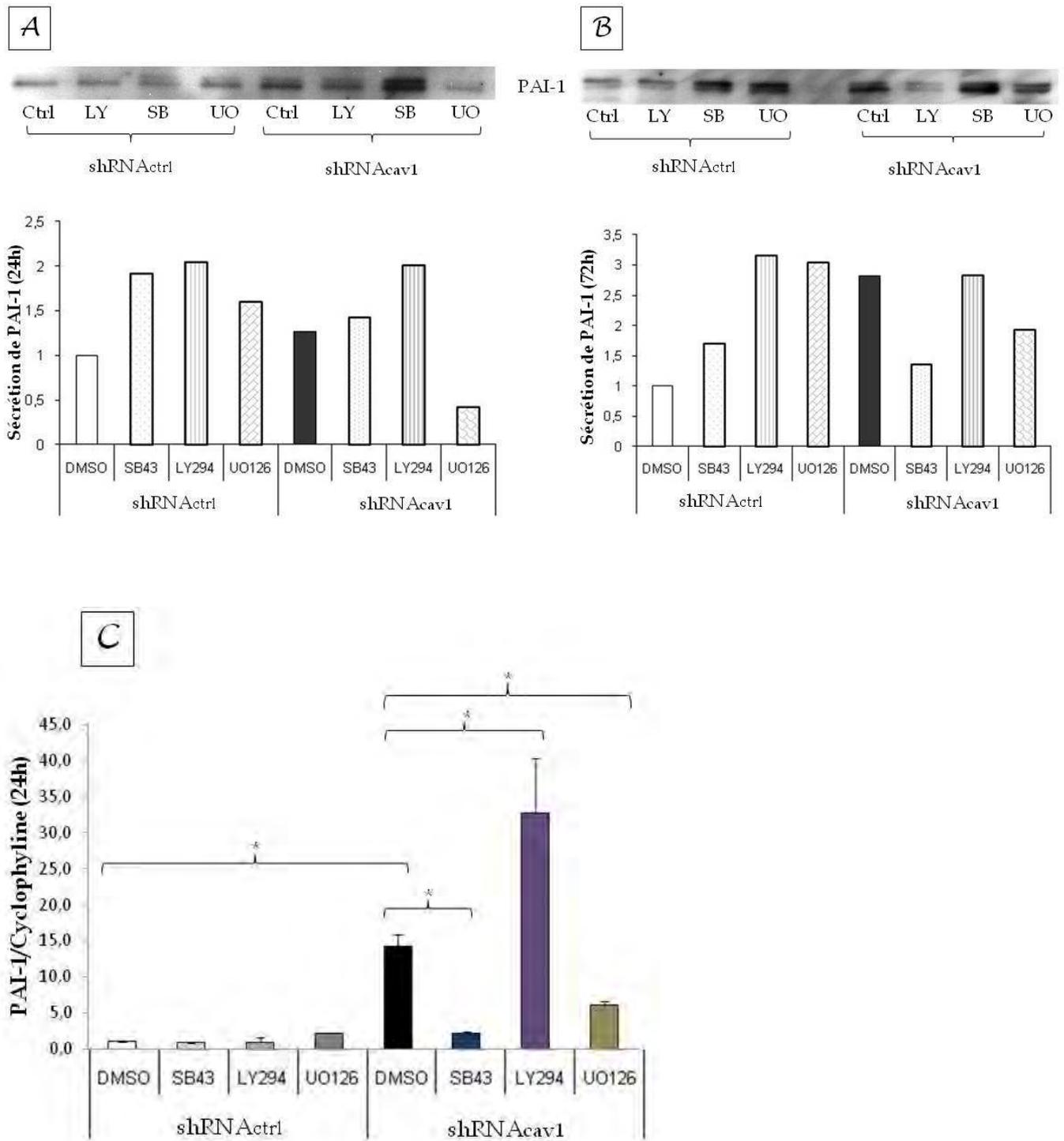


Figure63. Modulation de l'expression de PAI-1 par les voies TGF β RI/Smad2, ERK-MAPK et PI3K-Akt. PAI-1 est détectée dans le surnageant des cellules U87-MGshRNA_{cav1} et U87-MGshRNA_{ctrl} après un traitement par 10 μ M de SB-431542, de LY294002 ou de UO126 durant 24 (A) ou 48 (B) heures (n = 1). L'analyse de l'expression de l'ARNm de PAI-1 a été réalisée par RT-PCR quantitative (C) et l'histogramme représente l'analyse de différentes expériences indépendantes (n = 3) \pm SEM avec * p<0,05.

De plus, Hamaguchi et son équipe ont montré l'implication de la voie ERK-MAPK dans la régulation de l'expression de PAI-1 induite par le TNF- α dans les cellules endothéliales HUVEC (Hamaguchi E, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2003). L'étude de l'implication des voies ERK-MAPK et TGF β R/Smad a été réalisée en utilisant des inhibiteurs de MEK1 et du récepteur TGF β RI, le UO126 et le SB-431542 respectivement. L'analyse de l'expression de PAI-1 a été réalisée par RT-PCR quantitative au terme d'un traitement de 24 heures avec les différents inhibiteurs.

Les résultats ont mis en évidence le rôle de la voie TGF β R/Smad dans la régulation de l'expression de PAI-1 par la cavéoline-1 mais aussi de la voie ERK-MAPK (**Figure63**). L'analyse de la sécrétion de PAI-1, au niveau protéique, ne semble révéler une diminution de son expression qu'après bout de 72 heures de traitement par le SB-431542 (n=1) (**Figure63**). En revanche, l'inhibition de la sécrétion de PAI-1 par le UO126 semble être obtenue dès 24 heures de traitement (n=1). Cependant, ces résultats sont à prendre avec précaution puisqu'ils ne représentent qu'une expérience. Toutefois, au niveau des transcrits, une inhibition significative de l'expression de PAI-1 est observée dans les cellules U87-MGshRNA_{cav1} par rapport aux cellules U87-MGshRNA_{cav1} non traitées ($0,2 \pm 0,009$ et 1 ± 0 respectivement) après un traitement de 24 heures par le SB-431542 (**Figure63C**). L'inhibition de l'expression de PAI-1 par le UO126, bien que moins importante, est observée dans les cellules U87-MGshRNA_{cav1} par rapport aux cellules U87-MGshRNA_{cav1} non traitées ($0,4 \pm 0,02$ et 1 ± 0 respectivement) (**Figure63C**).

III-6-3/ La voie PI3K-Akt inhibe l'expression de PAI-1

A l'inverse des voies ERK-MAPK et TGF β RI/Smad connues pour réguler positivement l'expression de PAI-1, la voie PI3K-Akt agirait comme un régulateur négatif de l'expression et de la sécrétion de cette protéine (Whiley BR, *Gyn. Oncol.*, 2007). Comme pour les voies de signalisation ERK-MAPK et TGF β R/Smad, l'étude de l'implication de la voie PI3K-Akt dans la régulation de l'expression de PAI-1 par la cavéoline-1 a été réalisée en utilisant un inhibiteur de la PI3K, le LY294002.

Contrairement aux autres inhibiteurs, le LY294002 induit une augmentation significative de l'expression de PAI-1 dans les cellules U87-MGshRNA_{cav1} (**Figure63**).

Au niveau protéique, une augmentation de la sécrétion de PAI-1 est observée après 24 heures dans ces cellules mais elle est moins claire à 72 heures de traitement (n=1) (**Figure63A**). Au niveau des transcrits, le LY24002 provoque une augmentation de l'expression de PAI-1 dans les cellules U87-MGshRNA_{cav1} par rapport aux cellules U87-MGshRNA_{cav1} non traitées ($2,2 \pm 0,13$ et 1 ± 0 respectivement).

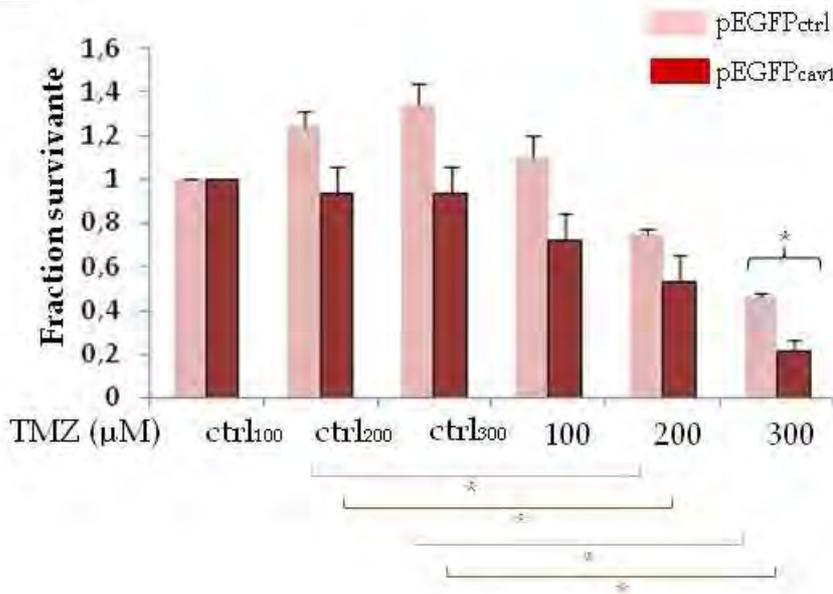
La voie PI3K-Akt exercerait un contrôle négatif sur l'expression de PAI-1 dans les cellules de glioblastome U87-MGshRNA_{cav1}.

Conclusions:

Les résultats obtenus au cours de cette étude ont mis en évidence:

- ✚ Une corrélation inverse entre l'expression de la cavéoline-1 et l'expression de PAI-1 (autant au niveau de la cavéoline-1 sécrétée que de la cavéoline-1 intra-cellulaire)
- ✚ La régulation de l'expression de PAI-1 par la voie TGF β R/Smad et ERK-MAPK et son inhibition par la voie PI3K-Akt
- ✚ La différence de régulation de l'expression de la sous-unité intégrine $\alpha 5$ et de celle de la protéine PAI-1 par la cavéoline-1

A



B

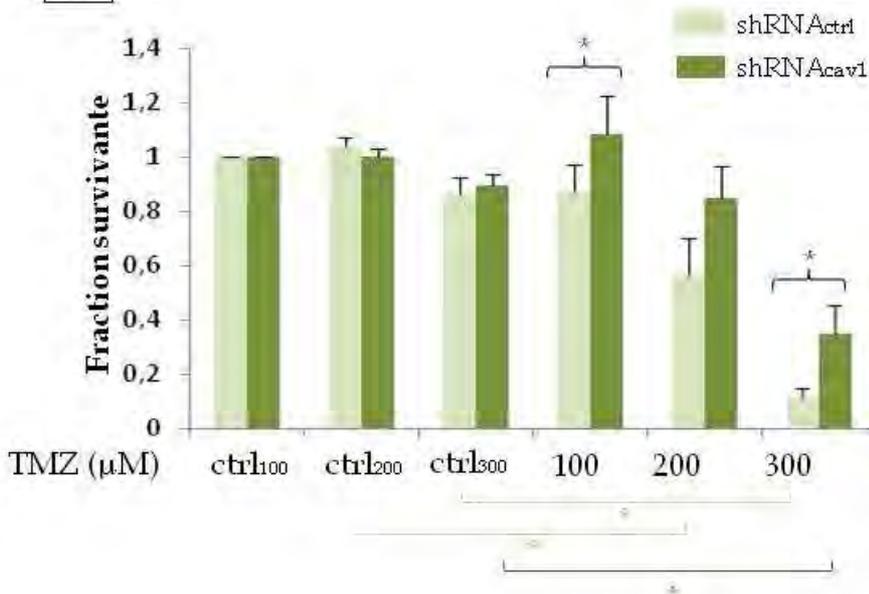


Figure64. Le TMZ affecte moins la clonogénicité des cellules de glioblastome sous-exprimant l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. La clonogénicité des cellules U87-MG shRNA_{cav1}, shRNA_{ctrl}, pEGFP_{cav1} et pEGFP_{ctrl} est évaluée avec différentes doses de TMZ (100, 200 et 300µM) et de solvant (Ethanol/Eau). Les histogrammes représentent la moyenne de différentes expériences indépendantes (n = 7-9) \pm SEM et correspond à la fraction des cellules ayant survécu (fraction survivante). Avec * pour p<0,05.

IV/ Chimiorésistance des cellules de glioblastome au témozolomide (TMZ)

IV-1/ Effet du TMZ sur la clonogénicité des cellules de glioblastomes

La résistance des cellules tumorales au traitement est également un critère permettant d'évaluer l'agressivité tumorale. Le traitement de première intention des glioblastomes étant le TMZ, nous avons souhaité évaluer la chimiosensibilité au TMZ des cellules U87-MGshRNA_{cav1} et les cellules U87-MGpEGFP_{cav1}. L'évaluation de la clonogénicité des cellules a été réalisée en les traitant avec des doses croissantes de TMZ (100, 200 et 300 μ M) durant 72 heures ; la croissance des colonies est favorisée durant 7 jours par un milieu riche (EMEM + 10% SVF).

L'analyse de la clonogénicité des cellules sur-exprimant la cavéoline-1 (U87-MGpEGFP_{cav1}) a mis en évidence une chimiosensibilité de ces cellules par rapport à leurs contrôles (**Figure64A**). En effet, les cellules U87-MGpEGFP_{cav1} forment moins de clones que les cellules témoins en présence de TMZ avec une inhibition significative de leur clonogénicité ($0,21 \pm 0,05$ et $0,46 \pm 0,01$ fois respectivement) à la dose de 300 μ M. Au contraire, les cellules U87-MGshRNA_{cav1} ont montré une chimiorésistance au traitement par le TMZ par rapport à leur contrôles (**Figure64B**). A la dose de 300 μ M, la clonogénicité des cellules contrôles U87-MGshRNA_{ctrl} diminue par rapport aux cellules U87-MGshRNA_{cav1} ($0,11 \pm 0,03$ et $0,34 \pm 0,10$ fois respectivement).

L'analyse des résultats a révélé une chimiorésistance des cellules U87-MGsiRNA_{cav1} au TMZ. Les cellules U87-MGsiRNA_{cav1} sont par conséquent les cellules les plus agressives mais aussi les plus résistantes aux traitements conventionnels.

IV-2/ Effet de l'ellipticine sur la clonogénicité des cellules de glioblastome

La résistance des cellules U87-MGshRNA_{cav1} et des cellules U87-MGpEGFP_{cav1} à un autre agent cytotoxique, l'ellipticine, a également été déterminée. L'ellipticine est un intercalant de l'ADN et un inhibiteur de la topoisomérase II dont la toxicité évaluée *in vivo* s'est avérée trop importante. Nous avons testé la chimiosensibilité des cellules à l'ellipticine (que nous avons ici utilisée comme un simple agent cytotoxique).

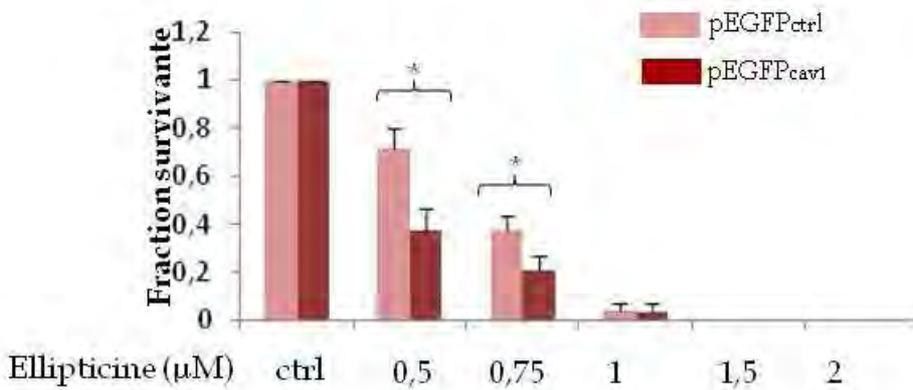
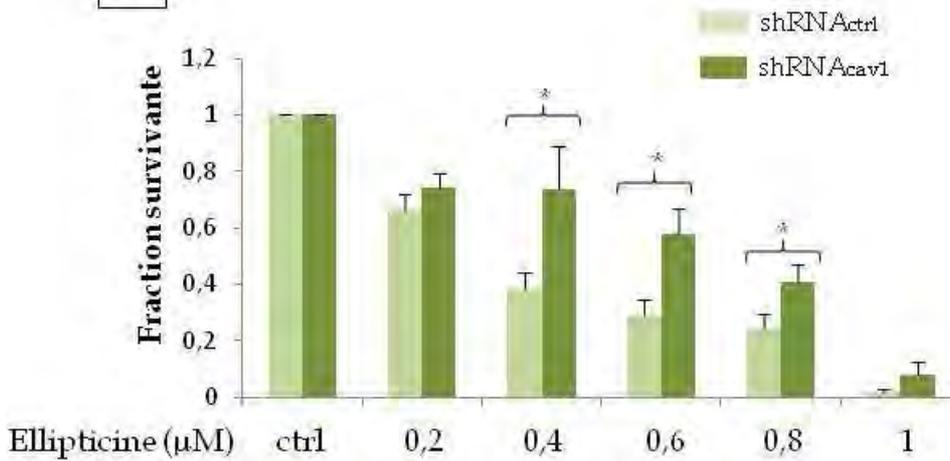
A**B**

Figure65. L'ellipticine affecte moins la clonogénicité des cellules de glioblastome sous-exprimant l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. La clonogénicité des cellules U87-MG shRNA_{cav1}, shRNA_{ctrl}, pEGFP_{cav1} et pEGFP_{ctrl} est évaluée avec différentes doses d'ellipticine (0,2 ; 0,4 ; 0,5 ; 0,6 ; 0,75 ; 0,8 ; 1 ; 1,5 et 2 μ M) et de solvant (DMSO). Les histogrammes représentent la moyenne de différentes expériences indépendantes (n = 6) \pm SEM et correspond à la fraction des cellules ayant survécu (fraction survivante). Avec * pour p<0,05.

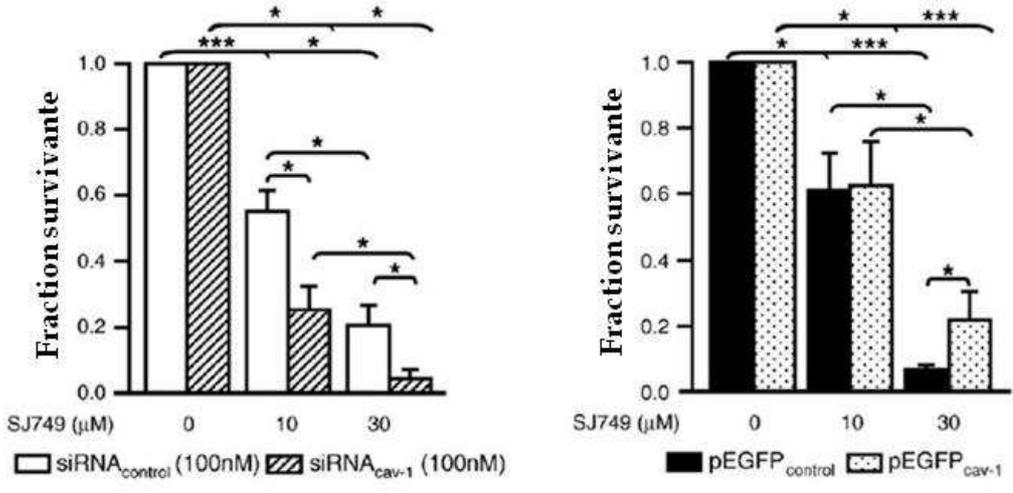
La clonogénicité des cellules a tout d'abord été évaluée sur les cellules U87-MGpEGFP_{cav1} (les plus chimiosensibles) avec différentes doses d'ellipticine (0,5 ; 0,75 ; 1 ; 1,5 et 2 μ M). Les résultats obtenus ont révélé une forte toxicité de l'ellipticine avec une absence de colonies pour les doses les plus fortes (1,5 et 2 μ M). L'inhibition significative de la clonogénicité est réalisée de manière dose dépendante pour les cellules U87-MGpEGFP_{cav1} et les cellules témoins U87-MGpEGFP_{ctrl} ($0,37 \pm 0,09$ et $0,71 \pm 0,08$ respectivement à 0,5 μ M et $0,20 \pm 0,065$ et $0,37 \pm 0,06$ respectivement à 0,75 μ M) (**Figure65A**). Comme dans le cas du traitement par le TMZ, les cellules U87-MGpEGFP_{cav1} ont montré une plus forte sensibilité à l'ellipticine par rapport à leurs témoins avec une diminution significative de leur clonogénicité (**Figure65A**).

L'étude de la sensibilité des cellules U87-MGshRNA_{cav1} à l'ellipticine a été réalisée dans une gamme différente compte tenu de la toxicité de l'ellipticine (0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 et 1 μ M). Les résultats obtenus rejoignent les données obtenus au cours de l'étude de la clonogénicité des cellules de glioblastome en présence de TMZ. En effet, les cellules U87-MGshRNA_{cav1} qui avaient déjà montré une chimiorésistance au TMZ sont également plus résistantes à l'ellipticine par rapport à leurs contrôles (**Figure65B**). L'inhibition de la clonogénicité des cellules U87-MGshRNA_{cav1} et U87-MGshRNA_{ctrl} est également dose dépendante ($0,73 \pm 0,0047$ et $0,38 \pm 0,05$ respectivement à 0,4 μ M et $0,58 \pm 0,008$ et $0,28 \pm 0,05$ respectivement à 0,6 μ M et $0,40 \pm 0,05$ et $0,24 \pm 0,04$ respectivement à 0,8 μ M) (**Figure65B**).

IV-3/ L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et le récepteur TGF β RI en tant que cible thérapeutique

Les résultats obtenus au cours de cette étude ont mis en évidence que l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ était le médiateur de l'agressivité des cellules de glioblastome. De plus, la voie TGF β R/Smad joue un rôle central dans la régulation de l'expression de cette intégrine dans ces cellules. Nous avons donc souhaité tester le potentiel thérapeutique des antagonistes de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et d'un inhibiteur de l'activité du récepteur TGF β RI.

A



B

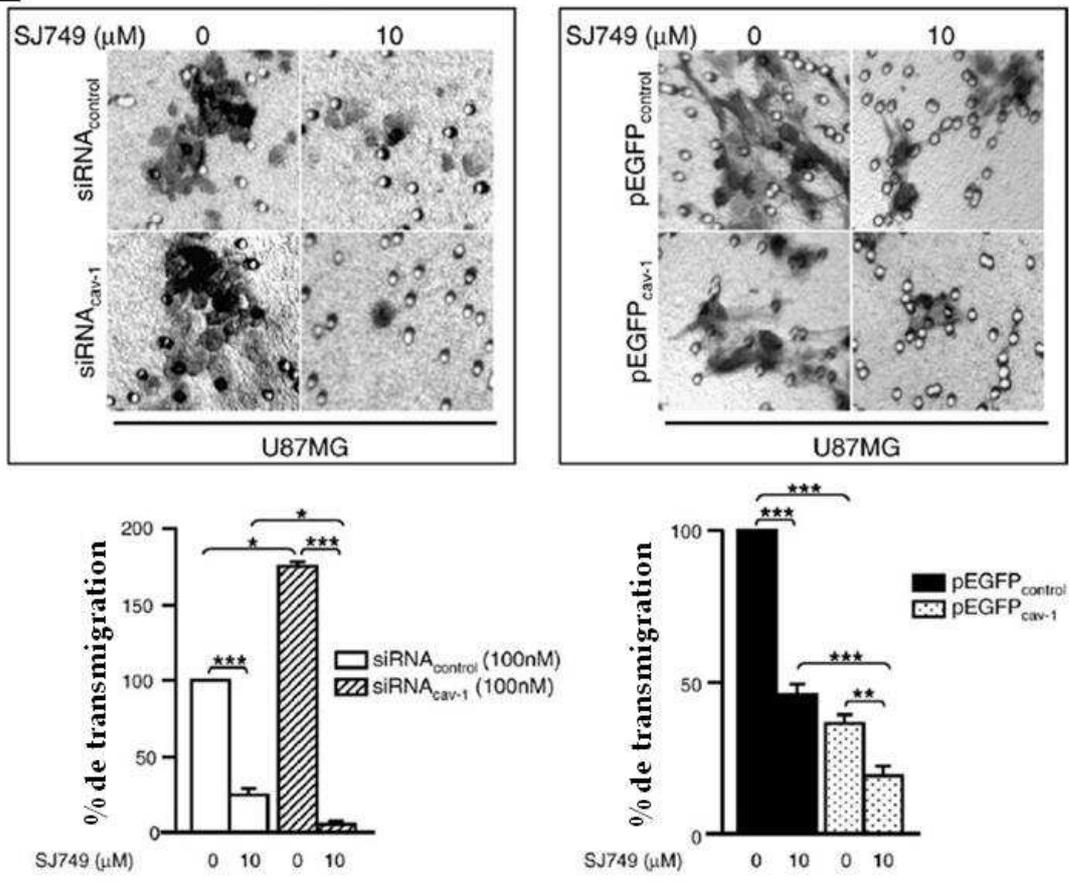


Figure66. Le SJ749 affecte beaucoup plus la clonogénicité et la trans-migration à travers la FN des cellules de glioblastome sur-exprimant l'intégrine α5β1. Les histogrammes représentent la moyenne de différentes expériences indépendantes (n = 3-5) ± SEM et correspondent (A) à la fraction des cellules ayant survécu (fraction survivante) ou (B) aux cellules ayant trans-migré. Avec * p<0,05 ; ** p<0,01 et *** p<0,001.

IV-3-1/ Inhibition de la clonogénicité et de la trans-migration des cellules de glioblastome par le SJ749

Le SJ749 est le premier antagoniste spécifique de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ ayant été décrit. Nous avons donc testé la capacité de cette molécule à inhiber la clonogénicité et la trans-migration des cellules de glioblastome.

L'analyse de la clonogénicité des cellules U87-MGsiRNA_{cav1} et U87-MGpEGFP_{cav1} a révélé que le SJ749 induisait une diminution dose dépendante de la clonogénicité de ces cellules (**Figure66A**). Toutefois, la clonogénicité des cellules U87-MGsiRNA_{cav1} est beaucoup plus affectée que son témoin ($45 \pm 7\%$ et $75 \pm 7\%$ respectivement à $10\mu\text{M}$; $80 \pm 6\%$ et $96 \pm 3\%$ à $30\mu\text{M}$), U87-MGshRNA_{ctrl}, mais aussi que les cellules U87-MGpEGFP_{cav1} (**Figure66A**). La clonogénicité de ces dernières diminue de $37 \pm 13\%$ à $10\mu\text{M}$ (versus $39 \pm 11\%$ pour les U87-MGpEGFP_{ctrl}) et de $78 \pm 9\%$ à $30\mu\text{M}$ (versus $93 \pm 1\%$ pour les U87-MGpEGFP_{ctrl}). L'analyse de la trans-migration cellulaire montre le même profil de résultats car la capacité à trans-migrer des cellules de glioblastome est affectée par le SJ749 (à $10\mu\text{M}$) et les cellules U87-MGsiRNA_{cav1} sont les plus affectées (**Figure66B**).

Ces résultats indiquent que les cellules de glioblastome sur-exprimant l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, les cellules U87-MGsiRNA_{cav1}, qui sont les plus agressives, sont les plus sensibles au SJ749 qui affecte leur capacité clonogénique et leur migration.

IV-3-2/ Inhibition de la clonogénicité des cellules de glioblastome par un nouvel antagoniste de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, le K34c

Grâce à une collaboration avec D. Bonnet (UMR7200 CNRS, Strasbourg) qui a synthétisé la molécule, nous avons pu tester l'effet d'un nouvel antagoniste de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, le K34c, sur la clonogénicité des cellules U87-MGshRNA_{cav1}. Cette expérience a été réalisée avec deux doses de K34c (10 et $30\mu\text{M}$).

Les résultats ont révélé une inhibition significative et dose dépendante de la clonogénicité des cellules U87-MGshRNA_{cav1}. La clonogénicité des cellules U87-MGshRNA_{cav1} était de $0,82 \pm 0,07$ fois à $10\mu\text{M}$ (versus $1,2 \pm 0,14$ pour les U87-MGshRNA_{ctrl}) et à $30\mu\text{M}$ elle était de $0,63 \pm 0,16$ fois (versus $1,07 \pm 0,12$ pour les U87-MGshRNA_{ctrl}) (**Figure67A**).

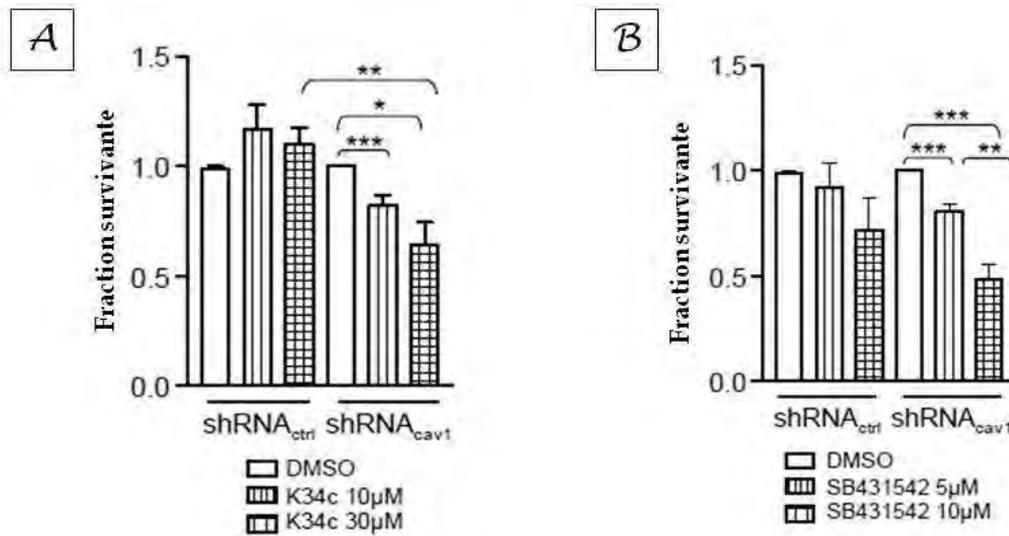


Figure67. La clonogénicité des cellules de glioblastome sous-exprimant la cavéoline-1 est affectée par le K34c, antagoniste sélectif de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et par un inhibiteur de TGF β RI, le SB-431542. La clonogénicité des cellules est évaluée avec différentes doses (A) de K34c (10 et 30 μ M), (B) de SB-431542 et de solvant (DMSO). Les histogrammes représentent la moyenne de différentes expériences indépendantes (n = 5-8) \pm SEM et correspondent à la fraction des cellules ayant survécu (fraction survivante). Avec * p<0,05 ; ** p<0,01 et *** p<0,001.

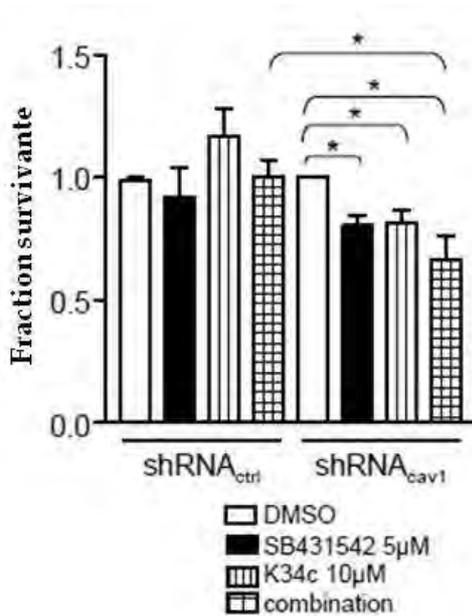


Figure68. La clonogénicité des cellules de glioblastome sous-exprimant la cavéoline-1 est affectée par le co-traitement par K34c et SB-431542. La clonogénicité des cellules est évaluée avec une dose de 10 μ M pour le K34c et de 5 μ M pour le SB-431542 et de solvant (DMSO). L'histogramme représente la moyenne de différentes expériences indépendantes (n = 5-8) \pm SEM et correspond la fraction des cellules ayant survécu (fraction survivante). Avec * p<0,05 ; ** p<0,01 et *** p<0,001.

Ces résultats confirment ceux obtenus avec le SJ749 puisque nous avons montré que les cellules sur-exprimant l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, U87-MGshRNA_{cav1}, sont aussi les plus sensibles à un antagoniste de cette intégrine.

IV-3-3/ Inhibition de la clonogénicité des cellules de glioblastome par un inhibiteur du récepteur TGF β RI

Le SB-431542 est un inhibiteur des récepteurs du TGF β qui induit la diminution de l'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans les cellules U87-MGshRNA_{cav1} ainsi qu'une diminution de la phosphorylation de Smad2 et d'AKt. L'étude des effets du SB-431542 sur la clonogénicité des cellules U87-MGshRNA_{cav1} et de leurs contrôles U87-MGshRNA_{ctrl} a été réalisée avec deux doses d'inhibiteur (5 et 10 μ M).

L'analyse des résultats a mis en évidence une inhibition dose dépendante de la clonogénicité des cellules U87-MGshRNA_{cav1} (qui sur-expriment le récepteur TGF β RI) (**Figure67B**). L'inhibition de la clonogénicité de ces cellules est d'environ 50% à la dose de 10 μ M de SB-431542 alors que la clonogénicité des cellules contrôles n'est pas diminuée de manière significative (quoiqu'une tendance à la baisse ait pu être observée).

L'ensemble de ces résultats indiquent que les cellules de glioblastome U87-MGshRNA_{cav1} (les plus agressives et les plus résistantes au TMZ) sont les plus sensibles à l'inhibition de l'activité du récepteur TGF β RI.

IV-3-4/ Inhibition de la clonogénicité des cellules de glioblastome par le co-traitement SB-431542 et K34c

Compte tenu des résultats obtenus avec l'inhibiteur de TGF β RI et l'antagoniste de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, nous avons souhaité évaluer la clonogénicité des cellules en réponse au co-traitement SB-431542 et K34c (à 5 et 10 μ M respectivement). Les cellules ont été traitées simultanément par les deux agents durant 72 heures puis la reprise de croissance s'est effectuée dans un milieu riche (EMEM + 10% SVF).

De manière similaires aux résultats obtenus par l'usage de chacune des molécules séparément, la clonogénicité des cellules témoins n'est pas affectée ($1,05 \pm 0,07$) par le co-traitement SB-431542 et K34c à 5 et 10 μ M respectivement (**Figure68**).

Au contraire, la clonogénicité des cellules U87-MGshRNA_{cav1} est diminuée par le co-traitement SB-431542 et K34c ($0,66 \pm 0,09$).

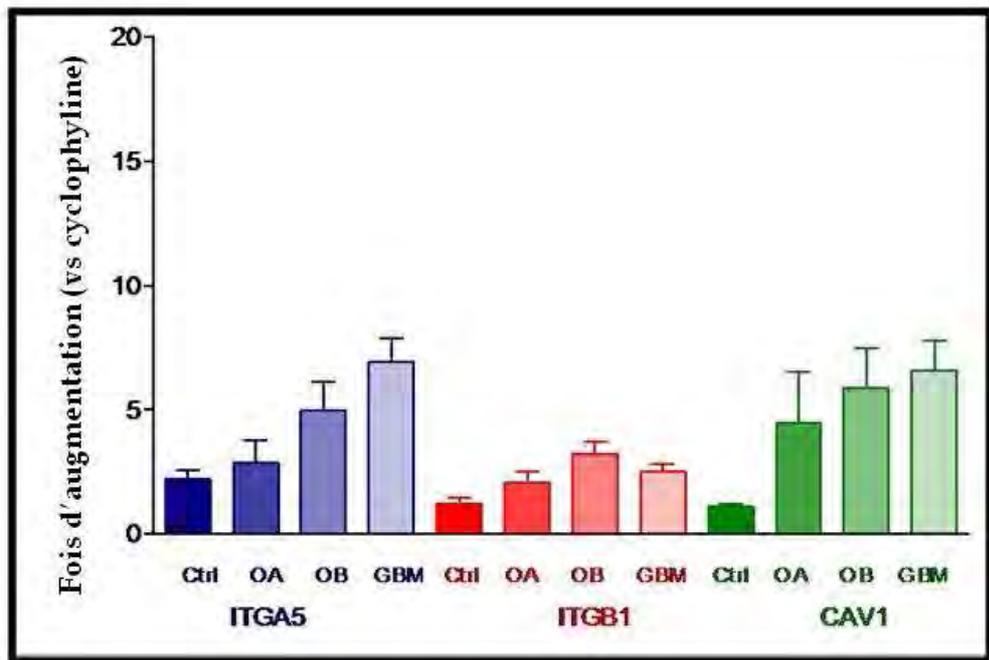
Néanmoins, bien que la clonogénicité des cellules U87-MGshRNA_{cav1} diminue en réponse au co-traitement, la diminution n'est pas significativement différente de celle observée avec chacune des molécules utilisée séparément : nous n'avons donc pas observé d'effet additif ou synergique des deux agents sur l'inhibition de la clonogénicité des cellules U87-MGshRNA_{cav1} (**Figure68**).

Conclusions:

Les résultats obtenus au cours de cette étude ont montré:

- ✚ Une chimiorésistance des cellules U87-MGsiRNA_{cav1} et U87-MGshRNA_{cav1} (les plus agressives) au TMZ ou à l'ellipticine
- ✚ Une chimiosensibilité au TMZ et à l'ellipticine des cellules U87-MGpEGFP_{cav1}
- ✚ Pour autant les cellules de glioblastome sous-exprimant la cavéoline-1, les plus résistantes, sont les plus affectées par un traitement au SJ749, au K34c (antagonistes de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$) et au SB-431542 (inhibiteur de TGF β RI)
- ✚ L'antagoniste K34c de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et l'inhibiteur de TGF β RI n'ont pas d'effet, aux doses testées, sur la clonogénicité de cellules ne sur-exprimant pas l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et le récepteur TGF β RI
- ✚ Le co-traitement SB-431542 et K34c n'a pas d'effet additif sur l'inhibition de la clonogénicité des cellules U87-MGshRNA_{cav1}

A



B

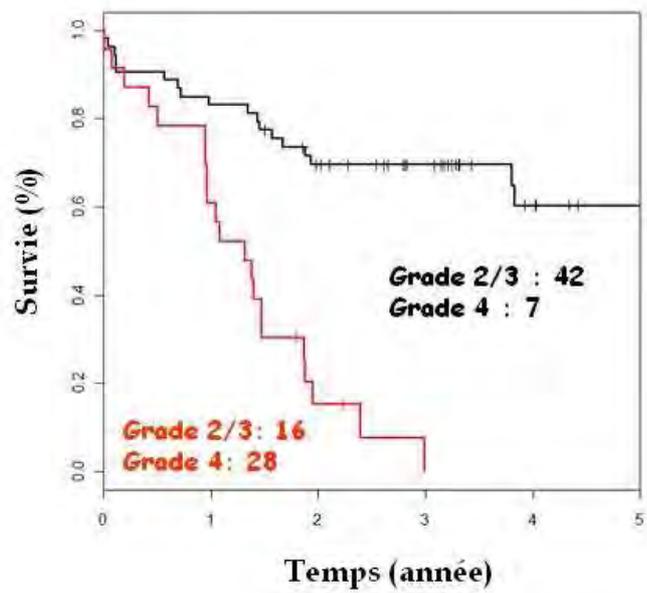


Figure69. Expression des sous-unités intégrines $\alpha 5$ et $\beta 1$ et de la cavéoline-1 dans les échantillons de biopsies humaines de patients atteints de gliome. A, Les histogrammes représentent la moyenne de plusieurs expériences indépendantes ($n = 3$) \pm SEM. Les échantillons sont classés selon la classification de Daumas-Duport: OA pour oligodendroglioma A (grade II), OB pour oligodendroglioma B (grade III) et GBM pour glioblastome multiforme (grade IV). Ctrl pour contrôle. B, Analyse de Kaplan-Meier indiquant que l'expression de la sous-unité intégrine $\alpha 5$ est corrélée à un facteur de mauvais pronostic.

V/ Analyse des biopsies de patients

V-1/ Corrélation entre l'expression de la sous-unité intégrine $\alpha 5$ et la survie des patients

Nous avons souhaité déterminer le taux d'expression des sous-unités intégrines $\alpha 5$ et $\beta 1$ au cours de la progression tumorale ainsi que celui de la cavéoline-1 et nous avons voulu savoir si le taux d'expression de la sous-unité intégrine $\alpha 5$ était corrélé à la survie globale des patients. Les échantillons ont été classés selon la classification de Daumas-Duport : OA pour oligodendrogliome A (grade II selon la classification de l'OMS), OB pour oligodendroglioma B (grade III) et GBM pour glioblastome multiforme (grade IV) (**Figure69A**).

L'analyse des résultats a révélé une augmentation croissante de l'expression de la sous-unité intégrine $\alpha 5$ avec la progression tumorale (**Figure69A**). Ainsi, la plus forte expression de la sous-unité intégrine $\alpha 5$ est retrouvée dans les glioblastomes (environ 3 fois plus exprimée par rapport aux contrôles). Au contraire, l'expression de la sous-unité intégrine $\beta 1$ n'augmente pas lors de la progression tumorale puisque son expression dans les GBM est moins importante que dans les oligodendrogliomes B. Néanmoins, son expression est plus importante dans les échantillons issus des patients par rapport aux contrôles. L'expression de la cavéoline-1 est globalement forte dans l'ensemble des échantillons de patients (OA, OB et GBM) et, comme pour la sous-unité intégrine $\alpha 5$, son expression augmente lors de la progression tumorale (**Figure69A**).

L'étude de Kaplan-Meier réalisée sur la corrélation entre la survie des patients et le taux d'expression de la la sous-unité intégrine $\alpha 5$ a pu mettre en évidence deux groupes de patients (**Figure69B**). Les patients du premier groupe ont une faible survie globale avec des taux élevés d'expression de la sous-unité intégrine $\alpha 5$ alors que ceux du deuxième groupe ont une bonne survie (à 5 ans) et des taux bas d'expression de la sous-unité intégrine $\alpha 5$. De plus, les glioblastomes sont majoritairement représentés au sein du groupe 1 (en rouge), de mauvais pronostic alors que le groupe 2, de bon pronostic, rassemble des patients atteints de gliomes de grade II et III (**Figure69B**).

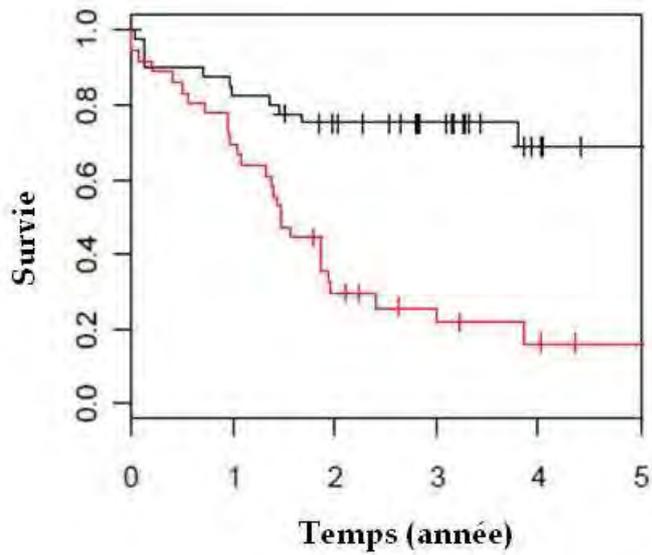


Figure70. L'expression de PAI-1 est corrélée à un facteur de mauvais pronostic dans les gliomes. Selon l'analyse par Kaplan-Meier, la courbe noire représente les patients exprimant faiblement PAI-1 et la courbe rouge ceux qui sur-expriment la protéine.

V-2/ Corrélation entre l'expression de PAI-1 et la survie des patients

Dans les gliomes, une forte expression de PAI-1 étant associée à un facteur de mauvais pronostic (Muracciole X, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2002), nous avons également souhaité évaluer l'expression de PAI-1 dans l'ensemble des échantillons de patients afin de vérifier cette corrélation.

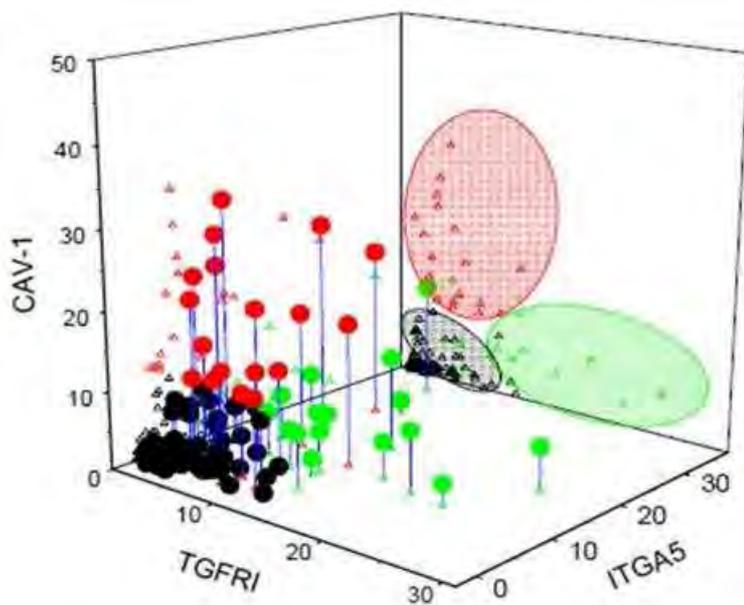
L'analyse Kaplan-Meier a mis en évidence une corrélation claire entre l'expression de PAI-1 et la survie des patients (**Figure70**). De manière similaire aux résultats obtenus avec l'étude de l'expression de la sous-unité intégrine $\alpha 5$, l'étude de l'expression de PAI-1 dans les échantillons de biopsies de patients a permis d'identifier deux sous-groupes : le premier, avec une faible expression de PAI-1 et une bonne survie et le deuxième groupe qui présente des taux élevés de PAI-1 corrélés à une survie plus faible (**Figure70**).

