



HAL
open science

La Filamine A, acteur central relayant les mécanismes d'invasion des gliomes de haut-grade: implication dans la signalisation et le trafic du récepteur chimiotactique de l'urotensine II

Alexandre Mutel

► **To cite this version:**

Alexandre Mutel. La Filamine A, acteur central relayant les mécanismes d'invasion des gliomes de haut-grade: implication dans la signalisation et le trafic du récepteur chimiotactique de l'urotensine II. Sciences du Vivant [q-bio]. Normandie Université, France, 2019. Français. NNT: . tel-02418263

HAL Id: tel-02418263

<https://normandie-univ.hal.science/tel-02418263>

Submitted on 18 Dec 2019

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

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



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

La Filamin A, acteur central relayant les mécanismes d'invasion des gliomes de haut-grade : implication dans la signalisation et le trafic du récepteur chimiotactique de l'urotensine II

**Présentée et soutenue par
Alexandre MUTEL**

**Thèse soutenue publiquement le (16/12/2019)
devant le jury composé de**

Mme Monique DONTENWILL	Directeur de recherche, Université de Strasbourg	Rapporteur
M Ahmed IDBAIH	Professeur des Universités Praticien Hospitalier, Institut du cerveau et de la moelle épinière - Paris	Rapporteur
Mme Annie LAQUERRIERE	Professeur des Universités Praticien Hospitalier, Université de Rouen	Examineur
M Laurent PRÉZEAU	Directeur de recherche, Université de Montpellier	Examineur
Mme Hélène CASTEL	Directeur de recherche, Université de Rouen	Directeur de thèse

Thèse dirigée par Hélène CASTEL, laboratoire DC2N

À mon grand-père Gilbert,

Remerciements

Je souhaite remercier :

Le Docteur Monique Dontenwill, Directrice de Recherche au CNRS de l'Université de Strasbourg, de me faire l'honneur d'évaluer mes travaux de thèse en tant que rapporteur. Je suis impatient de pouvoir bénéficier de son regard et expertise dans le domaine des protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire et le gliome. Je la remercie sincèrement.

Le Professeur Ahmed Id Baih, Professeur d'Université et Praticien Hospitalier à l'Institut du Cerveau et de la Moelle Epinière, Pitié-Salpêtrière, à Paris. C'est un privilège et un honneur d'être évalué par l'un des spécialistes français tant sur le plan clinique que préclinique, des gliomes. Je le remercie tout particulièrement.

Le Professeur Annie Laquerrière, Professeur d'Université et Praticien Hospitalier du Service d'Anatomocytopathologie du CHU de Rouen pour avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse en tant qu'examinatrice et pour son implication dans la mise en œuvre de ce projet et la possibilité d'accéder aux prélèvements de gliomes de patients. Je la remercie pour cela et pour la suite...

Le Docteur Laurent Prézeau, Directeur de Recherche au CNRS de l'Université de Montpellier qui me fait l'honneur de faire partie de ce jury en qualité d'examineur. Je tiens également à le remercier de m'avoir accueillie dans son équipe de recherche au sein de l'IGF et pour ses précieux conseils lors des expérimentations sur place, et donc pour son expertise précieuse dans le domaine des récepteurs couplés aux protéines G.

Je tiens tout particulièrement à remercier le Docteur Hélène Castel, Directrice de Recherche à l'Inserm, de l'Université de Rouen Normandie. Hélène, tu m'as accordé ta confiance dès le stage de troisième année de licence, tu as su déceler des capacités que je ne soupçonnais pas posséder. Merci de m'avoir toujours poussé vers le haut et accompagné dans cette ascension. Merci de m'avoir transmis ta rigueur scientifique et ta méthodologie, c'est grâce à ton investissement dans ma formation que j'ai pu atteindre le niveau que j'ai aujourd'hui scientifiquement mais aussi en terme de maturité. Merci pour ta patience à toute épreuve sur mes difficultés à rédiger, tant en français qu'en anglais. Le travail fut long et la progression importante, du moins je crois. J'espère que tu es fière de la thèse que j'ai pu préparer grâce à toi. Merci aussi de m'avoir permis de présenter mes travaux dans des congrès nationaux et internationaux, cela a vraiment été très formateur pour moi. J'espère pouvoir poursuivre tous les travaux que nous avons entrepris et qu'ils pourront faire avancer nos connaissances dans le domaine des gliomes et permettre des avancées thérapeutiques.

Je remercie le Docteur Youssef Anouar, Directeur de Recherche à l'Inserm, et directeur du laboratoire Inserm U1239 de Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine, qui m'a accueilli au sein de son unité durant toutes ces années.

Je tiens à remercier le Professeur Pierrick Gandolfo, qui a contribué à ma formation scientifique dès la licence et qui fait partie des personnes qui m'ont attiré vers le domaine de la recherche.

Merci également au Docteur Fabrice Morin, merci pour tous tes conseils et remarques avisées lors de l'avancement de ce projet, merci aussi pour tout ce que tu as pu me transmettre lors des

enseignements de licences et de master, ce fut un réel plaisir de t'avoir comme professeur puis comme collègue.

Au Docteur Oana Chever, merci pour ta bonne humeur sans faille et tes encouragements ainsi que ton aide durant la rédaction.

Merci au Docteur Laurent Mouchard pour son aide et son implication dans le traitement des données du TCGA, merci de m'avoir appris toutes ces manipulations en bio-informatique.

Merci au Docteur Florent Marguet pour sa disponibilité, son aide et son expertise pour les analyses des immunomarquages Filamine A sur les prélèvements de gliomes de patients.

Un très grand merci à Laurence Desrues, on avait dit que je devais arrêter de te remercier mais laisse-moi une dernière fois te dire à quel point je te suis reconnaissant. Pour commencer par la fin merci infiniment pour toute ton aide durant la rédaction, merci aussi pour ton aide durant les manip, pour les cellules, les western ... Merci au nom de tous les anciens et les futurs étudiants de ton calme et ta patience à toute épreuve et du soin que tu apportes à nous former.

Merci à Martine Dubois, merci pour toute ton aide pour la gestion des souris, merci pour ta disponibilité et ta rigueur qui ont permis l'expérimentation animale dans un bon environnement malgré les difficultés inhérentes à l'infrastructure.

Merci au meilleur ! Merci à toi Paul, ça a vraiment été un réel plaisir de pouvoir compter sur toi durant toute la thèse, j'ai eu beaucoup de chance de t'avoir comme collègue de bureau et comme ami. Je crois que tu es la personne avec laquelle j'ai effectué le plus de kilomètres autour du globe (le voyage au Mexique aidant beaucoup), on a pris beaucoup de train, de bus, de métros et d'avions toujours dans la bonne humeur. Pour ta présence sans faille pendant ces quelques années, merci.

Merci à toi Celeste pour la relecture de la bibliographie et pour les petites pauses lors des derniers jours de la rédaction, j'espère que les futurs jeunes de l'équipe sauront être aussi aidant avec toi que tu l'as été avec moi.

Merci à toi Martin pour la transposition des cerveaux fait durant la rédaction, et merci de m'avoir sauvé en m'envoyant le PDF du papier la veille de l'impression !

Merci à tous les jeunes de l'équipe, particulièrement à Emmanuel pour son coup de main à l'animalerie, merci à Daniele, Renaud, Quentin et Lucie d'apporter une bonne ambiance à l'équipe.

Merci à tous les anciens thésards de l'équipe Jane, Pierre-Mickaël et Benji, merci à tous les pingouins de m'avoir accueilli et élevé comme l'un des leurs il y a 6 ans, je me suis tellement senti bien que je ne suis jamais parti. Mention spéciale à toi Benji, lorsque tu es parti ça a fait un grand vide au labo et dans mes journées, merci pour ces heures à discuter en manip et tous ces fous rires, et je pense qu'au moment où tu liras ces remerciements l'heureux événement sera arrivé donc félicitation Papa ;).

Un grand merci aux copains de promos Hugo et Sarah, si j'ai un seul regret vous concernant c'est de ne pas avoir pu vous découvrir plus tôt, pour ça je suis extrêmement reconnaissant à la formation expérimentation animale à Lille sans laquelle nous ne nous serions peut être pas

autant rapprochés. Merci d'avoir été là pendant cette thèse et d'avoir rythmé mes journées au laboratoire, merci pour tous les fous rires. Sans vous la thèse aurait été bien triste.

Merci à Audrey et Marion, je suis vraiment très heureux d'avoir pu partager un petit morceau de parcours professionnel avec vous 2. Merci pour votre bonne humeur à toutes les 2 au quotidien, et pour votre soutien et vos conseils pendant la rédaction. BigUp à Marion pour m'avoir ouvert les portes du labo le dimanche la veille de l'impression pour pouvoir trouver un document.

Merci aux Bro's Antoine, Jérôme et JB, à l'heure où j'écris ces remerciements vous êtes devant la final des Worlds de League of Legends et je vous suis reconnaissant de ne pas spoiler dans notre conversation commune =P. Merci d'avoir fait partie de ma vie pendant toutes ces années d'études, merci de ne pas me les avoir fait raté en étant solidaire en écrivant des comptes rendus de TP à 3h du matin après une soirée pour pouvoir le rendre le lendemain matin 9h. Merci à Jérôme pour ces petites pauses du mercredi midi devant OPTC. Et comme disait le perroquet « Bro, ferme les yeux Bro, qu'est-ce que tu vois ? » « ...Rien... » « C'est ma vie sans toi Bro ».

Merci à Laurence.Q, merci pour tous vos messages de soutien pendant la rédaction et d'avoir toujours une pensée pour moi, merci d'avoir toujours cru en nous avec Sarah et de nous avoir encouragé, c'est aussi grâce à votre soutien que nous menons la vie que nous avons actuellement.

Merci à Emma, ma petite frangine qui n'a pas osé m'écrire durant la rédaction par peur de me déranger, merci d'avoir pensé à moi, sache que je ne t'oublie pas et que nous avons plein de temps à rattraper ! On va tâcher d'y remédier.

Une infinité de merci à mes parents qui ont toujours cru en moi, même pendant les heures sombres du BAC. Je vous remercie tous les 2 d'avoir fait de moi l'homme que je suis aujourd'hui et j'espère que cette thèse pourra vous rendre fières, je vous serais éternellement reconnaissant de tout ce que vous avez fait pour moi. J'ai conscience de ne pas avoir été très présent ces dernières années et plus particulièrement ces derniers mois mais on va tâcher de se voir plus souvent. Je vous aime.

A ma femme, ma meilleur amie, mon amour, je tiens à dire un million de merci, merci pour ton soutien sans faille, merci pour ton aide lors de la rédaction, merci pour ta compréhension. Cela fait maintenant 9 ans que tu partages ma vie et que tu participes à ma réussite, depuis le lycée, la licence, le master et la maintenant la thèse tu fais partie de tous les événements importants de ma vie et contribue à en faire quelque chose de bien. Tu m'as apporté la stabilité qui m'a permis d'être rigoureux dans mes études et d'être capable de faire cette thèse dans les meilleures conditions possibles. Ces derniers mots vont conclure la fin du premier chapitre de notre vie, il me tarde que l'on écrive la suite ensemble, je t'aime.



MUTEL ALEXANDRE

PhD. Student in Neuro-Oncology

✉ alexandre.mutel@etu.univ-rouen.fr
alexandre.mutel1@univ-rouen.fr

📞 +33687380635

📍 6 rue Georges Lanfry, 76250 Deville les Rouen

EDUCATION

PHD IN NEURO-ONCOLOGY

2016 – Present, UniRouen – DC2N Laboratory, InsermU1239

“Chemokine GPCR signaling is controlled by Filamin A: implication in high-grade glioma development”

Director: Dr. H.Castel

MASTER’S DEGREE IN BIOMEDICAL SCIENCES

2014-2016, University of Rouen Normandie

Speciality: Neurosciences

LICENCE IN BIOLOGY

2011-2014, University of Rouen Normandie

Speciality : Biochemistry, Molecular and Cellular Biology, Physiology

Options: Neurophysiology, Neuropsychology, Neuropsychopharmacology

PACES

2010-2011, University of Rouen Normandie

BACCALAUREAT

2010, Corneil High School – Barentin

Majors : Chemistry, Physics, Biology, Maths

Animal experimentation

Diploma in animal experimentation – Level 1

Diploma in experimental surgery

Behavioral tests (motor, anxiety, memory)

Informatics and Software

Basic Bash script (RNAseq data recovering)

Data statistical analysis (Prism, R)

Scientific results formatting & presentation

Entrepreneurship training

Doctorale Vallée de seine 2018

Winner of the best innovating project

Scientific Collaborations

* **Dr. L. Prezeau (Montpellier, IGF)**

“Characterization of signaling switch in Filamin A knock-out glioblastoma cells using BRET and FRET technologies”

* **Pr. P.Y Renard, (UMR 6014, COBRA)**

“*in cellulo* validation of a bimodal fluorescent probe to study UPA & Cathepsin B activity”

* **Dr. L. Mouchard, (UNIROUEN, LITHIS)**

aim : Bio-informatics analysis of RNAseq TCGA data for :

- K-P Dembele (Team mate) G protein expression pattern in glioblastomas

* **J-V Barnier (Institute of Neuroscience**

Paris-Saclay) “PAK1/3 expression levels in high grade gliomas (work submitted in clinical cancer research)”

* **Drs C. Tarhan & D. Collard (UMR8520, Univ. Lille & LIMMS/CNRS-IIS UMI2820 University of Tokyo)**

“Microfluidic system development to mimic brain parenchyma invasion by glioblastoma cells”

SCIENTIFIC SKILLS

In vitro cell culture (Glioblastoma and Endothelial cell lines)

Molecular biology (RT-qPCR primer design, plasmid preparation)

Cell migration analysis (Boyden chamber, microfluidic, video tracking)

Protein extraction and Western Blotting

Immunohisto/cytochemistry labelling in mouse brain slices and patients glioma biopsies. Imaging (confocal, videomicroscopy)

Experimental surgery in mice (Glioblastoma intrastriatal stereotaxic injection, follow-up, blood and brain sampling)

Bioinformatic skills for academic databases : TCGA, IvyGap

SCIENTIFIC PUBLICATIONS

Clavier T, Mutel A, Desrues L, Lefevre-Scelles A, Gastaldi G, El Amki M, Dubois M, Melot A, Wurtz V, Curey S, Gérardin E, Proust F, Compère V, Castel H. **Association between vasoactive peptide urotensin II and cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a potential therapeutic target.** J Neurosurg 2018 Oct

M.C. Tarhan, A. Mutel, L. Desrues, D. Collard, H. Castel. **Glioblastoma migration along constraints with different geometries: how to mimic brain parenchyma invasion.** μ TAS 2019 - Proceedings



Publications in preparation

Mutel A, Lecointre C, Desrues L, Guichet P.O, Langlois O, Laquerrière A, Marguet F, Prézeau L, Gandolfo P, Morin F and Castel H. **Re-expression of Filamin A in glioblastoma promotes the endogenous and chemokine receptor UT-induced migration/invasion: Marker of aggressiveness and survival.**

Dembele K.P, Mutel A, Desrues L, Nicolas C, Guichet P.O, Mouchard L, Bérard C, Dupel E, Latouche J.B, Langlois O, Morin F, Gandolfo P and Castel H. **R G protein expression and glioma subgroup signature: specific role of Ga15 in GBM mesenchymal phenotype.**

Le Joncour V, Guichet P.O, Dembele K.P, Mutel A, Perzo N, Desrues L, Modzelevski R, Bohn P, Véra P, Couraud P.O, Honnorat J, Marguet F, Laquerrière A, Ferracci F.X, Langlois O, Morin F, Gandolfo P Castel H. **Targeting the urotensin II/UT G protein-coupled receptor to counteract angiogenesis and mesenchymal hypoxia/necrosis in glioblastoma.**



Oral communications

Re-expression de la Filamine A dans les gliomes de haut grade - Rôle clé dans le switch invasif relayé par les récepteurs chimiotactiques. 11^{ème} journée scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest, Deauville May2018

Re-expression of the neurodevelopmental protein filamin A in glioblastoma via signaling switch of the urotensin II vasoactive peptide receptor. RegPep 2018 22nd International Symposium on Regulatory Peptides, Acapulco-Mexico, October 2018 ([Oral communication award](#))

GPCR's activity is controlled by Filamin A in glioblastoma. 7^{ème} meeting annuel du GDR GPCR, Strasbourg, November 2018



Poster communications

Mutel A., Lecointre C., Dembele K.P., Guichet P.O., Desrues L., Langlois O., Laquerrière A., Marguet F., Gandolfo P., Morin F. et Castel H., " **Control of membrane GPCR signaling by Filamin A : implication in high-grade glioma development.** " 5^{ème} meeting annuel du GDR GPCR, Tours, November 2016 ([Award: 1st price](#))

Mutel A., Lecointre C., Dembele K.P., Guichet P.O., Desrues L., Langlois O., Laquerrière A., Marguet F., Gandolfo P., Morin F. et Castel H., " **Control of membrane GPCR signaling by Filamin A: implication in high-grade glioma development.** " 20^{ème} Journées de l'école doctorale EdNBISE, le Havre, March 2017

Mutel A., Lecointre C., Dembele K.P., Guichet P.O., Desrues L., Langlois O., Laquerrière A., Marguet F., Gandolfo P., Morin F. et Castel H., " **Signalisation membranaire et filamine A dans la migration des gliomes de haut-grade.** " 10^{ème} journée scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest, Deauville, May 2017, ([Award: 1st price](#))

Mutel A., Lecointre C., Dembele K.P., Guichet P.O., Desrues L., Langlois O., Laquerrière A., Marguet F., Gandolfo P., Morin F. et Castel H., " **Control of membrane GPCR signaling by Filamin A: implication in high-grade glioma development.** " NeuroFrance 2017, Bordeaux, May 2017

Mutel A., Semaine du cerveau 2017, Rouen, March 2017, Communication affichée grand public " **Control du développement des tumeurs cérébrales par la Filamine A.** "

Mutel A., Lecointre C., Dembele K.P., Guichet P.O., Desrues L., Langlois O., Laquerrière A., Marguet F., Gandolfo P., Morin F. et Castel H., " **Chemokine GPCR signaling is controlled by Filamin A: implication in high-grade glioma development.** " 6^{ème} meeting annuel du GDR GPCR, Paris, November 2017

Mutel A., Lecointre C., Dembele K.P., Guichet P.O., Desrues L., Langlois O., Laquerrière A., Marguet F., Gandolfo P., Morin F. et Castel H., " **Chemokine GPCR signaling is controlled by Filamin A: implication in high-grade glioma development.** " 2^{ème} Journée Normande de Recherche biomédicale JNRB, Caen, November 2017

Mutel A., Lecointre C., Dembele K.P., Guichet P.O., Desrues L., Langlois O., Laquerrière A., Marguet F., Gandolfo P., Morin F. et Castel H., " **Chemokine GPCR signaling is controlled by Filamin A: implication in high-grade glioma development.** " 21^{ème} Journées de l'école doctorale EdNBISE, Rouen, March 2018

Mutel A., Lecointre C., Dembele K.P., Guichet P.O., Desrues L., Langlois O., Laquerrière A., Marguet F., Gandolfo P., Morin F. et Castel H., " **Chemokine GPCR signaling is controlled by Filamin A: implication in high-grade glioma development.** " 3^{ème} Journée Normande de Recherche biomédicale JNRB, Rouen, September 2018

Mutel A., Lecointre C., Dembele K.P., Guichet P.O., Desrues L., Langlois O., Laquerrière A., Marguet F., Gandolfo P., Morin F. et Castel H., " **Chemokine GPCR signaling is controlled by Filamin A: implication in high-grade glioma development.** " 22nd meeting of the LARC-Neuroscience, Rouen, October 2018

Mutel A., Lecointre C., Dembele K.P., Guichet P.O., Desrues L., Langlois O., Laquerrière A., Marguet F., Gandolfo P., Morin F. et Castel H., " **Chemokine GPCR signalling is controlled by Filamin A: implication in high-grade glioma development.** " 22^{ème} Journées de l'école doctorale EdNBISE, Caen, March 2018

Mutel A., Lecointre C., Dembele K.P., Guichet P.O., Desrues L., Langlois O., Laquerrière A., Marguet F., Gandolfo P., Morin F. et Castel H., " **Re-expression de la Filamine A associée au profil mésenchymateux et à l'agressivité des glioblastomes.** " 12ème journée scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest, Deauville, May 2019.

Mutel A., Lecointre C., Dembele K.P., Guichet P.O., Desrues L., Langlois O., Laquerrière A., Marguet F., Gandolfo P., Morin F. et Castel H., " **Re-expression of the neurodevelopmental protein filamin A in glioblastoma enhance tumor proliferation and invasiveness.** " NeuroFrance 2019, Marseille, May 2019

Résumé

Les glioblastomes multiformes (GBM) sont les tumeurs les plus fréquentes et agressives du système nerveux central. Le traitement standard des GBM suit le « Protocole de Stupp » qui consiste en une résection chirurgicale de la tumeur la plus large possible, suivie d'une radiothérapie/chimiothérapie au temozolomide (TMZ) concomitante. Malgré ce traitement lourd de première ligne, les patients atteints de GBM présentent une survie médiane de seulement 14,6 mois. Même si la résection semble la plus complète possible, le caractère diffus et invasif des cellules de GBM est à l'origine de récurrences quasi-systématiques en bordure de la cavité de résection. L'invasion du parenchyme cérébral sain par les cellules de GBM, en bordure ou à distance de la zone de résection, constitue par conséquent un enjeu thérapeutique majeur. Ces mécanismes d'invasion sont portés par des transformations cellulaires liées aux contraintes environnementales telles que l'hypoxie et l'angiogenèse, responsables d'une transition mésenchymateuse (TM) principalement contrôlée par les facteurs de transcription STAT3 et CEBP α qui stimulent 70% des gènes secondaires mésenchymateux. L'hypoxie associée à la TM entraînent notamment la surexpression de récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPGs) de chimiokines, entre autres. Le RCPG chimiotactique le plus largement étudié dans le GBM est le CXCR4 relayant ses effets pro migratoires *via* les couplages et les voies G α_i /PI3K/PIP3 et G $\alpha_{12/13}$ /Rho/ROCK ainsi que son endocytose clathrine-dépendante et le recyclage relayé par l'activité de β -arrestines. Des travaux déjà réalisés dans notre équipe ont aussi pu mettre en évidence que le récepteur UT du neuropeptide urotensine II (UII) se comporte comme un récepteur de chimiokine pouvant stimuler la migration directionnelle de cellules de GBM *via* l'activation séquentielle de G α_i /PI3K/PIP3 puis de G $\alpha_{12/13}$ /Rho/ROCK permettant la polarisation cellulaire, l'émission de lamellipodes, la polymérisation des fibres de stress d'actine, et la contraction cellulaire. Ainsi il apparaît que la redondance d'expression et de couplages des RCPGs chimiotactiques constitue un verrou majeur en termes de ciblage thérapeutique de l'un de ces systèmes. C'est sur la base de ces observations que nous avons entrepris d'isoler de nouveaux partenaires protéiques communs à ces récepteurs pouvant être la source de développement de nouvelles stratégies anti-invasives.

Dans un premier temps, nous avons validé la redondance d'expression systématique des systèmes CXCR4/SDF-1 α et UT/UII par immunomarquages réalisés sur des prélèvements de

différents grades de gliome de patients (Collaboration avec Pr A. Laquerrière, CHU Rouen). Ces systèmes sont plus particulièrement co-surexprimés dans les régions hypoxiques pseudopalissadiques péri-nécrotiques des GBM. Le criblage par double-hybride d'une banque d'ADNc de cerveaux humains nous a permis de mettre en évidence que la séquence en acides aminés 332-351 du domaine C-terminal du récepteur UT interagit avec les domaines répétés D16-D24 d'une protéine plateforme nommée Filamine A (FlnA).

Afin d'identifier si une telle interaction entre le récepteur UT et la FlnA peut constituer un mécanisme fonctionnel dans l'activité des GBM, nous avons évalué les niveaux d'expression de la FlnA à l'aide des informations de RNAseq de la base de données du TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) et de IVYgap (*IVY glioblastome atlas project*). Ces analyses de données bio-informatiques nous ont permis de mettre en évidence que les niveaux d'expressions de FlnA sont corrélées aux grades des gliomes, montrant les niveaux les plus élevés dans les GBM mésenchymateux au statut IDH1/2 (isocitrate déshydrogénase1/2) sauvage. La surexpression de FlnA est associée à une diminution de la survie globale et une récurrence plus précoce. De plus, les études des données de la base IVYgap combinées aux immunomarquages réalisés sur les prélèvements de gliomes de patients, mettent en évidence que la FlnA est très fortement exprimée dans les régions hypoxiques et pseudopalissadiques ainsi que dans les régions de prolifération microvasculaire. L'analyse de réseaux ontologiques réalisée à partir des données de niveaux d'expression des gènes dont l'expression est corrélée à la FlnA dans les gliomes, a révélée des réseaux associés à la voie PI3K, à la polarisation cellulaire, aux adhésions ou à la régulation du cytosquelette.

Afin d'étudier les propriétés intrinsèques de la FlnA dans la régulation de l'activité des cellules de GBM, les niveaux d'expression de FlnA ont été confirmés dans des lignées de GBM, en conditions normoxiques et hypoxiques, cette dernière permettant l'augmentation transcriptionnelle des ARNm codant la FlnA, et protéique de la FlnA et de l'UT. Nous avons à partir de la lignée de GBM U87, généré une lignée KnockOut (KO) délétée du gène codant la FlnA grâce au système CRISPR/Cas9. L'absence de FlnA dans la lignée U87, est associée à une réduction des capacités prolifératives, un mécanisme associé à une accumulation de cellules en phase G1 du cycle cellulaire, suggérant une faible progression des cellules vers la phase S et l'augmentation de la senescence. De plus, la délétion de la FlnA sensibilise les cellules U87 aux chimiothérapies TMZ et d'Irinotecan (CPT-11) testées à faibles concentrations (10^{-7} M, chaque). En termes de motilité, les cellules U87 montrent spontanément la présence de lamellipodes, de fibres de stress d'actine et de points focaux d'adhésion, responsables d'une migration de type « mésenchymateuse endogène ». En revanche, les cellules FlnAKO

présentent une diminution significative de leur motilité associée à la réduction du nombre d'adhésions focales marquées par un anti-Phospho_paxilline, ainsi qu'à une inhibition majeure de la polymérisation des fibres de stress d'actine. La quantification du nombre et du type de protrusions membranaires sur ces 2 lignées indique que les cellules U87-FlnAKO sont dans l'incapacité de générer et de stabiliser des lamellipodes. Ces observations montrent que la FlnA est essentielle pour la polymérisation des fibres de stress d'actine, formation de lamellipodes, et la maturation des points focaux d'adhésion indispensables à la migration chimiotactique directionnelle.

Les travaux précédant de l'équipe avaient montré que le récepteur UT relaye la migration chimiotactique de gliome *via* l'activation de $G\alpha_i$ /PI3K/PIP3 et $G\alpha_{12/13}$ /Rho/ROCK permettant l'expansion du lamellipode et la maturation de points focaux d'adhésion comportant la vinculine. Dans la présente étude nous montrons que l'absence de FlnA prévient les cycles d'adhésion/dé-adhésion provoqués par la stimulation de l'UT par l'UII (10^{-8} M), ainsi que la migration directionnelle en chambre de Boyden en réponse à des concentrations croissantes d'UII (10^{-12} M, 10^{-9} M et 10^{-7} M), suggérant que la FlnA contrôle la migration chimiotactique dépendante d'un RCPG tel que l'UT. De façon intéressante, par transfection de la lignée U87 par des vecteurs portant des séquences codant fragments peptidiques du domaine C-terminal de l'UT ou du domaine 16 à 24 de la FlnA, nous observons que la probable expression de ces peptidomimétiques interactants (UT₃₁₉₋₃₈₉ et FlnA_{D16-24}) prévient la migration directionnelle évoquée par l'UII dans les cellules de GBM U87 et 8MG, renforçant l'idée que l'interaction UT-FlnA influence la migration chimiotactique.

Nous avons ensuite recherché si la FlnA était impliquée dans les couplages du récepteur UT et son trafic cellulaire. En présence de FlnA dans les cellules U87 exprimant le récepteur UT-eYFP recombinant, les données immunocytochimiques montrent que le récepteur UT n'est pas associé à $G\alpha_q$, mais est co-localisé voire précouplé à la protéine $G\alpha_i$ au lamellipode et que cette co-localisation est augmentée au niveau intracellulaire après un traitement par l'UII. Dans les cellules U87-FlnAKO, ce précouplage $G\alpha_i$ n'est pas retrouvé, alors que l'UT se trouve co-localisé avec $G\alpha_q$ principalement après traitement par l'UII. Cette acquisition de couplage est confirmée par la stimulation de la mobilisation calcique spécifiquement détectée dans les cellules U87-FlnAKO traitées par des concentrations croissantes d'UII. Ainsi, la FlnA semble essentielle au pré-couplage $G\alpha_i$ et l'exclusion du couplage $G\alpha_q$ dans les cellules de GBM. Lors d'une activation plus prolongée, le récepteur l'UT, présent dans des *ruffles* membranaires (ondulations de la membrane plasmique en préparation d'une expansion membranaire) des cellules U87 et être internalisé/endocyté après traitement par l'UII (10^{-7} M, 10^{-9} M). Ces *ruffles*

membranaires sont absents dans les cellules U87-FlnAKO et l'UT est présent à la membrane plasmique y compris après un traitement prolongé en présence d'UUI, suggérant que la FlnA joue un rôle central dans la régulation du transport au lamellipode et au processus d'internalisation du récepteur UT. Réciproquement, nous avons aussi montré que l'activation du récepteur UT entraîne dans les cellules U87 un clivage de la FlnA et une bande à 110-130 kDa détectée en Western blot, ainsi qu'une relocalisation du récepteur UT à la membrane plasmique. Ces mécanismes sont bloqués en présence de pertussis toxine (PTX) qui inhibe l'activité de $G\alpha_i$, alors que les cellules émettent toujours de larges lamellipodes possiblement grâce au complexe $\beta\gamma$ libéré et l'activation de PI3K. Les résultats obtenus lors des quantifications de la distribution du récepteur dans les différents compartiments cellulaires suggèrent donc que le clivage de la FlnA dépendant de la protéine $G\alpha_i$ capable potentiellement d'inhiber l'activité d'une PKA et de stimuler de fait les calpaïnes, est nécessaire à l'accumulation du récepteur au lamellipode suite à une stimulation par l'UUI.

Enfin, nous avons réalisé des xéno greffes orthotopiques des lignées U87 et U87-FlnAKO dans des lignées de souris Nude/NMRI. Cette étude a permis de mettre en évidence une amélioration significative de la survie des animaux xéno greffés au niveau striatal avec la lignée U87-FlnAKO comparativement aux animaux contrôle. Des séries d'immunomarquages réalisés sur des cerveaux d'animaux prélevés de manière précoces (15 jours), ont permis de mettre en évidence une modification majeure du phénotype des GBM issus des cellules U87-FlnAKO. En effet, les GBM-U87 présentent un cœur tumoral plutôt d'apparence nécrotique et une morphologie hautement invasive, parfois multifocale, accompagnée d'un fort marquage de la FlnA et MMP-9 (*Matrix Metalloproteinase 9*), montrant une co-localisation des marquages UT et FlnA dans les processus invasifs et une angiogenèse anormale. *A contrario*, les GBM-U87-FlnAKO présentent un phénotype hautement circonscrit accompagné d'une perte des marquages FlnA, UT et MMP-9, et d'une vascularisation plutôt normalisée. Cependant la persistance de la détection du marqueur CD44 dans ces tumeurs suggère que l'absence de FlnA n'impacte pas l'expression de tous les marqueurs mésenchymateux, mais réprime en aval les capacités invasives des cellules U87.

L'ensemble de ces données montre que la FlnA joue un rôle majeur dans la régulation des phénomènes de prolifération et d'adhésion liés à la migration des cellules de GBM. De plus la FlnA contrôle directement la signalisation du récepteur UT en conditionnant d'une part son pré-couplage à la protéine $G\alpha_i$ et d'autre part en permettant l'internalisation/endocytose dynamique du récepteur après stimulation et son recyclage au lamellipode. Ainsi il est envisageable de développer des stratégies thérapeutiques ciblant spécifiquement l'interaction

UT/FlnA afin de prévenir l'invasion du parenchyme sain relayée par l'activation de l'UT, mais de manière plus générale, par l'ensemble des systèmes chimiokines interagissant avec la FlnA.

Abstract

Multiform glioblastoma (GBM) are the most frequent and aggressive tumor of the central nervous system (CNS). The standard treatment therapy for GBM follows the “Stupp protocol” consisting in the most complete surgical resection combined with radio/chemotherapy with temozolomide (TMZ). Despite this heavy first line treatment, patients with GBM display a survival median of only 14.6 months. Even if the resection as large as possible, the diffuse properties of GBM cells leads to a quasi-systematic invasion of the margin of the resection cavity. The healthy brain parenchyma invasion by GBM cells, in margin or at distance of the resection cavity, constitutes a main therapeutic issue. These invasion mechanisms are carried by cell transformations caused by the microenvironment such as hypoxia and angiogenesis responsible for mesenchymal transition (MT) mainly controlled by two transcription factors STAT3 and CEBP α which stimulate 70% of secondary mesenchymal genes. Hypoxia associated with MT triggers the expression of chemokine G protein-coupled receptor (GPCRs). The most studied chemotactic GPCR in GBM is CXCR4 which mediates promigratory effects through G α_i /PI3K/PIP3 and G α_{13} /Rho/ROCK as well as its endocytosis and recycling mediated by β -arrestins. Our team already demonstrated that the UT receptor of the neuropeptide urotensin II (UII) behaves like a chemokine receptor and stimulates GBM directional migration by G α_i /PI3K/PIP3 and G α_{13} /Rho/ROCK allowing cell polarization, lamellipodia formation, actin stress fiber polymerization and cell contraction. Thus it appears that the expression and coupling redundancy of chemotactic GPCRs constitute a major brake for the development of targeted therapy against these systems. Based on these observations, we proposed to identify new protein partners common to these chemokine GPCRs which could then be targeted by future anti-invasive therapies.

First, we validated the systematic redundancy of expression of CXCR4/SDF-1 α and UT/UII systems by immunohistochemical studies carried in various patient glioma grades (Collaboration with Pr A. Laquerrière, CHU Rouen Hospital). These systems are more strongly co-expressed in pseudopalisadic peri-necrotic hypoxic GBM areas. A two-hybrid screening of a bank of human brain cDNA allowed us to demonstrate that the 332-352 C-terminal amino acid sequence of UT interacts with the repeat D19-D20 domains of a platform protein called Filamin A (FlnA).

In order to identify whether this interaction between FlnA and UT could exert a functional impact in GBM activity, we evaluated the FlnA mRNA expression levels by means of RNAseq data from The Cancer Genome Atlas (TCGA) and IVYgap (IVY glioblastoma atlas project)

data bases. These analyses highlighted that FlnA expression levels are correlated with glioma grades, showing the highest levels in IDH1/2 (Isocitrate Dehydrogenase 1 & 2) wild type mesenchymal GBM. FlnA overexpression is shown associated with a decrease of overall survival and earlier recurrence. Moreover IVYgap data analysis combined with immunolabelings performed on glioma patient samples, revealed that is strongly express in pseudopalisades and hypoxic areas as well as in microvascular proliferation areas. Additional analysis FlnA-associated ontological gene networks based on genes which expression is the most correlated with FlnA in glioma, stressed main networks associated with PI3K pathway, cell polarization and adhesion or cytoskeleton regulation.

In order to study FlnA intrinsic properties in GBM activity, FlnA expression levels were first confirmed in GBM cell lines under normoxia and hypoxia. Hypoxia triggered FlnA mRNA overexpression as well as increased FlnA and UT protein forms. We generated from the U87 GBM cell line, a KnockOut (KO) U87 cell line deleted for the gene encoding FlnA by using the CRISPR/Cas9 technology. FlnA deletion in U87 cells is associated with a significant decrease of their proliferative capacities, a mechanism characterized by cell accumulation in G1 cell cycle phase, suggesting a slow progression towards S phase and accumulation in senescence. Moreover, FlnA depletion was shown to sensitize U87 cells to TMZ and Irinotecan (CPT-11) tested at low concentrations (10^{-7} M of each). Regarding motility, U87 cells displayed spontaneous production of lamellipodia, actin stress fibers and focal adhesion points, responsible for “mesenchymal endogenous” migration. However, FlnAKO cells exhibited a significant decrease of their motility associated with a reduction of focal adhesion points labeled by an anti phospho_paxillin antibody, associated with a major inhibition of actin stress fiber polymerization. The quantification of the number and the type of membrane protrusions on the two cell lines indicated that U87-FlnAKO are unable to generate and stabilize lamellipodia. These observations show that FlnA is essential for actin stress fiber polymerization, lamellipodia formation and focal adhesion maturation essential for chemotactic directional migration.

Previous work of our team demonstrated that UT receptor mediates glioma chemotactic migration through *Gai*/PI3K/PIP3 and $G\alpha_{13}$ /Rho/ROCK allowing lamellipodia expansion and vinculin focal adhesion maturation. In this study we showed that the absence of FlnA prevents adhesion/de-adhesion cycles stimulated by the UII (10^{-8} M)-induced UT activation, as well as the directional migration in response to UII (10^{-12} M, 10^{-9} M and 10^{-7} M) in the Boyden chamber assay. This strongly suggests that FlnA may control GPCR-dependent chemotactic migration in general and UT in particular. Interestingly, when U87 cell were transfected by vectors

encoding UT C-terminal sequences or the FlnA D16-24 domain, we observed that the sequences behaving as interacting peptidomimetics (UT₃₁₉₋₃₈₉ et FlnA_{D16-24}) inhibit U87 and 8MG GBM cell directional migration mediated by UII, strengthening the potential interaction between FlnA and UT leading to directional migration.

We next investigated whether this interaction would play a role in UT couplings and trafficking. In the presence of FlnA, U87 cells expressing recombinant UT-eYFP uncoupled to Gα_q, but precoupled within lamellipodia with Gα_i, while this colocalization increased within the cytosol after UII treatment. In U87-FlnAKO cells, this Gα_i precoupling was not found but UT appeared mainly colocalized with Gα_q mainly after UII treatment. This new coupling acquisition was confirmed by specific calcium mobilization after UII treatment in U87-FlnAKO cells. Thus, FlnA seems essential for UT precoupling to Gα_i and Gα_q exclusion in GBM cells. During a sustain activation, UT receptor is present in membrane ruffles of U87 cells and could be internalized and endocytate after UII treatment (10⁻⁷M and 10⁻⁹M). These membrane ruffles are absent in FlnAKO cells and UT was expressed at the plasma membrane even after sustained UII treatment. We conclude here that FlnA plays a key role in the transport regulation of UT to the lamellipodia through ruffles expansion and in UT internalization/endocytosis process. Reciprocally, we demonstrated that UT activation in U87 cells triggered FlnA cleavage characterized by the detection of FlnA band at 110-130 kDa in Western blot, associated with a UT relocation at the plasma membrane. These mechanisms are inhibited in presence of pertussis toxin (PTX) which inhibits Gα_i activity while cells still emitted lamellipodia possibly *via* free βγ complexes allowing PI3K activation. Results of the receptor distribution quantification suggested that receptor relocation after stimulation is dependent on Gα_i activity, PKA inhibition that would favor calpains activity to induce FlnA proteolysis and UT redistribution after UII stimulation.

Finally, we performed orthotopic U87 and U87-FlnAKO cells xenograft in the striatum of NMRI/Nude mice. We observed a significant survival improvement of U87-FlnAKO injected mice compared with control mice injected with U87 cells. Immunolabelings performed on brain tumor slices obtained from sampled injected mouse brains at 15 days post-injection, showed a drastic modification of the U87-FlnAKO tumor phenotype. Indeed, U87-GBM displayed a necrotic tumor core associated with a highly invasive phenotype, sometimes multifocal with strong and intense FlnA and MMP-9 labelings, showings colocalisation between FlnA and UT in invasive processes, around UII-expressing components. U87-FlnAKO GBM rather exhibited a highly circumscribe phenotype accompanied by the loss of FlnA, UT and MMP-9 expression as well as by occurrence of a normal vascularization. However the CD44 labeling was not

modified in the presence or the absence of FlnA in U87 GBM cells, suggesting that FlnA deletion is not controlling expression all mesenchymal markers, but rather represses downstream GBM invasive properties.

Altogether these data show that FlnA plays a major role in proliferation and adhesion processes in GBM cells. Moreover, FlnA directly controls UT receptor signalings by conditioning in one hand its precoupling to G α i and on the other hand by allowing its rapid and dynamic internalization/endocytosis and its recycling to the lamellipodia. Thus it is possible to develop therapeutic strategies specifically targeting FlnA/UT interaction in order to prevent healthy brain invasion mediated by UT, and more generally, by all chemokine receptors interacting with FlnA.

Sommaire

Résumé	
Abstract	
Sommaire	1
Liste des abréviations	3
Liste des figures et tableaux	9
Introduction	11
I Les gliomes, tumeurs gliales du système nerveux central	11
I.I Généralités sur les gliomes	11
I.I.A Epidémiologie et origines	11
I.I.B Classification des gliomes	13
I.I.B.1 Classification de l’OMS – 2007	13
I.I.B.2 Raffinement moléculaire de la classification des gliomes : classification de l’OMS – 2016	14
I.II Les glioblastomes	22
I.II.A Sous-classification des glioblastomes	23
I.II.B Micro-environnement tumoral	26
I.II.B.1 La niche périvasculaire	27
I.II.B.2 La niche hypoxique	30
I.II.C La niche invasive et transition mésenchymateuse	33
I.II.C.1 La transition mésenchymateuse	33
I.II.C.2 La matrice extracellulaire : support de la migration	36
I.II.C.3 Invasion du parenchyme cérébral : modèle hydrodynamique	38
I.II.C.4 Rôle des chimiokines et leurs récepteurs dans l’invasion	41
I.II.C.4.a Système urotensinergique et signalisations	43
I.II.C.4.b Le récepteur UT	44
I.II.C.4.c Fonctions physiologiques	46
I.II.C.4.d Fonctions physiopathologiques : implication dans la tumorigenèse	48
I.II.D Stratégies thérapeutiques	50
I.II.D.1 Les thérapies ciblées	50
I.II.D.3 Stratégies thérapeutiques ciblant les récepteurs des chimiokines	55
II Les Filamines, protéines plateformes et organisatrices	57
II.I La Famille des Filamines	58
II.II Structure et propriétés des Filamines	62
II.II.A Domaine de dimérisation des Filamines	63
II.II.B Liaison à la F-actine	65
II.II.C Rod 2 et Domaine d’auto-inhibition : cas de la Filamine A	68
II.II.D Structure des domaines répétés	69
II.III Les partenaires protéiques et fonctions de la Filamine A	70
II.III.A Cas des molécules d’adhésions	70

II.III.B GTPase de la famille Rho et effecteurs associés	73
II.III.C Régulation de la transcription et localisation nucléaire	76
II.III.D Interaction avec les RCPGs et β -arrestines	80
II.III.D.1 Récepteurs métabotropiques du glutamate	81
II.III.D.2 Calcium sensing receptor	82
II.III.D.3 Récepteurs chimiotactiques	83
II.III.D.4 Récepteurs opioïdiques	84
II.III.D.5 Récepteurs dopaminergiques	85
II.III.D.6 Récepteurs calcitoninergiques	86
II.III.D.7 Récepteurs somatostatinerigique	86
II.III.D.8 β -arrestines	88
II.III.D.9 Motif consensus d'interaction des RCPGs à la Filamine A	89
II.IV Modification, clivage et dégradation de la Filamine A	91
II.IV.I Modulation des fonctions de la Filamine A	92
II.IV.II Dégradation et clivage protéolytique de la Filamine A	94
II.V Mutation de la Filamine A et pathologies développementales	97
II.V.A L'hétérotopie Nodulaire Périvericulaire	97
II.V.B Spectre de malformations otopalatodigitales	98
II.VI Rôle de la Filamine A dans la tumorigenèse	102
II.VI.A Cancer de la prostate et Filamine A	102
II.VI.B Cancer mammaire et Filamine A	103
II.VI.C Cancer pulmonaire et Filamine A	105
II.VI.D Cancer pancréatique et Filamine A	105
II.VI.E Mélanome et Filamine A	107
II.VI.F Autres cancers ayant fait l'objet d'une publication et Filamine A	107
II.VI.G Cancers du système nerveux central et Filamine A	108
Objectifs de thèse	109
Résultats	111
Discussion	197
I RCPG chimiotactiques et glioblastomes méenchymateux	197
II Ré-expression de la Filamine A dans les gliomes de haut-grade : un facteur pronostic d'agressivité	201
III Fonction de la Filamine A dans l'agressivité des GBM	204
IV Propriétés mécaniques de la Filamine A dans l'adhésion et la migration des cellules de GBM	206
V La Filamine A régule le trafic et le couplage de l'UT : impacte sur la migration ?	208
VI L'activation de Gai par l'UT régule le clivage de la Filamine A	212
VII Impact de l'expression de la FlnA sur la croissance des GBM et la survie des animaux	213
Conclusion	217
Perspectives	219
Propriétés intrinsèques de la Filamine A dans la tumorigenèse gliale	219
Implication de la Filamine A dans le couplage et le trafic du récepteur UT	220
Généralisation du rôle de la FlnA aux autres récepteurs chimiokines ?	222
Ciblage de l'interaction UT-Filamin A ou RCPG-Filamin A à des fins thérapeutiques	223
Références bibliographiques	225
Publication annexe	259

Liste des abréviations

3-oxo	: 3-oxoglutarate
ABD	: <i>Actin binding domain</i>
ABP-280	: <i>Actin binding protein 280</i>
ACTN	: <i>Actinin</i>
ADD	: ATRX-DNMT3-DNMT3L
ADN	: Acide désoxyribonucléique
ADNc	: Acide désoxyribonucléique complémentaire
AKAP79	: <i>A kinase anchoring protein 79</i>
Akt	: <i>Akt serine/threonine kinase 1</i>
ALDH-1A3	: Aldéhyde dehydrogenase-1A3
ALDOA	: Aldolase A
ALLN	: N-[N-(N-Acetyl-L-leucyl)-L-leucyl]-L-norleucine
AMD3100	: Plerixafor
AMPc	: Adénosine monophosphate cyclique
Ang	: <i>Angiopoietin</i>
APCs	: Cellules présentatrices d'antigène
AQP1	: Aquaporines 1
AQP4	: Aquaporines 4
Arg	: Arginine
ARNm	: Acide ribonucléique messagé
ARNpolI	: ARN polymérase I
ARNr	: ARN ribosomaux
ASB2α	: <i>Ankyrin repeat and SOCS box containing 2 alpha</i>
ASCL1	: <i>Achaete-scute family BHLH transcription factor 1</i>
ATP	: Adénosine triphosphate
ATRX	: <i>α-thalassemia/mental retardation syndrome X-linked</i>
BCNU	: Carmustine
BHE	: Barrière hémato-encéphalique
bHLH-B2	: <i>Basic helix-loop-helix transcription factors</i>
BKV	: Polymavirus BK
BM	: Bleu de méthylène
BNIP3	: <i>BCL2 interacting protein 3</i>
BRCA1	: <i>Breast cancer 1</i>
BRCA2	: <i>Breast cancer 2</i>
BRET	: <i>Bioluminescence resonance energy transfert</i>
C/EBPβ	: <i>CCAAT enhancer binding protein beta</i>
CAIX	: Anhydrase carbonique de type 9
CaMK-II	: <i>Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase type II</i>
CaR	: <i>Calcium sensing receptor</i>
CCL2	: <i>C-C motif chemokine ligand 2</i>
CCR	: <i>C-C chemokine receptor</i>
CD44	: <i>CD44 antigen</i>
cdc42	: <i>cell division control protein</i>
CDK	: Kinases dépendantes des cyclines
CDKN2A	: Inhibiteur 2A des kinases dépendantes des cyclines
CDX-110	: Rindopepimut
CFTR	: <i>CF transmembrane conductance regulator</i>

CH	: <i>Calponin homology</i>
CHEM	: Chemokine
CHI3L1	: <i>Chitinase 3 like 1</i>
CIC	: <i>Chlorure canal</i>
c-MET	: <i>MNNG HOS transforming gene</i>
CPT-11	: Irinotecan
CR	: <i>Calpononin repeat</i>
CRIB	: cdc42 (p21) binding domain
CSCs	: Cellules souches cancéreuses
CTR	: <i>Calcitonin receptor</i>
CX3CR1	: <i>C-X3-C motif chemokine receptor 1</i>
CXCL12	: Chimiochine C-X-C de type 12
CXCR	: <i>C-X-C chemokine receptor</i>
Cys	: Segment riche en cystéine
D2R	: Récepteur dopaminergique 2
D3R	: Récepteur dopaminergique 3
DCX	: Doublecortine
ddFln	: <i>Dictyostelium discoideum filamin</i>
DDOST	: <i>Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase non-catalytic subunit</i>
DEAB	: Diethylaminobenzaldéhyde
DLL1	: <i>Delta like ligand 1</i>
DLL3	: <i>Delta like canonical notch ligand 3</i>
DLL4	: <i>Delta like ligand 4</i>
DNA-PKcs	: Sous unité cs de la protéine kinase dépendante de l'ADN
DNMT	: <i>DNA methyltransferase</i>
DNMT3L	: <i>DNMT 3 like</i>
DOR	: Récepteur opioïdérique delta
DTM	: Domaine transmembranaire
EF	: <i>Calmodulin-like domain</i>
EGF	: <i>Epidermal growth factor</i>
EGFR	: <i>Epidermal growth factor receptor</i>
EGFRvIII	: EGFR variant III
EMT	: Transition épithélio-mésenchymateuse
EphA2	: <i>EPH receptor A2</i>
ERK	: <i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FAP	: <i>Fibroblast activation protein alpha</i>
FBM	: <i>Filamine A bining motif</i>
FGF	: <i>Fibroblast growth factor</i>
FGFR	: Récepteur du FGF
FISH	: Hybridation <i>in situ</i> à fluorescence
FlnA	: Filamine A
FlnAΔH1	: Filamine A délétée de la région H1
FlnB	: Filamine B
FlnC	: Filamine C
Flns	: Filamines
FMD	: Dysplasie frontométaphyséale
FOLS2	: <i>FOS like 2</i>
FoxC1	: <i>Forkhead box C1</i>
FoxD1	: <i>Forkhead box D1</i>

FRET	: <i>Fluorescence resonance energy transfer</i>
GABRA1	: <i>Gamma-aminobutyric acid type A receptor alpha1 subunit</i>
GAPs	: <i>GTPase-activating proteins</i>
GBM	: <i>Glioblastome multiforme</i>
GBMO	: <i>GBM secondaire</i>
GCP	: <i>Genistein-combined-polysaccharide</i>
GEF	: <i>Guanine nucleotide exchange factor</i>
GIPs	: <i>GPCR-interacting proteins</i>
GLUT	: <i>Transporteur du glucose</i>
GMT	: <i>Glial-to-mesenchymal transition</i>
GPIba	: <i>Sous-unité Iba du complexe glycoprotéique (GP)Ib-IX-V</i>
GPI-PSS	: <i>Peptide signal glycosylphosphatidyl-inositol</i>
GRK2/3	: <i>G protein coupled receptor kinase 2/3</i>
H(n)	: <i>Hinge</i>
HA	: <i>Acide hyaluronique</i>
hAR	: <i>Récepteur des androgènes</i>
HDAC	: <i>Histone déacetylase</i>
HGF	: <i>Hepatocyte growth factor</i>
HGFR	: <i>Hepatocyte growth factor receptor</i>
HIF	: <i>Hypoxia inducible factors</i>
HIF-1α	: <i>Hypoxia inducible factor 1 alpha</i>
His	: <i>Histidine</i>
HK2	: <i>Hexokinase 2</i>
hMLH1	: <i>MutL homolog 1</i>
hMSH2	: <i>MutS homolog 2</i>
HNP	: <i>Hétérotopie nodulaire périventriculaire</i>
HNPC	: <i>Carcinomes colorectaux non-polypeux héréditaire</i>
hPMS2	: <i>Mismatch repair endonuclease PMS2</i>
HRE	: <i>Hypoxia respons element</i>
HU	: <i>Hydroxyurée</i>
ICAM-1	: <i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
ICL	: <i>Boucle intracellulaire</i>
IDH1/IDH2	: <i>Isocitrate déshydrogénase 1 et 2</i>
IDHmut	: <i>IDH muté</i>
IDHwt	: <i>IDH sauvage</i>
IgE	: <i>Immunoglobuline de type E</i>
IGF-1	: <i>Insulin-like growth factor-1</i>
IgG	: <i>Immunoglobuline de type G</i>
IgG-like	: <i>Immunoglobuline-like</i>
IL-13	: <i>Interleukine 13</i>
IL-4	: <i>Interleukine 4</i>
IP₃	: <i>Inositol triphosphate</i>
iRTK	: <i>Inhibiteurs de tyrosines kinases</i>
IQGAP1	: <i>IQ motif containing gtpase activating protein 1</i>
ITGB1	: <i>Intégrine β1</i>
IUPHAR	: <i>Union internationale de la pharmacologie de base et clinique</i>
J1	: <i>Jagged-1</i>
JAK	: <i>Janus kinase</i>
JCV	: <i>Polymavirus JC</i>
KASH	: <i>Klarsicht ANC-1 and syne homology domain</i>

KCa	: Canal potassique-Ca ²⁺ dépendant
KIF2C	: <i>Kinesin family member 2C</i>
KIT	: CD117
Klf-4	: <i>Kruppel-like factor -4</i>
KO	: <i>Knock-out</i>
KOR	: Récepteur opioïdérique kappa
Ku86	: <i>Ku86 autoantigen related protein</i>
LATS2	: <i>Large tumor suppressor kinase 2</i>
LDHA	: Lactate déshydrogénase
LFA-1	: <i>Lymphocyte function-associated antigen-1</i>
LAMB2	: Laminine β2
LLG	: <i>Low grade glioma</i>
LOH	: <i>Loss of heterozygotie</i>
MAG	: <i>Myelin associate glycoprotein</i>
MAPK	: <i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MB	: Membrane basale
MCT1/4	: <i>Monocarboxylate transporter 1 & 4</i>
MEC	: Matrice extracellulaire
MEK	: <i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MERTK	: <i>MER proto-oncogene, tyrosine kinase</i>
MET	: <i>MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase</i>
MGMT	: <i>O6-methylguanine-DNA methyl transferase</i>
MIDAS	: <i>Metal ion dependent adhesion site</i>
MLCK	: <i>Myosin light chain kinase</i>
MMP-14	: <i>Matrix metalloproteinase 14</i>
MMP-2	: <i>Matrix metalloproteinase 2</i>
MMP-9	: <i>Matrix metalloproteinase 9</i>
MMPs	: <i>Matrix metaloproteinase</i>
MNS	: Syndrome de melnick-needles
MOR	: Récepteur opioïdérique mu
MSN	: Moésine
mTOR	: <i>Mammalian target of rapamycin</i>
NADPH	: <i>Nicotiamide adenine dinucleotide phosphate</i>
Ndr2	: <i>Nuclear dbf2 related</i>
NEFL	: <i>Neurofilament light</i>
NES	: <i>Neural precursor and stem cell marker</i>
NF1	: Neurofibromine 1
NF-κB	: <i>Nuclear factor kappa B</i>
NHEJ	: <i>Non homologous end joining DNA repair</i>
NK	: <i>Lymphocyte natural killer</i>
NKCC1	: <i>Na-K-Cl cotransporter</i>
NO	: Monoxyde d'azote
Oct-4	: <i>POU class 5 homeobox 1</i>
ODP	: Spectre de malformation otopalatodigital
ODP1	: <i>Syndrome otopalatodigitale 1</i>
ODP2	: <i>Syndrome otopalatodigitale 2</i>
OLIG2	: <i>Oligodendrocyte transcription factor 2</i>
OMS	: Organisation mondiale de la santé
PAK1	: Sérine/thréonine kinase p21-activated-kinase-1
PaO₂	: Pression partielle en oxygène

PAR1	: <i>Protease-activated receptor 1</i>
PAS	: <i>Periodic acid schiff</i>
PBX1	: <i>Pre-B-cell leukemia transcription factor 1</i>
PCR	: <i>Polymerase chain reaction</i>
PCV	: Procarbazine, lomustine, vincristine
PDB	: Protein data bank
PDGF	: <i>Platelet-derived growth factor</i>
PDGFR	: Récepteur du PDGF
PDGFRA	: <i>Platelet-derived growth factor receptor-aplha</i>
PEBP2/CBF	: <i>Core-binding factor</i>
PEBP2β/CBFβ	: <i>Core-binding factor subunit beta</i>
PFK1	: Phosphofructokinase 1
PH	: <i>Pleckstrin homology domain</i>
PHD	: Prolylhydroxylase
PI3K	: <i>Phosphatidylinositol 3 kinase</i>
PIP2	: <i>Phosphatidylinositol 2</i>
PIP3	: <i>Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate</i>
PIPs	: Phosphatidylinositolphosphate
PKA	: Protéine kinase A
PKC	: Protéine kinase C
PKCα	: Protéine kinase C alpha
PKC-ϵ	: Protéine kinase C epsilon
PKCθ	: Protéine kinase C theta
PLC	: <i>Protéine lipase C</i>
pMGMT	: Promoteur de la MGMT
PR	: <i>Plectin repeat</i>
PRLR	: Récepteur de la prolactine
PrP	: Pro-prion
PSA	: <i>Prostate spécifique antigène</i>
PTEN	: <i>Phosphatase and tensin homolog</i>
pTERT	: Promoteur de TERT
PTX	: <i>Pertusis toxin</i>
R	: <i>Dystrophine repeat</i>
RAD51	: RAD51 recombinase
RCPG	: Récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G
RELB	: <i>RELB proto-oncogene, NF-KB subunit</i>
RET	: <i>Ret proto-oncogene</i>
RHO GEF	: <i>Guanine nucleotide exchange factor</i>
ROBO1	: <i>Roundabout guidance receptor 1</i>
ROCK	: <i>Rho associated coiled-coil containing protein kinase</i>
ROS	: Espèces réactive de l'oxygène
RPL13A	: <i>Ribosomal protein L13a</i>
RSK	: Ribosomal S6 kinase
RT	: Radiothérapie
RTK	: Récepteur tyrosine kinase
RUNX1	: <i>RUNX family transcription factor 1</i>
S1P	: Sphingosine 1-phosphate
S1PR	: <i>Sphingosine 1-phosphate receptor</i>
SDF-1α	: <i>Stromal cell-derived factor 1α</i>
Shh	: <i>Sonic hedgehog</i>

SL	: Sérine/leucine
SLC12A5	: <i>Solute carrier family 12 member 5</i>
SLUG	: <i>Snail family transcriptional repressor 2</i>
SMAD	: <i>Mothers against decapentaplegic homolog</i>
SNAI2	: <i>Snail family transcriptional repressor 2</i>
SNAIL	: <i>Drosophila snail homologues</i>
SNC	: Système nerveux central
SNF2	: SWI/SNF2
SOX	: Sry-type HMG box
Sox-2	: SRY-box-2
SphK1	: <i>Sphingosine kinase 1</i>
Sr	: <i>Spectrin repeat</i>
srABD	: <i>Spectrin related actin binding domain</i>
SST	: <i>Somatostatin receptor</i>
STAT	: <i>Signal transducers and activators of transcription</i>
STAT3	: <i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
SUN	: Sad1 and UNC-83
SV40	: Polymavirus simien
sVEGFR1	: <i>Soluble VEGFR1</i>
SYT1	: <i>Synaptotagmin 1</i>
TCF4	: <i>Transcription factor 4</i>
TCGA	: <i>The cancer genome atlas</i>
TCR	: Récepteur des cellules T
TERT	: <i>Telomerase reverse transcriptase</i>
TGF-β	: <i>Transforming growth factor-β</i>
TGN	: Réseau trans-golgien
T_H2	: Lymphocytes T helper 2
TM	: Transition mésenchymateuse
TMZ	: Témazolomide
TNC	: Tenascine C
TNF	: <i>Tumor necrosis factor</i>
TNFRSF1A	: <i>TNF receptor superfamily member 1A</i>
TP53	: <i>Tumor protein 53</i>
TRADD	: <i>TNFRSF1A associated via death domain</i>
TWIST1	: <i>Twist family BHLH transcription factor 1</i>
UII	: Urotensine II
uPAR	: <i>Urokinase-type plasminogen activator receptor</i>
URP	: <i>Urotensin-II related peptide</i>
UT	: <i>Urotensin-II receptor</i>
VCAM-1	: <i>Vascular cell adhesion protein 1</i>
VCL	: Vinculine
VEGF	: <i>Vascular endothelial growth factor</i>
VEGFα	: <i>Vascular endothelial growth factor-A</i>
VHL	: Ubiquitine ligase von Hippel Lindau
VZV	: <i>Varicella zoster virus</i>
ZEB1	: <i>Zinc finger E-box binding homeobox 1</i>
z-VAD-fmk	: Inhibiteur des caspases
β2AR	: Récepteur β 2 adrénergique
βFLN	: Beta(β)-filamine
γFLN	: Gamma(γ)-filamine

Liste des figures et tableaux

Figure 1 Réaction de conversion de l'isocitrate en α -cétoglutarate par l'isocitrate déshydrogénase _____	15
Figure 2 Alignement de séquences des gènes codant l'enzyme IDH1 et ses homologues chez différentes espèces _____	16
Figure 3 Mécanisme à l'origine de la co-délétion 1p/19q _____	18
Figure 4 Réaction de déméthylation d'une guanine méthylée catalysée par la MGMT _____	20
Figure 5 Schéma de la stratégie de classification moléculaire des gliomes et les stratégies thérapeutiques associées _____	21
Figure 6 Variation phénotypique intra-tumorale. Etude de la variation phénotypique intra-tumorale, réalisée par single cell RNA-sequencing sur un panel de cellules provenant de la même tumeur _____	23
Figure 7 Interaction niche vasculaire-cellules de gliome _____	28
Figure 9 Organisation de la matrice extracellulaire cérébrale _____	37
Figure 10 Modèle de migration hydrodynamique _____	39
Tableau 1 Expression des intégrines dans les gliomes _____	41
Figure 11 Séquences de l'UII et de l'URP _____	44
Tableau 2 Localisation centrale de l'UII chez l'Homme, le Singe, le Rat et la Souris _____	45
Tableau 3 Localisation centrale de l'UT chez l'Homme, le Singe, le Rat et la Souris. _____	46
Figure 12 Représentation schématique de la structure de l'UT humain _____	47
Tableau 4 Voies de transduction associées à l'activation du récepteur UT et à l'implication dans les effets promotogènes, hypertrophiques et chimioattractants de l'UII _____	49
Figure 13 Stratégies de thérapie ciblée testées dans le traitement des GBM _____	54
Tableau 5 Inhibiteurs de récepteurs aux chimiokines utilisés en préclinique _____	57
Tableau 6 Inhibiteurs de récepteurs aux chimiokines utilisés en essai clinique _____	57
Figure 14 Représentation schématique de l'organisation des Filamines _____	59
Figure 15 Localisation et propriétés des gènes codant les Filamines humaines ainsi que leurs distributions tissulaires _____	60
Figure 16 Représentation schématique de l'organisation tridimensionnelle d'un domaine répété de Filamine _____	63
Figure 17 Domaine 24 : interface de dimérisation des filamines _____	64
Figure 18 Représentation schématique des domaines protéiques des protéines appartenant à la superfamille possédant un spectrin-related actin binding domain _____	66
Figure 19 Réarrangement des domaines de la Filamine A lors d'une tension exercée par la contraction des fibres d'actine _____	67
Figure 20 Conservation phylogénique des tandems d'auto-inhibition _____	69
Figure 21 Représentation schématique des classes phylogénétiques de domaines répétés de la Filamine A _____	70

Figure 22 Organisation structurale d'un dimère d'intégrines _____	71
Figure 23 Modèle de clusterisation des intégrines par la Filamine A _____	72
Figure 24 Interaction Filamine A/GTPases : implication dans la migration cellulaire _____	75
Figure 25 Domaines fonctionnels des protéines de la famille p53 _____	77
Figure 26 Représentation schématique du rôle de la Filamine A dans la phosphorylation de Smad2 _____	78
Figure 27 Interaction de la Filamine A avec les protéines nucléaires _____	80
Figure 28 Signalisation des RCPGs impliqués dans la polymérisation d'actine _____	81
Figure 29 Domaines d'interactions des RCPG avec la Filamine A _____	82
Figure 30 Rôle de la Filamine A et RalA dans la régulation du trafic intracellulaire et le couplage des récepteurs dopaminergiques D2R et D3R _____	86
Figure 31 Modélisation du complexe SST2il1-FlnAD19 _____	87
Figure 32 Modèle de contrôle de la voie PI3K par le récepteur SST2 : implication de la Filamine A _____	88
Figure 33 Alignement des séquences des protéines interagissant avec un domaine de la classe A de Filamine A _____	90
Figure 34 Modèle de clusterisation des RCPGs par la Filamine A _____	91
Figure 35 Liste des modifications fonctionnelles apportées à la Filamine A _____	94
Figure 36 Effet de la pression partielle en oxygène sur la stabilité de Filamine A _____	96
Figure 37 Image IRM d'une patiente et d'un patient atteints d'hétérotopie nodulaire périventriculaire _____	98
Figure 38 Mutations impliquées dans la survenue d'hétérotopie nodulaire périventriculaire _____	100
Tableau 7 Tableau résumant l'ensemble des malformations associées au syndrome du spectre ODP _____	101
Figure 39 Phénotypes associés aux mutations de la Filamine A dans les syndromes ODP _____	101
Figure 40 Interaction entre la voie de MAPK et la Filamine A : implication dans les processus associés à la tumorigenèse _____	106
Figure 41 Voies associées à la prolifération tumorale impliquant une régulation par la Filamine A _____	207
Figure 42 Voie hypothétique de trafic du récepteur UT dépendant de l'expression de la Filamine A _____	210
Figure 43 Trafic du récepteur UT dépendant de la Filamine A lors de la migration directionnelle _____	214
Figure 44 Voie de migration possiblement utilisée par les cellules U87 et U87-FlnAKO via un mécanisme de migration amiboïde _____	216

Introduction

I | Les gliomes, tumeurs gliales du système nerveux central

I.1 | Généralités sur les gliomes

I.1.A | Epidémiologie et origines

Entre 2007 et 2011, l'incidence du gliome est de 6,6 personnes sur 100 000/an aux Etats-Unis, alors que la moitié de cette population contracte plus spécifiquement un gliome de grade IV aussi appelé glioblastome ou glioblastome multiforme (GBM) d'après le terme anglosaxon (Ostrom *et al.*, 2014). Le risque de développer un gliome augmente avec l'âge de l'individu, et cette corrélation est d'autant plus importante si l'on considère uniquement les GBM. Entre 2007 et 2011, ce sont donc 0,15 enfants, 0,41 jeunes adultes, 13,1 patients de 65 à 75 ans et 15,0 patients âgés de 75 à 84 ans pour une population de 100 000 habitants, qui développent un gliome (Ostrom *et al.*, 2014).