V-3/ L'expression de la cavéoline-1 est inversement corrélée à celles de l'intégrine $\alpha 5$ et du TGF β RI dans les échantillons de biopsies de patients

L'expression de la cavéoline-1 et celle des protéines $\alpha 5$ et TGF β RI a pu être vérifiée *in vitro* dans différents modèles cellulaires de glioblastome, mais qu'en est-il *in vivo* ?

Afin de déterminer la nature des liens existant entre l'expression des trois protéines (cavéoline-1/intégrine $\alpha 5$ et TGF β RI), nous avons analysé par RT-PCR quantitative l'expression de leurs transcrits dans des échantillons de biopsies de patients atteints de gliomes (Grade II, III et IV).

L'analyse de l'expression des transcrits (cavéoline-1/intégrine $\alpha 5$ et TGF β RI) a révélé un taux d'expression similaire de ces transcrits dans les cellules non néoplasiques (**Figure71**, tableau inférieur). De plus, l'expression de ces transcrits augmente avec le grade tumoral (**Figure71**, tableau inférieur). Ces données semblent suggérer une augmentation globale de l'ensemble des protéines avec le grade et donc avec l'agressivité tumorale. Toutefois, nous avons souhaité savoir si nous pouvions regrouper les patients en sous-groupes homogènes en fonction de leurs taux d'expression des trois gènes d'intérêt (cavéoline-1/intégrine $\alpha 5$ et TGF β RI).



| gènes | Cluster centers | | |
|-------------|----------------------------------|----------------|---------------|
| | Moyenne (en fois d'augmentation) | | |
| Cluster | ITGA5 | CAV1 | TGFRI |
| Cluster I | 2.2 (2.3) | 1.2 (1.5) | 2.4 (3.1) |
| Cluster II | 11.4 (9.0) | 5.4 (2.1) | 10.5 (7.3) |
| Cluster III | 6.1 (4.3) | 17.2 (10.6) | 5.2 (2.7) |

| Clusters | I | II | III | II+III |
|-------------|---------------------|---------------------|----------------------|----------------------------|
| | <i>Points noirs</i> | <i>Points verts</i> | <i>Points rouges</i> | <i>Points verts+rouges</i> |
| Non tumoral | 14 (100%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| Grade II | 18/21 (86%) | 0/21 (0%) | 3/21 (14%) | 3/21 (14%) |
| Grade III | 27/38 (71%) | 4/38 (11%) | 7/38 (18%) | 11/38 (29%) |
| Grade IV | 18/35 (51%) | 9/35 (26%) | 8/35 (23%) | 17/35 (49%) |
| Total | 77/108 (71%) | 13/108 (12%) | 18/108 (17%) | 31/108 (29%) |

| | FOIS D'AUGMENTATION | | |
|-------------|---------------------|---------|---------|
| | ITGA5 | CAV1 | TGFRI |
| Non tumoral | 1.5±0.2 | 1.3±0.2 | 1.8±0.3 |
| Grade II | 2.6±0.5 | 3.1±1.2 | 4.3±0.6 |
| Grade III | 5.6±1.0 | 5.2±1.1 | 4.7±0.6 |
| Grade IV | 7.9±1.1 | 7.9±1.2 | 5.1±0.7 |

Figure 71. L'expression de la cavéoline-1 est inversement corrélée à l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ et au TGF β RI dans les biopsies humaines de patients atteints de gliomes. L'analyse par K-means clustering a été réalisée sur 108 échantillons de biopsies et les trois clusters identifiés sont présentés en 3D sur le graphe de gauche. Le tableau, en haut à droite, présente l'expression des trois protéines et le tableau du centre représente la répartition des échantillons de patients dans les différents clusters selon le grade histologique. Enfin, le tableau inférieur présente les niveaux d'expression des protéines.

Le partitionnement des échantillons par la méthode d'analyses statistiques de données, K-means, a montré que les échantillons de biopsies de patients pouvaient être classés selon trois clusters (ou sous-groupes) distincts. Le Cluster I regroupe la majorité des échantillons analysés avec l'ensemble des échantillons sains, non tumoraux (pris comme référence). Il rassemble également 86% des gliomes de grade II, 71% des gliomes de grades III et la moitié des glioblastomes (**Figure71**, tableau du centre). Ce cluster est caractérisé par une expression de la cavéoline-1, de la sous-unité intégrine $\alpha 5$ et du récepteur TGF β RI faible, allant d'une augmentation de 1 à 2,5 fois.

Le Cluster II (nuage de points verts) est majoritairement représenté par les glioblastomes qui représentent 70% environ des échantillons présents dans ce cluster (9/13), le reste correspondant à des échantillons de gliomes de grade III.

Le troisième Cluster III regroupe des glioblastomes, des gliomes de grades III et II. Les glioblastomes représentent presque la moitié de ce cluster avec 44% (8/18).

La moitié des glioblastomes se retrouve dans le Cluster I et l'autre moitié est répartie équitablement entre les Clusters II et III. La majorité des gliomes de grade II et III est retrouvée dans le Cluster I (86 et 71% respectivement).

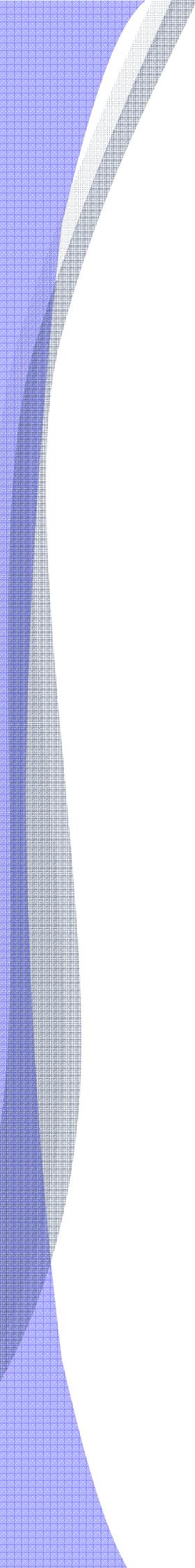
De manière intéressante, le cluster II est caractérisé par des échantillons présentant une faible expression de la cavéoline-1 mais une sur-expression de la sous-unité intégrine $\alpha 5$ et du récepteur TGF β RI soit un profil Cav1-/ $\alpha 5$ +/TGF β RI+ par rapport au cluster III qui regroupe des échantillons exprimant fortement la cavéoline-1 et faiblement l'intégrine et le TGF β RI soit un profil Cav1+/ $\alpha 5$ -/TGF β RI- (**Figure71**).

L'ensemble de ces résultats suggère l'existence d'une corrélation inverse entre ces trois gènes (cavéoline-1/ $\alpha 5$ / TGF β RI) entre les clusters II et III.

Conclusions:

Les résultats obtenus au cours de cette étude ont mis en évidence:

- ✚ L'interconnection *in vivo* de la cavéoline-1, de la sous-unité intégrine $\alpha 5$ et du récepteur TGF β RI
- ✚ L'augmentation progressive de l'expression de la cavéoline-1 et de la sous-unité intégrine $\alpha 5$ au cours de la progression tumorale
- ✚ La corrélation de la sur-expression de la sous-unité intégrine $\alpha 5$ et de PAI-1 à un facteur de mauvais pronostic dans les gliomes



*CONCLUSION
GÉNÉRALE*

Dans les glioblastomes, tumeurs cérébrales les plus invasives et les plus agressives, le taux de la cavéoline-1 est très élevé mais son expression est très hétérogène. Compte tenu des données de la littérature et des fonctions exercées par la cavéoline-1, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle les variations d'expression de la cavéoline-1 dans les cellules de glioblastome pouvaient modifier le phénotype de ces cellules.

Nous avons montré que la modulation de l'expression de la cavéoline-1 dans les cellules de glioblastome conduisait à des changements phénotypiques et à la modulation de certains gènes. En effet, les cellules de glioblastome sous-exprimant la cavéoline-1 acquièrent un phénotype plus agressif, évalué en termes de prolifération, de clonogénicité et de trans-migration. En revanche, les cellules de glioblastome sur-exprimant la cavéoline-1 présentent un phénotype moins agressif. L'analyse du transcriptome de ces cellules a montré que la famille de gènes la plus affectée par la modulation de l'expression de la cavéoline-1 était celles des intégrines. De manière intéressante, nos résultats ont révélé une corrélation inverse entre l'expression de la cavéoline-1 et celle de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. De plus, nous avons pu déterminer que l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ était le médiateur des effets de la cavéoline-1 dans ces cellules de glioblastome. Plus globalement, nos résultats indiquent que la cavéoline-1 est capable de réguler l'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans différents modèles cellulaires de glioblastome. Etant donné que la cavéoline-1 est capable de réguler l'activation de protéines et de voies de signalisation, nous avons analysé le taux d'expression et/ou d'activation de certaines protéines de signalisation et montré une corrélation inverse entre l'expression de la cavéoline-1 et celle du récepteur TGF β RI ainsi que l'activation des protéines ERK, AKt et Smad2.

Une analyse plus approfondie nous a permis de comprendre l'interconnexion de ces voies de signalisation et nos résultats montrent que la régulation de l'expression de la sous-unité intégrine $\alpha 5$ emprunte une voie dépendante du TGF β RI (TGF β RI - PI3K-AKt - Smad2 - $\alpha 5$) et une voie indépendante du TGF β RI (ERK-MAPK - AKt - Smad2 - $\alpha 5$) (**Figure72**).

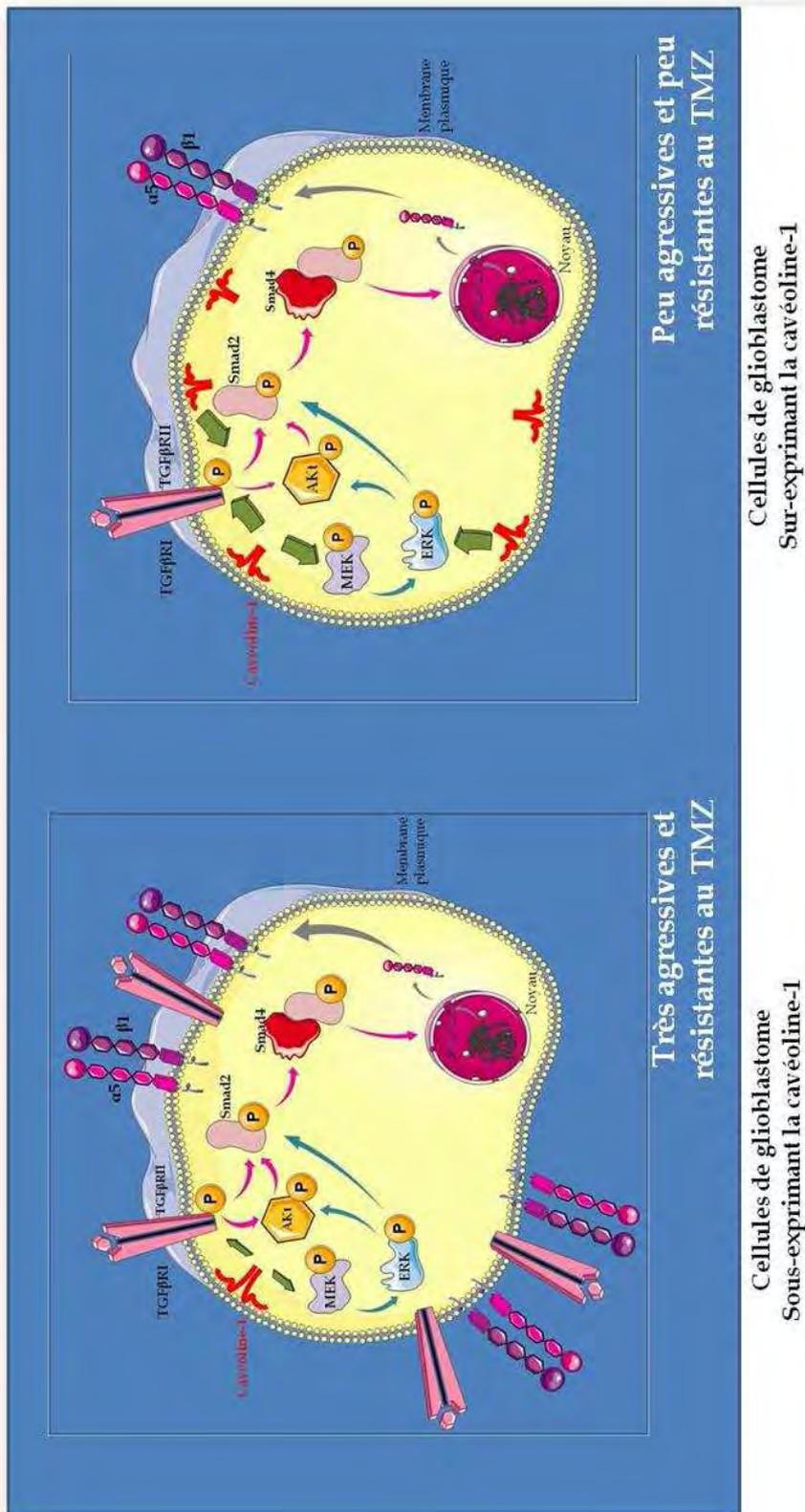
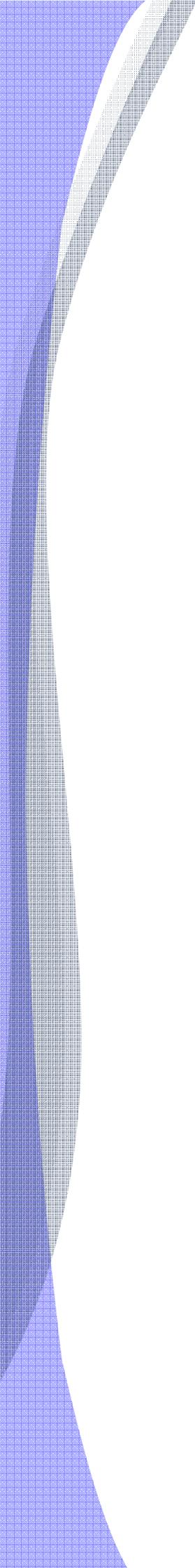


Figure72. Schéma général. Les cellules de glioblastome sous-exprimant la cavéoline-1 ont un phénotype agressif et sont résistantes au TMZ contrairement aux cellules de glioblastome sur-exprimant la cavéoline-1. Les flèches roses correspondent à la voie TGFβRI dépendante et les flèches bleues à la voie TGFβRI indépendante.

Par ailleurs, les voies TGF β RI/Smad2 et ERK-MAPK régulent également l'expression de la protéine PAI-1 impliquée dans l'invasion, la migration et l'angiogenèse dans les cellules de glioblastome alors que la voie PI3K-Akt agirait plutôt comme un régulateur négatif de son expression. L'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, comme celle de PAI-1, est inversement corrélée à celle de la cavéoline-1 dans ces cellules de glioblastome comme le montrent nos résultats. De manière intéressante, les cellules de glioblastome sous-exprimant la cavéoline-1 (les plus agressives) ont montré une chimiorésistance au témozolomide, agent chimiothérapeutique utilisé en première ligne dans la prise en charge thérapeutique des patients atteints de glioblastome. Au contraire, les cellules sur-exprimant la cavéoline-1 sont sensibles à ce traitement indiquant que les cellules de glioblastome les moins agressives sont aussi les plus sensibles. Toutefois, un traitement ciblé basé sur l'utilisation d'antagonistes sélectifs de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ ou d'un inhibiteur de TGF β RI a montré une efficacité beaucoup plus importante sur les cellules de glioblastome les plus agressives, sur-exprimant l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et le récepteur TGF β RI. Ces données ont permis de révéler le potentiel thérapeutique d'antagonistes sélectifs de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ ou d'inhibiteurs de TGF β RI dans le traitement des glioblastomes. Les résultats obtenus *in vitro* ont été confirmés *in vivo* par l'analyse d'échantillons issus de biopsies de patients. En effet, nos résultats révèlent que la cavéoline-1, la sous-unité intégrine $\alpha 5$ et le récepteur TGF β RI sont aussi trois protéines interconnectées *in vivo*.

Bien que la cavéoline-1 ne représente pas une cible thérapeutique en tant que telle, elle module l'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et du récepteur TGF β RI qui présentent un fort potentiel thérapeutique. Toutefois, d'un point de vue clinique, la cavéoline-1 avec l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et le récepteur TGF β RI pourraient être utilisés comme des marqueurs moléculaires permettant d'identifier des sous-groupes de patients. Ces sous-groupes de patients seraient alors candidats aux traitements par des antagonistes de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ ou par des inhibiteurs de TGF β RI. En effet, l'ensemble des résultats obtenus au cours de notre étude indique que l'expression de la cavéoline-1 module le phénotype des cellules de glioblastome en régulant le taux d'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans ces cellules.

De plus, nos résultats montrent que les cellules de glioblastome les plus agressives sont aussi les plus sensibles au K34c (antagoniste de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$) et au SB-431542 (inhibiteur du TGF β RI). Ainsi, l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et le récepteur TGF β RI présentent un fort potentiel thérapeutique dans les glioblastomes, en particulier, dans les sous-populations de patients sur-exprimant l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et le récepteur TGF β RI.



*DISCUSSION
ET
PERSPECTIVES*

Bien que leur pourcentage reste faible (5% de l'ensemble des tumeurs solides chez l'adulte) les tumeurs cérébrales présentent un taux de mortalité et de morbidité élevé. Les gliomes, tumeurs cérébrales ayant pour origine une cellule gliale, représentent la majorité des tumeurs cérébrales (près de 70%) et parmi les gliomes, les glioblastomes correspondent aux tumeurs gliales les plus agressives et les plus invasives. Malgré une prise en charge thérapeutique utilisant l'exérèse chirurgicale, la radiothérapie et la chimiothérapie (concomitante et adjuvante), la survie des patients reste extrêmement faible (de 12 à 15 mois). Dans un tel contexte, un effort de recherche important est réalisé dans ce domaine afin de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques. De plus, notre compréhension de la biologie de ces tumeurs s'est beaucoup améliorée depuis ces dernières années. Aujourd'hui, de nombreuses protéines et molécules ont été identifiées et leurs rôles dans la tumorigenèse sont connus et caractérisés.

Au laboratoire nous nous sommes intéressés à la cavéoline-1 car son rôle dans ce type de tumeur et, plus particulièrement dans les glioblastomes, était méconnu. En effet, de nombreuses études avaient mis en évidence que la cavéoline-1 jouait tantôt le rôle d'oncogène et tantôt celui de suppresseur de tumeur. Dans les gliomes, l'expression de la cavéoline-1 est globalement augmentée et dans les glioblastomes elle est sur-exprimée. Néanmoins, son expression est très hétérogène dans ces tumeurs. Nous avons donc souhaité savoir si la modulation de l'expression de la cavéoline-1 dans des cellules de glioblastome modifiait le phénotype de ces cellules.

1/ La cavéoline-1 module le phénotype des cellules de glioblastomes

En modulant l'expression de la cavéoline-1 dans les cellules de glioblastomes, nous avons mis en évidence que le taux d'expression de la cavéoline-1 modulait le phénotype de ces cellules vers un caractère plus ou moins agressif. En effet, l'inhibition de l'expression de la cavéoline-1 dans les cellules de glioblastome les pousse vers un phénotype plus agressif, évalué en termes de prolifération, de migration et de clonogénicité. Au contraire, sa sur-expression dans ces cellules se traduit par un phénotype moins agressif.

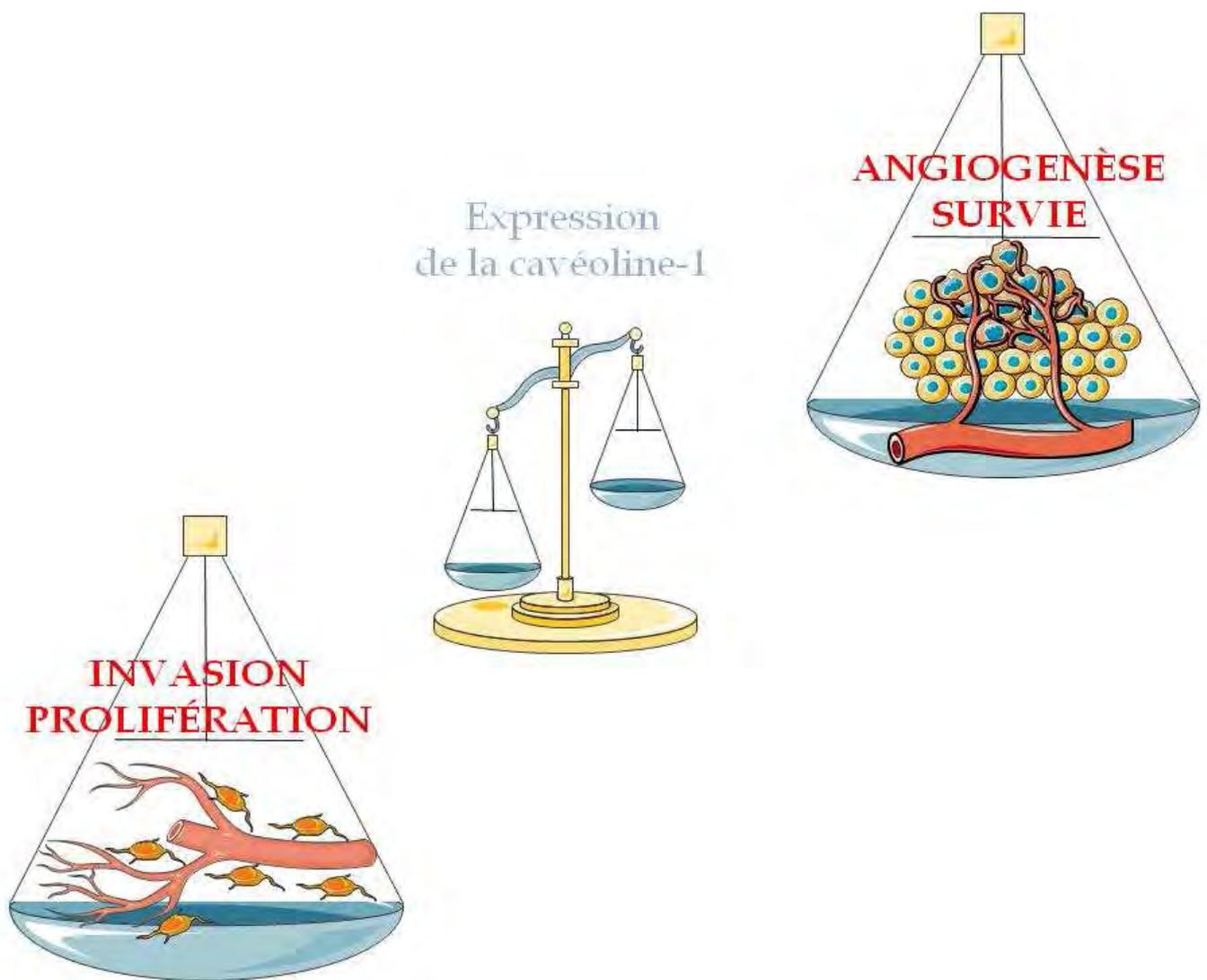


Figure73. Balance entre angiogenèse/survie et invasion/prolifération des cellules tumorales. La sur-expression de la cavéoline-1 protège les cellules tumorales de l'apoptose ce qui favoriserait la survie cellulaire. Au contraire, sa sous-expression conduit les cellules tumorales vers un phénotype plus invasif et plus prolifération.

Nos résultats mettent pour la première fois en évidence la capacité de la cavéoline-1 à moduler le phénotype des cellules de glioblastome. En effet, aucune étude ne s'était encore attachée à évaluer la contribution de la cavéoline-1 dans le phénotype de ces cellules tumorales. La cavéoline-1 agit comme une protéine « suppresseur de tumeur » dans les glioblastomes alors que dans d'autres types de cancers elle se comporte comme un promoteur de tumeur. Dans la littérature, l'inhibition de l'expression de la cavéoline-1 est associée à la transformation des fibroblastes et son expression est sévèrement réduite dans les fibroblastes transformés par différents oncogènes (Koleske AJ, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995 ; Galbiati F, *EMBO J.*, 1998). Particulièrement, l'inhibition de la cavéoline-1 dans des fibroblastes embryonnaires de souris MEF cav-1^{-/-} induit une augmentation de la prolifération cellulaire. Ces travaux mettaient déjà en évidence le rôle suppresseur de tumeur de la cavéoline-1. Dans les glioblastomes, l'expression de la cavéoline-1, bien que très hétérogène, est globalement augmentée (Cassoni P, *Am. J. Surg. Pathol.*, 2007 ; Barresi V, *Human Pathol.*, 2009). Différentes études ont mis en évidence que la cavéoline-1 était une protéine sur-exprimée dans les phases avancées des cancers et que son expression augmentait graduellement avec la progression tumorale (Yang C, *FEBS Lett.*, 1998 ; Ho CC, *Am. J. Pathol.*, 2002 ; Sanchez-Carbayo M, *Cancer Res.*, 2002). Ceci pourrait s'expliquer par le rôle joué par la cavéoline-1 dans la survie des cellules tumorales (Ravid D, *Advan. Enzyme Regul.*, 2006). Une sur-expression de la cavéoline-1 protégerait les cellules tumorales de l'anoïkis et de l'apoptose (Ravid D, *Oncogene.*, 2005 ; Tahir SA, *Cancer Res.*, 2001). Au contraire, les cellules de glioblastome sous-exprimant la cavéoline-1 pourrait être des cellules très invasives capables de migrer le long des vaisseaux afin d'envahir le parenchyme sain (Louis DN, *Annu. Rev. Pathol.*, 2006). Ces cellules seraient alors responsables de la formation de métastases et de la rechute des glioblastomes (**Figure73**). Nos résultats semblent cohérents avec les données publiées par Hoelzinger et ses collaborateurs qui ont montré une diminution de l'expression de la cavéoline-1 au niveau des cellules les plus invasives (Hoelzinger DB, *Neoplasia*, 2005). Ces dernières sur-expriment certaines protéines trans-membranaires mais l'expression des intégrines n'a pas été évaluée (Hoelzinger DB, *Neoplasia*, 2005). Au « cœur » de la tumeur, les cellules sous-exprimant la cavéoline-1 pourrait stimuler la croissance cellulaire ce qui permettrait à la tumeur de se développer plus rapidement.

L'immunohistologie réalisée sur des coupes de tumeur entière permettrait d'établir le profil d'expression de la cavéoline-1 sur l'ensemble d'une tumeur. *In vivo*, l'injection de tumeurs marquées (cavéoline-1 avec un tag GFP par exemple) pourrait également permettre de cartographier les cellules sur- et sous-exprimant la cavéoline-1. Différentes études avaient également montré que l'expression de la cavéoline-1 n'était pas modulée uniquement dans les cellules tumorales mais aussi au niveau des cellules environnantes, les cellules du stroma tumoral (Mueller MM, *Nat. Rev. Cancer*, 2004 ; Kalluri R, *Nat. Rev. Cancer*, 2006). Il serait intéressant d'évaluer le phénotype des cellules de glioblastome dans un micro-environnement sur- ou sous-exprimant la cavéoline-1. Par ailleurs, dans le cancer du sein, l'expression de la cavéoline-1 au niveau des cellules stromales est un biomarqueur qui permet de prédire la rechute, les métastases, la survie et la résistance au tamoxifène (Witkiewicz AK, *Am. J. Surg. Pathol.*, 2009). A ce jour, aucune donnée n'est disponible sur les conséquences de la modulation de l'expression de la cavéoline-1 au niveau des cellules stromales humaines sur la récurrence des glioblastomes.

De plus, la cavéoline-1 étant également une protéine sécrétée (Tahir SA, *Cancer Res.*, 2001 ; Bartz R, *Int. J. Cancer*, 2008), il serait intéressant de caractériser la nature des molécules sécrétées et échangées entre les cellules tumorales sur- et sous-exprimant la cavéoline-1. Les conséquences de ces échanges sur le phénotype tumoral et la progression tumorale seraient ensuite analysées. Des résultats préliminaires recueillis au laboratoire ont déjà montré que la cavéoline-1 était transférée grâce à des micro-vésicules, nommées micro-particules, d'une cellule tumorale à une autre.

II/ La cavéoline-1 module l'expression des gènes

La cavéoline-1 module le phénotype des cellules de glioblastome en régulant l'expression de certains gènes. Nos résultats nous ont permis d'identifier la famille des intégrines comme la principale famille de gènes affectée par la modulation de l'expression de la cavéoline-1. De plus, nos résultats désignent l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ comme le médiateur des effets de la cavéoline-1.

La modulation de l'expression de gènes par la cavéoline-1 est un mécanisme connu et caractérisé pour certains d'entre eux (Hulit J, *J. Biol. Chem.*, 2000 ; Glait C, *Exp. Cell Res.*, 2006).

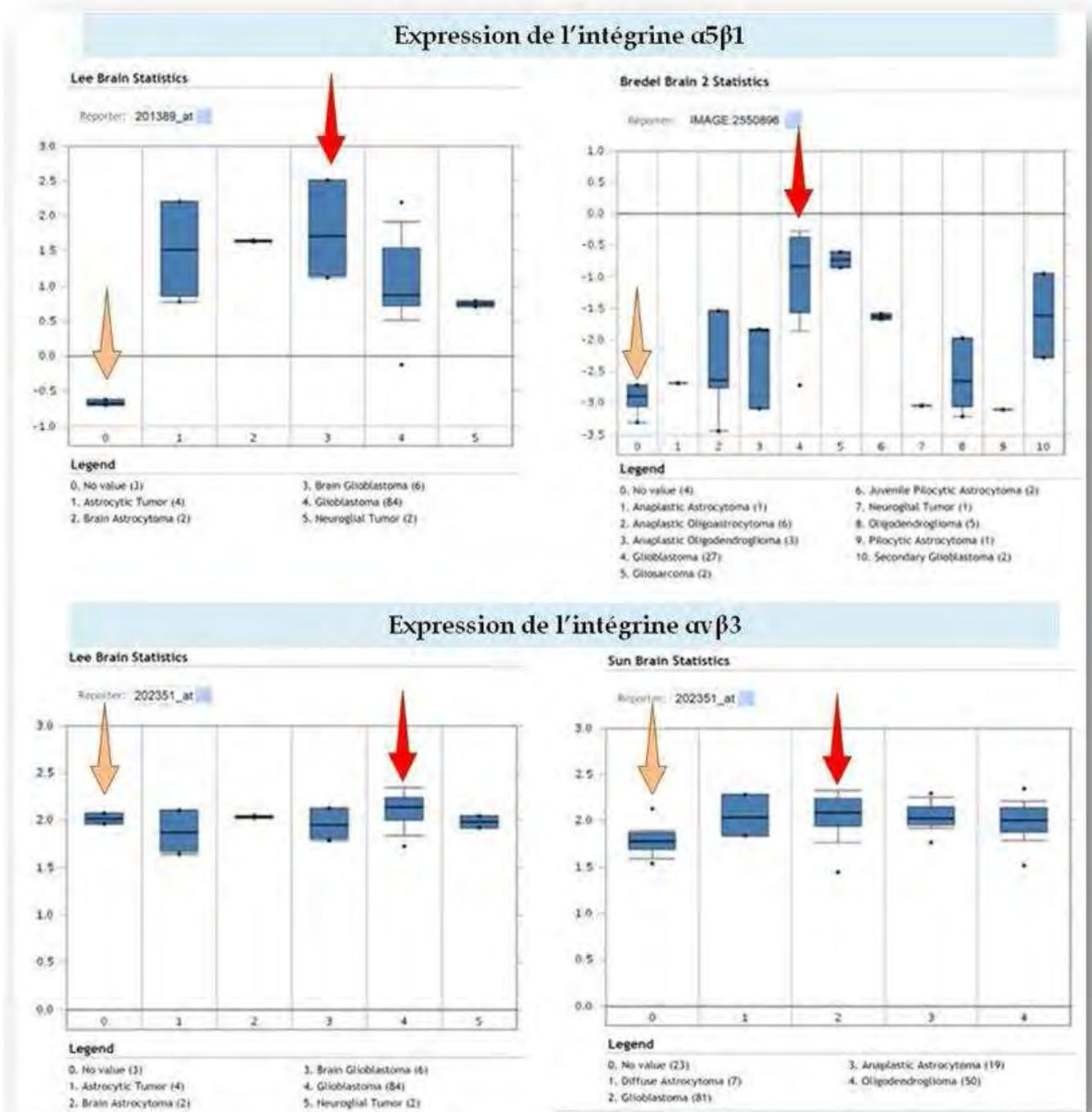


Figure74. Expression des intégrines $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha v\beta 3$ dans les glioblastomes. Les flèches orange correspondent au taux d'expression de l'intégrine au niveau du tissu sain alors que les flèches rouge correspondent au taux d'expression de l'intégrine dans les glioblastomes (d'après www.oncomine.org).

Toutefois, les données obtenues au cours de notre étude montrent, pour la première fois, une régulation de l'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ par la cavéoline-1.

Différentes études avaient déjà mis en évidence l'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans les gliomes et son implication dans l'invasion et la migration des cellules tumorales (Riemenschneider T, *Am. J. Pathol.*, 2005 ; Uhm JH, *Front. Biosci.*, 1999). La difficulté réside dans le fait que de nombreuses intégrines ont été impliquées dans la migration/invasion des cellules tumorales ou encore dans l'angiogenèse et la chimiorésistance de ces tumeurs notamment l'intégrine $\alpha v\beta 3$. Pour autant, dans notre modèle, nous n'observons pas de modulation de l'expression de l'intégrine $\alpha v\beta 3$ et le phénotype de cellules est dicté par le taux d'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. L'ensemble des données de la littérature étant très hétérogène, des études comparatives réalisées sur des modèles *in vivo* permettraient de définir les taux d'expression de ces deux intégrines, leur localisation, leur potentiel thérapeutique, prédictif et pronostic. D'ailleurs, une analyse comparative des profils d'expression des deux protéines a déjà permis de mettre en évidence que seule l'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ était augmentée dans les glioblastomes ; celle de l'intégrine $\alpha v\beta 3$ reste comparable aux taux retrouvés dans les cellules saines (Freije WA, *Cancer Res.*, 2004 ; Phillips HS, *Cancer Cell*, 2006) (Figure 74) . L'ensemble de ces résultats soulignent la nécessité d'une classification moléculaire des patients car certains patients pourraient sur-exprimer l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ (comme l'on montré nos résultats) et leur phénotype, comme pour leur prise en charge thérapeutique, seraient alors dépendant de l'expression cette intégrine. Au contraire, d'autres patients sur-exprimeraient l'intégrine $\alpha v\beta 3$ qui serait alors discriminant dans ce cas pour la prise en charge thérapeutique.

Par ailleurs, l'expression d'autres gènes a été modulée dans ces cellules de glioblastome. Dans les cellules de glioblastome sous-exprimant la cavéoline-1 nous avons pu observer une sur-expression de la MMP-2 ou encore de PAI-1. La MMP-2 a clairement été localisée au niveau des cellules tumorales invasives (Brooks PC, *Cell*, 1996). De plus, l'expression et l'activité des MMPs se traduisent par une augmentation de l'invasion des cellules de glioblastome (Wild-Bode C, *Cancer Res.*, 2001). La sur-expression de différentes MMPs a pu être révélée dans de nombreux cancers notamment dans les gliomes.

Particulièrement, l'expression de la MMP-2 et la de MMP-9 est corrélée avec le grade de ces tumeurs ([Lampert K, Am. J. Pathol., 1998](#)). Pour autant, la PCR Array n'a pas permis de révéler une sur-expression de la MMP-9 alors que l'expression de la MMP-2 est augmentée. Toutefois, l'analyse par PCR Array a montré certaines limites notamment dans l'étude de l'expression de PAI-1 dont l'expression s'est avérée inversement corrélée à la cavéoline-1 par RT-PCR quantitative et par WB mais pas par PCR Array. Ces résultats soulignent donc l'utilité de confirmer ou d'infirmer les tendances révélées par la PCR Array. Dans le cas des MMPs, il serait intéressant d'évaluer leur activité par zymographie et leur expression protéique.

Nous avons pu observer une sur-expression de PAI-1 dans les cellules U87MGshRNA_{cav1}. Chez les patients atteints de glioblastomes, la sur-expression de PAI-1 se traduit par une diminution de survie reflétant des tumeurs particulièrement agressives et invasives ([Murraciale X, Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 2002](#)). Ces données sont en faveur d'un modèle de cellules de glioblastome plus agressif et plus invasif comme le sont les cellules U87MGshRNA_{cav1} sous-exprimant la cavéoline-1.

De manière plus globale, nos résultats mettent en lumière un mécanisme moléculaire par lequel les cellules de glioblastome pourraient acquérir un phénotype plus agressif avec comme chef d'orchestre la cavéoline-1. Différents travaux, dont ceux réalisés par Williams et ses collaborateurs, avaient révélé que la cavéoline-1 n'avait pas d'effet direct sur l'immortalisation mais qu'elle jouait plutôt un rôle dans l'acquisition d'un phénotype plus agressif ([Williams TM, J. Biol. Chem., 2004](#) ; [Maglione JE, Cancer Res., 2001](#)). A ce jour, aucune donnée n'est disponible dans le glioblastome et on ne sait pas si la modulation de l'expression de la cavéoline-1 dans des astrocytes primaires humains pourrait conduire à la transformation de ces cellules ou si la modulation de l'expression de la cavéoline-1 serait un processus secondaire de la tumorigenèse. Les études réalisées dans d'autres systèmes sont plutôt en faveur de la seconde hypothèse.

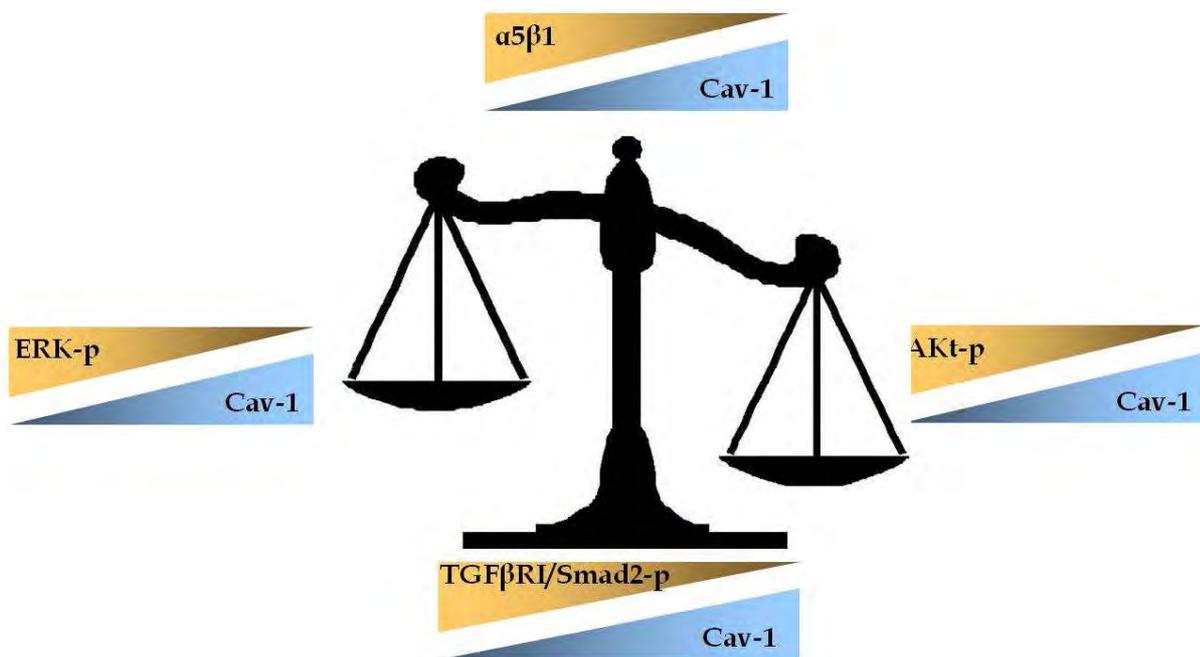


Figure75. Corrélation inverse entre l'expression de la cavéoline-1, de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et du récepteur TGF β RI et l'activation des protéines ERK, AKt et Smad2. Les cellules de glioblastome sous-exprimant la cavéoline-1 sur-expriment l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et le récepteur TGF β RI. Les protéines ERK, AKt et Smad2 sont également activées dans ces cellules.

III/ La cavéoline-1 module les voies de signalisation : régulation de l'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$

En essayant de déterminer les mécanismes par lesquels la cavéoline-1 régulaît l'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ nous avons mis en évidence une corrélation inverse entre l'expression de la cavéoline-1 et l'activation et l'expression des protéines de signalisation (Smad2, AKt, ERK et TGF β RI). De plus, nous avons montré que les voies ERK-MAPK, PI3K-AKt et TGF β R/Smad2 étaient impliquées dans la régulation de l'expression de l'intégrine par la cavéoline-1 (**Figure75**).

L'étude de ces voies de signalisation suscite aujourd'hui beaucoup d'intérêt, notamment, la cascade de transduction Ras-ERK1/2 qui est activée dans la presque totalité des glioblastomes (Guha A, *Oncogene*, 1997). Nos résultats rejoignent les données de la littérature avec d'une part l'activation identifiée de la voie ERK-MAPK dans les glioblastomes (Hulleman E, *Ad. Cancer Res.*, 2005) et d'autre part l'inhibition de l'activation de la protéine ERK par la cavéoline-1 (Engelman JA, *J. Biol. Chem.*, 1998 ; Engelman JA, *FEBS Letters.*, 1998). En effet, la cavéoline-1 est connue pour son action inhibitrice sur l'activation de la protéine ERK et l'inhibition de son expression induit une hyper-phosphorylation de ERK et la transformation des cellules NIH₃T₃ (Galbiati F, *EMBO J.*, 1998). Le mécanisme par lequel la cavéoline-1 inhibe l'activation des protéines ERK et MEK a déjà été décrypté dans les études réalisées par Engelman et ses collaborateurs (Engelman JA, *J. Biol. Chem.*, 1998 ; Engelman JA, *FEBS Letters.*, 1998).

L'activation de la protéine AKt a pu être mise en évidence dans près de 70% des glioblastomes (Haas-Kogan D, *Curr. Biol.*, 1998). L'activation de la PI3-K/AKt a également une valeur pronostic dans ces tumeurs car une hyperphosphorylation de la PI3K, d'AKt et de p70^{s6k} est corrélée avec une faible survie des patients (Chakravarti A, *J. Clin. Oncol.*, 2004 ; Pelloski CE, *Clin. Cancer Res.*, 2006). Par ailleurs, l'activation de cette voie est souvent reliée à une résistance à la radiothérapie et son activation, réalisée conjointement à celle de Ras, induit la formation de glioblastome *in vivo* (Holland EC, *Nat Genet.*, 2000). Dans ce contexte, un inhibiteur de la protéine AKt a été développé et caractérisé. Le perifosine, un nouvel alkylphospholipide, interfère avec le recrutement à la membrane d'AKt et inhibe sa phosphorylation (Kondapala SB, *Mol Cancer Ther.*, 2003).

Cette drogue inhibe aussi l'activation de ERK1/2, de JNK et de p21 conduisant à un arrêt du cycle cellulaire en phase G₁ et en phase G₂ (Ruiter GA, *Cancer Res.*, 1999 ; Patel V, *Cancer Res.*, 2002). Les études réalisées *in vivo* montrent toutefois des résultats mitigés sur le bénéfice du périfosine dans le traitement des glioblastomes (Momota H, *Cancer Res.*, 2005 ; Becher OJ, *Cancer Res.*, 2010).

Concernant la voie TGFβR/Smad, différentes études avaient déjà mis en évidence le rôle du TGFβ-1 et/ou TGFβ-2 dans la régulation de l'intégrine α5β1 (Cai T, *Biochem. Biophys. Res.*, 2000) comme dans celle de l'intégrine αvβ3 (Platten M, *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 2000) dans d'autres modèles cellulaires. Les résultats obtenus avec le modèle des cellules U87-MG rejoignent également les données de la littérature qui montrent une forte agressivité des tumeurs présentant une hyper-phosphorylation de Smad2. Dans ces tumeurs, l'hyperphosphorylation de Smad2 est corrélée à un facteur de mauvais pronostic (Bruna A, *Cancer Cell*, 2008). Les auteurs montrent que des scores élevés de Smad2-p sont corrélés, de façon significative, avec des taux élevés de TGF-β2 et TGF-β3 chez les patients. De plus, une différence significative de la survie globale des patients a été observée entre les patients présentant un taux élevé de Smad2-p par rapport à ceux qui présentaient un taux plus faible. L'utilisation d'un inhibiteur de TGFβRI, le LY2109761, a révélé des effets différentiels du TGFβ sur une série de 9 lignées de gliome. Les auteurs ont montré que le TGFβ pouvait induire la prolifération cellulaire des lignées U373MG, A172 et C4 alors qu'il n'avait aucun effet majeur sur celle des lignées U87MG, T98G, C3, C52, hs683, et U251 (Bruna A, *Cancer Cell*, 2008). Ces résultats sont corrélés avec les précédentes données de Piek et des ses collaborateurs montrant également des effets différentiels du TGFβ sur 6 lignées de gliome (Piek E, *Int. J. Cancer*, 1999). Dans l'étude réalisée par Bruna, les auteurs montrent que l'induction de la prolifération par le TGFβ est réalisée par l'intermédiaire du PDGF-B (Bruna A, *Cancer Cell*, 2008). Ces données soulignent d'une part l'importance de la voie TGFβR/Smad dans le phénotype des cellules de glioblastome et d'autre part mettent en évidence la nécessité de caractériser les cellules tumorales avant de traiter les patients.