A ce jour aucune origine environnementale relative au développement des gliomes n'a pu être directement démontrée, seuls les rayonnements ionisants utilisés à des fins thérapeutiques (1-6 Gy) pour le traitement d'infections fongiques du cuir chevelu ainsi que le traitement par radiothérapie de tumeurs pédiatriques, ou de tumeurs bénignes chez l'adulte, sont à l'origine de l'apparition de gliomes secondaires (Ostrom et Barnholtz-Sloan 2011 ; Neglia *et al.*, 2006 ; Minniti *et al.*, 2005 ; Brada *et al.*, 1992). Et si l'on veut évoquer des facteurs de protection, les maladies atopiques associées à l'asthme, l'eczéma et aux allergies en général doivent être citées. Ces pathologies sont caractérisées par une hyper-activité du système immunitaire généralement associée à une forte production d'interleukine 4 (IL-4) et 13 (IL-13) par les lymphocytes T *helper* 2 (T_H2). C'est plus particulièrement la présence de polymorphismes des gènes codant les interleukines associées aux haplotypes 01 du gène codant IL-4 et des haplotypes R110G et C-1112T du gène codant IL-13 qui semble être responsable de l'augmentation de la production d'IgE à l'origine d'une sensibilisation du système immunitaire de ces patients qui serait en capacité d'endiguer de manière précoce les néoplasmes du SNC (système nerveux central) (Wiemels *et al.*, 2007). Des traces de polymavirus BK, JC et simien (SV40) ont été retrouvées dans des tissus de gliomes humains et permettent la survenue de gliomes chez l'animal. Plus particulièrement lorsqu'il est inoculé chez le hamster doré, le BKV génère des tumeurs des régions ventriculaires telles que des épendymomes ou de papillomes des plexus choroïde. Le JCV (Polymavirus JV) quant à lui induit la survenue de médulloblastomes, d'astrocytomes et

de GBM. Chez le primate, l'inoculation de JCV provoque majoritairement la survenue d'astrocytomes (Shah 2000 ; Rollison *et al.*, 2003). Cependant aucun lien de causalité direct n'a pu être établi. En effet une étude de cas portant sur peu d'individus n'a pas pu corrélérer significativement les niveaux d'IgG réactifs à ces virus à la survenue des gliomes (Wesseling *et al.*, 2002). Tout comme pour les syndromes atopiques, une étude fait état d'une corrélation inverse entre les niveaux D'IgG dirigées contre le virus de la varicelle (*varicella zoster virus*, VZV) et la survenue de gliomes (Amirian *et al.*, 2016). Finalement, malgré un très grand nombre d'études, aucune source environnementale n'a pu être associée au développement de gliomes, mis à part le cadmium qui semble pouvoir perméabiliser la barrière hémato-encéphalique (BHE), et qui possède un grand pouvoir carcinogène. L'exposition prolongée au cadmium aboutie en effet à son accumulation dans les micro-vaisseaux sanguins cérébraux. Cette accumulation génère un stress oxydatif et une forte production locale d'espèces réactives de l'oxygène à l'origine de la mort des cellules endothéliales et de la perméabilisation de la BHE (Waisberg *et al.*, 2003 ; Shukla *et al.*, 1996 ; Wesseling *et al.*, 2002). Seuls des agents qui ne sont pas bloqués par la BHE (virus & rayonnement) semblent être en mesure de provoquer la survenue de gliomes.

Sur un plan génétique, le développement de gliomes est associé à de rares cas de syndromes familiaux représentant moins d'1% de l'ensemble des gliomes. La neurofibromatose de type I est associée à une incidence plus élevée d'astrocytomes (Ohgaki, Kim, et Steinbach 2010). Elle se caractérise par des mutations héréditaire (50%) ou *de novo* (50%) du gène codant la neurofibromine 1 (NF-1), une protéine oncosuppresseur inhibant la voie Ras (J. M. Friedman 1993). Le syndrome de Li-Fraumeni est caractérisé par des mutations germinales du gène TP53 (*Tumor protein 53*), dont la fonction principale est de réguler la réparation des dommages causés à l'ADN et de contrôler l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose lorsque ces derniers sont trop importants. Ainsi les mutations provoquant une perte de fonction de P53 sont à l'origine de l'accumulation d'instabilités génétiques à l'origine de la survenue de néoplasmes chez ces patients (Orr *et al.*, 2019), tels que des sarcomes de tissus mous, d'ostéosarcomes, de cancers du sein, de sarcomes adrénocorticaux ainsi que de tumeurs du SNC. Environ 14% des néoplasmes causés par le syndrome de Li-Fraumeni sont des tumeurs du SNC avec une prédominance pour le développement d'astrocytomes (Louis *et al.*, 2007). Le syndrome de Turcot est issu d'une altération autosomale dominante principalement à l'origine de polypes ou de carcinomes colorectaux combinés à des tumeurs du SNC. Les patients atteints du syndrome de Turcot de type I développent généralement des GBM associés à des mutations germinales

des gènes hPMS2 (*PMS1 Homolog 2, Mismatch Repair System Component*) et hMSH2 (*MutS Homolog 2*) hMLH1 (*MutL Homolog 1*) combinées à des carcinomes colorectaux non-polypeux héréditaire (HNPCC) (Khattab et Monga 2019). Les protéines hPMS2 et hMSH2 hMLH1 appartiennent au système de réparation des mésappariements ou *mismatch repair system*, les mutations de ces protéines à l'origine d'une perte de fonction vont causer une accumulation d'erreurs de réplication à l'origine de l'instabilité génétique provoquant l'apparition de néoplasmes. Le mécanisme à l'origine de la co-occurrence de GBM et de carcinome colorectaux est à ce jour encore non élucidé (Khattab et Monga 2019).

I.1.B | Classification des gliomes

Au cours des 15 dernières années, la classification des gliomes a évolué, et en 2007, la publication émanant de l'organisation mondiale de la santé (OMS), propose une classification des tumeurs cérébrales y compris gliales principalement basée sur des critères anatomocytologiques à partir des observations et de caractérisations morphotypiques des tumeurs (Louis *et al.*, 2007). En 2016, sous l'égide de spécialistes internationaux, l'OMS a proposé à la communauté une nouvelle classification sur la base de critères moléculaires tout en tenant compte des critères cytopathologiques (Louis *et al.*, 2016).

I.1.B.1 | Classification de l'OMS – 2007

La classification des gliomes de l'OMS de 2007 repose sur une analyse anatomocytologique de biopsies des tumeurs et organise les tumeurs d'origines gliales en 3 groupes principaux en se basant sur leur origine cellulaire. Ainsi les 3 groupes sont les oligodendrogliomes, les oligoastrocytomes, dont la composante cellulaire est dite « mixte » et les astrocytomes. Les oligodendrogliomes de bas grade se caractérisent par des noyaux ronds uniformes et bien délimités, la taille des cellules augmente dans les oligodendrogliomes anaplasiques associée à une chromatine vésiculée et à des nucléoles plus volumineux. Les oligodendrogliomes sont également caractérisés par une morphologie dite en « œuf sur le plat » avec un noyau entouré d'un halo leur donnant cet aspect caractéristique (Wesseling *et al.*, 2015). Les astrocytomes quant à eux sont subdivisés en 4 grades. L'astrocytome pilocytique (grade I) est caractérisé par un phénotype circonscrit parfois kystique associé à une prolifération modérée. Lorsque la localisation le permet, la tumeur est réséquée, les survies à 2 et 10 ans sont respectivement de 96,6 % et 91,9%. Sur un plan histologique la région compacte des astrocytomes pilocytiques contiennent de longs et fins prolongements appelés processus piloïde

arrangés de manière parallèle ou irrégulière ainsi que des fibres de Rosenthal étant fortement marquées par la coloration éosine hématoxyline (Collins *et al.*, 2015). La survenue d'atypies cytonucléaires accompagnées d'anaplasie, l'activité mitotique élevée ainsi que les zones de proliférations microvasculaires et de nécrose sont les critères histologiques utilisés pour définir le grade des astrocytomes. Un astrocytome diffus ne présentant pas ces caractéristiques est considéré comme un astrocytome de grade II. L'augmentation de l'activité mitotique conduit au diagnostic d'un astrocytome anaplasique (grade III). Pour finir, un astrocytome possédant des zones de micro-prolifération vasculaire associées à des zones de nécrose est considéré comme un GBM (grade IV). La zone de nécrose est généralement entourée d'une zone de forte densité cellulaire caractérisée par une couronne de noyaux allongés arrangés radialement par rapport au corps nécrotique appelée zone pseudo-palissadique. Le grade de la tumeur impacte significativement la survie des patients, en effet la survie à 10 ans est de 37 % pour les grades II, 19 pour les grades III et seulement de 2,6 % pour les GBM (Weller *et al.*, 2015; Louis *et al.*, 2007).

I.1.B.2 | Raffinement moléculaire de la classification des gliomes : classification de l'OMS – 2016

Avec la survenue du *whole genome sequencing* et des thérapies personnalisées, le besoin de raffiner la classification des gliomes avec des paramètres moléculaires s'est avéré nécessaire. Cette nouvelle approche ne s'affranchit pas totalement de l'ancienne classification et combine donc les critères anatomocytopathologiques et moléculaires pour générer une nouvelle classification intégrée impliquant plusieurs couches de paramètres. Cette nouvelle stratégie repose notamment sur l'analyse des mutations des gènes de l'isocitrate déshydrogénase 1 et 2 (IDH1/DH2), de l'*α-thalassemia/mental retardation syndrome X-linked* (ATRX), de la co-délétion des chromosomes 1p et 19q ainsi que la mutation du promoteur de la *telomerase reverse transcriptase* (TERT). L'hyperméthylation du promoteur de la *O6-methylguanine-DNA methyl transferase* (MGMT) est également un paramètre pris en compte pour l'établissement de cette nouvelle classification. Ainsi les nouvelles catégories de gliomes sont les astrocytomes pilocytiques, les astrocytomes diffus IDH muté (IDH_{mut}), les astrocytomes anaplasiques IDH_{mut}, les oligodendrogliomes IDH sauvage (IDH_{wt}) et 1p/19q codélétés, les oligodendrogliomes anaplasique IDH_{wt} et 1p/19q codélétés, les astrocytomes anaplasique IDH_{wt}, les GBM IDH_{wt} et les GBM IDH_{mut} issus de la transformation d'un gliome de plus bas grade (Louis *et al.*, 2016).

Les IDH1/IDH2 sont des enzymes centrales du métabolisme cellulaire impliquées dans la transformation de l'isocitrate en α -cétoglutarate, elles jouent également un rôle important dans la régénération du pool cytosolique de NADPH (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) nécessaire entre autre à la régénération de glutathion réduit (Figure 1 | Réaction de conversion de l'isocitrate en α -cétoglutarate par l'isocitrate déshydrogénase) (Krebs *et al.*, 1937).

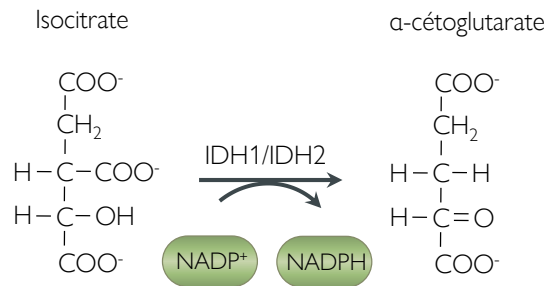


Figure 1 | Réaction de conversion de l'isocitrate en α -cétoglutarate par l'isocitrate déshydrogénase. L'isocitrate déshydrogénase convertie l'isocitrate en α -cétoglutarate, cette réaction génère 1 nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH).

Les mutations des gènes IDH1/2 constituent le premier critère de différenciation de la nouvelle classification des gliomes en deux groupes, IDH1/2_{mut} et IDH1/2_{wt}. La détection récurrente et fréquente de mutations de ces gènes constitue une piste moléculaire pronostique de gliomes moins agressifs. En effet, ce phénotype moléculaire est majoritairement caractéristique des gliomes de bas grades et concerne principalement les astrocytomes de grade II & III, les oligodendrogliomes et les oligoastrocytomes ainsi que les GBM secondaires issus de la transformation d'un astrocytome/gliome de plus bas grade (Parsons *et al.*, 2009 ; Balss *et al.*, 2009 ; Yan *et al.*, 2009). Ce marqueur moléculaire permet aussi de prédire le devenir clinique de patients présentant des tumeurs de morphotypes histologiques similaires, et dans ce cas, la survie médiane des patients développant des astrocytomes diffus (histologiquement parlant) est significativement impactée par la présence ou l'absence de mutations IDH (Sanson *et al.*, 2009 ; Hartmann *et al.*, 2011). Les patients porteurs d'une mutation IDH présentent une survie globale significativement plus longue que celle des patients non porteurs de mutations (56,50 vs 21,30 mois), cependant cette mutation n'affecte le délai de récurrence de la tumeur (5,57 vs 4,83 mois) (Lv *et al.*, 2011). La mutation présente fréquente est la mutation du gène codant IDH1 et conduit à la substitution d'une arginine (Arg) par une histidine (His) sur le codon 132 du gène IDH1. Contrairement à ses homologues IDH 2 et 3 qui sont exprimés dans les mitochondries, IDH1 est exprimée dans le cytosol et les peroxysomes et n'est pas impliquée dans le cycle de Krebs et la production d'énergie. L'arginine R132 est très conservée

phylogénétiquement et joue un rôle clé dans l'interaction à l'isocitrate en formant une liaison hydrogène avec un groupement carboxyle α et β de l'isocitrate (Nekrutenko *et al.*, 1998) (Figure 2 | Alignement de séquences des gènes codant l'enzyme IDH1 et ses homologues chez différentes espèces). La substitution de ce groupement par une histidine inhibe stériquement et électrostatiquement la liaison d'IDH1 à l'isocitrate et réduit son activité enzymatique de 80%. *In vitro*, la surexpression de la forme mutée R132H de IDH1 réduit significativement la production d' α -cétoglutarate dans des lignées de GBM U87MG en culture (Zhao *et al.*, 2009). L' α -cétoglutarate est utilisée par les prolyhydroxylases (PHD) afin de transférer un groupement OH sur certaines protéines devant être dégradées par le protéasome en condition normoxique. Dans les gliomes les PHD hydroxylent notamment le facteur de transcription HIF-1 α (*Hypoxia Inducible Factor-1 α*). Ainsi la surexpression du mutant R132H dans les cellules U87MG augmente l'expression de HIF-1 α , de plus les gliomes de patients IDH_{mut} présentent des niveaux plus élevés d'HIF-1 α (Zhao *et al.*, 2009).

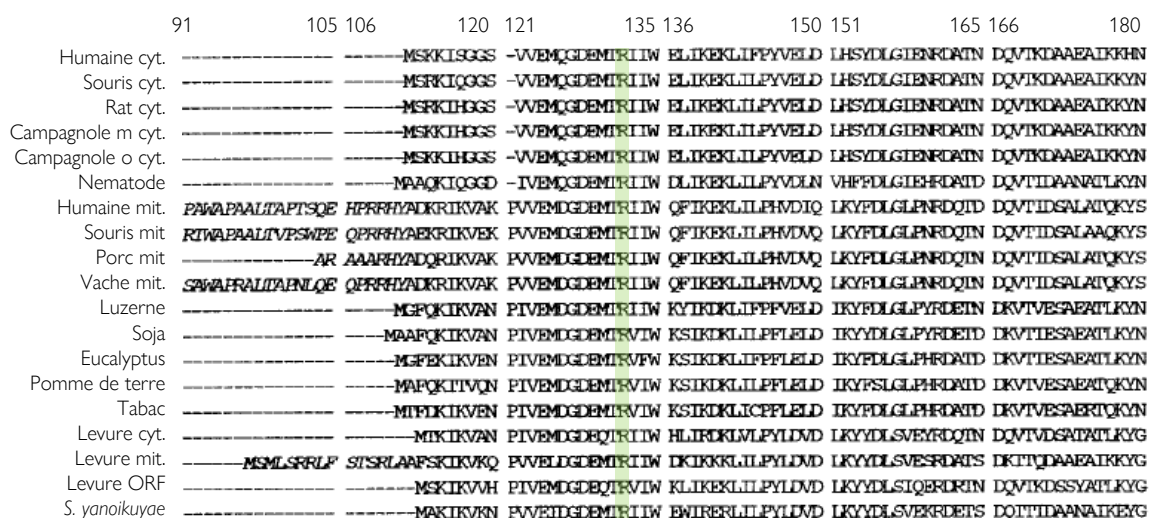


Figure 2 | Alignement de séquences des gènes codant l'enzyme IDH1 et ses homologues chez différentes espèces. La séquence de l'isocitrate déshydrogénase est fortement conservée entre les espèces de différents groupes phylogéniques. L'argine R132 (vert) mutée dans les gliomes fait partie de la séquence conservée. m : *mexicanus*, o : *ochrogaster*, ORF : *open reading frame*. (Modifié d'après Nekrutenko *et al.*, 1998).

Ces résultats sont paradoxaux si l'on considère que les gliomes IDH_{mut} permettent un meilleur pronostic en terme de survie que les gliomes IDH_{wt}, il est envisageable que les conditions micro-environnementales restent normoxiques dans les gliomes de bas grades du fait de la présence de cette mutation. Et, l'activation des gènes cibles de HIF-1 α en condition normoxique (VEGF (*Vascular endothelial growth factor*), GLUT 1/3 (*Glucose transporter 1/3*),

CAIX (Carbonic Anhydrase type 9) préviendrait la mise en place de niches hypoxiques en maintenant un système vasculaire fonctionnel au sein de la tumeur, favorisant par extension les effets des traitements permettant l'acheminement au cœur de la tumeur des agents antinéoplasiques tel que le Témzolomide (TMZ), de l'oxygène nécessaire aux effets de la radiothérapie, ainsi qu'aux acteurs du système immunitaire.

La co-délétion des chromosomes 1p et 19q constitue le second pilier de l'arbre décisionnel de diagnostic des patients atteints de gliomes. Cette anomalie est majoritairement associée aux oligodendrogliomes (Reifenberger *et al.*, 1994). La perte combinée de matériel génétique sur les chromosomes 1p et 19q résulte de la perte d'un chromosome hybride causée par une translocation déséquilibrée aboutissant à la perte d'hétérozygotie, souvent retrouvée sous le terme LOH (*loss of heterozygotie*) (Figure 3 | Mécanisme à l'origine de la co-délétion 1p/19q) (Jenkins *et al.*, 2006). La détection de cette modification s'effectue par hybridation *in situ* à fluorescence (FISH) grâce à la fusion CEP1/19q12 générée par la translocation déséquilibrée ou par analyse de microsatellites ce qui est plus couramment utilisé à des fins diagnostiques (Weller *et al.*, 2012). De façon intéressante, cette modification est associée à une meilleure réponse des patients à la chimio- et/ou radiothérapie, en effet les patients présentant cette co-délétion possèdent une survie de 11,9 ans et une survie globale de 95 % contre 8,1 ans et 59 % à 5 ans pour les patients ne possédant pas cette co-délétion (Cairncross *et al.*, 2006 ; Bent *et al.*, 2006; Wick *et al.*, 2009; Jenkins *et al.*, 2006). A ce jour aucun gène n'a pu être expérimentalement caractérisé comme étant responsable de la signature onco-suppressive de la co-délétion 1p/19q. Cependant, au début de l'année 2019, une équipe a publié une étude bioinformatique menée sur les bases des données du TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) ayant permis d'isoler une signature génétique maligne de 25 gènes parmi les 1203 gènes associés aux chromosomes 1p et 19q. De façon intéressante l'analyse d'interaction fonctionnelle de ces gènes réalisée grâce à la plateforme STRING n'a permis de relier fonctionnellement que les gènes RPL13A (*Ribosomal Protein L13a*) et DDOST (*Dolichyl-Diphosphooligosaccharide--Protein Glycosyltransferase Non-Catalytic Subunit*) suggérant que les 25 gènes sont fonctionnellement indépendants. Le gène codant KIF2C (*Kinesin Family Member 2C*) semble particulièrement impliqué dans cette signature au vu des résultats de l'étude bioinformatique. *In vitro* les auteurs ont montré que l'inhibition par ARN interférence du gène KIF2C réduisait significativement la prolifération et la migration de cellules de GBM LN229 et U87MG. De plus l'analyse ontologique des 25 gènes de la signature fait ressortir des réseaux associés à la prolifération cellulaire, à la matrice extracellulaire, à l'angiogenèse ainsi qu'à la réponse des

dommages à l'ADN. Ces travaux sont prometteurs et plus d'études devront être menées dans ce sens afin de pleinement identifier les éléments responsables du meilleur pronostic des gliomes possédant la signature 1p/19q co-délété (Chai *et al.*, 2019).

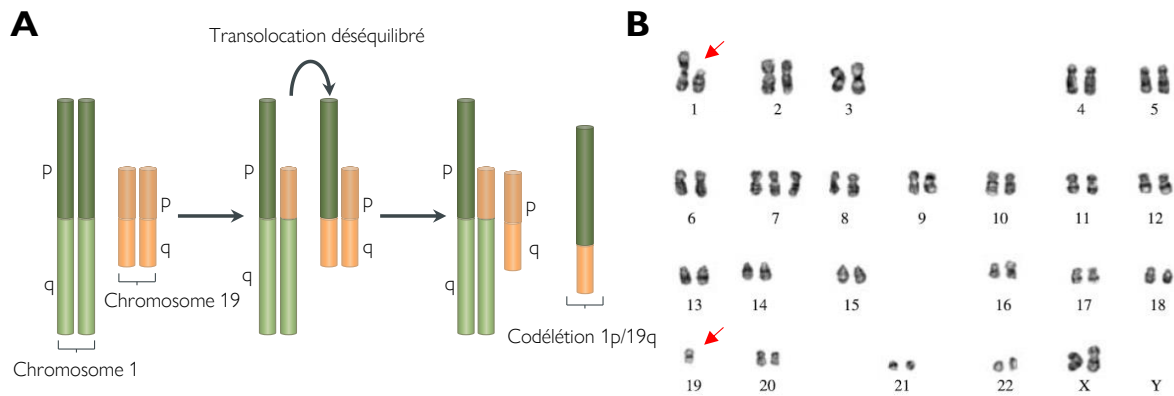


Figure 3 | Mécanisme à l'origine de la co-délétion 1p/19q. A. Représentation schématique du mécanisme impliquée dans la translocation 1p/19q. La co-délétion 1p/19q est issue de la translocation déséquilibrée entre les chromosomes 1 et 19 aboutissant à la perte d'un chromosome hybride composé du bras p du chromosome 1 et du bras q du chromosome 19. B. Caryotype d'une patiente porteuse de la codélétion 1p/19q. Le caryotype de cette patiente atteinte d'une codélétion 1p/19q montre une perte combinée des fragment chromosomiques 1p et 19q (flèche rouge) comme prédit par le modèle. (Modifié d'après Jenkins *et al.*, 2006).

La protéine ATRX tire son nom du syndrome auquel elle est associée, l' α -thalassémie, pathologie sanguine causée par une réduction de la production d'hémoglobine (Farashi et Hartevelde 2018). L'ATRX possède dans sa partie C-terminale un domaine ATPase/hélicase classant l'ATRX comme un membre de la famille de protéines de remodelage de la chromatine SNF2 (SWI/SNF2) (Picketts *et al.*, 1996 ; Tang *et al.*, 2004). La partie N-terminale de l'ATRX possède un domaine ATRX-DNMT3-DNMT3L ADD (DNMT : *DNA Methyltransferase* ; DNMT3L : *DNMT 3-like*), ce domaine tient son nom de son homologie avec des domaines *cystein-rich* similaires à ceux de DNMT3, une protéine impliquée dans la méthylation de l'ADN (Xie *et al.*, 1999 ; Argentaro *et al.*, 2007). L'ATRX intervient principalement dans le remaniement de la chromatine (Gibbons *et al.*, 2000). La déplétion d'ATRX induit des noyaux lobulés et des ponts nucléaires durant l'interphase accompagnés d'une faible prolifération dans des cellules HeLa (Ritchie *et al.*, 2008). Dans des cultures primaires de GBM murin l'inhibition de l'expression d'ATRX aboutit à une diminution de l'activité du système de réparation NHEJ (*nonhomologous end joining DNA repair*) potentialisant l'effet de chimiothérapies induisant des cassures double brin de l'ADN telles que la doxorubicine, l'irinotecan, le topotecan ainsi que des radiations (Koschmann *et al.*, 2016). De plus la déprivation d'ATRX dans des cellules de cancer colorectal HCT116 perturbe l'arrêt et le recommencement de la réplication lorsque les cellules sont soumises à des concentrations croissantes d'hydroxyurée (HU), suggérant

qu'ATRAX intervient dans une voie non canonique de protection du génome, permettant l'activation de *checkpoint* du cycle cellulaire (progression dans la phase S) (Leung *et al.*, 2013) lors de stress de la réplication. L'inactivation d'ATRAX dans les gliomes peut être d'origine multiple, à ce jour plus de 84 mutations à l'origine d'un décalage du cadre de lecture ou de mutations ponctuelles ont pu être recensées (Liu *et al.*, 2012 ; Jiao *et al.*, 2012). La détection des mutations ATRAX est souvent menée par immunohistochimie, *via* la recherche d'une perte de l'expression nucléaire d'ATRAX lorsque cette dernière est mutée (Reifenberger *et al.*, 2017). La mutation d'ATRAX est souvent corrélée à la mutation de TP53 et est considérée comme la signature du phénotype astrocytaire (Jiao *et al.*, 2012 ; Reuss *et al.*, 2015).

La mutation du promoteur de TERT (pTERT) est également un marqueur diagnostique central dans la nouvelle classification des gliomes (Louis *et al.*, 2016). Maintenir l'intégrité des télomères est un mécanisme central de la physiologie des cellules tumorales. L'une des stratégies mise en place par la cellule pour maintenir l'intégrité des télomères est d'augmenter l'expression de la *telomerase reverse transcriptase* (TERT). De façon intéressante les mutations de pTERT répertoriées dans les gliomes à savoir la mutation C250T et C228T, sont associées à une augmentation de la production d'ARNm codant TERT (Labussière *et al.*, 2014). Les mutations de pTERT sont retrouvées dans 2 groupes mutuellement exclusifs, les gliomes IDH_{mut} et 1p/19q co-déléte et IDH_{wt} 1p/19q intacts (Eckel-Passow *et al.*, 2015). De façon intéressante l'impact pronostique de la mutation de pTERT est diamétralement opposé si l'on considère les gliomes IDH_{mut} et IDH_{wt}. En effet lorsqu'elle est présente dans les gliomes IDH_{mut} la mutation de pTERT est associée à une amélioration de la survie globale (142,1 vs 74,4 mois) et la survie sans progression (108,4 vs 58 mois) des patients. En revanche son expression dans les gliomes IDH_{wt} est associée à une réduction de la survie globale (14,1 vs 36 mois) ainsi que la survie sans progression (7 vs 25,6 mois) (Chan *et al.*, 2015). La mutation de pTERT possède donc une valeur pronostique déterminante et permet de raffiner la stratification de la classification en permettant d'isoler des groupes de bon ou mauvais pronostic au sein des sous-catégories dépendantes des mutations IDH et de la co-délétion 1p/19q.

L'un des derniers critères principaux pris en compte dans la nouvelle classification des gliomes est un paramètre épigénétique correspondant à la méthylation du promoteur de la MGMT (pMGMT). La MGMT est une enzyme de réparation de l'ADN qui catalyse la de-alkylation en position O⁶ des guanines (Figure 4 | Réaction de déméthylation d'une guanine méthylée catalysée par la MGMT) (Tano *et al.*, 1990). Le TMZ couramment utilisé en clinique pour le traitement des GBM génère ce type alkylation en positions O⁶ et N⁷ des guanines.

L'hyperméthylation du promoteur de la MGMT réduit significativement son expression, aboutissant à une accumulation des perturbations des réparations de l'ADN causées par les agents alkylants à l'instar du TMZ (Friedman *et al.*, 1998; Esteller *et al.*, 2000). Le statut de méthylation de la MGMT est étudié par pyroséquençage, PCR méthylation spécifique ou par des approches plus intégrées comme celle proposée par Illumina® (*array-based-large-scale DNA methylation profiling*) (Bady *et al.*, 2012 ; Wick *et al.*, 2014).

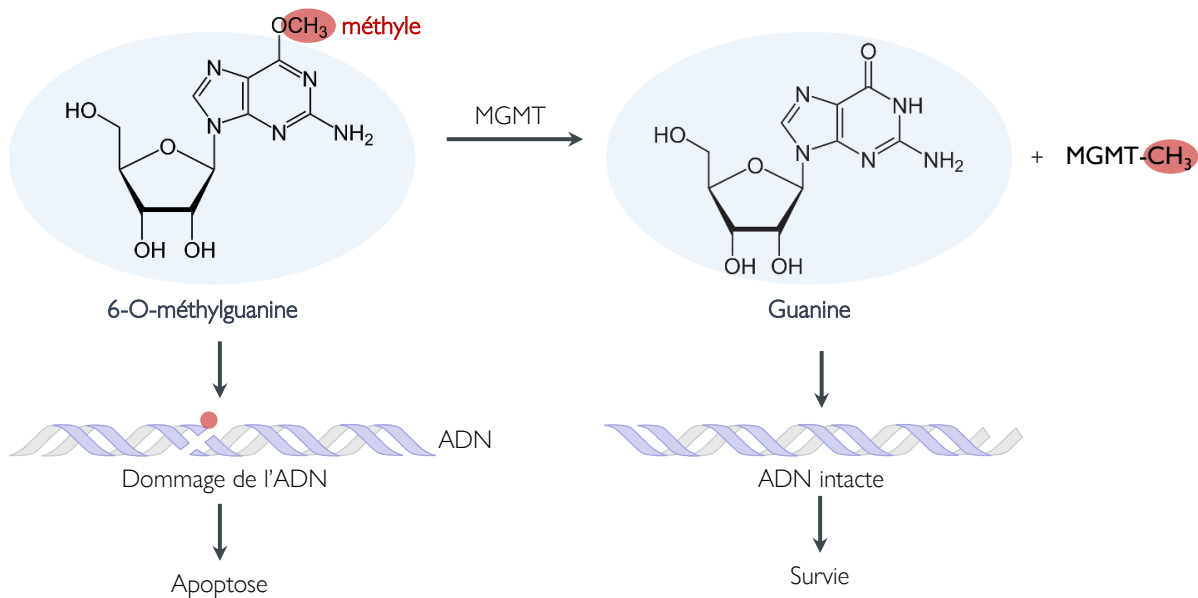


Figure 4 | Réaction de déméthylation d'une guanine méthylée catalysée par la MGMT. La MGMT est une enzyme de réparation de l'ADN qui retire les méthylation présentes sur les guanines. La MGMT transforme la 6-O-méthyleguanine en guanine en transférant le groupement méthyle sur une de ses cystéines.

L'hyperméthylation du pMGMT est fortement associée à une augmentation de la survie des patients porteurs de GBM ayant reçu une chimio/radiothérapie comparativement aux patients ne présentant pas cette hyperméthylation (Stupp *et al.*, 2005). En effet la médiane de survie des patients porteurs d'une hyperméthylation du promoteur de la MGMT est de 63 semaines contre 51 pour les patients possédant un statut de méthylation normal (Esteller *et al.*, 2000 ; Rivera *et al.*, 2010). L'étude de la méthylation du pMGMT chez les patients est donc un outil stratégique permettant de prédire la réponse des patients aux chimiothérapies.

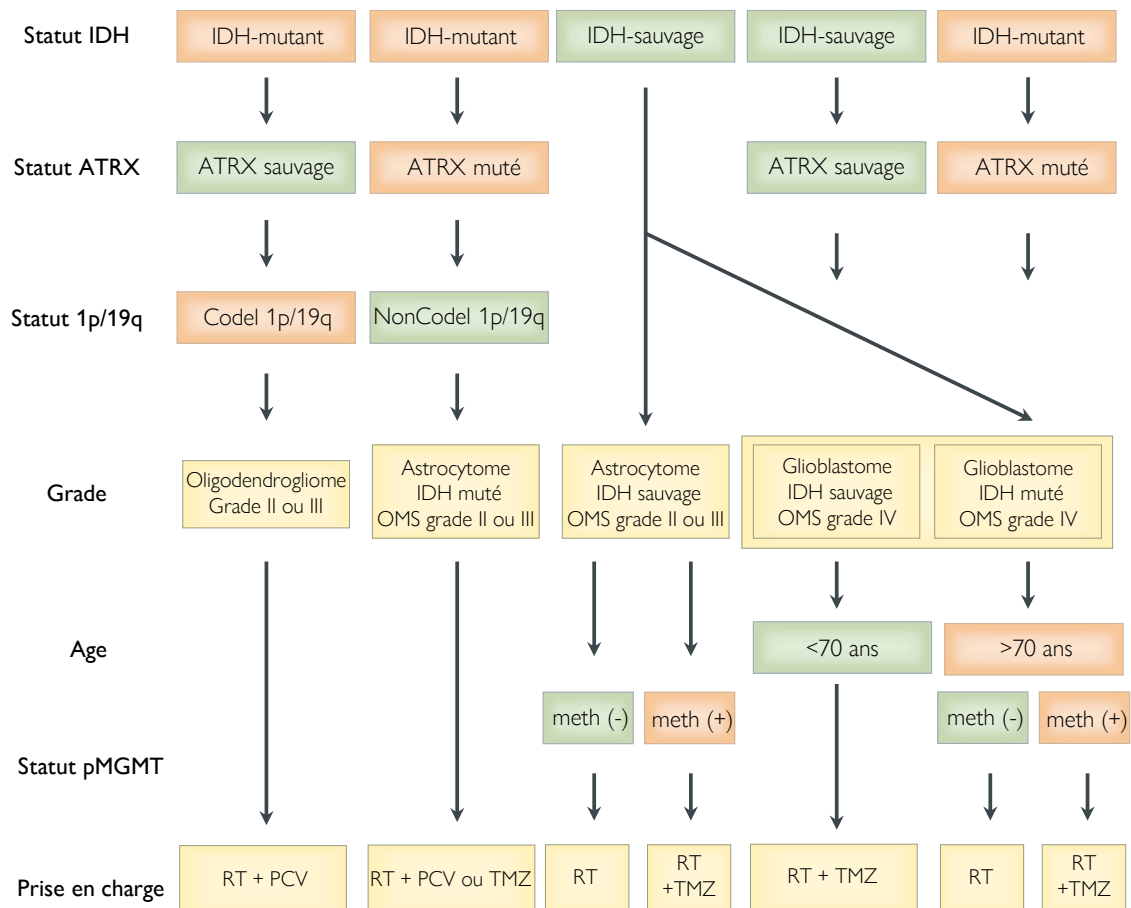


Figure 5 | Schéma de la stratégie de classification moléculaire des gliomes et les stratégies thérapeutiques associées. La nouvelle stratégie de diagnostic moléculaire des gliomes tenant compte des statuts mutationnels IDH et ATRX ainsi que de la co-délétion 1p/19q et du statut de méthylation du promoteur de la MGMT permet d'adapter le traitement post-chirurgical à administrer à chaque patient. Ainsi les patients porteurs d'un oligodendrogliome IDH_{mut} et 1p/19q codel sont traités par radiothérapie (RT) associée à la combinaison PCV (procarbazine, lomustine, vincristine). Les astrocytomes de grade II, IDH_{mut} sont également traités selon cette modalité. Les astrocytomes IDH_{mut} de grade III sont quant à eux plutôt traités par radio/chimiothérapie concomitante (RT+TMZ). Le choix de l'utilisation du TMZ pour le traitement des astrocytomes IDH_{wt} est conditionné par l'hyperméthylation du promoteur de la MGMT, ainsi les patients présentant un promoteur hyperméthylé sont traités par radio/chimiothérapie concomitante alors que leurs homologues sont uniquement traités par radiothérapie. Dans le cas des GBM l'âge du patient conditionne le choix de la stratégie à adopter, ainsi des patients dont l'âge est inférieur à 70 ans subiront inévitablement une radio/chimiothérapie concomitante, alors que les patients dont l'âge est supérieur à 70 ans seront traités par radio/chimiothérapie concomitante uniquement si le statut de méthylation du promoteur de la MGMT est élevé, sans quoi ces patients reçoivent uniquement un traitement par radiothérapie. (Modifié d'après Reifenberger *et al.*, 2017).

L'apport de ces nombreux critères moléculaires a permis de raffiner la classification des gliomes et permet d'apporter un diagnostic et un pronostic plus fins sur la survie des patients ainsi que sur les stratégies thérapeutiques à adopter (Figure 5 | Schéma de la stratégie de classification moléculaire des gliomes). Ainsi dans l'ensemble des cas et lorsque cela est possible la tumeur est résecuée et le choix des thérapies post-opératoires est défini par la

combinaison des statuts moléculaires. La co-délétion 1p/19q a notamment été associée à une bonne réponse des patients à la combinaison de chimiothérapies PCV (procarbazine, lomustine, vincristine), *de facto* les oligodendrogliomes de grade II et III sont traités par PCV après résection. Les astrocytomes diffus IDH_{mut} de grade II sont également traités selon cette modalité. Les astrocytome IDH_{wt} de grade III ainsi que les GBM de patients de plus de 70 ans, sont traités par radio/chimiothérapie combinées uniquement si le pMGMT est hyperméthylé, si ce n'est pas le cas seule la radiothérapie est choisie après résection. Les patients porteurs de GBM ayant moins de 70 ans sont traités par radio/chimiothérapie combinée indépendamment du statut du pMGMT (Reifenberger *et al.*, 2017).

1.11 | Les glioblastomes

Le GBM est la forme la plus agressive de gliome. Représentant le grade IV de la classification des gliomes, la médiane de survie après diagnostic des patients atteints de GBM est 14,6 mois (Bayat Mokhtari *et al.*, 2017) après traitements standardisés. L'incidence annuelle des GBM représente 2,53 femmes et 3,97 hommes par an pour 100 000 sujets (Koshy *et al.*, 2012 ; Ostrom *et al.*, 2014). Il existe deux grandes catégories de GBM, les GBM primaires qui représente la majorité des cas observés (~80%) et les GBM secondaires issus de la transformation en un stade supérieur de gliomes de plus bas grades pouvant être d'origine astrocytaire ou oligodendrogliale (GBMO).

Le traitement des GBM s'effectue selon une approche multidisciplinaire, la thérapie classiquement utilisée en clinique est appelée « Protocole de Stupp ». Il repose sur la résection chirurgicale de la tumeur la plus large possible, suivie d'une radiothérapie (RT) /chimiothérapie (TMZ) concomitante (Stupp *et al.*, 2005). La résection de la tumeur est souvent incomplète du fait de son caractère diffus et invasif et est à l'origine de récurrences en bordure de la zone de résection (Wilson *et al.*, 2014). Bien que ne permettant pas la guérison complète, ce protocole améliore significativement la survie des patients, en effet les patients ayant été traités par RT + TMZ présentent une médiane de survie de 14,6 mois contre 12,1 mois pour les patients uniquement traités par RT. Le groupe ayant reçu la thérapie combinée présente de plus une survie à 5 ans de l'ordre de 10% contre 2% pour le groupe RT seul, le TMZ apporte donc un réel bénéfice sur la survie des patients (Stupp *et al.*, 2009). L'efficacité de cette stratégie est cependant partielle, c'est pourquoi de nombreuses équipes ont cherché à compléter cette combinaison avec différents agents afin de potentialiser les effets des thérapies.

I.II.A | Sous-classification des glioblastomes

Sur un plan histologique, les GBM sont relativement homogènes et sont classiquement caractérisés d'un point de vue histologique par des zones hypoxiques, de prolifération microvasculaire et de nécrose (Louis *et al.*, 2007). Ces caractéristiques histopathologiques communes ne permettent pas de définir le statut clinique des patients, cependant certains facteurs moléculaires (mutations, niveaux d'expression, pertes chromosomiques) s'avèrent plus prédictifs en terme pronostic et de réponse aux traitements. Les travaux de Verhaak et collaborateurs menés à partir de la base de données américaine TCGA, a permis d'identifier 4 sous-catégories de GBM sur la base de critères moléculaires d'une cohorte de 206 patients. Ces 4 catégories générées sur la bases des niveaux d'expression (transcriptome) d'un panel de 40 gènes sont cliniquement pertinentes et permettent de discriminer les GBM : classiques, proneuraux, neuraux et mésenchymateux (Verhaak *et al.*, 2010). La classification de Verhaak repose elle-même sur la classification de Phillips élaborée en 2006 qui contient 3 groupes Proneural, Mésenchymateux et Prolifératif (Phillips *et al.*, 2006). Les 4 sous-groupes de GBM proposés par Verhaak semblent en réalité coexister au sein de la tumeur, en effet une étude menée plus tardivement réalisée sur la base de prélèvements de gliomes multifocaux lors de l'acte chirurgical et suivit d'analyses transcriptomiques a permis de mettre en évidence que sur 10 patients étudiés, 6 d'entre eux présentent au moins 2 sous-types différents de GBM (Sottoriva *et al.*, 2013).

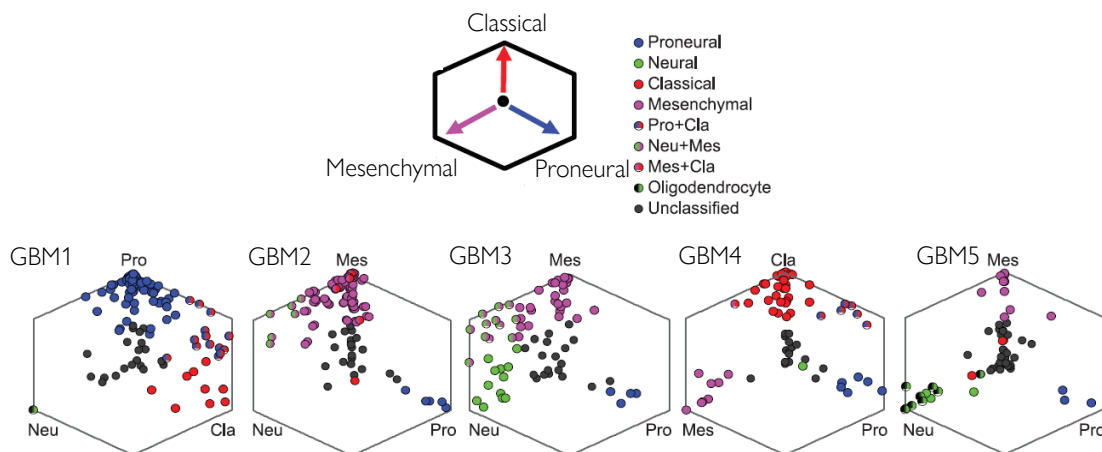


Figure 6 | Variation phénotypique intra-tumorale. Etude de la variation phénotypique intra-tumorale, réalisée par single cell RNA-sequencing sur un panel de cellules provenant de la même tumeur. Chaque radar correspond à une tumeur (GBM 1 à 5) et chaque point individuel au phénotype unitaire d'une cellule provenant de cette dernière. Ces résultats montrent clairement que chaque tumeur est composée de plusieurs composants cellulaires pouvant être très éloignés les uns des autres. Cependant l'aspect graduel du changement de phénotype renforce l'idée que l'acquisition d'un phénotype s'effectue graduellement en fonction des altérations transmises aux cellules filles après division ainsi qu'aux variations locales et progressives du micro-environnement. (Modifié d'après Patel *et al.*, 2014).

Une autre étude menée sur la caractérisation des sous-types par *single cell RNA-seq* confirme ces observations et montre que chaque tumeur possède une distribution cellulaire hétérogène composée d'un gradient phénotypique liant chaque sous-type (Figure 6 | Variation phénotypique intra-tumorale. Etude de la variation phénotypique intra-tumorale, réalisée par single cell RNA-sequencing sur un panel de cellules provenant de la même tumeur) (Patel *et al.*, 2014).

Les GBM classiques sont caractérisés par une amplification du chromosome 7 associé à une perte du chromosome 10 dans 100% des cas, ainsi qu'à une amplification du gène de l'*Epidermal Growth Factor receptor* (EGFR) (Olar et Aldape 2014). Environ la moitié des GBM porteurs d'une amplification de l'EGFR sont porteurs d'un réarrangement génomique issu de la délétion des exons 2 à 7 du gène EGFR, qui codent un segment clé du domaine extracellulaire du récepteur, aboutissant à l'expression d'un variant constitutivement actif du récepteur, l'EGFR variant III (EGFRvIII) (Humphrey *et al.*, 1990; Yamazaki *et al.*, 1990; Sugawa *et al.*, 1990). Le nouvel épitope extracellulaire généré par la fusion des exons 1-8 peut servir de cible pour certaines stratégies d'immunothérapie. Ainsi le Rindopepimut (CDX-110) est un peptide de 14 acides aminés correspondant à la séquence de la zone de fusion du variant EGFRvIII qui permet lorsqu'il est injecté chez la souris, le lapin, la chèvre et le singe de générer des anticorps reconnaissant spécifiquement le variant EGFRvIII (Wikstrand *et al.*, 1993 ; Chistiakov, Chekhonin, et Chekhonin 2017). Un anticorps monoclonal, le mAb806, généré grâce à l'injection de fibroblastes exprimant l'EGFRvIII chez des souris, réduit significativement la croissance de cellules de gliomes xénogreffées chez la souris (Luwor *et al.*, 2001; Mishima *et al.*, 2001). Chez l'Homme, le mAb806 est capable de traverser la BHE et s'accumule spécifiquement dans le tissu tumoral de GBM, il est de plus actuellement testé en phase I en combinaison avec le TMZ et/ou la radiothérapie (NCT01800695) (Scott *et al.*, 2007). La délétion localisée de la portion 9p21.3 est également caractéristique des GBM classiques et survient en même temps que l'amplification de l'EGFR dans 94% des cas (Verhaak *et al.*, 2010). Le chromosome 9p21.3 porte la séquence de l'inhibiteur de kinase dépendante des cyclines (CDK) 2A (CDKN2A). Les GBM classiques sont également associés à une surexpression de NES (*neural precursor and stem cell marker*) ainsi que Notch et Sonic hedgehog (Verhaak *et al.*, 2010). Ces acteurs moléculaires sont connus pour promouvoir la prolifération ainsi que l'autorenouvellement cellulaire *via* le maintien du statut souche, un

mécanisme impliqué dans la résistance aux agents antinéoplasiques utilisés en clinique tel que le TMZ (Lino *et al.*, 2010; Santoni *et al.*, 2013).

Le sous-type proneural de GBM est caractérisé par la réexpression de gènes développementaux tel que DCX (doublecortine), SOX (Sry-type HMG box), DLL3 (*Delta Like Canonical Notch Ligand 3*), ASCL1 (*Achaete-Scute Family BHLH Transcription Factor 1*) et TCF4 (*Transcription Factor 4*), des facteurs exprimés lors du développement cérébral, impliqués dans l'ontogenèse du SNC et la différenciation des précurseurs neuraux (Phillips *et al.*, 2006). Deux caractéristiques clés associées au sous-type proneural sont l'amplification du gène codant le *platelet-derived growth factor receptor-alpha* (PDGFRA) et la présence de la mutation IDH. Il faut préciser que l'amplification focale du locus 4q12 porteur du gène du PDGFRA est retrouvée dans l'ensemble des sous-types de GBM, cependant sa fréquence est plus élevée dans les GBM proneuraux (Verhaak *et al.*, 2010). La forte présence de mutation IDH dans cette catégorie de GBM suggère que les GBM proneuraux sont des GBM secondaires issus de la transformation de gliomes de plus bas grades. En accord avec ces observations il a été montré que les GBM proneuraux possèdent une forte expression d'un marqueur de développement de cellules oligodendrogiales, le gène OLIG2 (Oligodendrocyte Transcription Factor 2), caractéristique des gliomes de bas grade (Noble *et al.*, 2004 ; Verhaak *et al.*, 2010).

Le sous-type neural est associé à la forte expression de marqueurs neuraux tels que NEFL (*Neurofilament Light*), SYT1 (*Synaptotagmin 1*), GABRA1 (*Gamma-Aminobutyric Acid Type A Receptor Alpha1 Subunit*) et SLC12A5 (*Solute Carrier Family 12 Member 5*) accompagné d'une amplification de l'EGFR. L'analyse des réseaux ontologiques rattachés à ces gènes fait ressortir des réseaux associés aux projections neuronales et à la transmission synaptique axonale (Verhaak *et al.*, 2010).

Le type mésenchymateux est caractérisé par une délétion focale du locus 17q11.2 codant NF1 ainsi que des mutations de PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) et TP53 accompagnées d'une activation des gènes de la super famille du TNF (*tumor necrosis factor*), les gènes TRADD (*TNFRSF1A Associated Via Death Domain*), RELB (*RELB Proto-Oncogene, NF-KB Subunit*) et TNFRSF1A (*TNF Receptor Superfamily Member 1A*) ainsi que de NF- κ B (*Nuclear Factor Kappa B*). La surexpression de ces gènes est la conséquence du micro-environnement hypoxique et nécrotique caractéristique des GBM, et est également le signe d'infiltrats inflammatoires associés à une perturbation de la perméabilité de la BHE induite par l'hypoxie (Verhaak *et al.*, 2010 ; Zhao *et al.*, 2018). Ces GBM expriment un panel de gènes caractéristiques de leur signature mésenchymateuse tel que CHI3L1 (*Chitinase 3 Like*

1) qui est notamment exprimé lors du remodelage tissulaire durant l'acquisition du phénotype mésenchymateux nécessaire à la restructuration tissulaire consécutive d'une lésion. D'autres marqueurs mésenchymateux tels que cMET (*Proto-Oncogene, Receptor Tyrosine Kinase*) est reconnue comme un puissant récepteur chemoattracteur potentialisant l'invasion du parenchyme sain par les cellules de GBM et CD44 impliquée dans la liaison à l'acide hyaluronique (HA) (*CD44 antigen*) sont exprimés. Cette signature moléculaire suggère que les GBM du sous-groupe mésenchymateux présentent des indices de transition mésenchymateuse (Phillips *et al.*, 2006 ; Eckerich *et al.*, 2007 ; Verhaak *et al.*, 2010). L'acquisition du phénotype mésenchymateux dans les gliomes est sous la dépendance de 5 facteurs de transcriptions clés : C/EBP β (*CCAAT Enhancer Binding Protein Beta*), STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*), bHLH-B2 (*Basic helix-loop-helix transcription factors*), FOLS2 (*FOS Like 2*) et RUNX1 (*RUNX Family Transcription Factor 1*), qui potentialisent l'expression des gènes de la signature mésenchymateuse tel que les métalloprotéases MMP-9 (*Matrix Metalloproteinase 9*) et MMP-14 (*Matrix Metalloproteinase 14*), les protéines d'adhésion CD44 et les intégrines alpha 7 et 5 ainsi que des protéines associées au cytosquelette tel que l'actinine et la Filamin A (FlnA) (Carro *et al.*, 2010).

Il existe ainsi quatre sous catégories de GBM coexistant au sein de la tumeur en fonction du micro-environnement dans lequel les cellules progressent, impliquant des cellules non-tumorales et les facteurs moléculaires stimulant la tumeur, ainsi que les conditions physicochimiques.

I.II.B | **Micro-environnement tumoral**

Le terme micro-environnement tumoral fait référence aux cellules et aux conditions physicochimiques ainsi qu'aux autres composantes (matrice) interagissant avec la tumeur. Du fait de leur développement au sein du SNC, on considère que les GBM ont conservé leur phénotype neurobiologique, ils évoluent de plus dans une niche préférentielle protégée par la BHE. Les GBM sont des tumeurs ambivalentes présentant des régions très vascularisées et des régions hypoxiques et nécrotiques, ainsi que des régions hautement invasives en périphérie tumorale à la bordure du tissu cérébral sain sans évoquer les cellules gliomales disséminées dans le parenchyme cérébral.

I.II.B.1 | La niche périvasculaire

Les GBM font partie des tumeurs les plus vascularisées caractérisées par une forte angiogenèse et des systèmes vasculaires anormaux composés de structures vasculaires glomérulées dans lesquelles les cellules endothéliales et péricytes sont peu organisés. Ces systèmes vasculaires anormaux sont également composés de vaisseaux hyperdilatés et fuyant accompagnés d'une perte de la perméabilité de la BHE (Wesseling *et al.*, 1997). La présence des cellules tumorales au contact direct de ces vaisseaux néoformés, et plus particulièrement au contact des péricytes déclenche la dissociation des péricytes de l'unité vasculaire. Ce phénomène est la résultante de la sécrétion accrue par les cellules de GBM de cathepsines qui dégradent la membrane basale ce qui a pour conséquence de libérer les péricytes de leur liaison aux cellules endothéliales, générant ainsi des pertes ponctuelles de perméabilité à l'origine de micro-hémorragies (Dvorak 2015). L'absence d'inhibition par les péricytes potentialise la prolifération des cellules endothéliales à l'origine de structures vasculaires glomérulées irrégulières et chaotiques non-fonctionnelles, incapables d'acheminer sang et nutriments à la tumeur (Schiffer *et al.*, 2018). Cette angiogenèse est exacerbée par la sécrétion en grande quantité par les cellules tumorales de facteurs angiogéniques tel que le VEGF (*vascular endothelial growth factor*), le PDGF (*platelet-derived growth factor*) et le FGF (*fibroblast growth factor*), d'IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*) ainsi que d'angiopoïétines et d'interleukines (Calabrese *et al.*, 2007). Les astrocytes réactifs sécrètent également de l'angiopoïétine-1 et 2 (Ang-1 & Ang-2) ainsi que du VEGF et sont par conséquent aussi responsables de la potentialisation de l'angiogenèse tumorale (Holash *et al.*, 1999 ; Westphal et Lamszus 2011 ; Hardee et Zagzag 2012). Il est proposé que la néovascularisation anormale des GBM s'effectue selon 2 mécanismes distincts, le premier repose sur l'angiogenèse issue de la prolifération de progéniteurs endothéliaux, de péricytes ainsi que de cellules issues de la moelle osseuse qui colonisent la tumeur afin de former un système vasculaire (Wesseling *et al.*, 1997; Bergers 2009). L'angiogenèse s'initie par le bourgeonnement de structures vasculaires déjà en place sous l'action de gradients de facteurs proangiogéniques tel que le VEGF, et les cellules endothéliales ainsi stimulées changent de phénotype, la première cellule du bourgeon au sommet de la colonne acquiert un phénotype de *tip cell* présentant une forte motilité associée à l'émission de nombreuses protrusions membranaires lui permettant de percevoir le gradient de VEGF. La migration dirigée de *la tip cell* est accompagnée par la migration collective de cellules dites « *stalker* » (Walti *et al.*, 2013). La fin de la maturation du vaisseau néoformé se termine par le recrutement de péricytes *via* la sécrétion de PDGF-B et de TGF- β (*Transforming*

growth factor beta) par les cellules endothéliales, les péricytes ainsi recrutés répriment la prolifération et la migration de ces dernières et stabilisent la structure du vaisseau ainsi mature (Murakami 2012).

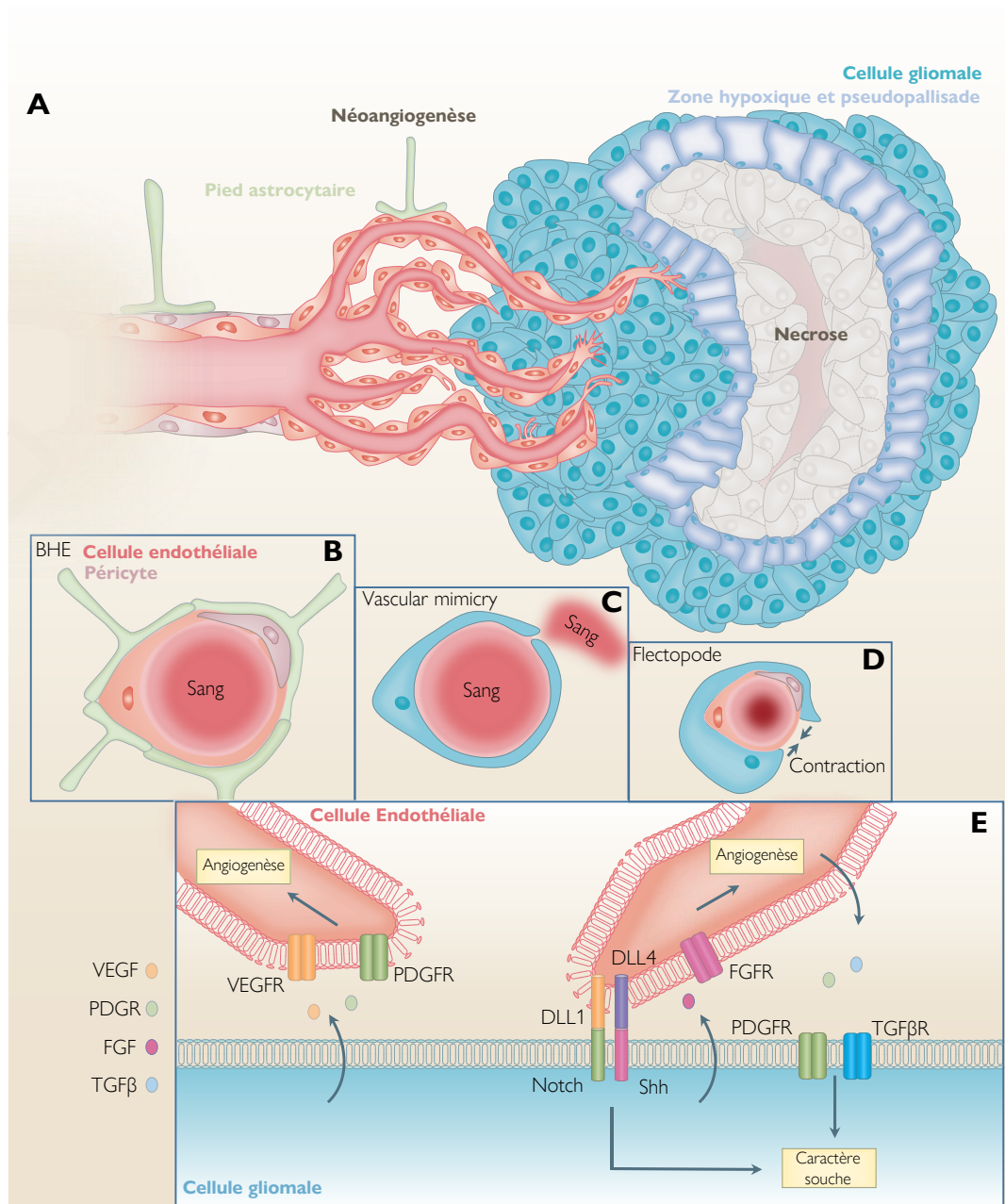


Figure 7 | Interaction niche vasculaire-cellules de gliome. **A.** Organisation caractéristique des cellules au sein d'un GBM, la masse de la tumeur contient en son centre une zone nécrotique cernée d'une zone hypoxique composée de cellules organisées en pseudopallisade. La tumeur libère des facteurs proangiogéniques stimulant la néoangiogenèse tumorale. **B.** Organisation de la barrière hématoencéphalique (BHE) : la BHE est composée de cellules endothéliales formant des jonctions serrées apportant l'étanchéité du vaisseau. Les péricytes et les pieds astrocytaires viennent épouser le pourtour du capillaire augmentant son imperméabilité. **C.** Les cellules souches gliomales peuvent former des structures tubulaires pouvant acheminer le sang jusqu'à la tumeur. **D.** Les cellules de GBM peuvent émettre des prolongements membranaires appelés flectopode capables de contracter les capillaires. **E.** Les cellules de GBM stimulent la néoangiogenèse en libérant du VEGF, PDGF et du FGF, réciproquement les cellules endothéliales maintiennent le caractère souche des cellules de GBM en activant les voies Notch Shh et *via* la sécrétion de TGFβ et de PDGF.

Le second mécanisme fait intervenir les cellules souches cancéreuses (CSCs) qui pourraient participer de manière active à la formation de réseaux vasculaires *via* un mécanisme de transdifférenciation en « cellule endothéliale » ou en péricyte, aboutissant à la formation de structures tubulaires dépourvues de marquage CD34 mais exprimant des marqueurs vasculaires tel que la laminine, la neuropiline-2 ou encore EphA2 (*EPH Receptor A2*) (El Hallani *et al.*, 2010 ; Wang *et al.*, 2010 ; Ricci-Vitiani *et al.*, 2010). Les réseaux *vascular mimicry* sont très riches en matrice extracellulaire (MEC) y compris en élément de la membrane basale tel que la laminine et le collagène IV et réagissent de plus très fortement au marquage PAS (*Periodic Acid Schiff*), un phénomène actuellement considéré comme la preuve de l'existence de *vascular mimicry* dans les tumeurs hyper vascularisées (Folberg et Maniotis 2004 ; Seftor *et al.*, 2001). Les cellules gliomales sont également capables de modifier les propriétés du réseau vasculaire, en interagissant avec les péricytes. Les cellules de GBM émettent *in vivo* des protrusions membranaires dépendantes de la Rho-GTPase Cdc-42 et de l'actine, appelées flectopode capables d'interagir avec les péricytes et de perturber leur contraction. Par ailleurs, des formes hybrides probablement issues de la fusion de péricytes et de cellules de GBM sont de plus détectées sur des vaisseaux anormalement contractés, suggérant l'existence d'un mécanisme d'auto promotion de l'hypoxie par la tumeur elle-même (Caspani *et al.*, 2014).

Il existe une relation étroite entre la niche périvasculaire et les CSCs, en effet les CSCs sont souvent retrouvées en contact direct des cellules endothéliales (Calabrese *et al.*, 2007; Caspani *et al.*, 2014; Seidel *et al.*, 2010). Les cellules endothéliales favorisent la survie des CSCs *via* la sécrétion de TGF β ou de PDGF qui stimulent l'expression de gènes caractéristiques du caractère souche tel que SOX2 ou CD133 (Yan *et al.*, 2014). De plus l'interaction directe entre CSCs et cellules endothéliales permet d'activer la voie Notch *via* DLL1 (*Delta like ligand 1*), et la voie Shh (Sonic Hedgehog) *via* DLL4 (*Delta like ligand 4*) et Jagged-1 (J1) (Zhu *et al.*, 2011 ; Zhao *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2016). Réciproquement les CSCs stimulent l'angiogenèse en sécrétant du VEGF. Les fortes concentrations locales de VEGF ont cependant des effets délétères sur l'intégrité du réseau vasculaire, en effet le VEGF induit le détachement des péricytes augmentant ainsi la perméabilité de la BHE, et pouvant même être à l'origine de micro-hémorragies à proximité d'hyperplasie vasculaire (Figure 7 | Interaction de la niche vasculaire et des cellules de gliomes) (Yao *et al.*, 2008 ; Dvorak 2015).

I.II.B.2 | La niche hypoxique

Les zones hypoxiques constituent un critère anatomocytopathologique caractéristique des GBM (Louis *et al.*, 2007). Physiologiquement les conditions normoxiques sont définies par des pressions partielles d'O₂, quantité d'oxygène véhiculée par le sang artériel jusqu'aux organes (PaO₂). En condition physiologique la PaO₂ est comprise entre 12.0 et 14.7 kPa (Erecińska et Silver 2001). Une étude de 2002 a permis de mettre en évidence que la PaO₂ était plus faible au cœur de la tumeur (1,2 kPa) qu'en périphérie (2,26 kPa), et bien que réduite cette tendance est conservée durant le sommeil (0,93 kPa vs 1,73 kPa) (Beppu *et al.*, 2002). L'apparition de régions hypoxiques dans les GBM se fait de manière séquentielle, en effet lors de la première étape de croissance l'apport en oxygène de la tumeur est supporté par les structures vasculaires déjà en place jusqu'à l'atteinte d'une masse tumorale comprise entre 1 et 2 mm³ (Jensen 2009 ; Yang *et al.* 2012).

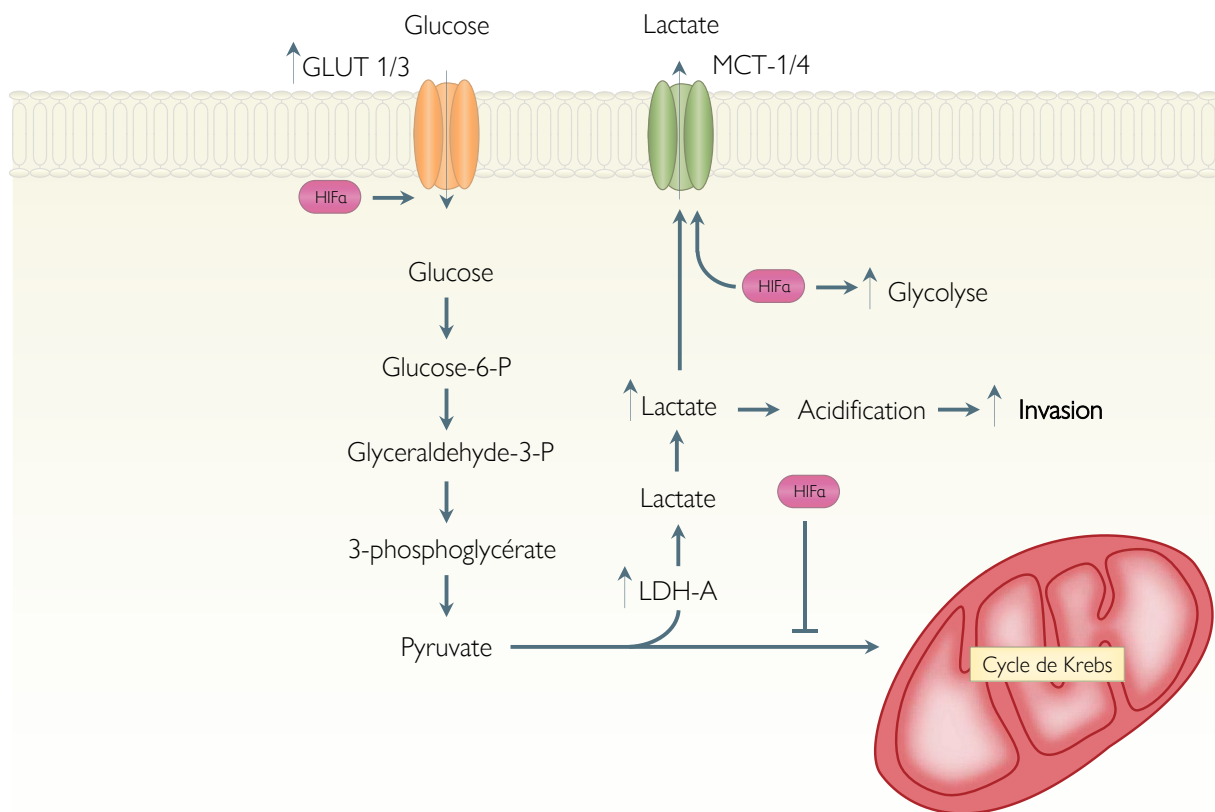


Figure 8 | Switch métabolique de la consommation de glucose dans les GBM. Les conditions hypoxiques sont à l'origine d'un switch métabolique connu sous le nom d'effet Warburg. HIF-1 α stimule plus particulièrement l'expression des transporteurs du glucose GLUT1 et 3 ainsi que l'expression de la lactate déshydrogénase (LDH-A) qui augmente la transformation du pyruvate en lactate, prévenant son entrée dans le cycle de Krebs. Le transport de lactate par les transporteurs MCT-1/4 stimule l'acidification du milieu potentialisant de fait l'invasion induite par l'acidification. MCT-1/4 ; *Monocarboxylate transporter 1 & 4* (Modifié d'après Colwell *et al.*, 2017).

La prolifération exacerbée des cellules de la masse tumorale conduit la tumeur à croître au-delà de ce volume critique, aboutissant à l'apparition de régions hypoxiques. Il est admis qu'une cellule présente à une distance de l'ordre de 100 μm du vaisseau le plus proche se trouve dans des conditions de stress oxygénique assimilé à de l'hypoxie, associée à une activation des facteurs de transcription HIF (Helmlinger *et al.*, 1997 ; Zagzag *et al.*, 2000 ; Bai *et al.*, 2011). Les zones hypoxiques périnécrotiques sont caractérisées par des régions de forte densité cellulaire formant des pseudopalissades en périphérie de zones nécrotiques. Ces régions de fortes densités cellulaires ne résultent pas d'une prolifération accrue mais s'expliquent par des cellules qui migrent pour s'éloigner du foyer hypoxique (Brat *et al.*, 2004). L'existence de ces régions fortement hypoxique malgré une angiogenèse accrue réside dans le fait que bien qu'exacerbée, l'angiogenèse tumorale est imparfaite, composée de vaisseaux tortueux et incomplets alors que le système vasculaire tumoral est souvent le siège d'événements vaso-occlusifs et de thromboses diminuant l'apport en oxygène et en nutriments (Jain 2013). Cette angiogenèse est en partie due à une perturbation de l'équilibre entre facteurs pro- et anti-angiogéniques : en condition physiologique des acteurs moléculaires tels que les thrombospondines et le sVEGFR1 (*soluble VEGFR*) répriment les effets du VEGF permettant un phénomène d'angiogenèse contrôlée et normalisée (Carmeliet et Jain 2000 ; Jain 2003), un équilibre rompu dans la tumeur.

L'hypoxie est la cause principale de la radiorésistance chez les patients, en effet la radiothérapie requière une PaO_2 minimum dans le tissu afin de générer des espèces réactives de l'oxygène (ROS) responsables des dommages à l'ADN à l'origine de la toxicité induite par la radiothérapie (Sheehan *et al.*, 2010). Les conditions hypoxiques sont à l'origine de la stabilisation de l'expression des facteurs de transcriptions HIF-1 α et -2 α . En effet, ces 2 facteurs de transcription sont constitutivement dégradés en condition normoxique. Les PHD hydroxylent les HIFs en transférant le groupement OH d'une molécule d' α -cétoglutarate sur les HIFs, lequel est ensuite reconnu par l'ubiquitine ligase von Hippel Lindau (VHL) déclenchant de fait la dégradation des HIFs par le protéasome 26S (Epstein *et al.*, 2001). Dans un second temps les facteurs HIFs stimulent l'expression de facteurs proangiogéniques tels que les couples PDGF/PDGFR VEGFA/VEGFR ainsi que d'Ang et le TGF- β en se fixant à des séquences dites *Hypoxia Respons Element* (HRE) (Gordan *et al.*, 2007 ; Yang *et al.*, 2012). CAIX est également surexprimée en condition hypoxique et de façon intéressante son expression dans le SNC est restreinte aux régions hypoxiques, faisant de CAIX un marqueur de choix pour la caractérisation de zones en stress oxygénique (Ivanov *et al.*, 2001; Proescholdt *et al.*, 2005).

Fonctionnellement, CAIX catalyse la réaction $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ via son domaine catalytique exprimé sur le versant extracellulaire (Lal *et al.*, 2001). Ainsi la CAIX convertit le CO_2 produit par les cellules tumorales en proton et en bicarbonate, ce qui a pour conséquence de générer des efflux de protons conduisant à une potentialisation de la migration par l'acidification du milieu (Shin *et al.*, 2011). Simultanément, les transporteurs d'ions HCO_3^- font rentrer les ions bicarbonates dans la cellule potentialisant également les effets de l'acidification du milieu sur les capacités invasives des cellules tumorales (Chiche *et al.*, 2009 ; Swietach *et al.*, 2010;). La réabsorption des ions HCO_3^- favorise également la croissance tumorale hypoxique en protégeant les cellules de l'acidose (Chiche *et al.*, 2009).

A l'instar de la niche vasculaire, la niche hypoxique joue un rôle important dans le maintien et l'auto-renouvellement des CSCs (Park et Rich 2009 ; Soeda *et al.*, 2009). L'expression de HIF-2 α favorise le maintien à l'état souche des CSCs en stimulant l'expression de gènes impliqués dans le maintien du statut pluripotent tel que Klf-4 (*Kruppel-like factor -4*), SOX2 ou Oct-4 (*Octamer-binding transcription factor 4*) (Covello *et al.*, 2006 ; Seidel *et al.*, 2010 ; Moreno-Manzano *et al.*, 2010). La stabilisation de HIF-1 α par l'hypoxie stimule de façon subséquente l'expression du récepteur c-MET ou HGFR (*Hepatocyte Growth Factor Receptor*) qui lui-même contribue fortement à la migration des cellules de GBM lorsqu'elles sont soumises à un gradient d'HGF (*Hepatocyte growth factor*) (Eckerich *et al.*, 2007). De même l'hypoxie stimule l'expression des récepteurs chimiokine CXCR4 (*C-X-C Receptor 4*) et CXCR7 (*C-X-C Receptor 7*) via l'activité d'HIF-1 α (Zagzag *et al.*, 2006 ; Esencay *et al.*, 2013), ainsi les cellules en hypoxie migrent le long de gradient de SDF-1 α sécrété par les structures vasculaires avoisinantes (Sciumè *et al.*, 2010).

L'hypoxie est également à l'origine de profonds changements métaboliques dans les cellules tumorales. En hypoxie, les cellules tumorales métabolisent préférentiellement le pyruvate en lactate sans qu'il ne participe au cycle de Krebs (Walenta *et al.*, 2004-1; Stefan Walenta *et al.*, 2004-2). Ce phénomène est plus communément appelé Effet Warburg (Koppenol *et al.*, 2011). En effet HIF-1 α stimule la synthèse de 9 des 10 enzymes impliquées dans la glycolyse ainsi que certains des transporteurs du glucose (GLUT) (Semenza 2003 ; Macheda *et al.*, 2005 ; Levine et Puzio-Kuter 2010). Plus précisément HIF-1 α stimule la synthèse de la phosphofructokinase 1 (PFK1), de l'aldolase A (ALDOA), de l'hexokinase 2 (HK2) et de la lactate déshydrogénase (LDHA) ainsi que celle des transporteurs GLUT1 et GLUT3 (Semenza 2010). L'augmentation de l'expression de ces protéines diminue l'utilisation du cycle de l'acide citrique en faveur de la glycolyse et de la production de lactate (Levine et Puzio-Kuter 2010).

Le lactate ainsi produit est transporté à l'extérieur de la cellule par les transporteurs MCT1/4 (*Monocarboxylate Transporter 1 & 4*) et participe à l'acidification du milieu extracellulaire dans les régions hypoxiques (Ullah *et al.*, 2006). Les niveaux d'expression de l'aldéhyde dehydrogenase-1A3 (ALDH-1A3) (une isoenzyme d'ALDH-1 intervenant dans la glycolyse et la neoglucogénèse) sont stimulés par le facteur de transcription FoxD1 (*Forkhead Box D1*) et sont particulièrement surexprimés dans les GBM mésenchymateux (Mao *et al.*, 2013 ; Cheng *et al.*, 2016). L'inhibition de l'activité d'ALDH-1 par le diéthylaminobenzaldéhyde (DEAB) réduit la prolifération de GBM mésenchymateux *in vitro* et *in vivo*, et l'inhibition de l'effet Warburg *in vitro* par le bleu de méthylène (BM) réduit significativement la prolifération de cellules U87. Ceci confirme que l'apport énergétique des GBM repose majoritairement sur l'exploitation de la glycolyse au détriment du cycle de Krebs (Figure 8 | Switch métabolique de la consommation de glucose dans les GBM) (Poteet *et al.*, 2013 ; Cheng *et al.* 2016).

L'hypoxie joue un rôle central dans la transition mésenchymateuse (TM) des GBM notamment *via* la stimulation de l'expression par HIFs, de facteurs de transcription impliqués classiquement dans l'EMT (*epithelial to mesenchymal transition*) tel que TWIST1 (Yang *et al.*, 2008), ZEB1 (Joseph *et al.*, 2015), SNAIL (Imai *et al.*, 2003) et SLUG (Xie *et al.*, 2012) ainsi que des *master genes* C/EBP β et STAT3 décrits initialement par Carro et collaborateurs comme de puissants initiateurs de la TM, contrôlant de manière hiérarchique l'expression de facteurs de transcription secondaires impliqués dans la TM des GBM (Carro *et al.*, 2010; Cooper *et al.*, 2012).

I.II.C | La niche invasive et transition mésenchymateuse

I.II.C.1 | La transition mésenchymateuse

L'acquisition de caractères mésenchymateux *via* la TM constitue l'un des piliers de la malignité des cancers en général et des GBM en particulier. Comme précisé à la fin du chapitre précédent, la TM repose sur l'expression de facteurs qui vont orienter le phénotype de la cellule vers un statut mésenchymateux associé à une augmentation des capacités migratoires de la cellule. Sur un plan moléculaire l'EMT se caractérise par une diminution de l'expression de marqueurs épithéliaux tels que la cytokératine, l'E-cadhérine ainsi que des protéines impliquées dans les jonctions cellule-cellule claudine et occludine. Concomitamment la cellule surexprime des marqueurs mésenchymateux à l'origine de son phénotype tel que la N-cadhérine, la vimentine et la fibronectine (Thiery 2002 ; Lee *et al.* 2006 ; Tsuji *et al.*, 2009 Lindsey et Langhans 2014). Ce changement phénotypique est à l'origine de la perte de polarisation de la

cellule au sein de l'épithélium ainsi que de son détachement de la structure d'origine. Les cellules de GBM n'effectuent pas fondamentalement une transition dite EMT, mais plutôt de type *glial-to-mesenchymal transition* ou GMT ou *EMT-like process* ou bien encore TM (Mahabir *et al.*, 2014). De façon intéressante, bien qu'étant d'origine neuroépithéliale, une réduction de l'expression des claudines 1 & 5 est corrélée au grade des gliomes (Karnati *et al.*, 2014). Le caractère diffus de certains gliomes et des GBM associé à l'invasion du parenchyme cérébral et la présence de cellules invasives résiduelles en bordure de cavité de résection, est en grande partie à l'origine des nombreux échecs thérapeutiques constatés en clinique à ce jour.

Parmi les facteurs impliqués dans l'EMT, un certain nombre sont également impliqués dans la MT des gliomes. L'expression du facteur de transcription TWIST1 est plus élevée dans les GBM mésenchymateux que dans les GBM proneuraux (Nordfors *et al.*, 2015). Dans des modèles précliniques, la surexpression de TWIST1 dans la lignée de GBM SF767 potentialise ses propriétés migratoires (Elias *et al.*, 2005). *In vivo*, la surexpression de TWIST1 dans les lignées de GBM SNB19 et T98G conduit à des phénotypes tumoraux significativement plus invasifs associés notamment à la surexpression des facteurs SNAI2 (*Snail Family Transcriptional Repressor 2*) qui potentialise lui aussi l'acquisition du phénotype mésenchymateux ainsi que de MMP-2 (*Matrix Metalloproteinase 2*), HGF, FAP α (*Fibroblast Activation Protein Alpha*) et NF1 (Mikheeva *et al.*, 2010). Plus largement, l'analyse ontologique des gènes dont l'expression est modifiée par la surexpression de TWIST1 fait notamment ressortir des voies associées à l'adhésion, à la MEC, à la motilité cellulaire et à la locomotion ainsi qu'à la migration et à la réorganisation du cytosquelette d'actine (Mikheeva *et al.*, 2010). De façon intéressante, l'effet de TWIST1 sur la TM ne semble pas relayé par la voie canonique de switch des cadhérines (E>N) classiquement constatée dans les carcinomes (Mikheeva *et al.*, 2010).

La protéine ZEB1 est un répresseur de la transcription principalement impliquée dans la TM des GBM *via* son effet répresseur sur la production des micro-ARN de la famille miR-200 qui sont des puissants activateurs de la différenciation épithéliale (Wellner *et al.*, 2009; Siebzehnrubl *et al.*, 2013). L'analyse du TCGA a montré que l'expression de ZEB1 était associée à une survie réduite des patients (Siebzehnrubl *et al.*, 2013). ZEB1 est plus particulièrement exprimé sur les fronts invasifs et dans les zones pseudopalisadiques des GBM qui sont constitués de cellules en migration (Joseph *et al.*, 2015). Sur un plan mécanistique, ZEB1 stimule la synthèse de ROBO1 (*Roundabout Guidance Receptor 1*), une protéine servant

d'ancrage au cytosquelette des N-cadhérines qui favorise la motilité et l'invasion des cellules de GBM (Rhee *et al.*, 2002).

Snail est un membre de la famille de facteurs de transcription SNAIL (*Drosophila Snail homologues*), l'une des conséquences principales de l'activation de Snail est l'inhibition de l'expression de l'E-cadhérine ainsi que d'autres marqueurs épithéliaux tels que l'occludine, la claudine ou la cytokératine lors de l'EMT de type II et dans les cellules de cancer ovariens (Boutet *et al.*, 2006 ; Zeisberg et Neilson 2009 ; Kalluri et Weinberg 2009 ; Wang *et al.*, 2015). *A contrario*, Snail stimule l'expression de marqueurs mésenchymateux tels que la fibronectine et la vitronectine, 2 protéines de la MEC, support de la migration (Cheng et al. 2012; Wang et al. 2015). Le TGF β potentialise l'activité de snail en stimulant sa phosphorylation et sa translocation nucléaire *via* une voie SMAD 2/3-dépendante dans les lignées de GBM T98G et KMG4 (Mahabir *et al.*, 2014). De façon intéressante, des expériences d'ARN interférences (siRNA) dirigés contre Snail menées dans les lignées de GBM KNS42, U87 et U373, montrent une augmentation de l'expression d'E-cadhérine associée à une inhibition des capacités migratoires de ces cellules accompagnée d'une augmentation du nombre de cellules en phase G1 du cycle cellulaire (Myung *et al.*, 2014).

La protéine Slug est également un membre de la famille SNAIL qui joue un rôle dans la TM des gliomes (Xie *et al.*, 2012). De même que Snail, la surexpression de slug est associée à une augmentation du phénotype invasif des cellules de GBM U87 et U251 (Oh *et al.*, 2019). De façon intéressante, l'analyse du TCGA a permis de mettre en évidence que Slug ainsi qu'un autre marqueur mésenchymateux, le CD44, peuvent être co-surexprimés dans les GBM (Phillips *et al.*, 2006 ; Verhaak *et al.*, 2010). La protéine CD44 est caractérisée comme étant le récepteur de l'acide hyaluronique (HA) et se lie également au collagène, à la laminine, à la fibronectine ainsi qu'aux MMPs (*Matrix Metalloproteinases*), cette dernière potentialise notamment *in vitro* l'invasion de cellules de GBM 4910 et 5310 (Chetty *et al.*, 2012 ; Yan *et al.*, 2015). En effet le CD44 est un des premiers acteurs de l'induction de l'EMT dans les cancers mammaires et colorectaux (Yin Xu, Stamenkovic, et Yu 2010). Bien que son expression soit corrélée au caractère invasif des GBM (Xu *et al.*, 2010), les mécanismes sous-jacents potentiellement liés à l'induction de la TM par le CD44 ne sont pas encore clairement élucidés dans les GBM (Wei *et al.*, 2010). Il a cependant été montré que CD44 protège les cellules U87 du stress oxydatif induit par le TMZ et la carmustine (BCNU) en réprimant la voie apoptotique Hippo (merlin-MST1/2-Lats1/2-YAP-cIAP1/2) (Xu *et al.*, 2010).

L'acquisition du phénotype mésenchymateux est donc la clé de voute sous-tendant les mécanismes d'invasion des GBM et le caractère diffus de la tumeur responsables d'une récurrence quasi-systématique en bordure de zone d'exérèse. En effet, dans plus de 45 % des cas les gliomes récidivent en bordure directe de zone de résection, près de 5% récidivent à moins de 2 cm de la bordure, et en environ 20 % des GBM récidivent à longue distance (> 2cm) du foyer primaire parfois même de façon multifocal (~10%) (Konishi *et al.*, 2012). De façon intéressante, environ la moitié des GBM multifocaux présentent une signature mésenchymateuse (47% selon Liu et collaborateur, et 63 % selon Paulsson et collaborateur) (Paulsson et al. 2014 ; Liu et al. 2015). L'approfondissement de la compréhension des mécanismes moléculaire supportant la TM des gliomes ainsi que les mécanismes associés à l'invasion constituent par conséquent à ce jour un enjeu thérapeutique majeur.

I.II.C.2 | La matrice extracellulaire : support de la migration

Les cellules de GBM envahissent le parenchyme sain en établissant des contacts avec les éléments de MEC. Elle représente environ 20% du volume cérébral et est constituée principalement d'HA, de tenascine R et de protéoglycanes de la famille des hyalectanes (aggrecan, versican, neurocan, brevican), ces composés s'organisent sous la forme d'un complexe ternaire générant un maillage complexe (Yamaguchi 2000 ; Zimmermann et Dours-Zimmermann 2008). La MEC est principalement synthétisée par les astrocytes et les oligodendrocytes (Syková et Nicholson 2008). L'HA est un glycosaminoglycane linéaire présentant une grande masse moléculaire comprise entre 4 et 8 000 kDa (Rayahin *et al.*, 2015), ses propriétés hydrophiles contrôlent les quantités d'H₂O présent dans l'espace interstitielle. Les cellules se lient à l'HA grâce au CD44 qu'elles expriment à leur surface ainsi qu'à ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*), une autre protéine transmembranaire pouvant se lier à l'HA (Itano 2008). La tenascine R est l'unique représentant de la famille des tenascines dans le SNC normal. Constitutivement exprimée sous forme d'homotrimère, elle permet notamment de former un lien entre les hyalectanes et la cellule *via* sa liaison avec les intégrines (Joester et Faissner 2001). Les hyalectanes sont une famille de protéoglycanes constituées de 4 membres, l'aggrecane et le versicane exprimés de manière ubiquiste, et le neurocane et le brevican exprimés plus spécifiquement dans le SNC (Yamaguchi 2000). Les hyalectanes possèdent des séquences de liaison à l'HA et à la tenascine R, cette liaison permet d'ancrer les éléments de la MEC du SNC (Yamaguchi 2000). La MEC cérébrale est également caractérisée par l'absence de réseaux fibrillaires de collagène associés à une plus faible rigidité de la MEC cérébrale

comparativement à celle d'autres tissus. Pour exemple, la matrice cérébrale montre de pressions appliquées sur les cellules allant de 260-490 Pa contre 50 kPa pour des muscles squelettiques et 950 kPa dans les cartilages (Zhang *et al.*, 1990 ; Kumar et Weaver 2009). On retrouve cependant quelques fibres de collagène I et III sécrétées à proximité de la pie-mère libérées par les cellules leptoméningées ainsi que par les péricytes et les cellules musculaires lisses. Ces types de collagène ne sont cependant pas à confondre avec le collagène IV présent spécifiquement dans la membrane basale des vaisseaux sanguins (Zhang *et al.*, 1990 ; Mohan *et al.*, 2010). La membrane basale a une composition bien distincte de celle de la MEC, elle est composée d'un enchevêtrement de collagène IV, de laminine, d'héparane sulfate, et de protéoglycane de la famille des perlécane ainsi que de nidogène et mesure entre 50 et 100 nm d'épaisseur (Kalluri 2003), étant plus rigide elle constitue un support privilégié de l'invasion des cellules de GBM.

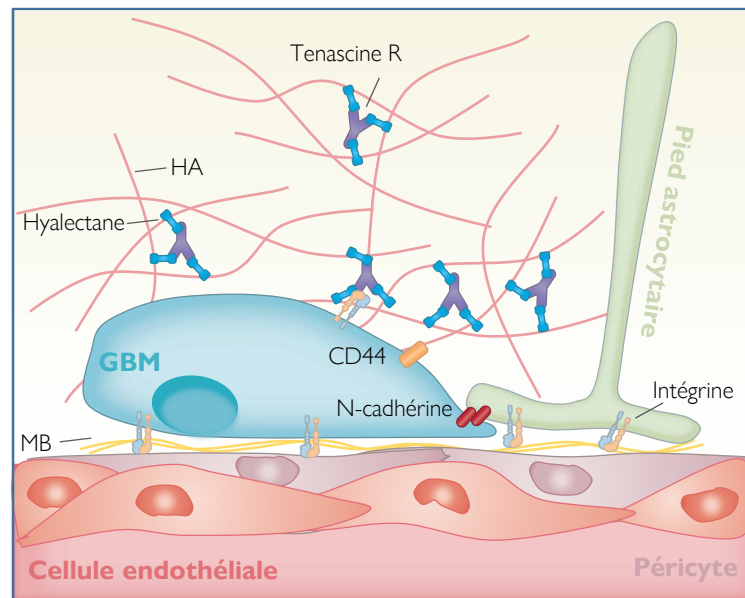


Figure 9 | Organisation de la matrice extracellulaire cérébrale. La matrice extracellulaire est principalement composée d'acide hyaluronique (HA), de ténaesine R et de hyalectanes permettant de réticuler le réseau d'HA. Les vaisseaux sanguins cérébraux sont entourés d'une membrane basale (MB) possédant une composition différente de la MEC cérébrale, majoritairement composée de laminine et de collagène IV.

La MEC présente dans la tumeur ne diffère pas fondamentalement de celle du cerveau sain, cependant il a été montré que les cellules de GBM sécrétaient en plus grande quantité de l'HA, du brevican ainsi que de la ténaesine R (Viapiano *et al.*, 2008 ; Virga *et al.* 2017). Il existe cependant une différence entre la composition de la MEC cérébrale et celle du GBM, en effet des structures fibrillaires à base de collagènes I et III et de laminine normalement absentes du cerveau sain, ont été retrouvées dans les GBM. Ce réseau fibreux apporte un support de migration supplémentaire aux cellules de GBM pour l'invasion du parenchyme sain cérébral

(Virga *et al.*, 2017). Afin de migrer efficacement, les cellules de GBM surexpriment et sécrètent des protéases appartenant à la famille des métalloprotéases (MMP-2 et MMP-9) ainsi que des enzymes de la famille des cathepsines (Cathepsines B, D et S) qui permettent la dégradation locale de la matrice afin de se frayer un passage dans le tissu sain cérébral (Tews 2000 ; Lakka *et al.*, 2004 ; Flannery *et al.*, 2006). L'invasion du parenchyme sain par les cellules de gliome s'effectue selon 2 voies privilégiées : la substance blanche, plus particulièrement la gaine de myéline et les vaisseaux sanguins par l'intermédiaire de la membrane basale (Figure 9 | Organisation de la matrice extracellulaire cérébrale) (Giese et Westphal 1996 ; Giese *et al.*, 2003).

I.II.C.3 | Invasion du parenchyme cérébral : modèle hydrodynamique

Bien que la MEC représente un volume non négligeable du tissu cérébral, l'espace est principalement occupé par les cellules présentes dans l'encéphale, le volume consacré à la MEC est par conséquent restreint et représente des « poches » d'environ 38-64 nm ce qui est largement inférieur à l'espace minimum que peut occuper une cellule (Thorne et Nicholson 2006). Pour contrecarrer le confinement et l'étroit espace interstitiel, les cellules de GBM utilisent un mode d'invasion à travers le parenchyme reposant sur un échange d'ion et d'H₂O avec les cellules en contact direct. Ainsi la cellule de GBM s'accapare le volume, majoritairement constitué d'eau, occupé par les cellules obstruant son chemin. Cette balance de flux d'H₂O, repose sur l'activité des aquaporines 1 et 4 (AQP1 ; AQP4) exprimées par les cellules de gliome ainsi que par les astrocytes (AQP4), qui laissent diffuser l'H₂O de manière passive selon les forces osmotiques impliquées localement. Le modèle hydrodynamique repose principalement sur les flux de Cl⁻ et de K⁺ générés par la cellule de GBM. Les canaux à l'origine de ces phénomènes sont les canaux de la famille KCa qui sont des canaux potassiques-Ca²⁺ dépendants et les canaux voltage dépendant de la famille des CIC (*Chlorure Canal*) pour le Cl⁻ tout 2 exprimés par les cellules de GBM (Cuddapah *et al.*, 2013; Papadopoulos et Verkman 2013). C'est la capacité des cellules de gliomes à maintenir une concentration élevée intracellulaire de Cl⁻, *via* l'activité du cotransporteur NKCC1 (*Na-K-Cl cotransporter*), 100 mM vs 10 nM pour un neurone mature qui leur permet d'échanger du Cl⁻ et de l'H₂O avec les cellules adjacentes, leur permettant ainsi de réduire leur volume pour migrer (Figure 10 | Modèle de migration hydrodynamique). En migrant le long de la membrane basale selon cette modalité, les cellules de GBM perturbent l'intégrité de l'unité neurovasculaire ainsi que celle de la BHE, montrant que la migration est aussi un facteur de perturbation de la BHE en présence

d'une tumeur infiltrante. Une étude menée par Farin et collaborateurs a mis en évidence que la migration des cellules de GBM à travers le parenchyme n'était pas constante, en effet les cellules de GBM envahissent le parenchyme sain de manière cyclique en suivant des *bursts* de migration pouvant atteindre 100 $\mu\text{m}/\text{h}$ entrecoupés de périodes d'immobilité. De façon intéressante, les cellules envahissantes font des pauses d'approximativement 1h au niveau d'embranchements vasculaires pour se diviser, et ensuite reprendre leur migration (Farin *et al.*, 2006).

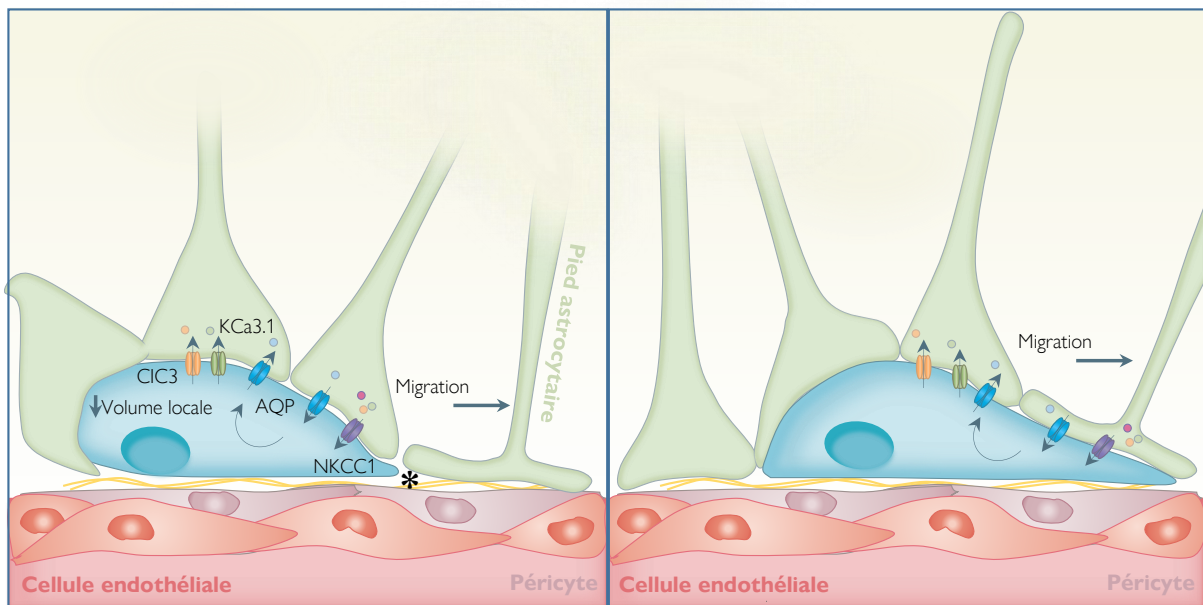


Figure 10 | Modèle de migration hydrodynamique. La cellule de GBM migre le long de la membrane basale et se fraye un chemin en utilisant des flux d'ions et d' H_2O lui permettant de réorganiser l'espace en s'accaparant les volumes occupés par les cellules du parenchyme. Les flux d'ions sont principalement contrôlés par les canaux potassiques KCa3.1 et chlore CIC3 . Ces phénomènes sont permis par l'activité constitutive du cotransporteur NKCC1 permettant à la cellule de maintenir sa concentration cytosolique de Cl^- plus élevée que celle des cellules du parenchyme sain (100mM vs 10 nM). La migration de la cellule le long de la membrane basale décolle les pieds astrocytaires de la membrane basale et perturbe l'intégrité de la BHE (*).

L'invasion du parenchyme par les cellules de GBM ne s'effectue pas de manière radiale mais plutôt selon des chemins particuliers, préservant certaines niches. Ainsi il a été montré que les tractus nerveux myélinisés tel que le nerf optique ou le corps calleux constituait des voies d'invasion préférentielles au sein de l'encéphale, *A contrario* l'hippocampe semble être protégé de l'invasion par les cellules de GBM (Mughal *et al.*, 2018). Les tractus nerveux constituent en effet le second support préférentiel de migration des GBM. D'un point de vue moléculaire la migration le long d'une gaine de myéline n'est pas chose aisée, en effet la myéline est

nativement un substrat non permissif pour la migration car dépourvu de protéines de la MEC et il n'existe à priori pas de récepteurs de surface capables de se lier à la myéline (Jahn, Tenzer, et Werner 2009). De plus, la gaine de myéline exprime des protéines inhibitrices de la migration et de la croissance axonales tel que Nogo-A et la *myelin associate glycoprotein* (MAG) (Giger *et al.*, 2008). Malgré ces éléments défavorables, les cellules de GBM sont en capacité de migrer le long des prolongements axonaux grâce à l'activité des métalloprotéases de type MMP-14 et MMP-2 qui clivent les éléments inhibiteurs présents sur la gaine de myéline prévenant la migration (Nakada *et al.*, 2001). Les fibres démyélinisées exercent un rétrocontrôle positif sur la migration des cellules de GBM le long des tractus de substance blanche en potentialisant le tropisme des cellules de GBM *via* une voie Jagged1-Notch-Sox9-SOX2 (Wang *et al.*, 2019).

La migration cellulaire à travers le parenchyme cérébral est un mécanisme cyclique composé de 5 phases distinctes : la polarisation, la protrusion, l'adhésion, la contraction et la rétractation (Lauffenburger et Horwitz 1996). En premier lieu la cellule se polarise vers la source de molécule chimio-attractante à l'origine de la migration. Cette dernière peut relayer son activité par des récepteurs tyrosine kinase, ce qui est par exemple le cas du récepteur c-Met un puissant chemoattracteur jouant un rôle central dans l'invasion des gliomes, ou bien par des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplé aux protéines G (RCPG) comme le récepteur CXCR4 de la chimiokine CXCL12 ou SDF-1 α (Ehtesham *et al.*, 2006 ; Eckerich *et al.*, 2007). Ces 2 types de récepteurs ont comme premier effecteur commun la protéine kinase PI3K (*phosphatidylinositol-3 kinase*) jouant le rôle d'initiateur de la migration directionnelle (Ridley 2003). Il est en effet admis que c'est l'activation localisée de PI3K qui permet la production locale de PIP3 (*phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate*) (Servant *et al.*, 2000 ; Insall et Weiner 2001). Les PIP3 quant à eux activent des GEF (*Guanine nucleotide exchange factor*) qui à leurs tours activent des GTPases de la famille Rho tels que Rho, Rac ou cdc42 (*cell division control protein*). Les rho GTPases ainsi activées stimulent localement la polymérisation d'actine et permettent la formation de structures membranaires clés de la migration directionnelle tel que les filopodes et les lamellipodes permettant la polarisation cellulaire le long du gradient chimioattractant (Ridley 2015). Le maintien de l'activation polarisée de PI3K est permis par l'hydrolyse constitutive des PIP3 formés par PTEN, qui dégrade les PIP3 en PIP2 à l'arrière et sur les flancs de la cellule (Sansal et Sellers 2004). Ce mécanisme, communément appelé «boussole cellulaire» permet de retranscrire le gradient extracellulaire de chimiokine en gradient intracellulaire de PIP3 permettant l'activation compartimentée des acteurs de la migration et par conséquent la polarisation cellulaire. L'adhésion des cellules à la MEC lors de

la migration s'effectue en grande partie grâce aux intégrines. Exprimées constitutivement sous forme d'hétérodimère $\alpha\beta$, 24 couples d'intégrines peuvent être formés à partir de 18 sous-unités α et 8 sous-unités β . C'est la sous-unité α qui définit la spécificité de liaison du complexe. *In vivo* les gliomes expriment plus spécifiquement les couples $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_6\beta_4$, $\alpha_v\beta_4$, $\alpha_v\beta_5$ (Tableau 1 | Expression des intégrines dans les gliomes) (Gingras *et al.*, 1995 ; Paulus *et al.*, 1993).

Intégrine	Element de la matrice associé	Expression	Référence
$\alpha_2\beta_1$	Collagène I & IV	Inchangé	Paulus <i>et al.</i> , 1993
$\alpha_3\beta_1$	Collagène IV, Laminine	Augmenté	Paulus <i>et al.</i> , 1993
$\alpha_6\beta_1$	Laminine	Inchangé	Gingras <i>et al.</i> , 1995 Paulus <i>et al.</i> , 1993
$\alpha_6\beta_4$	Laminine	Augmenté	Previtali <i>et al.</i> , 1996
$\alpha_5\beta_1$	Fibronectine	Inchangé / Diminué	Gingras <i>et al.</i> , 1995 Paulus <i>et al.</i> , 1993
$\alpha_9\beta_1$	Fibronectine, Tenascine	Augmenté	Brown <i>et al.</i> , 2008
$\alpha_v\beta_3$	Laminine, Vitronectine, Tenascine, Collagène IV	Augmenté	Gingras <i>et al.</i> , 1995 Paulus <i>et al.</i> , 1993 Bello <i>et al.</i> , 2001
$\alpha_v\beta_5$	Laminine, Vitronectine, Tenascine, Collagène IV	Augmenté	Bello <i>et al.</i> , 2001

Tableau 1 | Expression des intégrines dans les gliomes.

Ainsi le collagène IV et la laminine et plus largement la membrane basale constituent le support préférentiel de la migration des cellules de GBM à travers le parenchyme sain. L'invasion à l'origine de la récurrence en bordure de cavité de résection représente l'un des verrous majeurs dans l'efficacité des traitements des GBM, le développement de stratégie thérapeutique ciblant ce mécanisme représente un réel enjeu d'avenir.

I.II.C.4 | Rôle des chimiokines et leurs récepteurs dans l'invasion

Les gradients de chimiokines jouent un rôle central dans la stimulation de l'invasion du parenchyme cérébral par les cellules de GBM. Le récepteur CXCR4 fait partie des récepteurs chimiotactiques les plus étudiés dans les GBM. Son expression est particulièrement élevée dans les zones hypoxiques pseudopalisadiques des GBM (Rempel *et al.*, 2000 ; Ehtesham *et al.*, 2006; Zagzag *et al.*, 2006 ; Hong *et al.*, 2006). Les conditions hypoxiques qui règnent en bordure de zones nécrotiques stimulent l'expression de CXCR4, des études menées *in vitro* sur les cellules de GBM LN308 et U87MG ont permis de mettre en évidence que la stimulation de l'expression de CXCR4 en condition hypoxique est relayée par l'activité de HIF-1 α . L'application d'AMD3100 (Plerixafor), un pan-inhibiteur de récepteurs de la famille CXCR se fixant plus particulièrement à l'Asparagine 171 du DTM (domaine transmembranaire) IV

Asp¹⁷¹, à l'asparagine 262 du DTM VI Asp²⁶² et au glutamate 288 du DTM VII Glu²⁸⁸ du CXCR4, prévient la potentialisation des capacités migratoires relayées par l'hypoxie dans les lignées LN308 et U87MG (Rosenkilde *et al.*, 2004 ; Zagzag *et al.*, 2006). Les conditions hypoxiques stimulent également l'expression du ligand du CXCR4, le *stromal cell-derived factor 1α* SDF-1α dans les cellules endothéliales, et la libération de SDF-1α par les vaisseaux potentialiserait l'invasion relayée par l'activation du CXCR4 (Burger et Kipps 2006). Le peptide R est un inhibiteur peptidique spécifique du CXCR4, contrairement à l'AMD3100 qui peut aussi se fixer sur les récepteur CXCR3 et CXCR7 (Mercurio *et al.*, 2016). L'application de ce peptide sur des cellules U87MG en culture inhibe leur prolifération et leur migration évoquée par le CXCR4. Injecté par voie systémique *in vivo*, le peptide R diminue la densité cellulaire et la vascularisation tumorale (Mercurio *et al.*, 2016). Le récepteur CXCR7 est également surexprimé dans les GBM, son expression est elle aussi associée à un mauvais pronostic pour les patients atteints de GBM. De façon intéressante, *in situ* le CXCR7 est préférentiellement exprimé dans les cellules différenciées de GBM, alors que le récepteur CXCR4 est quant à lui exprimé dans les cellules différenciées et souches (Hattermann *et al.*, 2010) suggérant une orientation différentielle de la signalisation du CXCR4 en fonction du sous-type cellulaire de GBM. *In vitro* le traitement par un inhibiteur spécifique de CXCR7, le CCX771, réduit significativement la migration et la prolifération de cellules U251MG et U373MG en culture (Liu *et al.*, 2015). Le récepteur CXCR7 est également activé par le SDF-1α, il est cependant incapable d'activer les protéines G classiquement activées par CXCR4 du fait de l'absence du motif DRYLAIV nécessaire à la liaison aux protéines G (Burns *et al.*, 2006). L'activation du CXCR7 par SDF-1α active cependant la voie de MAPK via une activation de β-arrestine (Hattermann *et al.*, 2010 ; Odemis *et al.*, 2010 ; Rajagopal *et al.*, 2010 ; Décaillot *et al.*, 2011). Ces observations suggèrent un rôle redondant des récepteurs chimiokines dans la migration des cellules de GBM, cette hypothèse est étayée par les niveaux d'expression du récepteur CCR5 corrélés aux grades des gliomes, montrant les niveaux les plus élevés pour les GBM, avec association entre l'augmentation de son expression et une survie réduite pour les patients (Zhao *et al.*, 2015). Tout comme dans le cas de CXCR4, l'hypoxie stimule l'expression de CCR5 dans les cellules U87MG, et l'inhibition de son expression par siARN réduit le potentiel migratoire de ces lignées en condition hypoxique, une réduction associée à la diminution de l'expression de la MMP-9, un effet relayé par l'activation de NF-κB dans les cellules de cancer ovariens (Long *et al.*, 2012 ; Wang *et al.*, 2016). Un grand nombre d'autres récepteurs est également surexprimé dans les GBM, tel que le CCR2A (Liang *et al.*,

2008 ; Vakilian *et al.*, 2017), CCR3 (Kouno *et al.*, 2004), CX3CR1 (Sciumè *et al.*, 2010), CXCR1 (Desbaillets *et al.*, 1997), CXCR2 (Desbaillets *et al.*, 1997), dans l'ensemble de ces cas, la surexpression de ces récepteurs est associée à une potentialisation des propriétés invasives des cellules de GBM.

Le sphingosine 1-phosphate (S1P) est un sphingolipide intervenant dans la régulation de nombreux mécanismes associés à l'oncogenèse allant de l'inflammation aux métastases en passant par la survie et l'invasion (Pyne et Pyne 2010). Dans les gliomes, la radio/chimiothérapie potentialise la production de céramides qui sont eux métabolisés en S1P (Sordillo *et al.*, 2016). *In vitro*, le S1P potentialise la migration de cellules LN18 de GBM (Bien-Möller *et al.*, 2016). L'activité du S1P est relayée dans les GBM par 4 RCPG, les S1PR1, S1PR2, S1PR3 et S1PR5 (Yoshida *et al.*, 2010 ; Bernhart *et al.*, 2015; Bien-Möller *et al.*, 2016). *In vivo* l'activation de S1PR2 par le S1P stimule l'invasion des cellules de GBM par une voie G12/13– Rho (Young et Van Brocklyn 2007). Il a de plus été montré que l'activation de S1PR2 stimule la production de l'urokinase-type *plasminogen activator receptor* (uPAR), le récepteur de l'uPA qui intervient dans la maturation de la pro-MMP-9 en MMP-9 (Veeravalli et Rao 2012; Yu *et al.*, 2012). Le récepteur UT du neuropeptide urotensine II (UII) est également surexprimé dans les régions hypoxiques péri-nécrotiques des GBM et relaye les effets chimioattractants de l'UII *in vitro* sur les cellules d'astrocytome grade III SW1088 et de GBM U87. Ce mécanisme est relayé par l'activation séquentielle des voies Gαi et Gα13 qui vont conjointement stimuler l'initiation des adhésions nécessaires à la migration ainsi que la maturation de ces dernières et la polymérisation du cytosquelette d'actine essentielle à la formation du lamellipode (Lecointre *et al.*, 2015). Nous allons dans le paragraphe développer les spécificités du système UII/UT afin de mieux comprendre ses propriétés dans la régulation des mécanismes d'invasion des GBMs.

I.II.C.4.a | **Système urotensinergique et signalisations**

Le principal ligand endogène du récepteur UT est le peptide UII. Composé de 11 acides aminés chez l'homme, le peptide UII présente une structure cyclique hexapeptidique hautement conservée phylogénétiquement à l'origine de son activité biologique (Coulouarn et al. 1998). Le cycle (CFWKYC) est formé suite à la formation d'un pont disulfure entre les deux résidus cystéines (C) présents au début et à la fin du cycle. Un second ligand endogène du récepteur UT a pu être identifié, c'est un paralogue du peptide UII nommé urotensine II-related peptide ou URP (*urotensin-II related peptide*), qui possède une séquence plus courte (Ala⁴-hUII4-11)

conservant l'hexapeptide caractéristique de l'Ull (Figure 11 | Séquences de l'Ull et de l'URP (Sugo *et al.*, 2003). L'Ull partage un fort degré d'homologie de séquence avec la somatostatine, notamment au niveau de sa région cyclique, de fait l'Ull à initialement été caractérisée comme peptide *somatostatin-like* (Conlon *et al.*, 1997 ; Tostivint *et al.*, 2006). Cependant au vu des différences entre les séquences codant les précurseurs de ces 2 peptides, l'idée que l'Ull soit un ligand *somatostatin-like* a rapidement été écartée (Conlon *et al.*, 1997). L'Ull et l'URP sont néanmoins capables de lier et d'activer les récepteurs SST5 et SST2 dans des cellules CHO-K1 lorsqu'ils sont appliqués à de fortes concentrations (1 µM) (Malagon *et al.* 2008). Chez l'Homme adulte l'Ull est principalement exprimé dans les composantes rénales, digestive et cardiovasculaire (Shenouda *et al.*, 2002 ; Douglas *et al.*, 2002). Il est également exprimé dans les différentes composantes du SNC représentées par le cerveau, le tronc cérébral ainsi que la moelle épinière et le cervelet (Tableau 2 | Localisations centrale et périphérique de l'Ull chez l'Homme, le Singe, le Rat et la Souris) (Coulouarn *et al.*, 1998 ; Ames *et al.*, 1999 ; Totsune *et al.*, 2001 ; Sugo *et al.*, 2003).

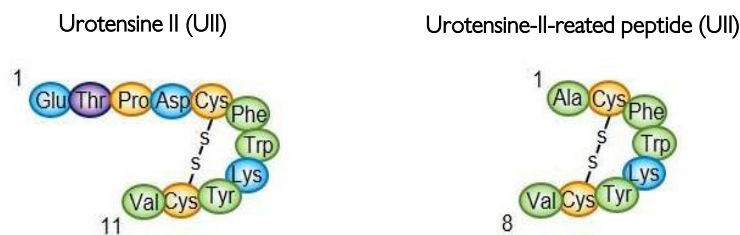


Figure 11 | Séquences de l'Ull et de l'URP. Les séquences courtes de l'Ull et l'URP partagent d'importantes similitudes structurales au niveau de leurs régions cycliques biologiquement actives. Ull : urotensine II ; URP : *urotensin-II related peptide*.

I.II.C.4.b | Le récepteur UT

Le récepteur UT fut isolé pour la première fois en 1995 à partir d'extraits de tissus sensoriels de rats d'une part (Tal *et al.*, 1995) et concomitamment par une autre équipe à partir de bases de données génomiques de Rat (Marchese *et al.* 1995). Orphelin à sa découverte, le récepteur UT fut nommé GPR14 jusqu'à sa désorphanisation en 1999, puis fut renommé *urotensin-II receptor* ou UT par l'IUPHAR (Union Internationale de la Pharmacologie de Base et Clinique) (Ames *et al.*, 1999 ; Mori *et al.*, 1999 ; Nothacker *et al.* 1999 ; Douglas et Ohlstein 2000). L'UT appartient à la classe A (Rhodopsine) des RCPG et possède de façon intéressante une forte homologie de séquence avec les récepteurs somatostatinergique SST4 (27%) et opioïdériques mu (26%), delta (26%) et kappa (25%) (Marchese *et al.*, 1995). Du fait de son appartenance à

la classe A, l'UT possède des sites de N-glycosylation (N²⁹ et N³³), un pont disulfure entre les résidus cystéine de l'extrémité extracellulaire du DTM3 et de la boucle e₂, un motif ER^{3.50} Y à l'extrémité cytoplasmique du DTM3 ainsi qu'un site de palmitoylation au niveau de la queue C-terminale (C334) (Onan *et al.*, 2004). Des séquences présentes dans les DTM3, 4 et 5 interviennent dans la formation de la poche de liaison permettant la fixation du ligand au récepteur (Sainsily *et al.*, 2013). L'UT possède de plus une séquence de localisation nucléaire dans sa boucle intracellulaire I3 responsable de l'adressage du récepteur au noyau (Doan *et al.*, 2012). Pour finir, l'UT exprime un doublet sérine/leucine SL dans son segment C-terminal retrouvé dans la séquence d'interaction d'autres RCPG interagissant avec la protéine plateforme FlnA connue pour réguler la distribution et l'activité de nombreux RCPG dont le CXCR4 (Figure 12 | Représentation schématique de la structure de l'UT humain) (Jiménez-Baranda *et al.*, 2007). La distribution d'expression du récepteur UT chez l'Homme adulte suit en grande partie le profil de celle de l'UII. Ainsi l'UT est fortement exprimé dans le système cardiovasculaire et rénal chez l'Homme, notamment dans le myocarde (Douglas *et al.*, 2002), les oreillettes (Leonard *et al.*, 2009), les ventricules (Totsune *et al.*, 2001), et l'aorte thoracique (Leonard *et al.*, 2009) mais aussi dans les reins (Langham *et al.*, 2004). Au niveau central l'UT est exprimé dans le tronc cérébral, la moelle épinière et dans certaines régions spécifiques du cerveau tel que le cortex, l'hippocampe et le thalamus (Tableau 2 | Localisation centrale de l'UII chez l'Homme, le Singe, le Rat et la Souris (Tableau 3 | Localisation centrale du récepteur UT chez l'Homme, le Singe, le Rat et la Souris) (Totsune *et al.*, 2001; Maguire *et al.* 2008 ; Doan *et al.* 2012 ; Spinazzi *et al.*, 2006).

Tissus	Homme	Singe	Rat	Souris
Cerveau	Ames <i>et al.</i> , 1999; Totsune <i>et al.</i> , 2001; 2003; Sugo <i>et al.</i> , 2003*	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002	Sugo <i>et al.</i> , 2003	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002
Hypothalamus	Totsune <i>et al.</i> , 2001		Egginger <i>et al.</i> , 2011	Dubessy <i>et al.</i> , 2008
Tronc cérébral	Coulouarn <i>et al.</i> , 1998; Ames <i>et al.</i> , 1999; Totsune <i>et al.</i> , 2001; Ng <i>et al.</i> , 2002		Coulouarn <i>et al.</i> , 1999; Dun <i>et al.</i> , 2001; Pelletier <i>et al.</i> , 2002	
Moelle épinière	Coulouarn <i>et al.</i> , 1998; Ames <i>et al.</i> , 1999; Sugo <i>et al.</i> , 2003	Coulouarn <i>et al.</i> , 1998; Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002	Coulouarn <i>et al.</i> , 1998; Dun <i>et al.</i> , 2001; Pelletier <i>et al.</i> , 2002; Sugo <i>et al.</i> , 2003	Coulouarn <i>et al.</i> , 1999; Pelletier <i>et al.</i> , 2002; Dubessy <i>et al.</i> , 2008; Egginger <i>et al.</i> , 2011
Cervelet	Sugo <i>et al.</i> , 2003	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002	Coulouarn <i>et al.</i> , 1999	Coulouarn <i>et al.</i> , 1999; Dubessy <i>et al.</i> , 2008
	Thompson <i>et al.</i> , 2003; Cowley <i>et al.</i> , 2005			

Tableau 2 | Localisation centrale de l'UII chez l'Homme, le Singe, le Rat et la Souris. Les références suivies d'une étoile (*) indiquent la présence simultanée des deux peptides. En noir, travaux ayant démontré la présence dans les différents tissus des ARNm de l'UII ou de l'URP ; en rouge, travaux rapportant la présence d'une immunoréactivité *UII-like*. LCR, liquide céphalo-rachidien.

I.II.C.4.c | Fonctions physiologiques

A ce jour l'UII est considéré comme le peptide vasoactif le plus puissant, efficace à des concentrations de type nanomolaire (Douglas et Ohlstein 2000). Il exerce des actions de vasoconstriction relayées par la voie PLC/PIP2/IP3 responsable de la mobilisation calcique permettant de recruter la calmoduline puis la *myosin light chain kinase* (MLCK), à l'origine de la contraction cellulaire (Tasaki *et al.*, 2004). Les effets de l'UT sur la contraction cellulaire peuvent également impliquer l'activation des voies RhoA/ROCK ou PKC/ERK1/2 (Russell et Molenaar 2004). L'application d'UII sur des artères pulmonaires intactes engendre une vasodilatation *via* la libération de NO (monoxyde d'azote) (Stirrat *et al.*, 2001 ; Porras-González *et al.*, 2014). Lorsqu'il est appliqué sur des cardiomyocytes de Rat en culture, l'UII stimule leur prolifération *via* l'activation de la voie Gαq ainsi que la transactivation de l'EGFR conduisant à l'activation de la voie PI3K/Akt ou de la voie NADPH oxydase (Tableau 4 | Voies de transduction associées à l'activation du récepteur UT et à l'implication dans les effets promitogènes, hypertrophiques et chimioattractants de l'UII) (Tzanidis *et al.*, 2003 ; Onan *et al.*, 2004 ; Liu *et al.*, 2009 ; Gruson *et al.*, 2010 ; Chao *et al.*, 2014).

Tissus	Homme	Singe	Rat	Souris
Cerveau		Nguyen <i>et al.</i> , 2012	Clark <i>et al.</i> , 2001; Gartion <i>et al.</i> , 2001; Jégou <i>et al.</i> , 2006; Maguire <i>et al.</i> , 2008; Nguyen <i>et al.</i> , 2012	
Amygdale			Jégou <i>et al.</i> , 2006	
Bulbe olfactif			Gartion <i>et al.</i> , 2001; Jégou <i>et al.</i> , 2006	
Cortex	Maguire <i>et al.</i> , 2000 Totsune <i>et al.</i> , 2001		Gartion <i>et al.</i> , 2001; Jégou <i>et al.</i> , 2006; Maguire <i>et al.</i> , 2008; Nguyen <i>et al.</i> , 2012	
Hippocampe			Gartion <i>et al.</i> , 2001; Jégou <i>et al.</i> , 2006; Nguyen <i>et al.</i> , 2012	
Hypothalamus	Totsune <i>et al.</i> , 2001		Gartion <i>et al.</i> , 2001; Lin <i>et al.</i> , 2003a; Jégou <i>et al.</i> , 2006; Nguyen <i>et al.</i> , 2012	
Thalamus			Jégou <i>et al.</i> , 2006	
Cervelet			Gartion <i>et al.</i> , 2001; Jégou <i>et al.</i> , 2006; Maguire <i>et al.</i> , 2008; Nguyen <i>et al.</i> , 2012	
Tronc cérébral	Totsune <i>et al.</i> , 2001;		Gartion <i>et al.</i> , 2001; Lin <i>et al.</i> , 2003a; Jégou <i>et al.</i> , 2006; Zhang <i>et al.</i> , 2007; Nguyen <i>et al.</i> , 2012	
Moelle épinière	Totsune <i>et al.</i> , 2001;	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002; Nguyen <i>et al.</i> , 2012	Gartion <i>et al.</i> , 2001; Jégou <i>et al.</i> , 2006; Maguire <i>et al.</i> , 2008; Nguyen <i>et al.</i> , 2012	Liu <i>et al.</i> , 1999

Tableau 3 | Localisation centrale de l'UT chez l'Homme, le Singe, le Rat et la Souris.

L'UII stimule également la prolifération d'astrocytes *via* l'activation de PLC (Jarry *et al.*, 2010). Pour finir, des effets proémittogènes de l'UII ont été observés sur des cellules musculaires lisses pulmonaires et sur des cellules endothéliales ombilicales (Lee *et al.*, 2014 ; Djordjevic *et al.*, 2005

; Diebold *et al.*, 2011). L'activation de l'UT par l'UII est également capable de relayer des effets chemoattractants dans des monocytes humains ainsi que des cellules de cancer de la prostate et colorectale (Grieco *et al.*, 2011 ; Federico *et al.*, 2014). Les propriétés pro-mitogènes et pro-migratoires de l'UII sur les cellules endothéliales, suggèrent une implication du système urotensinergique dans la régulation de l'angiogenèse. Il a en effet été montré *in vitro*, sur des cellules endothéliales humaines, que l'UII stimule l'expression des molécules d'adhésions ICAM-1 et VCAM-1 (*Vascular cell adhesion protein 1*) dans des cellules HCAEC (Cirillo *et al.*, 2008) et participe aux processus liés à l'angiogenèse (Diebold *et al.* 2012) tels que la prolifération (Lee *et al.*, 2014), la migration cellulaire (Guidolin *et al.*, 2010) et la tubulogenèse (Albertin *et al.*, 2009).

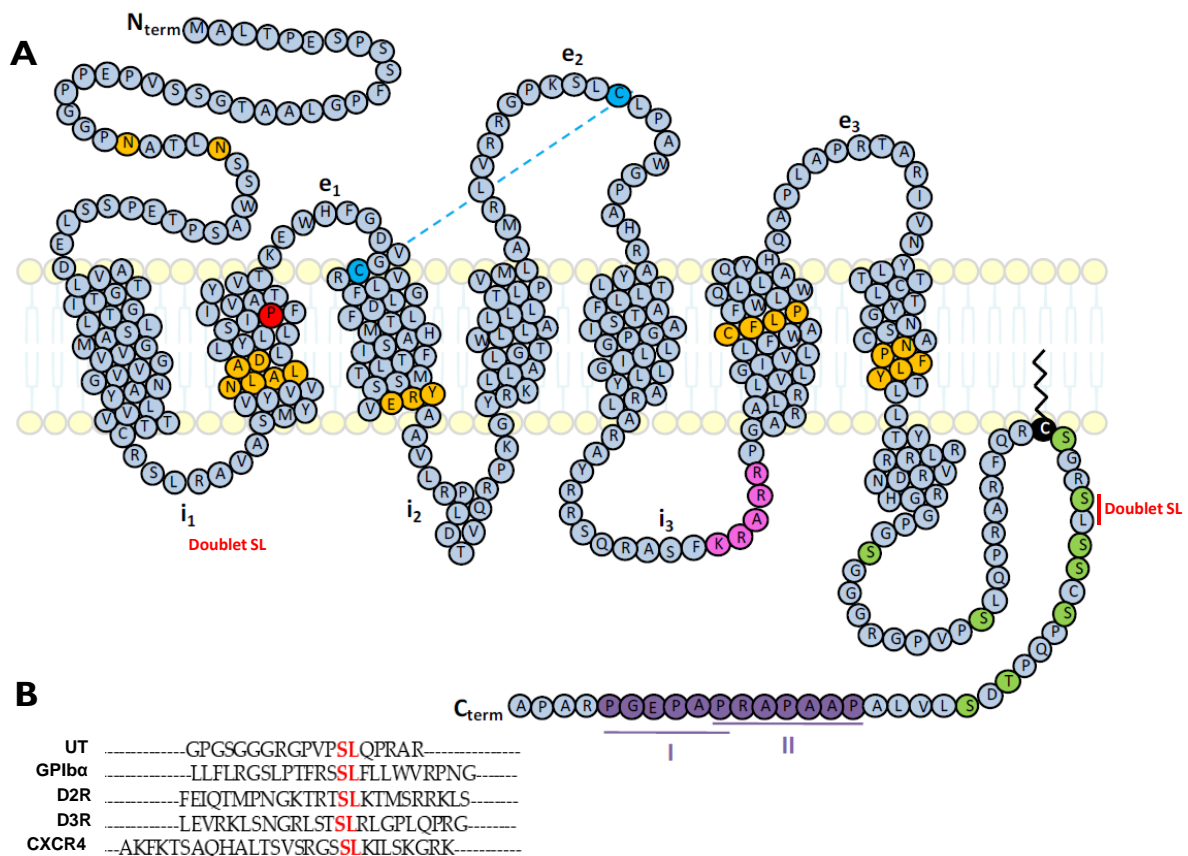


Figure 12 | Représentation schématique de la structure de l'UT humain. A. Les acides aminés représentés en jaunes sont des résidus hautement conservés au sein de la classe A des RCPG dont l'UT fait partie : deux sites de N-glycosylation dans la partie N-terminale (Nterm), un motif NLxxxD dans le DTM2, le motif ERY à l'extrémité cytoplasmique du DTM3, le motif CFxP du DTM6 et NPxxY au sein du DTM7. Les deux résidus cystéines participant au pont disulfure présent entre l'extrémité extracellulaire du DTM3 et la boucle e2 apparaissent en bleu. En plus de ces motifs consensus, la queue C-terminale de l'UT présente des sites de phosphorylation (en vert), une cystéine, potentiel site de palmitoylation et d'ancrage à la membrane plasmique en noir), ainsi que deux motifs polyproline de type I et II (en violet) mis en évidence à l'aide du logiciel Scansite (<http://scansite3.mit.edu#home>). Une séquence de localisation nucléaire (en rose) a également été identifiée dans la boucle i3. La proline en position 2.58 apparaît en rouge au sein du DTM2. **B.** Alignement de séquences mettant en évidence la redondance d'expression d'un doublet sérine/leucine (SL) présent dans a séquence d'interaction de récepteurs transmembranaires interagissant avec la protéine plateforme FlnA, suggérant que le récepteur UT est également

capable de se lier à la FlNA. CXCR4 : *C-X-C chemokine receptor*, D2R/D3R : récepteurs dopaminergiques D2 et D3 ; GPIIb α : sous-unité Ib α (GPIIb α) du complexe glycoprotéique (GP)Ib-IX-V ; UT : récepteur de l'urotensine II.

I.II.C.4.d | **Fonctions physiopathologiques : implication dans la tumorigenèse**

L'UT présente une large expression et distribution en condition physiologique, l'expression d'ARNm codant le récepteur UT a été caractérisée dans les lignées de cancer cervical HeLa, d'adénocarcinomes colorectaux DLD-1, de carcinome adrénocortical SW-13, de choriocarcinome BeWo mais aussi dans des lignées tumorales issues de néoplasmes du SNC tel que les lignées de neuroblastome NB69 et IMR-32 ainsi que dans la lignée de GBM T98G (Takahashi *et al.*, 2001). Notre équipe a de plus mis en évidence que l'expression de l'UT est retrouvée dans un large panel de lignées d'astrocytome de grade III et IV représentées par les astrocytomes SW1073 et SW1088 ainsi que dans les lignées de GBM U87, 8MG, 42MG et GL15 (Lecointre *et al.*, 2015). Par ailleurs des immunomarquages réalisés sur des prélèvements de GBM de patients ont permis de mettre en évidence que le récepteur UT ainsi que l'UUI étaient fortement exprimés dans les zones hypoxiques péri-nécrotiques de GBM (Lecointre *et al.*, 2015). La stimulation de l'activité du système urotensinergique dans les cellules tumorales promeut la malignité des tumeurs. En effet, il a été montré que de faibles concentrations d'UUI stimule la prolifération de cellules de cancer pulmonaire A549 *in vitro* et *in vivo* dans un modèle de xénogreffe (Wu *et al.*, 2010). Les mêmes observations ont pu être réalisées sur des cellules WB-F344 de cancer hépatique, avec un effet plus particulièrement associé à une stimulation du cycle cellulaire caractérisée par une accélération de la transition G1/S (Yu *et al.*, 2015). Plus largement, l'activation de l'UT par l'UUI stimule la prolifération de cellules de carcinomes rénaux corticosurrénaux SW-13 (Takahashi *et al.*, 2001) et colorectaux LOVO, HT29 et WIDR (Federico *et al.*, 2014). Nous avons déjà évoqué que l'UT agissait comme un chimiorécepteur et stimulait la migration directionnelle de cellules d'astrocytome de grade III SW1088 et de GBM U87 *via* l'activation séquentielle des voies G α i permettant l'initiation de la migration en stimulant la genèse des adhésions focales ainsi que G α 13 stimulant la maturation des adhésions ainsi que la contraction cellulaire nécessaires à la migration (Lecointre *et al.*, 2015 ; Castel *et al.*, 2017). Ces mécanismes sont sous-tendus par l'inhibition de l'autophagie consécutive à l'activation du récepteur UT, ce phénomène inhibant de façon polarisée la biogenèse des autophagosomes qui participent à la stabilisation des complexes d'adhésions focales à l'avant de la cellule (Coly *et al.*, 2016).

Effets cellulaires	Type cellulaire	Espèce	Voies de Transduction	Références
Prolifération	CML vasculaires	Lapin	PKC, src, MAPK	Watanabe <i>et al.</i> , 2001
	CML vasculaires	Rat	RhoA, ROCK	Sauzeau <i>et al.</i> , 2001
	CHO-UT	Hamster	G _{i/o} , PI ₃ K, PLC, calmoduline, MEK, Ca ²⁺ extracellulaire	Ziltener <i>et al.</i> , 2002
	Cellules épithéliales rénales	Porc	Ca ²⁺ (canaux voltage-dépendant), PKC, MAPK, ERK, c-myc	Matsushita <i>et al.</i> , 2003
	CML des voies aériennes	Rat	PKC, MAPK, Ca ²⁺ , calcineurine	Chen <i>et al.</i> , 2001
	Fibroblastes cardiaques		Transactivation de l'EGFR, ERK, ROS	Chen <i>et al.</i> , 2008
	Cellules tubulaires		ROS, inhibition de SHP-2, transactivation de l'EGFR via HB-EGF	Sue <i>et al.</i> , 2009
	CML		Ca ²⁺ , CaMK, ERK, PKD	Iglewski et Grant, 2010
	Précurseurs endothéliaux		ERK, p38MAPK	Xu <i>et al.</i> , 2012
	CML pulmonaires		ERK, TGFβ	Zhang <i>et al.</i> , 2012
	CML pulmonaires	Homme	NOX, ROS, ERK, p38MAPK, c-jun, Akt, expression de PAI-1	Djordjevic <i>et al.</i> , 2005
			NOX4, ROS, FoxO3, JNK, MMP-2	Diebold <i>et al.</i> , 2011
	Astrocytes	Rat	PLC, Ca ²⁺ intra- et extracellulaire (canaux de type T), IP ₃ , G _{i/o}	Jarry <i>et al.</i> , 2010
	Fibroblastes		MAPK, expression de VEGF, production de collagène	Song <i>et al.</i> , 2012
	CML aortiques		ROS, inhibition de SHP-2, transactivation de l'EGFR	Tsai <i>et al.</i> , 2009
Cellules endothéliales ombilicales	Homme	p38MAPK, ERK	Lee <i>et al.</i> , 2014	
Précurseurs cardiaques	Souris	JNK, LRP6	Chen <i>et al.</i> , 2014	
Survie	CML vasculaires	Rat	N.D.	Esposito <i>et al.</i> , 2011
	Cardiomyocytes		PI ₃ K, ERK	Chen <i>et al.</i> , 2012
	Cardiomyocytes-UT		G _q , Ras	Tzanidis <i>et al.</i> , 2003
Hypertrophie	Cardiomyocytes	Rat	Transactivation de l'EGFR via HB-EGF, ERK, p38MAPK	Onan <i>et al.</i> , 2004
			ROS, inhibition de SHP-2, transactivation de l'EGFR	Liu <i>et al.</i> , 2009
			PI ₃ K, Akt, GSK-3β	Gruson <i>et al.</i> , 2010
			ROS, NADPH oxydase, Akt, GSK-3β, PTEN	Chao <i>et al.</i> , 2014
Migration, motilité	Monocytes	Homme	RhoA, ROCK	Segain <i>et al.</i> , 2007
	Progéniteurs endothéliaux	Rat	RhoA/ROCK, MLC	Xu <i>et al.</i> , 2009
	Adénocarcinome prostatique (LNCaP)	Homme	RhoA, FAK	Grieco <i>et al.</i> , 2011
	CML vasculaires		MEK	Matsusaka et Wakabayashi, 2006
	Fibroblastes vasculaires	Rat	PKC, ROCK, calcineurine, MAPK	Zhang <i>et al.</i> , 2008b; 2011
	Progéniteurs endothéliaux		N.D.	Yi <i>et al.</i> , 2012
	Carcinomes colorectaux	Homme	N.D.	Federico <i>et al.</i> , 2014
Cancer de la vessie		N.D.	Franco <i>et al.</i> , 2014	

Tableau 4 | Voies de transduction associées à l'activation du récepteur UT et à l'implication dans les effets promitogènes, hypertrophiques et chimoattractants de l'U11. Akt, protéine kinase B ; CaMK, calmoduline kinase ; CHO-UT, lignée *chinese hamster ovary* transfectée avec la forme humaine du récepteur UT ; CML, cellules musculaires lisses ; EGFR, *epidermal growth factor receptor* ; ERK, *extracellular signal-regulated kinase* ; FAK, *focal adhesion kinase* ; FoxO3, *forkhead box O3* ; GSK-3β, *glycogen synthase kinase 3β* ; HB-EGF, *heparin-binding EGF-like growth factor* ; IL-8, interleukine 8 ; IP₃, inositol triphosphate ; LRP6, *low density lipoprotein receptor-related protein 6* ; JNK, c-Jun N-terminal kinase ; MAPK, *mitogen-activated protein kinase* ; MEK, *extracellular signal-regulated kinase* ; MLC, *myosin light chain* ; MMP-2, métalloprotéase matricielle de type 2 ; NOX, NADPH oxydase ; p38MAPK, p38 *mitogen-activated protein kinase* ; PAI-1, *plasminogen activator inhibitor-1* ; PI₃K, phosphoinositide-3 kinase ; PKC, protéine kinase C ; PKD, protéine kinase D ; PLC, phospholipase C ; PTEN, *phosphatase and tensin homolog* ; Ras, petites GTPases ; ROCK, *rho-associated protein kinase* ; ROS, *reactive oxygen species* ; SHP-2, *src-homology 2 containing tyrosine phosphatase* ; TGF-β, *transforming growth factor-β* ; VEGF, *vascular endothelial growth factor*. N.D., non déterminée.