L'équipe de Cai avait mis en évidence une induction de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ à la surface cellulaire et au niveau de son ARNm dans les cellules d'hépatocarcinome SMMC-7721 suite à un traitement par du TGF- $\beta 1$. Ce traitement induit également l'activation de FAK ainsi que l'adhésion à la fibronectine et la migration cellulaire (Cai T, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000). De même, la migration des cellules de glioblastome LN-18 et LN-229 est augmentée suite à un traitement par du TGF- $\beta 1$ et TGF- $\beta 2$ qui induit également l'expression de l'intégrine $\alpha v\beta 3$ (Platten M, *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 2000).

Nos résultats semblent donc parfaitement corroborer les données recueillies dans la littérature. Toutefois, de nombreuses données indiquent aujourd'hui que ce sont le TGF- $\beta 2$ et le TGF- $\beta 3$ qui seraient plus importants dans les glioblastomes que le TGF- $\beta 1$ (Bruna A, *Cancer Cell*, 2008). Il serait donc intéressant d'utiliser le TGF- $\beta 2$ et le TGF- $\beta 3$ pour déterminer leur habilité à induire l'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. Néanmoins, compte tenu du fait que ces facteurs de croissance sont aussi des ligands du récepteur TGF β RI/TGF β RII, on peut supposer qu'ils auraient le même effet que le TGF- $\beta 1$. Au cours de notre étude nous avons également pu observer une corrélation inverse de l'expression de la cavéoline-1 et de la protéine PAI-1 et nos résultats ont révélé les mécanismes de régulation de PAI-1 par la cavéoline-1 dans les cellules de glioblastome. La voie TGF β R/Smad était déjà connue pour réguler l'expression de PAI-1 (Piek E, *Int. J. Cancer*, 1999 ; Samarakoon R, *Thromb Haemost.*, 2008 ; Kutz SM, *Exp. Cell Res.*, 2006). De même, la voie ERK-MAPK est impliquée dans la régulation de l'expression de PAI-1 (Hamaguchi E, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2003). Au contraire, la voie PI3K-Akt est connue comme un répresseur de l'expression de PAI-1 (Whiley BR, *Gyn. Oncol.*, 2007). Ainsi, nos résultats rejoignent complètement les données de la littérature. Ces données soulignent les régulations complexes existant au sein des cellules de glioblastome et permettant de contrôler l'expression des gènes impliqués dans la tumorigenèse.

IV/ Les antagonistes de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et l'inhibiteur du TGF β RI représentent un fort potentiel thérapeutique dans les glioblastomes

L'ensemble des résultats obtenus nous ont amenés à évaluer le potentiel thérapeutique des antagonistes de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et d'un inhibiteur du TGF β RI.

Les résultats obtenus au laboratoire ont révélé que les cellules les plus agressives étaient aussi les plus résistantes (chimiorésistance au TMZ). Pourtant ces cellules se sont avérées être les plus sensibles face à un traitement ciblé. Plus encore, le K34c, antagoniste de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, n'a aucun effet sur la clonogénicité des cellules ne sur-exprimant pas l'intégrine. Il en est de même pour le SB-431542 qui inhibe uniquement la clonogénicité des cellules de glioblastome sur-exprimant le récepteur TGF β RI.

Ces données semblent apporter un début d'explication aux faibles taux de réponse observés par Stupp et ses collègues lors du traitement par le cilengitide des patients atteints de glioblastome (Stupp R, *J. Clin. Oncol.*, 2010). En effet, les auteurs auraient probablement obtenus de meilleurs taux de réponse en sélectionnant un sous-groupe de patients sur-exprimant, par exemple, l'intégrine $\alpha v\beta 3$. D'ailleurs, ils se proposent de poursuivre cet essai clinique sur des sous-groupes de patients sélectionnés selon leur statut MGMT. L'analyse réalisée au laboratoire avait mis en évidence que l'expression de la sous-unité αv ne variait pas avec le grade dans les échantillons de biopsies de patients contrairement à l'expression de la sous-unité $\alpha 5$ qui augmente avec le grade tumoral. Ces données semblent indiquer que l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ constituerait une meilleure cible thérapeutique que l'intégrine $\alpha v\beta 3$ dans les glioblastomes. Pour autant, l'analyse des biopsies de patients a révélé des sous-groupes de patients avec des expressions différentielles d'intégrine $\alpha 5\beta 1$. Compte tenu des résultats obtenus *in vitro*, la classification des patients selon leur expression en intégrine $\alpha 5\beta 1$ semble être une étape indispensable. Il serait donc particulièrement intéressant de pouvoir traiter *in vivo* des cellules de glioblastomes (avec des expressions variables d'intégrine) avec du K34c seul ou en combinaison avec du TMZ. Cette étude comparative pourrait également inclure le cilengitide afin de confirmer l'hypothèse selon laquelle l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ serait une meilleure cible que l'intégrine $\alpha v\beta 3$. D'ailleurs, il serait intéressant de réaliser une analyse des banques de données afin de savoir si de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ ou de l'intégrine $\alpha v\beta 3$ représente une meilleure valeur prédictive et/ou pronostique.

Le TGF β , comme son récepteur le TGF β RI, fait actuellement l'objet d'un réel engouement comme l'attestent les premiers essais cliniques menés par différentes équipes (Seoane J, *EACR*, 2010 ; Hau P, *Expert. Rev. Anticancer Ther.*, 2009 *Abst*).

L'inhibition du récepteur TGF β RI semble particulièrement intéressante compte tenu du rôle de ce récepteur dans l'activation des voies de signalisation et de son rôle dans la régulation de l'expression de l'intégrine α 5 β 1. Toutefois, comme pour l'intégrine α 5 β 1, il semble primordial de procéder à une caractérisation du profil moléculaire des patients afin de déterminer les sous-groupes les plus sensibles aux traitements. Dans ce contexte, l'interconnexion existante entre la cavéoline-1, l'intégrine α 5 β 1 et le récepteur TGF β RI permettrait d'établir ce profil moléculaire.

Enfin, l'ensemble de nos résultats a permis de comprendre l'implication de la cavéoline-1 dans la modulation phénotypique des cellules de glioblastome. Nous avons ainsi pu appréhender la complexité de ces tumeurs et expliquer, en partie, leur hétérogénéité intra- et inter-tumorale. La modulation de l'expression de la cavéoline-1 par les cellules tumorales présente de nombreux intérêts puisque d'une part les cellules qui la sous-expriment sont plus agressives (forte prolifération et forte migration) et que d'autre part les cellules qui la sur-expriment, bien que moins agressives, développent probablement des aptitudes à survivre dans un environnement hostile (hypoxie). La cavéoline-1 est donc une protéine clef dans le contrôle de différentes voies de signalisation fréquemment dérégulées dans les cellules cancéreuses. De plus, nos résultats ont mis en évidence le mécanisme par lequel la cavéoline-1 parvenait à moduler le phénotype de ces cellules. Ainsi, nous avons identifié l'intégrine α 5 β 1 (et le récepteur TGF β RI) comme une cible thérapeutique potentielle dans le traitement des glioblastomes. Toutefois, la classification des patients en sous-groupes semble indispensable compte tenu des résultats que nous avons obtenus et des données de la littérature démontrant l'efficacité d'une thérapie ciblée « à la carte ».

Listes des publications et des communications :

Publications :

- ✚ S. Martin, E.C. Cosset, J. Terrand, A. Maglott, K. Takeda and M. Dontenwill. 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-Mol. Cell Res.* 354-367. 2009.

- ✚ E.C. Cosset, J. Godet, N. Entz-Werlé, E. Guerin, M. Jaillet, E. Pencreach, S. Legrain, S. Froelich, D. Bonnet, M. Dontenwill and S. Martin. Caveolin-1/ $\alpha 5\beta 1$ /TGF β RI: three interconnected markers identified glioblastoma cells allowing a new molecular profiling of human glioma. Soumis.

Communications Orales :

- ✚ E.C. Cosset, D. Bonnet, M. Dontenwill and S. Martin. Nouvelle approche dans le traitement des glioblastomes par inhibition de la voie TGF β /Smad et de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. Présentation orale. Forum des Jeunes Chercheurs Nancy 2009.

- ✚ E.C. Cosset, D. Bonnet, M. Dontenwill and S. Martin. Caveolin-1 / TGF β /Smad and $\alpha 5\beta 1$ integrins connection in human glioblastoma. Présentation orale. Journée Campus 2010.

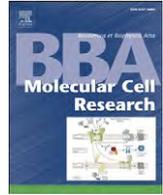
Posters :

- ✚ E.C. Cosset, M. Dontenwill and S. Martin. Regulation of $\alpha 5\beta 1$ expression by caveolin-1 in human glioblastoma. Poster. Journée Campus 2009.

- ✚ E.C. Cosset, D. Bonnet, M. Dontenwill and S. Martin. Caveolin-1, TGF β /Smad and $\alpha 5\beta 1$ integrins connection in human glioblastoma. Poster. Congrès EACR Oslo 2010.

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.

Dans cette publication nous mettons en évidence la nature de la contribution de la cavéoline-1 dans le phénotype des glioblastomes. Ainsi, nous avons manipulé l'expression de la cavéoline-1 dans les cellules de glioblastomes U87-MG et montré que l'expression de la cavéoline-1 modulait l'agressivité des cellules de glioblastome. L'analyse du transcriptome des cellules sur- et sous-exprimant la cavéoline-1 a permis de révéler que la principale famille de gènes touchée par la modulation de l'expression de la cavéoline-1 était la famille des intégrines. De plus, nous avons pu identifier l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ comme le médiateur des effets de la cavéoline-1. La clonogénicité et la capacité de migration des cellules de glioblastomes exprimant l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ sont affectées par un traitement avec un antagoniste spécifique de l'intégrine, le SJ749. L'ensemble de nos résultats suggèrent que l'intégrine représente une cible thérapeutique dans le traitement des glioblastomes.



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

Université Strasbourg 1 Institut Gilbert Laustriat, CNRS UMR 7175, Illkirch, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 May 2008

Received in revised form 18 September 2008

Accepted 30 September 2008

Available online 17 October 2008

Keywords:

$\alpha_5\beta_1$ integrin

Caveolin-1

$\alpha_5\beta_1$ integrin antagonist

SJ749

Human glioma

ABSTRACT

Caveolin-1 plays a checkpoint function in the regulation of processes often altered in cancer. Although increased expression of caveolin-1 seems to be the norm in the glioma family of malignancies, populations of caveolin-1 positive and negative cells coexist among glioblastoma specimens. As no data are available to date on the contribution of such cells to the phenotype of glioblastoma, we manipulated caveolin-1 in the glioblastoma cell line U87MG. We showed that caveolin-1 plays a critical role in the aggressiveness of glioblastoma. We identified integrins as the main set of genes affected by caveolin-1. We reported here that the phenotypic changes observed after caveolin-1 modulation were mediated by $\alpha_5\beta_1$ integrins. As a consequence of the regulation of $\alpha_5\beta_1$ levels by caveolin-1, the sensitivity of cells to the specific $\alpha_5\beta_1$ integrin antagonist, SJ749, was affected. Mediator of caveolin-1 effects, $\alpha_5\beta_1$ integrin, is also a marker for glioma aggressiveness and an efficient target for the treatment of glioma especially the ones exerting the highest aggressive phenotype.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Caveolin-1 is a scaffolding protein that directly interacts with several signaling molecules (growth factor receptors, kinases, G-proteins and adhesion molecules) in caveolae to control their subcellular distribution and activation status [1–3]. Additionally, caveolin-1 was described as a direct or indirect regulator of genes involved in tumor development and progression (IGFR [4], BRCA1 [5], ER α [6], cyclin D1 [7] and survivin [8]). Such checkpoint functions confer to caveolin-1 a crucial role in the regulation of proliferation, differentiation, apoptosis, adhesion and invasion. It is therefore not surprising that sporadic mutations or altered expression of caveolin-1 are often observed during cell transformation, invasion and metastasis. Despite significant studies done over the last ten years showing the role of caveolin-1 in malignancy, its function remains complex and controversial. Caveolin-1 was described either as a tumor suppressor or as a tumor promoter given its levels in tumors versus non neoplastic tissues [9,10]. Such contradictions tend to be explained by the fact that the expression of caveolin-1 undergoes dynamic changes during tumor progression. Downregulated during cell transformation by oncogenes or environmental carcinogens to allow proliferation,

caveolin-1 happens to be overexpressed in malignant and metastatic tumors to promote survival and multidrug resistance [9]. Such biphasic expression pattern of caveolin-1 seems therefore intimately linked to the protein function.

Glioblastoma is the most common intrinsic brain tumor in adults and is nearly uniformly fatal. Despite advances in neuroimaging, neurosurgery, radiation and medical oncology, the prognosis for patient with glioblastoma did not improve in the last 30 years with a median survival of 9–15 months [11]. Although increased expression of caveolin-1 seems to be a norm in the glioma family of malignancies (<http://cgap.nci.nih.gov>) [12–17], Cassoni et al. recently showed that caveolin-1 immunoreactivity is variably displayed among glioma. In half of the glioblastoma specimens studied, only 25–75% of neoplastic cells stained positive for caveolin-1 [17] suggesting that populations of caveolin-1 positive and negative cells coexist among glioblastoma specimens. No data are available to date on the contribution of such cells to the phenotype of glioblastoma. Therefore, we manipulated the levels of caveolin-1 in a glioblastoma cell line (U87MG) and showed that its reduction shifted cells towards an even more aggressive phenotype as conversely the forced expression of caveolin-1 slowed down proliferation, clonogenicity and invasion. Using PCR array strategies, we showed that only 20% of the genes studied were significantly affected by caveolin-1. Half of them belonged to the integrin family and their expression was always inversely correlated to caveolin-1. We showed that $\alpha_5\beta_1$ integrin mediates the phenotypic alterations observed after caveolin-1 manipulation. Finally, as a consequence of the regulation of $\alpha_5\beta_1$ levels by caveolin-1, the sensitivity of cells to the specific $\alpha_5\beta_1$ integrin antagonist, SJ749, was modulated.

[☆] Grant support: Ligue contre le Cancer and INCa.

^{☆☆} The authors acknowledge and dedicate this work in memory of Dr Klotz deceased June 2005 who contributed to the synthesis of SJ749.

^{*} Corresponding author. Université Strasbourg 1 Institut Gilbert Laustriat, CNRS UMR 7175, Faculté de Pharmacie, 74, route du Rhin, 67400 Illkirch, France. Tel.: +33390244267; fax: +33390244313.

E-mail address: Sophie.Martin@pharma.u-strasbg.fr (S. Martin).

2. Materials and methods

2.1. Cell lines, culture conditions and transfection

A172 and U87MG cell lines (ATCC) were cultured in EMEM supplemented with 10% heat-inactivated FCS and 0.6 mg/ml glutamine (Biowittaker). When indicated, transfections of the plasmids constructs or siRNA were performed using Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) or Arrest-In™ (OpenBiosystems) following the manufacturer's instructions.

2.2. Chemicals

SJ749 ((S)-2-[(2,4,6-trimethylphenyl) sulfonyl] amino-3-[7-benzoyloxycarbonyl-8-(2-pyridinylaminomethyl)-1-oxa-2,7-diazaspiro-(4,4)-non-2-en-3-yl] carbonylamino] propionic acid) was synthesized as described in the patent WO 97/33887. U0126 was obtained by Cell Signaling and used at the concentration of 10 μ M for 24 h.

2.3. Small interfering RNA and plasmids

Non silencing siRNA (siRNA_{control}), caveolin-1-targeting siRNA (siRNA_{cav-1}), α_2 integrin subunit-targeting siRNA (siRNA _{α_2}) and α_5 integrin subunit-targeting siRNA (siRNA _{α_5}) were obtained from Dharmacon Research and transfected at 100 nM for 72 h as recom-

mended. Non silencing shRNA (shRNA_{control}), caveolin-1-targeting shRNA (shRNA_{cav-1}) and α_5 -targeting shRNA (shRNA _{α_5}) already subcloned into the pSHAG-MAGICS2 (pSM2) plasmid were obtained from OpenBiosystems. EGFP-tagged caveolin-1 (pEGFP_{cav-1}) construct was created by introducing HindIII and BamHI restriction sites in 5' and 3' of the caveolin-1 CDS by PCR and by subcloning the resulting HindIII/BamHI fragment into a pEGFP-N3_{control} expression vector (BD Biosciences Clontech). pcDNA _{α_5} was obtained by subcloning the human α_5 cDNA of the pECE _{α_5} integrin plasmid (provided by Dr. E. Ruoslahti, The Burnham Institute, La Jolla, CA) in the XbaI/NotI sites of the expression vector pcDNA3.1 (Invitrogen). Stable cell lines were obtained after transfection of 1 μ g of each plasmid and selection with adequate antibiotics. Expression and functionality of the constructs were confirmed by western blot, qPCR and/or confocal microscopy.

2.4. Real-time quantitative PCR

RNA was extracted using Trizol and was transcribed into cDNA using high capacity cDNA kit (Applied Biosystems). Real-time quantitative PCR was performed using the ABI7000 SYBRGreen PCR detector with the following probes: cyclophilin forward 5'-CAGGTCCTGGCATCTTGTCC-3' and reverse 5'-TTGCTGTCTTGCCATTCT-3'; ITGA5 forward 5'-GGGCAGCAGGACAGGGTAC-3' and reverse 5'-GCCTTGCCAGAAATAGC TTCC-3'; ITGB1 forward 5'-CAAATTTGGGTGGTGCACA-3' and reverse

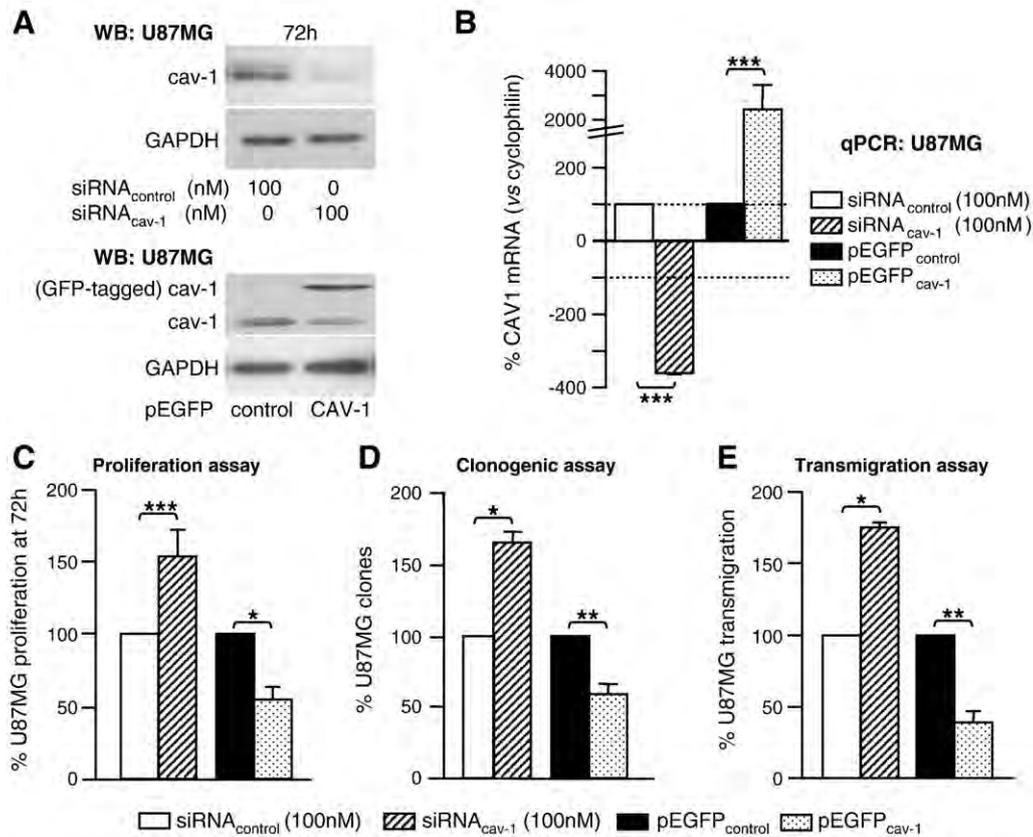


Fig. 1. Caveolin-1 modulates growth, clonogenicity and transmigration. (A) Expression of caveolin-1 (cav-1) and GAPDH was determined by western blot (WB) in U87MG transfected transiently with siRNA_{control} or siRNA_{cav-1} (100 nM for 72 h) or stably with pEGFP_{control} or pEGFP_{cav-1}. Western blots are representative of 3–5 independent experiments. (B) CAV1 mRNA (caveolin-1) was determined by qPCR in U87MG transfected transiently with siRNA_{control} or siRNA_{cav-1} (100 nM for 72 h) or stably with pEGFP_{control} or pEGFP_{cav-1}. Histograms represent the percentage of increase or decrease of CAV1 mRNA in siRNA_{cav-1}- and pEGFP_{cav-1}-transfected cells versus respective control (i.e. siRNA_{control} and pEGFP_{control}) normalized with the reporter gene, cyclophilin. (C) Proliferation of U87MG transfected transiently with siRNA_{control} or siRNA_{cav-1} (100 nM for 72 h) or stably with pEGFP_{control} or pEGFP_{cav-1} was determined at 72 h using the MTS assay. Histograms represent the percentage of proliferation of siRNA_{cav-1}- and pEGFP_{cav-1}-transfected cells versus respective control (i.e. siRNA_{control} and pEGFP_{control}). (D) Clonogenicity of U87MG transfected transiently with siRNA_{control} or siRNA_{cav-1} (100 nM for 72 h) or stably with pEGFP_{control} or pEGFP_{cav-1} was determined using the clonogenic assay. Histograms represent the percentage of residual clones formed by siRNA_{cav-1}- and pEGFP_{cav-1}-transfected cells versus respective control (i.e. siRNA_{control} and pEGFP_{control}) after 72 h growth in 2%-FCS medium and 6 days regrowth. Plating efficiency is 0.5±0.2, 0.8±0.3, 0.5±0.1 and 0.3±0.1 for siRNA_{control}, siRNA_{cav-1}, pEGFP_{control} and pEGFP_{cav-1} respectively. (E) Transmigration of U87MG transfected transiently with siRNA_{control} or siRNA_{cav-1} (100 nM for 72 h) or stably with pEGFP_{control} or pEGFP_{cav-1} was determined using fibronectin (FN)-coated Transwell. Histograms represent the percentage of siRNA_{cav-1}- and pEGFP_{cav-1}-transfected cells which transmigrated through FN versus respective control (i.e. siRNA_{control} and pEGFP) after 24 h. Data are represented as mean (n=3–5)±SEM (*P<0.05, **P<0.01 and ***P<0.001).

5'-TGGAGGGCAACCCTTCTTT-3'; PAI1 forward 5'-GGCTGACTT CAC-GAGTCTTTCA-3' and reverse 5'-GTTCACTCGATCTTCACTTCTG-3'; CAV1 forward 5'-ACCGCGACCTAAACACCTC-3' and reverse 5'-CCTTCAAATGCCGTCAAAA-3' (Invitrogen). Relative levels of mRNA gene expression were calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [18].

2.5. PCR array

PCR array were performed according to the manufacturer's protocol (SuperArray). Briefly, 1 μ g cDNA (obtained from RNA using the RT² PCR

Array First Strand Kit (SuperArray)) was mixed with a ready to use RT² Real-Time SYBR Green PCR master mix (SuperArray) and aliquoted into a 96-well plate containing pre-dispensed gene-specific primer sets (RT² Profiler™ PCR Array, Human Cancer PathwayFinder™). Real-Time PCR was performed according to manufacturer's protocol and analyzed as described above.

2.6. Western blot

Cells were lysed 30 min on ice in ice-cold lysis buffer (1% Triton-X100, NaF 100 mM, NaPPi 10 mM, Na₃VO₄ 1 mM in PBS, supplemented with

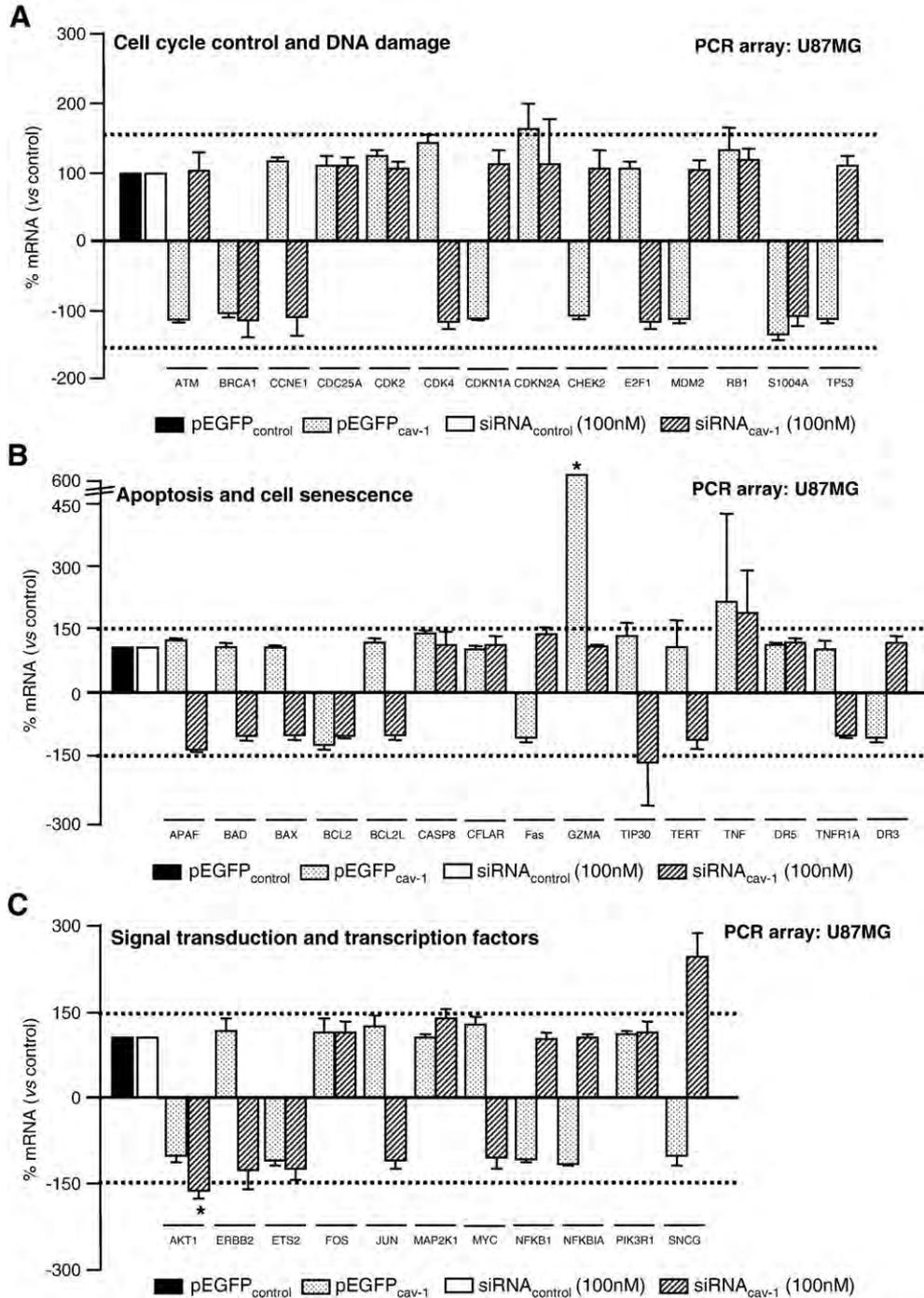


Fig. 2. Transcriptome analysis of siRNA_{control}-, siRNA_{cav-1}-, pEGFP_{control}- or pEGFP_{cav-1}-transfected U87MG using PCR arrays. mRNA of genes involved in the regulation of (A) cell cycle/ DNA damage, (B) apoptosis/cell senescence, (C) signal transduction/transcription, (D) angiogenesis, (E) invasion/metastasis and (F) adhesion was determined by PCR array (qPCR) in U87MG transfected transiently with siRNA_{control} or siRNA_{cav-1} (100 nM for 72 h) or stably with pEGFP_{control} or pEGFP_{cav-1}. Histograms represent the percentage of increase or decrease of each gene mRNA in siRNA_{cav-1}- and pEGFP_{cav-1}-transfected cells versus respective control (i.e. siRNA_{control} and pEGFP_{control}) normalized to the reporter genes, B2M, HGPRT/HPRT, RPL13A, G3PD/GAPD, b-ACTIN. Columns, means of 3 independent experiments; bars, SEM with * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

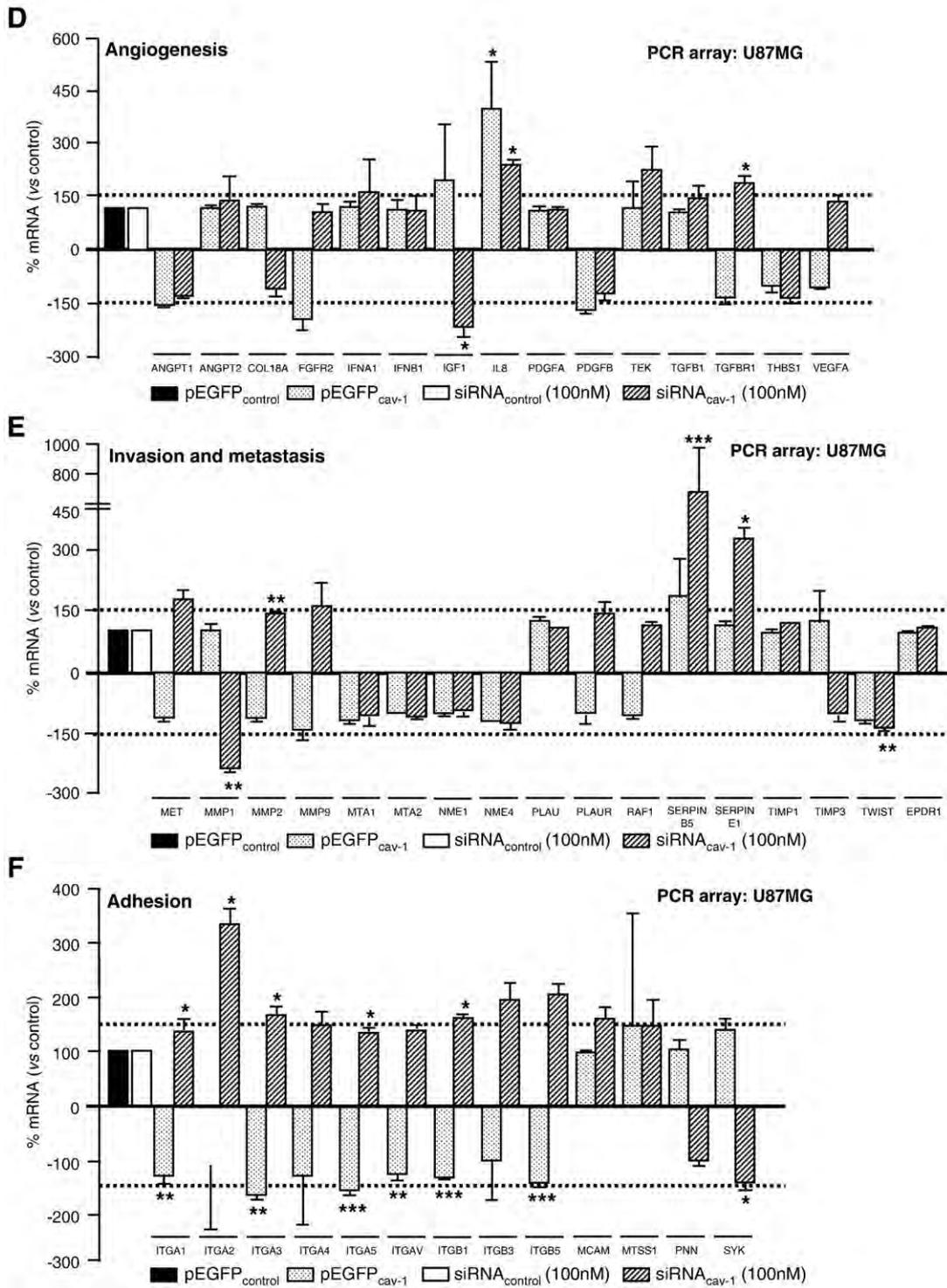


Fig. 2 (continued).

Complete anti-protease cocktail; Roche). For PAI-1 detection, samples were prepared from FCS-free conditioned media. Protein (10 µg) was separated by SDS-PAGE (BioRad) and transferred to PVDF membranes (Amersham). For phosphorylation detection, cells were directly lysed in Laemmli buffer (BioRad) supplemented by β-mercaptoethanol (1:20). Blots were probed with anti-α₁ (1:200, R-164, Santa Cruz Biotchnologies), anti-α₂ (1:200, N-19, Santa Cruz Biotchnologies), anti-α₃ (1:1000, AB1920, Chemicon), anti-α_v (1:3000, AB1930, Chemicon), anti-α₅ (1:4000, AB1928, Chemicon), anti-β₁ (1:1000, 9EG7, gift from Dr. Vestweber), anti-GFP (1:3000, Roche), anti-caveolin-1 (1:1000, N-20, Santa Cruz

Biotchnologies), anti-PAI-1 (1:1000, H-135, Santa Cruz Biotchnologies), phospho-MAPK family antibodies and MAPK family antibodies (Sampler kit #9910 and #9926, Cell Signaling) and anti-GAPDH (1:50000, MAB374, Chemicon) followed by the HRP-conjugated antibodies (1:10000, Promega). The proteins were visualized with enhanced chemiluminescence.

2.7. Flow cytometry

Cells (2 × 10⁵) were incubated 30 min at room temperature with 10 µg/ml anti-α₅ (MAB11, gift from Dr. Humphries, King's College,

London, UK) or with 1:50 dilution anti- β_1 (TS2/16, gift from Dr. Georges-Labouesse, IGBMC, Strasbourg, France) in PBS/0.1% azide/1% FBS. After washing, cells were incubated with the indicated ALEXA⁴⁸⁸- or PE-labeled secondary antibody (Molecular Probes, 1:100) 30 min in the dark at room temperature. After washing, cells were resuspended in 500 μ l PBS/0.1% azide/1% FCS. Surface expressions of integrins were measured with a FACS Calibur (Becton Dickinson, Flow cytometry facility, IGBMC, Strasbourg).

2.8. Adhesion assay

Cells (2×10^5 /well, 96 well plate) were plated on poly-L-lysine (PL, 100 μ g/ml, Sigma), fibronectin (FN, 10 μ g/ml, Calbiochem) or collagen type I (COL, 10 μ g/ml, Sigma)-coated 96 well plates for 1 h. Adhesion was measured after coloration with 0.1% crystal violet by absorbance reading at 595 nm and expressed as a percentage of adhesion versus control on poly-L-lysine.

2.9. Proliferation assay

Cells (1×10^3 /well, 96 well plate) were plated on plastic and cell viability was determined after 72 h by CellTiter96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) according to manufacturer's instruction.

2.10. Transmigration assay

Transwell polycarbonate membrane inserts (24 well, 8 μ m pores, Corning) were coated 1 h at room temperature under laminar flow with 10 μ g/ml fibronectin. The lower compartments were filled with 10% FCS culture medium and 2×10^5 cells were seeded onto the filters in 0% FCS culture medium containing either solvent (50% H₂O/50% methanol) or 10 μ M SJ749 for 24 h. Cells that had transmigrated and adhered to the lower surface were fixed in 4% paraformaldehyde for 10 min and stained with 0.1% crystal violet and counted. No cells were detected in the lower chamber.

2.11. Clonogenic assay

After attachment (250 cells/well, 6 well plate), cells were left untreated or treated with solvent (50% H₂O/50% methanol) or SJ749 (10 and 30 μ M) for 72 h in 2%-FCS containing medium. Medium was refreshed and cells were allowed to regrow in fresh 10%-FCS containing medium for 6 days. Clonogenic survival was determined by counting residual clones stained with 0.1% crystal violet. Results were expressed either as the percentage of clones versus control or when performed in the presence of SJ749 as surviving fraction. The surviving fraction was determined as: SF=PE of experimental group/PE of control group. The plating efficiency was determined as: PE=number of surviving cells/number of cells plated. PE are indicated for each cell line in the figure legend.

2.12. Statistical analysis

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

3. Results

3.1. Caveolin-1 modulates growth, clonogenicity and transmigration

To directly assess the role of caveolin-1 in human glioblastoma, we modulated its expression in the human glioblastoma cell line U87MG. Depletion (in siRNA_{cav-1}- versus siRNA_{control}-transfected cells) and overexpression (in pEGFP_{cav-1}- versus pEGFP_{control}-transfected

cells) of caveolin-1 were detected at the protein and mRNA level (Fig. 1A, B). Abrogation or forced expression of caveolin-1 in U87MG significantly influenced U87MG phenotype. Downregulation of caveolin-1 increases proliferation, clonogenicity and transmigration ($53 \pm 19\%$, $65 \pm 8\%$ and $75 \pm 3\%$ increase respectively in siRNA_{cav-1} versus siRNA_{control}; Fig. 1C–E). Opposite effects were observed when caveolin-1 was overexpressed as proliferation, clonogenicity and transmigration was reduced ($47 \pm 8\%$, $42 \pm 8\%$ and $67 \pm 7\%$ reduction respectively in pEGFP_{cav-1} versus pEGFP_{control}; Fig. 1C–E). Data suggest that caveolin-1 expression correlates with glioma aggressiveness.

3.2. Caveolin-1 regulates genes involved in cell invasion, metastasis and adhesion especially integrins

PCR arrays (Human Cancer Pathways) were undertaken to clarify how caveolin-1 affects U87MG phenotype. Among the genes screened, only 20% were significantly affected by the modulation of caveolin-1 (Fig. 2). Two major classes of genes were modulated by caveolin-1. The first one includes genes involved in the regulation of cell invasion and metastasis (6%, MMP1, MMP2, SERPINE1, SERPINB5 and TWIST, Fig. 2E). To validate PCR array data obtained for this group of genes, we selected SERPINE1 (PAI-1). PAI-1 is a serine protease inhibitor involved in extracellular matrix turnover and regulation of glioma cell motility and invasion. qPCR and western blot analysis of PAI-1 showed that PAI-1 was inversely correlated to caveolin-1 expression. Downregulation of caveolin-1 up regulates PAI-1 both at the mRNA and protein level ($275 \pm 35\%$ and $350 \pm 100\%$ increase of PAI-1 mRNA and protein respectively in shRNA_{cav-1} versus shRNA_{control}; Fig. 3A, B). Conversely, overexpression of caveolin-1 downregulates PAI-1 both at the mRNA and protein level ($71 \pm 11\%$ and $499 \pm 189\%$ decrease of PAI-1

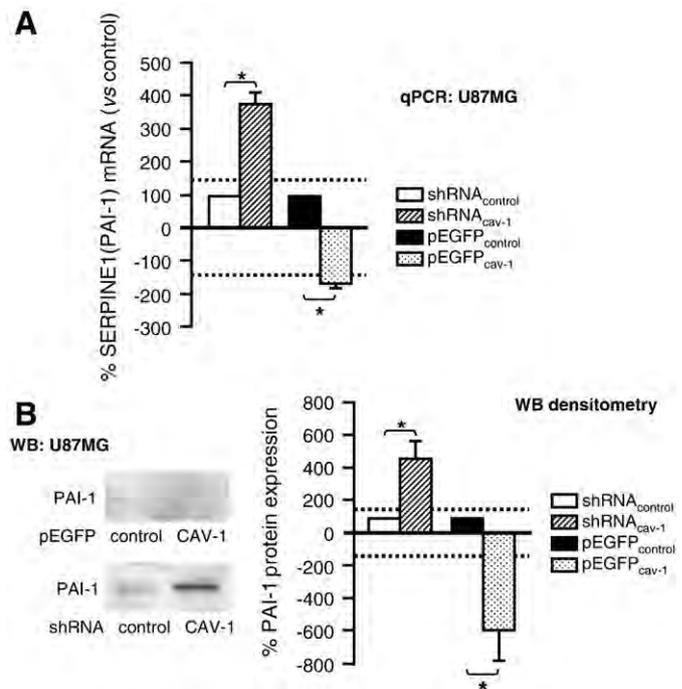


Fig. 3. Caveolin-1 regulates PAI-1 expression. (A) SERPINE1 (PAI-1) mRNA was determined by qPCR in U87MG transfected stably with shRNA_{control}, shRNA_{cav-1}, pEGFP_{control} or pEGFP_{cav-1}. Histograms represent the percentage of increase or decrease of SERPINE1 mRNA in shRNA_{cav-1}- and pEGFP_{cav-1}-transfected cells versus respective control (i.e. shRNA_{control} and pEGFP_{control}) normalized with the reporter gene, cyclophilin. (B) Expression of PAI-1 was determined by western blot (WB) in the supernatant of U87MG transfected stably with shRNA_{control}, shRNA_{cav-1}, pEGFP_{control} or pEGFP_{cav-1}. Western blots are representative of 3–5 independent experiments. Histograms show the percentage of PAI-1 protein expression determined by densitometry analysis in shRNA_{cav-1}- and pEGFP_{cav-1}-transfected cells versus respective control (i.e. shRNA_{control} and pEGFP_{control}). Data are represented as mean (*n* = 3–5) \pm SEM (**P* < 0.05).

mRNA and protein respectively in pEGFP_{cav-1} versus pEGFP_{control}, Fig. 3A, B).

The second set of genes modulated by caveolin-1 includes genes involved in the regulation of cell adhesion (10%, ITGA1, ITGA2, ITGA3, ITGA4, ITGA5, ITGAV, ITGB1, ITGB3 and ITGB5, Fig. 2F). The later class was interesting not only because it represented half of the genes affected by caveolin-1, but because their expression was inversely correlated with caveolin-1. Therefore, caveolin-1 might control the function of the collagen receptor $\alpha_2\beta_1$, the laminin receptor $\alpha_3\beta_1$ and the fibronectin receptors $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_v\beta_3/\beta_5$. Although modulation of caveolin-1 significantly affected α_1 at the mRNA level (25±13% decrease of α_1 mRNA in pEGFP_{cav-1} versus pEGFP_{control} and 32±23% increase of α_1 mRNA in siRNA_{cav-1} versus siRNA_{control}, Fig. 2F), the protein could not be detected. α_4 and β_3 were not significantly altered at the mRNA level. Although modulation of caveolin-1 significantly affected α_3 and α_v at the mRNA level (39±12% and 20±14% decrease of α_3 and α_v mRNA respectively in pEGFP_{cav-1} versus pEGFP_{control} and 67±28% and 37±11% increase of α_3 and α_v mRNA respectively in siRNA_{cav-1} versus siRNA_{control}, Fig. 2F), down-regulation of caveolin-1 had no effect on $\alpha_{3/V}$ protein levels while caveolin-1 up-regulation decreased $\alpha_{3/V}$ protein levels (41±5% and 26±7% decrease of α_3 and α_v protein respectively in pEGFP_{cav-1} versus pEGFP_{control}, Supplementary data).

However, down-regulation of caveolin-1 up regulates α_2 , α_5 and β_1 both at the mRNA and protein level (231±23%, 35±7% and 61±6% increase of α_2 , α_5 and β_1 mRNA respectively and 83±16%, 50±10% and 80±20% increase of α_2 , α_5 and β_1 protein respectively in siRNA_{cav-1} versus siRNA_{control}, Fig. 4A, B and Supplementary data). Conversely, overexpression of caveolin-1 downregulates α_2 , α_5 and β_1 both at the mRNA and protein level (56±9% and 31±4% decrease of α_5 and β_1 mRNA respectively and 39±4%, 50±17% and 62±9% decrease of α_2 , α_5 and β_1 protein respectively in pEGFP_{cav-1} versus pEGFP_{control}, Fig. 4A, B and Supplementary data). Similar data were obtained in another glioma cell line, A172 (Fig. 4C). By flow cytometry, we showed that downregulation of caveolin-1 increases $\alpha_5\beta_1$ integrin surface expression (25±5% and 44±14% increase of α_5 and β_1 respectively in siRNA_{cav-1} versus siRNA_{control}, Fig. 4D). Conversely, overexpression of caveolin-1 reduces the levels of $\alpha_5\beta_1$ integrin exposed at the cell surface (57±10% and 14±2% reduction of α_5 and β_1 respectively in pEGFP_{cav-1} versus pEGFP_{control}, Fig. 4D). Altogether, data suggest that α_2 , α_5 and β_1 integrin subunit expression is inversely correlated to caveolin-1.

We hypothesized that modulation of caveolin-1 would affect cell adhesion to extracellular matrix components as fibronectin and collagen. Inhibition of caveolin-1 increased the attachment to fibronectin (24% increase in siRNA_{cav-1} versus siRNA_{control}, Fig. 4E). Conversely, up-regulation of caveolin-1 reduced cell adhesion to fibronectin (20% decrease in pEGFP_{cav-1} versus pEGFP_{control}, Fig. 4E). No alteration of adhesiveness to collagen was observed under the conditions tested. A series of blocking experiments were undertaken to determine if $\alpha_5\beta_1$ integrins were involved in the regulation of cell adhesiveness observed after caveolin-1 manipulation. As the α_2 integrin subunit was shown to be the only other integrin which expression was inversely correlated to caveolin-1, we down-regulated α_2 and α_5 integrin subunits in cells depleted in caveolin-1 (shRNA_{cav-1}-transfected U87MG in which $\alpha_2\beta_1$ and $\alpha_5\beta_1$ are up-regulated). Although the enhanced attachment of cells to fibronectin was not affected by the removal of the α_2 integrin subunit (19±4% increase in shRNA_{cav-1}/siRNA_{control} and 12±5% increase shRNA_{cav-1}/siRNA _{α_2} versus shRNA_{control}/siRNA_{control}, Fig. 4F left panel), it was totally abolished by the removal of the α_5 integrin subunit (19±4% increase in shRNA_{cav-1}/siRNA_{control} and 3±1% increase shRNA_{cav-1}/siRNA _{α_5} versus shRNA_{control}/siRNA_{control}, Fig. 4F right panel). Again, no alteration of adhesiveness to collagen was observed under the conditions tested. Data suggest for the first time that caveolin-1 controls the expression of a functional $\alpha_5\beta_1$ integrin in glioblastoma with a consequence on the adhesive phenotype of cells.

3.3. Involvement of $\alpha_5\beta_1$ integrins in the phenotypic modulation induced by caveolin-1

As biological effects (proliferation, clonogenicity and transmigration) observed following modulation of caveolin-1 might occur independently of $\alpha_5\beta_1$ integrin, we generated U87MG expressing various levels of the α_5 subunit and compared their phenotype to that of cells expressing various levels of caveolin-1. Depletion (in shRNA _{α_5} - versus shRNA_{control}-transfected cells) and overexpression (in pcDNA _{α_5} - versus pcDNA_{control}-transfected cells) of α_5 was detected at the mRNA and protein levels (Figs. 5A–B). We chose the pcDNA _{α_5} E7 clone that expressed α_5 levels close to those observed in siRNA_{cav-1}-transfected cells and the pcDNA _{α_5} F8 clone that expressed higher levels of α_5 (Fig. 5A, B). No modulation of β_1 or caveolin-1 was observed in any of these cell lines at the protein level, although caveolin-1 mRNA appears significantly increased in cells overexpressing the α_5 subunit (Fig. 5A).

Upregulation of α_5 increases proliferation similarly to that observed in caveolin-1-depleted cells (32±18% and 52±16% increase in pcDNA _{α_5} E7 and pcDNA _{α_5} F8 versus pcDNA_{control} respectively, 53±19% increase in siRNA_{cav-1} versus siRNA_{control}, Fig. 5C). Down-regulation of α_5 decreases proliferation similarly to that observed in caveolin-1-overexpressing cells (39±11% decrease in shRNA _{α_5} D4 versus shRNA_{control}, 47±8% decrease in pEGFP_{cav-1} versus pEGFP_{control}, Fig. 5C). Upregulation of α_5 increases clonogenicity similarly to that observed in caveolin-1-depleted cells (85±30% and 80±24% increase in pcDNA _{α_5} E7 and pcDNA _{α_5} F8 versus pcDNA_{control} respectively, 66±8% increase in siRNA_{cav-1} versus siRNA_{control}, Fig. 5D). Down-regulation of α_5 decreases clonogenicity similarly to that observed in caveolin-1-overexpressing cells (35±5% decrease in shRNA _{α_5} -D4 versus shRNA_{control}, 42±8% decrease in pEGFP_{cav-1} versus pEGFP_{control}, Fig. 5D).

We down-regulated α_2 and α_5 integrin subunits in cells depleted in caveolin-1 (shRNA_{cav-1}-transfected U87MG in which $\alpha_2\beta_1$ and $\alpha_5\beta_1$ are up-regulated). The enhanced clonogenicity of cells was not affected by the removal of the α_2 integrin subunit (46±5% increase in shRNA_{cav-1}/siRNA_{control} and 38±10% increase shRNA_{cav-1}/siRNA _{α_2} versus shRNA_{control}/siRNA_{control}, Fig. 5E left), but it was totally abolished by the removal of the α_5 integrin subunit (46±5% increase in shRNA_{cav-1}/siRNA_{control} and 2±5% increase shRNA_{cav-1}/siRNA _{α_5} versus shRNA_{control}/siRNA_{control}, Fig. 5E right).

Altogether, results suggest that the effects of caveolin-1 on proliferation and clonogenicity of glioblastoma cells were mediated by $\alpha_5\beta_1$ integrins.

3.4. Caveolin-1 affects the effect of SJ749 on clonogenicity and transmigration

We next investigated the consequences of altered caveolin-1 levels on the sensitivity to a non peptidic $\alpha_5\beta_1$ integrin antagonist SJ749. SJ749 dose-dependently reduces the surviving fraction of all cell lines (Fig. 6A). However, SJ749 was more efficient in caveolin-1-depleted cells (45±7% versus 75±7% inhibition at 10 μ M and 80±6% versus 96±3% inhibition at 30 μ M in siRNA_{control} and siRNA_{cav-1} respectively, Fig. 6A). Conversely, over-expression of caveolin-1 reduces the effect of SJ749 (39±11% versus 37±13% inhibition at 10 μ M and 93±1% versus 78±9% inhibition at 30 μ M in pEGFP_{control} and pEGFP_{cav-1} respectively, Fig. 6A).

As glioblastoma are aggressively invasive tumors, the ability of cells to transmigrate in the presence of SJ749 was determined. SJ749 significantly reduces the invasion of all cell lines (Fig. 6B). However, SJ749 was more efficient in caveolin-1-depleted cells (75±4% versus 97±0% inhibition at 10 μ M in siRNA_{control} and siRNA_{cav-1}, Fig. 6B). Conversely, over-expression of caveolin-1 reduces the effect of SJ749 (56±2% versus 44±7% inhibition at 10 μ M in pEGFP_{control} and pEGFP_{cav-1} respectively, Fig. 6B). Thus, data suggest that SJ749 might

be even more efficient in tumors expressing high levels of $\alpha_5\beta_1$ integrin and low levels of caveolin-1.

3.5. Caveolin-1 regulates $\alpha_5\beta_1$ integrins through the MAP kinase pathway

Finally, we analyzed how caveolin-1 might affect $\alpha_5\beta_1$ integrin expression starting with pathways known to be involved in caveolin-1 signaling and in $\alpha_5\beta_1$ integrin regulation, like the mitogen activated protein kinases pathway. Down-regulation of caveolin-1 induced the phosphorylation of p44/42-MAPK, whereas total levels of p44/42-MAPK were unchanged (ratio [phospho-p44/42-MAPK]/[p44/42-MAPK] increases from 0.7 ± 0.1 to $1.1 \pm 0.1\%$ between siRNA_{control} and

siRNA_{cav-1}, Fig. 7A). Conversely, overexpression of caveolin-1 reduces the phosphorylation of p44/42-MAPK, whereas total levels of p44/42-MAPK were unchanged (ratio [phospho-p44/42-MAPK]/[p44/42-MAPK] drops from 0.9 ± 0.1 to $0.6 \pm 0.1\%$ between pEGFP_{control} and pEGFP_{cav-1}, Fig. 7A). In contrast, phosphorylation of p38-MAPK or JNK/SAPK-MAPK was not induced under the condition tested (Fig. 7A). To evaluate the role of p44/42-MAPK in $\alpha_5\beta_1$ integrin induction, cells were treated with the MAPK kinase inhibitor U0126. The induction of both the α_5 and the β_1 integrin subunit observed after down-regulation of caveolin-1 was abolished by U0126 (Fig. 7B). Similar results were observed for the α_2 integrin subunit (not shown). No modulations of the FAK- and β -catenin-dependent signaling pathway were observed in our study (not shown). Thus, data suggest that the

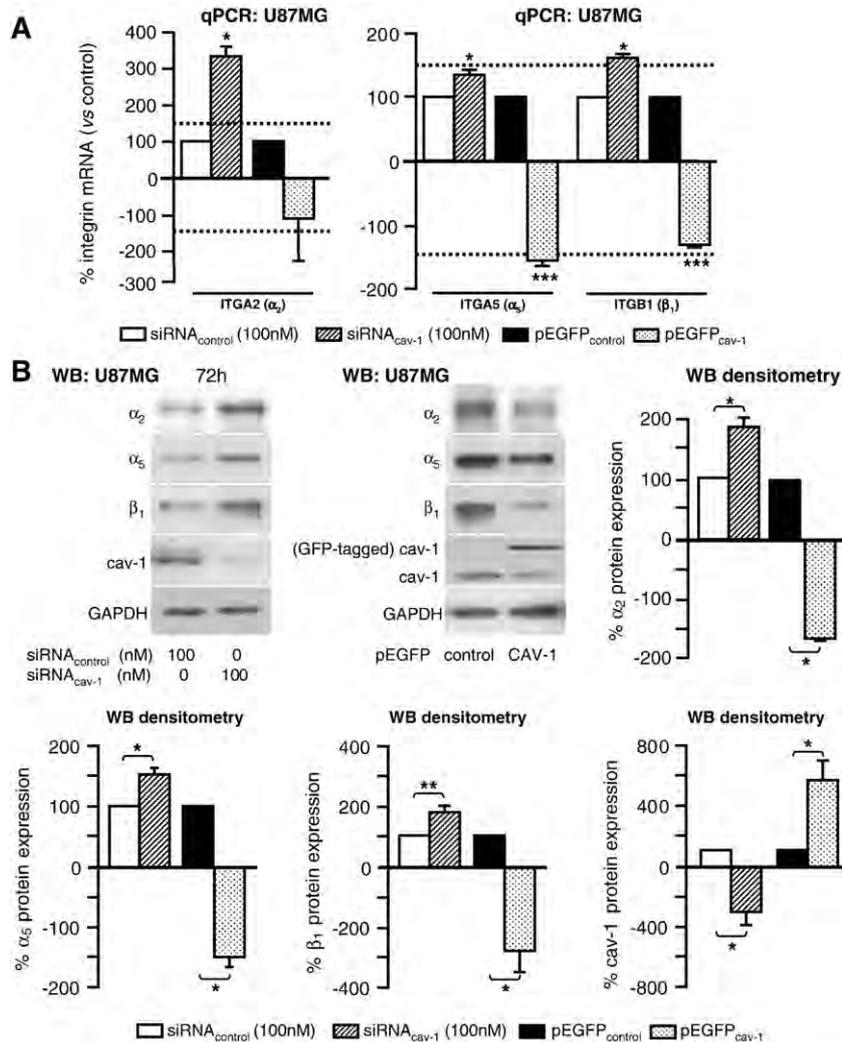


Fig. 4. Caveolin-1 regulates $\alpha_5\beta_1$ integrin expression. (A) ITGA2, ITGA5 and ITGB1 mRNA (α_2 , α_5 and β_1) was determined by qPCR in U87MG transfected transiently with siRNA_{control} or siRNA_{cav-1} (100 nM for 72 h) or stably with pEGFP_{control} or pEGFP_{cav-1}. Histograms represent the percentage of increase or decrease of ITGA2, ITGA5 and ITGB1 mRNA in siRNA_{cav-1}- and pEGFP_{cav-1}-transfected cells versus respective control (i.e. siRNA_{control} and pEGFP_{control}) normalized with the reporter gene, cyclophilin. (B) Expression of α_2 , α_5 , β_1 , caveolin-1 (cav-1 or GFP-tagged cav-1) and GAPDH was determined by western blot (WB) in U87MG transfected transiently with siRNA_{control} or siRNA_{cav-1} (100 nM for 72 h) or stably with pEGFP_{control} or pEGFP_{cav-1}. Western blots are representative of 3–5 independent experiments. Histograms show the percentage of α_2 , α_5 , β_1 and caveolin-1 (cav-1) protein expression determined by densitometry analysis in siRNA_{cav-1}- and pEGFP_{cav-1}-transfected cells versus respective control (i.e. siRNA_{control} and pEGFP_{control}) normalized with GAPDH. (C) Expression of α_5 , β_1 , caveolin-1 (cav-1 or GFP-tagged cav-1) and GAPDH was determined by western blot (WB) in A172 transfected transiently with siRNA_{control} or siRNA_{cav-1} (100 nM for 72 h) or stably with pEGFP_{control} or pEGFP_{cav-1}. Western blots are representative of 3–5 independent experiments. (D) Cell surface expression of α_5 and β_1 was determined by flow cytometry in U87MG transfected transiently with siRNA_{control} or siRNA_{cav-1} (100 nM for 72 h) or stably with pEGFP_{control} or pEGFP_{cav-1}. Secondary antibodies were IgG-Alexa488 for siRNA-transfected cells and IgG-PE for EGFP-transfected cells. Histograms show the percentage of α_5 and β_1 expression determined in siRNA_{cav-1}- and pEGFP_{cav-1}-transfected cells versus respective control (i.e. siRNA_{control} and pEGFP_{control}) normalized with IgG control. (E) Adhesion of U87MG transfected transiently with siRNA_{control} or siRNA_{cav-1} (100 nM for 72 h) or stably with pEGFP_{control} or pEGFP_{cav-1} was determined using the adhesion assay on poly-L-lysine (PL, 100 μ g/ml), fibronectin (FN, 10 μ g/ml) and collagen (COL, 10 μ g/ml). Histograms show the percentage of adhesion of siRNA_{cav-1}- and pEGFP_{cav-1}-transfected cells versus respective control (i.e. siRNA_{control} and pEGFP_{control}) on FN and COL with the non specific adhesion on PL representing the maximum cell adhesion used for normalization. Data are represented as mean ($n=3-5$) \pm SEM (* $P<0.05$, ** $P<0.01$ and *** $P<0.001$). (F) Adhesion of shRNA_{control}- and shRNA_{cav-1}-stably transfected U87MG transiently co-transfected with siRNA_{control}, siRNA α_2 or siRNA α_5 (100 nM for 72 h) was determined using the adhesion assay on poly-L-lysine (PL, 100 μ g/ml) and fibronectin (FN, 10 μ g/ml). Western blot show the levels of the α_2 and α_5 integrin subunit and GAPDH in each conditions. Histograms show the percentage of adhesion on FN with the non specific adhesion on PL representing the maximum cell adhesion used for normalization. Data are represented as mean ($n=4-6$) \pm SEM (^{ns} $P>0.05$, * $P<0.05$).

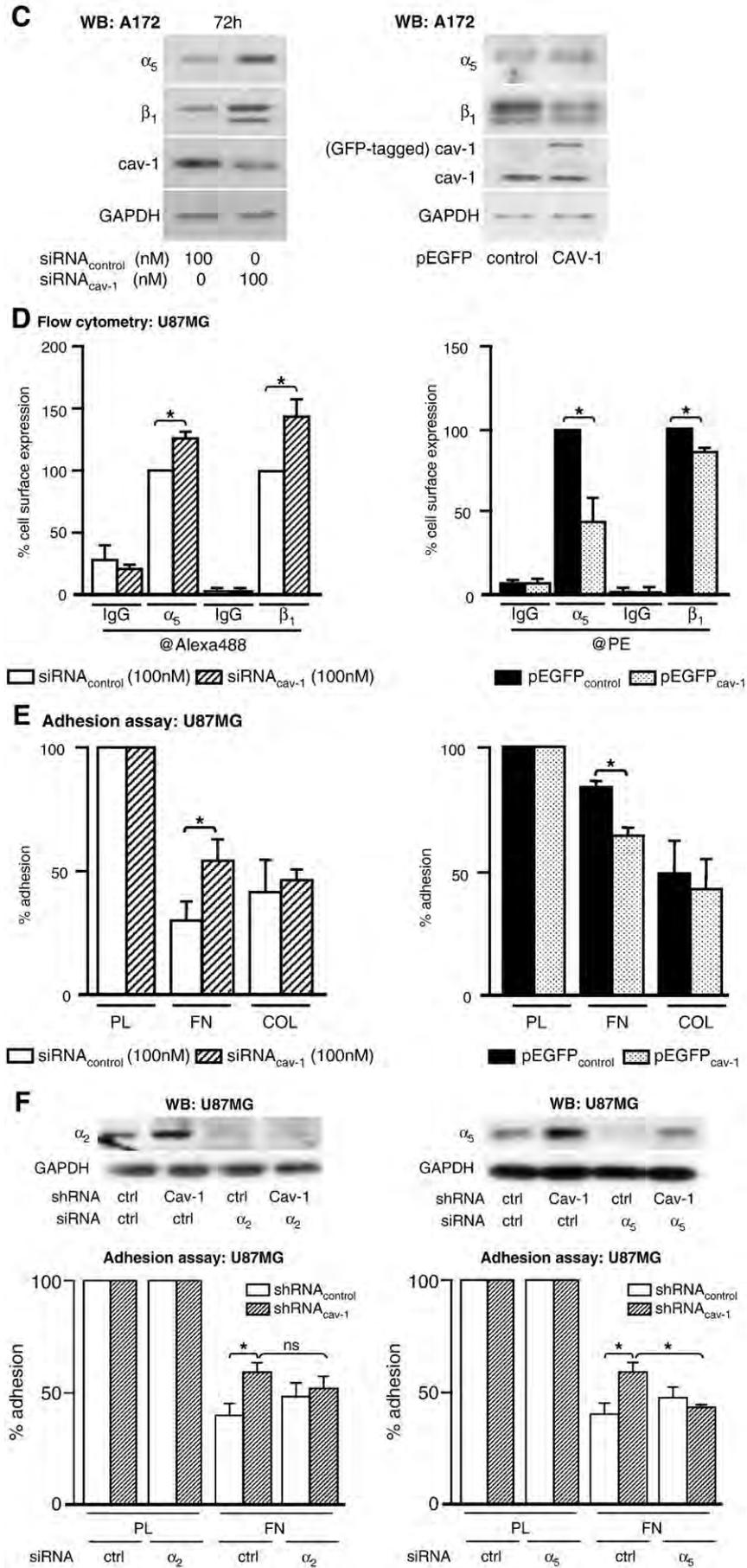


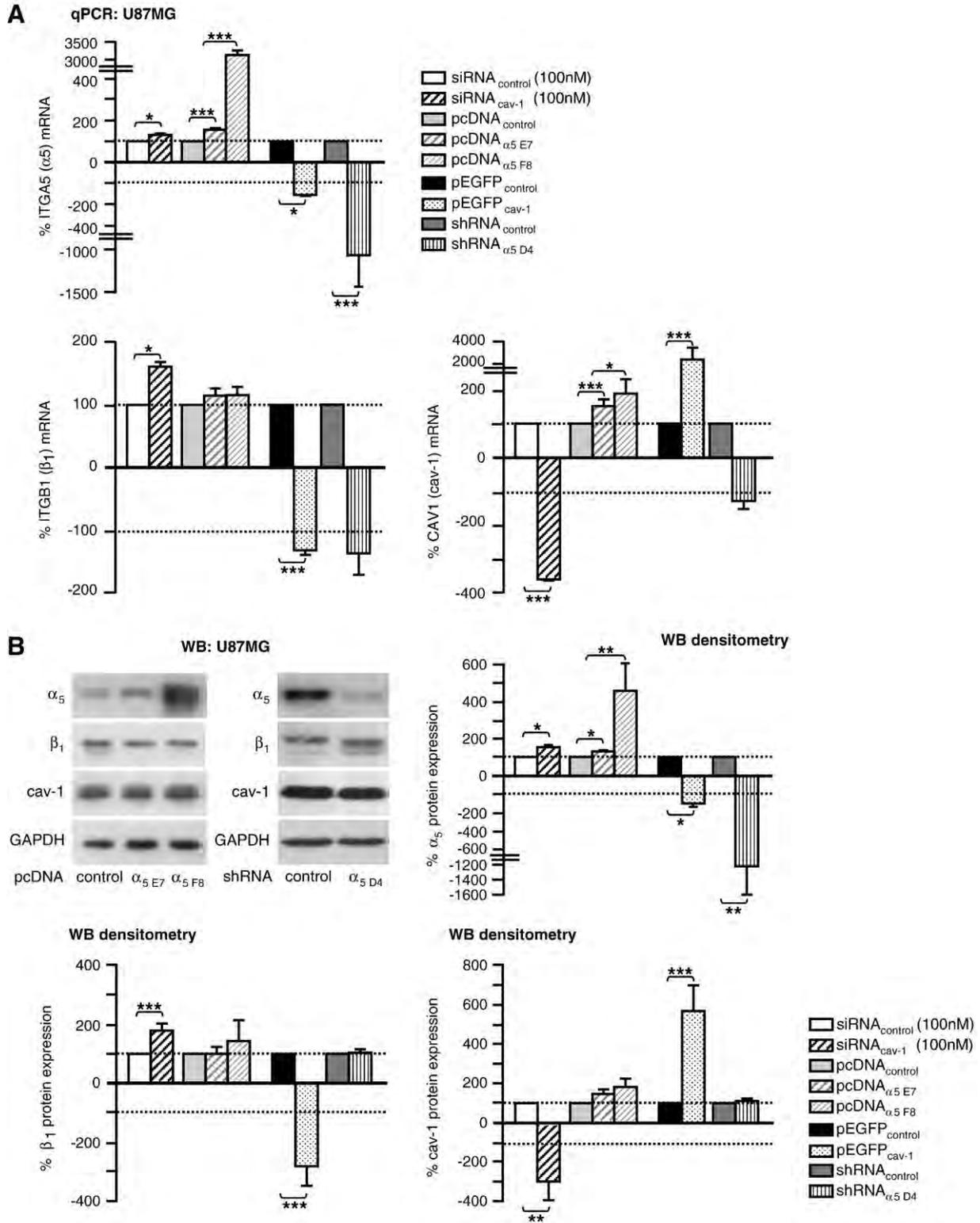
Fig. 4 (continued).

p44/42-MAPK pathway plays a crucial role in the regulation of $\alpha_5\beta_1$ integrin by caveolin-1.

4. Discussion

Despite several studies showing that caveolin-1 expression is increased but variably displayed in astroglial-derived tumors (<http://cgap.nci.nih.gov>) [12–17], the biological significance of caveolin-1 in

glioblastoma remains unknown. Our study showed that modulation of caveolin-1 expression in U87MG greatly modifies the pattern of growth, clonogenicity and transmigration. The reduction of caveolin-1 expression renders U87MG more proliferative, invasive and increased their clonogenic capacity. Conversely, increased expression of caveolin-1 slowed down proliferation, clonogenicity and transmigration of U87MG. Thus caveolin-1 expression seems correlated to glioma aggressiveness. Importantly, data highlight care that must be taken



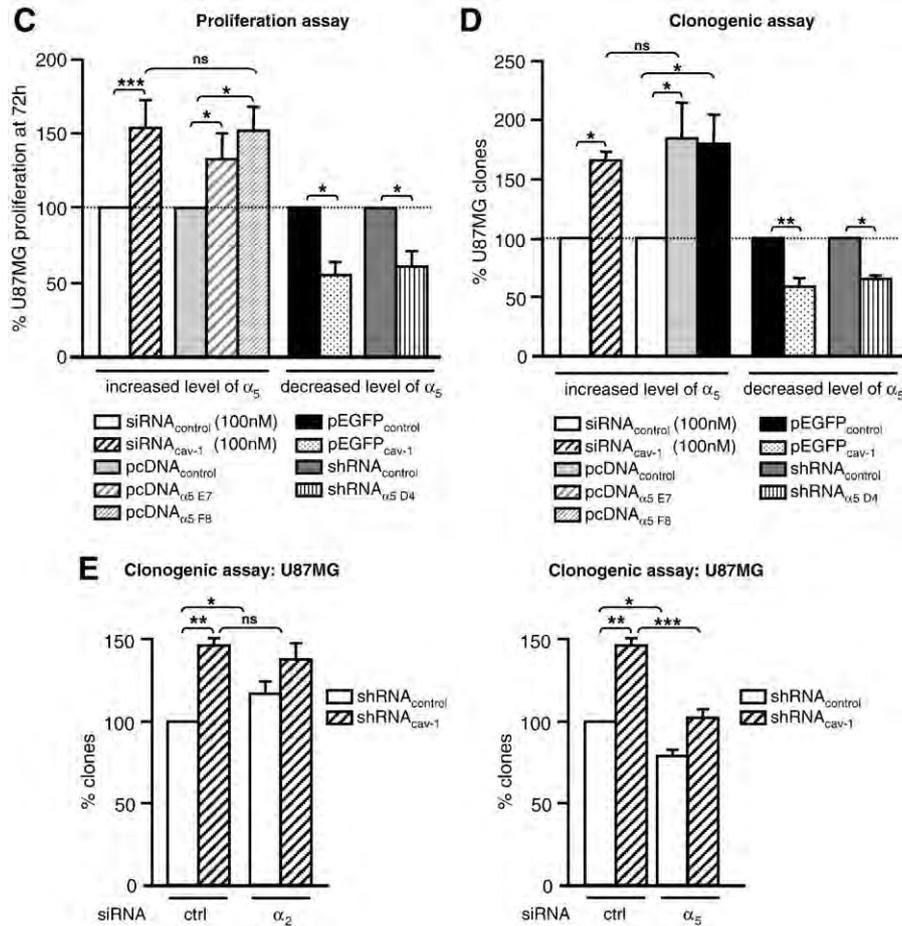


Fig. 5. Involvement of $\alpha_5\beta_1$ integrin in the phenotypic modulation induced by caveolin-1. (A) ITGA5, ITGB1 and CAV1 (α_5 , β_1 , caveolin-1) mRNA was determined by qPCR in U87MG transfected transiently with siRNA_{control} or siRNA_{cav-1} (100 nM for 72 h) or stably with pcDNA_{control} or pcDNA α_5 (clones E7 and F8), pEGFP_{control} or pEGFP_{cav-1}, shRNA_{control} or shRNA α_5 (clone D4). Histograms represent the percentage of increase or decrease of ITGA5, ITGB1 and CAV1 mRNA in siRNA_{cav-1}, pcDNA α_5 E7-, pcDNA α_5 F8-, EGFP_{cav-1}- and shRNA α_5 D4-transfected cells versus respective control (i.e. siRNA_{control}, pcDNA_{control}, pEGFP_{control} and shRNA_{control}) normalized with the reporter gene, cyclophilin. (B) Expression of α_5 , β_1 , caveolin-1 (cav-1) and GAPDH was determined by western blot (WB) in U87MG transfected stably with pcDNA_{control}, pcDNA α_5 (clones E7 and F8), shRNA_{control} or shRNA α_5 (clone D4). Western blots are representative of 3–5 independent experiments. Histograms show the percentage of α_5 , β_1 and caveolin-1 (cav-1) protein expression determined by densitometry analysis in siRNA_{cav-1}-, pcDNA α_5 E7-, pcDNA α_5 F8-, EGFP_{cav-1}- and shRNA α_5 D4-transfected cells versus respective control (i.e. siRNA_{control}, pcDNA_{control}, pEGFP_{control} and shRNA_{control}) normalized with GAPDH. (C) Proliferation of U87MG transfected transiently with siRNA_{control} or siRNA_{cav-1} (100 nM for 72 h) or stably with pcDNA_{control} or pcDNA α_5 (clones E7 and F8), pEGFP_{control} or pEGFP_{cav-1}, shRNA_{control} or shRNA α_5 (clone D4) was determined at 72 h using the MTS assay. Histograms represent the percentage of proliferation of siRNA_{cav-1}-, pcDNA α_5 E7-, pcDNA α_5 F8-, EGFP_{cav-1}- and shRNA α_5 D4-transfected cells versus respective control (i.e. siRNA_{control}, pcDNA_{control}, pEGFP_{control} and shRNA_{control}). (D) Clonogenicity of U87MG transfected transiently with siRNA_{control} or siRNA_{cav-1} (100 nM for 72 h) or stably with pcDNA_{control} or pcDNA α_5 (clones E7 and F8), pEGFP_{control} or pEGFP_{cav-1}, shRNA_{control} or shRNA α_5 (clone D4) was determined using the clonogenic assay. Histograms represent the percentage of residual clones formed by siRNA_{cav-1}-, pcDNA α_5 E7-, pcDNA α_5 F8-, EGFP_{cav-1}- and shRNA α_5 D4-transfected cells versus respective control (i.e. siRNA_{control}, pcDNA_{control}, pEGFP_{control} and shRNA_{control}) after 72 h growth in 2%-FCS medium and 6 days regrowth. Data are represented as mean ($n=3-5$) \pm SEM ($*P<0.05$, $**P<0.01$ and $***P<0.001$). (E) Clonogenicity of shRNA_{control}- and shRNA_{cav-1}-stably transfected U87MG transiently co-transfected with siRNA_{control}, siRNA α_2 or siRNA α_5 (100 nM for 72 h) was determined using the clonogenic assay. Histograms represent the percentage of residual clones formed by shRNA_{cav-1}/siRNA_{control}, shRNA_{control}/siRNA α_2 , shRNA_{control}/siRNA α_5 , shRNA_{cav-1}/siRNA α_2 - and shRNA_{cav-1}/siRNA α_5 -transfected cells versus shRNA_{control}/siRNA_{control} after 72 h growth in 2%-FCS medium and 6 days regrowth. Data are represented as mean ($n=7$) \pm SEM ($^{ns}P>0.05$, $*P<0.05$, $**P<0.01$ and $***P<0.001$). Plating efficiency is 0.4 ± 0.1 , 0.6 ± 0.1 , 0.5 ± 0.1 , 0.6 ± 0.1 , 0.5 ± 0.1 and 0.4 ± 0.1 for shRNA_{control}/siRNA_{control}, shRNA_{cav-1}/siRNA_{control}, shRNA_{control}/siRNA α_2 , shRNA_{cav-1}/siRNA α_2 , shRNA_{control}/siRNA α_5 and shRNA_{cav-1}/siRNA α_5 respectively.

with strategies that might affect indirectly caveolin-1 in glioma such as radiation or some chemotherapeutic agents. Induction of caveolin-1 in tumor cells and tumor endothelial cells following radiation is responsible for the acquisition of a radio-resistance phenotype [19,20]. Conversely, HDAC inhibitors, proteasome inhibitors or VEGF receptor inhibitors, which are in clinical trials for glioblastoma (<http://ClinicalTrials.gov>) were shown to reduce caveolin-1 levels and in light of our results might increase glioblastoma aggressivity. Radiation- or chemotherapy-induced dysregulation of caveolin-1 might therefore critically affect glioblastoma aggressiveness but also responsiveness to such treatments and partially explain how such tumors become refractory to treatment. Therefore, identifying more carefully caveolin-1 signaling pathways in glioblastoma might lead to identify more active compounds.

Getting further insight into cancer genes/pathways altered by caveolin-1 manipulation, we showed that only 20% of the genes probed were affected. Six percent of them were involved in the regulation of invasive processes among which the proteinase inhibitor PAI-1. Increased PAI-1 expression was reported in highly invasive high-grade glioma [21]. In accordance, increased secretion of PAI-1 was observed in caveolin-1-depleted U87MG that exerted enhanced invasivity. In contrast, forced expression of caveolin-1 reduced both significantly the invasive capacity of cells and the secretion of PAI-1. Although the precise role of PAI-1 needs to be clarified, it has recently been proposed that elevated levels of PAI-1 promote cancer cell detachment and tumor dissemination by causing internalization of PAI-1/uPA/uPAR/integrin complex [22,23]. Interestingly, the main genes affected by caveolin-1 (10%) belonged to the integrin family.

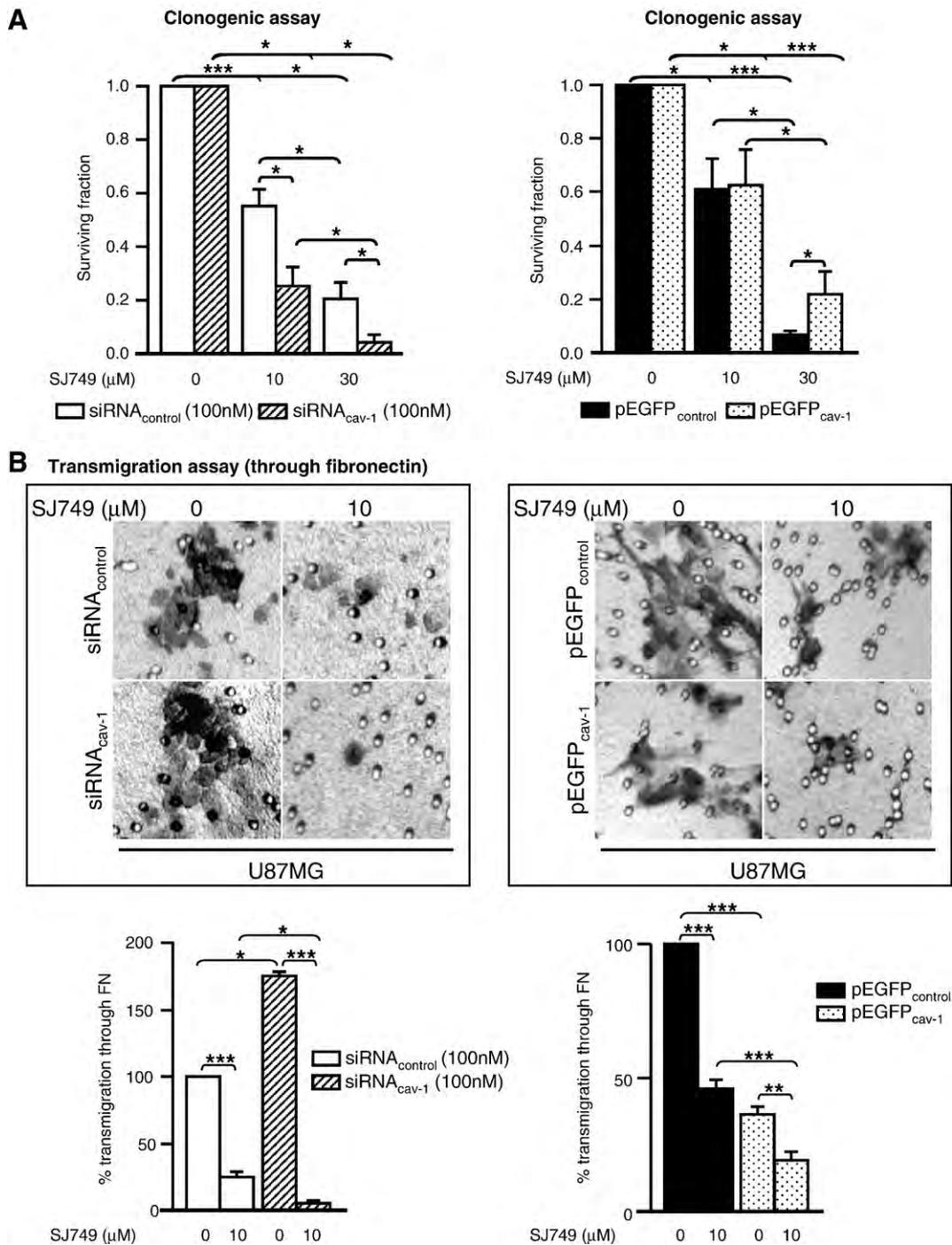


Fig. 6. Caveolin-1 affects the effect of SJ749 on clonogenicity and transmigration. (A) Clonogenicity of U87MG transfected transiently with siRNA_{control} or siRNA_{cav-1} (100 nM for 72 h) or stably with pEGFP_{control} or pEGFP_{cav-1} was determined after 72 h treatment with solvent (H₂O/Methanol) or indicated concentration of SJ749 and 6 days regrowth using the clonogenic assay. Histograms represent the surviving fraction of siRNA_{cav-1}- and EGFP_{cav-1}-transfected cells versus respective control (i.e. siRNA_{control} and pEGFP_{control}) in the presence of the solvent or SJ749. Plating efficiency is 0.5 ± 0.2 , 0.8 ± 0.3 , 0.5 ± 0.1 and 0.3 ± 0.1 for siRNA_{control}, siRNA_{cav-1}, pEGFP_{control} and pEGFP_{cav-1} respectively. (B) Transmigration of U87MG transfected transiently with siRNA_{control} or siRNA_{cav-1} (100 nM for 72 h) or stably with pEGFP_{control} or pEGFP_{cav-1} was determined in the presence of solvent (H₂O/Methanol) or 10 μ M SJ749 using fibronectin (FN)-coated transwell. Histograms represent the percentage of siRNA_{cav-1}- and EGFP_{cav-1}-transfected cells which transmigrated through fibronectin (FN) versus respective control (i.e. siRNA_{control} and pEGFP_{control}) after 24 h in the presence of the solvent or SJ749. Data are represented as mean ($n=3-5$) \pm SEM (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$). Representative pictures of 3 independent experiments.

As observed here for PAI-1 but never described before, the expression of integrins was always inversely correlated to caveolin-1. Data suggested therefore a regulation of integrins by caveolin-1 at the transcription level. Integrins represent an important class of heterodimeric cell-adhesion receptors that are involved in various processes deregulated in many pathologies especially in cancer. Although caveolin-1 is crucial for integrin signaling and dynamic, the mecha-

nism by which it exerts its control is far from being elucidated. Historically, caveolin-1 was identified as an adaptor that physically or functionally linked α_1 and α_5 to growth signaling pathway through Fyn/Shc [24,25] or β_1 to adhesion/migration signaling pathways through src/FAK [26] and as a regulator of integrin trafficking/internalization [27–29]. However, none of these studies ever mentioned the ability of caveolin-1 to control integrin expression at the

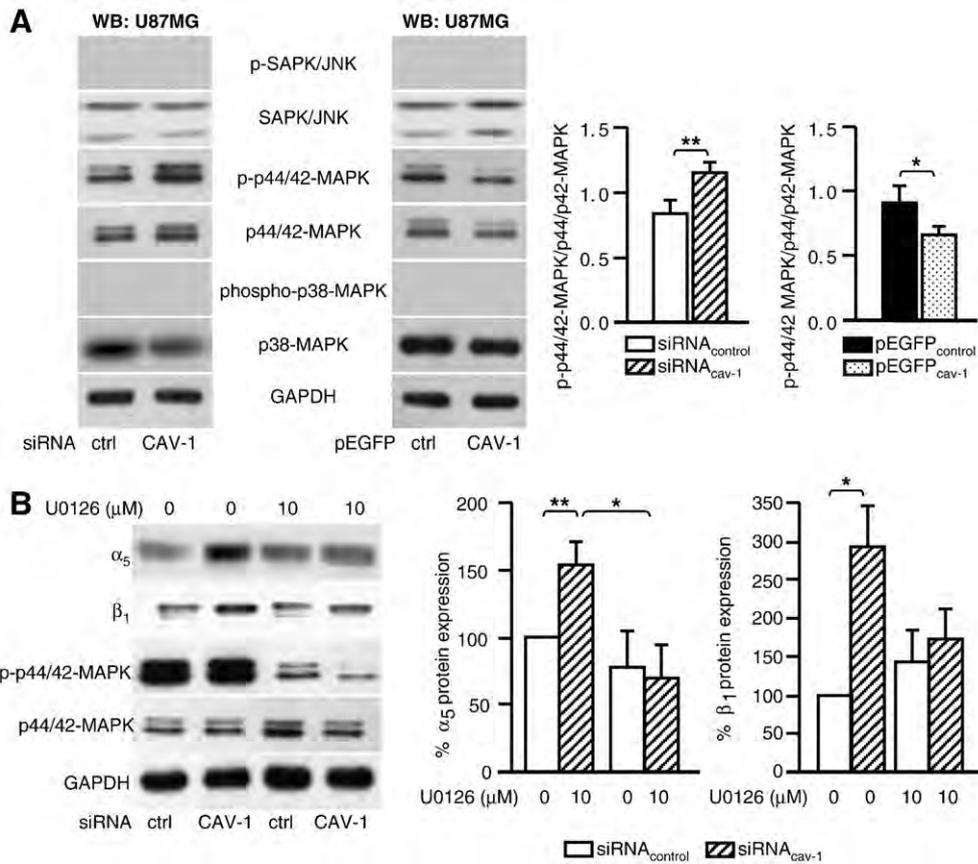


Fig. 7. Caveolin-1 regulates $\alpha_5\beta_1$ integrins through the MAP kinase pathway. (A) Expression of phospho-SAPK/JNK, SAPK/JNK, phospho-p44/42-MAPK, p44/42-MAPK, phospho-p38-MAPK, p38-MAPK and GAPDH was determined by western blot (WB) in U87MG transfected transiently with shRNA_{control} or siRNA_{cav-1} (100 nM for 72 h) or stably with pEGFP_{control} or pEGFP_{cav-1}. Histograms represent the ratio (phospho-p44/42-MAPK)/(p44/42-MAPK) in shRNA_{control}-, siRNA_{cav-1}-, pEGFP_{control}- and pEGFP_{cav-1}-transfected U87MG. Data are represented as mean ($n=3-5$) \pm SEM (* $P<0.05$ and ** $P<0.01$). (B) Expression of α_5 , β_1 , phospho-p44/42-MAPK, p44/42-MAPK and GAPDH was determined by western blot (WB) in U87MG transfected transiently with shRNA_{control} or siRNA_{cav-1} (100 nM for 72 h) treated either with solvent (DMSO) or U0126 (10 μ M) for 24 h. Histograms show the percentage of α_5 and β_1 integrin subunit protein expression determined by densitometry analysis normalized to GAPDH. Data are represented as mean ($n=4$) \pm SEM (* $P<0.05$, ** $P<0.01$).

transcription level. Our work focused on $\alpha_5\beta_1$ integrins that emerged recently as a potential antitumor target [14,30–33]. Gain- and loss-of-function showed that the reverse correlation between caveolin-1 and $\alpha_5\beta_1$ integrins was observed both at the mRNA and protein level in at least two different types of glioma cells and in a colon carcinoma cell line (not shown), with high levels of $\alpha_5\beta_1$ integrins in caveolin-1-depleted cells and low levels of $\alpha_5\beta_1$ integrins in caveolin-1-overexpressing cells. Although an alteration of caveolin-1-mediated integrin internalization processes affecting the levels of integrin present at the cell surface that might involve PAI-1 cannot be ruled out, caveolin-1 influences $\alpha_5\beta_1$ integrin gene expression. Accordingly, caveolin-1 was only recently shown as an indirect regulator of genes involved in tumorigenesis, like cyclin D1 and survivin through the β -catenin-Tcf/Lef pathway [7,8,34,35] and the IGF receptor and BRCA1 through Sp1- and p53-dependent pathway [4,5] or as a direct regulator through its binding to promoter elements of growth-associated genes after relocation of caveolin-1 into the nucleus [36]. As no relocation of β -catenin into the nucleus and no alteration either in the expression or in the activity of p53 could be observed in our study, the involvement of β -catenin- and p53-dependent pathway seems unlikely (data not shown). $\alpha_5\beta_1$ integrins were also recently shown to be negatively regulated by E-cadherin through the EGFR/FAK/p44/42-MAPK-dependent signaling pathway [33]. Although FAK seems not involved in the regulation of $\alpha_5\beta_1$ integrin expression as neither its expression nor its phosphorylation status was altered by caveolin-1 (data not shown), p44/42-MAPK seems to play a crucial role. We reported here that loss of caveolin-1 was associated with hyperphosphorylation of p44/42-MAPK.

When blocked using the MAPK kinase inhibitor U0126, the induction of $\alpha_5\beta_1$ integrin associated with caveolin-1 depletion was abolished. Caveolin-1 is well known to interact with p44/42-MAPK through the CSD (caveolin scaffolding domain) and to inhibit its activity. Consistent with this action, caveolin-1 KO mice show increased activation of p44/42-MAPK [37,38]. Therefore we suggest that loss of caveolin-1 frees p44/42-MAPK from repression allowing induction of $\alpha_5\beta_1$ integrin but also probably other genes such as the α_2 integrin subunit. Further studies will be needed to decipher the molecular pathway involved in the regulation of $\alpha_5\beta_1$ integrin by caveolin-1/p44/42-MAPK.

The phenotypic alteration observed after caveolin-1 modulation can be linked to caveolins themselves and the diverse array of molecules with which it was reported to interact. Our study showed that the major class of genes modulated by caveolin-1 is the integrin subfamily. Data suggest that the functionally relevant integrin regulated by caveolin-1 is the fibronectin receptor $\alpha_5\beta_1$. This was supported by blocking studies showing that increased adhesion and clonogenicity observed following caveolin-1 down-regulation remained unaffected by the removal of the α_2 integrin subunit but was totally abolished by the removal of the α_5 integrin subunit. Moreover, the consequences of caveolin-1 modulation on proliferation and clonogenicity could be reproduced by manipulation of $\alpha_5\beta_1$ integrins. Even subtle up- or down-regulations of α_5 integrin subunits as those induced by caveolin-1 were sufficient to carry out the signals initiated by caveolin-1 as no additional effects could be observed by forcing or abrogating further α_5 expression. Similarly, a discrete modulation of α_5 mRNA and protein levels induced by

rMaspin significantly affected the invasive capacity of MDA-MB-435 cells [39]. We previously reported that SJ749, the most selective nonpeptidic $\alpha_5\beta_1$ integrin antagonist described so far [32,40,41], inhibits cell proliferation and anchorage-independent growth of A172 and U87MG without inducing apoptosis [42,43]. The level of $\alpha_5\beta_1$ integrin seemed critical in the antagonistic effects of the drug [42,43]. In accordance, although SJ749 significantly reduced clonogenic survival and transmigration of U87MG, it was more efficient in highly proliferative and invasive cells (expressing high levels of $\alpha_5\beta_1$ integrin and low levels of caveolin-1). Altogether data suggest that the phenotypic changes (growth, adhesion and transmigration) resulting from caveolin-1 modulation are indeed mediated by $\alpha_5\beta_1$ integrin. This is also supported by some preliminary studies showing that genes altered by caveolin-1 (identified by PCR array) are modified to the same extent after $\alpha_5\beta_1$ integrin modulation. More importantly, our study is supportive to publications highlighting the potential role of $\alpha_5\beta_1$ integrins as therapeutic targets in several cancers [33,42,44,45].