D'autres études ont également mis en évidence que l'activation de l'UT stimule la migration directionnelle de cellules d'adénocarcinome de la prostate, colorectaux et hépatique (Grieco *et al.*, 2011 ; Li *et al.*, 2017 ; Wei *et al.*, 2017). Pour finir, de récents travaux réalisés dans notre équipe ont mis en évidence que l'UII stimule la croissance tumorale et le développement de régions hypoxiques dans des tumeurs issues de xénogreffes de cellules U87 de GBM chez des souris Nudes/NMRI. Ces résultats sont associés à l'augmentation de l'apparition de réseaux vasculaire tortueux associés à une angiogenèse accrue (Le Joncour *et al.*, soumis). Du fait de son implication dans la stimulation d'effets oncogènes associés à l'invasion, la prolifération et l'angiogenèse, la meilleure compréhension des mécanismes relayés par l'UT pour promouvoir ces phénomènes constitue un enjeu stratégique d'intérêt pour le développement de thérapie ciblée pouvant inhiber l'activité oncogène du récepteur UT et l'invasion des GBM.

I.II.D | Stratégies thérapeutiques

I.II.D.1 | Les thérapies ciblées

L'augmentation de la compréhension des voies de signalisation impliquées dans la tumorigenèse a permis d'identifier un large panel de cibles moléculaires impliquées dans l'autorenouveau et la prolifération, l'angiogenèse ainsi que dans l'invasion des GBM. Les récepteurs tyrosine kinase (RTKs) des facteurs de croissances, PDGFR, FGFR ou EGFR ainsi que les seconds messagers et voies de signalisation résultant de l'activation de ces récepteurs constituent des cibles thérapeutiques privilégiées pour le traitement de nombreux cancers y compris des GBM.

L'EGFR est le premier RTK pour lequel a été développé des inhibiteurs de RTKs (iRTKs), initialement développés pour le traitement des tumeurs pulmonaires à petites cellules et pour les cancers mammaires, le gefitinib et l'erlotinib, qui n'ont cependant aucun effet significatif *in vivo* sur le développement des GBM. L'hypothèse avancée par les auteurs est que le gefitinib et l'erlotinib ne pénètrent pas suffisamment la tumeur pour exercer leurs effets onco-suppresseur sur la tumeur (van den Bent *et al.*, 2009 ; Lassman *et al.*, 2005). L'anticorps monoclonal cetuximab dirigé contre le segment N-terminal de l'EGFR initialement développé pour le traitement des cancer colorectaux, n'a également montré aucune amélioration de la survie des patients atteints de GBM lors d'un essai clinique de phase II (Neyns *et al.*, 2009).

L'afatinib inhibe l'activité du récepteur EGFR en formant une liaison covalente avec ce dernier empêchant ainsi son activation. Son effet est actuellement testé en phase I en combinaison avec la radio/chimiothérapie. Des études précliniques avaient en effet permis de montrer qu'*in vitro* l'afatinib inhibe la prolifération et la migration de cellules U87-EGFRvIII en inhibant les voies AKT & JAK2/STAT3 (Vengoji *et al.*, 2019). Le dacomitinib est un autre iRTK de seconde génération se fixant irréversiblement au site de phosphorylation intracellulaire de l'EGFR, qui n'a montré qu'un effet bénéfique modéré sur la survie des patients porteurs spécifiquement d'une amplification EGFR lors d'un essai clinique de phase II (Sepúlveda-Sánchez *et al.*, 2017). Le nimotuzumab est un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre le segment N-terminal extracellulaire de l'EGFR. Une étude clinique multicentrique a permis de mettre en évidence que le nimotuzumab combiné au protocole de Stupp améliorait significativement la survie sans progression des patients (Du *et al.*, 2019).

Le PDGFR est également un RTK d'intérêt jouant un rôle central dans la gliomagenèse et est particulièrement surexprimé dans le sous-type proneural de GBM. Tout comme les iRTKs de première génération ciblant l'EGFR, l'imatinib qui inhibe l'activité du PDGFR en se fixant sur le site de liaison de l'ATP cytosolique, n'a montré qu'un effet modéré non significatif sur l'amélioration de la survie des patients, probablement causé par une mauvaise pénétration du composé associé à une efficacité réduite de l'inhibition du PDGFR sur la progression tumorale (Wen *et al.*, 2006). Le tandutinib et le dasatanib sont deux iRTK de seconde génération qui possèdent une meilleure pénétrance dans le SNC que l'imatinib, cependant les résultats préliminaires des essais cliniques de phase I et II suggèrent que ces 2 composés sont inefficaces dans le traitement des GBM (Batchelor *et al.*, 2017; Galanis *et al.*, 2019), suggérant qu'il ne s'agit pas d'un problème de passage de la BHE. Ces échecs dans le ciblage du PDGFR suggèrent qu'il ne constitue pas une cible pertinente pour le développement de futures thérapies ciblées.

Le manque significatif d'effet des iRTK a conduit la communauté scientifique à développer des agents pharmacologiques ciblant des voies de signalisation communes en aval de l'activation des récepteurs, y compris des RCPGs. Le temsirolimus et l'everolimus, deux inhibiteurs de la voie mTOR (*Mammalian target of rapamycin*) aux actions anti-angiogéniques impliquant la voie PI3K dans les cancers neuroendocrines et les carcinomes rénaux (Motzer *et al.* 2008; Oberstein et Saif 2012), n'ont montré aucun effet sur l'amélioration de la survie des patients atteints de GBM lors d'essais cliniques de phase II (Galanis *et al.*, 2005 ; Kreisl *et al.*, 2009). L'explication de ces échecs réside dans le fait que ces inhibiteurs exerceraient des effets

sur une seule population de cellules au sein de la tumeur possédant des niveaux élevés de p70s6 phosphorylé (Galanis *et al.*, 2005). Le voxtalisib est un inhibiteur mixte de PI3K & mTOR qui provoque la mort des cellules de GBM A172, U87MG et T98G *via* un stress du réticulum endoplasmique *in vitro*, de plus combiné au TMZ il réduit significativement la croissance de cellules A172 xénotreffées (Zhao *et al.*, 2019). Dans un essai clinique de phase I, il a montré un effet modéré sur l'inhibition de PI3K et mTOR sur des biopsies cutanées et semble être bien toléré par les patients lorsqu'il est administré en combinaison avec TMZ/radiothérapie, aucune étude d'efficacité n'a cependant été réalisée à ce jour (Wen *et al.*, 2015). Le buparlisib est un inhibiteur spécifique de PI3K, bien que les biopsies après 13 jours de traitement aient montré qu'il présentait une bonne pénétration de la tumeur, il n'engendre aucune amélioration clinique des patients atteints de GBM (Wen *et al.*, 2019).

Au vu du manque de succès des stratégies visant à cibler les cascades de transduction des RTKs, des agents thérapeutiques ciblant d'autres acteurs clés de la tumorigenèse ont été développés. Des inhibiteurs d'histones déacétylase (HDAC) sont, ou ont déjà été testés en essais cliniques. En effet il a été montré que le profil d'acétylation des histones des gliomes était associé à une amélioration de la survie des patients, ainsi l'acétylation H3K18 de l'histone H3 est associée à une amélioration de la survie des patients présentant cette modification (Liu *et al.*, 2010). Le vorinostat améliore modestement la survie des patients atteints de GBM en phase II, son activité caractérisée par immunomarquage, est associée à une augmentation de l'acétylation des histones H2B, H3 et H4 chez les patients de cet essai clinique (Galanis *et al.*, 2009). Le panobinostat est un autre inhibiteur d'HDAC qui n'a montré aucun effet synergique en phase II lorsqu'il était co-administré avec du bevacizumab (Drappatz *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2015). Le palbociclib est un inhibiteur des kinases dépendantes des cyclines de types CDK4 et CDK6 testé en phase II n'ayant montré aucun effet significatif sur la survie des patients (Taylor *et al.*, 2018). L'absence d'effet du palbociclib est vraisemblablement due à sa faible pénétration dans le SNC, c'est pourquoi des équipes travaillent actuellement sur des méthodes de vectorisation visant à augmenter sa distribution cérébrale (Bronner *et al.*, 2019).

Le développement de stratégies anti-angiogéniques pour lutter contre la croissance des GBM a été une des pistes les plus étudiées. Les premières stratégies visant à inhiber l'angiogenèse des GBM concernaient l'inhibition de l'activité du VEGF. En effet, dans des modèles précliniques l'administration d'anticorps anti-VEGF réduit significativement la croissance de cellules de gliome xénotreffées chez la souris, une inhibition associée à une perturbation de la maturation des réseaux microvasculaires tumoraux caractéristiques d'une perturbation des

mécanismes angiogéniques (Kunkel *et al.*, 2001; Stefanik *et al.*, 2001). Le bevacizumab est un anticorps monoclonal humanisé reconnaissant le VEGFA humain. Lors d'essais cliniques de phase II, il a montré une amélioration de 6 mois de la survie sans progression de patients atteints de GBM ayant récidivés (Cohen *et al.*, 2009 ; Friedman *et al.*, 2009). Il améliore également de 6 mois la survie sans progression des patients porteurs de GBM nouvellement diagnostiqués lors d'un essai clinique de phase II. Il n'a cependant aucun effet sur la survie globale des patients (Lai *et al.*, 2011). En phase III, combiné à la radio/chimiothérapie, le bevacizumab améliore également la survie sans progression des patients sans impacter la survie globale (Chinot *et al.*, 2014). Ces observations sont à rapprocher des données précliniques et *ex vivo*, qui montrent que la tumeur doit développer des stratégies d'adaptation à l'origine de l'échappement au traitement, probablement causées par l'augmentation des conditions hypoxiques à l'origine d'une TM et d'un switch métabolique (augmentation de la production de lactate et acidification) augmentant l'invasion du parenchyme sain par les cellules de GBM (Talasila *et al.*, 2017). Ainsi, le bevacizumab constitue une réelle piste thérapeutique d'intérêt qui pourrait être proposé uniquement en combinaison avec des agents anti-néoplasiques, pro-apoptotiques et/ou anti-invasifs.

D'autres stratégies ciblant le système VEGFA/VEGFR ainsi que l'angiogenèse tumorale ont également été développées. L'afilbercept est une protéine recombinante composée des domaines extracellulaires des récepteurs VEGFR-A et VEGFR-B, et en tant que protéomimétique interagissant, agit comme un chélateur en prévenant la liaison du VEGF à ses récepteurs, ce qui le mène potentiellement à mimer les effets du bevacizumab (Ciombor et Berlin 2014). Utilisé en phase II, l'afilbercept n'a montré qu'un effet modéré sur la survie des patients associé à une toxicité (lymphopénie et hypertension) ayant touché 25% des patients de la cohorte (de Groot *et al.*, 2011). Le sunitinib est un iRTK ciblant à la fois les récepteurs VEGFR ainsi que PDGFR et KIT(CD117), il exerce lui aussi son effet en se fixant sur le site de liaison de l'ATP présent sur la face cytosolique de ces récepteurs (Delbaldo *et al.*, 2012). Administré lors d'essais cliniques de phase II il n'a montré aucune amélioration sur la survie des patients (Neyns et al. 2011). Le cediranib est un iRTK ciblant les récepteurs VEGFR-A et B agissant comme le sunitinib, il améliore cependant de 6 mois la survie sans progression des patients lors d'administration en monothérapie en essai clinique de phase II (Batchelor *et al.*, 2010). Utilisé en phase Ib/II en combinaison avec la radio/chimiothérapie le cediranib améliore la survie sans progression et rallonge la survie globale à 20,2 mois (Gerstner *et al.*, 2012). Le vandetanib est un inhibiteur du VEGFR2, de l'EGFR et de RET (*Ret proto-oncogene*).

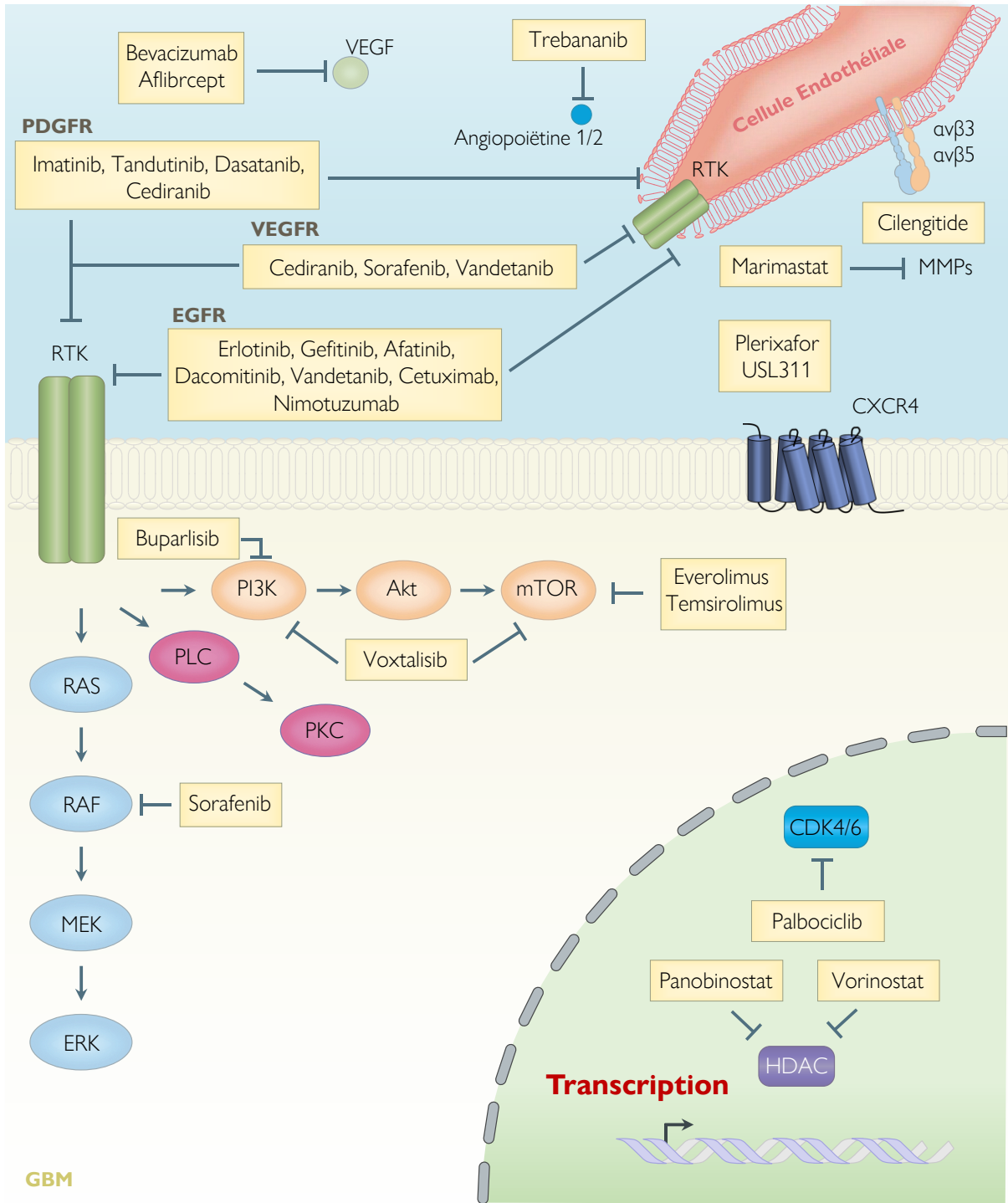


Figure 13 | Stratégies de thérapie ciblée testées dans le traitement des GBM. DLL, *delta-like ligand* ; EGF, *epidermal growth factor* ; EGFR, *récepteur de l'EGF* ; ERK, *extracellular signal-regulated kinase* ; FGFR, *récepteur du FGF* ; HDAC, *histone déacetylase* ; JAK, *Janus kinase* ; MAPK, *mitogen-activated protein kinase* ; MEK, *mitogen-activated protein kinase* ; MMPs : *Matrix Metaloproteïnase* ; mTOR, *mammalian target of rapamycin* ; PDGFR, *récepteur du PDGF* ; PLC, *protéine lipase C* ; PI3K, *phosphatidylinositol 3-kinase* ; PKC, *protéine kinase C* ; RTK, *récepteur tyrosine kinase* ; SHH, *sonic hedgehog* ; STAT, *signal transducers and activators of transcription* ; VEGF, *vascular endothelial growth factor* ; VEGFR, *récepteur du VEGF*.

Testé en phase II il n'améliore que d'un mois la survie globale des patients de la cohorte (Figure 13 | Stratégies de thérapie ciblée testées dans le traitement des GBM) (Lee *et al.*, 2015). Le trebananib est un inhibiteur des Ang-1 et -2, administré seul ou en thérapie combinée avec le bévacizumab lors d'un essai clinique en phase II, il n'améliore pas la survie des patients et ne potentialise pas l'effet du bevacizumab sur la survie sans progression (Reardon *et al.*, 2018).

D'autres stratégies ne ciblant pas les RTK et les cascades de signalisation associées, ont été développées dans le but d'inhiber les mécanismes associés à l'angiogenèse tumorale par exemple. Le cilengitide est un inhibiteur spécifique des couples d'intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$ impliqués dans l'angiogenèse. Un essai clinique de phase II de grande envergure comprenant 3471 patients répartis sur 146 centres a mis en évidence que le cilengitide n'améliorait pas la survie des patients lorsqu'il était associé à la radio/chimiothérapie (Stupp *et al.*, 2014). Au vu de la diversité des couples d'intégrines impliqués dans les phénomènes d'angiogenèse et d'invasion, les intégrines restent des cibles thérapeutiques d'intérêt pour le traitement des GBM. La dégradation de la MEC par les MMPs est un élément clé sous-tendant les mécanismes d'angiogenèse et d'invasion, c'est dans ce cadre que le marimastat, un inhibiteur des MMPs mimant la séquence reconnue par ces dernières, a été testé en essais cliniques de phase II combiné à la radio ou la chimiothérapie (TMZ). Combiné à la radiothérapie, il n'améliore pas la survie des patients, il améliore en revanche la survie sans progression de 29% lorsqu'il est co-administré avec le TMZ (Groves *et al.*, 2002 ; Levin *et al.*, 2006). Bien que ne présentant aucune toxicité aiguë, le marimastat engendre de puissantes douleurs articulaires chez les patients ayant reçu le co-traitement marimastat/TMZ (Groves *et al.*, 2002).

I.II.D.3 | Stratégies thérapeutiques ciblant les récepteurs des chimiokines

Il existe un large éventail d'outils pharmacologiques ciblant les récepteurs des chimiokines dans la lutte contre les processus cancéreux et métastatiques (Tableau 5 | Inhibiteurs de récepteurs aux chimiokines utilisés en préclinique) (Tableau 6 | Inhibiteurs de récepteurs aux chimiokines utilisés en essais cliniques), le nombre de molécules testées dans les GBM est en revanche réduit comparativement à l'arsenal disponible. En préclinique, un antagoniste du CXCR4, l'AMD3465, inhibe la prolifération de cellules U87MG stimulées par l'application de SDF-1 α *in vitro*. *In vivo*, la perfusion continue d'AMD3465 réduit de 80% le volume tumoral après 5 semaines de croissance (Yang *et al.*, 2007).

Le PRX177561 est également un antagoniste du récepteur CXCR4 qui potentialise les effets du bevacizumab et du sunitinib sur la croissance tumorale et réduit de 80% la croissance

tumorale, contre 62% pour le bevacizumab seul et 42% pour le sunitinib seul (Gravina *et al.*, 2017). Ces effets sont associés à la réduction de la densité vasculaire au sein de la tumeur (Gravina *et al.*, 2017). Toujours dans les études précliniques, la coadministration de POL5551, un autre antagoniste du récepteur CXCR4, ainsi que d'un anticorps anti-VEGF réduit significativement l'invasion de cellules de GBM murin GL261 xéno greffées chez la souris C57Bl/6 (Gagner *et al.*, 2017). Un anticorps chimérique ciblant le récepteur CXCR7 (X7Ab) induit la mort des cellules de GBM *in vivo* via le recrutement de lymphocyte NK et de macrophage, aboutissant à une réduction du volume tumorale et à une amélioration significative de la survie des animaux (Salazar *et al.*, 2018).

Le plerixafor est actuellement testé dans plusieurs essais cliniques sur des patients nouvellement diagnostiqués ou ayant récidivés. Les patients des premières études d'innocuité et d'efficacité reçoivent une injection sous-cutanée quotidienne de plerixafor (Numéro d'accès : NCI2012-00149) ou une injection intraveineuse continue de 2 semaines (Numéro d'accès : NCI2013-02012). Un essai clinique en phase I/II est actuellement en période de recrutement pour tester l'USL311, un antagoniste du CXCR4 en combinaison avec la lomustine, un agent alkylant, sur différentes tumeurs solides et des GBM récurrents (Numéro d'accès : NCT02765165).

De nombreuses stratégies thérapeutiques ont donc été développées durant la dernière décennie et peu d'entre elles ont su faire preuve d'efficacité, même si les traitements anti-angiogéniques semblent pouvoir fournir un délai de 6 mois aux patients atteints de GBM avant la récurrence. Il est donc nécessaire d'identifier d'autres cibles thérapeutiques pouvant être combinées aux stratégies anti-angiogéniques par exemple. Inhiber l'activité des acteurs liés aux phénomènes d'invasion semble constituer une piste peu explorée qui nécessite encore des recherches plus fondamentales et mécanistiques. En particulier, l'inhibition de l'activité des systèmes ligand/récepteur de chimiokine semble prometteuse. Cependant bien qu'efficace en préclinique on peut supposer qu'inhiber un seul de ces systèmes qui s'avèrent « redondants » indépendamment des autres, pourra à terme conduire la tumeur à mettre en place des stratégies d'échappement thérapeutique. C'est pourquoi il semble pertinent à ce jour d'étudier le rôle d'effecteurs secondaires communs à ces systèmes (protéines de signalisation, d'ancrage ou de trafic intracellulaire) qui à travers leur ciblage, permettront de bloquer les fonctions de plusieurs systèmes pro-migratoires, simultanément.

Récepteur	Agent	Cancer
CCR1	CCX721	Myélome multiple
	BL923	Cancer du colon et métastases hépatiques
CCR2	CCX9588 + anti-PD-L1	Cancer mammaire
	PF-04136309 + GEM	Cancer du pancréas
	CCX872 + anti-PD-1	Cancer du pancréas
	RDC018	Carcinome hépatocellulaire
CCL2	747 + Sorafenib	Carcinome hépatocellulaire
	iCCR2	Cancer des ovaires
CCR4	CNTO 888 + radiothérapie	Cancer mammaire
CCR4	Anti-CCR4 CAR-T cells	T cell malignancies
	Affi 5	Cancer rénal
CCR5	AF399/420/1802	Mélanome, cancer pulmonaire et colorectal
CCR7	Maraviroc	Cancer colorectal
CCR7	siRNA	Métastase CRC et cancer de la prostate
	MSM R707	Metastatic T- ALL
CXCR2	Cxcr2-/- + PTX	Cancer mammaire
	Navarixin + anti-MEK	Mélanome
	SB225002 + Sorafenib	Cancer des ovaires
	Reparixin + 5-fluorouracil	Cancer gastrique
	Cxcr2-/-	Cancer du pancréas
	Cxcr2-/+ anti-PD-1	Cancer du pancréas
	B225002+RS504393+F	Cancer du pancréas
SB265610 + Docetaxel	Cancer de la prostate	
CXCR4	AMD3100 + Ara-C	Leucémie aigue myéloblastique
	LY2510924	Leucémie aigue myéloblastique
	BKT140 + Rituximab	Lymphome non-Hodgkinien
	AMD3465	GBM and Medulloblastoma
	POL5551 + anti-VEGF	GBM
	AMD3100	Cancer des ovaires
	AMD3100 + anti-PD-L1	Cancer du pancréas
AMD3100 + VIC-008	Mesothéliome	
ACKR2	PRX177561+Bevacizumab+Sunitinib	GBM
ACKR3	Ackr2 -/-	Métastase de cancer mammaire et mélanome
	X7Ab + Temozolomide	GBM

Tableau 5 | Inhibiteurs de récepteurs aux chimiokines utilisés en préclinique. (D'après Mollica Poeta et al., 2019).

Récepteur	Agent	Cancer	Numéro d'essai
CCR2	PF-04136309+nab-PTX+GEM	Cancer du pancréas	NCT02732938
	PF-04136309 + FX	Adenocarcinome ductal pancréatique	NCT01413022
	CCX872 +FX	Cancer du pancréas	NCT02345408
CCL2	CNTO 888	Tumeurs solides	NCT00537368
	CNTO 888	Cancer de la prostate métastatique	NCT00992186
CCR4	Mogamulizumab	Lymphome T de l'adulte	NCT01728805
	Mogamulizumab	Lymphome T cutané	
CCR5	Maraviroc + chimiothérapie	Cancer colorectal	NCT01736813
CXCR2	AZD5069	Cancer du pancréas	NCT02583477
	Reparixin + PTX	Cancer mammaire	NCT02370238
CXCR4	AMD3100	Rechute de leucémie aigue myéloblastique	NCT00512252
	LY2510924	Cancer colorectal, pulmonaire, mammaire et de la prostate	NCT02737072
	BMS-936564	Leucémie aigue myéloblastique	NCT01120457
	PF-06747143	Cancers hématologiques	NCT02954653
	USL311 + Lomustine	Tumeurs solides et GBM	NCT02765165
	Balixafortide + Eribulin	Métastase de cancer mammaire	NCT01837095
	AMD3100	GBM récurrent	NCT012-00149 NCT013-02012

Tableau 6 | Inhibiteurs de récepteurs aux chimiokines utilisés en essai clinique. (D'après Mollica Poeta et al., 2019).

II | Les Filamines, protéines plateformes et organisatrices

La Filamine A (FlnA) est la forme la plus abondante d'une famille de 3 protéines homologues de liaison à l'actine appelées Filamines (Flns), nommées respectivement FlnA, Filamine B (FlnB) et Filamine C (FlnC) (Zhou *et al.*, 2010). Ces protéines d'ancrage à l'actine exprimées constitutivement sous forme d'homodimères jouent un rôle central dans la mise en place et la régulation du cytosquelette d'actine ainsi que dans le maintien de structures permettant l'adhésion des cellules à leurs substrats notamment *via* l'interaction avec la sous-unité Ib α (GPIb α) du complexe glycoprotéique (GP)Ib-IX-V (Von Willebrand factor receptor) exprimé par les plaquettes (Xu *et al.*, 1998) ou aux intégrines (Calderwood *et al.*, 2000). A ce jour plus de 70 partenaires protéiques différents ont été caractérisés pour l'ensemble de la famille des Filamines dont plus de 90 pour la FlnA. Le grand nombre et la grande diversité des protéines interagissant avec les Filamines confèrent à cette famille un rôle central dans la régulation de l'ensemble des mécanismes cellulaires.

II.1 | La Famille des Filamines

La purification de la première filamine fut réalisée en 1975 lors de la caractérisation des protéines intervenant dans les propriétés contractiles de macrophages de Lapin, initialement orientée vers l'isolation et la compréhension des propriétés physicochimiques de l'actine et de la myosine. L'étude a permis d'isoler une protéine de haut poids moléculaire qui lie l'actine et nommée *l'actin binding protein 280* ABP-280 ou FlnA (Hartwig et Stossel 1975). La même année des immunomarquages réalisés à l'aide d'anticorps reconnaissant cette protéine appelée *actin binding protein* ont permis de caractériser des structures filamenteuses dans des cellules embryonnaires de gésier de poulet. L'apparence fibreuse de ce marquage a finalement conduit les chercheurs à renommer cet antigène « filamine » (Wang *et al.*, 1975).

Parallèlement à ces découvertes, la recherche de protéines interagissant physiquement avec l'actine chez l'amibe *Dictyostelium discoideum* à partir d'extraits cytosoliques de protéines, a conduit à la découverte d'un paralogue des filamines humaines, la ddFln (*Dictyostelium discoideum Filamin*), qui représente une forme prototypique de filamine très largement étudiée dans la littérature. La ddFln est notamment fortement exprimée dans le cortex cellulaire ainsi que dans les *ruffles* membranaires et les pharopodes de *D. discoideum*, suggérant un rôle important dans la régulation des mécanismes associés à la migration de l'amibe (Coudeelis *et al.*, 1981 ; Condeelis *et al.*, 1982). Il a par la suite été montré qu'une lignée de *D. discoideum* ddFLN KO (*Knock-Out*) (ABP-120⁻) présentait une réduction significative de ses capacités migratoires, un phénotype associé à une perturbation du cytosquelette d'actine (Cox *et al.*, 1992

; Cox *et al.*, 1996). L'effet du KO (HG1264) de ddFLN a pu être observé lors du développement de *D.discoideum*, en effet la ddFLN est fortement exprimée dans les *tip cell* de l'amibe lors du développement (Fisher *et al.*, 1997 ; Khaire *et al.*, 2007).

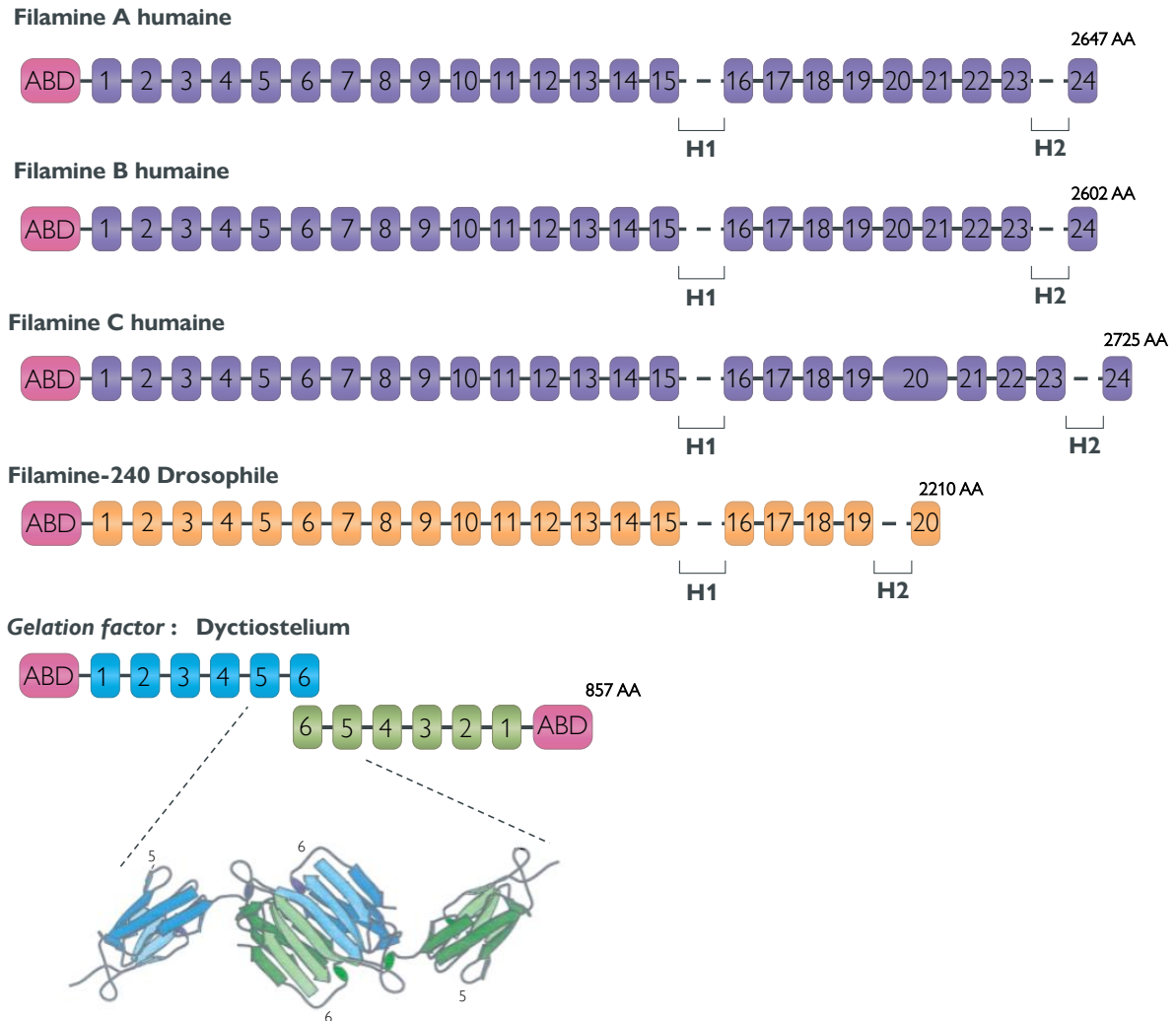


Figure 14 | Représentation schématique de l'organisation des Filamines. Architecture et alignement des modules composant différentes formes de filamines du règne animal. Les 3 formes de filamines humaines A, B et C, la filamine de *Drosophila melanogaster* et la filamine de *Dictyostelium discoideum* ou *gelation factor* sont représentées sous forme d'un dimère issu de l'association des domaines 6 de deux filamines. ABD : *actin binding domain*, H1 : *hinge 1*, H2 : *hinge 2*. (Modifié d'après Stossel *et al.*, 2001).

A

Nom	Alias	Chromosome	Coordonnées	Taille du gène	Taille du transcrit	Taille de la protéine	Masse de la protéine
Filamine A	FlnA, ABP-280	Xq28	chrX:154,348,524-154,374,638	26115 bases	8507 bases	2647 AA	280739 Da
Filamine B	FlnB, βFLN	3p14.3	chr3:58,008,400-58,172,255	163856 bases	9463 bases	2602 AA	278164 Da
Filamine C	FlnC, γFLN	7q32.1	chr7:128,830,377-128,859,274	28898 bases	9188 bases	2725 AA	291022 Da

B

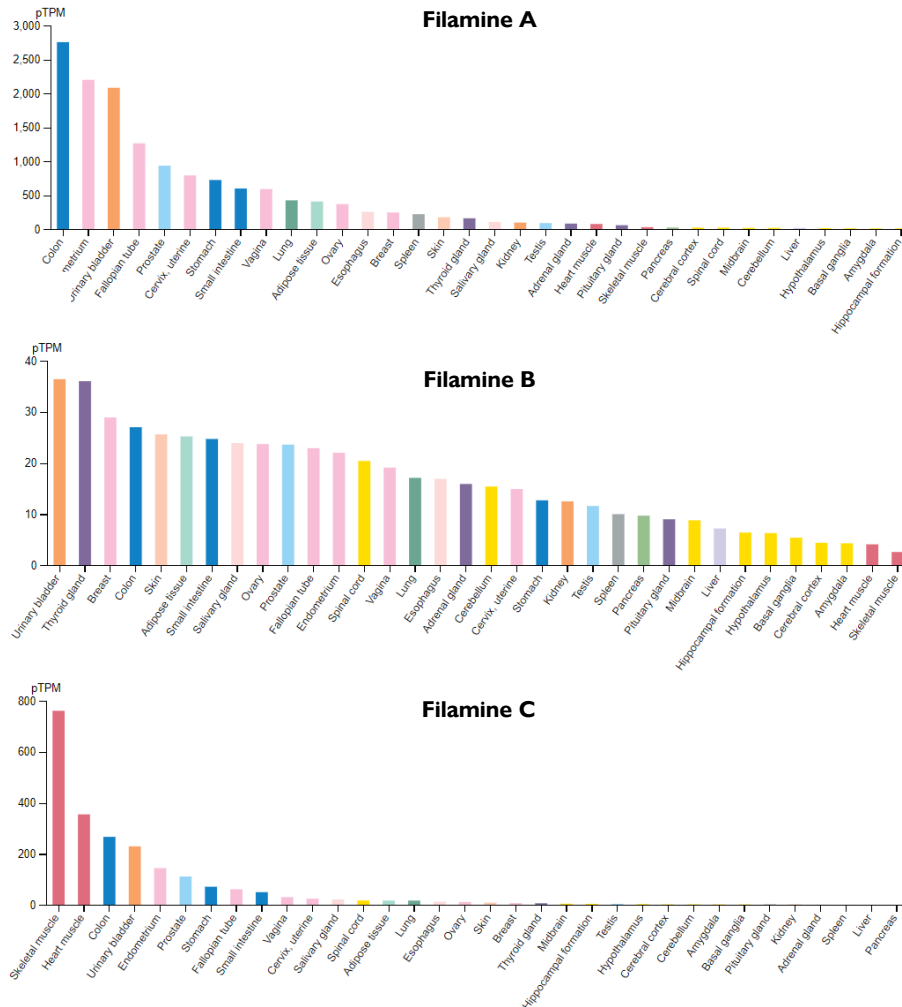


Figure 15 | Localisation et propriétés des gènes codant les Filamines humaines ainsi que leurs distributions tissulaires. A. Tableau résumant la localisation chromosomique ainsi que la longueur des transcrits et des protéines produites à l'origine des trois formes de Fln A, B et C. B. Distributions tissulaires des différentes formes de Filamines. Quantification d'expression des ARNm codant les FlnA, B et C obtenue de <https://www.proteinatlas.org/> sur la base des données de la base GTEx. La FlnA est la forme de Filamine la plus largement et fortement distribuée avec des niveaux d'expression de l'ordre du millier de transcrits par million (TPM), la FlnB est quant à elle largement distribuée, son expression est en revanche bien inférieure à celle de son homologue principal, avec des niveaux avoisinants la dizaine de TPM. L'expression de la FlnC est majoritairement présente dans les muscles squelettiques et dans le cœur à des niveaux de l'ordre de la centaine de TPM.

La ddFln est plus courte que ses homologues mais possède cependant l'ensemble des groupements fonctionnels nécessaires à sa fonction qui est de réticuler ou *crosslinker* le réseau d'actine, à savoir 1 domaine de liaison à l'actine ainsi qu'un domaine de dimérisation. Ces 2

domaines sont séparés par une région rigide composée de la répétition de 5 domaines répétés de type IgG like (Popowicz *et al.*, 2004).

Chez l'Homme il existe 3 formes homologues de filamines comme décrit précédemment, la FlnA ou *Actin Binding Protein 280* qui est la forme la plus abondante et la plus largement et fortement exprimée des 3 filamines (Gorlin *et al.*, 1990) ; la FlnB ou beta(β)-filamine (β FLN) largement exprimée mais en quantité moindre comparativement à son homologue principal puisque environ 100 fois moins d'ARNm codant la FlnB sont retrouvés dans les tissus correspondant (colon : 2754 pTPM FlnA ARNm vs 27 pTPM FlnB ARNm ; 2082 pTPM FlnA pTPM vs 36,4 FlnB pTPM ; Endomètre : 2199 pTPM FlnA ARNm vs 22pTPM FlnB ARNm) (The Human Protein Atlas : Gtex Dataset) (Bröcker *et al.*, 1999 ; Chakarova *et al.*, 2000). Pour finir, la FlnC ou gamma(γ)-filamine (γ FLN) dont l'expression est restreinte au tissu musculaire (Chakarova *et al.*, 2000 ; van der Ven *et al.*, 2000) (Figure 14 | Représentation schématique de l'organisation des Filamines).

Ces 3 formes sont codées par 3 gènes distincts et sont à leur tour à l'origine de différents variants d'épissage ou *splice variant*. Les FlnB et C partagent le même type d'épissage alternatif aboutissant à l'excision d'une région charnière appelé H1 (*Hinge 1*) conférant aux Filamines leurs flexibilités. L'absence de cette région H1 dans les variants d'épissage des FlnB et C réduit significativement l'organisation orthogonale du réseau d'actine des cellules concernées. La distribution ainsi que la proportion de ces variants varient en fonction du tissu considéré, par exemple les cellules de la thyroïde expriment une majorité de forme longue de FlnB combinée à la forme Δ H1 de la FlnC (Xie *et al.*, 1998 ; Xu *et al.*, 1998). Il a également été montré que le variant FlnB Δ H1 est exprimé aux extrémités des fibres de stress d'actine des myotubes, l'expression d'un tel variant stabilise la structure d'actine du fait de son incapacité à être clivé (van der Flier *et al.*, 2002). Le seul variant d'épissage validé expérimentalement de la FlnA présente une délétion de 41 acides aminés entre les domaines répétés 19 et 20, cette délétion aboutie à une potentialisation de la fixation de la FlnA aux β -intégrines (van der Flier *et al.*, 2002 ; Lad *et al.*, 2007). (Figure 15 | Localisation et propriétés des gènes codant les filamines humaines ainsi que leurs distributions tissulaires). Les 3 formes de filamines présentent un fort pourcentage d'homologie sur l'ensemble de leurs séquences (~70%) à l'exception des 2 boucles flexibles H1 et H2 d'environ 30 acides aminés qui présentent 45% d'homologie de séquence. De plus la FlnC possède une insertion de 81 acides aminés dans le domaine répété 20 absent des FlnA et B (van der Flier *et al.*, 2001).

II.II | Structure et propriétés des Filamines

Les filamines sont caractérisées par une ossature principale issue de la répétition de 24 domaines répétés *Immunoglobuline-like* (IgG-like) d'environ 96 résidus, chaque domaine répété se présente sous forme d'un baril β issu de l'agencement antiparallèle de 7 feuillets β (A, B, C, D, E, F et G) (Figure 16 | Représentation schématique de l'organisation tridimensionnelle d'un domaine répété de Filamine) (Gorlin *et al.*, 1990 ; Fucini *et al.*, 1997 ; Page *et al.*, 2011). La répétition de ces barils β est à l'origine de 2 segments rigides appelés *rod domain 1* et *rod domain 2*, respectivement constitué des domaines 1 à 15 et 16 à 23. Ces 2 domaines sont séparés par une séquence charnière appelée *Hinge H1*, on retrouve une seconde séquence charnière *Hinge 2* (H2) entre les domaines 23 et 24. Ces 2 séquences charnières sont en partie responsables des propriétés viscoélastiques du réseau FlnA/F-actine se comportant comme un gel, en effet des études réalisées *in vitro* sur des reconstitutions artificielles de réseau F-actine/FlnA ont permis de mettre en évidence que le réseau formé par la forme longue de FlnA permettait au réseau de se déformer et de maintenir son intégrité sous des contraintes atteignant les 30 Pa alors qu'un réseau formé de F-actine et d'une forme Δ H1 de la FlnA ne se déforme pas et se rompt dès les 0.1 Pa (Gardel *et al.*, 2006). En plus d'apporter de la souplesse et de la résistance au réseau FlnA/F-actine de manière statique, le clivage de la charnière H1 par les calpaïnes, des cystéine-protéases dépendantes du calcium, permet de réduire localement la réticulation orthogonale du réseau de F-actine, nécessaire à l'émission et à la formation de structures membranaires tel que les lamellipodes ou les filopodes (Perrin et Huttenlocher 2002 ; Ridley 2003). Il a en effet été montré que l'inhibition de l'activité des calpaïnes dans les cellules de mélanomes M93-047 et UACC647 par le *calpain-inhibitor-III* augmentait drastiquement la colocalisation entre FlnA et F-actine dans l'ensemble du cortex cellulaire d'actine là où en condition contrôle les cellules présentent des régions polarisées riches en actine dépourvues de FlnA, permettant à la cellule d'émettre et de former des protrusions membranaires qui pourront par la suite être stabilisées par la FlnA (O'Connell *et al.*, 2009). Il a de plus été montré *in vitro* que l'inhibition de l'activité des calpaïnes par la calpeptin dans des cellules de mélanome A7, de cancer de la prostate PC3 et de fibrosarcome murin T241 inhibe concomitamment le clivage de la Filamine A et les capacités migratoires de ces cellules en chambre de Boyden (Salimi *et al.*, 2018).

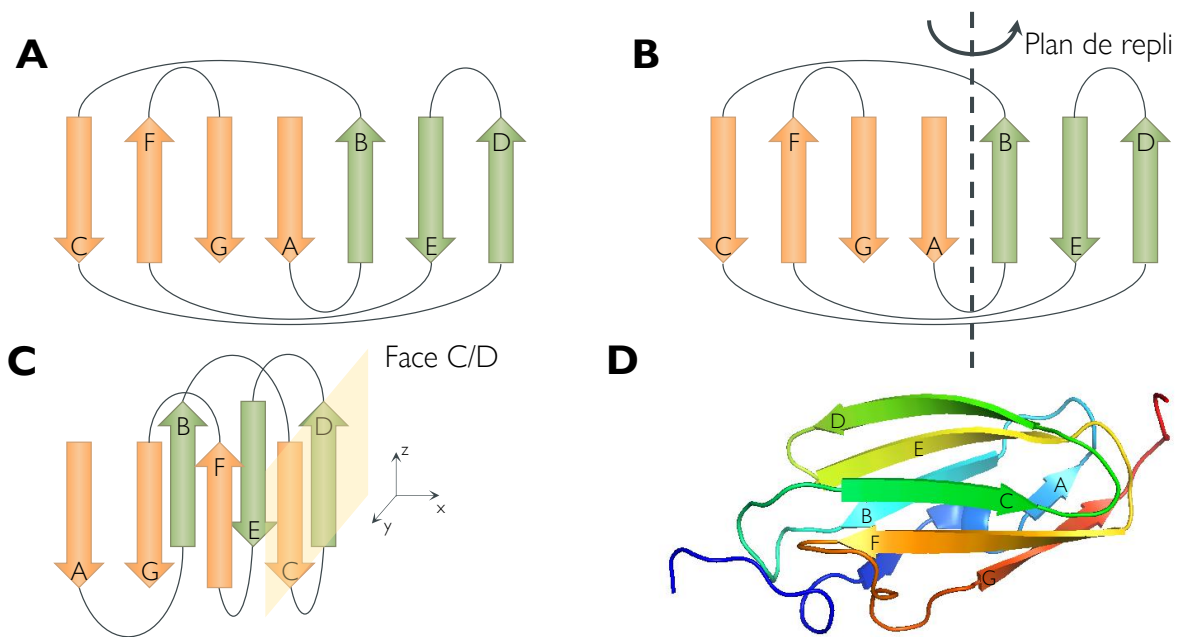


Figure 16 | Représentation schématique de l'organisation tridimensionnelle d'un domaine répété de Filamine.
A. Diagramme topologique des 7 feuillets β (A, B, C, D, E, F et G) composant un domaine répété de filamine. **B.** Positionnement du plan de repli permettant l'obtention de l'organisation 3D des feuillets entre eux. **C.** Organisation tridimensionnelle du domaine répété après repli, positionnement de la face C/D. **D.** Diagramme en ruban d'un modèle de domaine répété, le domaine 23.

II.II.A | Domaine de dimérisation des Filamines

La capacité des filamines à réticuler le réseau de F-actine repose en partie sur leur capacité à s'homodimériser *via* leur *repeat* ou domaine répété 24, ce mécanisme a d'abord été caractérisé chez *D.discoideum* (McCoy *et al.*, 1999) puis chez l'Homme (Pudas *et al.*, 2005). Dans ce cas ce mécanisme fait intervenir les feuillets β C et D du domaine répété 24 qui vont s'organiser de façon antiparallèle (Figure 17 | Domaine 24 : interface de dimérisation des filamines). Les dimères de filamines s'organisent dans une conformation dite en V responsable de leurs capacités à réticuler le réseaux d'actine orthogonalement (Gorlin *et al.*, 1990). Comme précisé plus haut, les filamines possèdent un fort pourcentage d'homologie de séquence (~70%), cette forte conservation est notamment présente au niveau du domaine de dimérisation (Pudas *et al.*, 2005), leur permettant de former des hétérodimères lorsqu'elles sont exprimées dans le même type cellulaire. Ce phénomène est notamment observé entre la FlnA et la FlnB dans les neurones lors de la corticogenèse (E14-E16) de cerveau de souris C57bl/6J. Les FlnA et B colocalisent plus particulièrement dans les précurseurs neuraux de la zone sous-ventriculaire ainsi que dans les neurones en migrations (Sheen 2002). Ce mécanisme évolutif permettrait de compenser dans

certains cas particuliers la perte de fonction d'une des 2 Filamines lors de l'ontogenèse cérébrale. En effet des hommes présentant une mutation ponctuelle du gène de la FlnA (L656F) normalement associée à la formation d'hétérotopie périventriculaire présentent néanmoins un cortex cérébral d'apparence normale suggérant que la proportion de FlnB s'hétérodimérisant avec la FlnA est capable de compenser la perte de fonction dû à la mutation ponctuelle L656F (Sheen 2002). Ce phénomène a également été proposé de façon transitoire entre la FlnA et la FlnC dans les myofibres de Poulet en développement. Dans ce cas la FlnA interagirait transitoirement avec la FlnC au cours de la mise en place des myofibres du fait de son expression permettant aux cellules embryonnaires de migrer efficacement sur le site de formation des myofibres. Une fois le tissu structuré, l'expression de la FlnA décroît pour laisser place à la FlnC, c'est lors de cette période de transition que les Filamines A et C pourraient former des dimères. Cependant aucune implication fonctionnelle ne découlerait de cette interaction puisqu'en effet la FlnC n'est détectée qu'une fois les myofibres fonctionnelles (Price *et al.*, 1994). Cependant il apparaît *in vitro* que la FlnA semble incapable de former des hétérodimères de filamines alors que les FlnB et FlnC forment des hétérodimères lorsque les *repeat 24* recombinant de chacune des isoformes sont mis en solution (Himmel *et al.*, 2003). Les mécanismes d'hétérodimérisation *in situ* des filamines ne sont pas encore complètement élucidés à ce jour, ces différences d'observation laissent penser que ces phénomènes sont soumis à des mécanismes de régulation complexes pouvant faire intervenir des parties distales des filamines et/ou d'autres partenaires protéiques.

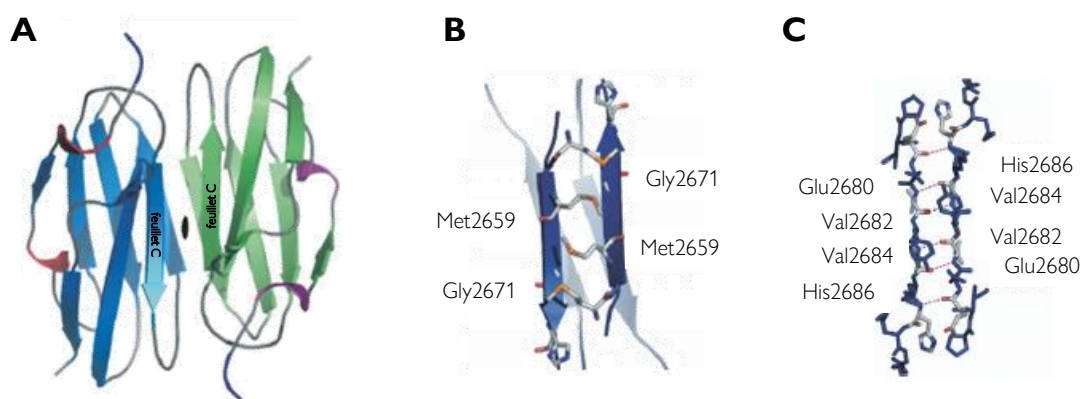


Figure 17 | Domaine 24 : interface de dimérisation des filamines. **A.** Diagramme en ruban représentant l'interface de liaison entre 2 filamines faisant intervenir les feuillets C et D respectif de chaque monomère. **B.** Regroupement Hydrophobe des feuillets C à l'interface du dimère, la Met2659 interagit avec la Gly2671 opposée. **C.** Liaisons hydrogènes établis à l'interface entre les feuillets D. (D'après Pudas *et al.*, 2005).

II.II.B | Liaison à la F-actine

Le domaine de liaison à l'actine ou *actin-binding domain* (ABD) des filamines est un domaine de type *spectrin-related actin binding domain* (srABD). Les membres de cette superfamille partagent les mêmes mécanismes d'interaction avec l'actine, ainsi les spectrines, les filamines, l' α -actinine, les nesprines, la dystrophine, la plectine et la fimbrine possèdent un ABD composé de 2 domaines de type *calponin homology* (CH), CH1 & CH2 séparés par un *linker* (Figure 18 | Représentation schématique des domaines protéiques de protéines appartenant à la superfamille possédant un *spectrin-related actin binding domain*.) (Dubreuil 1991) (Gimona *et al.*, 2002). Brièvement, l' α -actinine intervient principalement dans la fixation du réseau d'actine aux lignes Z des cellules musculaires squelettiques et participe à la formation et au maintien du réseau de F-actine lors de la migration cellulaire (Jahed *et al.*, 2014). La dystrophine participe également à l'organisation du cytosquelette dans les cellules musculaires squelettiques et lisses (Hoffman *et al.*, 1987). Les nesprines permettent de crosslinker le cytosquelette d'actine au nucléosquelette *via* sa fixation au complexe SUN (Sad1 and UNC-83) (Jahed *et al.*, 2014). La plectine est une protéine d'ancrage capable de crosslinker les filaments intermédiaires au cytosquelette d'actine, elle participe ainsi à la rigidité et à l'organisation du cytosquelette (Castañón *et al.*, 2013). La fimbrine permet d'organiser le cytosquelette d'actine de manière fasciculée à l'inverse des Filamines qui elles permettent de réticuler le cytosquelette d'actine (Christensen *et al.*, 2017). Un domaine de type srABD possède en moyenne 250 acides aminés et partage entre 20-60% d'identité avec les autres membres de la superfamille, cependant le domaine CH1 des filamines possède un site unique de liaison aux calmodulines et aux holocalmodulines pouvant réguler négativement la liaison de la F-actine au domaine ABD (Hartwing *et al.*, 1995 ; Nakamura *et al.*, 2005). Ainsi l'augmentation locale de la concentration cytosolique de calcium engendre une dissociation de la liaison actine/Filamine relayée par la fixation des calmoduline et holocalmoduline, mettant en évidence un mécanisme par lequel la cellule restructure dynamiquement son cytosquelette en réponse aux stimuli extérieurs à l'origine d'une variation locale de la concentration cytosolique de calcium. Les domaines répétés distaux 9 à 15 présents dans le *rod 1* possèdent eux aussi un domaine de liaison à la F-actine, conférant aux filamines un point d'ancrage supplémentaire à la F-actine ainsi qu'une meilleure affinité pour cette dernière. En effet une expérience de binding entre l'actine et la forme complète de la FlnA et une forme courte contenant uniquement le domaine de liaison à l'actine de la FlnA, a permis de mettre en évidence que le domaine ABD seul présentait un Kd

de liaison à l'actine de $\sim 17 \mu\text{M}$ alors que la forme complète de la FlnA possède un $K_d \sim 0,017 \mu\text{M}$ (Nakamura *et al.*, 2007).

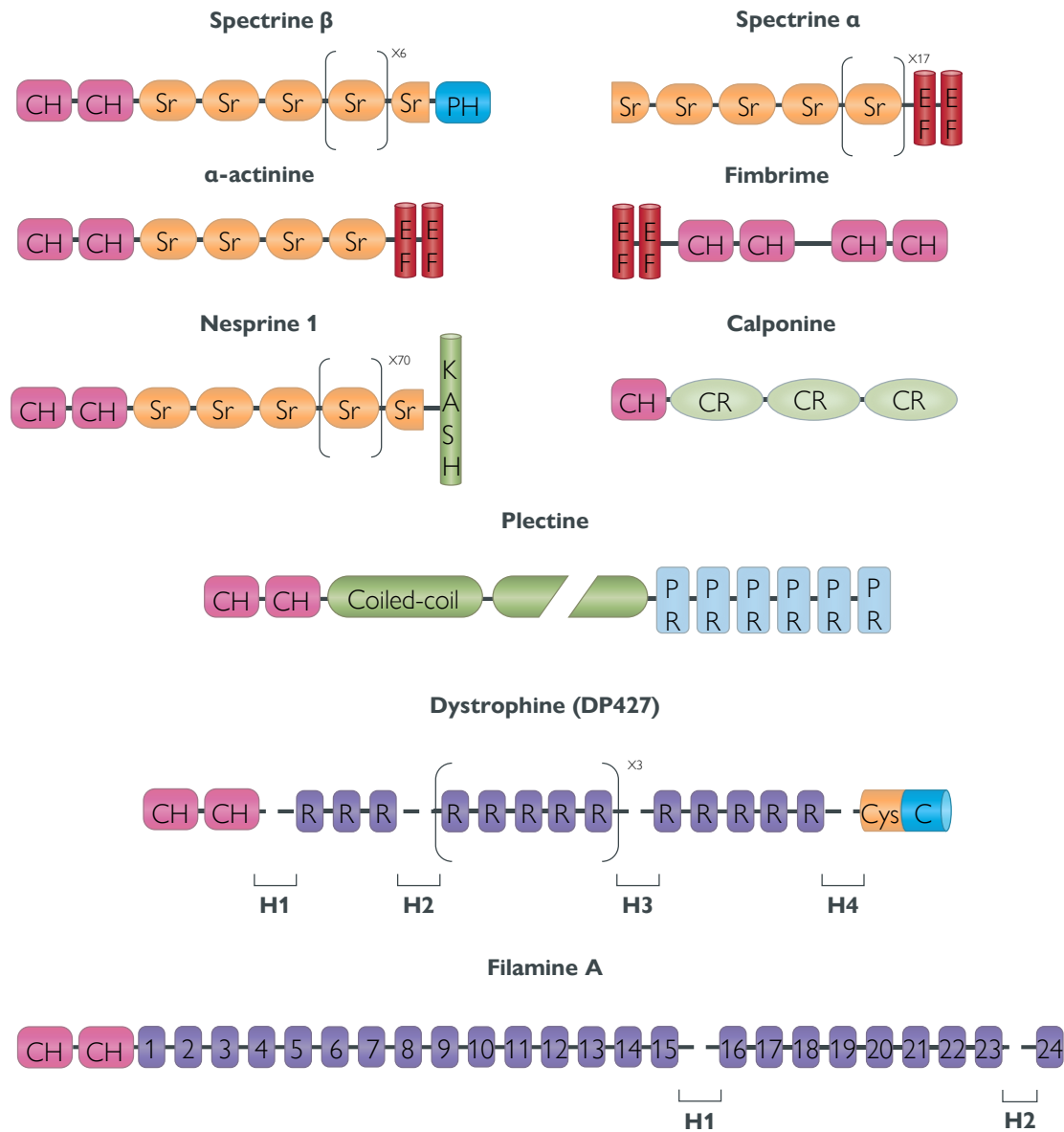


Figure 18 | Représentation schématique des domaines protéiques des protéines appartenant à la superfamille possédant un *spectrin-related actin binding domain*. Schéma illustrant l'organisation modulaire des protéines possédant un domaine CH de liaison à l'actine. Les différents modules sont colorés et annotés. C : partie C-terminale de la dystrophine ; CH : *calponin homology* ; CR : *calpononin repeat* ; Cys : Segment riche en cystéine segment ; EF : calmodulin-like domain ; H(n) : Hinge ; KASH : Klarsicht ANC-1 and Syne Homology domain ; PH : pleckstrin homology domain ; PR : *plectin repeat* ; R : *Dystrophine repeat* ; Sr : *spectrin repeat* ; 1-24 : *filamin A repeat*. (Bañuelos *et al.*, 1998 ; Nichols *et al.*, 2015 ; Rajgor *et al.*, 2013).

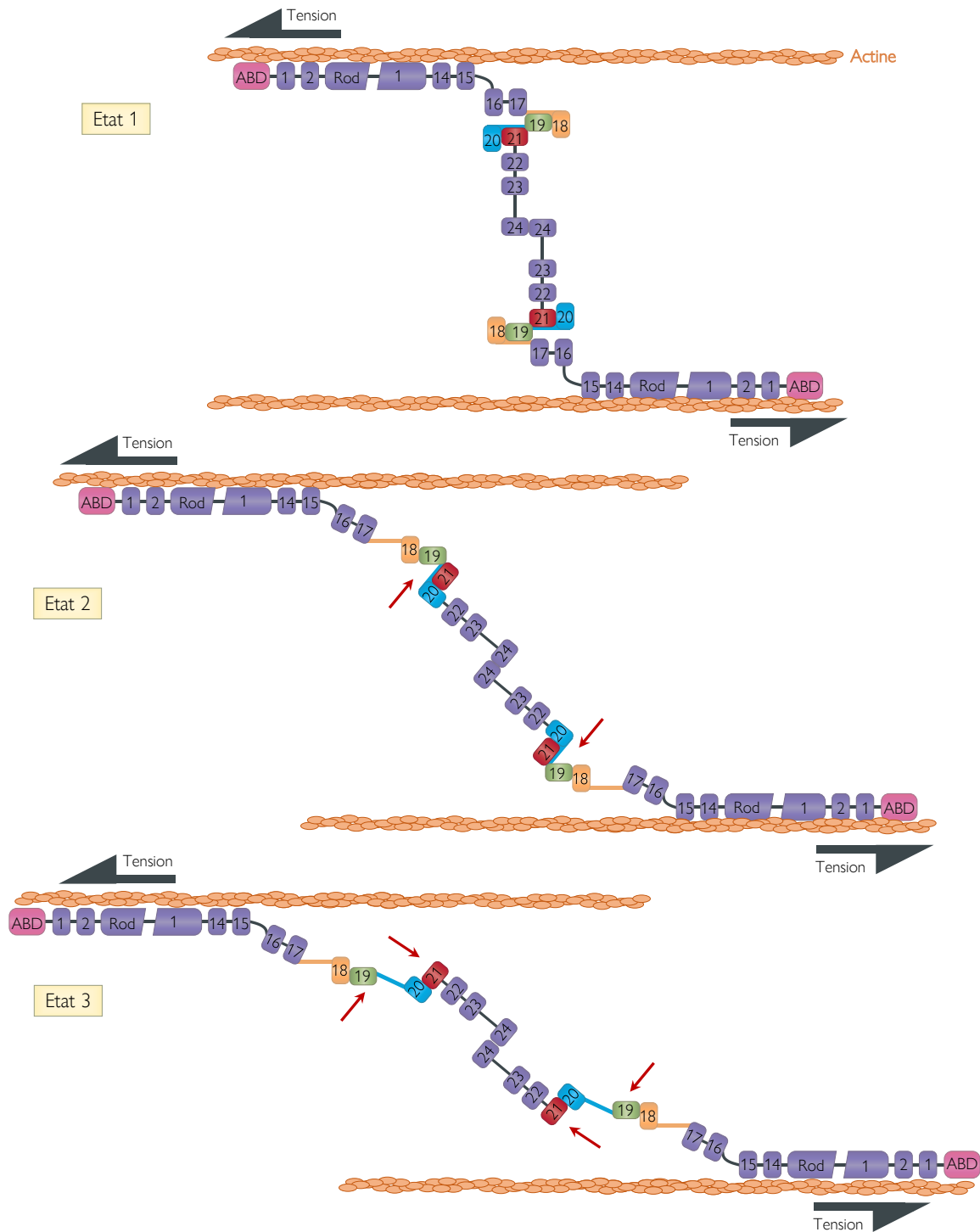


Figure 19 | Réarrangement des domaines de la Filamine A lors d'une tension exercée par la contraction des fibres d'actine. Les domaines d'intérêts sont représentés avec une couleur particulière, le domaine Rod 1 n'est pas montré explicitement. Dans l'état 1, la FlnA est complètement repliée et le domaine Rod 1 ainsi que l'ABD sont liés à l'actine. Dans l'état 2 les forces exposent la face CD du domaine répété 19 (flèche rouge), permettant aux protéines se liant à ce domaine de se fixer à la filamine. Dans l'état 3, la filamine est complètement déployée et expose la face CD du domaine répété 21 en plus de tous les autres sites de liaison déjà exposés. (Modifié d'après Pentikäinen *et al.*, 2009).

II.II.C | *Rod 2* et Domaine d'auto-inhibition : cas de la Filamine A

Contrairement au domaine *rod 1*, le domaine *rod 2* présente une organisation inter-domaine inhabituelle, alors que dans le *rod 1* les domaines sont agencés de manière linéaire pour former une chaîne rigide, ici les domaines 16-17, 18-19 et 20-21 s'organisent sous forme de paires compactes (Lad *et al.*, 2007 ; Heikkinen *et al.*, 2009). Dans les paires de domaines 18-19 et 20-21, les feuillets β de type A des domaines 18 et 20 se replient pour interagir respectivement avec les feuillets C et D (formant la face C/D du baril) des domaines 19 et 21. Ces mêmes faces C/D ont pu être caractérisées comme site d'interaction spécifique des intégrines (Kiema *et al.*, 2006 ; Takala *et al.*, 2008) et de la migfiline (Lad *et al.*, 2008 ; Ithychanda *et al.*, 2009). La face C/D du domaine 19 de la FlnA a également été montrée comme site de liaison des récepteurs dopaminergiques D2R et D3R (Lin *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2002). Vraisemblablement l'ensemble des protéines interagissant avec la FlnA semblent se lier aux domaines répétés selon les mêmes règles à savoir une fixation sur la face C/D des barils β et bien que les séquences spécifiques d'interaction n'aient pas encore été caractérisées, la littérature a pu mettre en évidence qu'un très grand nombre de partenaires protéiques de la FlnA se fixent dans le domaine *rod 2* (Nakamura *et al.*, 2011). Ce genre d'interaction entre domaines suggère que la liaison de la FlnA à certain de ces partenaires est auto-inhibée. L'exposition de ces sites cachés requière donc des changements de conformation pouvant être causés par de faibles forces mécaniques (<10pN) semblables à celles pouvant être générées par la myosine lors de la migration cellulaire. On notera que les forces nécessaires pour induire un changement de conformation de ce domaine sont bien inférieures à celles nécessaires pour changer la conformation du *rod 1* (30pN) (Finer *et al.*, 1994 ; Chen *et al.*, 2011). Ces observations ont pu être réalisées grâce à un ingénieux système de pinces magnétiques permettant d'appliquer graduellement une force de traction sur le segment de FlnA préalablement fixé sur les 2 parties du dispositif (Figure 19 | Réarrangement des domaines de la Filamine A lors d'une tension exercée par la contraction des fibres d'actine). Ce changement de conformation peut aussi être provoqué par la liaison de partenaires protéiques tel que les intégrines, la migfiline ou même des RCPGs tels les récepteurs dopaminergiques DRD2 et DRD3 (Lad *et al.*, 2007 ; Ruskamo *et al.*, 2012). Ainsi la liaison des partenaires protéiques de la FlnA au domaine *rod 2* est conditionnée par les stress mécaniques, permettant à la cellule de conditionner l'ancrage à l'actine de protéines transmembranaires en fonction du degré de contrainte appliqué au cytosquelette, ainsi l'étirement localisé à l'avant de la cellule permet d'initier la liaison des intégrines à la FlnA (Lad *et al.*, 2007). Contrairement aux paires 18-19 et 20-21, la paire 16-17

ne présente pas de phénomène d’auto-inhibition (Heikkinen *et al.*, 2009), en effet le feuillet A du domaine 16 est peu structuré et est incapable de s’associer au domaine 17, suggérant que les partenaires protéiques de la FlnA s’associant au domaine 16-17 ne sont pas soumis aux mécanismes de régulation associés au degré d’étirement du cytosquelette. De façon intéressante, cet assemblage sous forme d’un triplet de tandem conservé au cours de l’évolution est retrouvé chez *D.melanogaster* et *C.elegans* (Figure 20 | Conservation phylogénique des tandems d’auto-inhibition) (Heikkinen *et al.*, 2009).

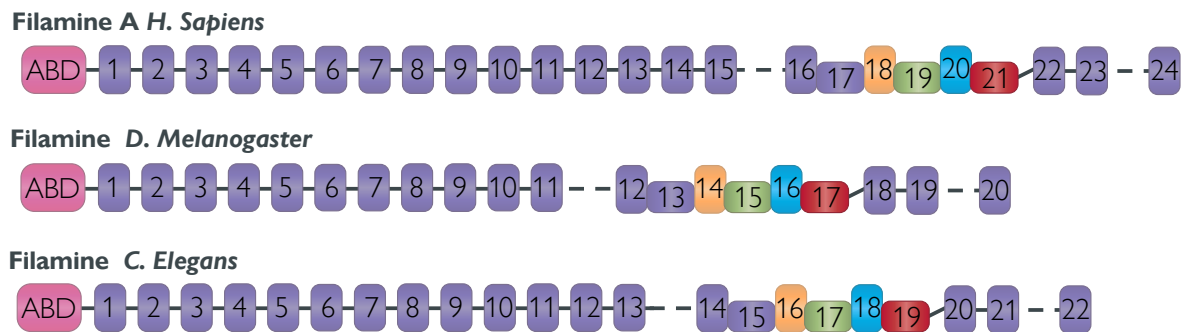


Figure 20 | Conservation phylogénique des tandems d’auto-inhibition. Positionnement des tandems d’auto-inhibition dans les Filamines humaines (*H. Sapiens*) ainsi que chez *D. Melanogaster* et *C. Elegans*. (Modifié d’après Heikkinen *et al.*, 2009).

II.II.D | Structure des domaines répétés

Comme précisé plus haut, la FlnA est composée d’une répétition de 24 domaines répétés d’environ 96 résidus (~11kDa) de type *immunoglobulin-like* issus de l’agencement antiparallèle de 7 feuillets β générant une structure tertiaire appelée baril β (Gorlin *et al.*, 1990). Suite à l’alignement des séquences des domaines répétés, Ithychanda et collaborateurs ont séparés les domaines répétés de la FlnA en 4 classes (A, B, C et D), suggérant que chaque famille de domaine répété interagit avec les mêmes partenaires protéiques. De façon intéressante, le domaine *rod 2* est constitué d’une alternance de domaines de classe A et de classe B issus de la duplication ancestrale d’un doublet à l’origine du triplet de tandem évoqué dans la partie précédente (Figure 21 | Représentation schématique des classes phylogénétiques de domaines répétés de la Filamine A) (Ithychanda *et al.*, 2009). Cette organisation des classes de domaine dans le segment C-terminal de la FlnA serait à l’origine de sa capacité à générer des clusters d’une même protéine, comme cela a pu être proposé pour les intégrines (Ithychanda, *et al.*, 2009).

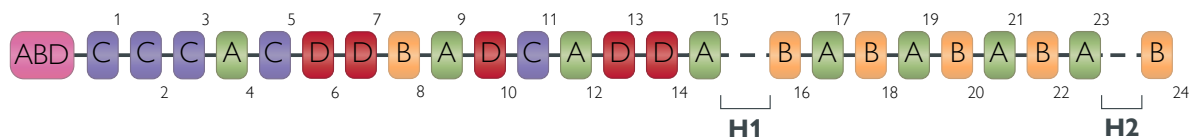


Figure 21 | Représentation schématique des classes phylogénétiques de domaines répétés de la Filamine A. La FlnA est composée de 4 classes de domaines différents (A, B, C et D) possédant de fortes homologies de séquences. (Modifié d'après Itchychanda *et al.*, 2009).

II.III | Les partenaires protéiques et fonctions de la Filamine A

Les fonctions de la FlnA au sein de la cellule peuvent se résumer en 3 points principaux. Premièrement organiser le cytosquelette d'actine ; deuxièmement, permettre la liaison du cytosquelette à la MEC par sa liaison avec un grand nombre de protéines transmembranaires impliquées dans les mécanismes d'adhésion cellulaire, troisièmement, agir en tant que plateforme d'interaction pour une grande variété de molécules impliquées dans la signalisation cellulaire.

II.III.A | Cas des molécules d'adhésions

Les intégrines sont des molécules transmembranaires impliquées dans l'adhésion cellulaire permettant aux cellules d'adhérer à leurs substrats. Elles sont exprimées sous forme d'hétérodimères issus de l'association de sous-unités α et β (Figure 22 | Organisation structurale d'un dimère d'intégrine). Chacune de ces sous-unités possède un long domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et une courte extrémité intracellulaire. La spécificité de liaison d'un hétérodimère d'intégrine est déterminée par la nature des sous-unités composant l'hétérodimère (Hynes 1987 ; Hynes 1992). La queue cytosolique de la sous-unité β est suffisante pour lier les intégrines au cytosquelette d'actine (BurrIDGE et Chrzanowska-Wodnicka 1996). La liaison de la FlnA aux intégrines requière les 3 résidus C-terminaux de la sous-unité β (Loo *et al.*, 1998). Les sous-unités β se lient avec les domaines 21 et 19 de la FlnA (Kiema *et al.*, 2006) de plus l'approche phylogénique de Itchychanda et collaborateurs, suppose qu'elles sont également capables de se lier à l'ensemble des domaines de classes A de la FlnA, à savoir les domaines : 4, 9, 12, 15, 17, 21 et 23 (Figure 20 | Modèle de clusterisation des intégrines par la Filamine A) (Itchychanda *et al.*, 2009).

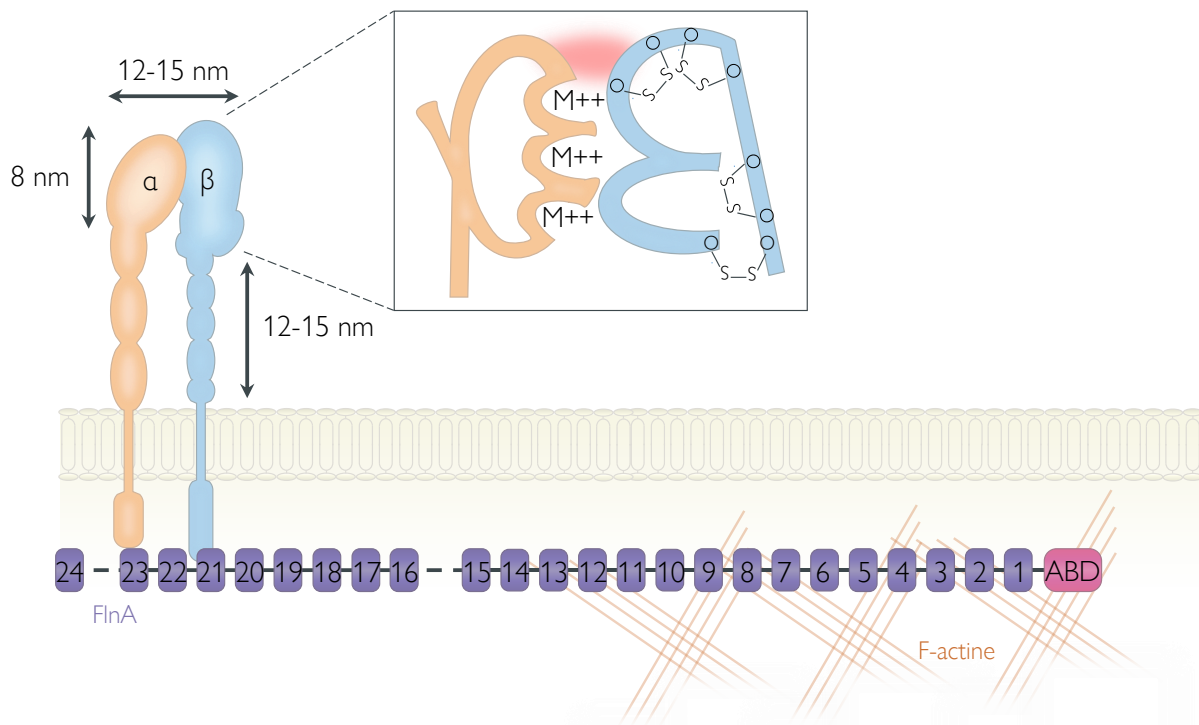


Figure 22 | Organisation structurale d'un dimère d'intégrines. Les intégrines α et β possèdent une partie extracellulaire imposante qui une fois repliée mesure ~ 20 nm de longueur alors que leurs séquences cytosoliques représentent $\sim 8-10$ nm. L'union de chacune des boucles N-terminales des intégrines forme la poche de liaison à la MEC (rouge). L'organisation 3D de la tête des intégrines β requiert 4 ponts disulfures, la tête α quant à elle possède 3 poches de liaison de cations divalents ou domaine MIDAS (*Metal Ion Dependent Adhesion Site*) (Ca^{2+} ou Mg^{2+}) (M^{++}) nécessaire à la liaison du ligand. L'interaction entre la sous-unité β du dimère d'intégrines et la FlnA permet d'ancrer le dimère au cytosquelette d'actine (Modifié d'après Bouvard *et al.*, 2013 ; Hynes *et al.*, 1992).

La FlnA interagit et stabilise l'expression des intégrines $\beta 1$ et $\beta 7$ à la membrane plasmique, en effet l'insertion de la mutation $\beta 1\text{V36,40I}$ associée à une augmentation de l'interaction entre la FlnA et l'intégrine $\beta 1$, réduit la capacité de cellules CHO à se polariser et à initier la migration. C'est la stabilisation accrue des adhésions $\beta 1$ -dépendantes qui empêchent la cellule de restructurer son cytosquelette et ses complexes d'adhésion afin de se repolariser pour migrer (Calderwood *et al.*, 2001). Il a en effet été montré que la FlnA permet la relocalisation des intégrine $\beta 1$ dans les pseudopodes et les lamellipodes de cellules HEK293 et de fibroblastes murin 3T3 (Kim *et al.*, 2010). Les auteurs ont plus particulièrement montré dans cette étude que la FlnA potentialise la phosphorylation de la vimentine par la protéine kinase C epsilon (PKC- ϵ) et que ce mécanisme était nécessaire à la relocalisation des intégrines $\beta 1$ dans les

structures membranaires polarisées tel que les pseudopodes et les lamellipodes, un mécanisme déjà décrit comme nécessaire à la migration directionnelle (Ivaska *et al.*, 2005). Une étude récente a de plus montré que l'interaction entre la FlnA et l'intégrine $\beta 2$ était nécessaire à la migration de lymphocyte T *in vitro*. *In vivo* cette interaction est nécessaire au recrutement des lymphocytes T sur le site d'inflammation dans un modèle murin d'hypersensibilité ainsi qu'au *homing* dans les ganglions lymphatiques (Savinko *et al.*, 2018). La liaison entre la FlnA et l'intégrine $\beta 2$ est conditionnée par le statut de phosphorylation de la thréonine Thr758, en effet la phosphorylation de ce résidu prévient la fixation de la FlnA à l'intégrine $\beta 2$ (Takala *et al.*, 2008). La FlnA participe donc à l'établissement ainsi qu'à la stabilisation des intégrines de façon dynamique permettant la polarisation de la cellule *via* la formation de protrusions membranaires tel que les filopodes et les lamellipodes.

L'interaction entre la FlnA avec la glycoprotéine Iba du complexe GPIb-V-IX du facteur von Willebrand est une des mieux caractérisée. Ce complexe est exprimé à la surface des plaquettes et joue un rôle clé dans les processus de coagulation (Berndt *et al.*, 1985). GPIba est la sous-unité la plus importante du complexe GPIb-V-IX, en effet sa présence est critique pour l'adhésion des plaquettes aux vaisseaux sanguins sur le site de la lésion et potentialise l'effet de la thrombine dans l'activation des plaquettes à faible concentration. La liaison de la FlnA à GPIba a été démontrée par double-hybride et pull-down (Meyer *et al.*, 1997 ; Xu *et al.*, 1998). Des études de liaison *in vitro* ont permis de mettre en évidence que la GPIba interagit avec les domaines 17 à 19 de la FlnA, cette liaison est cruciale pour le maintien de la morphologie et de l'intégrité des plaquettes, associées au maintien des propriétés adhésives du récepteur GPIb-V-IX (Mistry *et al.*, 2000 ; Englund *et al.*, 2001).

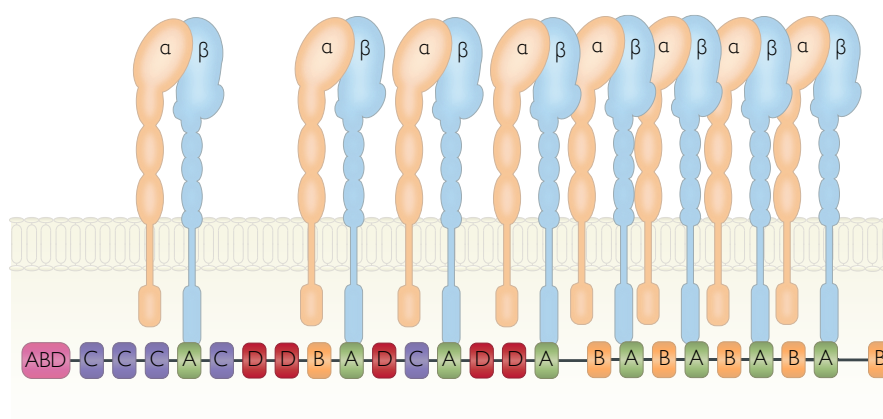


Figure 23 | Modèle de clusterisation des intégrines par la Filamine A. Liaison de 8 dimères $\alpha\beta$ d'intégrines à un monomère de FlnA aboutissant à la formation d'un cluster d'intégrines selon le modèle proposé par Ithychanda et collaborateurs. (Modifié d'après Ithychanda *et al.*, 2009).

II.III.B | GTPase de la famille Rho et effecteurs associés

Lors de la migration cellulaire, les β -intégrines se lient aux protéines de la MEC, cette liaison est suivie par l'activation de petites GTPases de la famille Rho telles que Cdc42, Rac1, Rho ou RalA. Cette activation stimule la polymérisation d'actine nécessaire à la formation de filopodes ou de lamellipodes, structures membranaires clés intervenant dans la migration cellulaire (Nobes et Hall 1995 ; Price *et al.*, 1998). La FlnA interagit avec ces petites GTPases mais aussi avec des facteurs intervenant en amont ou en aval de l'activation de ces protéines. De façon intéressante l'ensemble des GTPases de la famille Rho se lie à la FlnA sur le domaine 24, qui est le domaine de dimérisation de la FlnA (Ohta *et al.*, 1999). L'interaction entre la FlnA et RalA est nécessaire à la protrusion de filopodes dépendante de l'activité de la GTPase RalA dans des fibroblastes 3T3 (Ohta *et al.*, 1999). C'est en fait la forme active de RalA présente à la membrane avant l'émission de la protrusion membranaire qui permet le recrutement d'une forte concentration de FlnA à la membrane plasmique. De forte densité de FlnA organisent les filaments d'actine de manière parallèle et non plus orthogonale aboutissant à la formation de cette structure membranaire filiforme qu'est le filopode (Hartwig 1980 ; Hartwig et Stossel 1981). La FlnA interagit avec la sérine/thréonine kinase p21-activated-kinase-1 (PAK1), un effecteur secondaire recruté en réponse à l'activation de Rac1 et Cdc42 eux-mêmes activés par des Rho GEF (*guanine nucleotide exchange factor*). La liaison de la FlnA au domaine CRIB (*cdc42 (p21) binding domain*) de PAK1 provoque un changement de conformation d'une forme auto-inhibée vers une forme active, réciproquement PAK1 phosphoryle la FlnA ce qui la protège d'un clivage protéolytique par les calpaïnes. L'interaction physique et fonctionnelle entre ces 2 protéines est responsable de la production de replis membranaires ou *ruffles* accompagnant la migration (Vadlamudi *et al.*, 2002). D'une part PAK1 favorise la nucléation du réseau d'actine et d'autre part la FlnA permet le réticuler le réseau formé, ainsi en agissant de concert PAK1 et la FlnA permettent l'expansion membranaire dynamique initiant la migration directionnelle (Sells *et al.*, 1999). La FlnA régule également l'activité de PAK1 *via* son interaction avec la *sphingosine kinase 1* (SphK1) qui va phosphoryler la sphingosine pour générer le sphingosine-1-phosphate (S1P), un puissant stimulateur de PAK1 *via* l'activation de son récepteur S1P₁ (*Sphingosine-1-phosphate receptor*) ou par interaction directe, potentiellement inhibant la conformation auto-inhibée de PAK. L'interaction directe de la FlnA avec SphK1 permet de rapprocher et de maintenir SphK1 ainsi que PAK1 au lamellipode, favorisant ainsi le maintien de la polarisation cellulaire (Maceyka *et al.*, 2008). Au sein du lamellipode, la FlnA interagit également avec la kinase ROCK, un effecteur secondaire activé

par Rho. ROCK se lie aux domaines 21 à 23 de la FlnA *via* son domaine carboxy-terminal *pleckstrin homology domain* (PH) (Ueda *et al.*, 2003). La FlnA et ROCK colocalisent plus particulièrement dans les protrusions membranaires de cellules HeLa. Aucune interprétation fonctionnelle n'a été réalisée par les auteurs, cependant au vu des fonctions connues de ROCK et de la FlnA, on peut proposer que l'interaction entre ces 2 partenaires dans les protrusions membranaires permet de stabiliser le cytosquelette d'actine favorisant leurs formations ainsi que leurs maintiens. Tout comme ROCK, la Rac (GEF) Trio interagit avec la FlnA *via* son domaine PH, cette interaction est nécessaire au remodelage du cytosquelette d'actine relayé par Trio dans les cellules de mélanome A7 exprimant la FlnA (Bellange *et al.*, 2000). L'interaction de la FlnA avec les GEFs permet donc de polariser la polymérisation des fibres d'actine dans la cellule en migration, puisque en effet la GEF Trio perd son activité *Rac specific GEF* en absence de FlnA (Ueda *et al.*, 2003). Les GEFs réinitialisent les GTPases en échangeant le GDP par un GTP, leurs permettant ainsi de retourner à leur état initial de haute énergie. *A contrario* la FlnA lie des protéines nommées *GTPase-activating proteins* (GAPs) qui inactivent les GTPases en échangeant le GTP par un GDP, les ramenant ainsi à un état de repos. Plus spécifiquement, la FlnA lie la p190RhoGAP et inhibe son activité. Ces résultats mettent en lumière un autre mécanisme par lequel la FlnA stimule la polymérisation d'actine dans les structures polarisées ; en effet en inhibant l'activité de p190RhoGAP, la FlnA potentialise l'activité de Rho (Mammoto *et al.*, 2007). L'interaction de la FlnA à FilGAP permet la liaison de FilGAP à Rac et potentialise par conséquent l'inactivation de Rac (Ohta *et al.*, 2006). La phosphorylation de FilGAP par ROCK potentialise la liaison de FilGAP à la FlnA, alors qu'une FlnA élongée, comme elle pourrait l'être au lamellipode, interagit significativement moins avec FilGAP (Ehrlicher *et al.*, 2011). Ensemble ces résultats renforcent la fonction promigratoire de la FlnA, en expliquant que sa présence à l'arrière de la cellule, permet de réprimer la polymérisation d'actine *via* un axe ROCK-FilGAP-rac, permettant ainsi la rétraction cellulaire à l'arrière de la cellule. L'activation de l'axe Rho-ROCK est en effet inhibée à l'avant de la cellule par les GTPases cdc42 et Rac eux-mêmes spécifiquement activés par la production locale de PIP3 engendrée par l'activation de récepteurs membranaires de type RCPG tels que CXCR4 & UT ou RTK tels que c-MET ou VEGFR à l'origine de l'activation de la PI3K (Ridley 2003).

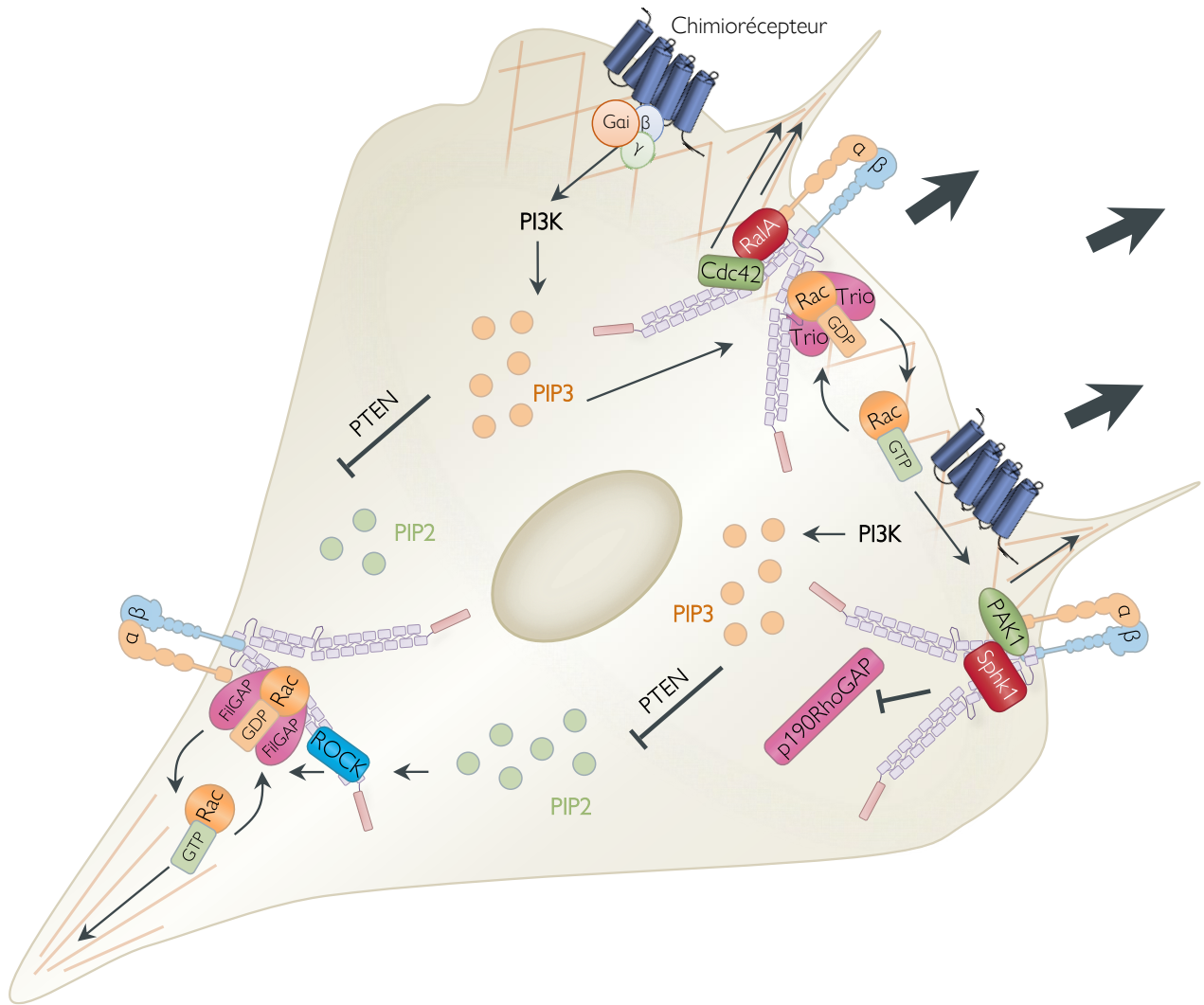


Figure 24 | Interaction Filamine A/GTPases : implication dans la migration cellulaire. La FlnA fournit une plateforme d'interaction lors de la migration directionnelle initiée par l'activation de chimiorécepteurs à l'avant de la cellule stimulant la production de PIP3 *via* la PI3K. En effet, la FlnA potentialise l'activité des Rho GEF (*guanine nucleotide exchange factor*) qui stimulent les GTPases de la famille Rho telles que Cdc42, Rho, Rac et RalA à l'avant de la cellule. Elle régule également l'activité d'effecteurs secondaires des Rho GTPase tels que PAK1 en potentialisant son activité sur la polymérisation dynamique du réseau d'actine. L'interaction de la FlnA avec la *GTPase-activating proteins* (GAP) p190RhoGAP à l'avant inhibe son activité et potentialise par conséquent la polymérisation d'actine induite par Rho à l'avant. A l'arrière l'accumulation de PIP2 générée par PTEN stimule l'activité de ROCK qui potentialise la fixation de FilGAP à la FlnA, résultant en une inhibition de l'activité de Rac à l'arrière et par conséquent à une déstabilisation du réseau d'actine, favorisant la rétraction de la queue cellulaire lors de la migration. (Modifié d'après Zhou *et al.*, 2010).

En résumé, la FlnA fournit une plateforme d'interaction aux acteurs moléculaires intervenant dans le remaniement du cytosquelette d'actine lors de la migration, elle permet d'une part de favoriser la formation de structures membranaires associées à la migration telle que les lamellipodes/*ruffles* ou les filopodes en mettant en relation les GTPases de la famille Rho ainsi que leurs activateurs et leurs effecteurs secondaires à l'avant. Et d'autre part à l'arrière de la

cellule elle permet le rapprochement d'inhibiteur des Rho GTPases, favorisant ainsi le désassemblage du cytosquelette d'actine et la rétraction de l'arrière de la cellule, tout cela sous contrôle du gradient intracellulaire du second messager PIP3 généré par l'activation polarisée de récepteurs membranaires (Figure 24 | Interaction Filamine A/GTPases : implication dans la migration cellulaire).

II.III.C | Régulation de la transcription et localisation nucléaire

La FlnA est capable d'interagir et de réguler positivement ou négativement l'activité d'un certain nombre de facteurs de transcription. Elle inhibe l'activité transcriptionnelle du complexe PEBP2/CBF (*Core-Binding Factor*), un complexe composé de 2 sous-unités : une sous-unité de liaison à l'ADN nommé Runx1 (facteur de transcription impliqué dans la TM) et une sous-unité ne liant pas l'ADN s'appelant PEBP2 β /CBF β (*Core-Binding Factor Subunit Beta*). Le facteur de liaison à l'ADN Runx1 est systématiquement détecté dans le noyau, la sous-unité PEBP2 β /CBF β est quant à elle également présente dans le cytosol. Une étude par double-hybride a permis de mettre en évidence que PEBP2 β /CBF β lie la FlnA au niveau cytosolique *via* les domaines 23 à 24. Cette interaction FlnA-PEBP2 β /CBF β permet de séquestrer PEBP2 β /CBF β dans le compartiment cytosolique, l'empêchant ainsi de lier Runx1 au niveau nucléaire (Yoshida *et al.*, 2005). Des immunomarquages dirigés contre PEBP2 β /CBF β réalisés dans les cellules de mélanomes A7 (FlnA+) et M2 (FlnA-) montrent en effet une parfaite rétention cytosolique de PEBP2 β /CBF β dans les cellules A7 alors que PEBP2 β /CBF β s'accumule au niveau nucléaire dans les lignées M2. La Filamine A prévient de la même manière les effets transcriptionnels du facteur p73 α , appartenant à la famille des protéines p53 (Kim *et al.*, 2007). Cette famille joue un rôle central dans la régulation et l'arrêt du cycle cellulaire, principalement *via* l'initiation de l'arrêt du cycle et l'apoptose lors de l'accumulation de cassures de l'ADN. De façon intéressante la FlnA se lie *via* ses domaines 21 à 24 à p73 α , elle se fixe plus particulièrement à la partie C-terminale de p73 α (Kim *et al.*, 2007). La liaison entre ces 2 partenaires aboutie à une séquestration cytosolique de p73 α dans les cellules A7 résultant en une inhibition de l'activité de p73 α . Ainsi la surexpression de la FlnA dans un contexte pathologique tel qu'une tumeur inhibera l'activité onco-suppressive de p73 α potentialisant par conséquent l'accumulation d'anomalies génétiques à l'origine de la malignité du néoplasme (Figure 25 | Domaines fonctionnels des protéines de la famille p53) (Harms et Chen 2006) (Kim *et al.*, 2007). *A contrario* la FlnA peut faciliter la translocation de PBX1 (*Pre-*

B-Cell Leukemia Transcription Factor 1) dans le noyau, favorisant ainsi son effet inhibiteur sur l'activité du facteur de transcription FOXC1 (*Forkhead Box C1*) (Berry *et al.*, 2005). FOXC1 est un facteur de transcription principalement exprimé lors du développement embryonnaire dont la pathologie associée la plus fréquente est une pathologie oculaire caractérisée par un défaut de développement de l'œil (syndrome de Axenfeld-Rieger) accompagnée du développement de glaucomes (Shields *et al.*, 1985).

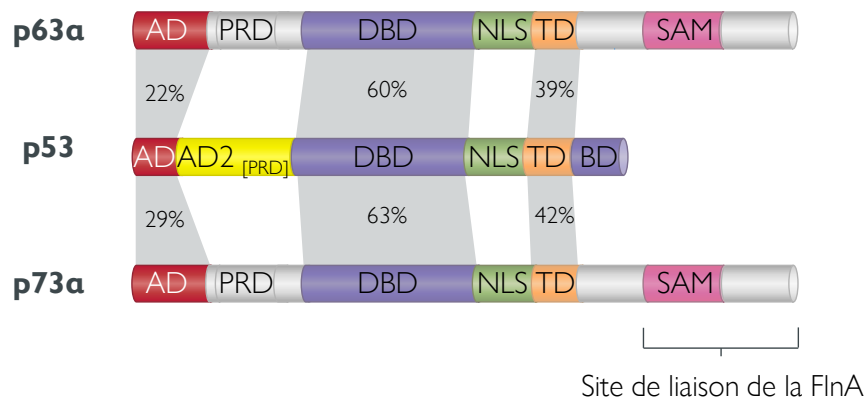


Figure 25 | Domaines fonctionnels des protéines de la famille p53. La famille de protéines p53 possède 3 membres : p63α, p53, et p73α qui possèdent à quelques exceptions les mêmes domaines fonctionnels. AD : *activation domain* ; PRD *proline-rich domain* ; DBD *DNA-binding domain* ; NLS *nuclear localization signal* ; TD *tetramerization domain* ; BD : *basic domain* ; SAM : *sterile-α-motif domain*. Les pourcentages représentent le pourcentage d'homologie existant entre chaque domaine. (Modifié d'après Harms et Chen 2006).

Enfin, la FlnA est capable d'interagir avec le récepteur des androgènes (hAR), un récepteur cytosolique composé de 5 domaines (N-terminal, *DNA binding domain*, une région charnière *Hinge*, une zone de liaison du ligand ou *Ligand binding domain* et C-terminal) pouvant être transloqué au niveau du noyau pour agir comme facteur de transcription consécutivement à son activation par ses ligands spécifiques, les androgènes. Paradoxalement, la liaison à la forme clivée de FlnA (90kDa) facilite sa translocation vers le noyau, cependant cette liaison prévient la fixation de Co-activateur du AR l'empêchant de se lier à l'ADN et inhibant son activité transcriptionnelle (Ozanne *et al.*, 2000; Loy *et al.*, 2003).

La FlnA peut également réguler positivement l'activité de facteurs de transcription, elle intervient notamment dans la régulation de l'activité de la protéine SMAD2 consécutivement à l'activation du récepteur du TGF-β. SMAD2 peut lier la FlnA dans ses domaines 20 à 24, ce qui permet à SMAD de prendre une conformation permettant la phosphorylation par le récepteur du TGF-β consécutive à son activation. En effet, l'absence de FlnA dans les cellules de mélanome M2 provoque une diminution de la phosphorylation de SMAD2 consécutive à

une stimulation par le TGF- β (Sasaki *et al.*, 2001). La liaison de FlnA à l'actine semble nécessaire puisque Sasaki et collaborateurs ont mis en évidence que la restauration de la fonction de la FlnA avec une forme tronquée ne possédant pas le domaine ABD, était incapable de restaurer la phosphorylation de SMAD2 (Figure 26 | Représentation schématique du rôle de la FlnA dans la phosphorylation de Smad2) (Sasaki *et al.*, 2001).

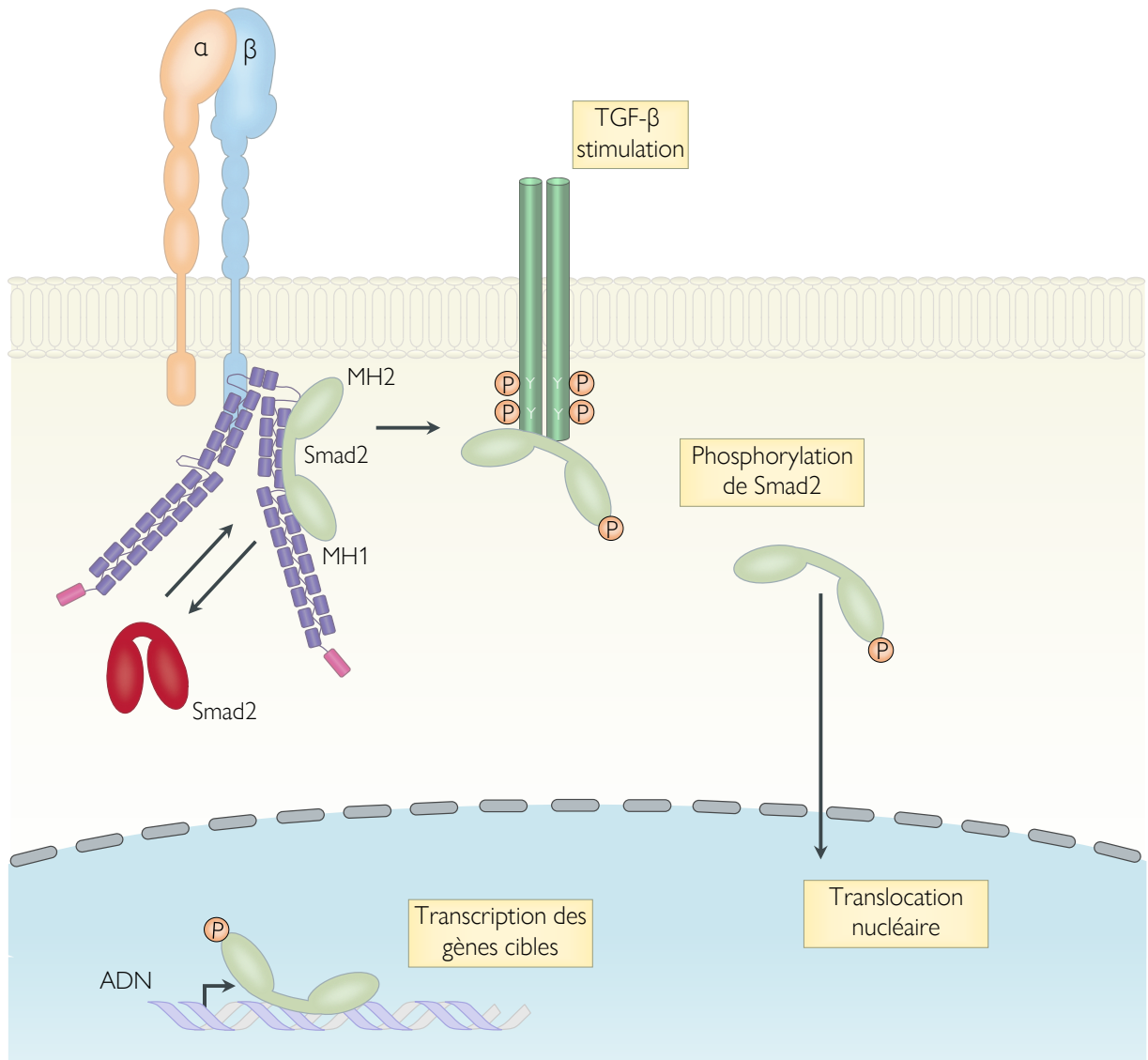


Figure 26 | Représentation schématique du rôle de la Filamine A dans la phosphorylation de Smad2. La FlnA permet l'ancrage de Smad2 proche de la membrane plasmique et du récepteur du TGF- β . Dans ces conditions la liaison de Smad2 à la FlnA prévient l'auto-association de Smad2 sous forme inactive, de plus le rapprochement à la membrane de Smad2 facilite sa phosphorylation par le récepteur du TGF- β activé. (Modifié d'après Sasaki *et al.*, 2001).

Au niveau nucléaire, la FlnA est capable de se lier à la protéine BRCA2 (*Breast Cancer 2*) (Yuan et Shen 2001). BRCA2 se lie à RAD51 (RAD51 recombinaise) et favorise sa liaison sur les sites de cassure double brin de l'ADN, lui permettant d'effectuer des recombinaisons

homologues afin de réparer les cassures. La recombinaison homologue utilise comme substrat de réparation la région d'ADN génomique présente sur le chromosome homologue afin de remplacer la zone lésée. Plusieurs protéines RAD51 se fixent sur la séquence d'ADN simple brin du site de cassure lors de la phase d'initiation de la recombinaison homologue, la structure ainsi obtenue est appelée filament nucléoprotéique, ce dernier servira de support et recevra la séquence d'ADN homologue (Mazin *et al.*, 2003). La protéine BRCA2 se lie à la FlnA *via* son domaine de liaison à l'ADN (BRCA2-DBD), une structure conservée parmi les protéines liant l'ADN. La FlnA joue un rôle clé dans les processus de recombinaison homologue consécutifs à une cassure double brin de l'ADN générée par une irradiation. En effet des cellules de mélanome M2 n'exprimant pas la FlnA ou des cellules de tumeur mammaire C8161 et MB231 sous exprimant la FlnA par siARN, sont plus sensibles à des doses croissantes de rayonnement γ . De plus on relève que les cellules M2 présentent une fréquence de recombinaison homologue nettement inférieure aux cellules A7 (Yue *et al.*, 2009). En plus de BRCA2, la FlnA interagit avec BRCA1 (*Breast Cancer 1*) *via* ses domaines 23 et 24, et dans des cellules de cancer colorectale HCT-116, la FlnA potentialise la réparation par BRCA1 de cassures double-brin consécutives à une irradiation (Velkova *et al.*, 2010). La FlnA interagit également avec des protéines faisant partie du système NHEJ (*non homologous end joining*) intervenant dans la réparation de cassure de l'ADN en joignant les extrémités non-homologues d'un site de cassure double-brin de l'ADN. Ce processus non conservatif fait notamment intervenir Ku86 (autrement appelé Ku80) et DNA-PKcs (Sous-unité cs de la protéine kinase dépendante de l'ADN), deux protéines pouvant lier la FlnA. Dans leur étude, Velkova et collaborateurs ont mis en évidence que la FlnA stabilise la formation du complexe Ku86/DNA-PKcs et favorise les réparations de cassure double brin de l'ADN *via* le système NHEJ (Velkova *et al.*, 2010).

De plus, la FlnA interagit avec une autre catégorie de protéines au niveau nucléaire, présentes dans le noyau au niveau des nucléoles, c'est l'ARN polymérase I (ARNpolI), responsable de la transcription des ARN ribosomiaux (ARNr). Cette interaction aboutit à une inhibition de l'activité de l'ARNpolI et par conséquent à une inhibition de la production d'ARNr. Cet effet est indépendant de la liaison à l'actine, puisque la ré-expression de la FlnA dans les cellules M2 (déficientes en FlnA), à l'aide d'un vecteur codant une forme tronquée de la FlnA ne possédant pas le ABD, permet la restauration complète de la production d'ARNr (Figure 27 | Interaction de la FlnA avec les protéines nucléaires) (Deng *et al.*, 2012).

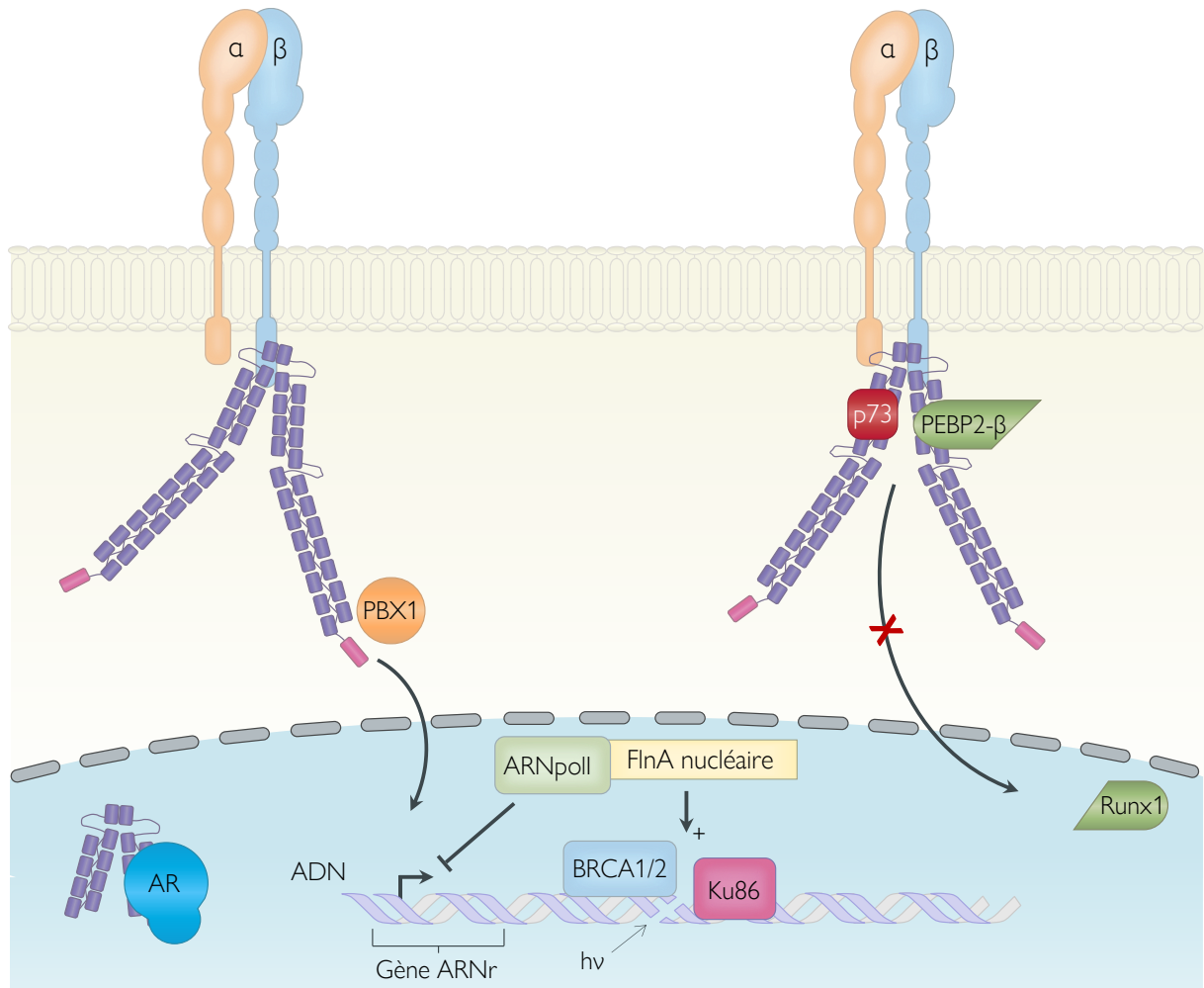


Figure 27 | Interaction de la Filamine A avec les protéines nucléaires. La FlnA inhibe la translocation nucléaire de p73 et PEBP2 β /CBF β (noté PEBP2 β) en gardant ces protéines ancrées dans le compartiment cytosolique, la rétention de PEBP2 β /CBF β prévient sa dimérisation à Runx1, inhibant par conséquent son activité transcriptionnelle. Au contraire la FlnA facilite la translocation nucléaire de PBX1 et sa forme clivée potentialise le transfert du récepteur aux androgènes dans le noyau. Dans le noyau la FlnA interagit avec des facteurs de réparations des cassures double brin pour potentialiser l'activité de ces systèmes. En interagissant avec BRCA1 et BRCA2 la FlnA potentialise la réparation de cassure double brin par recombinaison homologue et lorsqu'elle se lie à Ku86 elle favorise les réparations *via* le système NHEJ. La liaison l'ARNpoll à la FlnA dans les nucléosomes represse la transcription des ARN ribosomiaux.

II.III.D | Interaction avec les RCPGs et β -arrestines

Les RCPGs sont une famille de récepteurs membranaires composés de plus de 800 membres impliqués dans la régulation d'un large éventail de fonctions cellulaires (Wootten *et al.*, 2018), telles que la migration, la survie ou la croissance cellulaire. La relation entre les RCPGs et le remaniement du cytosquelette ainsi que le degré d'implication dans la modification du phénotype cellulaire en condition physiologique et physiopathologique est très largement étudié. Les principaux représentants de la famille des protéines G (*Gas*, *Gai/o*, *Gaq*, *Ga12/13*)

influencent tous *in fine* la polymérisation du cytosquelette d'actine *via* des cascades de transduction distinctes afin de réguler un panel de fonction dépendant du remaniement du cytosquelette (motilité, polarisation et adhésion, morphologie cellulaire, division cellulaire, exo/endocytose, expression génique et survie) (Figure 28 | Signalisation des RCPGs impliquées dans la polymérisation d'actine) (Vázquez-Victorio *et al.*, 2016). Réciproquement la FlnA permet de mettre en relation certains RCPGs avec le cytosquelette d'actine apportant une voie de rétrocontrôle du cytosquelette sur l'activité et la localisation des RCPGs. En liant ces récepteurs, la FlnA régule d'une part leurs localisations subcellulaires et d'autre part leurs couplages et leurs signalisations, ainsi que leurs devenir cellulaires.

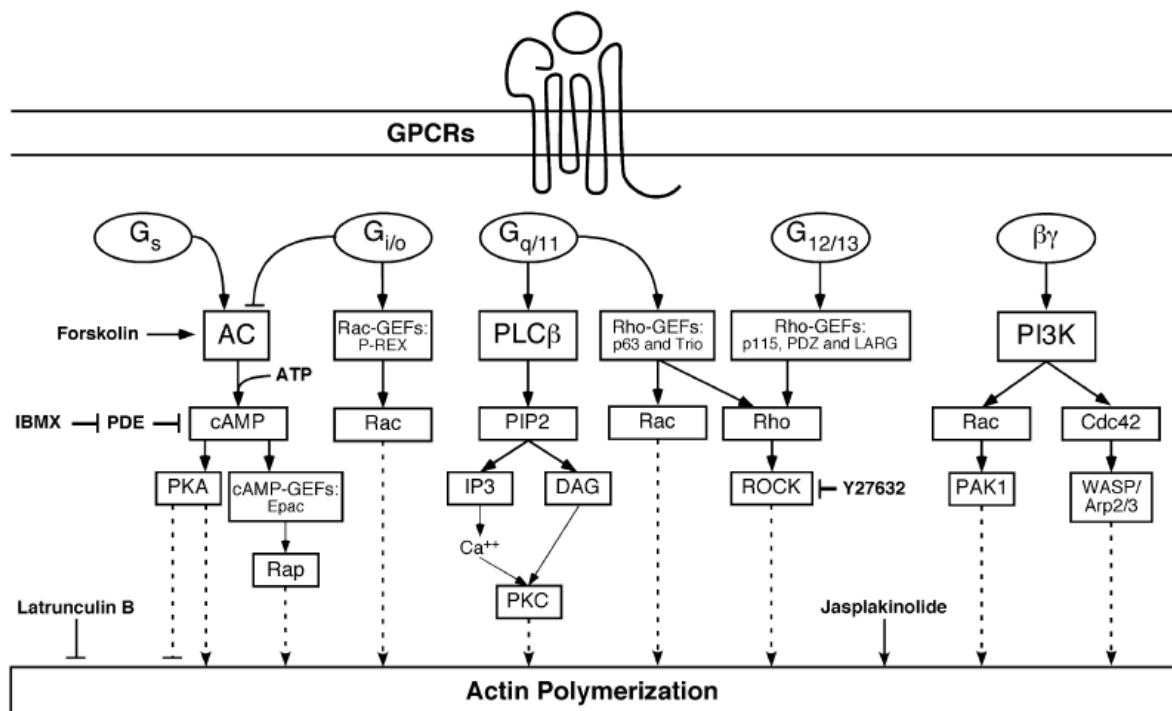


Figure 28 | Signalisation des RCPGs impliqués dans la polymérisation d'actine. Les voies de signalisation activées par les RCPG sont capables de moduler la polymérisation d'actine selon différentes voies. La voie G12/13/Rho/ROCK est la voie la plus forte contrôlant la polymérisation d'actine, la polymérisation d'actine induite par les voies Gq et Gi/o est plus modérée que celle induite par G12/13. *A contrario* la voie Gs/AMPC prévient la polymérisation d'actine. De fait la dynamique de réorganisation du cytosquelette d'actine est étroitement liée aux variations des concentrations cytosoliques d'AMPC. (D'après Vázquez-Victorio *et al.*, 2016).

II.III.D.1 | Récepteurs métabotropiques du glutamate

Les domaines 21-22 de la FlnA sont capables d'interagir avec différents sous-type de récepteurs métabotropiques du glutamate, les récepteurs mGluR4a, mGluR5a, mGluR5b, mGluR7a, mGluR7b et mGluR8a interagissent avec la FlnA en impliquant leur domaine C-terminal. (Figure 29 | Domaines d'interaction des RCPG avec la Filamine A). Plus

particulièrement, les récepteurs mGluR4a, mGluR5a, mGluR7a, mGluR7b et mGluR8a présentent une tyrosine conservée (Y916) dans la région C-terminale cytosolique jouant un rôle clé dans l'interaction à la FlnA. En effet une substitution de cette tyrosine en sérine (Y916S) abolit totalement la liaison du récepteur mGluR7b à la FlnA (Enz 2002 ; Enz et Croci 2003). Bien qu'aucune étude fonctionnelle n'ait été réalisée entre les récepteurs métabotropiques du glutamate et la FlnA, les auteurs proposent que du fait de son rôle de plateforme, la FlnA interviendrait dans la formation de complexes macromoléculaire comprenant les récepteurs métabotropiques du glutamate au niveau synaptique.

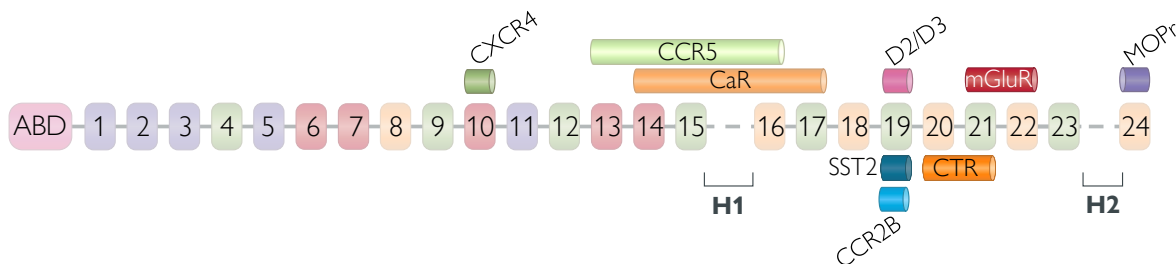


Figure 29 | Domaines d'interactions des RCPG avec la Filamine A. L'interaction des récepteurs CaR CCR2B, CCR5, CTR, CXCR4, D2/D3, mGluR, MOPr et SST2 a été validée par double hybride ou par co-immunoprécipitation. Alors que le domaine spécifique d'interaction est clairement caractérisé pour les récepteurs CCR2B, CXCR4, D2/D3, MOPr et SST2 les sites spécifiques de liaison des récepteurs CaR, CCR5, mGluR et CTR ne sont pas complètement élucidés à ce jour. On notera que le segment C-terminal semble être un lieu privilégié pour la liaison des RCPG.

II.III.D.2 | Calcium sensing receptor

Le RCPG activé par le calcium ou *calcium sensing receptor* (CaR) peut également interagir avec la FlnA. Cette liaison s'effectue entre les domaines 14 à 17 de la FlnA et la partie C-terminale (aa907-aa997) du CaR (Figure 29 | Domaines d'interaction des RCPG avec la Filamine A). Des études fonctionnelles menées dans les cellules de mélanomes A7 (FlnA⁺) et M2 (FlnA⁻) ont permis de mettre en évidence que la FlnA est nécessaire à l'activation de ERK1/2 (phospho-ERK1/2) consécutivement à la stimulation de CaR, alors que l'activation des MAPK n'est pas modifiée en son absence, suggérant des mécanismes dépendants et indépendants de la FlnA. De façon intéressante, la transfection transitoire d'un vecteur codant la partie C-terminale (aa907-aa1022) du récepteur CaR, permettant la synthèse d'un peptidomimétique interagant inhibe l'activation de ERK1/2 consécutive à la stimulation du CaR dans des cellules HEK-293 (Awata *et al.*, 2001 ; Zhang et Breitwieser 2005), suggérant une possible interférence dans l'association de CaR et de la FlnA. L'expression de la FlnA semble aussi contribuer à maintenir les niveaux d'expressions du CaR, puisqu'en effet dans les cellules M2, les niveaux d'expression protéique du CaR sont significativement plus faibles que

dans les cellules A7. De plus la co-transfection de la FlnA avec le CaR augmente significativement l'expression protéique du CaR, suggérant que la FlnA stabilise l'expression du récepteur, les mécanismes associés sont cependant non élucidés à ce jour (Zhang et Breitwieser 2005). Deux voies sont envisageables, on peut considérer d'une part que la FlnA protège le récepteur de la dégradation et d'autre part, que la FlnA peut agir de concert avec certains facteurs de transcription pour potentialiser l'expression d'ARNm codant le CaR.

II.III.D.3 | Récepteurs chimiotactiques

Un criblage double-hybride a permis de mettre en évidence que le domaine 10 de la FlnA interagit avec la troisième boucle intracellulaire du récepteur chimiotactique CXCR4 (Figure 29 | Domaines d'interaction des RCPG avec la Filamine A). Une étude menée dans les cellules A7 (FlnA⁺) et M2 (FlnA⁻) a révélé que la FlnA n'intervient pas dans la stimulation de la mobilisation calcique consécutive à l'application de SDF-1 α sur ces cellules transfectées transitoirement avec le vecteur codant CXCR4. Cependant, la transfection d'un vecteur codant les domaines 10-12 de la FlnA inhibe spécifiquement la migration directionnelle de cellules Jurkat en condition de gradient de SDF-1 α en chambre de Boyden (Jiménez-Baranda *et al.*, 2007). Dans cette étude, Jiménez-Baranda et collaborateurs ont également mis en évidence par double-hybride que le récepteur CCR5, *via* son domaine c-terminal, peut lier les domaines 13-16 de la FlnA (Figure 29 | Domaines d'interaction des RCPGs avec la Filamine A). De même que pour CXCR4, la FlnA ne modifie pas la mobilisation calcique consécutive à l'activation du CCR5, mais entraîne un remaniement du cytosquelette d'actine suite à l'activation de CCR5 (Jiménez-Baranda *et al.*, 2007).

Le récepteur CCR2B, un autre récepteur appartenant à la famille des récepteurs chimiotactiques est capable de se lier à la FlnA. La partie cytosolique C-terminale du CCR2B (aa314-aa360) se fixe au domaine *rod 2* de la FlnA. La validation de cette interaction par double-hybride a mis en évidence que des fragments codant les domaines 16-19 et 19-24 lient la FlnA, alors que les domaines 18, 23 ou 24 seuls n'interagissent pas avec la FlnA, suggérant que la liaison de CCR2B à la FlnA implique le domaine 19 (Figure 29 | Domaines d'interaction des RCPGs avec la Filamine A). Le CCR2B et la FlnA sont retrouvés co-exprimés à la surface de lignées de cellules immunitaires humaines Mono Mac 1 et THP-1, et ces 2 partenaires protéiques sont également co-exprimés avec la FlnA dans les lamellipodes de cellules de mélanome A7 suggérant un rôle majeur dans la migration chimiotactique. Même si la FlnA

n'intervient pas dans l'expression constitutive à la membrane du récepteur dans les cellules A7 et M2, ni dans le recrutement de la β -arrestine-2, elle est cependant nécessaire à l'internalisation rapide du CCR2B suite à son activation par CCL2 (Minsaas *et al.*, 2010). Ainsi, l'absence de FlnA est associée à une accumulation de CCR2B dans les endosomes précoces suite à un traitement avec CCL2, associée à une motilité plus lente des vésicules CCR2B positives, suggérant que la FlnA joue un rôle central dans le trafic et la relocalisation du récepteur consécutive à son internalisation. Mais il faut aussi noter que l'activation du récepteur CCR2B, provoque la phosphorylation de la sérine 2152 (S2152) de la FlnA *via* une voie G_q / PKC-dépendante. En effet dans leur étude les auteurs ont montré que l'application d'un inhibiteur de PKC, le bisindolylmaleimide II, prévenait la phosphorylation de la FlnA relayée par l'activation du CCR2B, alors qu'un inhibiteur spécifique de PKA, le H-89, n'avait aucun effet sur cette phosphorylation. De façon intéressante, une forme mutée de la FlnA ne possédant pas ce résidu S2152 (FlnA-S2152A), est absente des endosomes, suggérant que la phosphorylation S2152 déclenche l'accumulation de la FlnA dans le compartiment endosomal (Pons *et al.*, 2017). Tout comme pour CXCR4, l'inhibition de l'expression de la FlnA par siARN dans des cellules THP-1 inhibe la migration directionnelle évoquée par CCL2 (Minsaas *et al.*, 2010).

II.III.D.4 | Récepteurs opioïdiques

Les opiacés sont spécifiques chez l'Homme de 3 types de RCPG appelés mu (MOR), delta (DOR) et kappa (KOR). Le récepteur opioïdique MOR interagit avec le domaine 24 de la FlnA *via* sa partie cytosolique C-terminale (aa333-aa400) (Figure 29 | Domaines d'interaction des RCPGs avec la Filamine A). Comme pour le récepteur CCR2B, la FlnA n'impacte pas l'expression membranaire constitutive du MOR dans les cellules A7 et M2, mais est nécessaire à l'internalisation rapide du récepteur après stimulation associée à une désensibilisation (Onoprishvili *et al.*, 2003). De façon intéressante une forme tronquée de la FlnA ne possédant pas l'ABD est capable de restaurer la désensibilisation du récepteur dans des cellules M2 après stimulation, suggérant que les fonctions de la Filamine A impliquées dans la physiologie du récepteur MOR sont indépendantes de la liaison au cytosquelette d'actine (Onoprishvili *et al.*, 2008). L'activation de MOR entraîne là encore une phosphorylation rapide et transitoire de ERK1/2. Les cellules M2 présentent une activation de ERK1/2 similaire à celle observée dans les cellules A7, cependant la phase d'inactivation, quant à elle, est plus lente que dans les cellules exprimant la FlnA. Cette phase d'inactivation rapide est partiellement restaurée lorsque

les cellules M2 sont transfectées avec le vecteur codant la forme tronquée de la FlnA ne possédant pas l'ABD (Onoprishvili *et al.*, 2008).

II.III.D.5 | Récepteurs dopaminergiques

Les récepteurs dopaminergiques D2R et D3R interagissent eux aussi avec la FlnA, et cette interaction fait partie des mécanismes les mieux caractérisés. La troisième boucle intracellulaire ICL3 des récepteurs D2R et D3R peut se fixer sur la face C/D du domaine répété 19 de la FlnA (Figure 29 | Domaines d'interaction des RCPG avec la Filamine A) (Lin *et al.*, 2001 ; Lin *et al.*, 2002). La présence de FlnA est essentielle à l'expression membranaire de D2R et D3R (Lin *et al.*, 2001), de plus la transfection d'un vecteur codant le fragment de la FlnA spécifique de l'interaction avec D2R et D3R, bloque l'adressage membranaire de ces derniers (Lin *et al.*, 2002). De façon intéressante il a été montré que la FlnA, la β -arrestine-2 et le D3R forment un complexe ternaire en absence de stimulation, et que la stimulation du récepteur par la dopamine et/ou une augmentation de l'activité de la GRK2/3 (*G protein-coupled receptor kinase 2/3*) provoque une dissociation de ce complexe (Kim *et al.*, 2005). Les GRK2/3 sont connues pour phosphoryler les RCPG en réponse à leur activation, ce qui déclenche consécutivement le recrutement des β -arrestines et leur internalisation. De plus, une augmentation de l'activité de la GTPase RalA provoquée par l'inhibition de l'expression de la FlnA, a pour conséquence de prévenir la liaison de GRK2 au D2R, réprimant ainsi l'endocytose et le recyclage constitutif de D2R aboutissant à une diminution de l'expression membranaire du récepteur D2R après stimulation (Lin *et al.*, 2002 ; Kim *et al.*, 2005).

De même l'inhibition de l'activité de GRK2 par RalA prévient la fixation de β -arrestine-2 et inhibe la stimulation secondaire de ERK1/2 consécutive à l'activation de D3R (Zheng *et al.*, 2016). On notera que l'absence de FlnA prévient le couplage D3R à la protéine Gao, accompagnée d'une réduction significative de l'inhibition de la production d'AMPc, consécutive à l'activation de D3R dans des cellules HEK-293 (Zheng *et al.*, 2016). En d'autres termes, la FlnA contrôle l'activité et le trafic des récepteurs dopaminergiques de manière directe *via* une interaction physique, et de manière indirecte en régulant l'activité de la GTPase RalA (Figure 30 | Rôle de la Filamine A et RalA dans la régulation du trafic intracellulaire des récepteurs dopaminergiques D2R et D3R) (Zheng *et al.*, 2016).

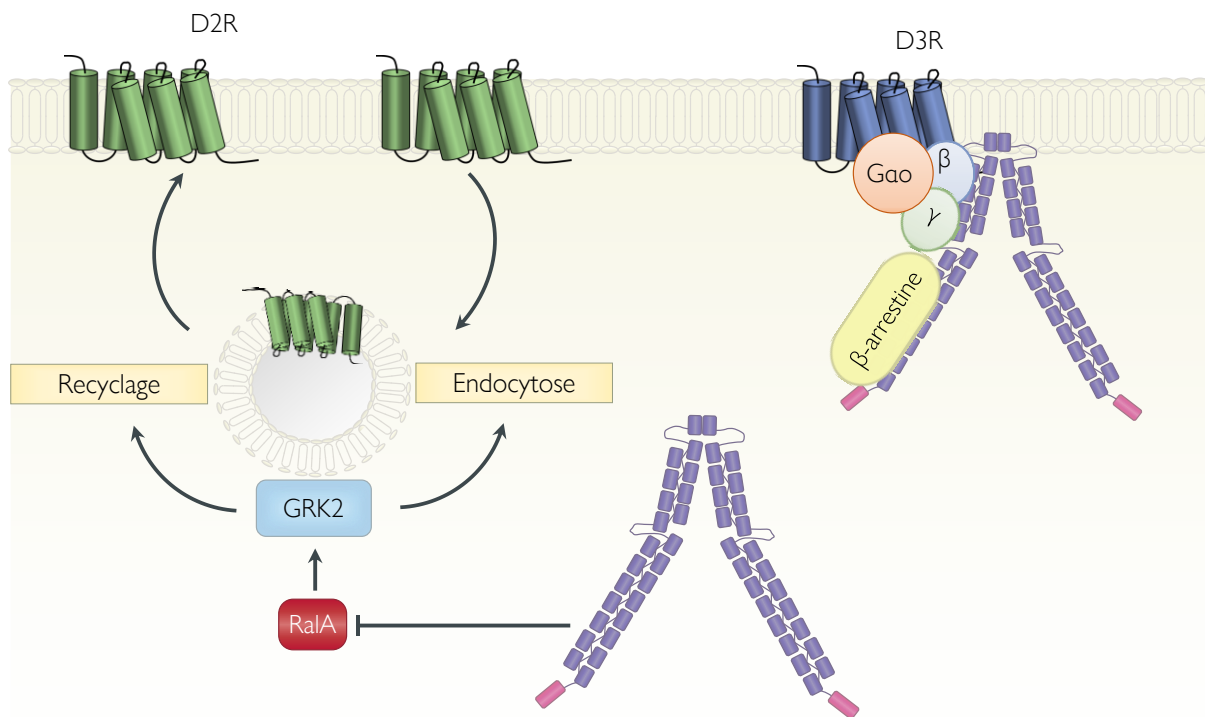


Figure 30 | Rôle de la Filamine A et RalA dans la régulation du trafic intracellulaire et le couplage des récepteurs dopaminergiques D2R et D3R. La FlnA inhibe l'activité de RalA, et inversement RalA exerce un effet négatif sur l'endocytose et le recyclage constitutif du récepteur D2R relayé par l'activité de GRK2 qui contrôle la désensibilisation du récepteur. L'activité de RalA inhibe la signalisation du récepteur D3R via une voie β -arrestine dépendante. La FlnA est nécessaire à l'expression membranaire du D3R indépendante de RalA. De plus la FlnA permet au récepteur D3R de coupler la protéine G α o et permet de rapprocher physiquement la β -arrestine2 du D3R ce qui a pour conséquence de potentialiser le recrutement de cette dernière après phosphorylation par la GRK2 (Modifié d'après Zheng *et al.*, 2016).

II.III.D.6 | Récepteurs calcitoninergiques

La calcitonine est une hormone peptidique produite en grande partie dans la thyroïde qui possède un seul récepteur de type RCPG, le CTR (*Calcitonin Receptor*) (Foster 2010). Le fragment C-terminal de ce récepteur (aa398-aa474) se lie aux domaines 20-21 de la FlnA (Figure 29 | Domaines d'interaction des RCPGs avec la Filamine A). L'interaction entre la FlnA et CTR réduit sa dégradation et augmente son recyclage à la membrane à partir du compartiment endosomal, et dans le même temps, l'activation de CTR, inhibe la protéolyse constitutive de la FlnA, un phénomène associé à une augmentation du recyclage de CTR (Seck *et al.*, 2003).

II.III.D.7 | Récepteurs somatostatinerigique

La première boucle intracellulaire ICL1 du récepteur SST2 de la somatostatine interagit également avec la FlnA. Plus précisément, la première boucle intracellulaire de SST2 interagit

avec les domaines 19-20 de FlnA. Une simulation dans des expériences de *docking* suggère que les acides aminés hydrophobes I65, Y66, et V67 de la ICL1 de SST2 se lient plus particulièrement au domaine répété 19 (Figure 31 | Modélisation du complexe SST2_{il1}-FlnA_{D19}) (Najib *et al.*, 2012). Cette liaison est nécessaire pour relayer l'activité de SST2 sur l'inhibition de l'activation de la cycline D1 et des caspases 3/7 lorsqu'il est activé dans des cellules GH3 d'hypophyse de rat (Peverelli *et al.*, 2014).