In conclusion, caveolin-1 regulates growth, clonogenicity and transmigration of glioblastoma cells. Among the genes targeted by caveolin-1, we identified $\alpha_5\beta_1$ integrin as the principal mediator of caveolin-1 effects. The status of caveolin-1/ $\alpha_5\beta_1$ integrin might be a useful marker of the tumor behavior with caveolin-1_{low}/ $\alpha_5\beta_1$ _{high} levels that would indicate that the tumor is highly proliferative and infiltrative but highly responsive to $\alpha_5\beta_1$ integrin antagonists, whereas caveolin-1_{high}/ $\alpha_5\beta_1$ _{low} levels could indicate a delay in tumor progression and reduced response to the drug. Our data open new aspects in the understanding of the caveolin-1/ $\alpha_5\beta_1$ integrin partnership in fundamental cell biology and its contribution to glioma biology.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bbamcr.2008.09.019.

References

- M. Liscovitch, E. Burgermeister, N. Jain, D. Ravid, M. Shatz, L. Tencer, Caveolin and Cancer, Humana Press, 2005.
- L.A. Carver, J.E. Schnitzer, Caveolae: mining little caves for new cancer targets, *Nat. Rev. Cancer* 3 (2003) 571–581.
- B. van Deurs, K. Roepstorff, A.M. Hommelgaard, Sandvig, Caveolae: anchored, multifunctional platforms in the lipid ocean, *Trends Cell Biol.* 13 (2003) 92–100.
- C. Glait, L. Tencer, D. Ravid, R. Sarfstein, M. Liscovitch, H. Werner, Caveolin-1 up-regulates IGF-1 receptor gene transcription in breast cancer cells via Sp1- and p53-dependent pathways, *Exp. Cell Res.* 312 (2006) 3899–3908.
- C. Glait, D. Ravid, S.W. Lee, M. Liscovitch, H. Werner, Caveolin-1 controls BRCA1 gene expression and cellular localization in human breast cancer cells, *FEBS Lett.* 580 (2006) 5268–5274.
- T. Li, F. Sotgia, M.A. Vuolo, M. Li, W.C. Yang, R.G. Pestell, J.A. Sparano, M.P. Lisanti, Caveolin-1 mutations in human breast cancer: functional association with estrogen receptor alpha-positive status, *Am. J. Pathol.* 168 (2006) 1998–2013.
- J. Hulit, T. Bash, M. Fu, F. Galbiati, C. Albanese, D.R. Sage, A. Schlegel, J. Zhurinsky, M. Shtutman, A. Ben-Ze'ev, M.P. Lisanti, R.G. Pestell, The cyclin D1 gene is transcriptionally repressed by caveolin-1, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 21203–21209.
- V.A. Torres, J.C. Tapia, D.A. Rodriguez, M. Parraga, P. Lisboa, M. Montoya, L. Leyton, A.F. Quest, Caveolin-1 controls cell proliferation and cell death by suppressing expression of the inhibitor of apoptosis protein survivin, *J. Cell Sci.* 119 (2006) 1812–1823.
- D. Ravid, S. Maor, H. Werner, M. Liscovitch, Caveolin-1 inhibits anoikis and promotes survival signaling in cancer cells, *Adv. Enzyme Regul.* 46 (2006) 163–175.
- A.F. Quest, L. Leyton, M. Parraga, Caveolins, caveolae, and lipid rafts in cellular transport, signaling, and disease, *Biochem. Cell Biol.* 82 (2004) 129–144.
- S.A. Grossman, J.F. Batara, Current management of glioblastoma multiforme, *Semin. Oncol.* 31 (2004) 635–644.
- K. Boon, J.B. Edwards, C.G. Eberhart, G.J. Riggins, Identification of astrocytoma associated genes including cell surface markers, *BMC Cancer* 4 (2004) 39.
- S.L. Sallinen, P.K. Sallinen, H.K. Haapasalo, H.J. Helin, P.T. Helen, P. Schraml, O.P. Kallioniemi, J. Kononen, Identification of differentially expressed genes in human gliomas by DNA microarray and tissue chip techniques, *Cancer Res.* 60 (2000) 6617–6622.
- T. Van Meter, C. Dumur, N. Hafez, C. Garrett, H. Fillmore, W.C. Broaddus, Microarray analysis of MRI-defined tissue samples in glioblastoma reveals differences in regional expression of therapeutic targets, *Diagn. Mol. Pathol.* 15 (2006) 195–205.
- D.T. Ross, U. Scherf, M.B. Eisen, C.M. Perou, C. Rees, P. Spellman, V. Iyer, S.S. Jeffrey, M. Van de Rijn, M. Waltham, A. Pergamenschikov, J.C. Lee, D. Lashkari, D. Shalon, T.G. Myers, J.N. Weinstein, D. Botstein, P.O. Brown, Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines, *Nat. Genet.* 24 (2000) 227–235.
- J.M. Nigro, A. Misra, L. Zhang, I. Smirnov, H. Colman, C. Griffin, N. Ozburn, M. Chen, E. Pan, D. Koul, W.K. Yung, B.G. Feuerstein, K.D. Aldape, Integrated array-comparative genomic hybridization and expression array profiles identify clinically relevant molecular subtypes of glioblastoma, *Cancer Res.* 65 (2005) 1678–1686.
- P. Cassoni, R. Senetta, I. Castellano, E. Ortolan, M. Bosco, I. Magnani, A. Ducati, Caveolin-1 expression is variably displayed in astroglial-derived tumors and absent in oligodendrogliomas: concrete premises for a new reliable diagnostic marker in gliomas, *Am. J. Surg. Pathol.* 31 (2007) 760–769.
- K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method, *Methods* 25 (2001) 402–408.
- A. Regina, J. Jodoin, P. Khoeur, Y. Rolland, F. Berthelet, R. Mounmdjian, L. Fenart, R. Cecchelli, M. Demeule, R. Beliveau, Down-regulation of caveolin-1 in glioma vasculature: modulation by radiotherapy, *J. Neurosci. Res.* 75 (2004) 291–299.
- N. Cordes, S. Frick, T.B. Brunner, C. Pilarsky, R. Grutzmann, B. Sipos, G. Kloppel, W.G. McKenna, E.J. Bernhard, Human pancreatic tumor cells are sensitized to ionizing radiation by knockdown of caveolin-1, *Oncogene* 26 (2007) 6851–6862.
- X. Muracciole, S. Romain, H. Dufour, J. Palmari, O. Chinot, L. Ouafik, F. Grisoli, D.F. Branger, P.M. Martin, PAI-1 and EGFR expression in adult glioma tumors: toward a molecular prognostic classification, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 52 (2002) 592–598.
- R.P. Czekay, D.J. Loskutoff, Unexpected role of plasminogen activator inhibitor 1 in cell adhesion and detachment, *Exp. Biol. Med.* (Maywood) 229 (2004) 1090–1096.
- R.P. Czekay, K. Aertgeerts, S.A. Curriden, D.J. Loskutoff, Plasminogen activator inhibitor-1 detaches cells from extracellular matrices by inactivating integrins, *J. Cell Biol.* 160 (2003) 781–791.
- K.K. Wary, A. Mariotti, C. Zurzolo, F.G. Giancotti, A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth, *Cell* 94 (1998) 625–634.
- K.K. Wary, F. Maimiero, S.J. Isakoff, E.E. Marcantonio, F.G. Giancotti, The adaptor protein Shc couples a class of integrins to the control of cell cycle progression, *Cell* 87 (1996) 733–743.
- Y. Wei, X. Yang, Q. Liu, J.A. Wilkins, H.A. Chapman, A role for caveolin and the urokinase receptor in integrin-mediated adhesion and signaling, *J. Cell Biol.* 144 (1999) 1285–1294.
- N.D. Boyd, B.M. Chan, N.O. Petersen, Beta1 integrins are distributed in adhesion structures with fibronectin and caveolin and in coated pits, *Biochem. Cell Biol.* 81 (2003) 335–348.
- P. Upla, V. Marjomaki, P. Kankaanpaa, J. Ivaska, T. Hyypia, F.G. Van Der Goot, J. Heino, Clustering induces a lateral redistribution of alpha 2 beta 1 integrin from membrane rafts to caveolae and subsequent protein kinase C-dependent internalization, *Mol. Biol. Cell* 15 (2004) 625–636.
- M.A. del Pozo, N. Balasubramanian, N.B. Alderson, W.B. Kiosses, A. Grande-Garcia, R.G. Anderson, M.A. Schwartz, Phospho-caveolin-1 mediates integrin-regulated membrane domain internalization, *Nat. Cell Biol.* 7 (2005) 901–908.
- P. Parsons-Wingter, I.M. Kasman, S. Norberg, A. Magnussen, S. Zanivan, A. Rissone, P. Baluk, C.J. Favre, U. Jeffrey, R. Murray, D.M. McDonald, Uniform overexpression and rapid accessibility of alpha5beta1 integrin on blood vessels in tumors, *Am. J. Pathol.* 167 (2005) 193–211.
- D. Kita, T. Takino, M. Nakada, T. Takahashi, J. Yamashita, H. Sato, 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 (2001) 7985–7991.
- S. Kim, K. Bell, S.A. Mousa, J.A. Varner, Regulation of angiogenesis in vivo by ligation of integrin alpha5beta1 with the central cell-binding domain of fibronectin, *Am. J. Pathol.* 156 (2000) 1345–1362.
- K. Sawada, A.K. Mitra, A.R. Radjabi, V. Bhaskar, E.O. Kistner, M. Tretiakova, S. Jagadeeswaran, A. Montag, A. Becker, H.A. Kenny, M.E. Peter, V. Ramakrishnan, S.D. Yamada, E. Lengyel, Loss of E-cadherin promotes ovarian cancer metastasis via alpha 5-integrin, which is a therapeutic target, *Cancer Res.* 68 (2008) 2329–2339.
- F. Galbiati, D. Volonte, A.M. Brown, D.E. Weinstein, A. Ben-Ze'ev, R.G. Pestell, M.P. Lisanti, Caveolin-1 expression inhibits Wnt/beta-catenin/Lef-1 signaling by recruiting beta-catenin to caveolae membrane domains, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 23368–23377.
- Z. Lu, S. Ghosh, Z. Wang, T. Hunter, Downregulation of caveolin-1 function by EGF leads to the loss of E-cadherin, increased transcriptional activity of beta-catenin, and enhanced tumor cell invasion, *Cancer Cell* 4 (2003) 499–515.
- E. Sanna, S. Miotti, M. Mazzi, G. De Santis, S. Canevari, A. Tomassetti, Binding of nuclear caveolin-1 to promoter elements of growth-associated genes in ovarian carcinoma cells, *Exp. Cell Res.* 313 (2007) 1307–1317.
- J.A. Engelman, C. Chu, A. Lin, H. Jo, T. Ikezu, T. Okamoto, D.Z. Kohtz, M.P. Lisanti, Caveolin-mediated regulation of signaling along the p42/44 MAP kinase cascade in vivo. A role for the caveolin-scaffolding domain, *FEBS Lett.* 428 (1998) 205–211.
- A.W. Cohen, D.S. Park, S.E. Woodman, T.M. Williams, M. Chandra, J. Shirani, A. Pereira de Souza, R.N. Kitsis, R.G. Russell, L.M. Weiss, B. Tang, L.A. Jelicks, S.M. Factor, V. Shtutman, H.B. Tanowitz, M.P. Lisanti, Caveolin-1 null mice develop cardiac

- hypertrophy with hyperactivation of p42/44 MAP kinase in cardiac fibroblasts, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 284 (2003) C457–474.
- [39] R.E. Seftor, E.A. Seftor, S. Sheng, P.A. Pemberton, R. Sager, M.J. Hendrix, maspin suppresses the invasive phenotype of human breast carcinoma, *Cancer Res.* 58 (1998) 5681–5685.
- [40] L. Marinelli, A. Meyer, D. Heckmann, A. Lavecchia, E. Novellino, H. Kessler, Ligand binding analysis for human alpha5beta1 integrin: strategies for designing new alpha5beta1 integrin antagonists, *J. Med. Chem.* 48 (2005) 4204–4207.
- [41] D. Cue, S.O. Southern, P.J. Southern, J. Prabhakar, W. Lorelli, J.M. Smallheer, S.A. Mousa, P.P. Cleary, 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 (2000) 2858–2863.
- [42] A. Maglott, P. Bartik, S. Cosgun, P. Klotz, P. Ronde, G. Fuhrmann, K. Takeda, S. Martin, M. Dontenwill, The small alpha5beta1 integrin antagonist, SJ749, reduces proliferation and clonogenicity of human astrocytoma cells, *Cancer Res.* 66 (2006) 6002–6007.
- [43] P. Bartik, A. Maglott, G. Entlicher, D. Vestweber, K. Takeda, S. Martin, M. Dontenwill, Detection of a hypersialylated beta1 integrin endogenously expressed in the human astrocytoma cell line A172, *Int. J. Oncol.* 32 (2008) 1021–1031.
- [44] O. Stoeltzing, W. Liu, N. Reinmuth, F. Fan, G.C. Parry, A.A. Parikh, M.F. McCarty, C.D. Bucana, A.P. Mazar, L.M. Ellis, 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 (2003) 496–503.
- [45] D.L. Livant, R.K. Brabec, K.J. Pienta, D.L. Allen, K. Kurachi, S. Markwart, A. Upadhyaya, Anti-invasive, antitumorigenic, and antimetastatic activities of the PHSCN sequence in prostate carcinoma, *Cancer Res.* 60 (2000) 309–320.

Caveolin-1 / $\alpha 5\beta 1$ integrin / TGF β RI: three interconnected markers identified in glioblastoma cells allowing a new molecular profiling of human glioma.

Dans cette publication nous mettons en évidence le mécanisme par lequel la cavéoline-1 régule l'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. Nos résultats révèlent que la cavéoline-1 module l'activation et l'expression de protéines de signalisations. Ainsi, nous montrons que la régulation de l'expression de la sous-unité intégrine $\alpha 5$ passe par une voie dépendante de TGF β RI (TGF β RI - PI3K-Akt - Smad2 - $\alpha 5$) et une voie indépendante de TGF β RI (ERK-MAPK - Akt - Smad2 - $\alpha 5$). Nous avons également pu montrer le potentiel thérapeutique d'un nouvel antagoniste de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, le K34c, et d'un inhibiteur de l'activité du récepteur TGF β RI, le SB-431542 dans le traitement des cellules de glioblastome. Enfin, l'analyse d'échantillons de biopsies de patients atteints de gliomes a permis de confirmer l'interconnexion entre la cavéoline-1, l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et le TGF β RI. Ces derniers constitueraient des marqueurs moléculaires pour l'identification des sous-groupes patients atteints de gliomes susceptibles de répondre aux thérapies ciblées (K34c et SB-431542).

Caveolin-1/ $\alpha_5\beta_1$ integrins/TGF β RI: three interconnected markers identified in glioblastoma cells allowing a new molecular profiling of human glioma

Erika C. Cosset¹, Julien Godet^{1,2}, Natacha Entz-Werlé^{3,4}, Eric Guerin^{3,4}, Madeleine Jaillet^{3,4}, Erwan Pencreach^{3,4}, Michèle Legrain^{3,4}, Sébastien Froelich⁵, Dominique Bonnet⁶, Monique Dontenwill¹ and Sophie Martin*¹

¹Université de Strasbourg, LBP, CNRS UMR 7213, Illkirch, France, ²Département d'informations médicales, ³Service de Biochimie et Biologie Moléculaire, ⁴EA4438, Physiopathologie et recherche translationnelle, ⁵Service de neurochirurgie, Hôpital de Hautepierre, CHRU Strasbourg, France and ⁶Université de Strasbourg, LIT, CNRS UMR 7200, Illkirch, France.

Grant support: Ligue contre le Cancer, ARC and INCa

***Corresponding author:** Sophie Martin, ¹Université de Strasbourg, LBP, CNRS UMR 7213, Faculté de Pharmacie, 74, route du Rhin, 67400 Illkirch, France.

E-mail: sophie.martin@unistra.fr

Phone: 0033368854197; Fax: 0033368854313

Running title: Caveolin-1, TGF β /SMAD2, $\alpha_5\beta_1$ integrin in human glioma

Key words: $\alpha_5\beta_1$ integrin, caveolin-1, $\alpha_5\beta_1$ integrin antagonist, TGF β RI, SMAD2 K34c, SB431542, human glioma.

Abstract

Caveolin-1 plays a crucial role in cancer development and progression. Although caveolin-1 expression is increased in glioma, cav1 negative (cav1_{low}) and positive (cav1_{high}) cells coexist in glioblastoma. We previously reported that cav1_{low} glioblastoma cells exerted a more aggressive phenotype than cav1_{high} cells. Such phenotype is due to $\alpha_5\beta_1$ integrins induction that is being freed from repression after the depletion of caveolin-1. Going further, the role of the TGF β /Smad2 pathway in the regulation of $\alpha_5\beta_1$ integrins by caveolin-1 was identified and the consequences in terms of anti- $\alpha_5\beta_1$ integrins and anti-TGF β therapies were analyzed. Finally, subpopulations of patients suffering glioma were uncovered by performing the molecular profiling of the three interconnected genes in human biopsies.

Introduction

Caveolin-1 is the principal structural protein of caveolae. Through its ability to control the subcellular distribution, activity and transcription of various proteins (1-8), caveolin-1 plays a crucial role in the regulation of several processes altered in cancer. It is therefore not surprising that sporadic mutations or altered expression of caveolin-1 are observed during cell transformation, invasion and metastasis.

Among cancer, glioblastoma is the most common intrinsic brain tumor in adults and is nearly uniformly fatal. Despite advances in neurosurgery, radiation and medical oncology, the prognosis for patient with glioblastoma did not improve in the last 30 years with a median survival of 9-15 months (9). Although increased expression of caveolin-1 seems to be a norm in glioma (10-15), caveolin-1-positive and caveolin-1-negative cells coexist in half of the glioblastoma (15). We recently elucidated what contribution each cell type might have on the tumor by manipulating the level of caveolin-1 in glioblastoma cells. We showed that a loss of caveolin-1 shifted cells towards a more aggressive phenotype as reflected by a higher proliferative and invasive potential when compared to cells overexpressing caveolin-1 (16). Looking for genes affected by such manipulations, we showed that caveolin-1 acted as a transcriptional repressor of $\alpha_5\beta_1$ integrins. The loss of caveolin-1 was therefore associated with increased levels of $\alpha_5\beta_1$ integrins so that caveolin-1 and $\alpha_5\beta_1$ integrins levels were inversely correlated. $\alpha_5\beta_1$ integrins were also identified as principal mediators of cell aggressiveness as blocking $\alpha_5\beta_1$ integrin expression in caveolin-1 depleted cells abolished caveolin-1 effect on proliferation, invasion and clonogenic survival (16). Although being the most aggressive, cells expressing low levels of caveolin-1 but high levels of $\alpha_5\beta_1$ integrins were also those exerting the highest sensitivity toward the non peptidic $\alpha_5\beta_1$ integrin antagonist, SJ749 (16).

The mechanism by which $\alpha_5\beta_1$ integrins was regulated by caveolin-1 remained unsolved. As $\alpha_5\beta_1$ integrins are known targets of TGF β (17-19) and as caveolin-1 was identified as a negative regulator of TGF β signaling, we investigated the TGF β pathway in the regulation of $\alpha_5\beta_1$ integrins by caveolin-1. We identified an ERK-dependent and a TGF β RI-dependent pathway freed from repression when caveolin-1 was depleted. Both pathways crosstalked at the level of Smad2 and lead to the induction of $\alpha_5\beta_1$ integrins. We also investigated the behavior of $\alpha_5\beta_1$ integrin and TGF β RI as a function of caveolin-1 in 108 human adult glioma biopsies and determined the answer of tumors to anti-TGF β or anti- $\alpha_5\beta_1$ integrin therapies.

Materials and Methods

Cell lines, culture conditions and transfection

Cell lines were cultured in EMEM supplemented with 10% heat-inactivated FCS and 0.6 mg/ml glutamine (Lonza). U87MG and U373 cell lines were from ATCC. LN-18, LNT-229, LNZ-308 and LN-319 were a generous gift from Pr M. Hegi (University of Lausanne, Switzerland).

Chemicals

The compound 34c (2-(S)-2,6-dimethylbenzamido)-3-[4-(3-pyridin-2-ylaminopropoxy)-phenyl] propionic acid) named K34c was synthesized in our laboratory according to the procedure described by Heckmann et al. (20). U0126 and LY294002 (Cell Signaling) were used at 10 μ M for 24 h. SB431542 (Sigma) was used at 10 μ M up to 72 h. TGF β 1 (Sigma) was used at 1-2 ng/ml up to 72 h. Activin (MACS Miltenyi Biotec) was used at 1-2 ng/ml up to 72 h.

Small interfering RNA and plasmids

Non silencing siRNA (siRNA_{ctrl}), caveolin-1-targeting siRNA (siRNA_{cav1}), SMAD2-targeting siRNA (siRNA_{Smad2}) and TGF β RI-targeting siRNA (siRNA_{TGF β RI}) (Dharmacon Research) were transfected at 100 nM for 72 h as recommended. Non silencing shRNA (shRNA_{ctrl}), caveolin-1-targeting shRNA (shRNA_{cav1}) and α_5 integrin subunit-targeting shRNA (shRNA _{α_5}) subcloned into the pSHAG-MAGICS2 (pSM2) were from OpenBiosystems. EGFP-tagged caveolin-1 (pEGFP_{cav1}) and pcDNA _{α_5} constructs were created as previously described (16). Stable cell lines were obtained after transfection of 1 (for pEGFP and pcDNA plasmids using lipofectamine 2000 (Invitrogen)) and 2.5 (for shRNA plasmids using Arrest-In™ (OpenBiosystems)) μ g of each plasmid and selection with adequate antibiotics (G418 for pEGFP and pcDNA plasmids and puromycin for shRNA plasmids).

Real-time quantitative PCR

RNA was extracted as previously described (16). Real-time quantitative PCR was performed using the ABI7000 SYBRGreen PCR detector with the probes (Invitrogen) described in supplementary data 1. Relative levels of mRNA gene expression were calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (21).

Western blot

Cells were lysed 30 min on ice in ice-cold lysis buffer (1% Triton-X100, NaF 100 mM, NaPPi 10 mM, Na₃VO₄ 1 mM in PBS, supplemented with Complete anti-protease cocktail; Roche). Protein (10 μ g) was separated by SDS-PAGE (BioRad) and transferred to PVDF membranes (Amersham). For phosphorylation detection, cells were directly lysed in Laemmli buffer (BioRad) supplemented by β -mercaptoethanol (1:20). Blots were probed with anti- α_5 , anti- β_1 and anti-GAPDH (Chemicon), anti-caveolin-1 and anti-TGF β RI (Santa Cruz Biotchnologies), anti-phospho-ERK-1/2, anti-ERK-1/2, anti-phospho-Smad2, anti-Smad2/3, anti-phospho-Akt, anti-Akt (Cell Signaling) followed by the HRP-conjugated antibodies (1:10000, Promega). The proteins were visualized with enhanced chemiluminescence.

Clonogenic assay

After attachment (250 cells/well, 6 well plate), cells were treated 72 h with solvent (DMSO), SB431542 (5 or 10 μ M), K34c (10 or 30 μ M) or a combination of both in 2%-FCS containing medium. Medium was refreshed and cells were allowed to regrow in fresh medium containing 10% FCS for 6 days. Clonogenic survival was determined as previously described (16).

Quantification of Human TGF β 1

Cells were plated at $3 \cdot 10^5$ cells/well in 60mm Petri dishes and grown in serum-free medium for 24 and 72h. Supernatant were collected and activated TGF β 1 was measured using the Quantikine® human TGF β 1 immunoassay according to manufacturer's instructions (R&D Systems). Results are expressed as ng of TGF β 1 produced per ml of supernatant.

Tumor banking, patient characteristics and k-means clustering analysis

108 adult brain tumors were collected from January 2004 to April 2008. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and each patient was entered in the study after his/her consent. All population characteristics are summarized in the supplementary data 2. Biopsies were fresh-frozen in the operating room and stored at -80°C . Each sample was histologically analyzed by the pathologist to determine the tumor diagnostic and the percentage of cancer cells. Control tissues were obtained from epileptic surgery. RNA were purified with RNeasy Mini Kit (Qiagen). RNA concentrations were quantified by fluorometry. The quality of RNA was assessed by the RNA LabChip® kits using an Agilent 2100 bioanalyzer. RNA were transcribed into cDNA as described previously (16). Real-time quantitative PCR was performed using the ABI7000 SYBRGreen PCR detector with the probes described in supplementary data 1.

In order to pool patients into homogenous groups in respect to their levels of CAV1, TGFBR1 and ITGA5, k-means clustering procedure, which aims to partition the points into K groups such that the sum of squares from point to the assigned cluster centers is minimized, has been performed (22). Because it could clinically make sense, and strengthen by a local maximum of the Calinski criterion, we choose to divide the data in three 3-D-clusters.

Statistical analysis

Data are represented as mean \pm SEM. In all cases, n refers to the number of independent experiments. Statistical analyses were done with the Student's t-test and ANOVA where $P < 0.05$ was considered significant.

Results

Caveolin-1 modulates the TGF β /TGFBR1/Smad2 pathway.

To directly assess the role of caveolin-1 in the regulation of TGF β secretion, the TGF β receptor (TGFBR1) expression and/or signalling reflected by the phosphorylation status of its downstream effector Smad2, we used the human glioblastoma cell line U87MG depleted in or overexpressing caveolin-1 established in the laboratory (16). Depletion of caveolin-1 significantly increased the secretion of TGF β 1 as early as 24h (Fig. 1A). In contrast, overexpression of caveolin-1 significantly decreased the secretion of TGF β 1 (Fig. 1A). Depletion of caveolin-1 up-regulates the expression of TGFBR1 and increases the phosphorylation of Smad2 (Fig. 1B). Conversely, overexpression of caveolin-1 downregulates the expression of TGFBR1 and decreases the phosphorylation of Smad2 (Fig. 1B). Data suggest that the secretion of TGF β 1 and the activity of the TGFBR1/Smad2 pathway is inversely correlated to caveolin-1 expression as already observed for $\alpha_5\beta_1$ integrin (16).

As we identified $\alpha_5\beta_1$ integrin as the principal mediator of caveolin-1 effects in glioblastoma cells (16), we assessed their role in U87MG depleted in or overexpressing $\alpha_5\beta_1$ integrins. Overexpression of the α_5 integrin subunit up-regulates the expression of TGFBR1 without affecting the phosphorylation of Smad2 (Fig. 1C). Conversely, downregulation of the α_5 integrin subunit decreases the expression of

TGF β RI without affecting the phosphorylation of Smad2 (Fig. 1C). Data suggest that although $\alpha_5\beta_1$ integrins are able to regulate the expression of TGF β RI, they seem unable to activate its downstream effector Smad2. Results also suggest that the activation of the TGF β RI/Smad2 pathway is involved in caveolin-1 signaling and not secondary to the induction of $\alpha_5\beta_1$ integrins following caveolin-1 depletion.

Although depletion of caveolin-1 did not affect the level of TGF β RI in another glioblastoma cell line, U373, an up-regulation of $\alpha_5\beta_1$ integrin and an increase of Smad2 phosphorylation was observed (Fig. 1D).

Altogether, data suggest that the activation of the Smad2 pathway accompanied or not by an increased expression of the TGF β RI is a common feature in glioblastoma cells undergoing caveolin-1 depletion or expressing low levels of caveolin-1.

Caveolin-1 modulates $\alpha_5\beta_1$ integrins through the TGF β /Smad2 pathway

To clarify the involvement of the TGF β /Smad2 pathway in the transcriptional regulation of $\alpha_5\beta_1$ integrins by caveolin-1, cells were treated with an inhibitor of TGF β RI, SB431542. The induction of both α_5 and β_1 integrin subunits observed after depletion of caveolin-1 as well as the phosphorylation of Smad2 were abolished by SB431542 at the protein level (Fig. 2A) as well as at the mRNA level (Fig. 2B). Similarly, the induction of both α_5 and β_1 integrin subunits observed after downregulation of caveolin-1 was abolished in U373 by SB431542 at the protein level (Fig. 2C).

As SB431542 might act on ALK-4 (or activin type I receptor), ALK-5 (or TGF β type I receptor) or ALK-7 (or nodal type I receptor), U87MG cells were exposed to either TGF β 1 or activin to investigate the effect of both growth factors on $\alpha_5\beta_1$ integrin expression. Concentrations used were similar to those achieved after depletion of caveolin-1 in U87MG as determined in Fig. 1A. U87MG shows increased $\alpha_5\beta_1$ integrin expression when exposed 72 h to various concentration of TGF β 1 (Fig. 2D). Under similar conditions, no alteration of $\alpha_5\beta_1$ integrin or caveolin-1 expression was observed in response to activin (Fig. 2D). Altogether, data confirm that caveolin-1 controls $\alpha_5\beta_1$ integrin expression specifically through the TGF β RI/Smad2 pathway.

Caveolin-1 controls $\alpha_5\beta_1$ integrins expression through ERK-dependent Smad2 and Akt-dependent Smad2 pathways

R-Smad phosphorylation can be mediated directly through TGF β receptors or through the ERK pathway (23). As we previously implicated ERK in the regulation of $\alpha_5\beta_1$ integrin expression by caveolin-1 (16), cells were treated with the MEK inhibitor, U0126. The enhanced expression of α_5 and β_1 integrin subunits and phosphorylation of ERK, Akt and Smad2 observed after downregulation of caveolin-1 were abolished by U0126 (Fig. 3A). U0126 did not affect the induction of TGF β RI expression following the depletion of caveolin-1 (Fig. 3A). Conversely, the enhanced phosphorylation of ERK observed after downregulation of caveolin-1 was not affected by the blockade of the TGF β RI using SB431542 (Fig. 3B). Data suggest that ERK activates Smad2 independently of the TGF β RI pathway following caveolin-1 depletion.

Smads proteins are also potential target of the PI3K/Akt pathway (24). We studied its involvement using the PI3K inhibitor, LY294002. The enhanced expression of α_5 and β_1 integrin subunits and phosphorylation of Akt and Smad2 observed after downregulation of caveolin-1 were abolished by LY294002 (Fig. 3C). LY294002 did not affect the induction of either TGF β RI expression or ERK phosphorylation induced by the depletion of caveolin-1 (Fig. 3C). Conversely, the

enhanced phosphorylation of Akt observed after downregulation of caveolin-1 was abolished by the blockade of the TGF β RI using SB431542 (Fig. 3D). Data suggest that Akt activate Smad2 dependently of TGF β RI following caveolin-1 depletion.

Altogether, results point out two Smad2-dependent signaling pathways by which caveolin-1 controls $\alpha_5\beta_1$ integrin expression; one independent of the TGF β RI: caveolin-1 \rightarrow ERK \rightarrow Smad2 \rightarrow $\alpha_5\beta_1$ integrin and one dependent of the TGF β RI: caveolin-1 \rightarrow TGF β RI \rightarrow Pi3K/Akt \rightarrow Smad2 \rightarrow $\alpha_5\beta_1$ integrin. As the enhanced phosphorylation of Akt was abolished by U0126, it seems that both pathway are interconnected through ERK. Finally, the regulation of TGF β RI expression by caveolin-1 is independent of both ERK and Akt.

$\alpha_5\beta_1$ integrins antagonists and TGF β /Smad2 inhibitors significantly reduce the clonogenic survival of human glioblastoma

We next investigated the effect of the $\alpha_5\beta_1$ integrin antagonist K34c and the TGF β RI inhibitor SB431542 alone or in combination in U87MG expressing low levels of caveolin-1 but high levels of $\alpha_5\beta_1$ integrins and TGF β RI/SMAD2. K34c (Fig. 4A) and SB431542 (Fig. 4B) dose-dependently reduced the surviving fraction of caveolin-1-depleted cells without affecting control cells. The combination of both inhibitors did not induce further reduction of the surviving fraction (Fig. 5C). Data comfort our previous study (16) suggesting that $\alpha_5\beta_1$ integrin antagonists might be more efficient in highly aggressive tumors expressing high levels of $\alpha_5\beta_1$ integrin. Additionally they also revealed that tumors expressing high levels of $\alpha_5\beta_1$ integrin, strong TGF β /Smad2 activity and low levels of caveolin-1 will be more responsive to therapies with TGF β RI/Smad2 inhibitors.

Caveolin-1 is inversely correlated to $\alpha_5\beta_1$ integrins and the TGF β /Smad2 pathway in glioblastoma cell lines as well as in human brain tumor biopsies

To determine if $\alpha_5\beta_1$ integrin, caveolin-1 and TGF β RI/Smad2 expressions are correlated, we measured their expression by western blot in five additional human glioblastoma cell lines. A significant negative correlation between the α_5 integrin subunit and caveolin-1 was found (Fig. 4A, $r^2=0.837$; $p=0.03$, $n=3$). Although the correlation test was not significant between phospho-Smad2/TGF β RI and caveolin-1 (Fig. 5A), data clearly evidenced a trend towards low expression levels of the α_5 integrin subunit, Smad2 and TGF β RI when caveolin-1 is overexpressed.

To determine if such a trend is clinically relevant, variation of $\alpha_5\beta_1$ integrins, caveolin-1 and TGF β RI was studied in 108 human brain biopsies by qPCR. ITGA5, ITGB1, CAV1, and TGFBR1 were expressed at similar levels in nonneoplastic brain tissues and gradually increased with the tumor grade (Fig. 5B), suggesting that the general tendency is a parallel increase of the expression levels of these genes with the tumor aggressivity.

To check for sub-populations of patients that would not fit with this global trend, K-means clustering analysis were performed in order to gather patients with homogenous subgroups in respect to the levels of ITGA5, CAV1, and TGFBR1. We identified 3 clusters of patients. The first one (cluster I, black dots, Fig. 5C-D) gathered patients with low levels of expression of all 3 genes compared to the two other subgroups. It gathered 71% of the samples among which 100% of the non tumoral samples (Fig. 5D). In contrast to cluster I, the levels of expression of all 3 genes were higher in cluster II (green dots, Fig. 5C) and cluster III (red dots, Fig. 5C). Cluster II and III were not similarly distributed in the 3D graphic. Cluster II was localized in an area of lower CAV1 expression but higher ITGA5 and TGBR1 expression when compared to cluster III that rather localized in an area of higher

CAV1 expression but lower ITGA5 and TGBRI expression (Fig. 5C). 12% and 17% of the samples were grouped in cluster II and III respectively (Fig. 5D). Analysis of the population parameters allowed us to show an strong enrichment in the proportion of patients distributed in cluster II during tumor progression (0%, 11% and 26% of patients with grade II, III and IV glioma respectively, Fig. 5D) balanced by a reduction of patients distributed in cluster I (86%, 71% and 41% of patients with grade II, III and IV glioma respectively, Fig. 5D) with only small changes in cluster III (14%, 18% and 23% of patients with grade II, III and IV glioma respectively, Fig. 5D). For adult patients, cluster II and III gathered 14% grade II tumors, 29% of grade III tumors and 49% of grade IV tumors. Altogether, data suggest that a reverse correlation in the expression of all three genes exists between tumors in cluster II and III. Tumors gathered in cluster II and III seems to take advantage on those represented in cluster I during tumor progression to finally represent half of the tumors of high grade.

Discussion

Caveolin-1 was identified as a negative regulator of the TGF β signaling in fibroblasts (25-27) and epithelial cells (28). A loss of caveolin-1 associated to a hyperactivation of Smad2 triggered an early stage of epithelial to mesenchymal transformation (EMT) (28). It is to date the first study reporting a physiologically relevant role for caveolin-1 in a TGF β -mediated cellular process. Such connection remained unexplored in cancer cells especially in glioma. We reported here that when overexpressed, caveolin-1 represses all components of the TGF β signaling in high grade glioma cells. Conversely silencing caveolin-1 resulted in constitutive TGF β /Smad2 signaling suggesting that caveolin-1 expression was inversely correlated to the activation status of the TGF β /Smad2 pathway. TGF β , a cytokine frequently expressed by malignant brain tumor cells and microglia, induces survival advantage by enhancing growth, invasion, angiogenesis and immune paralysis (29). Knock-down of TGF β R abolished TGF β -induced glioblastoma invasiveness (30) and high phospho-Smad2 level is a poor prognosis marker in glioma (31). The TGF β pathway is acting as an oncogenic factor in glioma and has an important role in glioma progression. We previously reported that glioblastoma cells depleted in caveolin-1 are highly proliferative and infiltrative conversely to those overexpressing caveolin-1 (16). It would be tempting to speculate that the TGF β pathway might convey such phenotype if we had not clearly identified $\alpha_5\beta_1$ integrin as the mediator of caveolin-1 effect in glioblastoma (16).

Manipulation of caveolin-1 in glioblastoma cells showed that caveolin-1 represses $\alpha_5\beta_1$ integrin expression at the transcriptional level (16). Similarly to what observed for TGF β pathway, depletion of caveolin-1 was associated to increased levels of $\alpha_5\beta_1$ integrin and vice versa (16). Exogenous TGF β 1 was reported to enhance expression of several integrin subunits among which α_5 and β_1 integrins (18, 19, 32-34). We hypothesized that the TGF β pathway might play a role in the signaling mechanism by which caveolin-1 regulates $\alpha_5\beta_1$ integrin. Inhibition of TGF β RI blocked the induction of $\alpha_5\beta_1$ integrin expression following caveolin-1 depletion. Using similar concentrations as those produced by caveolin-1 depleted cells, we showed that TGF β 1 but not activin lead to the induction of $\alpha_5\beta_1$ integrin. Data are to our knowledge the first to show the involvement of TGF β pathway in the regulation of $\alpha_5\beta_1$ integrin expression by caveolin-1 in glioblastoma.

Several mechanisms of $\alpha_5\beta_1$ integrin regulation by TGF β were identified (34-36). Although, the classical signaling cascade after interaction of TGF β with its receptors is through Smad, TGF β may signal through other pathways (ERK, PI3K, and p38).

Moir et al. reported an ERK-dependent induction of $\alpha_5\beta_1$ integrin by TGF β in human airway smooth muscle (36). Similarly, we reported that ERK activation observed after the loss of caveolin-1 controlled $\alpha_5\beta_1$ integrin expression (16). Although hyperphosphorylation of Smad2 observed after caveolin-1 depletion was abolished by the MEK/ERK inhibitor, activation of ERK observed in shRNA_{cav1}-U87MG was not affected by the TGF β RI inhibitor. Data argued in favour of a TGF β RI-independent ERK-dependent activation of Smad2. As caveolin-1 represses ERK activity by a direct interaction *via* the CSD, we hypothesized that loss of caveolin-1 frees ERK from repression allowing induction of Smad2 independently of TGF β RI. In accordance, Funaba et al. reported a direct phosphorylation of Smad2 by ERK resulting in the stabilization of Smad2 and an increase of its transcriptional activity (37). Looking for a TGF β RI-dependent signaling pathway leading to the activation of Smad2, we identified Pi3K/Akt. Bakin et al. showed a Pi3K/Akt-dependent activation of Smad2 in the EMT of mammary epithelial cells induced by TGF β (24). Blocking the hyperphosphorylation of Akt observed after caveolin-1 depletion with the PI3K inhibitor prevented the activation of Smad2 and the induction of $\alpha_5\beta_1$ integrin without affecting ERK. Caveolin-1 being also a negative regulator of TGF β RI activity, the loss of caveolin-1 might also free TGF β RI from repression allowing signal transduction. Therefore, $\alpha_5\beta_1$ integrin expression is not regulated by a single Smad2-dependent pathway but two, one being ERK-dependent/TGF β RI independent and the other being TGF β RI/Pi3K/Akt-dependent.

How effective would anti-TGF β /TGF β R/Smad or anti- $\alpha_5\beta_1$ integrin therapies be in subgroups of GBM exerting such distinct molecular pattern? Antagonizing the biological effect of TGF β /TGF β R/Smad has become a potential experimental strategy to treat glioblastoma. Anti-TGF β R therapies have shown promise in preclinical and early clinical studies (38-40) and seems to improve survival rates compared with conventional chemotherapy (41). Concerning $\alpha_5\beta_1$ integrins, several publications including ours highlight their potential role as therapeutic targets in several cancer including glioma (16, 42-46). We showed that antagonizing TGF β RI or $\alpha_5\beta_1$ integrins more efficiently blocked the surviving of glioblastoma cells expressing caveolin-1_{low}/ $\alpha_5\beta_1$ _{high}/TGF β RI_{high} levels. Similar results were already obtained using another $\alpha_5\beta_1$ integrin antagonist, SJ749 (16). Therefore, anti-TGF β /TGF β R/Smad or anti- $\alpha_5\beta_1$ integrin therapies would be more beneficial for patients presenting the most aggressive subtype of glioblastoma. Combining two pharmacological approaches that aim a common molecular target has no advantage in terms of potency to block cell surviving. However, our study opens new aspect in terms of an alternative treatment to anti-TGF β therapy already in clinical trial that might be proposed to patient in case of failure or resistance to such treatment. As we and others found that $\alpha_5\beta_1$ integrins are promising therapeutic targets in glioma and as we reported here that $\alpha_5\beta_1$ integrins are controlled by caveolin-1 through the TGF β R/Smad pathway, anti- $\alpha_5\beta_1$ integrin therapies might produce similar therapeutical effects than anti-TGF β therapies. Altogether, data suggest that the molecular profiling of glioma using our markers might be a useful predictor of the response to anti-TGF β /TGF β R/Smad or anti- $\alpha_5\beta_1$ integrin therapies and might be taken into account in future clinical trials.

Finally, knowing that caveolin-1-positive and caveolin-1-negative cells coexist among glioblastoma (15), we postulated that such specimens exert variable levels of $\alpha_5\beta_1$ integrin expression and TGF β /Smad activity since both are inversely correlated to caveolin-1. Although significant reverse correlations could be established using various human glioblastoma cell lines that are homogenous at the molecular level,

none was found when processing human brain tumor biopsies globally. Using the k-means clustering analysis on adult glioma, specimens were subgrouped into 3 clusters. Cluster I concentrates 1- samples with equal and low levels of all three genes, 2- 100% of adult non neoplastic brain tissue samples and 3- a majority of the patient samples. Cluster II and III concentrate samples with higher levels of all three genes. But both clusters are not similarly distributed in the 3D graphic: cluster II was localized in an area of lower CAV1 expression but higher ITGA5 and TGFBR1 expression ($CAV1_{low}/ITGA5_{high}/TGFBR1_{high}$) when compared to cluster III ($CAV1_{high}/ITGA5_{low}/TGFBR1_{low}$). In adult glioma, cluster II and III gathered respectively all grade merged 14% and 18% of the patients. Both clusters gathered 14%, 29% and 49% of the patients suffering respectively grade II, III and IV glioma. Such tumors are strongly represented in high grade glioma. Subgroups of glioblastoma showing strong or weak patterns of TGF β activation were recently documented. Glioblastoma with strong TGF β activation also exerted high expression of many molecules involved in integrins signaling including the β_1 integrins (17). In relation with our findings, data take all its importance and suggest that the integrin signaling is indeed under the transcriptional control of TGF β in human glioblastoma. We observed that the proportion of patients in cluster II increased dramatically from 0% in grade II to 26% in grade IV tumors, supposing that the loss of caveolin-1 associated to the gain of α_5 integrin subunit and TGF β RI reflects an increased aggressivity of such tumors. In support, we showed that glioblastoma cells exerting similar molecular profile are the most aggressive (16). Additionally, overexpression of tumor associated protein among which TGF β and hyperactivation of Smad2 are associated with a poor prognosis in glioma (31, 47). Turning to $\alpha_5\beta_1$ integrin, its expression is related to the tumor stage of glioma and the integrin signaling is part of the functional networking of glioblastoma (48, 49). Altogether, data suggest that the molecular profiling of glioma using 3 interconnected markers might also be a useful predictor of the tumor behavior and its prognosis.

In conclusion, caveolin-1 controls $\alpha_5\beta_1$ integrin expression through an ERK/Smad2-dependent pathway and a TGF β RI/Pi3K/Akt/Smad2-dependent pathway. The status of caveolin-1/ $\alpha_5\beta_1$ integrins/TGF β RI might be a useful marker of the tumor behavior and its prognosis as well as a predictor of anti-TGF β or anti- $\alpha_5\beta_1$ integrin therapies. Our data open new aspects in the understanding of the caveolin-1/ $\alpha_5\beta_1$ integrin/TGF β RI partnership in fundamental cell biology and its contribution to glioma biology.