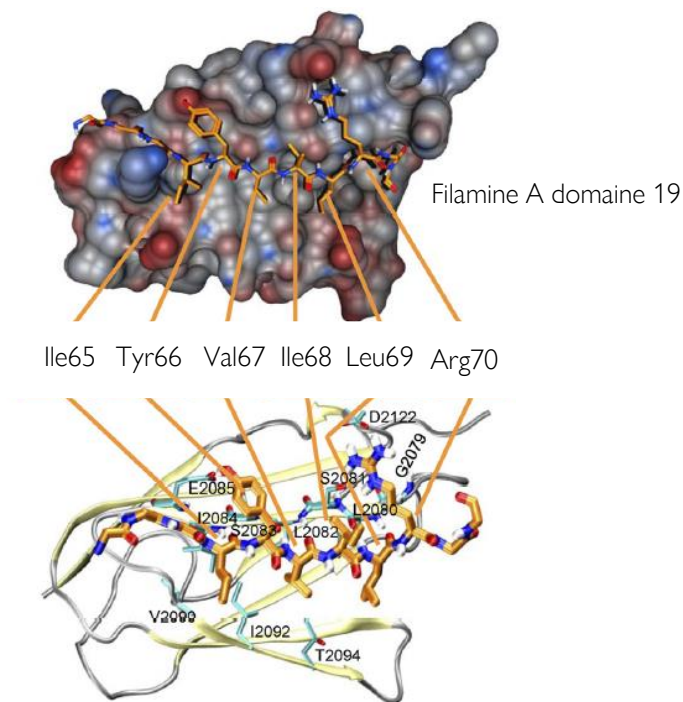


Figure 31 | Modélisation du complexe SST2_{il1}-FlnA_{D19}. Représentation des surfaces de van der Waals du domaine 19 de la FlnA montrant les interactions hydrophobes entre la boucle il1 du SST2 (SST2_{il1}) et le domaine 19 de la FlnA (FlnA_{D19}). (d'après Najib *et al.*, 2012).

De façon intéressante il a récemment été montré que la surexpression d'une forme phosphomimétique de la FlnA, la FlnAS2152D, dans les cellules GH3 prévenait la liaison de SST2 à la protéine G α i, suggérant l'existence d'un mécanisme dynamique de régulation du couplage du SST2 dépendant du niveau de phosphorylation de la FlnA. De plus l'expression d'un dominant négatif de la FlnA codant la séquence d'interaction entre SST2 et la FlnA prévient l'expression membranaire du récepteur à la membrane plasmique, et de façon intéressante la surexpression d'un vecteur codant une forme tronquée de la FlnA contenant les domaines 21 à 24, inhibe les effets de SST2 sur l'activité des caspases 3/7 et de ERK1/2 (Peverelli *et al.*, 2014). La sous-unité régulatrice de la voie PI3K, p85, se lie à l'ICL1 de SST2, cette liaison lève l'inhibition de p85 sur la voie PI3K et favorise par conséquent l'activation de cette dernière (Bousquet *et al.*, 2006). La stimulation de SST2 libère la p85, mais de façon

intéressante, la FlnA et p85 possèdent le même site de liaison avec SST2, la compétition entre ces 2 protéines constituerait un axe de régulation des voies de prolifération reposant sur un switch de signalisation à partir d'un RCPG et régulée par la présence de la FlnA (Najib *et al.*, 2012).

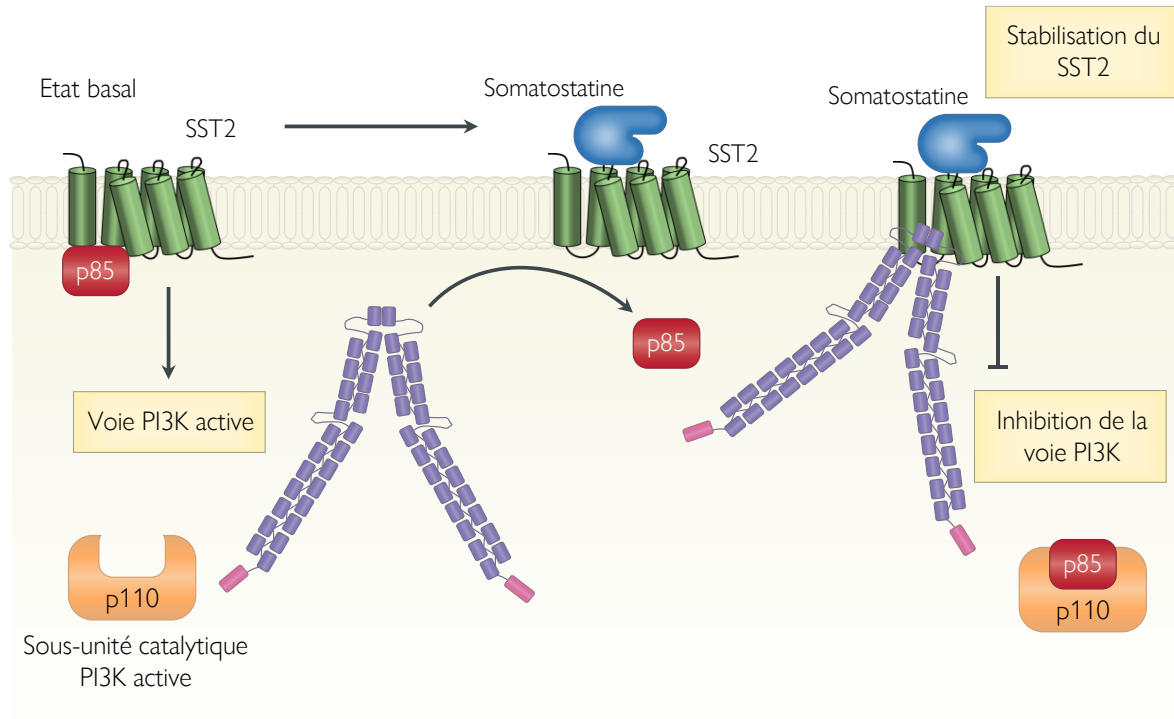


Figure 32 | Modèle de contrôle de la voie PI3K par le récepteur SST2 : implication de la Filamine A. En condition basale le récepteur SST2 est lié à la sous-unité régulatrice p85 du complexe PI3K, laissant la sous-unité catalytique p110 libre. L'activation du récepteur SST2 par la somatostatine provoque la dissociation de p85 en faveur de la liaison à la FlnA, ayant pour conséquence l'inhibition de la voie PI3K et la stabilisation du récepteur à la membrane plasmique. (Modifié d'après Najib *et al.*, 2012).

La FlnA régule donc l'activité de SST2 *via* 3 axes : en favorisant le maintien de l'expression du récepteur à la membrane après stimulation d'une part, en empêchant la liaison de la sous-unité régulatrice des PI3K p85 et en permettant le couplage dynamique de la protéine Gαi au SST2 d'autre part. (Figure 32 | Modèle de contrôle de la voie PI3K par le récepteur SST2 : implication de la Filamine A).

II.III.D.8 | β -arrestines

Après activation, les RCPGs présentent la plus part du temps une « désensibilisation » ou « inactivation » permettant le recrutement transitoire des voies de signalisation associées au RCPG en question, et protège la cellule contre une stimulation excessive. Ce processus fait

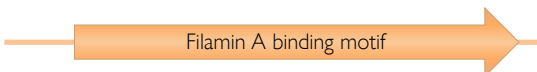
généralement intervenir 2 types de protéines, les GRKs et les β -arrestines. Les GRKs sont capables de phosphoryler des résidus sérine/thréonine présents sur la face cytosolique des RCPGs. Les RCPG ainsi phosphorylés par les GRKs présentent une affinité accrue pour les β -arrestines. La liaison des β -arrestines aux RCPGs prévient la fixation de nouvelles protéines G, ce qui atténue par conséquent la production de nouveaux seconds messagers. D'autre part la liaison des β -arrestines conduit au mécanisme d'endocytose clathrine-dépendant des récepteurs responsables aboutissant soit à leurs dégradations lysosomales soit à leurs recyclages à la membrane plasmique (Kelly *et al.*, 2008). Le criblage par double-hybride des partenaires de la β -arrestine-2 à partir d'une banque d'ADNc de thymus humain, a permis de mettre en évidence que la β -arrestine-2 peut interagir avec les domaines 22-24 de la FlnA (Scott *et al.*, 2006). Cette étude a de plus montré que la liaison de la FlnA à la β -arrestine-2 est nécessaire pour relayer l'activation complète de ERK1/2 après stimulation des récepteurs de l'angiotensine II AT1AR et muscarinique de l'acétylcholine M1R1 (Scott *et al.*, 2006). De plus comme précisé précédemment, la FlnA permet le recrutement de β -arrestine-2 par le récepteur D3R en formant un complexe ternaire liant le D3R à la FlnA et la FlnA à β -arrestine-2 (Zheng *et al.*, 2016). L'étude de Zheng et collaborateur ayant de plus montré que la FlnA inhibe l'effet répresseur de la GTPase RalA sur l'activité de GRK2, on peut dès lors proposer que la FlnA contrôle le recrutement de β -arrestine-2 par les RCPGs selon 2 mécanismes distincts, l'un reposant sur une interaction directe favorisant le recrutement de β -arrestine-2, et l'autre en potentialisant l'activité des GRK.

II.III.D.9 | Motif consensus d'interaction des RCPGs à la Filamine A

Les stratégies de validation d'interaction protéine-protéine *in vivo* étant longues et fastidieuses (criblage double-hybride, co-immunoprécipitation), Tirupula et collaborateurs ont réalisé une étude bio-informatique *in silico* visant à caractériser les sous-type de RCPG capables d'interagir avec la face C/D d'un domaine répété de la FlnA appartenant à la classe A. Sur la base de l'alignement des séquences des protéines interagissant avec les domaines de classe A de la FlnA (*Protein Data Bank* (PDB) code : 2BRQ, 2J3S, 2K9U, 2W0P, 2BP3, 2JF1, and 3ISW), les auteurs ont défini la séquence de liaison à la FlnA des RCPGs ou *filamine A binding motif* (FBM) comme étant : $[X_a/R/K]_3-[X'_a/R/K]_2-[\Omega/\Phi/T]_1-[R/K/\Phi/S/F]_0-[\zeta/E/D]_1-X'_2-[\Psi/F]_3-X'_4-[\Psi/R/K/\Omega]_5-X'_6-[\Psi/\Phi/\Omega/M/R/K/S/P]_7-X_8$; où $\Psi = L, V, I$ ou T ; $\Omega = F, W$ ou Y ; $\Phi = A, V, I$ ou L ; $\zeta = S, T, N$ ou Q . X représentant n'importe quel acide aminé, X_a représentant n'importe quel acide aminé excepté un AA acide (D & E), et X' représente n'importe quel acide

aminé excepté P. Dans le FBM la position (annoté en indice) du résidu le plus conservé est le numéro « 0 » et contient un résidu basique (K ou R). De plus, dans la séquence d'interaction de la migfiline et du CFTR, l'absence de ces résidus en position 0 sont compensé en position -2 ou -3. Les résidus basiques présents à ces positions sont cruciaux pour la liaison au domaine 21 (Figure 33 | Alignement des séquences des protéines interagissant avec un domaine de la classe A de Filamine A).

A



	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Intégrine β7	P	L	Y	K	S	A	I	T	T	T	I	N
Intégrine β2	P	L	F	K	S	A	T	T	T	V	M	N
GPLba	P	T	F	R	S	S	L	F	L	W	V	R
Filamine A _{D20}	G	R	V	K	E	S	I	T	R	R	R	R
Migfilin (A)	K	R	V	A	S	S	V	F	I	T	L	A
Migfilin (B)	R	V	A	S	S	V	F	I	T	L	A	P
CFTR (B)	K	M	F	F	S	W	T	R	P	I	L	R
CFTR (A)	A	S	V	V	S	K	L	F	F	S	W	T
Intégrine β1	P	I	Y	K	S	A	V	T	T	V	V	N
Intégrine β3	P	L	Y	K	E	A	T	S	T	F	T	N
D2R	G	K	T	R	T	S	L	K	T	M	S	R
D3R	G	R	L	S	T	S	L	R	L	G	P	L

B

$[X_{-4}/R/K]_{-3}-[X'_{-4}/R/K]_{-2}-[\Omega/\Phi/T]_{-1}-[R/K/\Phi/S/E]_0-[\zeta/E/D]_1-X'_2-[\Psi/F]_3-X'_4-[\Psi/R/K/\Omega]_5-X'_6-[\Psi/\Phi/\Omega/M/R/K/S/P]_7-X_8$

Figure 33 | Alignement des séquences des protéines interagissant avec un domaine de la classe A de Filamine
A. Séquences d'interaction à la FlNA des intégrines β1, β2, β3 et β7, des sites A et B de la migfiline, des sites A et B du CFTR ainsi que des récepteurs D2R et D3R de la dopamine. **B.** Proposition d'un motif consensus d'interaction à la FlNA où Ψ = L, V, I ou T ; Ω = F, W ou Y ; Φ = A, V, I ou L ; ζ = S, T, N ou Q. X représentant n'importe quel acide aminé, X_a représentant n'importe quel acide aminé excepté un AA acide (D & E), et X' représente n'importe quel acide aminé excepté P. Dans le FBM la position (annoté en indice) du résidu le plus conservé est le numéro « 0 » et contient un résidu basique (K ou R). De plus, dans la séquence d'interaction de la migfiline et du CFTR, l'absence de ces résidus en position 0 est compensée en position -2 ou -3. (Modifié d'après Tirupula *et al.*, 2015).

Le screening des séquences des 824 RCPGs caractérisés chez l'Homme a permis de mettre en évidence que 20% des RCPGs possèdent un FBM sur leur face cytosolique dans leur boucle ICL1, ICL2 ou ICL3 ou dans leur domaine C-terminal. Parmi ces 20%, 116 RCPGs appartiennent à la famille des récepteurs non-olfactifs et 73 à la famille des récepteurs olfactifs. Un très grand nombre des RCPGs évoqués précédemment sont uniquement le résultat de l'algorithme et pourrait interagir par conséquent avec un domaine de la classe A. Cependant certains récepteurs qui ne sont pas extraits après sollicitation de l'algorithme, ont pour autant été validé dans leur interaction expérimentalement. Ces informations peuvent laisser supposer

que ces derniers RCPG interagissent avec un domaine de la classe B ou avec une autre face que la face C/D ayant servi de support pour cette étude. On compte parmi ces récepteurs les récepteurs CaR, CCR2B, MOR, CTR, SST2 ainsi que les récepteurs mGluR4a, mGluR7a, mGluR7b et mGluR8a.

En reprenant l'articulation proposée pour le domaine *rod 2* de la FlnA, composée d'une alternance de domaines de classe A et B (Ithychanda *et al.*, 2009), et en supposant que chacune de ces classes interagit avec certains types de RCPG, on peut dès lors supposer que ce phénomène d'alternance permet la formation de clusters homogènes ou hétérogènes de RCPGs, voire la formation d'hétérodimères ou hétéro-oligomères de récepteurs (Figure 34 | Modèle de clusterisation des RCPGs par la Filamine A).

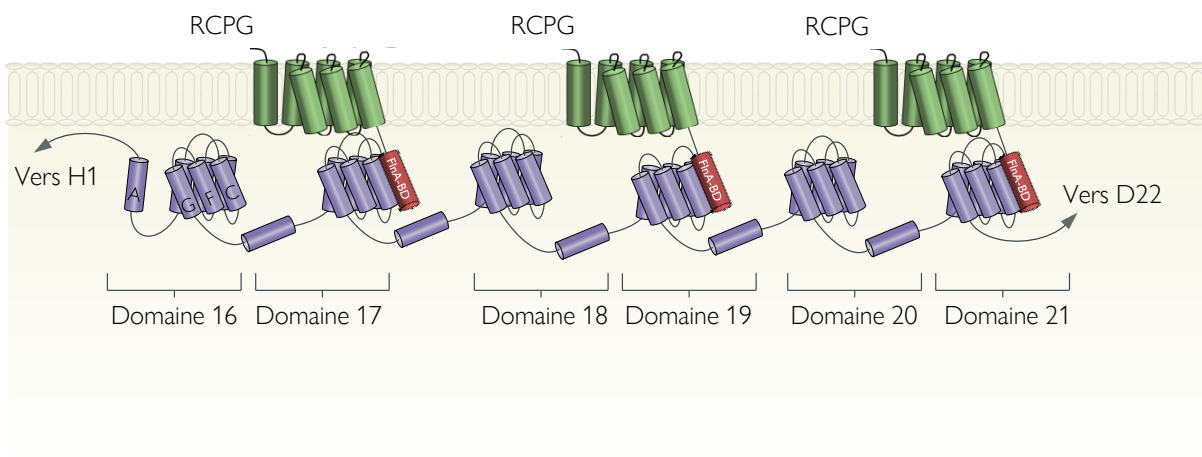


Figure 34 | Modèle de clusterisation des RCPGs par la Filamine A. Cluster de 3 RCPGs interagissant avec les domaines 17, 18 et 21 de la FlnA formant ainsi un cluster de récepteurs. Les lettres représentent les feuillets formant un domaine répété.

II.IV | Modification, clivage et dégradation de la Filamine A

L'activité ainsi que les fonctions de la FlnA au sein de la cellule sont régulés à différents niveaux : par phosphorylation par des sérine/thréonine kinases (Ohta et Hartwig 1996), des tyrosine kinases (Sharma et Goldmann 2004), par la liaison de Ca^{2+} (Rosenberg *et al.*, 1981) et de phospholipides (Furuhashi *et al.* 1992 ; Goldmann *et al.* 1999) ainsi que par protéolyse (Davies *et al.*, 1978 ; Truglia et Stracher 1981; Browne *et al.*, 2000).

II.IV.1 | Modulation des fonctions de la Filamine A

La liaison de phospholipides de type phosphatidylinositolphosphate ou PIPs à la FlnA conduit à une réduction de sa capacité à lier la F-actine aboutissant à une diminution de la réticulation du réseau de F-actine (Furuhashi *et al.*, 1992). De façon intéressante il a été montré que c'est plus particulièrement le PIP2 qui posséderait cet effet inhibiteur. La forte production de PIP3 à l'avant par la PI3K associée à de forte concentration de PIP2 générée par la dégradation de PIP3 par PTEN à l'arrière, met en exergue une autre voie par laquelle la cellule régule la réticulation du cytosquelette d'actine *via* la production localisée de différentes espèces de phosphoinositides et leurs interactions à la FlnA lors de la polarisation.

La modulation des fonctions de la FlnA est en très grande partie régulée par la phosphorylation dynamique d'un site consensus conservé situé sur la sérine 2152 présente sur le domaine 20 dans la section C-terminale de la FlnA (Van der Flier *et al.*, 2001). Plusieurs types de protéines kinases sont en capacité de phosphoryler le résidu S2152 de la FlnA. En effet, comme déjà mentionné, la phosphorylation de la FlnA par la kinase PAK1 permet la formation de *ruffles* membranaire lors de la migration cellulaire (Vadlamudi *et al.*, 2002). De plus la phosphorylation de ce site par la Ribosomal S6 Kinase (RSK) est nécessaire à la migration directionnelle évoquée par un stimulus d'EGF, un mécanisme pouvant être inhibé par un inhibiteur spécifique de la kinase MEK, le UO126, suggérant que la phosphorylation de la FlnA par RSK est relayée par l'activation de la voie des MAPK. La phosphorylation de la FlnA par la PKA a pour conséquence de la protéger contre le clivage induit par les calpaïnes (Chen et Stracher 1989 ; Jay et de la Luz 2004). La phosphorylation en S2152 par Akt est nécessaire à la migration de cellules de tumeur mammaire MCF-7 en réponse à un stimuli d'*Insulin-like growth factor-I* (IGF-I) (Ravid *et al.*, 2008). La phosphorylation par la *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase type II* (CaMK-II) de la sérine 2152 a pour conséquence d'augmenter le Kd de la FlnA pour la F-actine de 3,2 μ M à 6,9 μ M entraînant la diminution de la réticulation du réseau de F-actine (Y. Ohta et Hartwig 1995). *A contrario* la calcineurine, une serine/threonine phosphatase *Ca²⁺/calmodulin-dependent* déphosphoryle la sérine 2152 de la FlnA dans des cellules 293FT (García *et al.*, 2006). Bien que le site de phosphorylation n'ait pas encore été caractérisé, il a été démontré que la PKC α (Protéine Kinase C alpha) peut lier la FlnA dans sa partie N-terminale (domaines 1-4) et C-terminale (domaines 23-24) et qu'elle peut phosphoryler cette dernière (Tigges *et al.*, 2003). L'étude réalisée sur des fragments courts de la FlnA avec du ³²P n'a en effet pas permis d'isoler spécifiquement le site

de phosphorylation de PKC α (Figure 35 | Liste des modifications fonctionnelles apportées à la Filamine A).

La tyrosine kinase p56^{lck} phosphoryle la FlnA dans des lymphocyte-T activés, le/les sites d'action de la p56^{lck} ne sont à ce jour pas encore caractérisés, cependant ce mécanisme augmente la capacité de la FlnA à réticuler le réseau de F-actine et sa liaison aux intégrines β (Sharma et Goldmann 2004). La phosphorylation de la sérine S2152 de la FlnA par la sérine/thréonine kinase Ndr2 (*Nuclear dbf2 related*) joue un rôle clé dans l'activation des lymphocytes T. En effet, l'activation des TCRs (Récepteur des cellules T) présents à la surface des lymphocytes T a pour conséquence d'activer la kinase Ndr2 qui à son tour phosphoryle la FlnA sur la sérine S2152, ce qui provoque la dissociation de la FlnA du LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen-1*), une intégrine spécifiquement exprimée par les cellules T intervenant dans les processus d'extravasation. Cette dissociation permettrait aux cellules T d'envahir le tissu inflammé et d'entrer en contact avec les cellules présentatrices d'antigène (APCs) (Waldt *et al.*, 2018). Par ailleurs, bien qu'aucune phosphorylation n'ait pu être démontrée, la FlnA interagit avec la PKC θ (Protéine kinase C theta) dans les lymphocytes T. De façon intéressante, elle permet l'accumulation membranaire de la PKC θ à l'interface entre lymphocyte T et APCs (Hayashi et Altman 2006).

Dans un autre registre, le complexe Cycline B1/CDK1 modifie de manière dynamique le statut de phosphorylation de la FlnA lors de la division cellulaire. Lors de la mitose, la Cycline B1/CDK1 phosphoryle les sérines S1084 (Domaine 9), S1459 (Domaine 12) et S1533 (Domaine 13), alors que ces sites de phosphorylation se situent sur le deuxième site de liaison à l'actine de la FlnA. Cet enrichissement local en sites phosphorylés réduit la réticulation du réseau de F-actine lors de la mitose (Cukier *et al.*, 2007 ; Szeto *et al.*, 2015). Le couple Cycline D1/CDK4-6 est également capable de phosphoryler la FlnA sur les sérines S1459 et S2152, la phosphorylation de ces sites par le dimère Cycline D1/CDK4-6 est associée à une potentialisation des capacités invasive et migratoire des cellules de cancer mammaire MDA-MB-231 (Figure 35 | Liste des modifications fonctionnelles apportées à la Filamine A) (Zhong *et al.*, 2010).

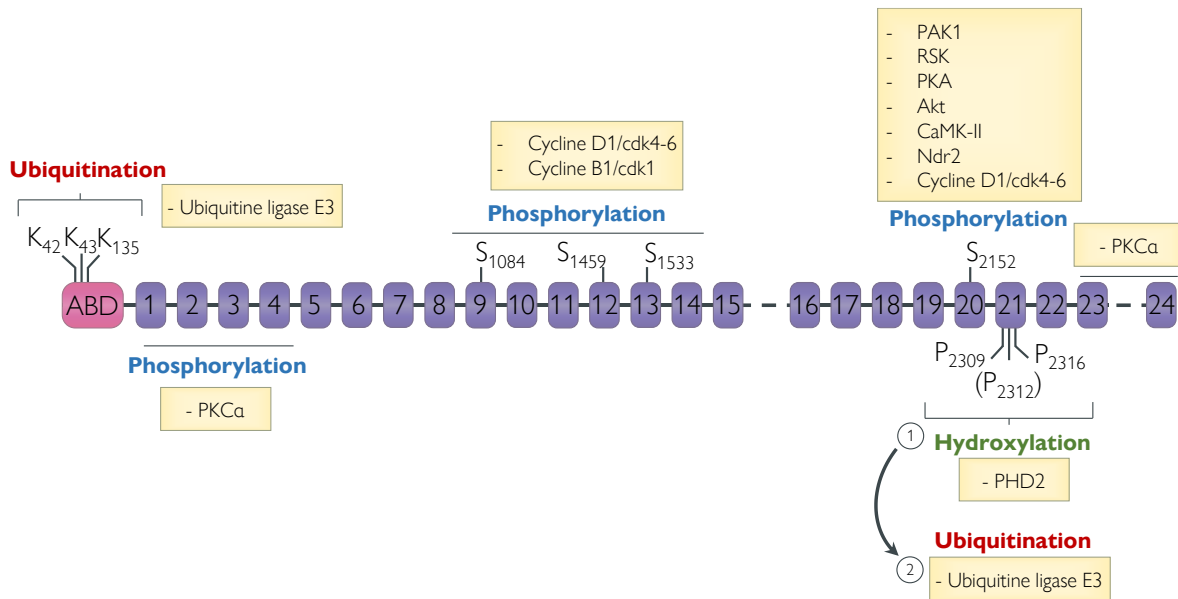


Figure 35 | Liste des modifications fonctionnelles apportées à la Filamine A. La FlnA peut subir un ensemble de modifications visant à moduler son activité et sa stabilité au sein de la cellule. Les kinases PAK1, RSK, PKA, Akt, CAMK-II, Nrd2 ainsi que le complexe cycline D1/cdk4-6 phosphorylent la FlnA sur la sérine S2152. Les complexes cyclines D1/cdk4-6 et cycline B1/cdk1 phosphorylent la FlnA sur les sérines S1084, S1459 et S1533. La PKC α se lie à la FlnA dans les domaines 1 à 4 et 23-24 et peut phosphoryler la FlnA, cependant les sites précis de phosphorylation ne sont pas encore déterminés. En présence d'oxygène, la PHD2 hydroxyle les proline P2309, P2316 et potentiellement la proline P2312. L'hydroxylation de ces proline est suivie par l'ubiquitination par une ubiquitine ligase E3 et la dégradation par le protéasome de la FlnA. L'ubiquitine ligase E3 ASB2 α ubiquitine la FlnA sur les Lysines K42, K43 et K135.

II.IV.II | Dégradation et clivage protéolytique de la Filamine A

La régulation des fonctions de la FlnA peut s'accompagner également d'une dégradation de la protéine. Dans le cas de la FlnA, cette dégradation est possible au sein du protéasome, un complexe protéique impliqué dans la dégradation ciblée de protéines mal conformées, dénaturées ou adressées à la dégradation. L'adressage au protéasome s'effectue *via* la fixation d'un groupement protéique de 76 résidus nommé ubiquitine par des enzymes, les ubiquitines ligases. La protéine ainsi ubiquitinilée peut être reconnue et prise en charge par le protéasome 26S qui procède à la dégradation de sa cible (Thibaudeau et Smith 2019). La FlnA possède dans son domaine CH1 (présent en N-terminal) un cluster de 3 lysine (K42, K43 et K135) pouvant être ubiquitinilées par l'ubiquitine ligase E3 (Figure 35 | Liste des modifications fonctionnelles apportées à la Filamine A). Il a plus précisément été montré que ces 3 lysine sont nécessaires à la dégradation de la FlnA par le protéasome mais qu'elles n'intervenaient pas dans la liaison du complexe ubiquitine ligase E3 à la FlnA *via* sa sous-unité ASB2 α (*Ankyrin Repeat And SOCS Box Containing 2 alpha*) (Razinia *et al.*, 2013). L'étude de Zakaria et collaborateurs a montré que la phosphorylation de la sérine S323 d'ASB2 α est nécessaire à la dégradation de la FlnA

car la substitution de cette sérine par une alanine entraîne une réduction significative de la dégradation de la FlnA par ASB2 α , réciproquement la substitution de la sérine S323 par une asparagine, un phosphomimétique, provoque une stimulation de la dégradation de la FlnA (Zakaria *et al.*, 2013). Razinia et collaborateurs proposent au vu du site d'ubiquitylation reconnue par ASB2 α que la FlnA est reconnue par ASB2 α uniquement lorsqu'elle n'est pas liée au cytosquelette d'actine. Ce mécanisme fournirait à la cellule un moyen de sélectivement conserver un pool fonctionnel de Filamine A lié à la F-actine en dégradant la FlnA libre, permettant un meilleur contrôle des fonctions de la FlnA associées à sa distribution subcellulaire.

Les cellules eucaryotes produisent leurs substrats énergétiques, l'ATP, *via* une chaîne d'oxydo-réduction au sein des mitochondries, cette cascade redox combinée au cycle de Krebs ou cycle de l'acide citrique nécessite un approvisionnement continu en O₂. C'est pourquoi les cellules eucaryotes possèdent des senseurs capables de percevoir les variations de PaO₂ au niveau subcellulaire, ces senseurs sont notamment représentés par les PHD. Présentes au nombre de 3 chez l'Homme, les PHD utilisent l' α -cétoglutarate, un métabolite du cycle de Krebs comme substrat pour hydroxyler des protéines comme HIF-1 α (Epstein *et al.*, 2001). La protéine HIF-1 α est par la suite ubiquitinilée par l'ubiquitine ligase de type 3 VHL, entraînant sa dégradation par le protéasome (Ivan *et al.*, 2001). Selon le même modèle de régulation, la PHD2 hydroxyle les proline P2309 (Domaine 21), P2316 (Domaine 21) et possiblement la proline P2312 (Domaine 21) de la FlnA, lesquelles favorisent la liaison de l'ubiquitine ligase E3 VHL aboutissant à la dégradation protéasomale de la FlnA en condition normoxique (Figure 35 | Liste des modifications fonctionnelles apportées à la Filamine A) (Segura *et al.*, 2016).

En condition hypoxique, la FlnA interagit spécifiquement avec les acides aminés 1-390 de HIF-1 α , cette liaison est accompagnée d'un clivage de la FlnA dépendant des calpaïnes au niveau de la région charnière H1, générant un fragment C-terminal de 90 kDa dépourvu du ABD. Ce fragment de 90 kDa facilite la translocation nucléaire de HIF-1 α dans le noyau et stimule la transcription des gènes cibles possédant une séquence HRE dans leurs régions promotrices (Figure 36 | Effet de la pression partielle en oxygène sur la stabilité de Filamine A). L'absence de FlnA réduit notamment la production des ARNm codant VEGFA (*vascular endothelial growth factor-A*), GLUT1 et BNIP3 (*BCL2 interacting protein 3*) en conditions hypoxiques (Zheng *et al.*, 2014). Étonnement les quantités d'ARNm codant la FlnA ne sont pas modifiées en condition hypoxiques dans des cellules U2OS, HeLa et 293T (Zheng *et al.*, sup. inf. 2014)

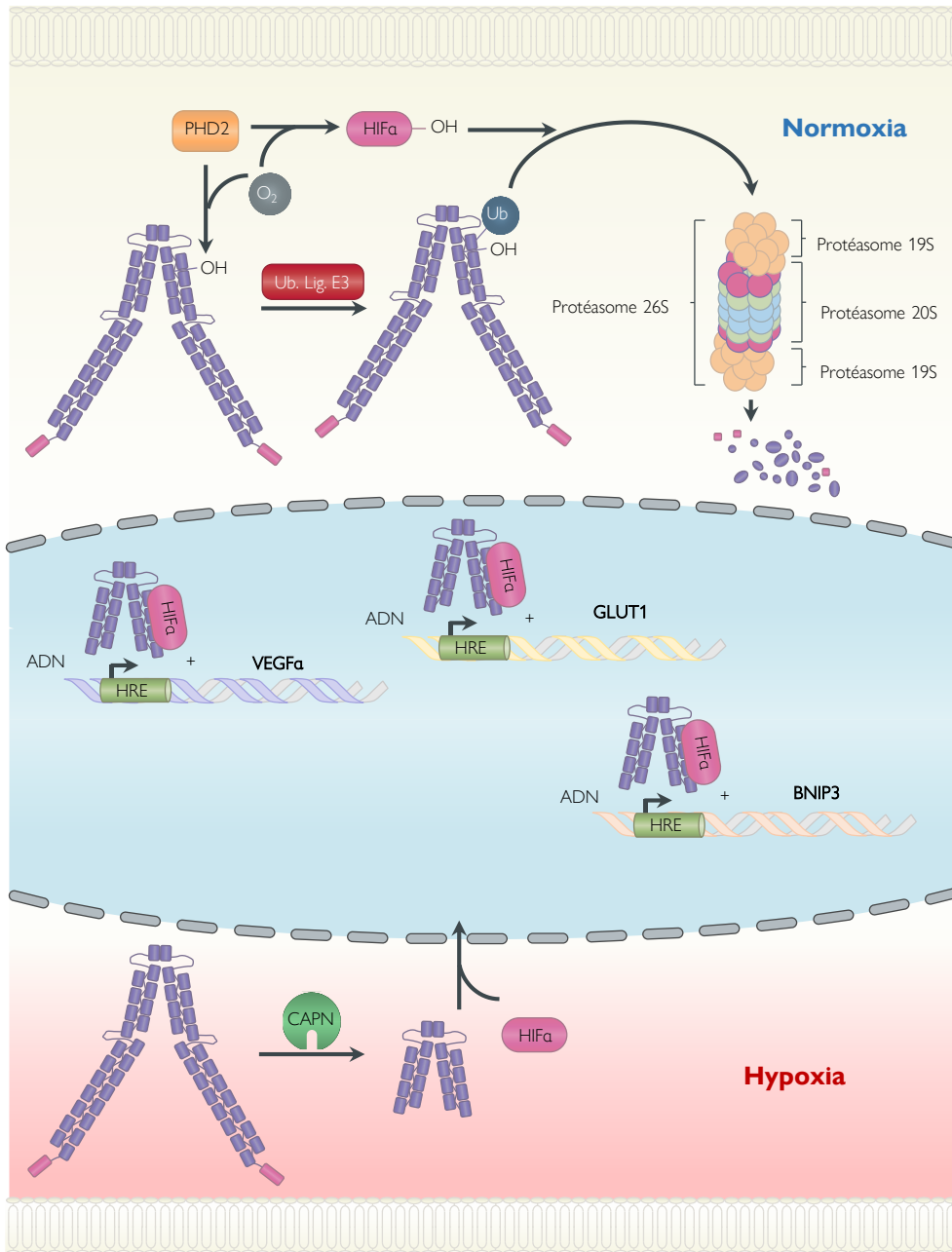


Figure 36 | Effet de la pression partielle en oxygène sur la stabilité de Filamine A. En condition normoxique, l'enzyme PHD2 hydroxyle la FlnA sur 3 prolines présentes dans le domaine *rod 2*, les proline P2309, P2312 et P2316. Cette hydroxylation conduit à l'ubiquitination et à la dégradation de la FlnA par le protéasome. En condition hypoxique la FlnA ainsi que HIF-1 α ne sont plus constitutivement dégradés, la FlnA est clivée par les calpaïnes. Le fragment court ainsi généré potentialise la translocation nucléaire de HIF-1 α . La présence concomitante de la FlnA dans le noyau avec HIF-1 α augmente la transcription des gènes codant le VEGFA, GLUT1 et BNIP3 qui tout trois possèdent une séquence HRE (*hypoxia responsive element*).

Bien qu'une très grande partie des clivages protéolytiques de la FlnA soit relayée par les calpaïnes au niveau de 2 sites charnières H1 et H2 (Gorlin *et al.*, 1990), il a été montré que l'application de granzyme B, une protéase proapoptotique, sur des cellules Jurkat induit un clivage de la FlnA produisant 2 fragment de 95 kDa et 110 kDa. L'activation du récepteur pro

apoptotique Fas, génère les mêmes fragments protéiques *via* un clivage dépendant des caspases qui peut être bloqué par la pré-incubation d'un inhibiteur de caspase (z-VAD-fmk) (Browne *et al.*, 2000). De façon intéressante les cellules M2 de mélanome sont résistantes à l'apoptose induite par l'application de granzyme B, suggérant que la FlnA joue un rôle central dans les mécanismes d'apoptoses induits par la granzyme B, cette enzyme co-libérée avec la perforine par les lymphocytes T pour éradiquer leurs cibles (Browne *et al.*, 2000).

II.V | Mutation de la Filamine A et pathologies développementales

Un grand nombre de mutations dans les séquences codant le gène de la FlnA est associée à des pathologies congénitales touchant le système vasculaire, les os et le SNC (Fox *et al.*, 1998 ; Robertson *et al.*, 2003). Plus particulièrement, les mutations touchant la FlnA exprimée de façon ubiquiste lors du développement sont à l'origine de 2 syndromes principaux : l'hétérotopie nodulaire périventriculaire (HNP) et le spectre de malformation otopalatodigital (ODP).

II.V.A | L'hétérotopie Nodulaire Périventriculaire

L'HNP est une pathologie neuro-développementale liée à l'X causée par des mutations responsables d'une perte de fonction de la FlnA (Fox *et al.*, 1998 ; Guerrini *et al.*, 2004). L'HNP est la conséquence de neurones n'ayant pas migrés vers le cortex depuis leur zone de genèse dans la zone ventriculaire, provoquant l'accumulation de nodules en périphérie des ventricules (Figure 37 | Image IRM d'une patiente et d'un patient atteint d'hétérotopie nodulaire périventriculaire) (Fox *et al.*, 1998). Les mutations survenant dans la FlnA associées au HNP sont liées à des perturbations du cadre de lecture, et à l'absence d'expression de la FlnA sous forme protéique ou à un épissage alternatif non physiologique générant des formes tronquées de la FlnA avec perte de une ou plusieurs fonctions (Figure 38 | Mutations impliquées dans la survenue d'hétérotopie nodulaire périventriculaire). Fonctionnellement, l'accumulation de ces nodules peri-ventriculaires est à l'origine d'un cerveau présentant des activités épileptiformes associées à peu voir à pas, de troubles cognitifs (Sheen *et al.*, 2001 ; Parrini *et al.*, 2006). Les femmes qui elles, peuvent présenter des mutations hétérozygotes, développent des malformations complémentaires associées au défaut de fonction de FlnA. Il s'agit notamment de malformations du système cardiovasculaire, allant de la malformation cardiaque mineure telle qu'une malformation de la valve tricuspide au développement d'anévrysmes aortiques, en passant par la survenue précoce d'AVC associée à un syndrome d'hypercoagulabilité

caractérisé par une perturbation de l'interaction entre la FlnA et la glycoprotéine Ib α du complexe GPIb-V-IX du facteur von Willebrand dans les plaquettes (Fox *et al.*, 1998 ; Moro *et al.*, 2002). Du fait de son expression liée au chromosome X, la survenue de mutations délétères dans la FlnA est généralement létale au stade embryonnaire chez l'homme. Cependant des individus présentant des mutations mosaïques (mutation restreinte à un ou plusieurs types cellulaires) survivent à la perte localisée de fonction de la FlnA. Ces hommes développent *in fine* le même spectre de troubles congénitaux que leurs homologues femmes avec mutations hétérozygotes (Parrini *et al.*, 2004).

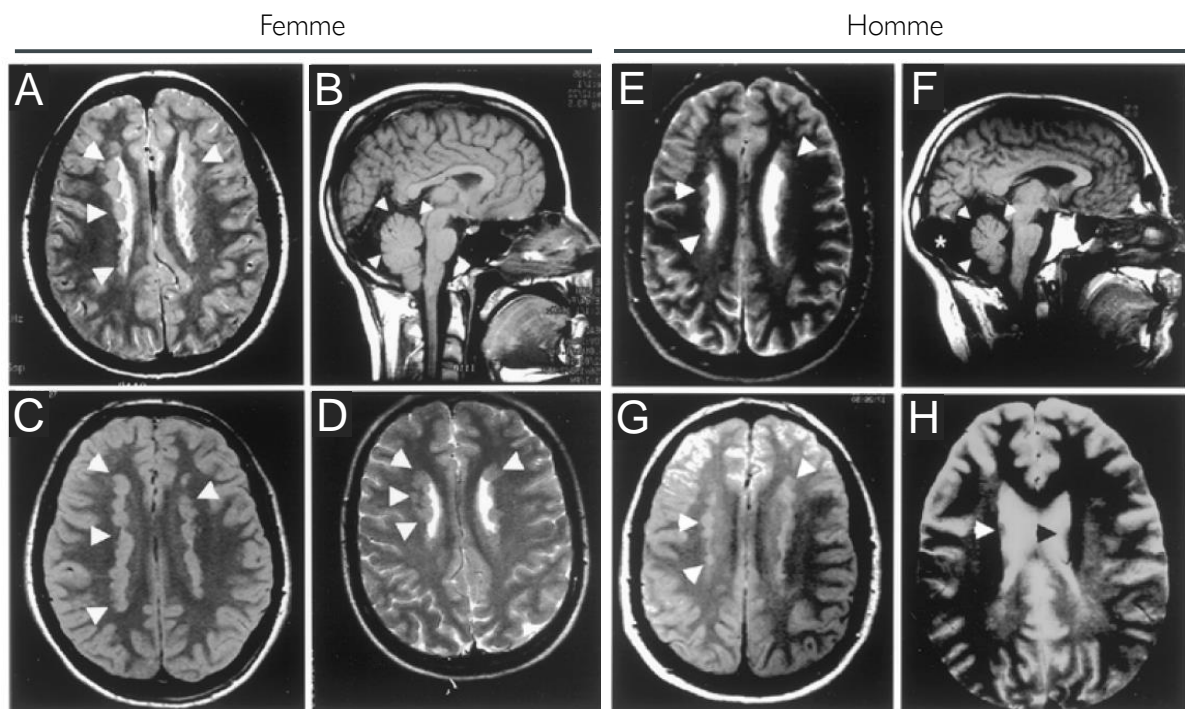


Figure 37 | Image IRM d'une patiente et d'un patient atteints d'hétérotopie nodulaire périventriculaire. A. IRM pondérée axiale T2 d'une femme présentant une hétérotopie nodulaire périventriculaire sporadique bilatérale (flèches blanches). B. IRM pondérée sagittale T1 de la même patiente qu'en (A), les flèches blanches indiquent un double déplacement cérébelleux, une caractéristique souvent associée à l'HNP. C. IRM pondérée axiale T2 d'une femme présentant une hétérotopie nodulaire périventriculaire familiale bilatérale (flèches blanches). D. IRM pondérée axiale T1 d'une femme présentant une hétérotopie nodulaire périventriculaire familiale bilatérale (flèches blanches). E. IRM pondérée axiale T2 d'un homme présentant une hétérotopie nodulaire périventriculaire sporadique bilatérale (flèches blanches). F. IRM pondérée sagittale T1 du même patient qu'en (E) montrant un élargissement de la grande citerne (astérisque). G. IRM en densité de proton du même patient que présenté en (E) une hétérotopie nodulaire périventriculaire sporadique bilatérale (flèches blanches). H. IRM pondérée axiale T2 d'un homme présentant une hétérotopie nodulaire périventriculaire unilatérale sporadique, la flèche blanche désigne les 2 nodules présents dans l'hémisphère droit, la tête du noyau caudé s'étend à gauche du ventricule de façon normale (flèche noire). (D'après Sheen *et al.*, 2001).

II.V.B | Spectre de malformations otopalatodigitales

Le spectre de malformations otopalatodigitales regroupe un ensemble de troubles associés à des mutations ponctuelles de la FlnA permettant l'expression complète de FlnA

mutée. Ce spectre regroupe les syndromes ODP1 et ODP2 (*Syndrome otopalatodigitale 1 & 2*), la dysplasie frontometaphyséale (FMD) et le syndrome de Melnick-Needles (MNS), qui sont tous à l'origine de malformations osseuses de localisation variable (Tableau 7 | Tableau résumant l'ensemble des malformations associées au syndrome du spectre ODP) (Robertson 2005). La sévérité des troubles est très variable, allant de la légère dysplasie osseuse à la létalité embryonnaire, tout dépend du tissu touché par cette anomalie. Les mutations à l'origine des malformations du spectre ODP sont concentrées dans le domaine ABD et les *repeat* 3, 10, 14 et 15 (Robertson *et al.*, 2003). Le syndrome ODP1 est associé exclusivement à des mutations présentes dans le sous-domaine CH2 de l'ABD de la FlnA et est à l'origine de légères anomalies osseuses touchant principalement les longs os, de fente palatine, d'hypertrophie supraorbitale accompagnée de dysmorphies craniofaciales, ainsi qu'à une taille réduite et des anomalies digitales touchant les membres supérieurs et inférieurs (Robertson 2005).

Le syndrome ODP 2 quant à lui est provoqué par des mutations dans le domaine CH2 de l'ABD comme son homologue, mais aussi par des mutations des domaines 14 et 15. On notera que ces mutations impactent les 2 régions de la FlnA impliquées dans sa liaison à l'actine, l'ABD dont la liaison à l'actine est la fonction principale, et les domaines 14 et 15 présents dans la région secondaire de liaison à l'actine de la FlnA (Robertson *et al.*, 2003 ; Nakamura *et al.*, 2007). Le syndrome ODP2 est associé à des troubles plus sévères semblables à ceux de l'ODP1 généralement accompagnés de retards mentaux (Robertson 2005). Les mutations du CH2 liées à l'ODP2 augmentent l'affinité de la FlnA à la F-actine et sont associées à un gain de fonction (Figure 39 | Phénotypes associés aux mutations de la FlnA dans les syndromes ODP) (Robertson *et al.*, 2003; Clark *et al.*, 2009).

La FMD impacte principalement le développement du crâne et de la face et est associée à de sévères dysmorphies squelettiques. Les patients atteints de FMD possèdent de lourdes dysmorphies craniofaciales accompagnées de surdité. Ces patients ont également des malformations cardiaques impactant généralement le septum, mais aussi des troubles de mise en place du système urogénital (Figure 39 | Phénotypes associés aux mutations de la Filamine A dans les syndromes ODP) (Robertson *et al.*, 2003; Gorlin et Cohen 1969). Le FMD est provoqué par un ensemble de mutations dispersées dans la séquence de la FlnA (CH2 du domaine ABD, domaines répétés 3,10,14, 22 et 23 (Robertson *et al.*, 2003).

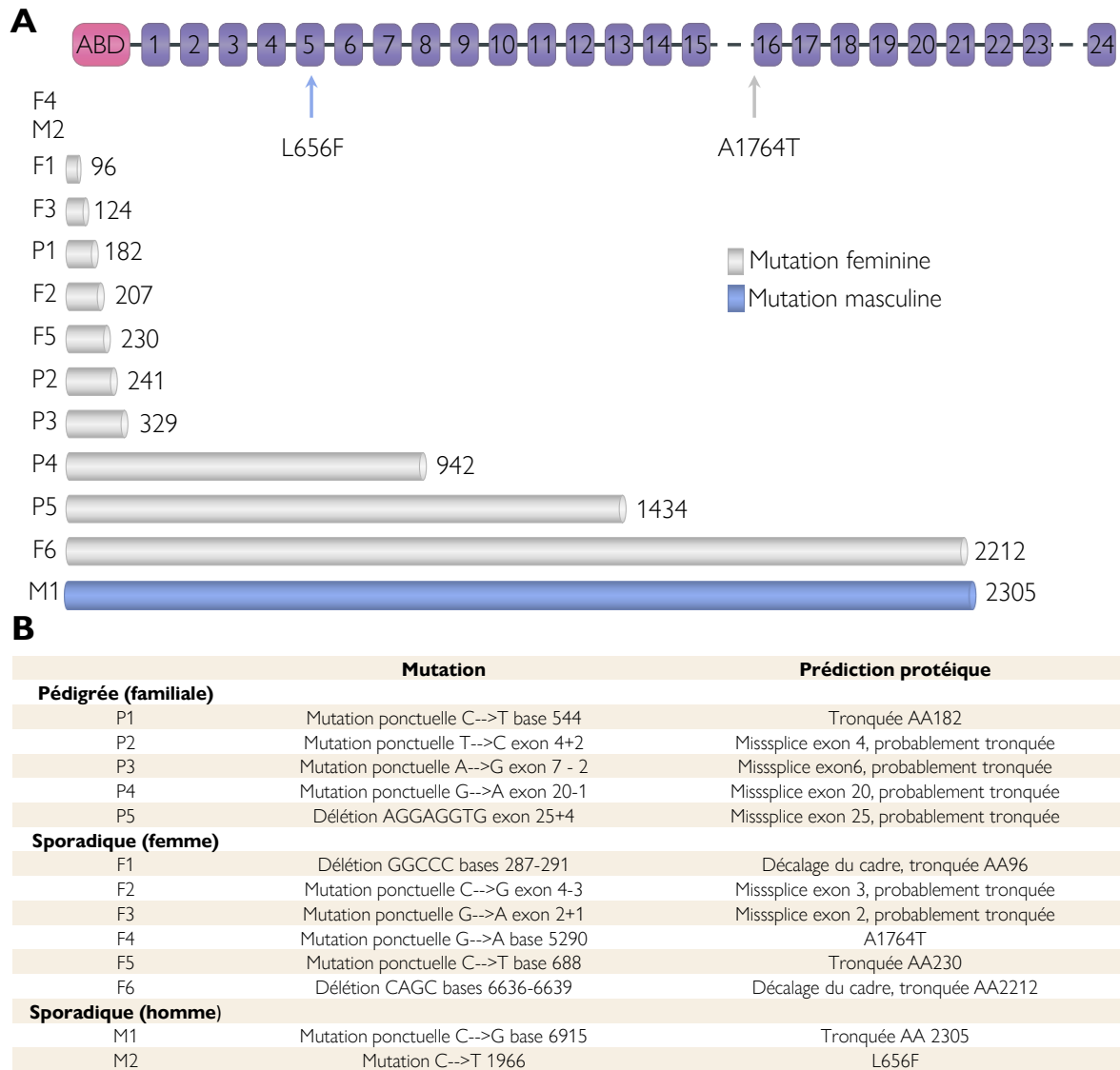


Figure 38 | Mutations impliquées dans la survenue d'hétérotopie nodulaire périventriculaire. A. Représentation schématique de mutations impliquées dans la survenue d'HNP chez les femmes et les hommes, les numéros présent en fin de ligne représente l'acide aminé terminal des protéines tronquées. **B.** Tableau résumant l'ensemble des mutations impliquées dans l'HNP. (Modifié d'après Sheen *et al.*, 2001).

Le syndrome de Melnick-Needles (MNS) est le plus grave du spectre ODP et est généralement retrouvé chez les femmes hétérozygotes car létale au stade embryonnaire si présent de façon homozygote. Les enfants arrivant à terme présentent de sévères dysplasies osseuses, associées à une courbure des os longs, une cage thoracique anormale caractérisée par des côtes irrégulières (Figure 39 | Phénotypes associés aux mutations de la Filamine A dans les syndromes ODP). L'ensemble des syndromes MNS caractérisés sont liés à des mutations du domaine répété 10 (Melnick et Needles 1966 ; Robertson *et al.*, 2003).

La FlnA joue donc un rôle essentiel dans le développement embryonnaire, en permettant la mise en place et le maintien des structures osseuses, cartilagineuses, cardiaques et cérébrales. Le large spectre de troubles associés aux mutations de la FlnA reflète son implication dans la régulation d'un large éventail de fonction cellulaire. C'est cependant sa fonction de protéine organisatrice du cytosquelette associée à la perception des contraintes mécaniques ainsi qu'au processus de migration qui semble être principalement à incriminer. La meilleure compréhension des acteurs moléculaires interagissant avec la FlnA durant les phases précoces du développement est cependant requise afin de complètement élucider les fonctions qu'occupent la FlnA durant l'ontogenèse.

Phénotype	Petite taille	Phénotype craniofaciale	Thorax	Scoliose	Doigt	Autre
OPD1		Caractéristique	Normal	-	Pouces court ; phalanges distales hypoplasiques ; anomalies des orteils 2	Extension du coude limité, abduction du poigné, os longs courbés
OPD2	+	Caractéristique, plus sévère que l'ODP1	Hypoplasie	Occasionelle	Pouces hypoplasiques et gros orteils; camptodactylie	Os long courbés, problème de fermeture de la fontanelle
Dysplasie Fronto-metaphyseale		Plus sévère que l'ODP2	Hypoplasie	+	Hypoplasie des phalanges distales; contraction progressives des mains	Degré de liberté des articulations réduit (coude, poignet, hanche et genoux)
Syndrome Melnick-Needles	+	Proptosis, joues pleines, micrognathie, asymétrie faciale	Hypoplasie	+	Doigts longs ; légère hypoplasie des phalanges	Courbure et subluxation des articulations

Tableau 7 | Tableau résumant l'ensemble des malformations associées au syndrome du spectre ODP.

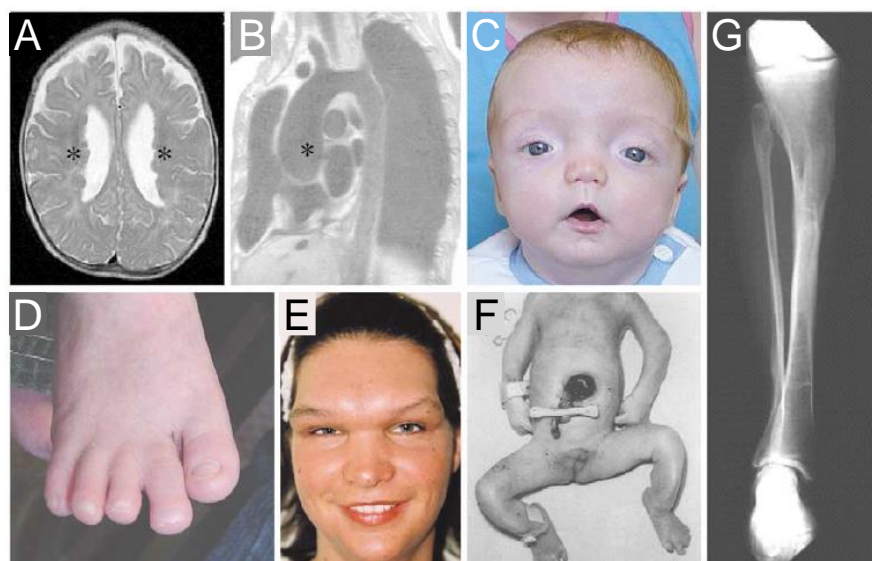


Figure 39 | Phénotypes associés aux mutations de la Filamine A dans les syndromes ODP. A. Image IRM d'une femme atteinte d'une hétérotopie nodulaire périventriculaire (astérisque = nodules). B. Image IRM montrant la dilatation (astérisque) chez un individu atteint d'un syndrome Ehlers-Danlos-HNP. C. Photo d'un enfant atteint d'ODP1. D. Pied de l'enfant de la photo (C). E. Photo d'une femme atteinte d'une dysplasie frontométaphyseale avec une dysplasie supraorbitale marquée. F. Enfant masculin atteint d'ODP2, le patient présente un omphalocèle, des membres courbés associés à une sévère dysplasie squelettique. G. Tibia et fibula courbés d'une patiente atteinte d'un syndrome de Melnick-Needles. (D'après Robertson et al., 2005).

II.VI | Rôle de la Filamine A dans la tumorigenèse

L'implication de la FlnA dans la régulation d'un large panel de fonctions cellulaires allant de la migration à la régulation du cycle cellulaire en passant par la modulation de l'activité de récepteurs membranaires a inévitablement conduit la communauté scientifique à étudier le rôle de la FlnA dans la régulation des mécanismes associés à la tumorigenèse tels que la prolifération, l'angiogenèse, l'invasion ou les métastases. Il existe un paradigme selon lequel la localisation subcellulaire de la FlnA est une variable clé lorsque l'on considère son action sur les mécanismes cités précédemment. La forme longue, entière, de la FlnA (280 kDa) exprimée constitutivement dans le cytosol agirait comme pro-oncogène en interagissant et en favorisant l'activité d'acteurs de la signalisation pro-oncogènes. En revanche la protéolyse par les calpaïnes de la FlnA, peut générer un fragment court de 90 kDa capable d'être transporté au niveau nucléaire, et ce phénomène pourrait réprimer l'action de certains facteurs de transcription et la tumorigenèse (Savoy et Ghosh 2013).

II.VI.A | Cancer de la prostate et Filamine A

Le cancer de la prostate est le cancer le plus fréquent chez les hommes de plus de 50 ans, et le rôle de la FlnA a été largement étudié dans ce type de cancer, avec des niveaux d'expression protéique et d'ARNm qui semblent diminuer comparativement à ceux décrits dans le tissu sain homologue. Ces niveaux d'expression de FlnA ne sont pas corrélés à la concentration augmentée de PSA (*Prostate Spécifique Antigène*), dont les fortes concentrations plasmatiques sont utilisées à des fins diagnostiques (Sun *et al.*, 2014). Bien que n'étant pas corrélée à la concentration de PSA, l'expression de la FlnA est cependant corrélée au stade T, aux métastases des ganglions lymphatiques et est par conséquent associée à la malignité de la tumeur prostatique (Sun *et al.*, 2014). De plus, la distribution subcellulaire de la FlnA change drastiquement en fonction des grades : en effet dans le tissu sain, dans les tumeurs bénignes, les néoplasmes intraépithéliaux et dans les tumeurs délimitées, la proportion de FlnA nucléaire est prépondérante. En revanche, la proportion de FlnA cytosolique augmente graduellement pour être la plus forte dans les cancers de la prostate métastatiques (Bedolla *et al.*, 2009). La corrélation entre la malignité des tumeurs prostatiques et la localisation subcellulaire de la FlnA peut trouver son explication dans la connaissance des partenaires protéiques avec lesquels la FlnA peut interagir dans les cellules d'origine prostatique. La grande majorité de ces cancers sont androgéno-dépendants, leur croissance est donc stimulée par l'activation du hAR (Ozanne

et al., 2000). Une étude menée *in vitro* sur la lignée LnCAP androgéno-dépendante et la lignée C4-2 androgéno-indépendante a permis de mettre en évidence que la translocation nucléaire de la FlnA dans les cellules d'origine prostatique est dépendante du hAR, potentialisant la dépendance aux androgènes (Wang *et al.*, 2007). Une autre étude a pu montrer que l'application d'un inhibiteur de PKA, le H89, potentialise la translocation nucléaire de la FlnA dans les cellules LnCAP (Bedolla *et al.*, 2009). La liaison de la FlnA au niveau de la région charnière du hAR dans le noyau, inhibe la fixation du facteur intermédiaire de co-activation transcriptionnelle 2 nécessaire à l'activité transcriptionnelle de hAR pour promouvoir la progression tumorale, ce qui explique en partie qu'une forte expression de la FlnA nucléaire est un facteur de bon pronostic pour les patients atteints de cancer de la prostate (Loy *et al.*, 2003). Actuellement, les patients atteints de cancers de la prostate hormonaux dépendants suivent une thérapie de déprivation androgénique (Catalona 1994). Certains de ces patients traités vont évoluer vers un cancer de la prostate résistant à la castration qui est à ce jour métastatique et incurable (Gustavsson *et al.*, 2005). Une longue période de thérapie de déprivation androgénique a pour conséquence d'augmenter l'expression de la FlnA dans les cellules tumorales (Liu *et al.*, 2014). Dans ce contexte, Mooso et collaborateurs ont montré que l'induction de la translocation nucléaire de la FlnA par le GCP (Genistein-combined-polysaccharide) dans des cellules en culture CaP (CRPC, *castration resistant CaP*) induit l'apoptose et restaure la sensibilité au docetaxel, un agent anti-cancéreux utilisé en deuxième ligne pour le traitement des cancers de la prostate (Cortes et Pazdur 1995 ; Mooso *et al.*, 2012), suggérant qu'il est possible de tenter d'agir sur le trafic de la FlnA pour lutter contre la progression tumorale.

II.VI.B | **Cancer mammaire et Filamine A**

La FlnA est surexprimée dans les tumeurs mammaires, cette surexpression est associée à des formes avancées de cancer et s'accompagne souvent de métastases envahissant les ganglions lymphatiques et d'une invasion périvasculaire ou neurale du tissu sain environnant. La FlnA est par conséquent associée à un mauvais pronostic de survie pour les patients présentant des niveaux plus élevés de FlnA (Jiang *et al.*, 2012 ; Tian *et al.*, 2013). Les niveaux circulants de FlnA sont également augmentés chez les patientes porteuses de cancer du sein métastatique, cette augmentation est associée à une expression de la FlnA dans les lysosomes des cellules MDA-MB-231, étonnement aucune trace de FlnA n'est détectée dans le compartiment lysosomal de cellules mammaires saines en culture suggérant que la sécrétion de FlnA est un

mécanisme propre aux cellules tumorales (Alper *et al.*, 2009). *In vitro*, des cellules MDA-MB-231 et C8161 dont les niveaux de FlnA ont été réprimés par siARN, présentent un potentiel migratoire significativement réduit associé à une vitesse de migration plus faible en test de recouvrement de zone lésée. Injectée de manière systémique par voie intra-cardiaque, les lignées MDA-MB-231 FlnAKD et C8161 FlnAKD (Knock-down) produisent moins de tumeurs secondaires pulmonaires que leurs homologues sauvages dans ce modèle de métastase (Jiang *et al.*, 2012). La répression de l'expression de la FlnA dans les cellules MDA-MB-231 est associée à une augmentation de l'expression des niveaux d'ARNm et de protéine 14-3-3 σ , normalement faibles dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 (Vercoutter-Edouart *et al.*, 2001 ; Ji *et al.*, 2018). De façon intéressante, la FlnA et 14-3-3 σ possèdent le même site d'interaction avec l'intégrine β 2. Ces 2 interactions aboutissent à 2 phénomènes opposés, la liaison de la FlnA à l'intégrine β 2 réduit les adhésions alors que la fixation de la FlnA à la 14-3-3 σ , les stabilises (Fagerholm *et al.*, 2005 ; Heikki Takala *et al.*, 2008). Il existe donc potentiellement un axe FlnA – intégrine β 2 impliqué dans la dé-adhésion et les phénomènes de métastases des tumeurs mammaires. De façon contradictoire, les travaux de Xu et collaborateurs montrent dans leur étude menée sur les cellules BT-20 de cancer mammaire, que l'inhibition par siARN de l'expression de la FlnA conduit à une augmentation des capacités migratoires de ces cellules associées à une dynamique de désassemblage des adhésions focales associée à des adhésions moins stables, mais il pourrait s'agir là de motilité et non de migration directionnelle. Le modèle préclinique d'injection orthotopique utilisé dans cette étude conduit à un plus grand nombre de métastases hépatiques pour les tumeurs sous-exprimant la FlnA (PSR-BT-20) (Xu *et al.*, 2010). Bien que les résultats des deux études pré-cliniques soient différents, il est important de noter que la première étude sur les cellules MDA-MB-231 FlnAKD et C8161 FlnAKD est réalisée *via* une injection intracardiaque de cellules tumorales, elle s'affranchit par conséquent de 2 étapes clés du processus de métastase, l'invasion du tissu sain et l'extravasation pour rejoindre la circulation sanguine. Comme présenté tout au long de cet exposé, les fonctions de la FlnA dans la cellule reposent en grande partie sur ses partenaires protéiques et non sur son activité intrinsèque. Par conséquent les divergences d'observation dans ces 2 modèles sont potentiellement provoquées par une variation d'expression d'un ou plusieurs partenaires protéiques. A ce travail, on peut ajouter les études portant sur la prolactine dans l'invasion des tumeurs (Marano et Ben-Jonathan 2014). Lorsqu'il est activé, le récepteur de la prolactine (PRLR) active consécutivement la kinase PAK1, qui peut phosphoryler la FlnA sur sa sérine S2152 afin de permettre la migration directionnelle des cellules T47D de tumeurs

mammaires (Hammer *et al.*, 2013). De même, le couple Cycline D1/CDK4-6 est également capable de phosphoryler la FlnA sur les sérines S1459 et S2152, la phosphorylation de ces sites par le dimère Cycline D1/CDK4-6 est associée à une potentialisation des capacités invasives et migratoires des cellules de cancer mammaire MDA-MB-231 (Zhong *et al.*, 2010).

II.VI.C | Cancer pulmonaire et Filamine A

Dans les cancers pulmonaires, la FlnA est modérément sur-exprimée, et ne semble pas constituer un facteur pronostique (Shieh *et al.*, 1999 ; Uramoto *et al.*, 2010). L'EMT de cellules d'adénocarcinome pulmonaire A549 induite par le TGF- β , semble être en revanche à l'origine de la ré-expression de FlnA dans les cellules A549. Il est bon de noter que la ré-expression de FlnA lors de l'EMT est accompagnée de la ré-expression de la tropomyosine et de l'intégrine β 1, des protéines impliquées dans les processus d'invasion cellulaire (Keshamouni *et al.*, 2006). La GTPase K-Ras est un effecteur secondaire central des RTKs et joue un rôle clé dans les effets pro-oncogènes des RTKs (McCormick 2016). Nallapalli et collaborateurs ont mis en évidence que la FlnA est nécessaire à la formation d'adénocarcinomes pulmonaires induite par l'activité de K-Ras, entraînant une réduction de l'activation des kinases ERK1/2 et AKT (Nallapalli *et al.*, 2012). La FlnA joue donc un double rôle dans la tumorigenèse des tumeurs pulmonaires, en régulant d'une part les mécanismes de migration et d'invasion, et d'autre part en modulant la signalisation associée à la stimulation de la prolifération induite par l'activation de l'EGFR dont le rôle dans la tumorigenèse est aujourd'hui très largement décrit (Figure 40 | Interaction entre la voie de MAPK et la Filamine A : implication dans les processus associés à la tumorigenèse) (Sigismund *et al.*, 2018).

II.VI.D | Cancer pancréatique et Filamine A

La FlnA est également surexprimée dans les cancers du pancréas (Zhou *et al.*, 2011 ; Surcel *et al.*, 2019). La surexpression de la filamine A stimule le phénomène de métastase des tumeurs pancréatiques, un mécanisme pouvant être associé au rôle de la FlnA dans l'activité du récepteur c-Met au sein de la tumeur. En effet le récepteur c-Met est un des acteurs centraux régulant les mécanismes d'invasion des tumeurs du pancréas (Di Renzo *et al.*, 1995). Or il a été montré que la FlnA est nécessaire à l'activation de AKT consécutive à la stimulation du récepteur c-Met. La FlnA renforce également l'activité du promoteur de c-Met *via* sa liaison avec SMAD2 et potentialise par conséquent l'expression de c-Met *via* l'activation des EGFR (Zhou *et al.*, 2011). Le récepteur SST2 constitue l'une des cibles thérapeutiques principales

pour le traitement des tumeurs neuroendocrines pancréatiques. Or comme mentionné dans la partie traitant de l'interaction entre la FlnA et les RCPGs, la FlnA joue un rôle clé dans la signalisation de SST2. Les effets de l'analogue du SST2, le BIM23120, sur l'expression de la cycline D1, l'accumulation d'AMPc, la phosphorylation de ERK1/2 et l'expression de VEGF dans les cellules P-NETs sont complètement abolis en absence de FlnA. Les effets du BIM23120 sur l'adhésion et la migration sont également inhibés en absence de FlnA (Vitali *et al.*, 2016). Associée aux stratégies thérapeutiques déjà en place, le ciblage de la FlnA constitue donc également une piste thérapeutique d'intérêt dans la prise en charge des tumeurs d'origine pancréatique et plus particulièrement des tumeurs neuroendocrines.