References

1. van Deurs B, Roepstorff K, Hommelgaard AM, and Sandvig K. Caveolae: anchored, multifunctional platforms in the lipid ocean. *Trends Cell Biol* 2003; 13: 92-100.
2. Torres VA, Tapia JC, Rodriguez DA, *et al.* Caveolin-1 controls cell proliferation and cell death by suppressing expression of the inhibitor of apoptosis protein survivin. *J Cell Sci* 2006; 119: 1812-1823.
3. Liscovitch M, Burgermeister E, Jain N, Ravid D, Shatz M, and Tencer L. *Caveolin and Cancer*: Humana Press; 2005. p.161-190
4. Li T, Sotgia F, Vuolo MA, *et al.* Caveolin-1 mutations in human breast cancer: functional association with estrogen receptor alpha-positive status. *Am J Pathol* 2006; 168: 1998-2013.
5. Hult J, Bash T, Fu M, *et al.* The cyclin D1 gene is transcriptionally repressed by caveolin-1. *J Biol Chem* 2000; 275: 21203-21209.
6. Glait C, Tencer L, Ravid D, Sarfstein R, Liscovitch M, and Werner H. Caveolin-1 up-regulates IGF-I receptor gene transcription in breast cancer cells via Sp1- and p53-dependent pathways. *Exp Cell Res* 2006; 312: 3899-3908.
7. Glait C, Ravid D, Lee SW, Liscovitch M, and Werner H. Caveolin-1 controls BRCA1 gene expression and cellular localization in human breast cancer cells. *FEBS Lett* 2006; 580: 5268-5274.
8. Carver LA and Schnitzer JE. Caveolae: mining little caves for new cancer targets. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 571-581.
9. Grossman SA and Batara JF. Current management of glioblastoma multiforme. *Semin Oncol* 2004; 31: 635-644.
10. Boon K, Edwards JB, Eberhart CG, and Riggins GJ. Identification of astrocytoma associated genes including cell surface markers. *BMC Cancer* 2004; 4: 39.
11. Sallinen SL, Sallinen PK, Haapasalo HK, *et al.* Identification of differentially expressed genes in human gliomas by DNA microarray and tissue chip techniques. *Cancer Res* 2000; 60: 6617-6622.
12. Van Meter T, Dumur C, Hafez N, Garrett C, Fillmore H, and Broaddus WC. Microarray analysis of MRI-defined tissue samples in glioblastoma reveals differences in regional expression of therapeutic targets. *Diagn Mol Pathol* 2006; 15: 195-205.
13. Ross DT, Scherf U, Eisen MB, *et al.* Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat Genet* 2000; 24: 227-235.
14. Nigro JM, Misra A, Zhang L, *et al.* Integrated array-comparative genomic hybridization and expression array profiles identify clinically relevant molecular subtypes of glioblastoma. *Cancer Res* 2005; 65: 1678-1686.
15. Cassoni P, Senetta R, Castellano I, *et al.* Caveolin-1 expression is variably displayed in astroglial-derived tumors and absent in oligodendrogliomas: concrete premises for a new reliable diagnostic marker in gliomas. *Am J Surg Pathol* 2007; 31: 760-769.
16. Martin S, Cosset EC, Terrand J, Maglott A, Takeda K, and 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: 354-367.
17. Xu XL and Kapoun AM. Heterogeneous activation of the TGFbeta pathway in glioblastomas identified by gene expression-based classification using TGFbeta-responsive genes. *J Transl Med* 2009; 7: 12.
18. Wang B, Li S, Southern PJ, and Cleary PP. Streptococcal modulation of cellular invasion via TGF-beta1 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 2380-2385.
19. Heino J and Massague J. Transforming growth factor-beta switches the pattern of integrins expressed in MG-63 human osteosarcoma cells and causes a selective loss of cell adhesion to laminin. *J Biol Chem* 1989; 264: 21806-21811.

20. Heckmann D, Meyer A, Marinelli L, Zahn G, Stragies R, and Kessler H. Probing integrin selectivity: rational design of highly active and selective ligands for the alpha5beta1 and alphavbeta3 integrin receptor. *Angew Chem Int Ed Engl* 2007; 46: 3571-3574.
21. Livak KJ and Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25: 402-408.
22. Bader BL, Rayburn H, Crowley D, and Hynes RO. Extensive vasculogenesis, angiogenesis, and organogenesis precede lethality in mice lacking all alpha v integrins. *Cell* 1998; 95: 507-519.
23. Hayashida T, Decaestecker M, and Schnaper HW. Cross-talk between ERK MAP kinase and Smad signaling pathways enhances TGF-beta-dependent responses in human mesangial cells. *Faseb J* 2003; 17: 1576-1578.
24. Bakin AV, Tomlinson AK, Bhowmick NA, Moses HL, and Arteaga CL. Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration. *J Biol Chem* 2000; 275: 36803-36810.
25. Razani B, Zhang XL, Bitzer M, von Gersdorff G, Bottinger EP, and Lisanti MP. Caveolin-1 regulates transforming growth factor (TGF)-beta/SMAD signaling through an interaction with the TGF-beta type I receptor. *J Biol Chem* 2001; 276: 6727-6738.
26. Lee EK, Lee YS, Han IO, and Park SH. Expression of Caveolin-1 reduces cellular responses to TGF-beta1 through down-regulating the expression of TGF-beta type II receptor gene in NIH3T3 fibroblast cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 359: 385-390.
27. Sotgia F, Del Galdo F, Casimiro MC, *et al.* Caveolin-1-/- null mammary stromal fibroblasts share characteristics with human breast cancer-associated fibroblasts. *Am J Pathol* 2009; 174: 746-761.
28. Sotgia F, Williams TM, Schubert W, *et al.* Caveolin-1 deficiency (-/-) conveys premalignant alterations in mammary epithelia, with abnormal lumen formation, growth factor independence, and cell invasiveness. *Am J Pathol* 2006; 168: 292-309.
29. Platten M, Wick W, and Weller M. Malignant glioma biology: role for TGF-beta in growth, motility, angiogenesis, and immune escape. *Microsc Res Tech* 2001; 52: 401-410.
30. Wesolowska A, Kwiatkowska A, Slomnicki L, *et al.* Microglia-derived TGF-beta as an important regulator of glioblastoma invasion--an inhibition of TGF-beta-dependent effects by shRNA against human TGF-beta type II receptor. *Oncogene* 2008; 27: 918-930.
31. Bruna A, Darken RS, Rojo F, *et al.* High TGFbeta-Smad activity confers poor prognosis in glioma patients and promotes cell proliferation depending on the methylation of the PDGF-B gene. *Cancer Cell* 2007; 11: 147-160.
32. Zhang G, Cao Y, Xu Y, and See WA. Micro-array analysis of the effect of post-urethral bladder tumor resection urine on transforming growth factor-beta1 dependent gene expression in transitional cell carcinoma. *Urol Oncol* 2005; 23: 413-418.
33. Paulus W, Baur I, Huettner C, *et al.* Effects of transforming growth factor-beta 1 on collagen synthesis, integrin expression, adhesion and invasion of glioma cells. *J Neuropathol Exp Neurol* 1995; 54: 236-244.
34. Fong YC, Hsu SF, Wu CL, *et al.* Transforming growth factor-beta1 increases cell migration and beta1 integrin up-regulation in human lung cancer cells. *Lung Cancer* 2009; 64: 13-21.
35. Nesti LJ, Caterson EJ, Wang M, *et al.* TGF-beta1 calcium signaling increases alpha5 integrin expression in osteoblasts. *J Orthop Res* 2002; 20: 1042-1049.
36. Moir LM, Burgess JK, and Black JL. Transforming growth factor beta 1 increases fibronectin deposition through integrin receptor alpha 5 beta 1 on human airway smooth muscle. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121: 1034-1039 e1034.

37. Funaba M, Zimmerman CM, and Mathews LS. Modulation of Smad2-mediated signaling by extracellular signal-regulated kinase. *J Biol Chem* 2002; 277: 41361-41368.
38. Uhl M, Aulwurm S, Wischhusen J, *et al.* SD-208, a novel transforming growth factor beta receptor I kinase inhibitor, inhibits growth and invasiveness and enhances immunogenicity of murine and human glioma cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 2004; 64: 7954-7961.
39. Kaminska B, Wesolowska A, and Danilkiewicz M. TGF beta signalling and its role in tumour pathogenesis. *Acta Biochim Pol* 2005; 52: 329-337.
40. Hjelmeland MD, Hjelmeland AB, Sathornsumetee S, *et al.* SB-431542, a small molecule transforming growth factor-beta-receptor antagonist, inhibits human glioma cell line proliferation and motility. *Mol Cancer Ther* 2004; 3: 737-745.
41. Akhurst RJ. Large- and small-molecule inhibitors of transforming growth factor-beta signaling. *Curr Opin Investig Drugs* 2006; 7: 513-521.
42. Stoeltzing O, Liu W, Reinmuth N, *et al.* Inhibition of integrin alpha5beta1 function with a small peptide (ATN-161) plus continuous 5-FU infusion reduces colorectal liver metastases and improves survival in mice. *Int J Cancer* 2003; 104: 496-503.
43. 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: 2329-2339.
44. 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: 6002-6007.
45. Livant DL, Brabec RK, Pienta KJ, *et al.* Anti-invasive, antitumorigenic, and antimetastatic activities of the PHSCN sequence in prostate carcinoma. *Cancer Res* 2000; 60: 309-320.
46. Martinkova E, Maglott A, Leger DY, *et al.* alpha5beta1 integrin antagonists reduce chemotherapy-induced premature senescence and facilitate apoptosis in human glioblastoma cells. *Int J Cancer*.
47. Freije WA, Castro-Vargas FE, Fang Z, *et al.* Gene expression profiling of gliomas strongly predicts survival. *Cancer Res* 2004; 64: 6503-6510.
48. Kita D, Takino T, Nakada M, Takahashi T, Yamashita J, and 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: 7985-7991.
49. 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: 8679-8689.

Figure legends

Fig. 1. Caveolin-1 modulates the TGF β 1/TGF β RI/Smad2 pathway. (A) Secretion of TGF β 1 in shRNA_{ctrl-}, shRNA_{cav1-}, pEGFP_{ctrl-} or pEGFP_{cav1-}-U87MG was measured by immunoassay. Histograms show ng of TGF β 1 secreted per ml of supernatant (n=4-6, *P<0.05, **P<0.01 and ***P<0.001). (B-C) Expression of TGF β RI, phospho-Smad2, Smad2 and GAPDH was determined by western blot (WB) in shRNA_{ctrl-}, shRNA_{cav1-}, pEGFP_{ctrl-} or pEGFP_{cav1-}, shRNA_{ctrl-}, shRNA α_5- , pcDNA_{ctrl-} or pcDNA α_5- -U87MG. Histograms show the fold increase in the protein expression or phosphorylation determined by densitometry analysis (n=3-5, *P<0.05, **P<0.01). (D) Expression of α_5 integrin subunit, β_1 integrin subunit, caveolin-1, TGF β RI, phospho-Smad2, Smad2 and GAPDH was determined by western blot (WB) in siRNA_{ctrl-} and siRNA_{cav1-}-U373 (n=3-5). Histograms show the fold increase in the protein expression or phosphorylation determined by densitometry analysis (n=3-5, *P<0.05 and **P<0.01).

Fig. 2. Caveolin-1 modulates $\alpha_5\beta_1$ integrins through the TGF β /Smad2 pathway. (A) Expression of α_5 integrin subunit, β_1 integrin subunit, phospho-Smad2, Smad2 and GAPDH was determined by western blot (WB) in shRNA_{ctrl-} and shRNA_{cav1-}-U87MG treated 72h with solvent (DMSO) or SB431542 (10 μ M). Histograms show the fold increase in the protein expression or phosphorylation determined by densitometry analysis (n=4, *P<0.05, **P<0.01). (B) Histograms represent the fold increase in ITGA5 and ITGB1 mRNA in shRNA_{ctrl-} and shRNA_{cav1-}-U87MG treated 72h with solvent (DMSO) or SB431542 (10 μ M). (C) Expression of α_5 integrin subunit, β_1 integrin subunit, phospho-Smad2 and GAPDH was determined by western blot (WB) in siRNA_{ctrl-} and siRNA_{cav1-}-U373 treated 72h with solvent (DMSO) or SB431542 (10 μ M). (D) Expression of α_5 integrin subunit, caveolin-1 (cav1) and GAPDH was determined by western blot (WB) in U87MG treated 72h with solvent (DMSO), TGF β 1 (1 and 2 ng/ml) or activin (1 and 2 ng/ml). Histograms show the fold increase in the protein expression determined by densitometry analysis (n=4, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001).

Fig. 3. Caveolin-1 controls $\alpha_5\beta_1$ integrin expression through ERK-dependent Smad2 and Akt-dependent Smad2 pathways. (A) Expression of α_5 integrin subunit, β_1 integrin subunit, phospho-ERK, ERK, phospho-Akt, Akt, phospho-Smad2, Smad2, expression of TGF β RI and GAPDH was determined by western blot (WB) in shRNA_{ctrl-} and shRNA_{cav1-}-U87MG treated 24h with solvent (DMSO) or U0126 (10 μ M). Histograms show the fold increase in the protein expression or phosphorylation determined by densitometry analysis (n=3-6, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001). (B) Expression of phospho-ERK, ERK, and GAPDH was determined by western blot (WB) in shRNA_{ctrl-} and shRNA_{cav1-}-U87MG treated 24h with solvent (DMSO) or SB431542 (10 μ M). Histograms show the fold increase in the protein expression or phosphorylation determined by densitometry analysis (n=4, **P<0.01). (C) Expression of α_5 integrin subunit, β_1 integrin subunit, phospho-Akt, Akt, phospho-ERK, ERK, phospho-Smad2, Smad2, expression of TGF β RI and GAPDH was determined by western blot (WB) in shRNA_{ctrl-} and shRNA_{cav1-}-U87MG treated 24h with solvent (DMSO) or LY294002 (10 μ M). Histograms show the fold increase in the protein expression or phosphorylation determined by densitometry analysis (n=4-7, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001). (D) Expression of phospho-Akt, Akt and GAPDH was determined by western blot (WB) in shRNA_{ctrl-} and shRNA_{cav1-}-U87MG treated 24h with solvent (DMSO) or SB431542 (10 μ M). Histograms show the fold increase

in the protein expression or phosphorylation determined by densitometry analysis (n=4, *P<0.05).

Fig. 4. $\alpha_5\beta_1$ integrin antagonists and TGF β /Smad2 inhibitors significantly reduce the clonogenic survival of human glioblastoma. (A) shRNA_{ctrl}- and shRNA_{cav1}-U87MG were treated 72 h with solvent (DMSO) or K34c (10 or 30 μ M); (B) with solvent (DMSO) or SB431542 (5 or 10 μ M); (C) with solvent (DMSO) or a combination of K34c (10 μ M) and SB431542 (5 μ M). Histograms represent the surviving fraction of shRNA_{cav1}- versus shRNA_{ctrl}-transfected cells in presence of the solvent or drugs. Plating efficiency are 0.4 ± 0.1 , and 0.6 ± 0.1 for shRNA_{ctrl} and shRNA_{cav1} respectively (n=5-8, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001).

Fig. 5. Caveolin-1 is inversely correlated to $\alpha_5\beta_1$ integrins and the TGF β /Smad2 pathway in several glioblastoma cell lines as well as in human brain biopsies. (A) Expression of α_5 integrin subunit, β_1 integrin subunit, caveolin-1 (cav1), phospho-Smad2, Smad2, TGF β RI and GAPDH was determined by western blot (WB) in LN-18, LNT-229, LNZ-308, LN-319, U87MG and U373 and analyzed by densitometry analysis. Plot show the reverse correlation between indicated proteins (n=3, *P<0.05). (B) Table representing the fold increase in ITGA5 (α_5 integrin subunit), ITGB1 (β_1 integrin subunit), CAV1 (caveolin-1) and TGF β RI mRNA in 108 adults human brain tumor biopsies from various grade. (C) K-means clustering analysis of ITGA5, CAV1 and TGF β RI. Black dots=cluster I, green dots=cluster II and red dots=cluster III. Right table represents the cluster centers or the average fold increase into brackets. (D) Table identifies the tumor origin in each cluster as well the number and percentage of samples in each cluster.

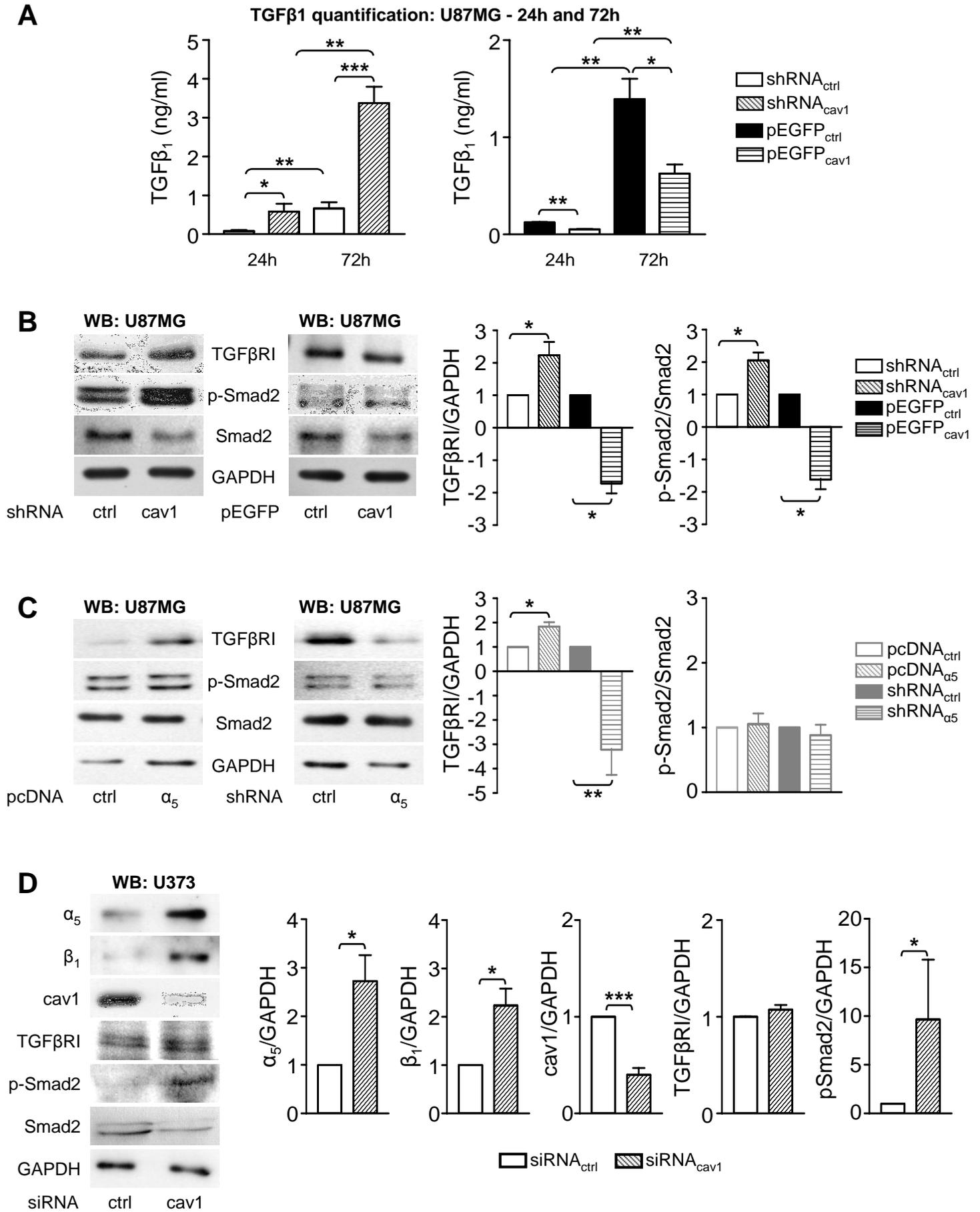


Figure 1

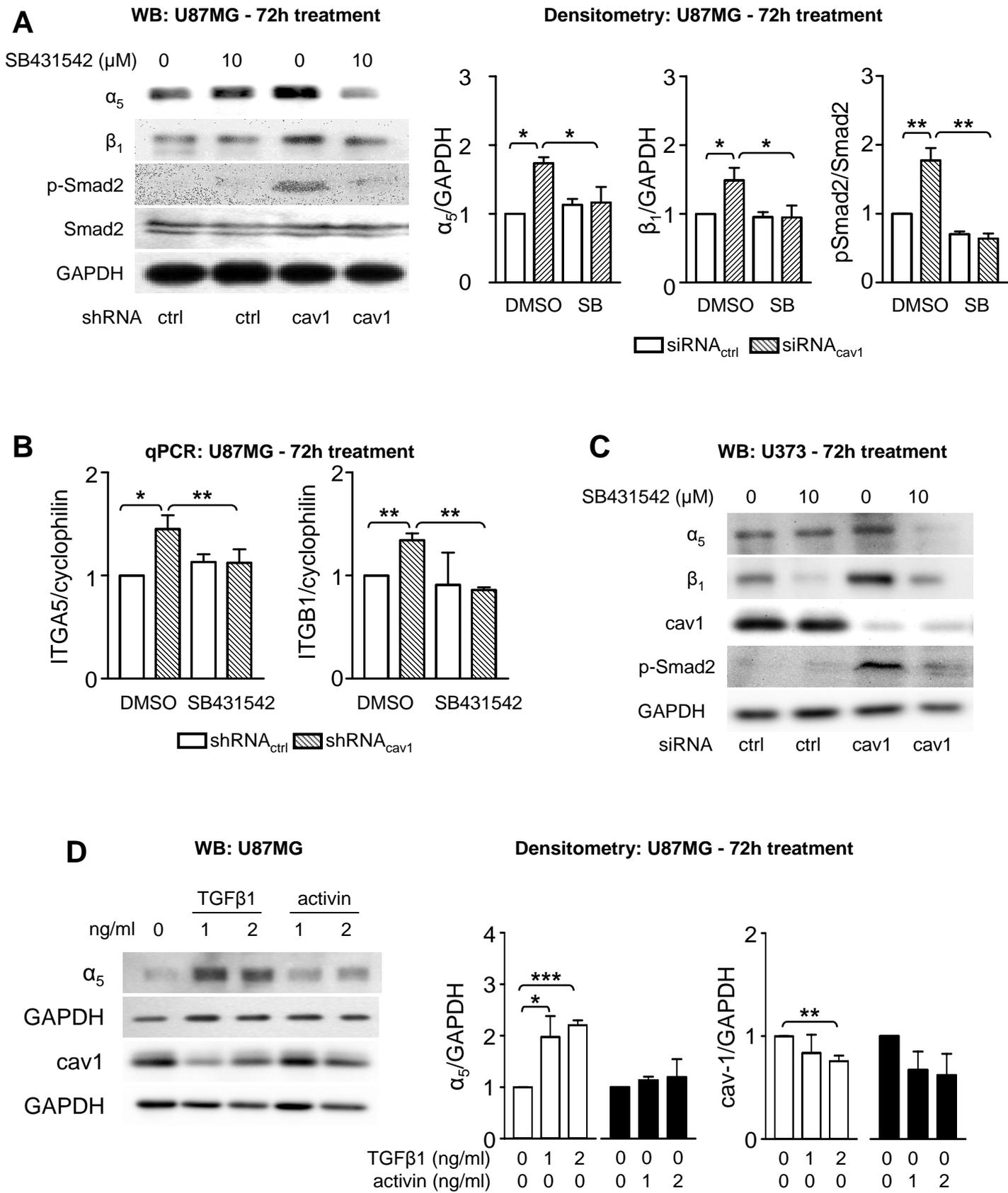


Figure 2

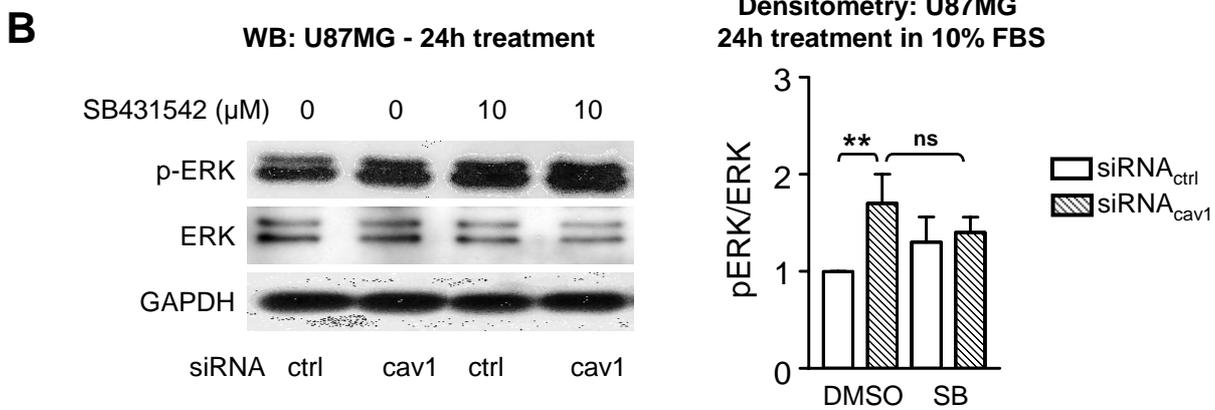
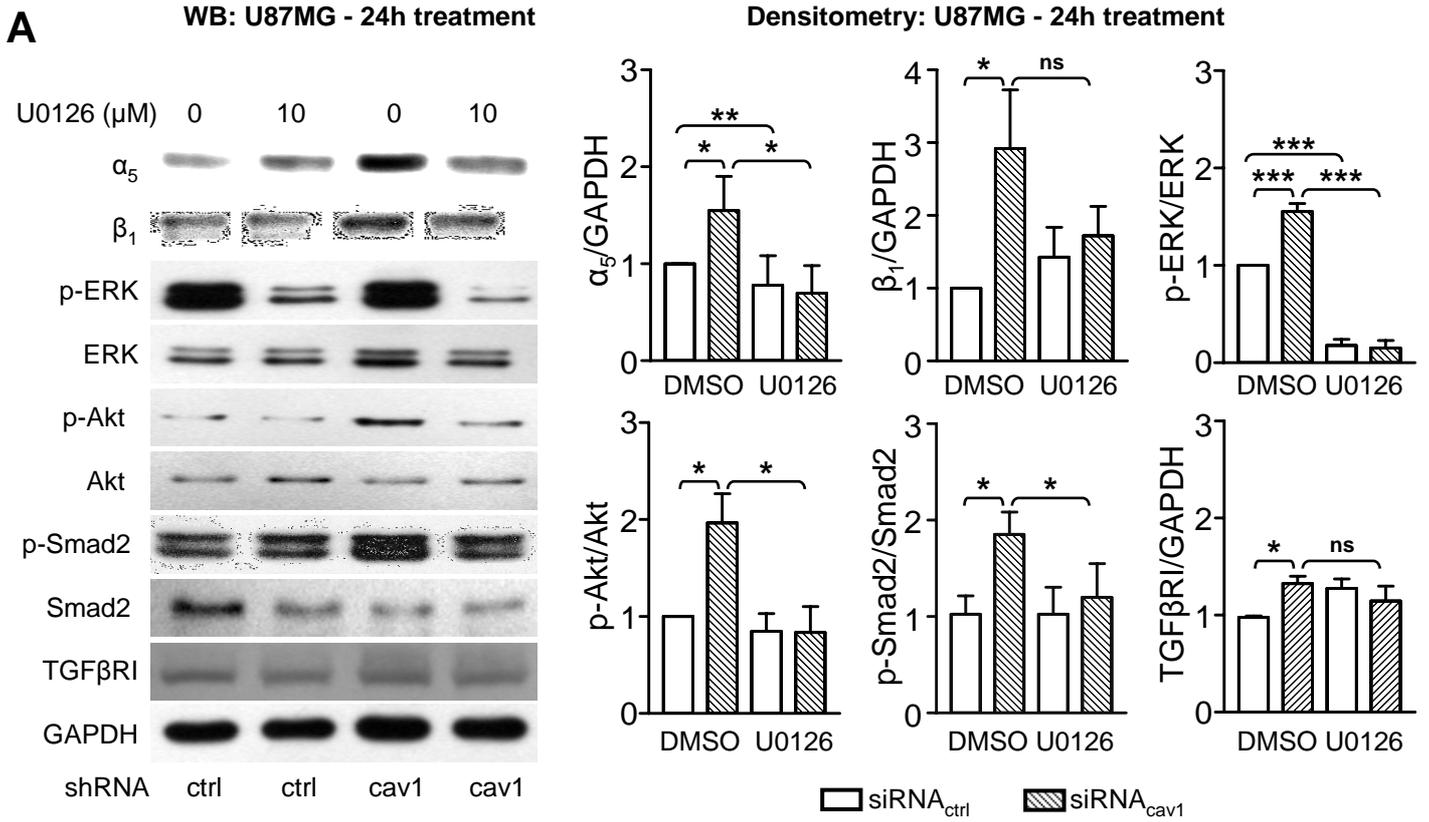


Figure 3

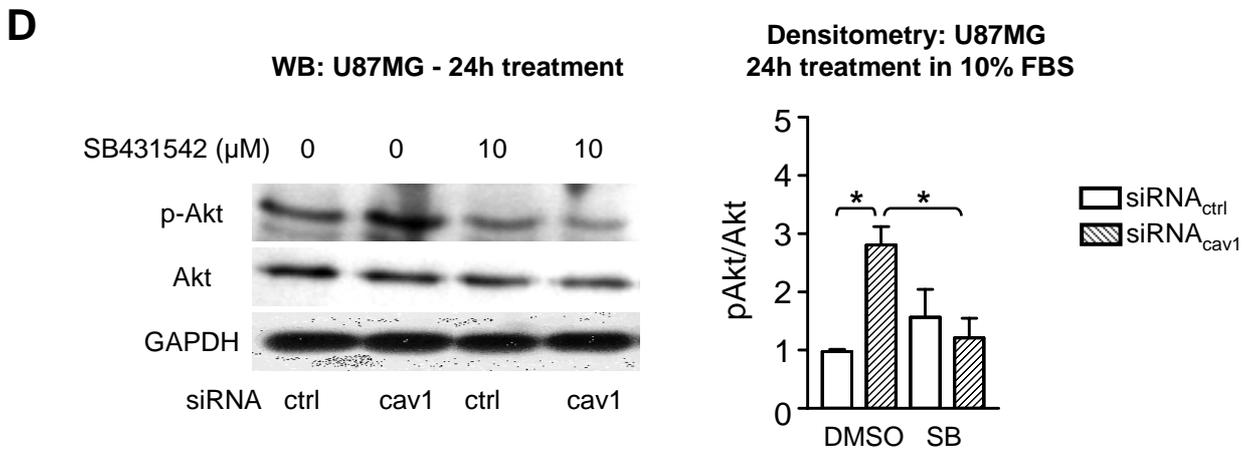
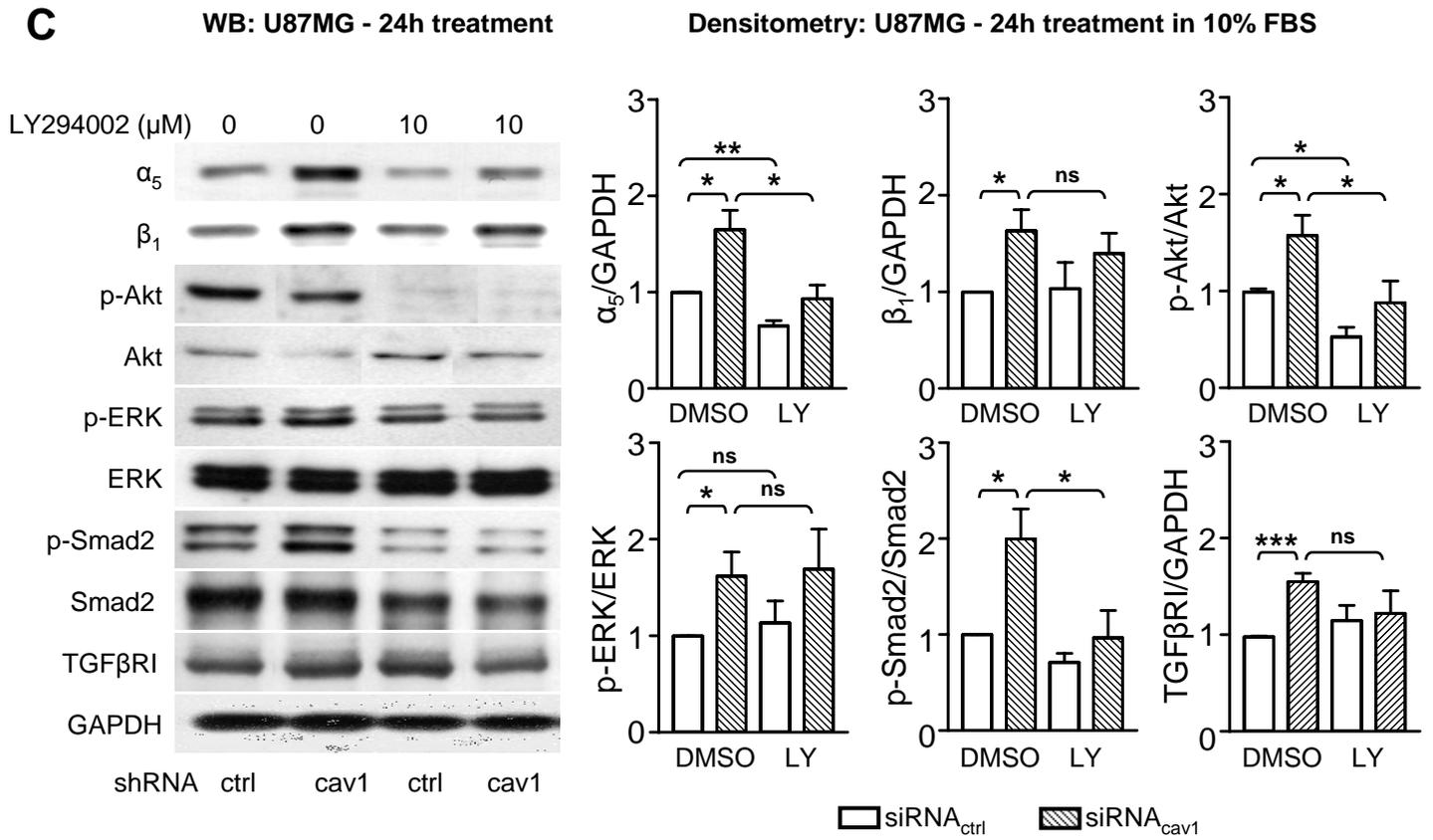


Figure 3

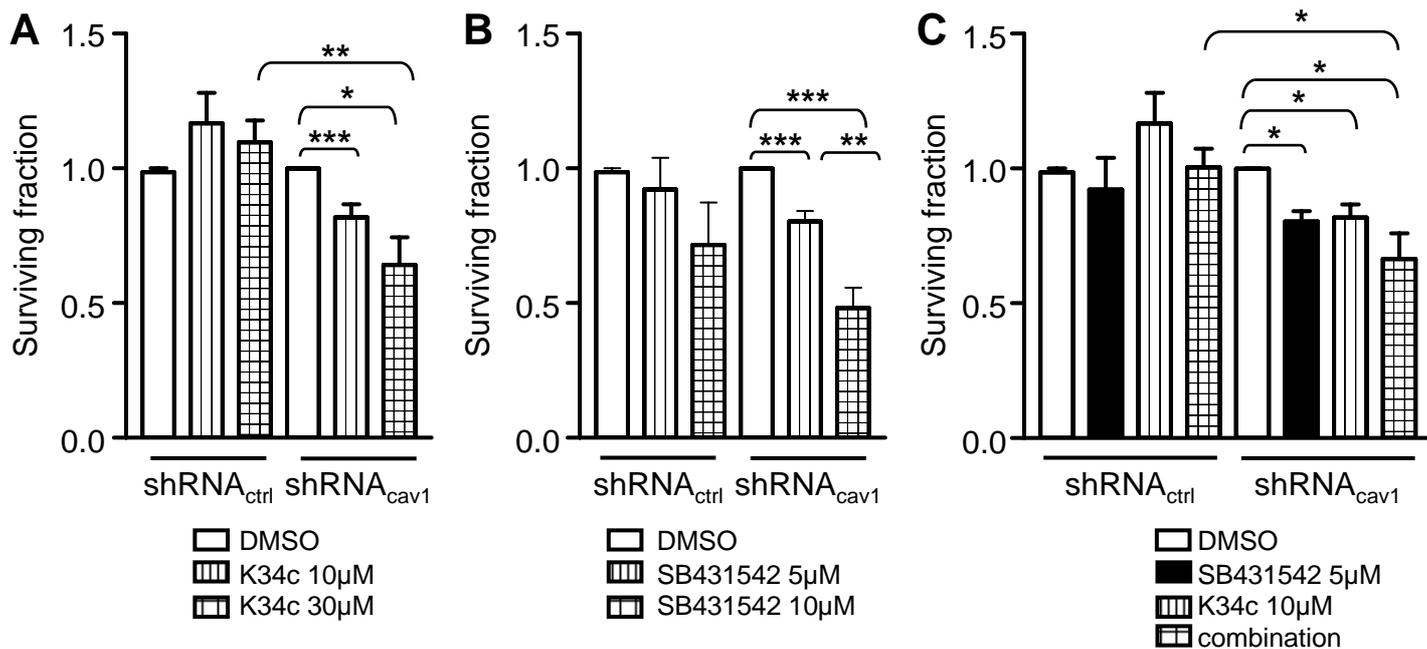
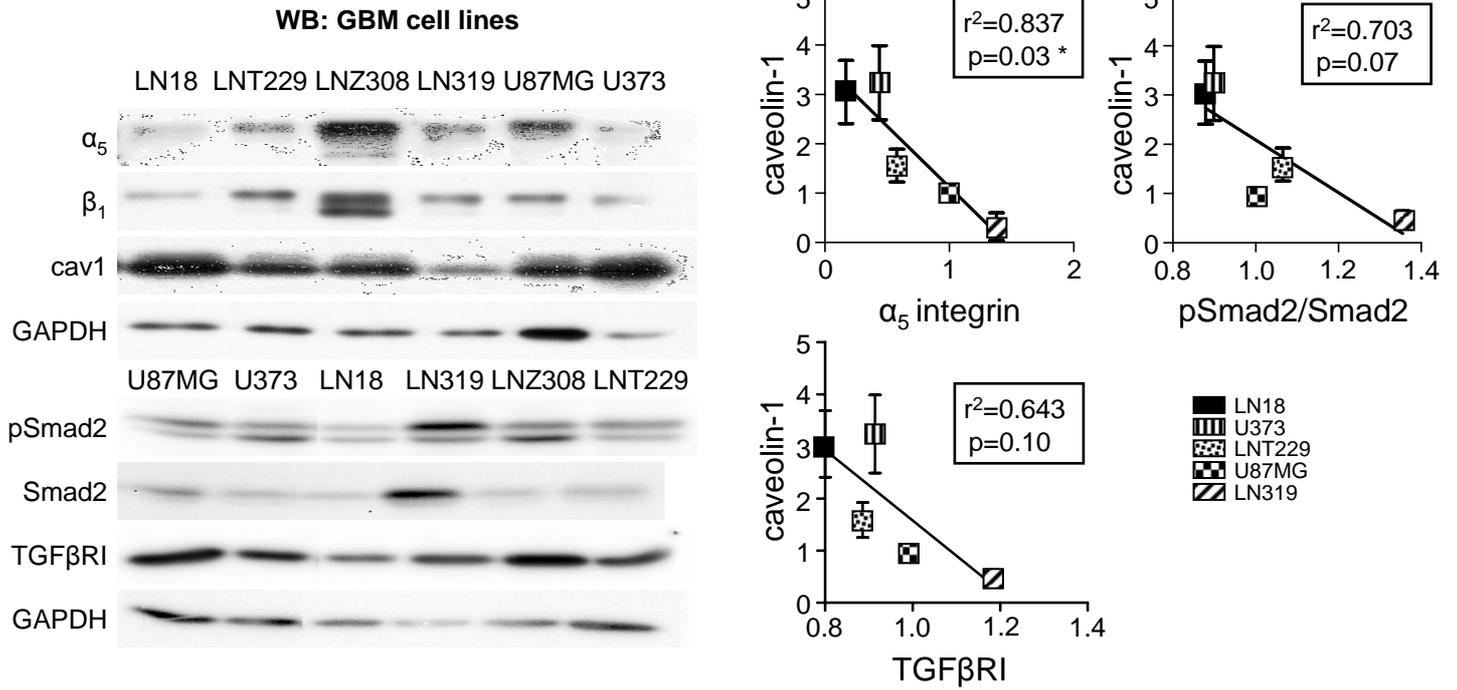


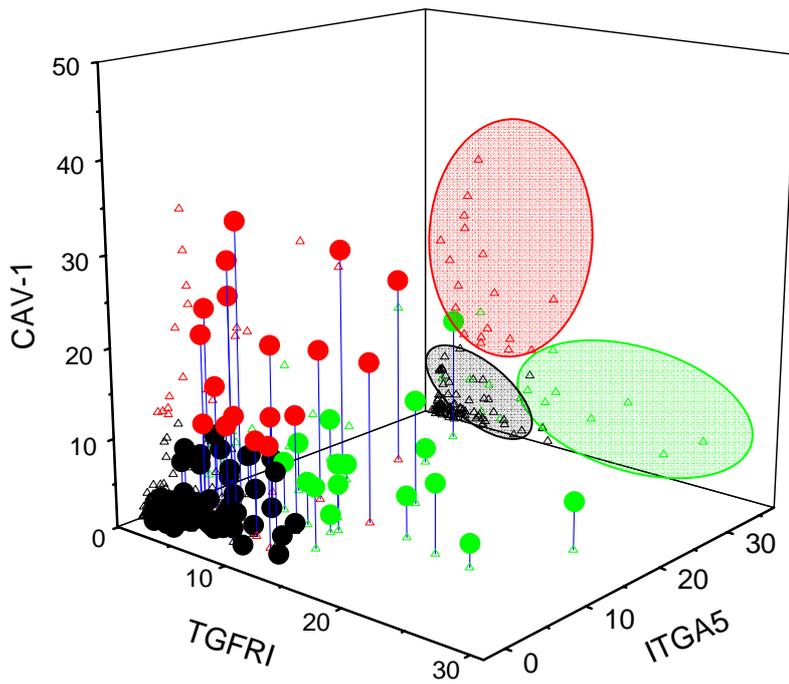
Figure 4

A**B**

| Adult samples | Fold increase | | | |
|------------------------|---------------|---------|---------|---------|
| | ITGA5 | ITGB1 | CAV1 | TGFBRI |
| Normal brain tissu | 1.5±0.2 | 1.2±0.2 | 1.3±0.2 | 1.8±0.3 |
| Adult glioma grade II | 2.6±0.5 | 2.1±0.3 | 3.1±1.2 | 4.3±0.6 |
| Adult glioma grade III | 5.6±1.0 | 3.2±0.4 | 5.2±1.1 | 4.7±0.6 |
| Adult glioma grade IV | 7.9±1.1 | 2.9±0.3 | 7.9±1.2 | 5.1±0.7 |

Figure 5

C



| Genes | Cluster centers (Average fold increase) | | |
|-------------|--|----------------|---------------|
| | ITGA5 | CAV1 | TGFRI |
| Cluster I | 2.2 (2.3) | 1.2 (1.5) | 2.4 (3.1) |
| Cluster II | 11.4 (9.0) | 5.4 (2.1) | 10.5 (7.3) |
| Cluster III | 6.1 (4.3) | 17.2 (10.6) | 5.2 (2.7) |

D

Tumor origin in each cluster:

| Clusters | I (black dots) | II (green dots) | III (red dots) | II+III (green+red dots) |
|------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------------|
| Non tumoral | 14 (100%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| Adult glioma grade II | 18/21 (86%) | 0/21 (0%) | 3/21 (14%) | 3/21 (14%) |
| Adult glioma grade III | 27/38 (71%) | 4/38 (11%) | 7/38 (18%) | 11/38 (29%) |
| Adult glioma grade IV | 18/35 (51%) | 9/35 (26%) | 8/35 (23%) | 17/35 (49%) |
| Total | 77/108 (71%) | 13/108 (12%) | 18/108 (17%) | 31/108 (29%) |

Figure 5

Supplementary data 1. Probes used for qPCR analysis.

| Probes | Forward | Reverse |
|---------------|------------------------------|------------------------------|
| cyclophilin | 5'-CAGGTCCTGGCATCTTGTC-3' | 5'-TTGCTGGTCTTGCCATTCCT-3' |
| ITGA5 | 5'-GGGCAGCAGGACAGGGTTAC-3' | 5'-GCCTTGCCAGAAATAGCTTCC-3' |
| ITGB1 | 5'-CAAA TTGTGGGTGGTGCACA-3' | 5'-TGGAGGGCAACCCTTCTTT-3' |
| CAV1 | 5'-ACCGCGACCCTAAACACCTC-3' | 5'-CCTTCAAATGCCGTCAAAA-3' |
| TGFBRI | 5'-CCACAGAGTGGGAACAAAAAGG-3' | 5'-GTCAGCACGTTTGAAGGATTCA-3' |

Supplementary data 2. Table shows tumor types, median age, sexe and the number of patients used for the study.

| Tumor type | Median age | Sexe | Number of patient |
|------------------------|-------------------|---------------|--------------------------|
| Non tumoral | 29 | M: 7 / F: 8 | 17 |
| Adult glioma grade II | 50 | M: 17 / F: 4 | 21 |
| Adult glioma grade III | 45 | M: 19 / F: 17 | 38 |
| Adult glioma grade IV | 59 | M: 16 / F: 17 | 35 |

Supplementary data

Erika COSSET
Age: 26
Driving Licence
Phone Home: (33) 3 90 29 62 49
Office: (33) 3 68 85 41 56
cosset.erika@hotmail.fr

Nationality: French
12, rue de la liberté
67114 ESCHAU
FRANCE

EDUCATION

Since 2007: PhD Candidate in Cellular, Molecular Biology

- *University of Strasbourg (Strasbourg, France)*

2006-2007: Master's Degree in Cellular, Molecular Biology and Oncology

- *Claude Bernard University (Lyon, France)*

2005-2006: Master's Degree in Biotechnologies (ESSEP)

- *Catholic University (Lyon, France)*

June 2005: First Degree/Bachelor Degree in Development's Biology and Genetics

- *Claude Bernard University (Lyon, France)*

June 2004: Two-year university diploma in Biology

- *Claude Bernard University (Lyon, France)*

June 2002: A level specialized in Science

- *Gaston Monnerville High School (Kourou, French Guyana, France)*

WORK EXPERIENCE

September 2007 to October 2010: PhD Candidate in Gilbert Laustriat Institute, Research Unit CNRS UMR 7213, University of Strasbourg

Research Project: *"Caveolin-1 regulates glioblastoma aggressiveness through regulation of integrin $\alpha 5\beta 1$ expression"*

January 2006 to July 2007: Training period in the Leon Berard Centre (CLB), National Institute of Safety and Medical Research (INSERM Unit 590)

Research Project: *"Role of the medullary micro-environment in chemo-resistance mechanisms of leukaemic stem cells to tyrosine kinase inhibitors and Interferon-alpha in Chronic Myeloid Leukaemia"*

August 2005: Voluntary training period in the Molecular Genetics and Cellular Centre (CGMC), CNRS UMR 5534 and UCBL (Claude Bernard University, Lyon)

Research Project: *"Determination of the specific regulating sequences of dRFX and characterization of its target genes"*

Techniques: Western Blot, RT-PCR-Quantitative, Clonogenicity assay, Proliferation assay (Uptiblu, MTS), Adhesion assay (on Fibronectin and stromal cells), Flow cytometry, CFC (Colony-Forming-Cell), LTC-IC (Long-Term-Colony-Initiating cell), Generation of resistant clones (to Imatinib and Interferon- α), CD34+ Selection, Mononuclear cells separation (Ficoll), Transmigration assay (transwell), siRNA (Twist-1, Smad2-3, TGF β R1, Caveolin-1), Apoptosis assay (F2N12S probe), Senescence-associated β -galactosidase activity assay, Zymography assay, Invasion assay (matrigel), ELISA (TGF- β 1)

SKILLS

Supervised project students and provided guidance to students in Pharmacy and PhD candidates

Strong participation in the general housekeeping of the laboratory

TEACHING EXPERIENCE

Practical works in Pharmacology to first-year and third-year students in Pharmacy as well as first-year master degree students

PUBLICATIONS

S. Martin, E.C. Cosset, J. Terrand, A. Maglott, K. Takeda and M. Dontenwill. 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-Mol. Cell Res.* 354-367. 2009.