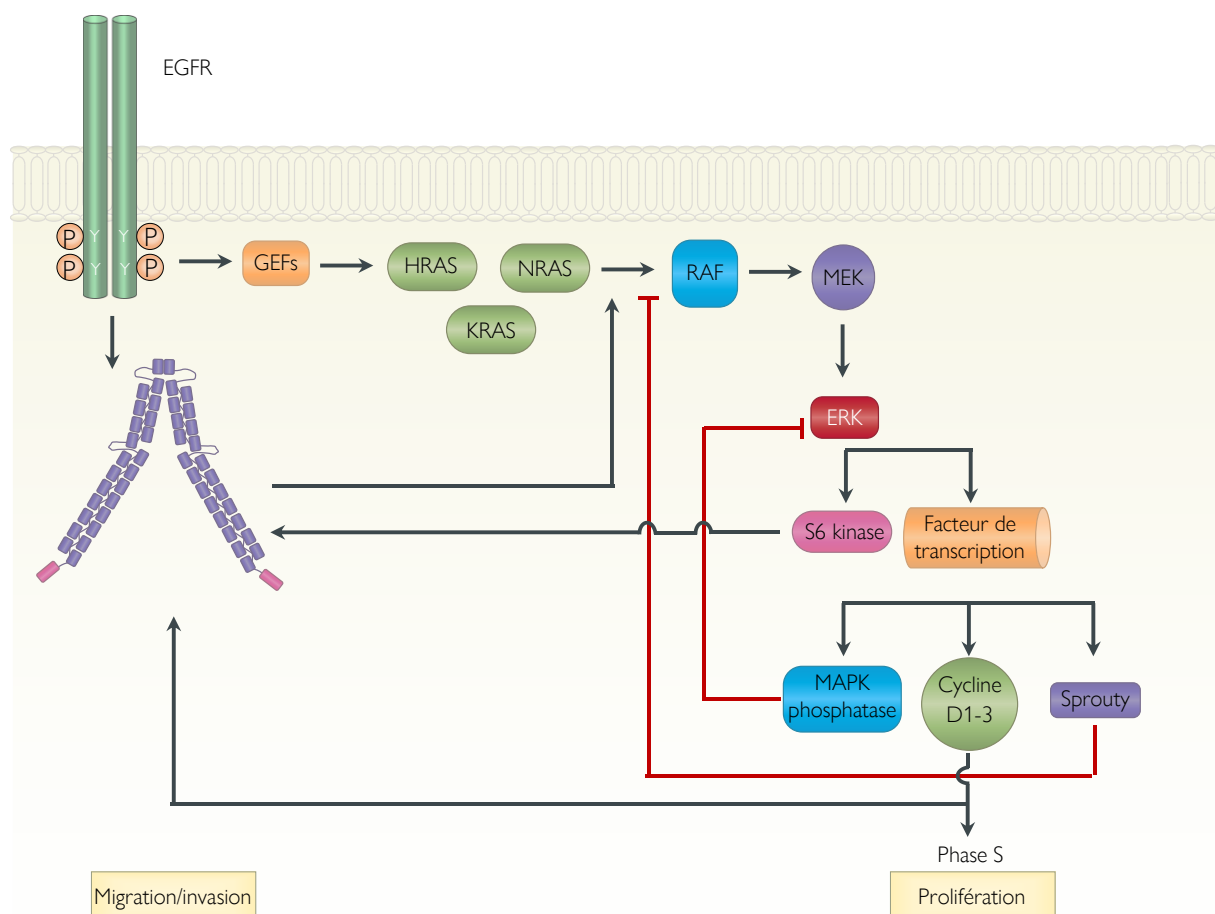


Figure 40 | Interaction entre la voie de MAPK et la Filamine A : implication dans les processus associés à la tumorigénèse. La FlnA intervient à plusieurs niveaux dans la régulation de la voie des MAPK activée consécutivement à l'EGFR. Premièrement, la FlnA intervient dans l'activité de KRas lors de la tumorigénèse d'adénocarcinomes pulmonaires puis elle facilite l'activation de SMAD2 consécutive à l'activation de l'EGFR. Réciproquement la S6 kinase et la cycline D1 phosphorylent la FlnA, potentialisant ainsi la migration.

II.VI.E | Mélanome et Filamine A

Les patients atteints de mélanomes et possédant de faibles niveaux de FlnA présentent une amélioration significative de leur survie (Zhang *et al.*, 2014). En préclinique, il a été montré que les cellules de mélanomes C8161 sous-exprimant la FlnA produisent significativement moins de métastases hépatiques, pulmonaires et spléniques dans un modèle de greffes par injection sous-cutanée (Jiang *et al.*, 2012). *In vitro* la déplétion de FlnA dans la lignée de mélanome UACC647 réduit significativement la migration, l'invasion ainsi que la prolifération de ces cellules (Zhang *et al.*, 2014). La lignée UACC647-FlnAKD génère des tumeurs d'un volume plus réduit lorsqu'elle est xénotreffée. De façon intéressante, la cascade d'activation Raf-MEK-ERK activée par la stimulation de l'EGFR est altérée *in vitro* et *in vivo* dans les cellules UAC647-FlnAKD. Le contrôle de l'axe EGFR Ras-Raf-MEK-ERK par la FlnA semble constituer une piste pour l'explication de la réduction des capacités prolifératives et invasives des mélanomes sous-exprimant la FlnA. En effet il a été montré que la cascade Ras-Raf-MEK-ERK est une cascade d'activation dominante dans les mélanomes qui régule positivement l'expression et l'activité de métalloprotéases impliquées dans le remodelage de MEC associé aux phénomènes d'invasion des cellules tumorales (Kim et Choi 2010). Le Pro-Prion ou PrP est un peptide immature ayant conservé son peptide signal glycosylphosphatidyl-inositol (GPI-PSS). Ce peptide est fortement exprimé dans certains cancers comme le cancer du pancréas et les mélanomes (Li *et al.*, 2009 ; Sy *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010). Seul le Pro-PrP se lie à la FlnA *via* son peptide signal, cette liaison potentialise la liaison de la FlnA avec les intégrines $\beta 1$. De façon intéressante l'application de concentrations croissantes du fragment GPI-SS inhibe la migration des cellules A7, potentiellement en stabilisant le complexe FlnA-intégrine $\beta 1$ (Li *et al.*, 2010).

II.VI.F | Autres cancers ayant fait l'objet d'une publication et Filamine A

L'expression de la FlnA diminue dans les adénocarcinomes colorectaux, cette diminution d'expression est associée à un mauvais pronostic chez ces patients. La sous-expression de FlnA est également associée à un plus grand nombre de métastases chez les patients possédant des niveaux faibles de FlnA (Tian *et al.*, 2015). De façon intéressante des traces de FlnA sont détectées dans les fèces des patients atteints d'adénocarcinomes et de forts niveaux constitueraient un marqueur diagnostique pour le dépistage des adénocarcinomes colorectaux (Ang et Nice 2010). Cependant au vu des différences d'observations entre ces 2 études on peut

dès lors supposer que la FlnA détectée dans les fèces des patient atteints d'adénocarcinomes colorectaux serait produite par un autre type cellulaire différent du type tumorale, il est possible d'incriminer les infiltras lymphocytaires envahissant le néoplasme et exprimant fortement la FlnA (Ropponen et al. 1997; Hayashi et Altman 2006).

L'expression de la FlnA est également significativement réduite dans les carcinomes gastrique, nasopharyngé et rénaux. Dans l'ensemble de ces trois types tumoraux la diminution de l'expression de la FlnA est associée à une augmentation des métastases des ganglions lymphatiques. Sur un plan histologique les niveaux les plus faibles de FlnA sont détectés dans les grades II et III des carcinomes nasopharyngé et gastrique. Les niveaux les plus faibles sont également retrouvés dans les grades II et III des carcinomes rénaux avec une diminution qui semble plus prononcée pour le sous type papillaire. *In vitro*, la transfection de FlnA dans des cellules SGC-7901 (carcinome gastrique), ACHN (carcinome rénal) et CNE-2 (carcinome nasopharyngé) diminue la prolifération de ces cellules ainsi que leurs capacités migratoires et invasives (Sun *et al.*, 2014-1 ; Sun *et al.*, 2014-2 ; Sun *et al.*, 2014-3). La FlnA joue un rôle central dans l'établissement et la stabilisation des jonctions cellule-cellule (Tu et You 2014), or la perte des jonctions cellulaires est un des mécanismes initiateurs du processus de métastases, par conséquent la perte de l'expression de la FlnA pourrait être l'un des mécanismes centraux impliqués dans la dispersion des carcinomes.

II.VI.G | **Cancers du système nerveux central et Filamine A**

Les cancers du SNC font l'objet de peu de publications en rapport avec la FlnA. A ce jour, seul 2 publications traitent le sujet, l'une fait état de l'expression membranaire de FlnA à la surface des cellules de neuroblastome LAN-1 et LAN-5 (Bachmann, Howard, et Vogel 2006) et la seconde a mis en évidence que les niveaux d'expression de FlnA étaient corrélés au grade des astrocytomes, présentant une augmentation significative dès l'astrocytome de grade II pour montrer les niveaux les plus élevés dans les GBM. La même étude fait également l'état d'une augmentation des niveaux circulants de FlnA, cependant aucune donnée rapportant au potentiel invasif ou à la survie des patients n'est à ce jour disponible. De plus aucune étude fonctionnelle du rôle de la FlnA dans la physiologie des gliomes n'est décrite (Alper *et al.*, 2009). Les investigations dans ce domaine sont nécessaires et permettront de déterminer le rôle de la FlnA dans les mécanismes associés à la malignité des gliomes, impliquant la migration, l'invasion, la prolifération ainsi que la résistance au traitement.

Objectifs de thèse

A ce jour aucune stratégie thérapeutique ne permet la rémission partielle ou complète des patients atteints de GBM. Le protocole actuel standard de traitement des GBM repose sur le protocole de Stupp qui consiste en l'exérèse complète de la masse tumorale par chirurgie associée à un traitement combiné de radiothérapie et chimiothérapie. Cependant, plus de 95% des gliomes récidivent en marge de la cavité de résection, zone dans laquelle on retrouve des cellules tumorales invasives agissant comme un réservoir de tumeur. La majeure partie des stratégies thérapeutiques développées ces 10 dernières années reposent principalement sur l'inhibition de la croissance tumorale *via* l'utilisation d'un large panel d'iRTK, incluant les stratégies anti-angiogéniques telles que le bevacizumab, l'afilbercept et le cediranib, qui peuvent améliorer la survie sans progression des patients, mais sont décevantes en terme de survie globale. Plusieurs phénomènes peuvent expliquer les échecs thérapeutiques actuels, il s'agit de i) la radio et/ou chimiorésistance intrinsèque ou acquise des cellules de gliome, ii) la présence d'une BHE qui limite l'acheminement des agents thérapeutiques, et surtout iii) l'invasion des cellules de gliome qui envahissent le parenchyme cérébral sain en suivant les fibres nerveuses myélinisées ou les vaisseaux sanguins en réponse aux gradients de facteurs chimiotactiques. Des chimiokines telles que le SDF-1 α et son récepteur le CXCR4, sont surexprimés dans les GBM et font l'objet d'une intense recherche en tant que cible thérapeutique majeure. Le récepteur CXCR4 étant classiquement couplé aux protéines G α_i et G α_{12} , relayant la polarisation cellulaire et la migration chimiotactique directionnelle, se trouve surexprimé dans les régions hypoxiques des GBM responsables de la transition mésenchymateuse et l'invasion. Notre équipe a récemment montré que le récepteur UT du neuropeptide UII se comporte comme un récepteur chimiokine et que son activation stimule la migration directionnelle de cellules d'astrocytome de grade III (SW1088) et de GBM (U87) *in vitro* *via* l'activation conjointe des voies G α_i /PI3K/PIP3 et G $\alpha_{12/13}$ /Rho/ROCK. De plus, l'UT et son peptide UII sont surexprimés dans les régions hypoxiques périnécrotiques de GBM.

Ainsi la meilleure compréhension des acteurs moléculaires impliqués dans la régulation de l'invasion des GBM constitue une piste thérapeutique d'intérêt à ce jour. Sur la base des données de la littérature montrant que les RCPGs chimiotactiques CXCR4, CCR5, CCR2A, CCR3, CX3CR1, CXCR1, CXCR2 ou UT sont surexprimés dans les GBM, nous émettons l'hypothèse que les stratégies d'inhibition ciblée d'un système chimiokine ligand/récepteur

parmi les autres, telles que celles développées en essai clinique et préclinique actuellement, risquent d'être inefficaces **face à la redondance d'expression des récepteurs**.

L'objectif de mon travail de thèse était donc d'isoler et de caractériser des acteurs moléculaires communs aux RCPGs chimiokines qui représenteraient des « nœuds » ou « routeurs », intervenant dans la régulation des voies de couplage et/ou du trafic de ces récepteurs et contrôlant l'invasivité des GBM. Nous avons donc :

- 1) Vérifié la co-expression systématique des récepteurs chimiokines CXCR4 et UT ainsi que leurs ligands respectifs, SDF-1 α et UII dans des prélèvements de gliomes de patients y compris des GBM (grâce à une collaboration avec Pr A. Laquerrière, CHU de Rouen).
- 2) Recherché et identifié un ou des nouveaux partenaires protéiques du récepteur UT, afin d'isoler de potentiels acteurs communs aux autres récepteurs chimiokines, capables de réguler leurs activités et la migration cellulaire.
- 3) Evaluer l'expression et le facteur diagnostic/pronostic de ce partenaire protéique commun, la FlnA, dans différents grades de gliome à l'aide des cohortes de données du TCGA et d'IVYgap, ainsi qu'une banque d'échantillons du CHU de Rouen.
- 4) Etudier le rôle de la FlnA dans la prolifération, la résistance aux traitements et la migration de cellules de GBM.
- 5) Elucider les conséquences fonctionnelles de ces interactions sur les voies de couplages et le trafic du récepteur UT, et l'impact sur la migration directionnelle et l'invasion *in vitro* et *in vivo* relayées par le système UII/UT.

Résultats

Mutel A, Lecointre C, Desrues L, Guichet P.O, Langlois O, Laquerrière A, Marguet F, Prézeau L, Gandolfo P, Morin F and Castel H. Re-expression of Filamin A in glioblastoma promotes the endogenous and chemokine receptor UT-induced migration/invasion: Marker of aggressiveness and survival.

Re-expression of Filamin A in glioblastoma promotes the endogenous and chemokine receptor UT-induced migration/invasion: Marker of aggressiveness and survival

Alexandre Mutel¹, Céline Lecointre¹, Laurence Desrues¹, Pierre-Olivier Guichet¹, Olivier Langlois^{1,2}, Annie Laquerrière³, Florent Marguet³, Laurent Prézeau⁴, Pierrick Gandolfo¹, Fabrice Morin¹ and Hélène Castel¹

¹ Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM, U1239, Laboratoire Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine, Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale de Normandie, 76000 Rouen, France

² Neurosurgery Service, Rouen CHU Hospital, 76000 Rouen, France

³ Anathomocytopathology Service, Rouen CHU Hospital, 76000 Rouen, France

⁴ IGF, Institut of Functional Genomic, CNRS UMR 5203, Inserm U661, University of Montpellier 1 and 2, Montpellier, France.

Corresponding author: Hélène Castel, INSERM U1239, Laboratory of Neuronal and Neuroendocrine Cell Communication and Differentiation, University of Rouen Normandie, 25 Rue Tesnière, 76821 Mont-Saint-Aignan

E-mail address: helene.castel@univ-rouen.fr

Running head: Filamin A involvement in GBM resistance to chemotherapy and invasivity.

Conflicts of Interest and Source of Funding

The authors have disclosed that they hold no financial interests related to the conduct or results of this research.

This work was supported by Inserm, Normandie Rouen University, Ligue contre le Cancer Normandie and Géfluc

Abstract

Multiform glioblastoma (GBM) are the most frequent and aggressive brain tumors associated with a near-systematic tumor recurrence in the margin of the resection cavity. The acquisition of a mesenchymal phenotype in perinecrotic hypoxia GBM areas, constitutes one of the key mechanisms responsible for GBM cell invasion towards chemokine cues. Hypoxia-induced mesenchymal transition can also stimulate overexpression of a number of G protein-coupled chemokine receptors (GPCR) responsible for brain parenchyma infiltration of GBM cells. Our previous work established that a peptide chemokine GPCR named UT activated by the neuropeptide urotensin II (UII) mediates chemotactic glioma cell migration through $G_{\alpha i}$ /PI3K/PIP3 and $G_{\alpha_{12/13}}$ /Rho/ROCK pathways, a classical coupling of chemokine GPCRs. This suggests redundancy of chemokine GPCRs expression and functions in GBM cells. Thus common effectors of these GPCRs would represent a strategy of choice.

Immunohistochemical studies on patient-paraffin-embedded biopsies demonstrated the consistent co-overexpression of CXCR4/SDF-1 α and UT/UII systems in high-grade glioma and more specifically in hypoxic pseudopalisadic areas in GBM. By two-hybrid assay, we found that the UT C-terminal part (UT_{Cterm}332-351) interacts with Filamin A (FlnA), through its repeat 19-20 domains. From glioma patient biopsies as well as The Cancer Genome Atlas and IVYgap databases, FlnA expression level was shown correlated with glioma grades, patient survival and tumor recurrence, showing the highest levels in IDHwild-type GBM. By using U87 and U87-FlnAKO cell lines, we showed that deletion of FlnA leads to reduced glioma cell proliferation and accumulation in G1 cell cycle phase, inducing sensitization to the temozolomide and irinotecan chemotherapy to provoke cell death. The absence of FlnA, was associated with faint detection of actin stress fibers and paxillin focal adhesion points, and lack of lamellipodia protrusion responsible for inhibition of cell motility. In addition, the UII-induced U87 cell adhesion and migration were abolished while UT was only expressed at the plasma membrane and failed to be internalized/endocytosed after UII treatment. A FlnA-dependent UT- $G_{\alpha i}$ pre-coupling was not found in U87-FlnAKO cells. In this latter, activation of UT rather favored a coupling to $G_{\alpha q}$ and an increase of cytosolic Ca²⁺ mobilization. Reversely, in U87, UT by recruiting a $G_{\alpha i}$ pathway, promoted FlnA cleavage and UT translocation to new lamellipodia, suggesting that a FlnA-UT/ $G_{\alpha i}$ coupling transduces FlnA cleavage, UT endocytosis and relocation to lamellipodia. Finally, *in vivo* xenografted mice by U87-FlnAKO displays a longer survival compared with U87, and displayed a highly circumscribed phenotype associated with significant reduction of UT/UII and MMP-9 expression within the tumor bulk, supporting the role of FlnA in the regulation of invasion

processes. Altogether these data highlighted the role of FlnA as a potential therapeutic target involved in GBM invasion and resistance to chemotherapy.

Introduction

Multiform glioblastoma (GBM) are the most aggressive glioma subtypes referred to the grade IV of all astrocytoma. The annual incidence of GBM represents 2.53 women and 3.97 men for 100 000 people, whose median of survival after resection is only 14.6 months (Koshy *et al.*, 2012; Ostrom *et al.*, 2014). Glial tumors represent a wide spectrum of malignancies recently newly classified according to the histomolecular classification published by the World Health Organization -WHO2016- (Louis *et al.*, 2016). Accordingly, three major diagnostic subtypes of GBM are individualized in 4 groups: (i) IDH-mutant (IDHmut), (ii) IDH-wildtype (IDHwt) and, (iii) IDH not otherwise specified (Louis *et al.*, 2016). GBM are histologically characterized by necrotic areas surrounded by hypoxic pseudo-palisading areas and by microvascular proliferation and abnormal vascularization (Louis *et al.*, 2007). Although not used in clinical practice, additional subgroups of GBM were identified at the molecular level with clinical significance. As an illustration of this heterogeneity, 4 major transcriptomic subgroups of GBM have been identified by analogy to normal central nervous system (CNS) developmental transcriptomic programs: proneural -PN-, neural -N-, classical -CL- and mesenchymal -MES- (Verhaak *et al.*, 2010). Recently, some analyses of microdissected specific zones of GBMs, e.g. hypoxic, vascular, core tumor or leading edge, tend to indicate that the main groups of the Verhaak classification can be recapitulated within a GBM resection fragment (Wick and Kessler, 2018), strongly supporting the heterogeneous and constantly metamorphosing nature of malignant gliomas (Aubry *et al.*, 2015). In particular, the mesenchymal subtype is associated with mutation or overexpression of NF1 (Neurofibromin 1), TP53 or PTEN (phosphatase and tensin homolog), or overexpression of genes belonging to the super family of TNF (Tumor Necrosis Factor- α) and NF- κ B (*nuclear factor-kappa B*) pathways (Verhaak *et al.*, 2010), potentially involved in increased necrosis and inflammatory infiltrates. Other alterations of mesenchymal markers or inflammation as CHI3L1 (*Chitinase-3-like protein 1*), the proto-oncogene cMET (Hepatocyte Growth Factor Receptor) or CD44 (CD44 antigen) are also observed (Phillips *et al.*, 2006; Agnihotri *et al.*, 2013).

Heterogeneity and mesenchymal phenotype were associated with higher hypoxic micro-environmental GBMs (Patel *et al.*, 2014). It is commonly established that effects of hypoxia are mainly related to the stabilization of the transcription factors (TF) Hypoxia Inducible Factor-1 α (HIF-1 α) normally degraded under normoxic conditions. Indeed, prolyhydroxylase (PHD) enzymes used α -ketoglutarate to hydroxylate HIF-1 α thus triggering VHL (Von Hippel-Lindau)-dependent ubiquitinylation and proteasomal degradation of HIF-1 α (Epstein *et al.*,

2001). Under hypoxia, the decreased hydroxylation favors HIF-1 α expression and translocation to the nucleus to trigger Hypoxia Response Element (HRE) activation and targeted genes expression. In GBM hypoxic areas, HIF-1 α more especially promotes angiogenesis associated molecules expression like VEGF (Vascular epidermal growth factor) (Merighi *et al.*, 2006; Gillespie *et al.*, 2007) and PDGF (*Platelet derived growth factor*) (Clara *et al.*, 2014), causing the formation of tortuous hyperplastic leaky vessels caused by an uncontrolled and exacerbated angiogenesis (Jain, 2003). On the other hand, HIF-1 α enhances GBM invasive properties by promoting chemokine G protein-coupled receptor (GPCR) expression like CXCR4 and CXCR7 and CCR5 known as potent chemokine receptors allowing cells to migrate through SDF-1 α gradient secreted by surrounding vascular component (Zagzag *et al.*, 2006; Sciumè *et al.*, 2010; Esencay *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2015). Moreover extended necrosis and hypoxia are associated with the mesenchymal transition, responsible for tumor invasiveness (Cooper *et al.*, 2012). Carro *et al.* (2010) demonstrated that the mesenchymal phenotype acquisition can be driven by at least 2 key transcription factors, e.g. C/EBP (CCAAT Enhancer Binding Protein Beta) and STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3), coordinating the signature the mesenchymal phenotype in GBM and the aggressiveness relayed by invasiveness and resistance to treatment, leading to recurrence.

Invasive GBM cells escaping from the tumor bulk are responsible for the 95 % of tumor recurrence in the resection cavity margin (Giese *et al.*, 2016). It is currently recognized that GBM cell invasion occurs through at least two different routes, along blood vessels by adhesion to the basement membrane (BM) mainly releasing collagen IV and laminine (Kalluri, 2003). *In vivo* GBM cells express $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$, $\alpha v\beta 4$, $\alpha v\beta 5$ allowing cells to migrate on MB during invasion of healthy brain parenchyma (Paulus *et al.*, 1993; Gingras *et al.*, 1995). This invasion requires extracellular matrix degradation (ECM) degradation through the release of two main proteases, the Matrix Metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 & MMP-9). More especially high MMP-9 mRNA and protein expression are correlated with glioma malignancy and histological grades (Lakka *et al.*, 2004). The migration can also be detected along myelinated fibers as a mechanism requiring the specific secretion of the metalloproteinase-14 (MMP-14) by GBM cells, within myelinated fibers like myelin and myelin-associated glycoprotein (Giger *et al.*, 2008; Gritsenko *et al.*, 2012;). By exploiting these tracts, GBM cells respond to chemical cues including growth factors, chemokines, peptides and/or components of the ECM (Seifert and Sontheimer 2014). In particular, this was demonstrated for the growth factor receptors c-Met or EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) and the chemokines GPCRs as CXCR4,

CXCR7 or CCR5 (Eckerich *et al.*, 2007; Talasila *et al.*, 2013). Interestingly, CXCR4, CXCR7 and CCR5 expressions are correlated to glioma grades, showing the strongest expression for GBM (Zhao *et al.*, 2015; Birner *et al.*, 2015; Lange *et al.*, 2018). And pharmacological inhibition of CXCR4 or repression of CXCR7 expression by shRNA, significantly inhibit GBM cell migration and invasion *in vitro* and in preclinical models (Rosenkilde *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2015; Yadav *et al.*, 2016).

We previously established that the GPCR UT of the vasoactive neuropeptide urotensin II (UII) shares structural homologies with chemokine GPCRs potentially allowing to sense a gradient concentration of the ligand, and to mediate chemotactic cell migration, leading to invasion (Castel *et al.*, 2017). UT expression has been described in various cancer types like adrenocortical carcinoma and pheochromocytoma and in CNS tumors like neuroblastoma and GBM (Takahashi *et al.*, 2003; Takahashi *et al.* 2001). It has been reported that UII stimulates A549 pulmonary adenocarcinoma cell proliferation *in vitro* and *in vivo* (Wu *et al.*, 2010), and of WB-F344 hepatic cancer cells associated with an increase of G1/S transition (Yu *et al.*, 2015). We previously established that UT is expressed in astrocytoma and GBM cells mediating directional migration, a mechanism relayed by a Gai/PI3K pathway responsible for cell polarization and focal adhesion point formation (FA), a G α 13/Rho/ROCK signaling inducing FA maturation and actin cytoskeleton polymerization within lamellipodia, and inhibition of autophagy (Lecointre *et al.*, 2015, Coly *et al.*, 2016). Thus, chemokine GPCR expression and functional redundancy may allow GBM relapse during a treatment targeting one of these chemokine systems. Thus, common secondary effectors and protein partners of these chemokine GPCRs should constitute shared key signaling nodes essential for GBM invasion.

Among potential candidates, Filamin A (FlnA), a large protein platform was previously reported as a major interacting partner of both CXCR4 and CCR5 (Jiménez-Baranda *et al.*, 2007) and CCR2B (Planagumà *et al.*, 2012). FlnA is composed of 24 repeat domains, forming 2 rod segments separated by one hinge region potentially cleavable by calpain-dependent proteolysis (Zhou *et al.*, 2010). Its ability to cross-link the actin cytoskeleton *via* FlnA N-terminal actin-binding domain (ABD) and to homodimerize *via* the C-terminal repeat domain 24 of two FlnA monomers (Pudas *et al.*, 2005; Nakamura *et al.*, 2005), supports the role of FlnA on CHO cell polarization (Calderwood *et al.*, 2001), HEK293 and 3T3 cell adhesion (Kim *et al.*, 2010) and MDA-MB-231 breast cancer cell line migration (Jiang *et al.*, 2012). In addition, more than 90 different proteins (Nakamura *et al.*, 2011) were proven to bind and interact with FlnA, promoting many cell functions. It concerns adhesion molecules like the Iba α

glycoprotein from the GPIb-V-IX complex (Meyer *et al.*, 1997) or the β subunit of $\alpha\beta$ integrin dimers (Kiema *et al.*, 2006), transcription factors like SMAD2 (Mothers Against Decapentaplegic Homolog 2) (Sasaki *et al.*, 2001) and PEBP2- β (Core-Binding Factor Subunit Beta) (Yoshida *et al.*, 2005), DNA repair machinery proteins like BRCA1 (Breast Cancer 1) or Ku80 (Ku Autoantigen, 80kDa) (Velkova *et al.*, 2010), Rho GTPase family proteins and associated effectors like ROCK (Rho Associated Coiled-Coil Containing Protein Kinase) or PAK1 (P21 (RAC1) Activated Kinase 1) (Zhou *et al.*, 2010), and a number of transmembrane receptors as opioïdergic MOPr (Onoprishvili, 2003), dopaminergic D2R and D3R (Lin *et al.*, 2001), calcitoninergic CTR (Seck *et al.*, 2003) or somatostatinergic SST2 (Najib *et al.*, 2012). The generic role of FlnA in the control of GPCRs is not entirely well described, but concerns membrane expression of D2R, D3R and SST2 (Lin *et al.*, 2001; Peverelli *et al.*, 2014), efficient β -arrestin-2 recruitment to D3R after agonist stimulation and GRK2 receptor phosphorylation (Kim *et al.*, 2005). It was shown that CXCR4 interacts with FlnA repeat 10, and allow chemotactic migration (Jiménez-Baranda *et al.*, 2007), CCR5 binds FlnA through its repeat domains 13-16 (Jiménez-Baranda *et al.*, 2007), CCR2B interacts with FlnA repeat domain 19 mediating receptor internalization while reciprocally CCR2B activation triggers FlnA phosphorylation, through a $G\alpha_q$ -PKC pathway (Minsaas *et al.*, 2010; Pons *et al.*, 2017). Interestingly, an unphosphorylatable recombinant FlnA form (FlnA-S2152A) is missing from endosomes, suggesting that FlnA phosphorylation is a key mechanism of FlnA mediated receptor internalization (Pons *et al.*, 2017).

Here, we identified FlnA by two hybrid assay as a key interacting partner of UT, through the cytosolic C-terminal fragment of the receptor and the 19-20 repeat domains of FlnA. The redundant expression of UT and UII or CXCR4 and SDF-1 α as well as the expression and localization of FlnA were established by immunohistochemistry (IHC) in a series of human glioma samples compared with normal brain tissue. Expression levels of FlnA in different glioma (IDHmut, IDHwt), association with patient recurrence and survival and correlations with the positive expression of different genes were established by means of TCGA (The Cancer Genome Atlas), and the heterogeneous expression of FlnA within a GBM was also investigated with the IVYgap (IVY glioblastoma atlas project) database. The presence of FlnA was confirmed in GBM cell lines under normoxia and or hypoxia conditions. By down-regulating FlnA (Sh-RNA, CRISPR/cas9) in the U87 GBM cell line, we showed the role of FlnA in cell cycle and growth, sensitivity to treatment, cell morphology and cytoskeleton organization, migration and lamellipodia expansion. In addition, the key role of FlnA in UII-

induced migration and adhesion, and the UT receptor coupling to G α i or G α q and internalization in the U87 was established. *In vivo*, we tested the role of FlnA in tumor growth and invasion, as well as mouse survival *via* brain intrastriatal injection of U87 or FlnA deleted U87 cell lines.

Materials and Methods

Reagents and consumables

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Trypsin-EDTA (0.05%) and Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) were from GIBCO Life Technologies (Fisher Scientific, Illkirch, France). Lipofectamine 2000, the secondary antibodies Alexa Fluor® 488-, 594-, 647-conjugated donkey anti-rabbit (DAR488, DAR594, DAR647), Alexa Fluor® 488-, 594-, 647-conjugated donkey anti-mouse (DAM488, DAM594, DAM647), Alexa Fluor® 594-conjugated donkey anti-rat (DARat594), rhodamine-phalloidin, Fluo4-AM Dye, CellTracker™ Green CMFDA Dye, Pluronic F-127 (20% solution) and the primary antibodies raised against KI67 and Gαi1 protein were provided by Invitrogen (Fisher Scientific). Methanol and the 10% sodium dodecyl sulfate (SDS) solution were from Fisher Scientific. Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS), the antibiotic-antimycotic solution (penicillin 10,000 U/mL; streptomycin 10 mg/mL; amphotericin B 25 µg/ml), sodium pyruvate solution (100 mM), fibronectin from human plasma (0.1%), 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI), eosin, hematoxylin, Ultrapure water, normal donkey serum (NDS), paraformaldehyde (PFA), triton X-100, the cocktails of protease and phosphatase inhibitors, H-89 dihydrochloride hydrate, Pertussis toxin from *Bordetella pertussis* (PTX), 8Br-cAMP, probenecid, HEPES solution (1 M) as well as the primary antibodies directed against Gαq/11 protein, laminin and vinculin were purchased from Sigma Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Bovine Serum Albumin fraction V (BSA) was from Roche Diagnostics (Mannheim, Germany). Fetal Bovine Serum (FBS) was purchased from Dutscher (Brumath, France). Cell line nucleofector kit V was from Lonza Sales Ltd (Basel, Switzerland). Mowiol 4-88 (Calbiochem) and ethanol were from VWR (Fontenay-sous-bois, France). The horseradish peroxidase-conjugated (HRP-conjugated) secondary antibodies directed against rabbit and mouse, the primary antibodies raised against FlnA actin binding domain (Ab_FlnA_{D16-D24}), Urotensin II, UT, c-myc, HA, β-actin and β-tubulin were provided by Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany). Anti-phospho-FlnA (Ser2152) antibody was from Cell Signaling Technology (CST, Danvers, USA). Anti-human nuclei antibody was purchased by Millipore (Molsheim, France). The primary antibodies directed against CD44, CXCR4, carbonic anhydrase IX (CAIX), phospho-paxillin (Y31), MMP9, SDF-1 and FlnA D16-D24 (Ab_FlnA_{D16-D24}) were from Abcam (Cambridge, UK). ECL prime western-blotting detection reagent was from GE Healthcare (Freiburg, Germany). Transblot turbo RTA transfer kit PVDF was provided by Bio-Rad (Marnes-la-Coquette, France). Modified Boyden chambers (6,5 mm-transwell with 8 µm pore

polycarbonate membrane insert) as well as the 6-, 12-, 24- and 96-well cell culture plates were from Corning (Bagneaux-Sur-Loing, France). The peptide Urotensin II was provided by Tocris Bioscience (Bio-technique, Bristol, UK). Temozolomide (TMZ) and Irinotecan (CPT-11) were from CTI Europe (Heusenstamm, Germany).

Cell culture

The glioma cell lines U87 and SW1088 were from the American Type Culture Collection (ATCC; LGC standards, Molsheim, France). The 8MG, 42MG, U251 and GL15 cell lines were generously provided by Pr. J. Honnorat (CNRL, Lyon, France). Glioma cells were maintained in complete culture medium containing DMEM, 1 mM sodium pyruvate, 1% antibiotic-antimycotic solution and 10% FBS, at 37°C in a humidified incubator (5% CO₂ for normoxia or 1% O₂ for hypoxia).

Patient glioma biopsies immunostaining

Patient paraffin-embedded glioma biopsies were provided by the Anatomocytopathologic service of Rouen Normandy Hospital (Pr A. Laquerrière). Immunohistochemistry was performed using EnVision G/2 Doublestain System Kit (Dako, Glostrup, Denmark) according to manufacturer's instruction. Antibodies used for the study are shown in Table 1. Biopsies were counterstained using hematoxylin solution.

primary antibody	reference	species
anti-UT (H-90)	Santa Cruz sc-20940	rabbit
anti-CXCR4	Abcam ab124824	rabbit
anti-UII	Santa Cruz sc-20939	rabbit
anti-SDF-1	Abcam ab9797	rabbit
anti-FlnA N-term (Ab_FlnA _{ABD})	Santa Cruz sc-17749	mouse
anti-carbonic anhydrase IX (CAIX)	Abcam ab15086	rabbit
anti-MMP9	Abcam ab38898	rabbit

Table 1: Antibodies used for immunostaining of glioma samples.

Immunohistochemistry and image analysis

Glioma cells (50 000 cells/well) were plated onto 24-well plates containing fibronectin-coated glass coverslips. After a 24-h incubation (37°C, 5% CO₂), cells were starved for 2 h with serum-free medium. For experiments investigating the involvement of signaling pathways on UT-flnA distribution, cell were first treated with PTX (100 ng/mL, 6 h), H-89 (300 nM, 2 h) or 8Br-cAMP (200 µM, 20 min) and then treated with UII (10⁻⁸ M) for 5, 20 and 40 min. After several

washes with PBS, cells were fixed with PFA (4%, 5 min), permeabilized with Triton X-100 (0,05%; 5 min) and rinsed 3 times with PBS. The non-specific binding sites were blocked with normal donkey serum (NDS; 2%) and 10% BSA for 1 h at RT. Cells were incubated (overnight, 4°C) with the primary antibodies listed in table 2 diluted in 10% of the blocking solution. After 3 washes with PBS, cells were incubated with the appropriate Alexa Fluor secondary antibody (table 2) 2 h at RT. Cells were then stained with DAPI (1 µg/mL, 10 min) to label nuclei, and/or with rhodamine-phalloidin (1/200, 10 min) for stress F-actin staining. Cells were mounted with Mowiol 4-88 on glass slides and imaged by confocal microscopy (Leica TCS SP8 confocal laser scanning microscope, PRIMACEN platform, Rouen). The labeling intensity was quantified by measuring the integrated density using ImageJ software.

primary antibody	reference	species
anti-UT (H-90)	Santa Cruz sc-20940	rabbit
anti-U1I	Santa Cruz sc-20939	rabbit
anti-FlnA N-term (Ab_FlnA _{ABD})	Santa Cruz sc-17749	mouse
anti-FlnA C-term (Ab_FlnA _{D16-D24})	Abcam ab76289	rabbit
anti-phospho-paxillin (Y31)	Abcam ab32115	rabbit
anti-vinculin	SIGMA V9264	mouse
anti-MMP9	Abcam ab38898	rabbit
anti-laminin	SIGMA L9393	rabbit
anti-KI67	Invitrogen 14-5698-82	rat
anti-human nuclei	Millipore MAB1281	mouse
anti-CD44	Abcam ab119348	rat
anti-Gai1	Invitrogen PA5-28223	rabbit
anti-Gαq/11	SIGMA G4290	rabbit
anti-rabbit IgG, Alexa Fluor® 488	Invitrogen A21206	donkey
anti-rabbit IgG, Alexa Fluor® 594	Invitrogen A21207	donkey
anti-rabbit IgG, Alexa Fluor® 647	Invitrogen A31573	donkey
anti-mouse IgG, Alexa Fluor® 488	Invitrogen A21202	donkey
anti-mouse IgG, Alexa Fluor® 594	Invitrogen A21203	donkey
anti-mouse IgG, Alexa Fluor® 647	Invitrogen A31571	donkey
anti-rat IgG, Alexa Fluor® 594	Invitrogen A21209	donkey

Table 2: Antibodies used for immunofluorescence

Yeast two-hybrid screening

All vectors, yeast strains, reagents and methods were derived from the Matchmaker GAL4 Two hybrid System 3 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). The yeast strain AH109 contains two nutritional reporter genes Ade2 and His3, and the Mel1a reporter gene encoding

α -galactosidase, which allows direct blue/white screening on medium containing X- α gal. As bait, we used the coding region of the C-terminal 319-389 urotensin II receptor (UT_{cterm}). UT_{cterm} cDNA was generated by PCR using a sense primer (5'-GATCGAATTCACCAGGAACTACCGCGACCAC-3') that introduced an EcoRI site, and an antisense primer (5'-AAGTCGACTCACGCCGGGGCCCTGGGA-3') that introduced a Sall site. UT_{cterm} was cloned as an EcoRI-Sall fragment into pGBKT7 vector, in frame with the Gal4 DNA-binding domain, and sequenced. Absence of autonomous activation of reporter genes by the bait was verified prior to library screening. The UT_{cterm} bait was used to screen a human brain cDNA library constituted of 5 independent adult brains (provided by Dr. J.M Flaman, U614, Rouen, France) generated in pACT2 vector. The number of independent clones were evaluated at 3.5×10^6 . Co-transformants were first selected on leucin-tryptophan depleted-medium. Seventy-four co-transformants were then selected from a protein-protein interaction medium (*Quadruple dropout* (QDO), YNB/-Adenine / -Histidine / -Leucine / -Tryptophan / +X- α gal). DNA from positive colonies was prepared as described ("YEASTMAKER Yeast Plasmid Isolation" kit, BD Biosciences), and used to PCR amplify pGADT7-Rec inserts. PCR products were gel-purified and directly sequenced. Two controls were included for each two-hybrid assay: p53 (murine p53 protein, fused to the Gal4 DNA-binding domain) and T antigen (SV40 large T antigen (Tag), fused to Gal4 activation domain) are known to interact and used as a positive control; Lamin (human Lamin C, fused to the Gal4 DNA-binding domain) and TAg were used as a negative control.

For mapping experiments, the following truncated UT_{cterm} mutant cDNAs were generated by PCR and cloned in pGBKT7 vector using EcoRI-Sall sites: UT₃₁₉₋₃₅₁ (truncation of the 351 C-terminal residues), UT₃₁₉₋₃₇₀ (truncation of the 370 C-terminal residues), UT₃₃₂₋₃₈₉ (truncation of the 332 N-terminal residues), UT₃₅₁₋₃₈₉ (truncation of the 351 N-terminal residues) and UT₃₇₀₋₃₈₉ (truncation of the 370 N-terminal residues). In addition, cDNAs of UT_{cterm} P374-377A (mutation of proline P374 and P377 in alanine) and UT_{cterm} P382-385A (mutation of proline P382 and P385 in alanine) were constructed by oligonucleotide-directed mutagenesis (Quick-change site-directed mutagenesis kit, Agilent Technologies, Les Ulis, France) using UT_{cterm}-pGBKT7 as template. Absence of autonomous activation of reporter genes in AH109 cells was verified for each construct.

Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)

Total mRNAs from all glioma cell lines were extracted using TRI Reagent and purified with NucleoSpin RNAII kit (Macherey Nagel, Hoerd, France) according to the manufacturer's instructions and quantified by spectrophotometry (Nanodrop 1000, Ozyme, Saint-Cyr-l'Ecole, France). cDNA synthesis was carried out using Improm-II reverse transcription kit. All primers used are listed in Table 3. Each target mRNA gene was amplified and measured using the Fast SYBR Green Master Mix and the QuantStudio3 Real-Time PCR System according to the following protocol: 20 sec at 95°C, 40 cycles of amplification (denaturation: 3 sec at 95 °C, annealing and amplification: 30 sec at 60 °C). Fluorescence signals, which are proportional to the concentration of the PCR products, are measured at the end of each cycle and immediately displayed on a computer screen, allowing real-time monitoring of the PCR reactions. The fold change in expression of each target mRNA relative to ubiquitin C mRNA (UBC, internal control) or GAPDH mRNA, was calculated based on the threshold cycle (Ct) as $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$, where $\Delta Ct = Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{UBC/GAPDH}}$, and $\Delta(\Delta Ct) = \Delta Ct_{\text{sample}} - \Delta Ct_{\text{control}}$.

UTS2R	<i>forward</i>	5' CCCAACGCAACCCTCAACA 3'
	<i>reverse</i>	5' ACCACGTAGACGTACATGGAG 3'
UTS2	<i>forward</i>	5' AGGAAATTTGAGAAAGTTTCAGGAT 3'
	<i>reverse</i>	5' ATGGGTGTTTCTGAGCTGACT 3'
FlnA	<i>forward</i>	5' CACTGTCACAGGTGCTGGCATCG 3'
	<i>reverse</i>	5' TCCGGGGCCCAAGTCTGCT 3'
UBC	<i>forward</i>	5' CTGGAAGATGGTCGTACCCTG 3'
	<i>reverse</i>	5' GGTCTTGCCAGTGAGTGTCT 3'
GAPDH	<i>forward</i>	5' CTGGGCTACACTGAGCACC 3'
	<i>reverse</i>	5' AAGTGGTCGTTGAGGGCAATG 3'

Table 3: Oligonucleotides used for qPCR

Generation of glioma cell line FlnA Knockout

U87 cells were transiently transfected with 3 µg of the CRISPR/Cas9 KO human Fln 1 plasmid provided by Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany) by using Amaxa cell Line Nucleofector kit V according to the manufacturer's instructions. The transfected cells were then cloned by using the Smart Aliquoter device (Tebu-bio, Le Perray-en-Yvelines, France) for single cell isolation. FlnA protein repression was evaluated by western blotting with antibodies directed against FlnA actin binding domain (Ab_FlnA_{ABD}) (Santa Cruz, sc-17749) and rod 2 domain (repeat domain 16-24 of FlnA, Ab_FlnA_{D16-D24}) (ab76289, Abcam, Cambridge, UK).

Protein extraction and Western blotting

Cells under 80% of confluence in T75 flask were lysed by 100 μ L of RIPA buffer (25 mM Tris-HCl pH7,6; 150 mM NaCl, 1% NP40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) supplemented with 1% phosphatase and protease inhibitor cocktails. Cell lysates were homogenized within a 25G needle and centrifuged (18 000 rcf, 15 min, 4°C). The proteins of the supernatant were quantified by a colorimetric assay (DC Protein Assay, Bio-Rad), and the absorbance was measured at 750 nm with the TECAN infinite F200 pro platereader (TECAN, Männedorf, Switzerland). Protein samples were prepared at 5 μ g/15 μ L with Laemmli buffer, heated (5 min, 95°C), and then loaded onto a 4-12% polyacrylamide gel (Clinisciences, Nanterre, France). After separation, proteins were transferred onto a PVDF membrane thanks to Transblot turbo system (2.5 A, 25 V, 20 min) (Bio-rad, Marnes-la-Coquette, France). Membranes were blocked with TBS/Milk 10% (1 h, RT) and incubated with primary antibodies (see Table 4. for corresponding dilutions) (overnight, 4°C). The membranes were then washed 3 times with TBS-Tween (0.1%) and incubated with the corresponding HRP-conjugated secondary antibodies (2 h, RT). After rinsing (3 times with TBS-Tween (0.5%) and once with TBS), immunoreactive bands were visualized with ECL western blotting substrate kit (GE Healthcare, Aulnay sous-bois, France) on the ChemiDoc XRS+ gel imaging system (Bio-rad).

primary antibody	reference	species
anti-UT (H-90)	Santa Cruz sc-20940	rabbit
anti-FlnA N-term (Ab_FlnA _{ABD})	Santa Cruz sc-17749	mouse
anti-FlnA C-term (Ab_FlnA _{D16-D24})	Abcam ab76289	rabbit
anti- β -actin	Santa Cruz sc-47778	mouse
anti- β -tubulin	Santa Cruz sc-9104	rabbit
anti-phospho-FlnA (Ser2152)	CST #47615	rabbit
anti-cmyc	Santa Cruz sc-40	mouse
anti-HA	Santa Cruz sc-805	rabbit
anti-mouse IgG-HRP	Santa Cruz sc-2005	goat
anti-rabbit IgG-HRP	Santa Cruz sc-2004	goat

Table 4: Antibodies used for Western blotting

Motility

Glioma cells (25 000 cells) were plated onto fibronectin- (20 μ g/ml) coated 12-well plate. After 24 h of adhesion in complete medium, cells were starved during 2 h in FBS-, antibiotic-antimycotic- and sodium pyruvate-free medium. Cells were then placed in Zeiss Cell

Discoverer 7 microscope for acquisition. Images were collected every 2 min during 12 h and cells were tracked using ImageJ[®] manual tracking plugging.

Proliferation assay

For proliferation assay, 5 000 cells were plated onto fibronectin-coated 24-well plates and maintained in serum-reduced culture medium containing (1% FBS). After 24, 48 and 72 h, cells were labeled with 10 μ M of cell tracker green during 15 min, trypsinized with 100 μ L of trypsin, loaded onto Chemometec A8 slide (Chemometec, Villeneuve-Loubet, France) and counted at 488 nm in NC-3000 Nucleocounter (Chemometec).

Resistance to chemotherapies

To evaluate the resistance of glioma cells to chemotherapies, cells were plated onto fibronectin-coated 24-well plates and maintained in serum-reduced culture medium supplemented with 10^{-5} M or 10^{-7} M of Temozolomide (TMZ) and Irinotecan (CPT-11) (CTI Europe, Heusenstamm, Germany). After 24, 48 and 72 h, cells were labeled with 10 μ M of cell tracker green during 15 min, trypsinized with 100 μ L of trypsin, loaded onto Chemometec A8 slide (Chemometec, Villeneuve-Loubet, France) and counted at 488 nm in NC-3000 Nucleocounter (Chemometec).

Cell cycle

100 000 cells were plated onto fibronectin-coated 6-well plates and serum starved during 16 h. Then, cells were replaced in complete culture medium containing 10% FBS during 4 h. Cell cycle was evaluated using the Chemometec 2-step cell cycle assay and read on Chemometec NC-3000 Nucleocounter.

Cell migration assay

Glioma cells (50 000 cells/100 μ l DMEM) were seeded on the upper compartment of transwell filters with 8 μ m pores, previously coated with fibronectin (20 μ g/ml), without any chemoattractant compound. The chemokine gradient was generated by filling the lower chamber of the transwell with UII at the concentration of 10^{-7} M, 10^{-9} M, or 10^{-12} M in DMEM. The peptide diffusion through the membrane pores allows to create UII chemoattractant gradient. After 24 h of incubation at 37°C, membranes were rinsed with PBS, non-migrating cells were removed from the upper surface of the membrane using a cotton swab and cells that

migrated through the filter were fixed with 4 consecutive baths of methanol (50%, 70%, 90% and 100%). After fixation, cells were stained using hematoxylin solution. Then, membrane were removed from plastic with a scalpel and mounting on glass slides using Mowiol 4-88. Microphotography were taken using Nikon D7100 camera and cells on photographic fields were counted using the cell counter plug-in of ImageJ software.

Wound healing

Glioma cells (100 000 cells) were plated onto fibronectin-coated 12-well plates. After 24 h of adhesion in complete medium, cells were starved during 2 h in FBS-, antibiotic-antimitotic- and sodium pyruvate-free medium. Then, cells were placed in the Zeiss Cell Discoverer 7 microscope for acquisition and treated with 10^{-7} M and 10^{-12} M of UII. Images were collected every 20 min during 12 h. Wound closure was quantified manually using ImageJ[®] software.

Internalization assay

U87 and U87-FlnA KO cells were transfected with the plasmid encoding snap-tagged UT receptor using lipofectamine 2000 according to the manufacturer's recommendation. Cells were directly plated after transfection onto fibronectin-coated 96 well plates. Twenty-four h after seeding, cells were rinsed with cold PBS and incubated with a solution of 100 nM of BG-Lumi4 Tb (Cisbio, Codolet, France) for 1 h at 4°C. Cells were washed with PBS and incubated in the absence or presence of UII (10^{-7} M, 10^{-9} M or 10^{-12} M) diluted in buffer containing 25 µM of fluorescein. Fluorescence at 620 and 650 nm were read each 150 seconds during 1 h on Infinite F500 platereader (Tecan, Männedorf, Switzerland).

Calcium mobilization

U87 and U87-FlnA KO cells were transfected with 3 µg of recombinant UT_{pmKate} using Cell line nucleofector kit V. Transfected cells were then plated in fibronectin-coated 96-well plates at the density of 50 000 cells/well and incubated for 48 h at 37°C with 5% CO₂. Cells were washed twice with a modified HBSS buffer supplemented with 10 mM HEPES and 2.5 mM probenecid (pH 7,4) and incubated with 2 µM Fluo4-AM dye containing 0.01% pluronic acid for 1 h at 37 °C in 5% CO₂ atmosphere. Cells were rinsed twice with modified HBSS buffer and the effect of increasing concentrations of UII on cytosolic Ca²⁺ concentration was measured with a fluorimetric imaging plate reader FlexStation III (Molecular Devices, Wokingham, England) on PRIMACEN Platform (Mont-Saint-Aignan, France).

***In vivo* intrastriatal injection**

U87 and U87-FlnA KO cells were prepared at the density of 50 000 cells/3 μ l HBSS. Cell preparation (3 μ l) was orthotopically injected in adult NMRI/nude mice (7 weeks) using a Hamilton syringe 75RN mounted on a stereotaxic frame work at the ML: -0.18, AP: +0.14, DV: -0.27 coordinates at the rate of 300 nL/min. Eight animals per condition were injected and 2 sets of experiments were performed for survival and immunohistochemical studies with a total of 32 animals injected in the present study. When animals reached the limit point (loss of 15% of body weight) for the survival study or after 15 days of growth, mouse brains were sampled and immediately frozen in -35°C isopentane solution until immunohistochemistry.

Tumor data base analysis.

The clinical and molecular data on low grade glioma and GBM samples for this study were down-loaded from The Cancer Genome Atlas database (<https://tcga-data-nci-nih-gov.gate2.inist.fr/tcga/>) firstly in 2014, and the molecular information were again down loaded in February 2016. The clinical information used was the overall patient survival. The molecular data used were mRNA expression levels of FlnA obtained from RNAseq information by means of Illumina TruSeq Kit Paired-end Sequencing on Illumina HiSeq2000 and the gene expression level within the GBM subgroups of the Verhaak classification was obtained from different microarray platforms previously processed and summarized. Detection of somatic variants (IDHmut) from the TCGA Whole-Exome Sequencing and RNA-Seq data was done using RADIA. RADIA is a computational method combining the patient-matched normal and tumor DNA with the tumor RNA. The mRNA levels were represented as “normalized count” corresponding to a transformation of the "raw_count". For each gene of interest, all "raw_count" values were divided by the 75th percentile of the column patient (after removing zeros) and multiply by 1000 to generate “normalized expression level”. Filamin a most correlated genes were sort by their Person coefficient correlation (PCC), then genes showing PCC upper than 0.65 were used for the ontologique network analysis on the STRING platform. IVYgap data are RNA sequencing data for anatomic structures identified in the Anatomic Structures ISH Survey and putative cancer stem cell clusters isolated by laser microdissection.

Results

UT/UII and CXCR4/SDF-1 α systems are co-expressed in patient glioma samples

Previous studies from the team established key functional mechanisms relayed by UT and CXCR4 activated respectively by UII and SDF-1 α , in GBM cell lines. It was shown that as already described for the CXCR4/SDF-1 α system (Tan *et al.*, 2006; Dillenburg-Pilla *et al.*, 2015), UT responds to gradient concentrations of UII relaying chemotactic migration through G $\alpha_{i/o}$ /PI3K and G α_{13} /Rho/ROCK pathways (Lecointre *et al.*, 2015; Castel *et al.*, 2017). These classical mechanisms including lamellipodia expansion and actin polymerization can be accompanied by autophagic regulation of adhesions to allow directional migration of GBM cells (Lecointre *et al.*, 2015; Coly *et al.*, 2016). These observations clearly indicate that at least in part, the peptide Chemokine UT/UII and professional chemokine CXCR4/SDF1- α systems exhibit common G protein couplings and signaling cascades to control chemotactic migration, thus questioning whether they act in concert to promote GBM cell invasion (Fig. 1A). Here we performed immunohistochemical characterization of UT/UII and CXCR4/SDF-1 α expression in various glioma grades obtained from the tumor bank of the Anatomocytopathology service of the Rouen C.H.U Hospital (Pr A. Laquerriere, Normandie, France). These glioma samples were included in the protocol from 2012 to 2016, and diagnoses were first provided according to WHO 2007 glioma classification (Louis *et al.*, 2007). From at least 5 samples in each group of glioma, UT, UII or CXCR4, SDF-1 α immunoreactivity were tested in pilocytic astrocytoma (Grade I), diffuse astrocytoma (Grade II), anaplastic astrocytoma (Grade III), and GBM the most aggressive glioma as being grade IV. Both ligands, UII and SDF-1 α as well as their respective receptors UT and CXCR4 were shown systematically co-expressed in patients glioma samples (Fig. 1B). A faint but detectable signal corresponding to the 4 components was detectable in the tumor core of pilocytic astrocytoma, suggesting constitutive expression of these chemokine systems in dividing glial cells (Fig.1B). A strong and moderate labeling intensity was observed for CXCR4/SDF-1 α and UT/UII in grade II astrocytoma, respectively while labeling intensity appeared largely found and intense from grade III astrocytoma to GBM (Fig. 1B and C). In GBM, UT/UII and CXCR4/SDF1 were more specifically found in hypoxic perinecrotic areas (Fig. 1, white arrows) also expressing the hypoxia specific marker, the carbonic anhydrase type IX (CAIX) (Fig. 1C) . Thus, these systematic co-localization of UT and CXCR4 in human GBM samples illustrates redundancy in expression and potentially in function, suggesting that targeting one of these chemokine GPCRs would let others active to mediate invasion and resistance to treatments. The search for common secondary effectors and

interacting proteins controlling the activity of chemokine receptors in glioma invasion would thus constitute a key opportunity of finding new therapeutic targets.

The UT C-terminal fragment interacts with the platform protein Filamin A

A yeast two-hybrid strategy was used to characterize unknown interacting proteins with the cytosolic C-terminal region of UT (UT_{cterm}). This region corresponds to the UT319-389 C-terminal sequence of the receptor, thus containing 70 amino acids. The nucleotide sequence encoding this UT319-389 peptide fragment was cloned within the pGBKT7 vector being used as the prey vector (Fig. 2). In order to find key UT interactors more specifically evolving from neurobiological compartments, a bank of human brain cDNA constituted of 5 independent brains (Dr. J.M Flaman, U614, Rouen, France) was cloned within pACT2 vectors containing a number of pACT2 independent bait clones evaluated as being 3.5×10^6 (Fig.2A). The AH109 yeast transformation by the prey and bait vectors led to the growing of 19 yeast clones, and their content were systematically sequenced. One of the positive clones was identified as the nucleotide sequence potentially encoding the 2104-2203 amino acids (AA) region of the human protein FlnA (Fig. 1B). This FlnA is an actin-binding protein formed by the repetition of 24 repeat IgG-like domains (D1-D24), two rod domains and two short sequences potentially cleavable (H1 and H2) by some proteases (Fig. 2A). Here, the FlnA sequence (AA 2104-2203) interacting with the UT_{cterm} in yeast likely encodes a part of the FlnA repeat D19 and full sequence of D20 (Fig.2A, orange), belonging to the FlnA rod 2 domain. The rod 2 domain has been found to interact with a large number of transmembrane proteins including GPCR, e.g. the somatostatin receptor SST2 (Najib *et al.*, 2012), the dopaminergic receptors D2/D3 (Lin *et al.*, 2001), the GPIb α (Ib α subunit of the glycoproteique complexe (GP)Ib-IX-V) (Meyer *et al.*, 1997), but also with CXCR4 through its repeat domain 10 present in the rod 1 domain (Jiménez-Baranda *et al.*, 2007). These receptors exhibit within their sequence, a FlnA-interacting site containing a doublet of Serine-Leucine (SL) also found in the UT_{cterm}, more precisely in the 8th cytosolic helix of the receptor (Fig. 2A). To confirm the UT₃₁₉₋₃₈₉–FlnA_{D19-D20} interaction, AH109 yeast were co-transformed with pGBKT7- UT₃₁₉₋₃₈₉ and pGBKT7-FlnA_{D19-D20} isolated by two hybrid, and seeded in QDO/+3AT selective media and on X- α -Gal containing media, and control experiments were carried to validate the specificity of interaction *in vivo*, while western blot from transformed yeast validated the co-expression of the transgene tagged with c-myc and HA (Fig.2B). Co-transformed yeast with pGBKT7-UT₃₁₉₋₃₈₉ and pACT2-FlnA_{D19-D20} grew on QDO/+3AT selective media and generated blue dye in X- α -Gal containing media

as in the condition of the positive control here represented by pGBKT7-p53 and pGAD-TAG, thus validating the specific interaction between the full length UT_{cterm} (UT₃₁₉₋₃₈₉) and FlnA_{D19-D20}. To further characterize which AA region of the UT_{cterm} binds FlnA, different pGBKT7 containing various sequences and lengths of UT_{cterm} fragment were designed, and AH109 were co-transformed with pACT2-FlnA_{D19-D20} and these different pGKT7, and then seeded in selective media (Fig. 2C). The following co-transformants UT₃₁₉₋₃₈₉, UT_{cterm} P374-377A, UT_{cterm} P382-385A, UT₃₁₉₋₃₅₁, UT₃₁₉₋₃₇₀ and UT₃₃₂₋₃₈₉ allowed AH109 yeast to growth on QDO/+3AT media. However, the presence of UT₃₅₁₋₃₈₉ and UT₃₇₀₋₃₈₉ domains did not show ability to rescue yeast growth on selective media thought FlnA_{D19-D20} binding (Fig. 2C, stars). This different tests indicate that the P374 and P382 positioned in the segment end of UT_{cterm} were not involved in the interaction with FlnA, and that UT₃₃₂₋₃₅₁ AA sequence, containing the SL doublet, appears to be responsible for the interaction with the D19-D20 of FlnA at least in part in yeast (Fig. 2C). FlnA previously described as a key neurodevelopmental protein, is shown here to interact *in situ* with the cytosolic C-terminal part of UT, likely adding this chemokine receptor to the previous FlnA-interacting chemokine GPCRs, e.g. CXCR4, CCR5 or CCR2B (Jiménez-Baranda *et al.*, 2007; Minsaas *et al.*, 2010). Thus, the previous description of FlnA in high grade glioma and these data suggest that FlnA would constitute a signaling node regulating the behavior of UT controlling migration of GBM cells.

Filamin A expression is correlated with glioma grade and is strongly associated with tumor malignancy and invasiveness signatures

To establish the potential diagnostic and therapeutic role of FlnA in glioma, we first conducted a bio-informatic study based on 2 different databases, The Cancer Genome Atlas (TCGA) which gather multicentric RNAseq data associated with clinical information on various cancers including glioma, and the IVYgap (IVY Glioblastoma Atlas Project) database providing Transcriptomic mRNA expression levels depending on specific histologic areas of GBM samples, including healthy tumor edge, cellular tumor, vessels in cellular tumor, microvascular proliferation, necrotic area, pseudopalisading cells and infiltrating tumors. Analysis of TCGA data (extracted from the site in 2014) highlighted that FlnA expression levels increase progressively with the grade of the tumor, showing the highest level in GBM (P<0.001) (Fig. 3A). Regarding GBM subtypes according to the Verhaak classification, the highest FlnA expression level was found within the mesenchymal subtype and the lowest within the proneural GBM subtype (P<0.001) (Fig. 3A). The presence or the absence of IDH mutations

was recently described as being essential to stratify glioma patients, since IDHmut glioma patients exhibit an overall survival of 56,50 months while patients with IDHwt glioma showed only 21,30 months survival (Lv *et al.*, 2011). From the TCGA data, we found that IDHmut glioma presented significant lower levels of FlnA compared with IDHwt tumors ($P < 0.001$) (Fig. 3A). Interestingly, patients with glioma FlnA expression levels above the median displayed a significant decrease of their survival rate ($P < 0.001$) associated with earlier tumor recurrence ($P < 0.001$) (Fig.3.A). This is in agreement with the fact that GBM patients were found to express the highest levels of FlnA and that GBM patient were with the lowest median overall survival (14.6 months) (Bayat *et al.*, 2017). From TCGA database, we extracted the expressed genes positively correlated with FlnA in GBM by deciding to set the cutoff at 0.6 for the Pearson coefficient (Fig. 3B). Then by means of the Gene Ontology Network analysis of the correlated genes with the expression of FlnA, some key networks were extracted as being connected with FlnA. It mainly concerned Focal adhesion (KEGG pathway ID : hsa04510), Regulation of actin cytoskeleton (KEGG pathway ID: hsa04810), Leukocyte transendothelial migration (KEGG pathway ID: hsa04670), Adherents junctions (KEGG pathway ID: hsa04520), Amoebiasis (KEGG pathway ID: hsa05146), Tight junction (KEGG pathway ID: hsa04530) networks all closely related to adhesion and migration pathways and actin cytoskeleton (Fig. 3C). The most common proteins associated with these pathways were actinins α -1 and -4 (ACTN1 & ACTN4), β 1 integrin (IGTB1) and vinculin (VCL). Moreover, this gene ontology analysis stressed important connections between the Laminin β 2 subunit (LAMB2), β 1 integrin, FlnA, vinculin, moesin (MSN) and the large tumor suppressor kinase 2 (LATS2), a negative regulator of the oncogene YAP1 from the Hippo signaling pathway (Fig. 3C) (Guo *et al.*, 2019).

Based on what is already known in the literature and on the networks highlighted by the gene ontology analysis, we here expect that FlnA plays a key role in the regulation of adhesion and migration of glioma associated with PI3K-Akt signaling pathways. Independent analysis of the IVYGAP database revealed in line with TCGA's information, that high levels of mRNA encoding FlnA were found in cellular tumor compare with healthy tumor edges ($P < 0.001$) (Fig. 3D) Interestingly, vessels and microvascular compartments as well as necrotic and hypoxic compartments exhibited the highest levels of FlnA mRNA expression being significantly higher than in the cellular tumor subdomain ($\$, P < 0.001$ and $P < 0.05$ respectively) (Fig. 3D). From GBM IDHwt samples, our immunohistological labeling of FlnA (Brown) and UT (pink), revealed co-expression within vessels in cellular tumor, in microvascular proliferation areas as

well as the tumor bulk (Fig. 3E). These results are in a good agreement with previous works demonstrating that in adults, FlnA is mostly expressed in normal endothelial vascular compartment and play a key role in stabilization of tight junctions and vasculature integrity (Feng *et al.*, 2006). In addition, a closed link between oxygen homeostasis and FlnA protein degradation mainly through the ProlylHydroxylase (PHD)-induced hydroxylation of FlnA in normoxic conditions in adult mature neurons (Segura *et al.*, 2016), suggested that FlnA protein expression would be more stabilized in hypoxic conditions in GBM, thus leading to reinforcing adhesion and chemotactic migration controlled by chemotactic GPCRs as UT.

To validate the bioinformatics observations and the distribution of FlnA in glioma, we performed immunostaining of FlnA in our patient glioma paraffin-embedded samples from the Rouen CHU tumor bank. Healthy brain tissue, oligodendroglioma (grade II and III) and the 4 grades of astrocytoma including GBM were analyzed (5 samples each). In healthy tissues and in oligodendroglioma, the expression of FlnA was detected restricted to the vascular endothelial compartment (Fig. 4A). Pilocytic astrocytoma exhibited very weak labeling mainly associated with strong vasculature staining. FlnA labeling gradually increased with astrocytoma grades showing a marked and intense staining in GBM (Fig. 4A). In diffuse and anaplastic astrocytoma (grades II and III), the vasculature still expressed FlnA while here tumor bulk showed staining, as well as reactive astrocytes within the tumor (Fig. 4A&B). In GBM samples, FlnA labeling appeared strong in vascular compartments, tumor bulk and intense in hypoxic perinecrotic areas as illustrated in Fig. 4A&B. An immunohistological scoring based on labeling intensity and area distribution was corroborating bioinformatics observations, e.g. FlnA expression intensity and distribution increased with glioma grades and exhibit the highest levels in GBM, IDHwt compared with glioma IDHmut and pilocytic astrocytoma (Fig. 4C&D). Indeed, FlnA expression among these glioma patients was clearly segregated, IDHwt glioma exhibiting a significantly stronger labeling associated with a larger labeling area ($P < 0.001$ and $P < 0.05$ respectively) (Fig. 4D&E). As expected after TCGA data analysis, glioma samples belonging to the Rouen CHU tumor bank showing the highest labeling intensity and area distribution for FlnA, were associated with a significant lower patient survival and a faster tumor recurrence (Fig. 4F).