E. Cosset, Hamdan G., Jeanpierre S., Voeltzel T., Hayette S, Mahon F-X., Dumontet C., Puisieux A., Nicolini F.E. and Maguer-satta V. Deregulation of TWIST-1 as a novel prognostic factor in Chronic Myeloid Leukemia (CML). *Submitted.*

E.C. Cosset, J. Godet, N. Entz-Werlé, E. Guerin, M. Jaillet, E. Pencreach, S. Legrain, S. Froelich, D. Bonnet, M. Dontenwill and S. Martin. Caveolin-1/ $\alpha 5\beta 1$ /TGF β RI: three interconnected markers identified glioblastoma cells allowing a new molecular profiling of human glioma. *Submitted.*

ANOTHER WORK EXPERIENCE

2005-2006: Teacher at home in a National company (Complétude)

2003-2007: Telemarketing actor in several marketing companies in Lyon

Agust 2003: Summer job in the cultural service of the Sinnamary city hall

Jully 2002: Summer job at the Kourou's Treasury

LANGUAGE/ SOFTWARE

English: Working knowledge (KET: Cambridge University)

Spanish: basic (Spain written correspondence)

Software: Pack office, Gene Tools, Scion Image, Origin7

INTERESTS

Volley-ball Player and trainer at the national and regional level (SL Constanca club, Strasbourg; CISGO VB, Lyon), Basket-ball (Former player and trainer at the national level: Champion Antilles-Guyana senior and youngest child)

Active member of ADDAL association (Association of PhDs and PhD Candidates of Alsace) in the conviviality committee and person currently in charge of the committee career evolution

Organization of the Forum Biotechno 2009 (June 17 2009, Strasbourg)

Member of the departmental committee of CNRS UMR 7213 (since 2008)

Certificate of first aid training (AFPS: Attestation de Formation aux premiers secours - March 2003; PSC: Prévention secours civique de niveau 1 - January 2010)

REFEREES

Monique DONTENWILL

UMR 7213 "Biophotonique et Pharmacologie"

Faculté de Pharmacie Batiment D

Université de Strasbourg

74, route du Rhin - 67401 ILLKIRCH, France

Tel: (33)-(0)3 68 85 42 67

Fax: (33)-(0) 3 68 85 43 13

Monique.dontenwill@pharma.u-strasbg.fr

Véronique MAGUER-SATTA

Inserm U590 "Oncogenèse et progression tumorale"

Centre Léon Bérard, 28 Rue Laënnec

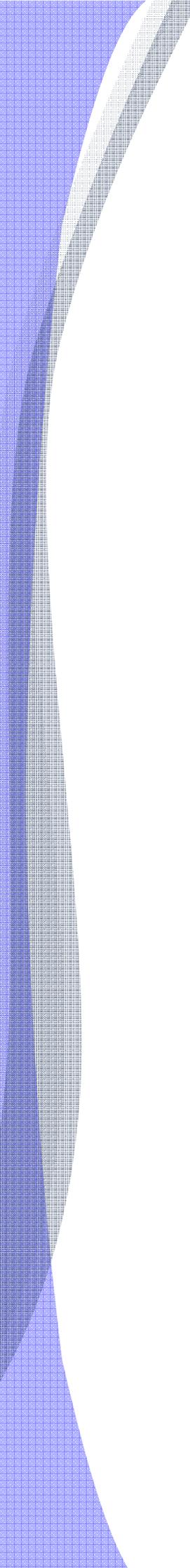
69373 Lyon, FRANCE

Tel: (33)-(0)4 78 78 29 07

Secretariat: (33)-(0)4 78 78 29 74

Fax: (33)-(0)4 78 78 27 20

Maguer@lyon.fnclcc.fr



BIBLIOGRAPHIE

Abbott JN, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat. Rev. Neurosc.* 2006 Jan;7:41-53.

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 Jan;6(1):96-101.

Anderson HA, Chen Y, Norkin LC. Bound simian virus 40 translocates to caveolin-enriched membrane domains, and its entry is inhibited by drugs that selectively disrupt caveolae. *Mol Biol Cell.* 1996 Nov;7(11):1825-34.

Anderson RG. The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:199-225.

Anderson RG, Kamen BA, Rothberg KG, Lacey SW. Potocytosis: sequestration and transport of small molecules by caveolae. *Science.* 1992 Jan 24;255(5043):410-1.

Avraamides CJ, Garmy-Susini B, Varner JA. Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2008 Aug;8(8):604-17.

Bauchet L, Rigau V, Mathieu-Daudé H, Figarella-Branger D, Hugues D, Palusseau L, Bauchet F, Fabbro M, Campello C, Capelle L, Durand A, Trétarre B, Frappaz D, Henin D, Menei P, Honnorat J, Segnarbieux F. French brain tumor data bank: methodology and first results on 10,000 cases. *J Neurooncol.* 2007 Sep;84(2):189-99.

Barakat S, Demeule M, Pilorget A, Régina A, Gingras D, Baggetto LG, Béliveau R. Modulation of p-glycoprotein function by caveolin-1 phosphorylation. *J Neurochem.* 2007 Apr;101(1):1-8.

Barakat S, Turcotte S, Demeule M, Lachambre MP, Régina A, Baggetto LG, Béliveau R. Regulation of brain endothelial cells migration and angiogenesis by P-glycoprotein/caveolin-1 interaction. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Aug 1;372(3):440-6.

Barresi V, Cerasoli S, Paioli G, Vitarelli E, Giuffrè G, Guiducci G, Tuccari G, Barresi G. Caveolin-1 in meningiomas: expression and clinico-pathological correlations. *Acta Neuropathol.* 2006 Nov;112(5):617-26.

Barresi V, Buttarelli FR, Vitarelli EE, Arcella A, Antonelli M, Giangaspero F. Caveolin-1 expression in diffuse gliomas: correlation with the proliferation index, epidermal growth factor receptor, p53, and 1p/19q status. *Hum Pathol.* 2009 Dec;40(12):1738-46.

Bartz R, Zhou J, Hsieh JT, Ying Y, Li W, Liu P. Caveolin-1 secreting LNCaP cells induce tumor growth of caveolin-1 negative LNCaP cells in vivo. *Int J Cancer.* 2008 Feb 1;122(3):520-5.

Batchelor TT, Sorensen AG, di Tomaso E, Zhang WT, Duda DG, Cohen KS, Kozak KR, Cahill DP, Chen PJ, Zhu M, Ancukiewicz M, Mrugala MM, Plotkin S, Drappatz J, Louis DN, Ivy P, Scadden DT, Benner T, Loeffler JS, Wen PY, Jain RK. AZD2171, a pan-VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, normalizes tumor vasculature and alleviates edema in glioblastoma patients. *Cancer Cell*. 2007 Jan;11(1):83-95.

Beardsley A, Fang K, Mertz H, Castranova V, Friend S, Liu J. Loss of caveolin-1 polarity impedes endothelial cell polarization and directional movement. *J Biol Chem*. 2005 Feb 4;280(5):3541-7.

Becher OJ, Hambardzumyan D, Walker TR, Helmy K, Nazarian J, Albrecht S, Hiner RL, Gall S, Huse JT, Jabado N, MacDonald TJ, Holland EC. Preclinical evaluation of radiation and perifosine in a genetically and histologically accurate model of brainstem glioma. *Cancer Res*. 2010 Mar 15;70(6):2548-57.

Bellacosa A, Kumar CC, Di Cristofano A, Testa JR. Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting. *Adv Cancer Res*. 2005;94:29-86.

Berens ME, Rief MD, Loo MA, Giese A. The role of extracellular matrix in human astrocytoma migration and proliferation studied in a microliter scale assay. *Clin Exp Metastasis*. 1994 Nov;12(6):405-15.

Bhaskar V, Fox M, Breinberg D, Wong MH, Wales PE, Rhodes S, DuBridges RB, Ramakrishnan V. Volociximab, a chimeric integrin alpha5beta1 antibody, inhibits the growth of VX2 tumors in rabbits. *Invest New Drugs*. 2008 Feb;26(1):7-12.

Bhaskar V, Zhang D, Fox M, Seto P, Wong MH, Wales PE, Powers D, Chao DT, Dubridges RB, Ramakrishnan V. A function blocking anti-mouse integrin alpha5beta1 antibody inhibits angiogenesis and impedes tumor growth in vivo. *J Transl Med*. 2007 Nov 27;5:61.

Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*. 2004 Nov 18;432(7015):332-7.

Bissell MJ, Radisky D. Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer*. 2001 Oct;1(1):46-54.

Bist A, Fielding CJ, Fielding PE. p53 regulates caveolin gene transcription, cell cholesterol, and growth by a novel mechanism. *Biochemistry*. 2000 Feb 29;39(8):1966-72.

Bradl M, Lassmann H. Oligodendrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2010 Jan;119(1):37-53.

Brandes AA, Franceschi E, Tosoni A, Blatt V, Pession A, Tallini G, Bertorelle R, Bartolini S, Calbucci F, Andreoli A, Frezza G, Leonardi M, Spagnoli F, Ermani M. MGMT promoter methylation status can predict the incidence and outcome of pseudoprogression after concomitant radiochemotherapy in newly diagnosed glioblastoma patients. *J Clin Oncol*. 2008 May 1;26(13):2192-7.

Brat DJ, Van Meir EG. Glomeruloid microvascular proliferation orchestrated by VPF/VEGF: a new world of angiogenesis research. *Am J Pathol*. 2001 Mar;158(3):789-96.

Brooks PC, Montgomery AM, Rosenfeld M, Reisfeld RA, Hu T, Klier G, Cheresch DA. Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell*. 1994 Dec 30;79(7):1157-64.

Brooks PC, Strömblad S, Sanders LC, von Schalscha TL, Aimes RT, Stetler-Stevenson WG, Quigley JP, Cheresch DA. Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell*. 1996 May 31;85(5):683-93.

Bruna A, Darken RS, Rojo F, Ocaña A, Peñuelas S, Arias A, Paris R, Tortosa A, Mora J, Baselga J, Seoane J. High TGFbeta-Smad activity confers poor prognosis in glioma patients and promotes cell proliferation depending on the methylation of the PDGF-B gene. *Cancer Cell*. 2007 Feb;11(2):147-60.

Bucci M, Gratton JP, Rudic RD, Acevedo L, Roviezzo F, Cirino G, Sessa WC. In vivo delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and reduces inflammation. *Nat Med*. 2000 Dec;6(12):1362-7.

Cai C, Chen J. Overexpression of caveolin-1 induces alteration of multidrug resistance in Hs578T breast adenocarcinoma cells. *Int J Cancer*. 2004 Sep 10;111(4):522-9.

Cai T, Lei QY, Wang LY, Zha XL. TGF-beta 1 modulated the expression of alpha 5 beta 1 integrin and integrin-mediated signaling in human hepatocarcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Aug 2;274(2):519-25.

Cairncross GJ, Ueki K, Zlatescu MC, Lisle DK, Finkelstein DM, Hammond RR, Silver JS, Stark PC, Macdonald DR, Ino Y, Ramsay DA, Louis DN. Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J Nat Cancer Inst*. 1998 Oct;90(7):1473-79.

Cameron PL, Liu C, Smart DK, Hantus ST, Fick JR, Cameron RS. Caveolin-1 expression is maintained in rat and human astrogloma cell lines. *Glia*. 2002 Mar 1;37(3):275-90.

Cameron PL, Ruffin JW, Bollag R, Rasmussen H, Cameron RS. Identification of caveolin and caveolin-related proteins in the brain. *J Neurosci*. 1997 Dec 15;17(24):9520-35.

Cao H, Courchesne WE, Mastick CC. A phosphotyrosine-dependent protein interaction screen reveals a role for phosphorylation of caveolin-1 on tyrosine 14: recruitment of C-terminal Src kinase. *J Biol Chem*. 2002 Mar 15;277(11):8771-4.

Capozza F, Williams TM, Schubert W, McClain S, Bouzahzah B, Sotgia F, Lisanti MP. Absence of caveolin-1 sensitizes mouse skin to carcinogen-induced epidermal hyperplasia and tumor formation. *Am J Pathol*. 2003 Jun;162(6):2029-39.

Cappuzzo F, Magrini E, Ceresoli GL, Bartolini S, Rossi E, Ludovini V, Gregorc V, Ligorio C, Cancellieri A, Damiani S, Spreafico A, Paties CT, Lombardo L, Calandri C, Bellezza G, Tonato M,

Crinò L. Akt phosphorylation and gefitinib efficacy in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2004 Aug 4;96(15):1133-41.

Cassoni P, Senetta R, Castellano I, Ortolan E, Bosco M, Magnani I, Ducati A. Caveolin-1 expression is variably displayed in astroglial-derived tumors and absent in oligodendrogliomas: concrete premises for a new reliable diagnostic marker in gliomas. *Am J Surg Pathol.* 2007 May;31(5):760-9.

Chakravarti A, Chakladar A, Delaney MA, Latham DE, Loeffler JS. The epidermal growth factor receptor pathway mediates resistance to sequential administration of radiation and chemotherapy in primary human glioblastoma cells in a RAS-dependent manner. *Cancer Res.* 2002 Aug 1;62(15):4307-15.

Chakravarti A, Zhai G, Suzuki Y, Sarkesh S, Black PM, Muzikansky A, Loeffler JS. The prognostic significance of phosphatidylinositol 3-kinase pathway activation in human gliomas. *J Clin Oncol.* 2004 May 15;22(10):1926-33.

Chang WJ, Rothberg KG, Kamen BA, Anderson RG. Lowering the cholesterol content of MA104 cells inhibits receptor-mediated transport of folate. *J Cell Biol.* 1992 Jul;118(1):63-9.

Chapman HA, Wei Y, Simon DI, Waltz DA. Role of urokinase receptor and caveolin in regulation of integrin signaling. *Thromb Haemost.* 1999 Aug;82(2):291-7.

Choudhury A, Marks DL, Proctor KM, Gould GW, Pagano RE. Regulation of caveolar endocytosis by syntaxin 6-dependent delivery of membrane components to the cell surface. *Nat Cell Biol.* 2006 Apr;8(4):317-28.

Cianfrocca ME, Kimmel KA, Gallo J, Cardoso T, Brown MM, Hudes G, Lewis N, Weiner L, Lam GN, Brown SC, Shaw DE, Mazar AP, Cohen RB. Phase 1 trial of the antiangiogenic peptide ATN-161 (Ac-PHSCN-NH(2)), a beta integrin antagonist, in patients with solid tumours. *Br J Cancer.* 2006 Jun 5;94(11):1621-6.

Cohen AW, Park DS, Woodman SE, Williams TM, Chandra M, Shirani J, Pereira de Souza A, Kitsis RN, Russell RG, Weiss LM, Tang B, Jelicks LA, Factor SM, Shtutin V, Tanowitz HB, Lisanti MP. Caveolin-1 null mice develop cardiac hypertrophy with hyperactivation of p42/44 MAP kinase in cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003 Feb;284(2):C457-74.

Constam DB, Philipp J, Malipiero UV, ten Dijke P, Schachner M, Fontana A. Differential expression of transforming growth factor-beta 1, -beta 2, and -beta 3 by glioblastoma cells, astrocytes, and microglia. *J Immunol.* 1992 Mar 1;148(5):1404-10.

Couet J, Li S, Okamoto T, Ikezu T, Lisanti MP. Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins. *J Biol Chem.* 1997 Mar 7;272(10):6525-33.

Couet J, Sargiacomo M, Lisanti MP. Interaction of a receptor tyrosine kinase, EGF-R, with caveolins. Caveolin binding negatively regulates tyrosine and serine/threonine kinase activities. *J Biol Chem.* 1997 Nov 28;272(48):30429-38.

D

'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, Folkman J. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Apr 26;91(9):4082-5.

Das K, Lewis RY, Scherer PE, Lisanti MP. The membrane-spanning domains of caveolins-1 and -2 mediate the formation of caveolin hetero-oligomers. Implications for the assembly of caveolae membranes in vivo. *J Biol Chem*. 1999 Jun 25;274(26):18721-8.

Davis FG, McCarthy BJ. Epidemiology of brain tumors. *Curr Opin Neurol*. 2000 Dec;13(6):635-40.

Daumas-Duport C, Varlet P, Tucker ML, Beuvon F, Cervera P, Chodkiewicz JP. Oligodendrogliomas. Part I: Patterns of growth, histological diagnosis, clinical and imaging correlations: a study of 153 cases. *J Neurooncol*. 1997 Aug;34(1):37-59.

del Pozo MA, Balasubramanian N, Alderson NB, Kiosses WB, Grande-García A, Anderson RG, Schwartz MA. Phospho-caveolin-1 mediates integrin-regulated membrane domain internalization. *Nat Cell Biol*. 2005 Sep;7(9):901-8.

Demeule M, Shedid D, Beaulieu E, Del Maestro RF, Moghrabi A, Ghosn PB, Moundjian R, Berthelet F, Béliveau R. Expression of multidrug-resistance P-glycoprotein (MDR1) in human brain tumors. *Int J Cancer*. 2001 Jul 1;93(1):62-6.

Demeule M, Jodoin J, Gingras D, Béliveau R. P-glycoprotein is localized in caveolae in resistant cells and in brain capillaries. *FEBS Lett*. 2000 Jan 28;466(2-3):219-24.

Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*. 2003 Oct 9;425(6958):577-84.

Dietrich T, Onderka J, Bock F, Kruse FE, Vossmeier D, Stragies R, Zahn G, Cursiefen C. Inhibition of inflammatory lymphangiogenesis by integrin alpha5 blockade. *Am J Pathol*. 2007 Jul;171(1):361-72.

Dietzen DJ, Hastings WR, Lublin DM. Caveolin is palmitoylated on multiple cysteine residues. Palmitoylation is not necessary for localization of caveolin to caveolae. *J Biol Chem*. 1995 Mar 24;270(12):6838-42.

Di Guglielmo GM, Le Roy C, Goodfellow AF, Wrana JL. Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover. *Nat Cell Biol*. 2003 May;5(5):410-21.

Drab M, Verkade P, Elger M, Kasper M, Lohn M, Lauterbach B, Menne J, Lindschau C, Mende F, Luft FC, Schedl A, Haller H, Kurzchalia TV. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science*. 2001 Sep 28;293(5539):2449-52.

Dupree P, Parton RG, Raposo G, Kurzchalia TV, Simons K. Caveolae and sorting in the trans-Golgi network of epithelial cells. *EMBO J*. 1993 Apr;12(4):1597-605.

E bos JM, Lee CR, Cruz-Munoz W, Bjarnason GA, Christensen JG, Kerbel RS. Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer Cell*. 2009 Mar 3;15(3):232-9.

Engelman JA, Chu C, Lin A, Jo H, Ikezu T, Okamoto T, Kohtz DS, Lisanti MP. Caveolin-mediated regulation of signaling along the p42/44 MAP kinase cascade in vivo. A role for the caveolin-scaffolding domain. *FEBS Lett*. 1998 May 29;428(3):205-11.

Engelman JA, Wykoff CC, Yasuhara S, Song KS, Okamoto T, Lisanti MP. Recombinant expression of caveolin-1 in oncogenically transformed cells abrogates anchorage-independent growth. *J Biol Chem*. 1997 Jun 27;272(26):16374-81.

Engelman JA, Lee RJ, Karnezis A, Bearss DJ, Webster M, Siegel P, Muller WJ, Windle JJ, Pestell RG, Lisanti MP. Reciprocal regulation of neu tyrosine kinase activity and caveolin-1 protein expression in vitro and in vivo. Implications for human breast cancer. *J Biol Chem*. 1998 Aug 7;273(32):20448-55.

Engelman JA, Zhang XL, Lisanti MP. Sequence and detailed organization of the human caveolin-1 and -2 genes located near the D7S522 locus (7q31.1). Methylation of a CpG island in the 5' promoter region of the caveolin-1 gene in human breast cancer cell lines. *FEBS Lett*. 1999 Apr 9;448(2-3):221-30.

Engelman JA, Zhang XL, Lisanti MP. Genes encoding human caveolin-1 and -2 are co-localized to the D7S522 locus (7q31.1), a known fragile site (FRA7G) that is frequently deleted in human cancers. *FEBS Lett*. 1998 Oct 9;436(3):403-10.

Engelman JA, Zhang XL, Razani B, Pestell RG, Lisanti MP. p42/44 MAP kinase-dependent and -independent signaling pathways regulate caveolin-1 gene expression. Activation of Ras-MAP kinase and protein kinase a signaling cascades transcriptionally down-regulates caveolin-1 promoter activity. *J Biol Chem*. 1999 Nov 5;274(45):32333-41.

F ärber K, Synowitz M, Zahn G, Vossmeier D, Stragies R, van Rooijen N, Kettenmann H. An alpha5beta1 integrin inhibitor attenuates glioma growth. *Mol Cell Neurosci*. 2008 Dec;39(4):579-85.

Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Feeser WS, Van Dyk DE, Pitts WJ, Earl RA, Hobbs F, Copeland RA, Magolda RL, Scherle PA, Trzaskos JM. Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem*. 1998 Jul 17;273(29):18623-32.

Feng Y, Venema VJ, Venema RC, Tsai N, Behzadian MA, Caldwell RB. VEGF-induced permeability increase is mediated by caveolae. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999 Jan;40(1):157-67.

Figarella-Branger D, Colin C, Coulibaly B, Quilichili B, Maues De Paula A, Fernandez C, Bouvier C. Classification histologique et moléculaire des gliomes Histological and molecular classification of gliomas. *Revue Neurologique*. 2008 Mars 164: 505-15.

Fine HA, Figg WD, Jaeckle K, Wen PY, Kyritsis AP, Loeffler JS, Levin VA, Black PM, Kaplan R, Pluda JM, Yung WK. Phase II trial of the antiangiogenic agent thalidomide in patients with recurrent high-grade gliomas. *J Clin Oncol*. 2000 Feb;18(4):708-15.

Fine HA, Wen PY, Maher EA, Viscosi E, Batchelor T, Lakhani N, Figg WD, Purow BW, Borkowf CB. Phase II trial of thalidomide and carmustine for patients with recurrent high-grade gliomas. *J Clin Oncol*. 2003 Jun 15;21(12):2299-304.

Fiucci G, Ravid D, Reich R, Liscovitch M. Caveolin-1 inhibits anchorage-independent growth, anoikis and invasiveness in MCF-7 human breast cancer cells. *Oncogene*. 2002 Apr 4;21(15):2365-75.

Felley-Bosco E, Bender FC, Courjault-Gautier F, Bron C, Quest AF. Caveolin-1 down-regulates inducible nitric oxide synthase via the proteasome pathway in human colon carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Dec 19;97(26):14334-9.

Feron O, Belhassen L, Kobzik L, Smith TW, Kelly RA, Michel T. Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J Biol Chem*. 1996 Sep 13;271(37):22810-4.

Fontana J, Fulton D, Chen Y, Fairchild TA, McCabe TJ, Fujita N, Tsuruo T, Sessa WC. Domain mapping studies reveal that the M domain of hsp90 serves as a molecular scaffold to regulate Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase and NO release. *Circ Res*. 2002 May 3;90(8):866-73.

Fra AM, Mastroianni N, Mancini M, Pasqualetto E, Sitia R. Human caveolin-1 and caveolin-2 are closely linked genes colocalized with WI-5336 in a region of 7q31 frequently deleted in tumors. *Genomics*. 1999 Mar 15;56(3):355-6.

Fra AM, Williamson E, Simons K, Parton RG. Detergent-insoluble glycolipid microdomains in lymphocytes in the absence of caveolae. *J Biol Chem*. 1994 Dec 9;269(49):30745-8.

Fra AM, Williamson E, Simons K, Parton RG. De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Sep 12;92(19):8655-9.

Freije WA, Castro-Vargas FE, Fang Z, Horvath S, Cloughesy T, Liao LM, Mischel PS, Nelson SF. Gene expression profiling of gliomas strongly predicts survival. *Cancer Res*. 2004 Sep 15;64(18):6503-10.

Friedman HS, Kerby T, Calvert H. Temozolomide and treatment of malignant glioma. *Clin Cancer Res*. 2000 Jul;6(7):2585-97.

Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, Hahn WC, Ligon KL, Louis DN, Brennan C, Chin L, DePinho RA, Cavenee WK. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev*. 2007 Nov 1;21(21):2683-710.

G

Galbiati F, Volonte D, Brown AM, Weinstein DE, Ben-Ze'ev A, Pestell RG, Lisanti MP. Caveolin-1 expression inhibits Wnt/beta-catenin/Lef-1 signaling by recruiting beta-catenin to caveolae membrane domains. *J Biol Chem*. 2000 Jul 28;275(30):23368-77.

Galbiati F, Volonte D, Engelman JA, Watanabe G, Burk R, Pestell RG, Lisanti MP. Targeted downregulation of caveolin-1 is sufficient to drive cell transformation and hyperactivate the p42/44 MAP kinase cascade. *EMBO J*. 1998 Nov 16;17(22):6633-48.

Galbiati F, Volonté D, Liu J, Capozza F, Frank PG, Zhu L, Pestell RG, Lisanti MP. Caveolin-1 expression negatively regulates cell cycle progression by inducing G(0)/G(1) arrest via a p53/p21(WAF1/Cip1)-dependent mechanism. *Mol Biol Cell*. 2001 Aug;12(8):2229-44.

García-Cardena G, Martasek P, Masters BS, Skidd PM, Couet J, Li S, Lisanti MP, Sessa WC. Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain in vivo. *J Biol Chem*. 1997 Oct 10;272(41):25437-40.

Gaus K, Le Lay S, Balasubramanian N, Schwartz MA. Integrin-mediated adhesion regulates membrane order. *J Cell Biol*. 2006 Aug 28;174(5):725-34.

Gentilucci L, Cardillo G, Spampinato S, Tolomelli A, Squassabia F, De Marco R, Bedini A, Baiula M, Belvisi L, Civera M. Antiangiogenic effect of dual/selective alpha(5)beta(1)/alpha(v)beta(3) integrin antagonists designed on partially modified retro-inverso cyclotrapeptide mimetics. *J Med Chem*. 2010 Jan 14;53(1):106-18.

Ghosh S, Gachhui R, Crooks C, Wu C, Lisanti MP, Stuehr DJ. Interaction between caveolin-1 and the reductase domain of endothelial nitric-oxide synthase. Consequences for catalysis. *J Biol Chem*. 1998 Aug 28;273(35):22267-71.

Giancotti FG. Complexity and specificity of integrin signalling. *Nat Cell Biol*. 2000 Jan;2(1):E13-4.

Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science*. 1999 Aug 13;285(5430):1028-32.

Giannopoulou E, Dimitropoulos K, Argyriou AA, Koutras AK, Dimitrakopoulos F, Kalofonos HP. An in vitro study, evaluating the effect of sunitinib and/or lapatinib on two glioma cell lines. *Invest New Drugs*. 2009 Jul 15.

Gladson CL, Cheresch DA. Glioblastoma expression of vitronectin and the alpha v beta 3 integrin. Adhesion mechanism for transformed glial cells. *J Clin Invest*. 1991 Dec;88(6):1924-32.

Gladson CL, Wilcox JN, Sanders L, Gillespie GY, Cheresch DA. Cerebral microenvironment influences expression of the vitronectin gene in astrocytic tumors. *J Cell Sci*. 1995 Mar;108 (Pt 3):947-56.

Glait C, Tencer L, Ravid D, Sarfstein R, Liscovitch M, Werner H. Caveolin-1 up-regulates IGF-I receptor gene transcription in breast cancer cells via Sp1- and p53-dependent pathways. *Exp Cell Res*. 2006 Nov 15;312(19):3899-908.

Glenney JR Jr. The sequence of human caveolin reveals identity with VIP21, a component of transport vesicles. *FEBS Lett*. 1992 Dec 7;314(1):45-8.

Glenney JR Jr. Tyrosine phosphorylation of a 22-kDa protein is correlated with transformation by Rous sarcoma virus. *J Biol Chem*. 1989 Dec 5;264(34):20163-6.

Glenney JR Jr, Zokas L. Novel tyrosine kinase substrates from Rous sarcoma virus-transformed cells are present in the membrane skeleton. *J Cell Biol*. 1989 Jun;108(6):2401-8.

Gottesman MM, Pastan I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem*. 1993;62:385-427.

Grande-García A, Echarri A, de Rooij J, Alderson NB, Waterman-Storer CM, Valdivielso JM, del Pozo MA. Caveolin-1 regulates cell polarization and directional migration through Src kinase and Rho GTPases. *J Cell Biol*. 2007 May 21;177(4):683-94.

Green JM, Zhelesnyak A, Chung J, Lindberg FP, Sarfati M, Frazier WA, Brown EJ. Role of cholesterol in formation and function of a signaling complex involving alphavbeta3, integrin-associated protein (CD47), and heterotrimeric G proteins. *J Cell Biol*. 1999 Aug 9;146(3):673-82.

Griffero F, Daga A, Marubbi D, Capra MC, Melotti A, Pattarozzi A, Gatti M, Bajetto A, Porcile C, Barbieri F, Favoni RE, Lo Casto M, Zona G, Spaziante R, Florio T, Corte G. Different response of human glioma tumor-initiating cells to epidermal growth factor receptor kinase inhibitors. *J Biol Chem*. 2009 Mar 13;284(11):7138-48.

Griffoni C, Spisni E, Santi S, Riccio M, Guarnieri T, Tomasi V. Knockdown of caveolin-1 by antisense oligonucleotides impairs angiogenesis in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Sep 24;276(2):756-61.

Guha A, Feldkamp MM, Lau N, Boss G, Pawson A. Proliferation of human malignant astrocytomas is dependent on Ras activation. *Oncogene*. 1997 Dec 4;15(23):2755-65.

H aas-Kogan DA, Prados MD, Tihan T, Eberhard DA, Jelluma N, Arvold ND, Baumber R, Lamborn KR, Kapadia A, Malec M, Berger MS, Stokoe D. Epidermal growth factor receptor, protein kinase B/Akt, and glioma response to erlotinib. *J Natl Cancer Inst*. 2005 Jun 15;97(12):880-7.

Haas-Kogan D, Shalev N, Wong M, Mills G, Yount G, Stokoe D. Protein kinase B (PKB/Akt) activity is elevated in glioblastoma cells due to mutation of the tumor suppressor PTEN/MMAC. *Curr Biol*. 1998 Oct 22;8(21):1195-8.

Halatsch ME, Schmidt U, Behnke-Mursch J, Unterberg A, Wirtz CR. Epidermal growth factor receptor inhibition for the treatment of glioblastoma multiforme and other malignant brain tumours. *Cancer Treat Rev.* 2006 Apr;32(2):74-89.

Hamaguchi E, Takamura T, Shimizu A, Nagai Y. Tumor necrosis factor-alpha and troglitazone regulate plasminogen activator inhibitor type 1 production through extracellular signal-regulated kinase- and nuclear factor-kappaB-dependent pathways in cultured human umbilical vein endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003 Dec;307(3):987-94.

Han VK, D'Ercole AJ, Lund PK. Cellular localization of somatomedin (insulin-like growth factor) messenger RNA in the human fetus. *Science.* 1987 Apr 10;236(4798):193-7.

Hau P, Jachimczak P, Bogdahn U. Treatment of malignant gliomas with TGF-beta2 antisense oligonucleotides. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2009 Nov;9(11):1663-74. *Abst*

Hayashi K, Matsuda S, Machida K, Yamamoto T, Fukuda Y, Nimura Y, Hayakawa T, Hamaguchi M. Invasion activating caveolin-1 mutation in human scirrhous breast cancers. *Cancer Res.* 2001 Mar 15;61(6):2361-4.

Head BP, Patel HH, Roth DM, Murray F, Swaney JS, Niesman IR, Farquhar MG, Insel PA. Microtubules and actin microfilaments regulate lipid raft/caveolae localization of adenylyl cyclase signaling components. *J Biol Chem.* 2006 Sep 8;281(36):26391-9.

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 Jun 16;9(9):1397-407.

Hegi ME, Diserens AC, Godard S, Dietrich PY, Regli L, Ostermann S, Otten P, Van Melle G, de Tribolet N, Stupp R. Clinical trial substantiates the predictive value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide. *Clin Cancer Res.* 2004 Mar 15;10(6):1871-4.

Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005 Mar 10;352(10):997-1003.

Hegi ME, zur Hausen A, Rüedi D, Malin G, Kleihues P. Hemizygous or homozygous deletion of the chromosomal region containing the p16INK4a gene is associated with amplification of the EGF receptor gene in glioblastomas. *Int J Cancer.* 1997 Sep 26;73(1):57-63.

Hermanson M, Funa K, Koopmann J, Maintz D, Waha A, Westermarck B, Heldin CH, Wiestler OD, Louis DN, von Deimling A, Nistér M. Association of loss of heterozygosity on chromosome 17p with high platelet-derived growth factor alpha receptor expression in human malignant gliomas. *Cancer Res.* 1996 Jan 1;56(1):164-71.

Herreros J, Ng T, Schiavo G. Lipid rafts act as specialized domains for tetanus toxin binding and internalization into neurons. *Mol Biol Cell*. 2001 Oct;12(10):2947-60.

Hill MM, Bastiani M, Luetterforst R, Kirkham M, Kirkham A, Nixon SJ, Walser P, Abankwa D, Oorschot VM, Martin S, Hancock JF, Parton RG. PTRF-Cavin, a conserved cytoplasmic protein required for caveola formation and function. *Cell*. 2008 Jan 11;132(1):113-24.

Hirose Y, Berger MS, Pieper RO. Abrogation of the Chk1-mediated G(2) checkpoint pathway potentiates temozolomide-induced toxicity in a p53-independent manner in human glioblastoma cells. *Cancer Res*. 2001 Aug 1;61(15):5843-9.

Hjelmeland MD, Hjelmeland AB, Sathornsumetee S, Reese ED, Herbstreith MH, Laping NJ, Friedman HS, Bigner DD, Wang XF, Rich JN. SB-431542, a small molecule transforming growth factor-beta-receptor antagonist, inhibits human glioma cell line proliferation and motility. *Mol Cancer Ther*. 2004 Jun;3(6):737-45.

Hjortland GO, Lillehammer T, Somme S, Wang J, Halvorsen T, Juell S, Hirschberg H, Fodstad Ø, Engebraaten O. Plasminogen activator inhibitor-1 increases the expression of VEGF in human glioma cells. *Exp Cell Res*. 2004 Mar 10;294(1):130-9.

Hnasko R, Lisanti MP. The biology of caveolae: lessons from caveolin knockout mice and implications for human disease. *Mol Interv*. 2003 Dec;3(8):445-64.

Ho CC, Huang PH, Huang HY, Chen YH, Yang PC, Hsu SM. Up-regulated caveolin-1 accentuates the metastasis capability of lung adenocarcinoma by inducing filopodia formation. *Am J Pathol*. 2002 Nov;161(5):1647-56.

Hoelzinger DB, Mariani L, Weis J, Woyke T, Berens TJ, McDonough WS, Sloan A, Coons SW, Berens ME. Gene expression profile of glioblastoma multiforme invasive phenotype points to new therapeutic targets. *Neoplasia*. 2005 Jan;7(1):7-16.

Holland EC, Celestino J, Dai C, Schaefer L, Sawaya RE, Fuller GN. Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice. *Nat Genet*. 2000 May;25(1):55-7.

Hua X, Liu X, Ansari DO, Lodish HF. Synergistic cooperation of TFE3 and smad proteins in TGF-beta-induced transcription of the plasminogen activator inhibitor-1 gene. *Genes Dev*. 1998 Oct 1;12(19):3084-95.

Hulit J, Bash T, Fu M, Galbiati F, Albanese C, Sage DR, Schlegel A, Zhurinsky J, Shtutman M, Ben-Ze'ev A, Lisanti MP, Pestell RG. The cyclin D1 gene is transcriptionally repressed by caveolin-1. *J Biol Chem*. 2000 Jul 14;275(28):21203-9.

Hulleman E, Helin K. Molecular mechanisms in gliomagenesis. *Adv Cancer Res*. 2005;94:1-27.

Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*. 2002 Sep 20;110(6):673-87.

Ichimura K, Ohgaki H, Kleihues P, Collins VP. Molecular pathogenesis of astrocytic tumours. *J Neurooncol.* 2004 Nov;70(2):137-60.

Ikezu T, Ueda H, Trapp BD, Nishiyama K, Sha JF, Volonte D, Galbiati F, Byrd AL, Bassell G, Serizawa H, Lane WS, Lisanti MP, Okamoto T. Affinity-purification and characterization of caveolins from the brain: differential expression of caveolin-1, -2, and -3 in brain endothelial and astroglial cell types. *Brain Res.* 1998 Sep 7;804(2):177-92.

Inman GJ, Nicolás FJ, Callahan JF, Harling JD, Gaster LM, Reith AD, Laping NJ, Hill CS. SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Mol Pharmacol.* 2002 Jul;62(1):65-74.

Isshiki M, Ando J, Yamamoto K, Fujita T, Ying Y, Anderson RG. Sites of Ca(2+) wave initiation move with caveolae to the trailing edge of migrating cells. *J Cell Sci.* 2002 Feb 1;115(Pt 3):475-84.

Jin H, Varner J. Integrins: roles in cancer development and as treatment targets. *Br J Cancer.* 2004 Feb 9;90(3):561-5.

Jodoin J, Demeule M, Fenart L, Cecchelli R, Farmer S, Linton KJ, Higgins CF, Béliveau R. P-glycoprotein in blood-brain barrier endothelial cells: interaction and oligomerization with caveolins. *J Neurochem.* 2003 Nov;87(4):1010-23.

Ju H, Zou R, Venema VJ, Venema RC. Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity. *J Biol Chem.* 1997 Jul 25;272(30):18522-5.

Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006 May;6(5):392-401.

Keime-Guibert F, Chinot O, Taillandier L, Cartalat-Carel S, Frenay M, Kantor G, Guillamo JS, Jadaud E, Colin P, Bondiau PY, Meneï P, Loiseau H, Bernier V, Honnorat J, Barrié M, Mokhtari K, Mazon JJ, Bissery A, Delattre JY; Association of French-Speaking Neuro-Oncologists. Radiotherapy for glioblastoma in the elderly. *N Engl J Med.* 2007 Apr 12;356(15):1527-35.

Khalili P, Arakelian A, Chen G, Plunkett ML, Beck I, Parry GC, Doñate F, Shaw DE, Mazar AP, Rabbani SA. A non-RGD-based integrin binding peptide (ATN-161) blocks breast cancer growth and metastasis in vivo. *Mol Cancer Ther.* 2006 Sep;5(9):2271-80.

Kleihues P, Ohgaki H. Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro Oncol.* 1999 Jan;1(1):44-51.

Kim JB, Stein R, O'Hare MJ. Three-dimensional in vitro tissue culture models of breast cancer-- a review. *Breast Cancer Res Treat.* 2004 Jun;85(3):281-91.

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 Apr;156(4):1345-62.

Kjellman C, Olofsson SP, Hansson O, Von Schantz T, Lindvall M, Nilsson I, Salford LG, Sjögren HO, Widegren B. Expression of TGF-beta isoforms, TGF-beta receptors, and SMAD molecules at different stages of human glioma. *Int J Cancer.* 2000 May 20;89(3):251-8.

Kleihues P, Ohgaki H. Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro Oncol.* 1999 Jan;1(1):44-51.

Knott JC, Mahesparan R, Garcia-Cabrera I, Bølge Tysnes B, Edvardsen K, Ness GO, Mørk S, Lund-Johansen M, Bjerkvig R. Stimulation of extracellular matrix components in the normal brain by invading glioma cells. *Int J Cancer.* 1998 Mar 16;75(6):864-72.

Koleske AJ, Baltimore D, Lisanti MP. Reduction of caveolin and caveolae in oncogenically transformed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Feb 28;92(5):1381-5.

Kondapaka SB, Singh SS, Dasmahapatra GP, Sausville EA, Roy KK. Perifosine, a novel alkylphospholipid, inhibits protein kinase B activation. *Mol Cancer Ther.* 2003 Nov;2(11):1093-103.

Kreisl TN, Lassman AB, Mischel PS, Rosen N, Scher HI, Teruya-Feldstein J, Shaffer D, Lis E, Abrey LE. A pilot study of everolimus and gefitinib in the treatment of recurrent glioblastoma (GBM). *J Neurooncol.* 2009 Mar;92(1):99-105.

Kurzchalia TV, Dupree P, Parton RG, Kellner R, Virta H, Lehnert M, Simons K. VIP21, a 21-kD membrane protein is an integral component of trans-Golgi-network-derived transport vesicles. *J Cell Biol.* 1992 Sep;118(5):1003-14.

Kutz SM, Higgins CE, Samarakoon R, Higgins SP, Allen RR, Qi L, Higgins PJ. TGF-beta 1-induced PAI-1 expression is E box/USF-dependent and requires EGFR signaling. *Exp Cell Res.* 2006 Apr 15;312(7):1093-105.

Lampert K, Machein U, Machein MR, Conca W, Peter HH, Volk B. Expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in human brain tumors. *Am J Pathol.* 1998 Aug;153(2):429-37.

Lauer S, VanWye J, Harrison T, McManus H, Samuel BU, Hiller NL, Mohandas N, Haldar K. Vacuolar uptake of host components, and a role for cholesterol and sphingomyelin in malarial infection. *EMBO J.* 2000 Jul 17;19(14):3556-64.

- Lavie Y, Fiucci G, Liscovitch M. Up-regulation of caveolae and caveolar constituents in multidrug-resistant cancer cells. *J Biol Chem*. 1998 Dec 4;273(49):32380-3.
- Le PU, Nabi IR. Distinct caveolae-mediated endocytic pathways target the Golgi apparatus and the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci*. 2003 Mar 15;116(Pt 6):1059-71.
- Lee BH, Ruoslahti E. alpha5beta1 integrin stimulates Bcl-2 expression and cell survival through Akt, focal adhesion kinase, and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV. *J Cell Biochem*. 2005 Aug 15;95(6):1214-23.
- Lee EK, Lee YS, Han IO, Park SH. Expression of Caveolin-1 reduces cellular responses to TGF-beta1 through down-regulating the expression of TGF-beta type II receptor gene in NIH3T3 fibroblast cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Jul 27;359(2):385-90.
- Lee H, Park DS, Razani B, Russell RG, Pestell RG, Lisanti MP. Caveolin-1 mutations (P132L and null) and the pathogenesis of breast cancer: caveolin-1 (P132L) behaves in a dominant-negative manner and caveolin-1 (-/-) null mice show mammary epithelial cell hyperplasia. *Am J Pathol*. 2002 Oct;161(4):1357-69.
- Lee H, Volonte D, Galbiati F, Iyengar P, Lublin DM, Bregman DB, Wilson MT, Campos-Gonzalez R, Bouzahzah B, Pestell RG, Scherer PE, Lisanti MP. Constitutive and growth factor-regulated phosphorylation of caveolin-1 occurs at the same site (Tyr-14) in vivo: identification of a c-Src/Cav-1/Grb7 signaling cassette. *Mol Endocrinol*. 2000 Nov;14(11):1750-75.
- Lee SW, Reimer CL, Oh P, Campbell DB, Schnitzer JE. Tumor cell growth inhibition by caveolin re-expression in human breast cancer cells. *Oncogene*. 1998 Mar;16(11):1391-7.
- Leenders WP, Küsters B, Verrijp K, Maass C, Wesseling P, Heerschap A, Ruiter D, Ryan A, de Waal R. Antiangiogenic therapy of cerebral melanoma metastases results in sustained tumor progression via vessel co-option. *Clin Cancer Res*. 2004 Sep 15;10(18 Pt 1):6222-30.
- Lenstra S, Bijlsma EK, Troost D, Oosting J, Westerveld A, Bosch DA, Hulsebos TJ. Allele loss on chromosomes 10 and 17p and epidermal growth factor receptor gene amplification in human malignant astrocytoma related to prognosis. *Br J Cancer*. 1994 Oct;70(4):684-9.
- Li B, Chang CM, Yuan M, McKenna WG, Shu HK. Resistance to small molecule inhibitors of epidermal growth factor receptor in malignant gliomas. *Cancer Res*. 2003 Nov 1;63(21):7443-50.
- Li HF, Kim JS, Waldman T. Radiation-induced Akt activation modulates radioresistance in human glioblastoma cells. *Radiat Oncol*. 2009 Oct 14;4:43.
- Li H, Papadopoulos V. Peripheral-type benzodiazepine receptor function in cholesterol transport. Identification of a putative cholesterol recognition/interaction amino acid sequence and consensus pattern. *Endocrinology*. 1998 Dec;139(12):4991-7.

- Li L, Ren CH, Tahir SA, Ren C, Thompson TC. Caveolin-1 maintains activated Akt in prostate cancer cells through scaffolding domain binding site interactions with and inhibition of serine/threonine protein phosphatases PP1 and PP2A. *Mol Cell Biol*. 2003 Dec;23(24):9389-404.
- Li S, Couet J, Lisanti MP. Src tyrosine kinases, Galpha subunits, and H-Ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto-activation of Src tyrosine kinases. *J Biol Chem*. 1996 Nov 15;271(46):29182-90.
- Lipardi C, Mora R, Colomer V, Paladino S, Nitsch L, Rodriguez-Boulan E, Zurzolo C. Caveolin transfection results in caveolae formation but not apical sorting of glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins in epithelial cells. *J Cell Biol*. 1998 Feb 9;140(3):617-26.
- Lisanti MP, Scherer PE, Vidugiriene J, Tang Z, Hermanowski-Vosatka A, Tu YH, Cook RF, Sargiacomo M. Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. *J Cell Biol*. 1994 Jul;126(1):111-26.
- Liu J, Razani B, Tang S, Terman BI, Ware JA, Lisanti MP. Angiogenesis activators and inhibitors differentially regulate caveolin-1 expression and caveolae formation in vascular endothelial cells. Angiogenesis inhibitors block vascular endothelial growth factor-induced down-regulation of caveolin-1. *J Biol Chem*. 1999 May 28;274(22):15781-5.
- Liu J, Wang XB, Park DS, Lisanti MP. Caveolin-1 expression enhances endothelial capillary tubule formation. *J Biol Chem*. 2002 Mar 22;277(12):10661-8.
- Liu P, Li WP, Machleidt T, Anderson RG. Identification of caveolin-1 in lipoprotein particles secreted by exocrine cells. *Nat Cell Biol*. 1999 Oct;1(6):369-75.
- Liu P, Ying Y, Ko YG, Anderson RG. Localization of platelet-derived growth factor-stimulated phosphorylation cascade to caveolae. *J Biol Chem*. 1996 Apr 26;271(17):10299-303.
- Liu W, James CD, Frederick L, Alderete BE, Jenkins RB. PTEN/MMAC1 mutations and EGFR amplification in glioblastomas. *Cancer Res*. 1997 Dec 1;57(23):5254-7.
- 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 Dec;25(4):402-8.
- Livant DL, Brabec RK, Kurachi K, Allen DL, Wu Y, Haaseth R, Andrews P, Ethier SP, Markwart S. The PHSRN sequence induces extracellular matrix invasion and accelerates wound healing in obese diabetic mice. *J Clin Invest*. 2000 Jun;105(11):1537-45.
- Louis DN. Molecular pathology of malignant gliomas. *Annu Rev Pathol*. 2006;1:97-117.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*. 2007 Aug;114(2):97-109.

M

achein MR, Plate KH. VEGF in brain tumors. *J Neurooncol.* 2000 Oct-Nov;50(1-2):109-20.

Mackay RL, Consigli RA. Early events in polyoma virus infection: attachment, penetration, and nuclear entry. *J Virol.* 1976 Aug;19(2):620-36.

Maglione JE, Moghanaki D, Young LJ, Manner CK, Ellies LG, Joseph SO, Nicholson B, Cardiff RD, MacLeod CL. Transgenic Polyoma middle-T mice model premalignant mammary disease. *Cancer Res.* 2001 Nov 15;61(22):8298-305.

Maglott A, Bartik P, Cosgun S, Klotz P, Rondé P, Fuhrmann G, Takeda K, Martin S, Dontenwill M. The small alpha5beta1 integrin antagonist, SJ749, reduces proliferation and clonogenicity of human astrocytoma cells. *Cancer Res.* 2006 Jun 15;66(12):6002-7.

Marjomäki V, Pietiäinen V, Matilainen H, Upla P, Ivaska J, Nissinen L, Reunanen H, Huttunen P, Hyypiä T, Heino J. Internalization of echovirus 1 in caveolae. *J Virol.* 2002 Feb;76(4):1856-65.

Martinez-Outschoorn UE, Pavlides S, Whitaker-Menezes D, Daumer KM, Milliman JN, Chiavarina B, Migneco G, Witkiewicz AK, Martinez-Cantarin MP, Flomenberg N, Howell A, Pestell RG, Lisanti MP, Sotgia F. Tumor cells induce the cancer associated fibroblast phenotype via caveolin-1 degradation: Implications for breast cancer and DCIS therapy with autophagy inhibitors. *Cell Cycle.* 2010 Jun 12;9(12).

Martinkova E, Maglott A, Leger DY, Bonnet D, Stiborova M, Takeda K, Martin S, Dontenwill M. alpha5beta1 integrin antagonists reduce chemotherapy-induced premature senescence and facilitate apoptosis in human glioblastoma cells. *Int J Cancer.* 2010 Sep 1;127(5):1240-8.

Massagué J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:753-91.

Matveev S, Li X, Everson W, Smart EJ. The role of caveolae and caveolin in vesicle-dependent and vesicle-independent trafficking. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001 Jul 28;49(3):237-50.

Matveev SV, Smart EJ. Heterologous desensitization of EGF receptors and PDGF receptors by sequestration in caveolae. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002 Apr;282(4):C935-46.

Mellinghoff IK, Wang MY, Vivanco I, Haas-Kogan DA, Zhu S, Dia EQ, Lu KV, Yoshimoto K, Huang JH, Chute DJ, Riggs BL, Horvath S, Liau LM, Cavenee WK, Rao PN, Beroukheim R, Peck TC, Lee JC, Sellers WR, Stokoe D, Prados M, Cloughesy TF, Sawyers CL, Mischel PS. Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors. *N Engl J Med.* 2005 Nov 10;353(19):2012-24.

Mercier I, Casimiro MC, Wang C, Rosenberg AL, Quong J, Minkeu A, Allen KG, Danilo C, Sotgia F, Bonuccelli G, Jasmin JF, Xu H, Bosco E, Aronow B, Witkiewicz A, Pestell RG, Knudsen ES, Lisanti MP. Human breast cancer-associated fibroblasts (CAFs) show caveolin-1 downregulation

and RB tumor suppressor functional inactivation: Implications for the response to hormonal therapy. *Cancer Biol Ther.* 2008 Aug;7(8):1212-25.

Mineo C, James GL, Smart EJ, Anderson RG. Localization of epidermal growth factor-stimulated Ras/Raf-1 interaction to caveolae membrane. *J Biol Chem.* 1996 May 17;271(20):11930-5.

Minshall RD, Tiruppathi C, Vogel SM, Niles WD, Gilchrist A, Hamm HE, Malik AB. Endothelial cell-surface gp60 activates vesicle formation and trafficking via G(i)-coupled Src kinase signaling pathway. *J Cell Biol.* 2000 Sep 4;150(5):1057-70.

Mittler MA, Walters BC, Stopa EG. Observer reliability in histological grading of astrocytoma stereotactic biopsies. *J Neurosurg.* 1996 Dec;85(6):1091-4.

Mittler MA, Walters BC, Stopa EG. Observer reliability in histological grading of astrocytoma stereotactic biopsies. *J Neurosurg.* 1996 Dec;85(6):1091-4.

Momota H, Nerio E, Holland EC. Perifosine inhibits multiple signaling pathways in glial progenitors and cooperates with temozolomide to arrest cell proliferation in gliomas in vivo. *Cancer Res.* 2005 Aug 15;65(16):7429-35.

Monier S, Dietzen DJ, Hastings WR, Lublin DM, Kurzchalia TV. Oligomerization of VIP21-caveolin in vitro is stabilized by long chain fatty acylation or cholesterol. *FEBS Lett.* 1996 Jun 17;388(2-3):143-9.

Monier S, Parton RG, Vogel F, Behlke J, Henske A, Kurzchalia TV. VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes in vivo and in vitro. *Mol Biol Cell.* 1995 Jul;6(7):911-27.

Mora R, Bonilha VL, Marmorstein A, Scherer PE, Brown D, Lisanti MP, Rodriguez-Boulan E. Caveolin-2 localizes to the golgi complex but redistributes to plasma membrane, caveolae, and rafts when co-expressed with caveolin-1. *J Biol Chem.* 1999 Sep 3;274(36):25708-17.

Mueller MM, Fusenig NE. Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2004 Nov;4(11):839-49.

Mundy DI, Machleidt T, Ying YS, Anderson RG, Bloom GS. Dual control of caveolar membrane traffic by microtubules and the actin cytoskeleton. *J Cell Sci.* 2002 Nov 15;115(Pt 22):4327-39.

Muracciole X, Romain S, Dufour H, Palmari J, Chinot O, Ouafik L, Grisoli F, Branger DF, Martin PM. PAI-1 and EGFR expression in adult glioma tumors: toward a molecular prognostic classification. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2002 Mar 1;52(3):592-8.

Murata M, Peränen J, Schreiner R, Wieland F, Kurzchalia TV, Simons K. VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Oct 24;92(22):10339-43.

N

adkarni S, Jung P, Levine H. Astrocytes optimize the synaptic transmission of information. *PLoS Comput Biol.* 2008 May 30;4(5).

Ndubaku U, de Bellard ME. Glial cells: old cells with new twists. *Acta Histochem.* 2008;110(3):182-95.

Nabors LB, Mikkelsen T, Rosenfeld SS, Hochberg F, Akella NS, Fisher JD, Cloud GA, Zhang Y, Carson K, Wittmer SM, Colevas AD, Grossman SA. Phase I and correlative biology study of cilengitide in patients with recurrent malignant glioma. *J Clin Oncol.* 2007 May 1;25(13):1651-7.

Ndubaku U, de Bellard ME. Glial cells: old cells with new twists. *Acta Histochem.* 2008;110(3):182-95

Newlands ES, Stevens MF, Wedge SR, Wheelhouse RT, Brock C. Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials. *Cancer Treat Rev.* 1997 Jan;23(1):35-61.

Nichols BJ. A distinct class of endosome mediates clathrin-independent endocytosis to the Golgi complex. *Nat Cell Biol.* 2002 May;4(5):374-8.

Nigro JM, Misra A, Zhang L, Smirnov I, Colman H, Griffin C, Ozburn N, Chen M, Pan E, Koul D, Yung WK, Feuerstein BG, Aldape KD. Integrated array-comparative genomic hybridization and expression array profiles identify clinically relevant molecular subtypes of glioblastoma. *Cancer Res.* 2005 Mar 1;65(5):1678-86.

Nishikawa R, Ji XD, Harmon RC, Lazar CS, Gill GN, Cavenee WK, Huang HJ. A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Aug 2;91(16):7727-31.

Norden AD, Drappatz J, Muzikansky A, David K, Gerard M, McNamara MB, Phan P, Ross A, Kesari S, Wen PY. An exploratory survival analysis of anti-angiogenic therapy for recurrent malignant glioma. *J Neurooncol.* 2009 Apr;92(2):149-55.

Noushmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K, Phillips HS, Pujara K, Berman BP, Pan F, Pelloski CE, Sulman EP, Bhat KP, Verhaak RG, Hoadley KA, Hayes DN, Perou CM, Schmidt HK, Ding L, Wilson RK, Van Den Berg D, Shen H, Bengtsson H, Neuvial P, Cope LM, Buckley J, Herman JG, Baylin SB, Laird PW, Aldape K; Cancer Genome Atlas Research Network. Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell.* 2010 May 18;17(5):510-22.

Nozaki M, Tada M, Kobayashi H, Zhang CL, Sawamura Y, Abe H, Ishii N, Van Meir EG. Roles of the functional loss of p53 and other genes in astrocytoma tumorigenesis and progression. *Neuro Oncol.* 1999 Apr;1(2):124-37.

Nutt CL, Mani DR, Betensky RA, Tamayo P, Cairncross JG, Ladd C, Pohl U, Hartmann C, McLaughlin ME, Batchelor TT, Black PM, von Deimling A, Pomeroy SL, Golub TR, Louis DN. Gene expression-based classification of malignant gliomas correlates better with survival than histological classification. *Cancer Res.* 2003 Apr 1;63(7):1602-7.

Ohgaki H, Kleihues P. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol.* 2005 Jan;109(1):93-108.

Olofsson A, Miyazono K, Kanzaki T, Colosetti P, Engström U, Heldin CH. Transforming growth factor-beta 1, -beta 2, and -beta 3 secreted by a human glioblastoma cell line. Identification of small and different forms of large latent complexes. *J Biol Chem.* 1992 Sep 25;267(27):19482-8.

Orlandi PA, Fishman PH. Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains. *J Cell Biol.* 1998 May 18;141(4):905-15.

Parat MO, Anand-Apte B, Fox PL. Differential caveolin-1 polarization in endothelial cells during migration in two and three dimensions. *Mol Biol Cell.* 2003 Aug;14(8):3156-68.

Park CM, Park MJ, Kwak HJ, Lee HC, Kim MS, Lee SH, Park IC, Rhee CH, Hong SI. Ionizing radiation enhances matrix metalloproteinase-2 secretion and invasion of glioma cells through Src/epidermal growth factor receptor-mediated p38/Akt and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathways. *Cancer Res.* 2006 Sep 1;66(17):8511-9.

Park H, Go YM, Darji R, Choi JW, Lisanti MP, Maland MC, Jo H. Caveolin-1 regulates shear stress-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000 Apr;278(4):H1285-93.

Parolini I, Sargiacomo M, Galbiati F, Rizzo G, Grignani F, Engelman JA, Okamoto T, Ikezu T, Scherer PE, Mora R, Rodriguez-Boulán E, Peschle C, Lisanti MP. Expression of caveolin-1 is required for the transport of caveolin-2 to the plasma membrane. Retention of caveolin-2 at the level of the golgi complex. *J Biol Chem.* 1999 Sep 3;274(36):25718-25.

Parsons-Wingert P, Kasman IM, Norberg S, Magnussen A, Zanivan S, Rissone A, Baluk P, Favre CJ, Jeffry U, Murray R, McDonald DM. Uniform overexpression and rapid accessibility of alpha5beta1 integrin on blood vessels in tumors. *Am J Pathol.* 2005 Jul;167(1):193-211.

Parton RG, Hanzal-Bayer M, Hancock JF. Biogenesis of caveolae: a structural model for caveolin-induced domain formation. *J Cell Sci.* 2006 Mar 1;119(Pt 5):787-96.

Parton RG, Joggerst B, Simons K. Regulated internalization of caveolae. *J Cell Biol.* 1994 Dec;127(5):1199-215.

Parton RG, Simons K. The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Mar;8(3):185-94.

Patel V, Lahusen T, Sy T, Sausville EA, Gutkind JS, Senderowicz AM. Perifosine, a novel alkylphospholipid, induces p21(WAF1) expression in squamous carcinoma cells through a p53-independent pathway, leading to loss in cyclin-dependent kinase activity and cell cycle arrest. *Cancer Res.* 2002 Mar 1;62(5):1401-9.

Pelkmans L, Kartenbeck J, Helenius A. Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat Cell Biol.* 2001 May;3(5):473-83.

Pelkmans L, Püntener D, Helenius A. Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science.* 2002 Apr 19;296(5567):535-9.

Pelloski CE, Lin E, Zhang L, Yung WK, Colman H, Liu JL, Woo SY, Heimberger AB, Suki D, Prados M, Chang S, Barker FG 3rd, Fuller GN, Aldape KD. Prognostic associations of activated mitogen-activated protein kinase and Akt pathways in glioblastoma. *Clin Cancer Res.* 2006 Jul 1;12(13):3935-41.

Pelloski CE, Mahajan A, Maor M, Chang EL, Woo S, Gilbert M, Colman H, Yang H, Ledoux A, Blair H, Passe S, Jenkins RB, Aldape KD. YKL-40 expression is associated with poorer response to radiation and shorter overall survival in glioblastoma. *Clin Cancer Res.* 2005 May 1;11(9):3326-34.

Philippon J, *Tumeurs cérébrales; du diagnostic au traitement.* 2004. Edition MASSON

Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, Misra A, Nigro JM, Colman H, Soroceanu L, Williams PM, Modrusan Z, Feuerstein BG, Aldape K. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell.* 2006 Mar;9(3):157-73.

Piek E, Westermarck U, Kastemar M, Heldin CH, van Zoelen EJ, Nistér M, Ten Dijke P. Expression of transforming-growth-factor (TGF)-beta receptors and Smad proteins in glioblastoma cell lines with distinct responses to TGF-beta1. *Int J Cancer.* 1999 Mar 1;80(5):756-63.

Pietrancosta N, Moumen A, Dono R, Lingor P, Planchamp V, Lamballe F, Bähr M, Kraus JL, Maina F. Imino-tetrahydro-benzothiazole derivatives as p53 inhibitors: discovery of a highly potent in vivo inhibitor and its action mechanism. *J Med Chem.* 2006 Jun 15;49(12):3645-52.

Pike LJ, Casey L. Localization and turnover of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in caveolin-enriched membrane domains. *J Biol Chem.* 1996 Oct 25;271(43):26453-6.

Platten M, Wick W, Wild-Bode C, Aulwurm S, Dichgans J, Weller M. Transforming growth factors beta(1) (TGF-beta(1)) and TGF-beta(2) promote glioma cell migration via Up-regulation of alpha(V)beta(3) integrin expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Feb 16;268(2):607-11.

Pol A, Martin S, Fernández MA, Ingelmo-Torres M, Ferguson C, Enrich C, Parton RG. Cholesterol and fatty acids regulate dynamic caveolin trafficking through the Golgi complex and between the cell surface and lipid bodies. *Mol Biol Cell*. 2005 Apr;16(4):2091-105.

Prados MD, Scott C, Curran WJ Jr, Nelson DF, Leibel S, Kramer S. Procarbazine, lomustine, and vincristine (PCV) chemotherapy for anaplastic astrocytoma: A retrospective review of radiation therapy oncology group protocols comparing survival with carmustine or PCV adjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol*. 1999 Nov;17(11):3389-95.

Radel C, Rizzo V. Integrin mechanotransduction stimulates caveolin-1 phosphorylation and recruitment of Csk to mediate actin reorganization. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005 Feb;288(2):H936-45.

Ravid D, Maor S, Werner H, Liscovitch M. Caveolin-1 inhibits anoikis and promotes survival signaling in cancer cells. *Adv Enzyme Regul*. 2006;46:163-75.

Ravid D, Maor S, Werner H, Liscovitch M. Caveolin-1 inhibits cell detachment-induced p53 activation and anoikis by upregulation of insulin-like growth factor-I receptors and signaling. *Oncogene*. 2005 Feb 17;24(8):1338-47.

Razani B, Engelman JA, Wang XB, Schubert W, Zhang XL, Marks CB, Macaluso F, Russell RG, Li M, Pestell RG, Di Vizio D, Hou H Jr, Kneitz B, Lagaud G, Christ GJ, Edelmann W, Lisanti MP. Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. *J Biol Chem*. 2001 Oct 12;276(41):38121-38.

Razani B, Lisanti MP. Caveolin-deficient mice: insights into caveolar function human disease. *J Clin Invest*. 2001 Dec;108(11):1553-61.

Razani B, Rubin CS, Lisanti MP. Regulation of cAMP-mediated signal transduction via interaction of caveolins with the catalytic subunit of protein kinase A. *J Biol Chem*. 1999 Sep 10;274(37):26353-60.

Razani B, Zhang XL, Bitzer M, von Gersdorff G, Böttinger EP, Lisanti MP. Caveolin-1 regulates transforming growth factor (TGF)-beta/SMAD signaling through an interaction with the TGF-beta type I receptor. *J Biol Chem*. 2001 Mar 2;276(9):6727-38.

Razani B, Woodman SE, Lisanti MP. Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol Rev*. 2002 Sep;54(3):431-67.

Régina A, Jodoin J, Khoueir P, Rolland Y, Berthelet F, Moundjian R, Fenart L, Cecchelli R, Demeule M, Béliveau R. Down-regulation of caveolin-1 in glioma vasculature: modulation by radiotherapy. *J Neurosci Res*. 2004 Jan 15;75(2):291-9.

Reardon DA, Fink KL, Mikkelsen T, Cloughesy TF, O'Neill A, Plotkin S, Glantz M, Ravin P, Raizer JJ, Rich KM, Schiff D, Shapiro WR, Burdette-Radoux S, Dropcho EJ, Wittmer SM, Nippgen J, Picard M, Nabors LB. Randomized phase II study of cilengitide, an integrin-targeting arginine-glycine-aspartic acid peptide, in recurrent glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol*. 2008 Dec 1;26(34):5610-7.

Reardon DA, Wen PY. Therapeutic advances in the treatment of glioblastoma: rationale and potential role of targeted agents. *Oncologist*. 2006 Feb;11(2):152-64.

Reifenberger G, Liu L, Ichimura K, Schmidt EE, Collins VP. Amplification and overexpression of the MDM2 gene in a subset of human malignant gliomas without p53 mutations. *Cancer Res*. 1993 Jun 15;53(12):2736-9.

Reinmuth N, Liu W, Ahmad SA, Fan F, Stoeltzing O, Parikh AA, Bucana CD, Gallick GE, Nickols MA, Westlin WF, Ellis LM. Alphavbeta3 integrin antagonist S247 decreases colon cancer metastasis and angiogenesis and improves survival in mice. *Cancer Res*. 2003 May 1;63(9):2079-87.

Reynolds AR, Hart IR, Watson AR, Welti JC, Silva RG, Robinson SD, Da Violante G, Gourlaouen M, Salih M, Jones MC, Jones DT, Saunders G, Kostourou V, Perron-Sierra F, Norman JC, Tucker GC, Hodivala-Dilke KM. Stimulation of tumor growth and angiogenesis by low concentrations of RGD-mimetic integrin inhibitors. *Nat Med*. 2009 Apr;15(4):392-400.

Reynolds LE, Wyder L, Lively JC, Taverna D, Robinson SD, Huang X, Sheppard D, Hynes RO, Hodivala-Dilke KM. Enhanced pathological angiogenesis in mice lacking beta3 integrin or beta3 and beta5 integrins. *Nat Med*. 2002 Jan;8(1):27-34.

Richterová Z, Liebl D, Horák M, Palková Z, Stokrová J, Hozák P, Korb J, Forstová J. Caveolae are involved in the trafficking of mouse polyomavirus virions and artificial VP1 pseudocapsids toward cell nuclei. *J Virol*. 2001 Nov;75(22):10880-91.

Riemenschneider MJ, Mueller W, Betensky RA, Mohapatra G, Louis DN. In situ analysis of integrin and growth factor receptor signaling pathways in human glioblastomas suggests overlapping relationships with focal adhesion kinase activation. *Am J Pathol*. 2005 Nov;167(5):1379-87.

Roettger BF, Rentsch RU, Pinon D, Holicky E, Hadac E, Larkin JM, Miller LJ. Dual pathways of internalization of the cholecystokinin receptor. *J Cell Biol*. 1995 Mar;128(6):1029-41.

Roman J, Ritzenthaler JD, Roser-Page S, Sun X, Han S. $\alpha 5 \beta 1$ Integrin Expression is Essential for Tumor Progression in Experimental Lung Cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010 Jan 15.

Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, Anderson RG. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell*. 1992 Feb 21;68(4):673-82.

Ruiter GA, Zerp SF, Bartelink H, van Blitterswijk WJ, Verheij M. Alkyl-lysophospholipids activate the SAPK/JNK pathway and enhance radiation-induced apoptosis. *Cancer Res.* 1999 May 15;59(10):2457-63.

Saito T, Kimura M, Kawasaki T, Sato S, Tomita Y. Correlation between integrin alpha 5 expression and the malignant phenotype of transitional cell carcinoma. *Br J Cancer.* 1996 Feb;73(3):327-31.

Samarakoon R, Higgins PJ. Integration of non-SMAD and SMAD signaling in TGF-beta1-induced plasminogen activator inhibitor type-1 gene expression in vascular smooth muscle cells. *Thromb Haemost.* 2008 Dec;100(6):976-83.

Sanchez-Carbayo M, Socci ND, Charytonowicz E, Lu M, Prystowsky M, Childs G, Cordon-Cardo C. Molecular profiling of bladder cancer using cDNA microarrays: defining histogenesis and biological phenotypes. *Cancer Res.* 2002 Dec 1;62(23):6973-80.

Sandström M, Johansson M, Sandström J, Bergenheim AT, Henriksson R. Expression of the proteolytic factors, tPA and uPA, PAI-1 and VEGF during malignant glioma progression. *Int J Dev Neurosci.* 1999 Aug-Oct;17(5-6):473-81.

Sanna E, Miotti S, Mazzi M, De Santis G, Canevari S, Tomassetti A. Binding of nuclear caveolin-1 to promoter elements of growth-associated genes in ovarian carcinoma cells. *Exp Cell Res.* 2007 Apr 15;313(7):1307-17.

Sargiacomo M, Scherer PE, Tang Z, Kübler E, Song KS, Sanders MC, Lisanti MP. Oligomeric structure of caveolin: implications for caveolae membrane organization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Sep 26;92(20):9407-11.

Sawada K, Mitra AK, Radjabi AR, Bhaskar V, Kistner EO, Tretiakova M, Jagadeeswaran S, Montag A, Becker A, Kenny HA, Peter ME, Ramakrishnan V, Yamada SD, Lengyel E. Loss of E-cadherin promotes ovarian cancer metastasis via alpha 5-integrin, which is a therapeutic target. *Cancer Res.* 2008 Apr 1;68(7):2329-39.

Scherer PE, Okamoto T, Chun M, Nishimoto I, Lodish HF, Lisanti MP. Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Jan 9;93(1):131-5.

Schlegel J, Merdes A, Stumm G, Albert FK, Forsting M, Hynes N, Kiessling M. Amplification of the epidermal-growth-factor-receptor gene correlates with different growth behaviour in human glioblastoma. *Int J Cancer.* 1994 Jan 2;56(1):72-7.

Schnitzer JE, Liu J, Oh P. Endothelial caveolae have the molecular transport machinery for vesicle budding, docking, and fusion including VAMP, NSF, SNAP, annexins, and GTPases. *J Biol Chem.* 1995 Jun 16;270(24):14399-404.

Schnitzer JE, Oh P, Pinney E, Allard J. Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *J Cell Biol.* 1994 Dec;127(5):1217-32.

Schubert W, Frank PG, Razani B, Park DS, Chow CW, Lisanti MP. Caveolae-deficient endothelial cells show defects in the uptake and transport of albumin in vivo. *J Biol Chem.* 2001 Dec 28;276(52):48619-22.

Schubert W, Frank PG, Woodman SE, Hyogo H, Cohen DE, Chow CW, Lisanti MP. Microvascular hyperpermeability in caveolin-1 (-/-) knock-out mice. Treatment with a specific nitric-oxide synthase inhibitor, L-NAME, restores normal microvascular permeability in Cav-1 null mice. *J Biol Chem.* 2002 Oct 18;277(42):40091-8.

Schwartzbaum JA, Fisher JL, Aldape KD, Wrensch M. Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nat Clin Pract Neurol.* 2006 Sep;2(9):494-503.

Serini G, Gabbiani G. Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation. *Exp Cell Res.* 1999 Aug 1;250(2):273-83.

Seoane J. Escaping from the TGFbeta anti-proliferative control. *Carcinogenesis.* 2006 Nov;27(11):2148-56.

Shatz M, Liscovitch M. Caveolin-1 and cancer multidrug resistance: coordinate regulation of pro-survival proteins? *Leuk Res.* 2004 Sep;28(9):907-8.

Shatz M, Lustig G, Reich R, Liscovitch M. Caveolin-1 mutants P132L and Y14F are dominant negative regulators of invasion, migration and aggregation in H1299 lung cancer cells. *Exp Cell Res.* 2010 Jun 10;316(10):1748-62.

Shibuya M. Brain angiogenesis in developmental and pathological processes: therapeutic aspects of vascular endothelial growth factor. *FEBS J.* 2009 Sep;276(17):4636-43.

Shibuya M. Vascular endothelial growth factor-dependent and -independent regulation of angiogenesis. *BMB Rep.* 2008 Apr 30;41(4):278-86.

Slezak M, Pfrieder FW. New roles for astrocytes: regulation of CNS synaptogenesis. *Trends Neurosci.* 2003 Oct;26(10):531-5.

Sloan EK, Ciocca DR, Pouliot N, Natoli A, Restall C, Henderson MA, Fanelli MA, Cuello-Carrión FD, Gago FE, Anderson RL. Stromal cell expression of caveolin-1 predicts outcome in breast cancer. *Am J Pathol.* 2009 Jun;174(6):2035-43.

Smallheer JM, Weigelt CA, Woerner FJ, Wells JS, Daneker WF, Mousa SA, Wexler RR, Jadhav PK. Synthesis and biological evaluation of nonpeptide integrin antagonists containing spirocyclic scaffolds. *Bioorg Med Chem Lett.* 2004 Jan 19;14(2):383-7.

Smart EJ, Foster DC, Ying YS, Kamen BA, Anderson RG. Protein kinase C activators inhibit receptor-mediated potocytosis by preventing internalization of caveolae. *J Cell Biol.* 1994 Feb;124(3):307-13.

Smart EJ, Ying YS, Anderson RG. Hormonal regulation of caveolae internalization. *J Cell Biol.* 1995 Nov;131(4):929-38.

Smart EJ, Ying YS, Conrad PA, Anderson RG. Caveolin moves from caveolae to the Golgi apparatus in response to cholesterol oxidation. *J Cell Biol.* 1994 Dec;127(5):1185-97.

Smart EJ, Ying Y, Donzell WC, Anderson RG. A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *J Biol Chem.* 1996 Nov 15;271(46):29427-35.

Sotgia F, Razani B, Bonuccelli G, Schubert W, Battista M, Lee H, Capozza F, Schubert AL, Minetti C, Buckley JT, Lisanti MP. Intracellular retention of glycosylphosphatidyl inositol-linked proteins in caveolin-deficient cells. *Mol Cell Biol.* 2002 Jun;22(11):3905-26.

Stahlhut M, Sandvig K, van Deurs B. Caveolae: uniform structures with multiple functions in signaling, cell growth, and cancer. *Exp Cell Res.* 2000 Nov 25;261(1):111-8.

Stoeltzing O, Liu W, Reinmuth N, Fan F, Parry GC, Parikh AA, McCarty MF, Bucana CD, Mazar AP, Ellis LM. 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.* 2003 Apr 20;104(4):496-503.

Strömblad 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 Jul 15;98(2):426-33.

Stupp R, Hegi ME, Neyns B, Goldbrunner R, Schlegel U, Clement PM, Grabenbauer GG, Ochsenbein AF, Simon M, Dietrich PY, Pietsch T, Hicking C, Tonn JC, Diserens AC, Pica A, Hermisson M, Krueger S, Picard M, Weller M. Phase I/IIa study of cilengitide and temozolomide with concomitant radiotherapy followed by cilengitide and temozolomide maintenance therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma. *J Clin Oncol.* 2010 Jun 1;28(16):2712-8.

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005 Mar 10;352(10):987-96.

Sulman EP, Guerrero M, Aldape K. Beyond grade: molecular pathology of malignant gliomas. *Semin Radiat Oncol.* 2009 Jul;19(3):142-9.

T

ahir SA, Ren C, Timme TL, Gdor Y, Hoogeveen R, Morrisett JD, Frolov A, Ayala G, Wheeler TM, Thompson TC. Development of an immunoassay for serum caveolin-1: a novel biomarker for prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2003 Sep 1;9(10 Pt 1):3653-9.

Tahir SA, Yang G, Ebara S, Timme TL, Satoh T, Li L, Goltsov A, Ittmann M, Morrisett JD, Thompson TC. Secreted caveolin-1 stimulates cell survival/clonal growth and contributes to metastasis in androgen-insensitive prostate cancer. *Cancer Res*. 2001 May 15;61(10):3882-5.

Tahir SA, Yang G, Goltsov AA, Watanabe M, Tabata K, Addai J, Fattah el MA, Kadmon D, Thompson TC. Tumor cell-secreted caveolin-1 has proangiogenic activities in prostate cancer. *Cancer Res*. 2008 Feb 1;68(3):731-9.

Tang Z, Okamoto T, Boontrakulpoontawee P, Katada T, Otsuka AJ, Lisanti MP. Identification, sequence, and expression of an invertebrate caveolin gene family from the nematode *Caenorhabditis elegans*. Implications for the molecular evolution of mammalian caveolin genes. *J Biol Chem*. 1997 Jan 24;272(4):2437-45.

Tate MC, Aghi MK. Biology of angiogenesis and invasion in glioma. *Neurotherapeutics*. 2009 Jul;6(3):447-57.

Tentori L, Dorio AS, Muzi A, Lacal PM, Ruffini F, Navarra P, Graziani G. The integrin antagonist cilengitide increases the antitumor activity of temozolomide against malignant melanoma. *Oncol Rep*. 2008 Apr;19(4):1039-43.

Timme TL, Goltsov A, Tahir S, Li L, Wang J, Ren C, Johnston RN, Thompson TC. Caveolin-1 is regulated by c-myc and suppresses c-myc-induced apoptosis. *Oncogene*. 2000 Jul 6;19(29):3256-65.

Torgersen ML, Skretting G, van Deurs B, Sandvig K. Internalization of cholera toxin by different endocytic mechanisms. *J Cell Sci*. 2001 Oct;114(Pt 20):3737-47.

Torres VA, Tapia JC, Rodriguez DA, Lladser A, Arredondo C, Leyton L, Quest AF. E-cadherin is required for caveolin-1-mediated down-regulation of the inhibitor of apoptosis protein survivin via reduced beta-catenin-Tcf/Lef-dependent transcription.

Torres VA, Tapia JC, Rodríguez DA, Párraga M, Lisboa P, Montoya M, Leyton L, Quest AF. Caveolin-1 controls cell proliferation and cell death by suppressing expression of the inhibitor of apoptosis protein survivin. *J Cell Sci*. 2006 May 1;119(Pt 9):1812-23.

Tortosa A, Viñolas N, Villà S, Verger E, Gil JM, Brell M, Caral L, Pujol T, Acebes JJ, Ribalta T, Ferrer I, Graus F. Prognostic implication of clinical, radiologic, and pathologic features in patients with anaplastic gliomas. *Cancer*. 2003 Feb 15;97(4):1063-71. *Mol Cell Biol*. 2007 Nov;27(21):7703-17.

V

Uhm JH, Gladson CL, Rao JS. The role of integrins in the malignant phenotype of gliomas. *Front Biosci*. 1999 Feb 15;4:D188-99.

Uittenbogaard A, Smart EJ. Palmitoylation of caveolin-1 is required for cholesterol binding, chaperone complex formation, and rapid transport of cholesterol to caveolae. *J Biol Chem*. 2000 Aug 18;275(33):25595-9.

Uittenbogaard A, Ying Y, Smart EJ. Characterization of a cytosolic heat-shock protein-caveolin chaperone complex. Involvement in cholesterol trafficking. *J Biol Chem*. 1998 Mar 13;273(11):6525-32.

Umeda N, Kachi S, Akiyama H, Zahn G, Vossmeier D, Stragies R, Campochiaro PA. Suppression and regression of choroidal neovascularization by systemic administration of an alpha5beta1 integrin antagonist. *Mol Pharmacol*. 2006 Jun;69(6):1820-8.

V

Varlet P, Soni D, Miquel C, Roux FX, Meder JF, Chneiweiss H, Daumas-Duport C. New variants of malignant glioneuronal tumors: a clinicopathological study of 40 cases. *Neurosurgery*. 2004 Dec;55(6):1377-91: discussion 1391-2.

Verhoeff JJ, van Tellingen O, Claes A, Stalpers LJ, van Linde ME, Richel DJ, Leenders WP, van Furth WR. Concerns about anti-angiogenic treatment in patients with glioblastoma multiforme. *BMC Cancer*. 2009 Dec 16;9:444.

Vey M, Pilkuhn S, Wille H, Nixon R, DeArmond SJ, Smart EJ, Anderson RG, Taraboulos A, Prusiner SB. Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Dec 10;93(25):14945-9.

Vinjamuri M, Adumala RR, Altaha R, Hobbs GR, Crowell EB Jr. Comparative analysis of temozolomide (TMZ) versus 1,3-bis (2-chloroethyl)-1 nitrosourea (BCNU) in newly diagnosed glioblastoma multiforme (GBM) patients. *J Neurooncol*. 2009 Jan;91(2):221-5.

Vinten J, Johnsen AH, Roepstorff P, Harpøth J, Tranum-Jensen J. Identification of a major protein on the cytosolic face of caveolae. *Biochim Biophys Acta*. 2005 Nov 10;1717(1):34-40.

Virgintino D, Robertson D, Errede M, Benagiano V, Tauer U, Roncali L, Bertossi M. Expression of caveolin-1 in human brain microvessels. *Neuroscience*. 2002;115(1):145-52.

Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem*. 1994 Feb 18;269(7):5241-8.

Volonte D, Zhang K, Lisanti MP, Galbiati F. Expression of caveolin-1 induces premature cellular senescence in primary cultures of murine fibroblasts. *Mol Biol Cell*. 2002 Jul;13(7):2502-17.

von Bubnoff A, Cho KW. Intracellular BMP signaling regulation in vertebrates: pathway or network? *Dev Biol*. 2001 Nov 1;239(1):1-14.

Vredenburgh JJ, Desjardins A, Herndon JE 2nd, Dowell JM, Reardon DA, Quinn JA, Rich JN, Sathornsumetee S, Gururangan S, Wagner M, Bigner DD, Friedman AH, Friedman HS. Phase II trial of bevacizumab and irinotecan in recurrent malignant glioma. *Clin Cancer Res*. 2007 Feb 15;13(4):1253-9.

Vredenburgh JJ, Desjardins A, Herndon JE 2nd, Marcello J, Reardon DA, Quinn JA, Rich JN, Sathornsumetee S, Gururangan S, Sampson J, Wagner M, Bailey L, Bigner DD, Friedman AH, Friedman HS. Bevacizumab plus irinotecan in recurrent glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol*. 2007 Oct 20;25(30):4722-9.

Wang M, Wang T, Liu S, Yoshida D, Teramoto A. The expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in human gliomas of different pathological grades. *Brain Tumor Pathol*. 2003;20(2):65-72.

Wary KK, Mariotti A, Zurzolo C, Giancotti FG. A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth. *Cell*. 1998 Sep 4;94(5):625-34.

Watanabe K, Tachibana O, Sata K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol*. 1996 Jul;6(3):217-23; discussion 23-4.

Watanabe T, Nobusawa S, Kleihues P, Ohgaki H. IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. *Am J Pathol*. 2009 Apr;174(4):1149-53.

Wei Y, Yang X, Liu Q, Wilkins JA, Chapman HA. A role for caveolin and the urokinase receptor in integrin-mediated adhesion and signaling. *J Cell Biol*. 1999 Mar 22;144(6):1285-94.

Werling D, Hope JC, Chaplin P, Collins RA, Taylor G, Howard CJ. Involvement of caveolae in the uptake of respiratory syncytial virus antigen by dendritic cells. *J Leukoc Biol*. 1999 Jul;66(1):50-8.

Whitley BR, Beaulieu LM, Carter JC, Church FC. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt regulates the balance between plasminogen activator inhibitor-1 and urokinase to promote migration of SKOV-3 ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol*. 2007 Feb;104(2):470-9.

Wikstrand CJ, McLendon RE, Friedman AH, Bigner DD. Cell surface localization and density of the tumor-associated variant of the epidermal growth factor receptor, EGFRvIII. *Cancer Res*. 1997 Sep 15;57(18):4130-40.

Wikstrand CJ, Reist CJ, Archer GE, Zalutsky MR, Bigner DD. The class III variant of the epidermal growth factor receptor (EGFRvIII): characterization and utilization as an immunotherapeutic target. *J Neurovirol.* 1998 Apr;4(2):148-58.

Wild-Bode C, Weller M, Rimner A, Dichgans J, Wick W. Sublethal irradiation promotes migration and invasiveness of glioma cells: implications for radiotherapy of human glioblastoma. *Cancer Res.* 2001 Mar 15;61(6):2744-50.

Williams TM, Cheung MW, Park DS, Razani B, Cohen AW, Muller WJ, Di Vizio D, Chopra NG, Pestell RG, Lisanti MP. Loss of caveolin-1 gene expression accelerates the development of dysplastic mammary lesions in tumor-prone transgenic mice. *Mol Biol Cell.* 2003 Mar;14(3):1027-42.

Williams TM, Hassan GS, Li J, Cohen AW, Medina F, Frank PG, Pestell RG, Di Vizio D, Loda M, Lisanti MP. Caveolin-1 promotes tumor progression in an autochthonous mouse model of prostate cancer: genetic ablation of Cav-1 delays advanced prostate tumor development in tramp mice. *J Biol Chem.* 2005 Jul 1;280(26):25134-45.

Williams TM, Lee H, Cheung MW, Cohen AW, Razani B, Iyengar P, Scherer PE, Pestell RG, Lisanti MP. Combined loss of INK4a and caveolin-1 synergistically enhances cell proliferation and oncogene-induced tumorigenesis: role of INK4a/CAV-1 in mammary epithelial cell hyperplasia. *J Biol Chem.* 2004 Jun 4;279(23):24745-56.

Williams TM, Lisanti MP. Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005 Mar;288(3):C494-506.

Williams TM, Medina F, Badano I, Hazan RB, Hutchinson J, Muller WJ, Chopra NG, Scherer PE, Pestell RG, Lisanti MP. Caveolin-1 gene disruption promotes mammary tumorigenesis and dramatically enhances lung metastasis in vivo. Role of Cav-1 in cell invasiveness and matrix metalloproteinase (MMP-2/9) secretion. *J Biol Chem.* 2004 Dec 3;279(49):51630-46.

Williams TM, Sotgia F, Lee H, Hassan G, Di Vizio D, Bonuccelli G, Capozza F, Mercier I, Rui H, Pestell RG, Lisanti MP. Stromal and epithelial caveolin-1 both confer a protective effect against mammary hyperplasia and tumorigenesis: Caveolin-1 antagonizes cyclin D1 function in mammary epithelial cells. *Am J Pathol.* 2006 Nov;169(5):1784-801.

Witkiewicz AK, Dasgupta A, Sotgia F, Mercier I, Pestell RG, Sabel M, Kleer CG, Brody JR, Lisanti MP. An absence of stromal caveolin-1 expression predicts early tumor recurrence and poor clinical outcome in human breast cancers. *Am J Pathol.* 2009 Jun;174(6):2023-34.

Wong AJ, Ruppert JM, Bigner SH, Grzeschik CH, Humphrey PA, Bigner DS, Vogelstein B. Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Apr 1;89(7):2965-9.

Wyse BD, Prior IA, Qian H, Morrow IC, Nixon S, Muncke C, Kurzchalia TV, Thomas WG, Parton RG, Hancock JF. Caveolin interacts with the angiotensin II type 1 receptor during exocytic transport but not at the plasma membrane. *J Biol Chem*. 2003 Jun 27;278(26):23738-46.

Yamada E. The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *J Biophys Biochem Cytol*. 1955 Sep 25;1(5):445-58. *Abst*

Yamada S, Bu XY, Khankaldyyan V, Gonzales-Gomez I, McComb JG, Laug WE. Effect of the angiogenesis inhibitor Cilengitide (EMD 121974) on glioblastoma growth in nude mice. *Neurosurgery*. 2006 Dec;59(6):1304-12; discussion 1312.

Yang G, Addai J, Ittmann M, Wheeler TM, Thompson TC. Elevated caveolin-1 levels in African-American versus white-American prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2000 Sep;6(9):3430-3.

Yoon KS, Lee MC, Kang SS, Kim JH, Jung S, Kim YJ, Lee JH, Ahn KY, Lee JS, Cheon JY. p53 mutation and epidermal growth factor receptor overexpression in glioblastoma. *J Korean Med Sci*. 2001 Aug;16(4):481-8.

Yu J, Bergaya S, Murata T, Alp IF, Bauer MP, Lin MI, Drab M, Kurzchalia TV, Stan RV, Sessa WC. Direct evidence for the role of caveolin-1 and caveolae in mechanotransduction and remodeling of blood vessels. *J Clin Invest*. 2006 May;116(5):1284-91.

Zhai GG, Malhotra R, Delaney M, Latham D, Nestler U, Zhang M, Mukherjee N, Song Q, Robe P, Chakravarti A. Radiation enhances the invasive potential of primary glioblastoma cells via activation of the Rho signaling pathway. *J Neurooncol*. 2006 Feb;76(3):227-37.

Zundel W, Swiersz LM, Giaccia A. Caveolin 1-mediated regulation of receptor tyrosine kinase-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity by ceramide. *Mol Cell Biol*. 2000 Mar;20(5):1507-14.