Expression of Filamin A and the chemokine system UT/UII in glioma cell lines: dependency on hypoxia conditions

Although we demonstrated that FlnA expression was correlated with glioma grades, we validate that FlnA and the UII/UT system were expressed in various available glioma cell lines. By qPCR analyses, FlnA mRNA expression normalized to the housekeeping gene UBC were found systematically and homogeneously expressed in the following GBM cell lines 8MG, 42MG, U251, GL15 and U87 (Fig. 5A). Western blot analysis of FlnA expression from various lysates of astrocytoma and GBM cell lines by using an antibody recognizing the actin-binding domain of FlnA (Ab_FlnA_{ABD}) confirmed the presence of FlnA protein (Fig. 5A) mainly as a doublet of bands at the apparent molecular weight of 280 and 250 kDa. Interestingly, the astrocytoma cell line SW1088 only expressed only the higher molecular weight band at 280 kDa (Fig. 5A), suggesting the existence of different forms of FlnA in glioma cell lines. For now, we have no clear explanation, but this form at 250kDa recognized by the Ab_FlnA_{ABD} can be explained by an alternative FlnA splice variant likely specifically processed in GBM. Indeed, based on sequence analysis, the Ensembl database predicts the existence of an alternative FlnA splice variant of 245.489 kDa (ENST00000610817) potentially detectable by Ab_FlnA_{ABD} compatible with a band at 250 kDa band. It is interesting to note that this predicted variant missed the repeat domains 19 and 20. Immunofluorescent labeling of SW1088, 42MG and U87 cells also confirmed a strong FlnA filamentous expression in SW1088 and 42MG, and a more specialized lamellipodium expression in U87 (Fig. 5B). We here verified the role of hypoxia in the regulation of FlnA expression levels in GBM cells and confirmed that after 12 hrs under hypoxia conditions (1% O₂), FlnA mRNA expression levels were significantly increased in 42MG, U251 and U87 cells, suggesting that in addition to PHD-controlling FlnA proteasomal degradation, a transcriptomic pathway may also be recruited to stimulate FlnA (Fig. 5C). FlnA protein expression, as for the Hypoxia Inducible Factor-1 α (HIF-1 α) would be subjected to an oxygen dependent proteasomal process under normoxia conditions *via* PHD-induced hydroxylation of FlnA. Thus the IDH metabolite product α -ketoglutarate may serve to hydroxylate FlnA, as HIF-1 α , to trigger its degradation by the proteasome through a Von Hippel-Lindau (VHL) ubiquitylation (Ivan *et al.*, 2001). By means of the two different antibodies Ab_FlnA_{ABD} and Ab_FlnA_{D16-D24} recognizing the N-terminal part of FlnA and the last C-terminal part of FlnA, we observed that under hypoxia, the 280 kDa band of FlnA was slightly increased after 12 hrs hypoxia (1% O₂). A recent original study was recently proposing that the 3-oxoglutarate, a permeable analogue of the 2-oxoglutarate or α -ketoglutarate, was able

to induce HIF-1 α proteasomal degradation in various cancer cells (Koivunen *et al.*, 2016). And because VHL mediated FlnA degradation under normoxic conditions (Segura *et al.*, 2016), we tested whether 3-oxoglutarate (3-oxo) may promote decreased expression of FlnA in U87 cells in normoxia and hypoxia. Treatment with 1 mM of 3-oxoglutarate (12 hrs) in normoxia condition led to the appearance of increased FlnA form of 280 KDa compared with controls and a “cleaved” form of FlnA detected by using the Ab_FlnA_{D16-D24} around 100 kDa, suggesting that in U87, α -ketoglutarate may induce FlnA cleavage (Fig. 5D). Such additional band containing the C-terminal part of FlnA was not found in hypoxic condition suggesting that 3-oxoglutarate effects were inefficient during Hypoxia at least in part in U87 (Fig.5.D). In the absence of obvious explanation concerning the effects of 3-oxo, we did not pursue in that direction.

To fully study combined roles of FlnA and the UII/UT system in GBM cells, the expression levels of UII and UT were tested by qPCR, and UT mRNA was mainly detectable in 42MG and U87 while UII mRNA could be shown in 8MG and U87 cells. Note that CXCR4 and SDF-1 α mRNAs were also only detected in 8MG, 42MG and U87 cells (data not shown) (Fig. 5E). By western blot, we finally confirmed that UT can be over-expressed in both U87 and 8MG cell lines under hypoxia conditions (Fig. 5F), in agreement with the HIF-1 α binding sites previously described on the promoter of the human UT (Segain *et al.*, 2007). Regarding these results U87 cell line, cultured as adherent cells and rather easily modifiable, express the four components of UT/UII and CXCR4/SDF1 systems and constitute an interesting GBM cell line to investigate the key role FlnA on the UT-relaying cell behaviors.

Filamin A knock-out reduces glioblastoma cell growth and enhance chemotherapy efficiency

We thus first decided to use two different strategies to down-regulate FlnA in GBM cells. The first one is based on lentiviral infection of glioma cells by lentiviral vectors containing shRNA specifically targeting FlnA mRNAs (Fig. 6A). After particle infection and cell selection, the repressed FlnA gene expression was validated by qPCR with the 5 different shRNA (1-5), then the ShFlnA1 leading to a reduced level of almost 80% (Fig. 6B&C), we selected the ShFlnA1-U87 clone to test the role of FlnA on GBM cell activity. However, after passages, during the experimental procedures, the repression was shown to recover rendering this strategy not useful. The second option was to transfect U87 cells with a commercial plasmid vector encoding the Cas9 enzyme and three specific guide RNA (gRNA) targeting human FlnA,

and designed according to the GeCKO.V2 knock-out guide database, to specifically knock-out the FlnA gene expressed on the X chromosome (U87 evolving from a male patient). Cloned cells were selected to isolate, after many cloning sequences, a fully knock-out population of U87 cells (U87-FlnAKO) (Fig. 6A&C).

Inhibition of FlnA expression by shRNA did not significantly modify U87 cell growth, whereas cell growth was significantly repressed at 72 hrs post-seeding in U87-FlnAKO compared with control U87 cells (Fig. 6.D). In order understand whether it was relayed by modified proliferation and/or survival, U87 and U87-FlnAKO cell cycles were analyzed by using the Chemometec® 2-step cell cycle analysis kit (Fig. 6E). After 16 hrs starvation and 4 hrs of culture synchronization, the different proportions of cells in the different phases of cell cycle were homogenous between samples (Fig. 6F). The cell cycle profiles revealed that U87-FlnAKO cells significantly accumulates in G1 phase ($P < 0.001$), leading to a reduced number of cells in S and G2/M phases (Fig. 6.G). Slow progression through G1/S in U87-FlnAKO can find its interpretation in the potential interaction of FlnA with cyclin D1- CDK4/6 kinase, known to play a key role in G1/S transition (Zhong *et al.*, 2010). Indirectly, the lack of FlnA would also decrease the DNA repair machineries, since FlnA may bind BRCA1 and Ku80 (Velkova *et al.*, 2010). Indeed, the absence of FlnA would lead to failure in control of DNA damages, thus resulting in cell cycle arrest in G1 phase.

In addition, we were wondering whether FlnA would be a key factor of the resistance to chemotherapy. Here, it was observed that U87 cells were unresponsive to treatment with temozolomide (TMZ, 10^{-5} M and 10^{-7} M) or irinotecan (CPT-11, 10^{-7} M) anti-neoplastic agents *in vitro* (Fig. 6.G). However, a diminished number of U87-FlnAKO cells were shown for the tested concentrations of TMZ and CPT-11, suggesting a key role of FlnA on intrinsic genomic stability in the presence of anti-neoplastic agents, DNA repair systems, or maybe the MGMT promoter methylation that is currently used to predict GBM patient response to TMZ in clinical situations (Stupp *et al.*, 2005).

Filamin A plays a key role in U87 glioblastoma cell motility through actin cytoskeleton and focal adhesion stabilization

FlnA involvement in focal adhesion (FA) stabilization and actin cytoskeleton dynamics are already described in various cell types including tumor cells but currently, no study demonstrated the essential FlnA-induced cytoskeleton regulation in GBM cells. To characterize these mechanisms, the phosphorylated form of Paxilline, P_Paxilline, as major component of

FA complexes, was verified at the plasma membrane in U87 and U87-FlnAKO cells in unstimulated conditions (Fig. 7.A). FA complexes containing P_Paxillin were quantified, U87-FlnAKO displaying significant less P_paxillin FA than U87 (Fig. 7B), likely suggesting reduced possible adhesions for migration. FlnA allows stabilization of actin stress fibers in U87 cells that may allow cells to expand and maintain large membrane features including lamellipodia. The decreased FA was associated with the absence of actin stress fibers and significant diminution of the size of cell cytoplasm and nuclei in U87-FlnAKO (Fig. 7C). These data strongly indicate that mesenchymal migration, such active process requiring dynamic formation of FA and actin cytoskeleton tension to polarize and reshape cells, were drastically dependent on FlnA. Thus, we studied the consequence of FlnA knock-out on U87 cells basal motility *in vitro* (Fig. 7D-F). U87-FlnAKO cells traveled less cumulated distance during 12 hrs than U87 while both cell types travelled the same Euclidian distance (direct distance between start and end point), suggesting that U87 cells presented a higher motility speed than U87-FlnAKO. As mentioned, cell polarization through lamellipodium formation is a key step in initiation and progress of migration, thus we quantified the number of cells emitting 1, 2 or more lamellipodia, since 1 or 2 lamellipodia being more efficient for directional migration (Fig. 7G). In culture, a majority of U87 cells showed 1 lamellipodium and displayed a bipolar phenotype ~35% (white arrows). Lamellipodium quantification in U87-FlnAKO cell population was impossible since these cells did not produce classical lamellipodium, likely exhibiting a multipolar phenotype associated with the formation long aberrant membrane protrusions (Fig. 7G), with defects in cell plasma membrane retraction and emission.

From these observations, the absence of FlnA in the GBM U87 cell line abolishes FA point formation, inhibits constitutive actin stress fibers and stops lamellipodium extension leading to a marked reduction of long distance migration, in the absence of chemokine stimuli.

Lack of Filamin A prevents UII-induced chemotactic migration in U87 GBM cells

Our previous work demonstrated that UT activation in glioma cells promotes lamellipodium expansion and vinculin-mediating mature adhesions through G α i-PI3K as well as G α 13-Rho-ROCK pathways (Fig. 8A) leading to directional migration. Thus, the key role of FlnA on the ability of UII to relay chemotactic GBM cell migration was here investigated. A time course of the effect of UII 10⁻⁸M on vinculin-contained FA complex formation (number of points) showed a bell-shape curve of the number of adhesions/cell with a peak after 30 min of UII treatment in U87 cells. This observation illustrates a transient increase of the FA formation,

suggesting a cycle of adhesion and de-adhesion under UII stimulation (Fig. 8C). In contrast, in U87-FlnAKO-UII treated cells, the FA complexes remained stable during 60 min treatment (Fig. 8B). Interestingly, the same transient effect of UII on adhesion was observed in FlnA melanoma expressing cells (A7) and absent in FlnA-deficient melanoma cells (M2) (Fig. S1A&B), suggesting a major impact of FlnA on UII-induced adhesion and de-adhesion cycle essential for migration.

Then, the chemoattractant effects of UII on U87 and U87-FlnAKO cells were tested by using modified Boyden chambers (Transwell) to allow cells migrating toward a gradient concentration of UII. Cells were seeded on a fibronectin-coated upper chamber in a UII-free culture media, while increasing concentrations of UII were added in the lower chamber. The peptide diffusion between the both compartments should create a chemoattractant gradient concentration of UII (Fig. 8D). U87 cells significantly migrated in response to 10^{-9} M and 10^{-7} M of UII, whereas U87-FlnAKO cells doesn't showed a drastic reduced migrating cells in control, being un-stimulated by increasing concentrations of UII (Fig. 8E&F). The same impact of FlnA on cell migration in response to UII, was established in A7 and in a less extent in M2 melanoma cells (Fig. S1C&D). In the wound healing assay, homogenous concentrations of UII 10^{-12} M and 10^{-7} M, slowed down the speed of U87 cell layer wound closure likely stimulating homogenous adhesions around cell perimeter. As expected, U87-FlnAKO cell basal wound closure was slower than wild type U87, but still remained. Interestingly, the effect of UII on the U87-FlnAKO wound closure was prevented, except for the highest concentration of UII, suggesting that some signaling pathways activated by UT in GBM cells and mediating adhesion is not dependent on FlnA (Fig. 8G&H). Together FlnA play a major role in basal and UII-induced migration and adhesion of GBM cells, likely preventing vinculin-FA formation and destabilization.

To validate that UT and FlnA can indeed interact to control GBM cell migration, vectors encoding various sequence lengths of the UT_{Cterm} or the FlnA-containing domain 16-24 in either U87 or 8MG GBM cells. In these different conditions, cells were submitted to various gradient concentrations of UII in the Boyden chamber assay (Fig. 9A). Interestingly, expression of the full length of the C-terminal part of UT (UT₃₁₉₋₃₈₉) totally prevented the directional migration of the U87 (Fig. 9B) and 8MG (Fig.10.C) cells in response to UII (10^{-9} M, 10^{-7} M and 10^{-9} M). Moreover the FlnA repeat domains 16-24 was also able to counteract the directional migration evoked by UII (10^{-9} M). To further better define the sequence of the UT_{Cterm} involved in the potential interaction with FlnA and leading to migration, we transfected with vectors encoding

shorter UT fragments, e.g. UT₃₁₉₋₃₃₂ and UT₃₅₂₋₃₈₉. These two transfected conditions did not show inhibition of the UII (10⁻⁷M)-induced migration, (Fig. 9D), suggesting by inference that the FlnA16-24 domain may interact with a UT₃₃₂₋₃₅₁ sequence to relay GBM cell migration.

Role of Filamin A in UT trafficking in U87 GBM cells

It was previously demonstrated that FlnA was an important regulator of GPCRs trafficking and internalization, notably by allowing SST2 expression at the plasma membrane or CCR2B internalization (Minsaas *et al.*, 2010; Peverelli *et al.*, 2014). Also, receptor translocation at the lamellipodium, and internalization were suggested as key mechanisms of directional migration likely allowing relocalized receptor and cell polarization towards gradient of chemokine, to efficiently migrate and to precisely target chemokine sources (Coly *et al.*, 2016; Minina *et al.*, 2007).

To study the potential role of FlnA in the regulation of UT trafficking in GBM cells, we transiently transfected U87 and U87-FlnAKO cells with vector encoding a recombinant fluorescent UT-eYFP. Transfected cells were treated with UII at 10⁻⁸M, and the subcellular distribution of UT-eYFP was investigated after 40 min treatment by confocal microscopy. In U87 cells, UT-eYFP expression was observed polarized and more specifically concentrated within lamellipodia, more especially in membrane ruffles (Fig. 10A), while in a less extent also detected within the cytosolic compartment. In U87-FlnAKO, UT-eYFP labeling was homogeneously distributed at the plasma membrane. After UII treatment, UT-eYFP strongly and drastically internalized in U87 cells, showing clusters within the cytosol, possibly in endocytic vesicles. This phenomena was totally absent in U87-FlnAKO after 40 min treatment with UII, UT-eYFP being localized at the plasma membrane in unstructured membrane filaments (Fig. 10A). In the attempt to quantify the internalization process in U87 and U87-FlnAKO cells, we collaborated with Laurent Prézeau at IGF of Montpellier, to transfect GBM cells with recombinant UT-snap encoding vector provided by Cis-Bio international. After incubation with Lumi-4Tb (TB), cells were incubated with increasing concentrations of UII and fluorescein used here quench the Tb fluorescence. Then, internalization of the snap-Tb receptor would allow Tb to emit fluorescence when excited at 340 nm. The ratio between Tb (620nm) and fluorescein (520nm) fluorescences was calculated to quantify the level of receptor internalization (Fig. 10B). A time-course acquisition after treatment with UII (10⁻¹² M, 10⁻⁹ M and 10⁻⁷ M) showed UT internalization in U87 but not in U87-FlnAKO cells. These

observations indicate that FlnA plays a major role in UT trafficking to the plasma membrane and endocytosis after UII treatment.

Filamin A induces G protein signaling switch and UII may control FlnA integrity

Since we found that FlnA controls the UT dynamic distribution in cells and would directly be interacting with the receptor to mediate chemotactic migration, the possible role of FlnA in the UT couplings important for chemotaxis was questioned here. FlnA has been shown to be essential for D3R coupling to G α o (Zheng *et al.*, 2016), thus we studied the potential FlnA-favored coupling of UT with G α i and/or G α q since we previously established pleiotropic couplings of UT in HEK cells (Brulé *et al.*, 2014). In U87 and U87-FlnAKO the colocalization between UT-eYFP and endogenous G α i or G α q/11 by immunofluorescence was first tested (Fig. 11.A). G α i and the recombinant UT-eYFP strongly colocalized within U87 cell lamellipodia in the absence of stimulation (Pearson correl. coeff. PCC=0.56), this colocalization rapidly decreased after 5 min of treatment with UII (10⁻⁸M) (Fig. 11C). In U87-FlnAKO cells, UT-eYFP and G α i appeared less colocalized at the lamellipodia than in U87 (PCC=0.24), while UT/G α i colocalization was almost absent in control condition within the intracellular compartment (PCC= -0.02) (Fig. 11C). A treatment with UII (10⁻⁸M) showed the occurrence of UT/G α i colocalized spots in the intracellular compartment (PCC=0.22) (Fig. 11C) suggesting the possible association even in the absence of FlnA. In contrast, G α q/UT colocalization remained faint in control and stimulated U87 cells (PCC \approx 0.20) (Fig. 11C) whereas exposure of U87-FlnAKO to UII triggered delayed G α q/UT colocalization (P<0.05) at the cell membrane (Fig. 11C). By means of microfluorimetry experiments, we demonstrated UII evoked a dose-dependent increase of Ca²⁺ mobilization only in U87-FlnAKO expressing the recombinant UT (Fig. 11D). These data originally propose that FlnA favors a precoupling of UT with G α i at the plasma membrane and allow intracellular UT/G α i trafficking while preventing from a potential coupling with G α q in GBM cells, thus suggesting that FlnA plays a major role to orient the UT coupling toward G α i or G α q.

Activation of UT relaying GBM cell migration and adhesion was previously demonstrated to be relayed by G α i (Lecointre *et al.*, 2015) and to involve calpain-I and calpain-II activities (Coly *et al.*, 2016). Furthermore, FlnA would be cleavable by calpains whose activity was proposed to depend both on diminished PKA activity and increased ERK1/2 activation-Phosphorylation at the plasma membrane. In this context, we studied the impact of the activation of UT on the potential cleavage of FlnA, and its colocalization with UT during

receptor endocytosis, by using the two different validated N and C terminal anti-FlnA antibodies (Ab_FlnA_{ABD}, Ab_FlnA_{D16-D24}). In the absence of stimulation, UT and the full-length FlnA can be detected in the front of the migrating cells at the lamellipodia (Fig. 12A). After 20 min treatment with UII (10^{-8} M), a non-significant tendency of UT translocation to a new lamellipodia was observed likely in association with the FlnA segment recognized by the Ab_FlnA_{ABD} while a decrease of the co-staining by the two anti-FlnA antibodies occurs in the intracellular compartment, suggesting a primary FlnA cleavage before relocalizing a UT/FlnA complex to the lamellipodia (Fig. 12B). This was confirmed by the analysis of the different molecular mass of FlnA protein bands revealed in Western blot. Indeed, Treatment with UII from 5 to 40 min led to the appearance of a FlnA-immunoreactive band at 110 kD and around 130 kDa, likely suggesting a calpain-dependent proteolysis at the H1 and H2 sites (Fig. 12D&E). We then tested the action of the pertussis toxin PTX, leading to the inhibition of G α i binding capacity to GPCR and more activated PKA, but allowing the constant $\beta\gamma$ activation. In U87 cells pre-incubated with PTX, a non-significant tendency of increased colocalized UT/FlnA at the lamellipodia was shown likely suggesting the role of the $\beta\gamma$ /PI3K pathway to mediate lamellipodia expansion containing UT/FlnA. When treated with UII, a significant dissociation of the two FlnA regions, and of UT with FlnA arose, accompanied a prevention of FlnA cleavage leading to accumulation of the full-length FlnA. In this situation, FlnA_{D16-D24}-FlnA_{ABD}, UT_{eYFP}-FlnA_{ABD} and UT_{eYFP}-FlnA_{D16-D24} colocalized staining were reduced within lamellipodia, while UT distribution at lamellipodia was also prevented after 20 min treatment compared with control (Fig. 12C). These data indicate that the FlnA cleavage can be induced by UII in the G α i-dependent way, suggesting that UII stimulation triggers a mechanism that allow FlnA_{D16-D24}-FlnA_{ABD}, UT_{eYFP}-FlnA_{ABD} and UT_{eYFP}-FlnA_{D16-D24} complex stabilization through a G α i pathway (Fig. 12B-D).

In conclusion, UT activation induces FlnA cleavage likely through a G α i/cAMP/PKA pathway, potentially allowing dissociation of actin anchorage, endocytosis of UT-complexes that could contain association with FlnA/ β -arrestin1/2/ERK1/2, and relocalization to a new oriented lamellipodia to promote GBM cell directional migration toward a gradient of UII.

Knock-out of Filamin A in U87 GBM cells improves survival of intrastrially xenografted mice via inhibition of brain invasion

To study the impact of Filamin A on GBM malignancy *in vivo*, we performed orthotopic xenografting of U87 and U87-FlnAKO cells within the striatum in adult (7 weeks) NMRI/nude

male mice (Fig. 13A). U87-FlnAKO injected mice exhibited significant longer survival than wild-type U87-bearing animals (56 vs 45 days, $P < 0.01$) (Fig. 13B). In a second series of U87 and U87-FlnAKO injections, tumor-bearing mice were sacrificed 15 days post-injection, brain were samplings and directly frozen, and then consecutive slices were prepared for immunohistological experiments. Here, two representative GBM-brain slices were stained by means of the Ab_Fln_{ABD} showing strong and intense expression in the invasive U87 GBM tumor around a centered necrotic zone in the, also expressing the Hypoxia marker CAIX and MMP9 characterizing mesenchymal status and strong invasiveness. In contrast U87-FlnAKO GBM displayed a circumscribed feature, exhibiting only a faint labeling of FlnA, a total absence of MMP-9 and a remaining expression of CAIX (Fig. 13C), demonstrating that FlnA is mediating GBM invasiveness and MMP-9 expression even in the presence of hypoxia markers. Interestingly, in U87 showing strong expression of FlnA (in green), UT (in red) was also detected in the same invading structures; in close proximity with UII-expressing features (in cyan) revealed by punctuate labelings. The presence of UII and/or UT was not retrieve in U87-FlnAKO GBM tumors also negative for FlnA (Fig. 13D). As illustrated here by two other independent series of brain slices containing U87 and U87FlnAKO cells (GBM1 and GBM2), we confirmed the expanded and invasive nature of GBM cells expressing FlnA (Ab_FlnA_{ABD}, magenta) associated with a tortuous network of laminin-containing vessels within the tumor (red). In contrast, U87FlnAKO GBM showing very faint FlnA labeling, were highly circumscribed while associated with a rather dense laminin vascularization network (Fig. 14A, green arrows), likely evolving from the host vascular components and explaining the residual FlnA co-labeling within the tumor bulk (Fig. 14A). These observations are in agreement with the U87 GBM invasive phenotype, previously attributed to the mesenchymal status. The GBM tumor cores markedly expressed the mesenchymal/GSC marker CD44, while invasive features showed reduced expression of this CD44 in U87 cells. From enlarged images corresponding to U87-brain tumor slices, columns of UT expressing cells likely invasive, were again shown to also express FlnA specifically in tumor cells (Fig. 14B).

This suggests that the mesenchymal marker CD44 is here more associated with proliferation than with migration, and appears expressed independently of the absence or the presence of FlnA, indicating that the role of FlnA in GBM cell invasion is not mediated through indirect repression of mesenchymal markers

Discussion

The neurobiological nature of glioma cells and intra-tumoral heterogeneities associated with a microenvironmental hypoxic state lead to invasiveness of the brain parenchyma. To actively migrate within the brain, malignant glioma cells respond to chemical cues including growth factors, chemokines, peptides and/or components of the extracellular matrix (ECM), exploiting the microvascular route network and white matter tracts with various mechanical and physical constraints. Nevertheless, they migrate over relative long distances and escape surgery, radiotherapy and systemic chemo- and targeted therapies. Thus, a better understanding of glioma brain invasion leading to recurrence and malignancy is crucial for future research and identification of new therapeutic targets in this very deadly disease.

Chemokine GPCRs and mesenchymal glioblastoma phenotype

GBM cells exhibit the highest level of invasiveness and recurrence mainly in the margin of the resection cavity (Giese *et al.*, 2016). Some GPCR including chemokine GPCRs represented by the CXCR4 activated by SDF-1 α , but also CCR5 (Zhao *et al.*, 2015), CCR2A (Liang *et al.*, 2008), CCR3 (Kouno *et al.*, 2004), CX3CR1 (Sciumè *et al.*, 2010), CXCR1 (Desbaillets *et al.*, 1997) or CXCR2 (Desbaillets *et al.*, 1997) have been well described to play a major role in GBM invasion. In addition, the non-typical chemokine GPCR UT shares structural homologies with CHEM (chemokine) GPCRs (Castel *et al.*, 2017) and has been shown to sense gradient concentrations of UII, and to activate Gai/PI3K and G α 13/Rho/ROCK signalings to mediate chemotactic cell migration (Lecointre *et al.*, 2015; Coly *et al.*, 2016). The ligands UII or SDF-1 α or their respective receptors UT and CXCR4 were shown systematically co-expressed in patients glioma samples exhibiting labeling increased intensity from grade III astrocytoma to GBM. Interestingly, UT/UII and CXCR4/SDF1 were more specifically found in hypoxic perinecrotic areas colocalized with the hypoxia specific marker CAIX, thus confirming as direct link between hypoxia, chemokine system expression and malignancy and invasiveness. In 2001, Takahashi *et al.* showed for the first time that UT can be expressed in many tumor cell lines, including GBM, neuroblastoma, or colorectal cancer cells. The presence of the receptor was also found in the perinecrotic area of glioma (Lecointre *et al.*, 2015), neuroblastoma (Takahashi *et al.*, 2003), liver (Yu *et al.*, 2015; Wei *et al.*, 2017), or colon (Federico *et al.*, 2014) cancers. Interestingly, over the past decade, an increasing number of publications has reported that UII exerts chemoattractant properties on native cells, e.g. murine endothelial progenitor (Zhang *et al.*, 2011; Yi *et al.*, 2012) or human monocytes (Segain *et al.*,

2007) but also in human prostate and colorectal tumor cell lines *via* an autocrine/paracrine mechanisms (Grieco *et al.*, 2011; Federico *et al.*, 2014), or in astrocytoma and GBM cell lines (Lecointre *et al.*, 2015). These sparse observations can be reconciled with CXCR4 in GBM which expression has been reported particularly intense in hypoxic pseudopalisadic areas (Rempel *et al.*, 2000; Ehtesham *et al.* 2006; Zagzag *et al.*, 2006; Hong *et al.*, 2006). Hypoxic conditions at the edge of necrotic areas can stimulate CXCR4 expression, as confirmed *in vitro* in the GBM LN308 and U87MG GBM cell lines, mainly due to the stabilized activity of HIF-1 α . Indeed, the acquisition of mesenchymal properties and phenotype through hypoxia or molecular switch inducing TGF- β secretion, can trigger the expression of CXCR4 and SDF-1 α within the tumor (Zagzag *et al.*, 2006; Pham *et al.*, 2015; Miyazaki *et al.*, 2017). Reciprocally it has been shown that SDF-1 α controls mesenchymal transition in U87 cells by promoting expression of TGF- β 1, Smad2, NF κ B, Snail and Twist (Zhu *et al.*, 2013). So CXCR4/SDF-1 α expression initiates and maintains mesenchymal transition through an autocrine/paracrine loop. Not in GBM but in mice tissues, it has been shown that UII relays mesenchymal transition of renal epithelial cells (Pang *et al.*, 2016) and cardiac endothelial microvascular cells (Zhang *et al.*, 2019). Both studies have shown that the UII-mediating mesenchymal transition is counteracted by an inhibitor (4-phenylbutyric acid) of the endoplasmic reticulum (ER) stress, strongly suggesting a key role of ER. Thus UII and UT co-expression within high grade glioma suggests that, as CXCR4/SDF1, the urotensinergic system is able to promote and maintain mesenchymal transition *via* an autocrine/paracrine mechanism. Together, these systematic co-localization of UT and CXCR4 in human GBM samples illustrates the redundancy in expression and potentially in function of chemokine GPCRs, suggesting that targeting one of these chemokine GPCRs would let others active to mediate invasion and resistance to treatments. Indeed there is actually targeted therapies tested in clinical which use plerixafor and USL311 two CXCR4 inhibitors to treat recurrent GBMs (NCI2012-00149, NCI2013-02012, NCT02765165). Although these inhibitors are efficient in pre-clinical models, we could hypothesis that at long term, tumors will develop escaping strategies based on other chemokine receptor systems like UT and UII. The search for interacting partner proteins controlling the activity of chemokine GPCRs in glioma cell invasion would thus constitute a key opportunity of finding new therapeutic strategies.

It is conventionally accepted that many GPCRs interact *via* their cytoplasmic domains with protein partners other than G proteins that modulate their signaling, cell location or pharmacology (Ritter and Hall, 2009). Thus, the interaction of the UT receptor with β -arrestins

would contribute to its internalization (Proulx *et al.*, 2005) and to the transactivation of the EGFR (Esposito *et al.*, 2011). In this study, we demonstrated for the first time, by double-hybrid, the direct interaction of UT with several protein partners including FlnA. We showed that the 332-351 C-terminal cytosolic AA sequence of UT interacts with a 2104-2203 AA protein fragment of FlnA. This sequence of 2104-2203 AA represents the end of the repeat 19 and the beginning of the repeat 20. It has been shown that cell deformation resulting in an actin cytoskeleton stretching results in the opening of the auto-inhibited conformation, a classical stretch-dependent protein binding with the C/D face of FlnA (Lad *et al.*, 2008; Pentikäinen *et al.*, 2011). Here we isolated a FlnA sequence corresponding to the sheets E, F and G of the repeat 19. A number of GPCRs have been shown to bind and interact with FlnA within the rod 2 domain. Interestingly, the most studied and well characterized were the D2/D3, SST2 and CCR2B, all interacting within the repeat 19, and many other works failed to clearly solve the exact GPCR bearing sequence while unknown other interactors would interact with the 20th repeat, but it remains to be investigated. An interesting work (Ithychanda *et al.*, 2009) reported that FlnA repeats can be classified in 4 different classes (A, B, C, D) based on structure and sequence analogies, the FlnA rod 2 domain being composed of an alternation of class A and B repeats coming from the repetition of the ancestral tandem that cause the auto-inhibited conformation. In the case of CXCR4, this is its third intracellular loop that interacts with FlnA, in the rod 1 domain on the repeat 10 belonging to the class D of FlnA repeats while UT interacts with the rod 2 on a class B repeat. This suggests that CXCR4 and UT were regulated by FlnA in a different way in a sense that a UT-FlnA complex can be released from actin anchoring through a calpain-proteolytic cleavage of FlnA, whereas a CXCR4-FlnA complex may stay connected to the actin cytoskeleton, while the repeats 10 and 20 were both able to bind CXCR4 and UT, respectively, independently on stretching.

Filamin A re-expression in high grade glioma, as prognostic factor of aggressiveness

FlnA expression and involvement in tumorigenesis have been previously studied in various cancer types. Its expression does not systematically increased with malignancy, but variations are always correlated with aggressiveness. Indeed FlnA is overexpressed in breast cancer (Jiang *et al.*, Tian *et al.*, 2013), lung adenocarcinoma (Shieh *et al.*, 1999; Uramoto *et al.*, 2010), pancreatic cancer (Zhou *et al.*, 2011; Surcel *et al.*, 2019) or melanoma (Zhang *et al.*, 2014), showing that the higher the level, the lower the is the survival prognosis accompanied with faster recurrence and metastatic situation. However, the finding of lower FlnA expression

levels within aggressive prostate cancer (Sun *et al.*, 2014), colorectal adenocarcinoma (Tian *et al.*, 2015) as well as gastric, nasopharyngeal and renal carcinoma (Sun *et al.*, 2014-1 ; Sun *et al.*, 2014-2 ; Sun *et al.*, 2014-3), thus being for most associated with tumor metastatic potential as well as a poor prognosis in term of overall survival. It thus still raises questions about the role(s) of FlnA in tumor development and its differential functions in pathophysiological conditions, and indicates that FlnA mRNA expression should constitute a relevant variable that could be used to predict cancer progression. In the present study, we show that FlnA expression increases with glioma grades, showing the highest level of expression within the most aggressive form of glioma, the GBM, IDH_{wt}. It was previously proposed that FlnA or a form of FlnA is secreted and that plasma level of FlnA increased in patient with glioma (Alper *et al.*, 2009), with a correlation with the grades. These observations make FlnA a potential valid diagnostic/prognostic marker for use in clinic to easily and cheaply diagnose glioma and follow the response to treatment. In high grades, glioma are histologically characterized by an increase of the diffuse features as well as hypoxic areas around necrotic patches associated with an increase of mesenchymal marker expression and cell phenotypes (Verhaak *et al.*, 2010; Carro *et al.*, 2010; Louis *et al.*, 2016). The mesenchymal phenotype of GBM cells is acquired with the loss of proneural signature for the gain of set of mesenchymal gene expression. More especially, mesenchymal transition is driven by the activities of 5 key transcription factors (TF) C/EBP- β (CCAAT Enhancer Binding Protein Beta), STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3), bHLH-B2 (Basic helix-loop-helix transcription factors), FOLS2 (FOS Like 2) and RUNX1 (RUNX Family Transcription Factor 1). Two of these, bHLH-B2 and FOLS2, appears able to bind FlnA promoter region, potentially leading to stimulation of FlnA expression in mesenchymal GBM (Carro *et al.*, 2010). In a good agreement, a mesenchymal transition triggering FlnA expression with integrin- β 1, tropomyosin or moesin has been described in A549 pulmonary adenocarcinoma cells, via TGF- β (Keshamouni *et al.*, 2006). In the present study, the expression of FlnA is mostly correlated with integrin- β 1 and moesin encoding genes, and with target genes involved in cellular processes associated with Focal Adhesion (ACTN1, ACTN4, FLNA, ITGB1, LAMB2, TNC, VCL), Regulation of actin cytoskeleton (ACTN1, ACTN4, IQGAP1, ITGB1, MSN, VCL), Adherents junction (ACTN1, ACTN4, IQGAP1, VCL), Amoebiasis (ACTN1, ACTN4, LAMB2, VCL) and tight junction (ACTN1, ACTN4, ITGB1, MSN). Consequently, the enhanced *de novo* of FlnA expression in GBM is strongly correlated with mesenchymal signature, associated with migration associated programs. This is confirmed by the Gene Ontology network analysis highlighting pathways

connecting Laminin subunit $\beta 2$ (LAMB2)/Tenascin C (TNC), to integrin $\beta 1$ (ITGB1), to FlnA, thus to vinculin (VCL), to moesin (MSN)/caldesmon 1 and to the Large Tumor Suppressor kinase 2 (LATS2). In this pathway, note that LATS2 is an inhibitor of the Hippo/Yap-Taz oncogenic pathway. It has been shown *in vitro* that LATS2 overexpression in U-372MG cells inhibits cell proliferation as well as migration and invasion processes (Guo *et al.*, 2019). The functional interaction between LATS2 and caldesmon/moesin remains actually unclear, but given the positive correlation between FlnA and LATS2, and given the poor survival associated with FlnA expression in patients, we may hypothesize that the oncosuppressor LATS2 is antagonized by the FlnA-caldesmon/moesin axis in GBM.

The TCGA RNA-seq bio-analysis was here performed on heterogeneous histological samples composed of heterogeneous glioma cells and also non-tumoral cells within the tumor like endothelial cells, reactive astrocytes, pericytes or macrophages, meaning that a fraction of the FlnA mRNA detected can also be attributed to non tumoral cell. This global analysis was here completed by analysis of the IVYGAP database indicating that FlnA mRNA shows strong expression within vessels in cellular tumor as well as microvascular proliferation areas which are characteristics histological features of GBM. In addition, we validate the strong expression of FlnA within healthy brain parenchyma vasculature as well as tumor vessels. Indeed, FlnA is involved in tight junction stabilization in normal vasculature and also in angiogenesis during embryonic development (Feng *et al.*, 2006). Moreover a network associated with tight junction and adherent junctions was found associated with FlnA expression in GBM.

We also demonstrated that FlnA is intensely expressed in hypoxic perinecrotic areas on paraffin-embed patients GBM samples, results validated by IVYGAP database analysis showing high FlnA expression levels in pseudopallissading cells and in necrotic area. The O_2 homeostasis closely regulates FlnA degradation- stability in adult mature neurons (Segura *et al.*, 2016). As for HIF-1 α , PHD1/2 can use α -ketoglutarate under normoxia to hydroxylate FlnA on P2309, P2316 and potentially on P2312. This hydroxylation triggers its degradation by the proteasome through VHL ubiquitinylation (Epstein *et al.*, 2001). GBM cells within hypoxic areas undergoes metabolic switch known as Warburg effect that reduces the Krebs cycle for the gain of glycolysis leading to increased lactate production (Koppenol *et al.*, 2011). This switch has the consequence of decreasing α -ketoglutarate production used by PHD as hydroxyl donor for FlnA hydroxylation, as for HIF-1 α , likely leading to FlnA stabilization. Thus, in GBM, the absence impact of 3-oxoglutarate under hypoxia can be due to a too short treatment time which prevent FlnA increased expression of the 280 kDa molecular mass form detected under hypoxia.

This phenomenon may be GBM-specific since FlnA mRNA level was not seen increased in U2OS HeLa and HEK293T cells cultured in hypoxia (Zheng *et al.*, 2014). As for HIF-1 α transcription factor able to bind DNA on a specific motif called HRE (Hypoxia Response Element), we may suppose that the FlnA promoter contains such motif type allowing HIF-1 α -induced transcriptional activity.

Functions of Filamin A in GBM cell line aggressiveness

We further study *in vitro* the involvement of FlnA in fundamental oncogenic processes, proliferation and resistance to treatments of GBM cell lines 8MG, 42MG, U251, U87, GL15 and the astrocytoma cell SW1088 expressing FlnA and/or UT at protein levels. We here by qPCR confirmed that hypoxic conditions stimulate the FlnA expression at the transcriptional level and FlnA or UT at the protein levels. After optimization of the U87 cell line deleted for the FlnA by Crispr/cas9 strategy, the tumor growth kinetic (proliferation) and cell cycle were first tested, and we observed that U87-FlnAKO cell growth is significantly reduced compared with U87 at 72h post-seeding, accumulation within G1 cell cycle phase and reduced fraction of cells in S and G2/M phases, characteristic of a slow progression while inhibiting proliferation with no signs of apoptosis. The cyclin D1/cdk4-6 complexes are known to drive progression through G1 to S phase, and interestingly these complexes are able to modify FlnA phosphorylation status in the breast cancer cell line MDA-MB-231 (Zhong *et al.*, 2010), on the widely recognized S2152 and on another serine in 1459 position. The S2152 phosphorylation has been shown to play a major role in the prevention of the FlnA cleavage by calpains in H1 and H2 regions, this proteolysis allowing dissociation from actin cytoskeleton and membrane reshapes. Other studies evoke an additional cyclin D1/cdk4-6 phosphorylation site possibly also phosphorylated by Cyclin B1/cdk1 within FlnA actin binding site constituted of repeat domains 9 to 15. More especially this site is highly phosphorylated during cell mitosis, causing actin cytoskeleton disruption before reshaping for mitosis (Cukier *et al.*, 2007; Szeto *et al.*, 2015). Given the steps occurring during the G1 phase, as replication preparation, we speculate that FlnA controls the G1/S progression in GBM cells as a platform allowing structural cytoskeleton organizer, maybe preventing senescence. Senescence activation is dependent on *TP53* status and U87MG are wild type for *TP53*, thus senescence could be essential to prevent execution of defective mitoses (Maehara *et al.*, 2010). These observations were resembling impact of dinaciclib which selectively inhibits CDK1, CDK2, CDK5 and CDK9, on GBM cell

proliferation independent of p53 status (Jane *et al.*, 2016) or of palbociclib, a CDK4/6 inhibitor, on inhibition of GBM cell cycle by inhibiting Rb1 phosphorylation (Lubanska and Porter, 2017), suggesting key crosstalk between FlnA and CDK4/6 or CDK1. In addition, FlnA-promoting arrest in G1 phase also appears determinant in sensitizing U87 cells to chemotherapy as TMZ or CPT-11. In a good agreement, when combined with TMZ and radiotherapy, CDK inhibitors show a GBM tumor suppressing effect, but while promising pre-clinical studies, most of them fail to make it into clinical trials, suggesting FlnA would be a new interesting therapeutic target.

Filamin A exhibits mechanical properties and stimulates adhesion for GBM migration

It interesting to note that in MDA-MB-231 cells, the phosphorylation of FlnA by cyclin D1/cdk4-6 appears associated with a potentiation of invasive and migratory properties of these cells making FlnA a bridge between cell cycle and invasion in tumor cells.

The GPCR UT is now considered as a chemokine receptor, and as previously shown, UII gradient concentration stimulates directional migration of astrocytoma SW1088 and GBM U87 cell lines in modified Boyden chambers (Lecointre *et al.*, 2015; Coly *et al.*, 2016; Castel *et al.*, 2017). First of all, we tested the intrinsic impact of FlnA on adhesion and migratory properties of GBM cells. When the gene encoding FlnA is deleted, U87 cells exhibit a significant reduction of their cytoplasm and nucleus areas associated with suppression of actin stress fibers. In addition, the P_Paxillin-containing FA point number decreased while lamellipodia protrusions almost completely disappeared. The role of FlnA in adhesion has been widely studied, e.g. FlnA is able to interact with the β -subunit of the $\alpha\beta$ integrin dimers and this interaction may stabilize FA in CHO and A7 melanoma cells (Cunningham *et al.*, 1992; Calderwood *et al.*, 2000). This potential phenomenon combined with the absence of actin stress fibers in FlnAKO cells, results in lack of cell cytoskeleton patterning essential in particular to form and stabilize membrane protrusions like lamellipodia. More than being a mechanical component in this process, FlnA can regulate actin cytoskeleton through its interaction with small GTPases belonging to the Rho family which potentiate actin polymerization within lamellipodia and to cluster on one membrane sites key molecular effectors (Ohta *et al.*, 1999; Sells *et al.*, 1999; Vadlamudi *et al.*, 2002; Ueda, *et al.*, 2003).

We previously established that UT mediated GBM cell migration through two concomitant different G protein pathways, on the one hand, a precoupled UT/G $\alpha_{i/o}$ promotes lamellipodium formation through PI3K/PIP3 pathway, potentially leading to Rho GTPase Rac activation, and

on the other hand the late recruitment of $G\alpha_{13}$ /Rho/ROCK pathway which sustains actin polymerization and contraction. Based on these data we studied FA dynamics after UII treatment in U87 and U87-FlnAKO, even if U87-FlnAKO cells display constitutively less FA. In treated U87, a transient increase of vinculin FA occurs, suggesting a UII-induced cycles of protrusion/adhesion/contraction and de-adhesion mechanisms essential for directional migration toward gradient concentration. Such Paxillin-adhesion and de-adhesion *via* autophagic degradation cycle has been previously proposed to explain the dynamic of lamellipodium formation and cell polarization in response to a gradient concentration of EGF (Kenific *et al.*, 2016). However, in the absence of FlnA, UII fails to favor FA formation and not adhesion-de-adhesion can be observed. This is corroborated by the total inhibition of the chemotactic migration of U87-FlnAKO cells in response to UII gradient concentrations in Boyden chambers demonstrating the major role of FlnA in the UT-relaying chemotactic U87 GBM cells. Considering that homogenous application of the highest concentration of UII still promotes whole-cell adhesion and wound healing reduced closure, FlnA seems to be specialized in UT-evoked cell polarization and compartmentalization of the actors of cell migration. Our preliminary experiments reveal the vectors encoding peptidomimetics of the full-length of the UT_{cterm} or of the D16-D24 domains of FlnA counteract the UII-induced U87 cell migration, suggesting that these sequences participate in the FlnA-UT interaction and thus chemotactic migration.

Filamin A regulates UT trafficking and couplings: impact on migration?

GPCR endocytosis/internalization process has been previously proposed as one of the mechanism allowing cells to efficiently migrate through a chemokine gradient concentration with pause periods allowing cell redirection for efficient migration. In particular, this sequential migration was first stressed in a nice study describing that CXCR4 C-terminus-dependent internalization and the control over signaling intensity play a key role in cell motility and SDF-1 α directional sensing *in vitro* and *in vivo* (Minina *et al.*, 2007). More generally, GPCRs targeted to a recycling pathway back to the plasma membrane requires a sequence-directed mechanism involving specific sorting sequences in their intracellular C-terminal tails (C-tail) (Trejo, 2005; Hanyaloglu and Zastrow, 2008). Here we detected concentrated UT-eYFP expression in membrane ruffles in polarized lamellipodia. After UII exposure (40 min), UTeYFP fluorescence appears within the cytosol, as intense dots likely corresponding to internalized receptor, kept in back-up within the perinuclear recycling compartment. Recent

findings described two pathways employed by GPCRs following endocytosis and their subsequent trafficking to opposing cellular fates: plasma membrane recycling and lysosomal degradation. It has been interesting shown that disruption of the latter stages of lysosomal sorting of some GPCRs results in endosomal retention, while inhibition at earlier steps, can reroute receptors to a recycling pathway. It was the case for PAR1 and CXCR4 where inhibition of their ubiquitination *via* the tyrosine kinase Her-2/ErB2 results in increased surface expression of these receptors in breast cancer and promotion of tumor progression (Bhandari *et al.*, 2009). Here we need to verify, by means of specific markers as rab5 and accumulation of PIP3 depending on the activation of PI3K, whether activated UT in U87 cells expressing FlnA, can be recycled to the plasma membrane directly from the early endosomes *via* a rapid recycling pathway (Naslavsky and Caplan, 2018). Lack of FlnA expression in U87 here prevents the existence of membrane ruffles, but not of UT at the plasma membrane expression and absent in the cytosol, even after 40 min treatment with UII. This FlnA-induced endocytosis of UT is confirmed from our experiments on A7 (FlnA melanoma expressing cells) and M2 (FlnA melanoma negative cell), and was very similar to the previous work demonstrating that CCR2B does not internalize within M2 melanoma cells after agonist stimulation (Minsaas *et al.*, 2010). In addition, CCR2B-positive vesicle displacement is significantly slower when FlnA is repressed indicating that FlnA may promote receptor binding to cargo proteins like SNAREs or β -arrestins-1/2 which allow rapid endosomal recycling (Traub and Bonifacino 2013; Pons *et al.*, 2017). In agreement with such mechanism, it has been shown the existence of FlnA- β -arrestin-2-D3R heterotrimeric complex in HEK-293 cells in absence of stimulation. Activated GRK2/3 triggers FlnA-D3R dissociation and increases D3R- β -arrestin2 association followed by receptor endocytosis (Kim *et al.*, 2005). We previously showed that UT is able to recruit β -arrestin-2, a mechanism associated with cyclic endocytosis and recycling (Brulé *et al.*, 2014). Thus, this suggests that FlnA would allow rapid β -arrestin-2 recruitment after UT activation in U87 cells allowing fast receptor endocytosis for non-desensitizing concentrations while signaling through ERk1/2, and rapid recycling to the plasma membrane.

GPCR pre-coupling to G protein was described in few cases but remains unexplored. For example, pre-assembling complexes of β 2AR with G α i allows β 2AR mediated femtomolar agonist response (Civciristov *et al.*, 2018). They further show that this pre-coupling depending on the expression of a platform protein called AKAP79 (A kinase anchoring protein 79), which potentiates β 2AR-G α i pre-coupling. Moreover PAR-1 are able to form pre-assembled complexes with G α i1 but not with G α 12, this pre-coupling results in a rapid and transient

activation of G α i1 by PAR1 followed by a slow and sustained of G α i2 accompanied by β -arrestin-1 activation (Ayoub *et al.*, 2010). We also more recently described that UT pre-associated to G α i proteins can relay high affinity and rapid signaling during chemotactic migration, then transducing signals via G α 13 cycling between cytoplasm and membranes, to potentially activate Rho-associated effectors (Lecointre *et al.*, 2015). Here we confirmed that UT and G α i are specifically co-localized/pre-coupled in U87 at membrane lamellipodia and co-endocytosed after treatment with UII, and not in U87-FlnAKO, indicating the key role of FlnA in the UT-G α i pre-coupling, as previously reported for the role FlnA in the D3R binding to G α o (Kim *et al.*, 2005). Considering that UT exhibits pleiotropic activities, being coupled to G α i/o, G α q and G α 13 (Brulé *et al.*, 2014; Castel *et al.*, 2017), and because UT shows a specific preferred signaling cascade independent of the G α q/Ca²⁺ pathway in GBM cells (Lecointre *et al.*, 2015), we tested the possible link between FlnA-UT and G α q. Interestingly we confirmed no UT-G α q coupling in U87 cells, while in U87-FlnAKO cells, activation by UII leads to increase the occurrence of colocalized features between UT and G α q allowing a UT/Ca²⁺ signaling cascade whose role in GBM remains to be establish.

Together, a signaling switch between G α i to G α q is determined by the expression of FlnA in GBM cells, thus indicating that the chemokine behavior of UT associated with a G α i precoupling, is entirely controlled by FlnA and suggesting UT coupling cell and condition-dependency. FlnA could provide a functional platform for UT-mediated chemotactic migration in GBM cells by *i*) preventing G α q coupling and potentiating G α i coupling, *ii*) allowing UT desensitization and rapid recycling after agonist stimulation and *iii*) endocytosing UT- β -arrestin1/2 relaying ERK1/2 activation, a mechanism potentially involved in dynamic FA formation.

UT-activated G α i coupling regulates Filamin A cleavage

The number of FlnA functions in various cells is controlled by some post-translational modifications including hydroxylation and ubiquitinylation and phosphorylation controlling proteasomal degradation and cleavage, respectively. In particular, it has been demonstrated that FlnA is cleavable by calpains at two different sites localized in the H1, and potentially H2, sequences (Gorlin *et al.*, 1990), consequently leading to the release of the road 2 domain from its actin anchorage, whereas this calpain proteolysis can be prevented by the phosphorylation on the S2152 consensus motif. When UT is stimulated in U87 cells by UII (10⁻⁸ M, 5 to 40 min), lower molecular mass bands immunodetected by the anti-FlnA Ab_D16-D24 were

detected at 130 and 110 kDa, indicating FlnA cleavage. Also, by immunocytochemistry, we observed UT-FlnA colocalization at lamellipodia and after 20 min treatment with UII, relocalization of UT complexes can be detected at the plasma membrane, while dissociation between UT and FlnA are seen in the intracellular compartment, but not at the plasma membrane, suggesting that FlnA proteolysis likely leads to relocation at the lamellipodia. Thus, UT/G α i-induced FlnA-UT released from actin anchorage, may either lead to UT receptor internalization and/or receptor trafficking and polarization after agonist stimulation. To verify the role of the G α i/o/cAMP/PKA pathway, U87 cells were treated with PTX. In this condition, UII stimulates the phosphorylation of S2152 maybe because of the sustained PKA activity while FlnA cleaved bands were absent resulting in accumulation of the 280 kDa full-length FlnA. In addition, PTX-treated cells exhibit large lamellipodia probably because of the constant release of $\beta\gamma$, from G α i and PI3K activation. UII treatment leads to decrease the co-labeling of UT with the full-length FlnA in lamellipodia. These data stressed the key role of UT/G α i/PKA that would catalyze FlnA cleavage by calpains, through inhibition of phosphorylation of S2152, allowing rapid internalization and trafficking efficiency allowing GPCR coupled to G α to prolong signaling (Jean-Alphonse and Hanyaloglu, 2011). Based on our observation and on the known role of β -arrestin-2 in UT internalization, we may propose that FlnA- β -arrestin complex can thus interact with UT-G α i $\beta\gamma$, complex to relay post-stimulation endocytosis of the UT/G α i/FlnA and calpain activation, and FlnA calpain dependent cleavage. Note that FlnA allows furin sorting from early endosomes to the Trans Golgi network (TGN) which could further recycle to plasma membrane (Liu *et al.*, 1997). UT, associated with FlnA, would be transported within (TGN) and may be redirected at the cell front allowing cell polarization. A hypothetical mechanism of the role played by FlnA in GBM cells to promote chemotactic migration *via* UT trafficking and couplings (Fig. 15)

Impact of FlnA expression on GBM growth and mouse survival

Together, it appears that targeting FlnA, in its multifaceted roles or only in its ability to control chemokine GPCR mediating invasion *in vivo*, constitutes new therapeutic options to prevent GBM invasiveness and recurrence. Nude mice were xenografted in the striatum with U87 and U87-FlnAKO GBM cells, and one series of experiment was stopped after 15 days, to sample tumor brains, and the other was corresponding to the animal follow-up until death. The survival of mice bearing U87-FlnAKO tumors is here significantly improved compared with mice bearing U87 GBM cells. The deletion of FlnA showed large tumors with a highly

circumscribed phenotype without invasion while U87 tumors appear less circumscribed with many invasive components. In addition, a strong FlnA staining was detected in these invasive components and co-expressed with UT in at the migration front, surrounded by UII-expressing cells. However, in U87-FlnAKO, a drastic decrease or even a complete inhibition of these factors expression suggest that triggering known signals stimulating UT/UII expression are not gathered, like hypoxia or inflammatory microenvironment, or mesenchymal signaling cascades like NF- κ B (Castel *et al.*, 2017). This growing rounded GBM tumor mass is associated with loss of MMP9 expression, suggesting a key role of FlnA expression and MMPs secretion. Paradoxically, other studies previously showed that FlnA overexpression in A7 melanoma cells, nasopharyngeal cancer CNE2 cells, prostate cancer PC-3 cells, renal cell carcinoma ACHN cells correlated with diminished MMP9 production (Sun *et al.*, 2014-1; Sun *et al.*, 2014-2; Sun *et al.*, 2014-3; Zhu *et al.*, 2007). In these studies, recombinant FlnA overexpression resulted from transfection of tumor cells, which contrasts with our study since here FlnA was deleted in U87 cells, leading to strong expression of CD44 in the diving tumor bulk, suggesting that all mesenchymal markers are not repressed. Interestingly U87, but also in a minor extent (not shown) U87-FlnAKO were migrating through corpus callosum. Glioma cell migration through myelinated fibers may require MMP-14 (MT1-MMP) and MMP-2 activities to progress *via* myelin and myelin-associated glycoprotein cleavage (Giger *et al.*, 2008). Moreover cells can use amiboidal migration when submitted to low adhesion and low constricted environment (Liu *et al.*, 2015-1; Callan-Jones and Voituriez 2016). Corpus callosum aligned fibrillary features may provide this kind of low adhesion and constricted environment that may allow wild-type but also U87-FlnAKO to move along the corpus callosum *via* amiboidal migration. Together, these preliminary observations demonstrate that by blocking FlnA expression, it's possible to counteract mesenchymal GBM cell migration but not the amiboidal infiltration, suggesting that GPCR non interacting with FlnA, or UT coupled to G α q, would relay GBM cell escape, mechanisms potentially targetable by specific G protein inhibitors.

In conclusion our work allowed to highlights that FlnA is re-expressed in gliomas, and that is expression is correlated with the tumor grade showing particularly high expression levels in hypoxic perinecrotic GBM areas. We also show that FlnA overexpression is associated with a bad prognosis for patient survival, due to the acquisition of a mesenchymal signature and the expression of promigratory programs involving protein linked to ECM adhesion and cytoskeleton reshaping. Moreover we show that FlnA plays a key role in focal adhesion establishment and actin cytoskeleton in GBM cells. Furthermore this process destabilization is

associated with cell inability to produce and maintain lamellipodia which impact significantly GBM cells motility. Moreover our work demonstrates the functional interaction between FlnA D19-D20 domains and UT (aa332-351) allowing chemotactic migration evoked by U11, and UT/G α i precoupling within lamellipodia. This mechanism allow quick G α i recruitment and seems to play a key role in cell polarization and migration. Indeed we highlight that UT induces FlnA calpain dependent photolytic cleavage, and that mechanism is necessary for UT relocalization to lamellipodia after endocytosis. *In vivo* tumors coming from U87 cells display invasive phenotype sometimes multifocal while U87-FlnAKO tumor exhibits highly circumscribe phenotype associated with the loss of MMP-9 expression. Thus FlnA seems to constitute a therapeutic target of interest which could be targeted to prevent healthy brain invasion by mesenchymal GBM cells.

References

- Agnihotri S, Burrell KE, Wolf A, Jalali S, Hawkins C, Rutka JT, Zadeh G. 2013. Glioblastoma, a brief review of history, molecular genetics, animal models and novel therapeutic strategies. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **61**(1): 25–41. doi: 10.1007/s00005-012-0203-0
- Alper Ö, Stetler-Stevenson WG, Harris LN, Leitner WW, Özdemirli M, Hartmann D, Raffeld M, Abu-Asab M, Byers S, Zhuang Z, et al. 2009 Sep 1. Novel anti-filamin-A antibody detects a secreted variant of filamin-A in plasma from patients with breast carcinoma and high-grade astrocytoma. *Cancer Science*. doi: 10.1111/j.1349-7006.2009.01244.x
- Aubry M, de Tayrac M, Etcheverry A, Clavreul A, Saikali S, Menei P, Mosser J. 2015. From the core to beyond the margin: a genomic picture of glioblastoma intratumor heterogeneity. *Oncotarget* **6**(14): 12094–12109. doi: 10.18632/oncotarget.3297
- Ayoub MA, Trinquet E, Pflieger KDG, Pin J-P. 2010. Differential association modes of the thrombin receptor PAR₁ with Gα_{i1}, Gα_{i2}, and β-arrestin 1. *The FASEB Journal* **24**(9): 3522–3535. doi: 10.1096/fj.10-154997
- Bayat Mokhtari R, Homayouni TS, Baluch N, Morgatskaya E, Kumar S, Das B, Yeger H. 2017. Combination therapy in combating cancer. *Oncotarget* **8**(23): 38022–38043. doi: 10.18632/oncotarget.16723
- Bhandari D, Robia SL, Marchese A. 2009. The E3 ubiquitin ligase atrophin interacting protein 4 binds directly to the chemokine receptor CXCR4 via a novel WW domain-mediated interaction. *Mol Biol Cell* **20**(5): 1324–1339. doi: 10.1091/mbc.e08-03-0308
- Birner P, Tchobanov A, Natchev S, Tuettenberg J, Guentchev M. 2015. The chemokine receptor CXCR7 influences prognosis in human glioma in an IDH1-dependent manner. *Journal of Clinical Pathology* **68**(10): 830–834. doi: 10.1136/jclinpath-2015-202886
- Brulé C, Perzo N, Joubert J-E, Sainsily X, Leduc R, Castel H, Prézeau L. 2014. Biased signaling regulates the pleiotropic effects of the urotensin II receptor to modulate its cellular behaviors. *The FASEB Journal* **28**(12): 5148–5162. doi: 10.1096/fj.14-249771
- Calderwood DA, Huttenlocher A, Kiousses WB, Rose DM, Woodside DG, Schwartz MA, Ginsberg MH. 2001. Increased filamin binding to β-integrin cytoplasmic domains inhibits cell migration. *Nature Cell Biology* **3**(12): 1060–1068. doi: 10.1038/ncb1201-1060
- Calderwood DA, Shattil SJ, Ginsberg MH. 2000. Integrins and Actin Filaments: Reciprocal Regulation of Cell Adhesion and Signaling. *Journal of Biological Chemistry* **275**(30): 22607–22610. doi: 10.1074/jbc.R900037199
- Callan-Jones AC, Voituriez R. 2016. Actin flows in cell migration: from locomotion and polarity to trajectories. *Current Opinion in Cell Biology* **38**: 12–17. doi: 10.1016/j.ceb.2016.01.003
- Carro MS, Lim WK, Alvarez MJ, Bollo RJ, Zhao X, Snyder EY, Sulman EP, Anne SL, Doetsch F, Colman H, et al. 2010. The transcriptional network for mesenchymal transformation of brain tumours. *Nature* **463**(7279): 318–325. doi: 10.1038/nature08712
- Castel H, Desrues L, Joubert J-E, Tonon M-C, Prézeau L, Chabbert M, Morin F, Gandolfo P. 2017. The G Protein-Coupled Receptor UT of the Neuropeptide Urotensin II Displays Structural and Functional Chemokine Features. *Front Endocrinol* **8**. doi: 10.3389/fendo.2017.00076
- Civciristov S, Ellisdon AM, Suderman R, Pon CK, Evans BA, Kleinfeld O, Charlton SJ, Hlavacek WS, Canals M, Halls ML. 2018. Preassembled GPCR signaling complexes mediate distinct cellular responses to ultralow ligand concentrations. *Science Signaling* **11**(551): eaan1188. doi: 10.1126/scisignal.aan1188

- Clara CA, Marie SKN, Almeida JRW de, Wakamatsu A, Oba-Shinjo SM, Uno M, Neville M, Rosenberg S. 2014. Angiogenesis and expression of PDGF-C, VEGF, CD105 and HIF-1 α in human glioblastoma. *Neuropathology* **34**(4): 343–352. doi: 10.1111/neup.12111
- Coly P-M, Perzo N, Le Joncour V, Lecointre C, Schouft M-T, Desrues L, Tonon M-C, Wurtz O, Gandolfo P, Castel H, et al. 2016. Chemotactic G protein-coupled receptors control cell migration by repressing autophagosome biogenesis. *Autophagy* **12**(12): 2344–2362. doi: 10.1080/15548627.2016.1235125
- Cooper LAD, Gutman DA, Chisolm C, Appin C, Kong J, Rong Y, Kurc T, Van Meir EG, Saltz JH, Moreno CS, et al. 2012. The Tumor Microenvironment Strongly Impacts Master Transcriptional Regulators and Gene Expression Class of Glioblastoma. *The American Journal of Pathology* **180**(5): 2108–2119. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.01.040
- Cukier IH, Li Y, Lee JM. 2007. Cyclin B1/Cdk1 binds and phosphorylates Filamin A and regulates its ability to cross-link actin. *FEBS Letters* **581**(8): 1661–1672. doi: 10.1016/j.febslet.2007.03.041
- Cunningham CC, Gorlin JB, Kwiatkowski DJ, Hartwig JH, Janmey PA, Byers HR, Stossel TP. 1992. Actin-binding protein requirement for cortical stability and efficient locomotion. *Science* **255**(5042): 325–327. doi: 10.1126/science.1549777
- Desbaillets I, Diserens AC, Tribolet N, Hamou MF, Van Meir EG. 1997. Upregulation of interleukin 8 by oxygen-deprived cells in glioblastoma suggests a role in leukocyte activation, chemotaxis, and angiogenesis. *J Exp Med* **186**(8): 1201–1212. doi: 10.1084/jem.186.8.1201
- Dillenburg-Pilla P, Patel V, Mikelis CM, Zárata-Bladés CR, Doçi CL, Amornphimoltham P, Wang Z, Martin D, Leelahavanichkul K, Dorsam RT, et al. 2015. SDF-1/CXCL12 induces directional cell migration and spontaneous metastasis via a CXCR4/G α i/mTORC1 axis. *The FASEB Journal* **29**(3): 1056–1068. doi: 10.1096/fj.14-260083
- Eckerich C, Zapf S, Fillbrandt R, Loges S, Westphal M, Lamszus K. 2007. Hypoxia can induce c-Met expression in glioma cells and enhance SF/HGF-induced cell migration. *Int J Cancer* **121**(2): 276–283. doi: 10.1002/ijc.22679
- Ehtesham M, Winston JA, Kabos P, Thompson RC. 2006. CXCR4 expression mediates glioma cell invasiveness. *Oncogene* **25**(19): 2801–2806. doi: 10.1038/sj.onc.1209302
- Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A, et al. 2001. C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* **107**(1): 43–54. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00507-4
- Esencay M, Sarfraz Y, Zagzag D. 2013. CXCR7 is induced by hypoxia and mediates glioma cell migration towards SDF-1 α . *BMC Cancer* **13**(1). doi: 10.1186/1471-2407-13-347
- Esposito G, Perrino C, Cannavo A, Schiattarella GG, Borgia F, Sannino A, Pironti G, Gargiulo G, Serafino LD, Franzone A, et al. 2011. EGFR trans-activation by urotensin II receptor is mediated by β -arrestin recruitment and confers cardioprotection in pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Basic Res Cardiol* **106**(4): 577–589. doi: 10.1007/s00395-011-0163-2
- Federico A, Zappavigna S, Romano M, Grieco P, Luce A, Marra M, Gravina AG, Stiuso P, D'Armiento FP, Vitale G, et al. 2014. Urotensin-II receptor is over-expressed in colon cancer cell lines and in colon carcinoma in humans. *European Journal of Clinical Investigation* **44**(3): 285–294. doi: 10.1111/eci.12231
- Feng Y, Chen MH, Moskowitz IP, Mendonza AM, Vidali L, Nakamura F, Kwiatkowski DJ, Walsh CA. 2006. Filamin A (FLNA) is required for cell–cell contact in vascular development and cardiac morphogenesis. *PNAS* **103**(52): 19836–19841. doi: 10.1073/pnas.0609628104

- Giese A, Bjerkvig R, Berens ME, Westphal M. 2016 Sep 21. Cost of Migration: Invasion of Malignant Gliomas and Implications for Treatment. *Journal of Clinical Oncology*, in press. doi: 10.1200/JCO.2003.05.063
- Giger RJ, Venkatesh K, Chivatakarn O, Raiker SJ, Robak L, Hofer T, Lee H, Rader C. 2008. Mechanisms of CNS myelin inhibition: evidence for distinct and neuronal cell type specific receptor systems. *Restor Neurol Neurosci* **26**(2–3): 97–115.
- Gillespie DL, Whang K, Ragel BT, Flynn JR, Kelly DA, Jensen RL. 2007. Silencing of Hypoxia Inducible Factor-1 α by RNA Interference Attenuates Human Glioma Cell Growth In vivo. *Clin Cancer Res* **13**(8): 2441–2448. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2692
- Gingras MC, Roussel E, Bruner JM, Branch CD, Moser RP. 1995. Comparison of cell adhesion molecule expression between glioblastoma multiforme and autologous normal brain tissue. *J Neuroimmunol* **57**(1–2): 143–153. doi: 10.1016/0165-5728(94)00178-q
- Gorlin JB, Yamin R, Egan S, Stewart M, Stossel TP, Kwiatkowski DJ, Hartwig JH. 1990. Human endothelial actin-binding protein (ABP-280, nonmuscle filamin): a molecular leaf spring. *J Cell Biol* **111**(3):1089-105. doi: 10.1083/jcb.111.3.1089
- Grieco P, Franco R, Bozzuto G, Toccaceli L, Sgambato A, Marra M, Zappavigna S, Migaldi M, Rossi G, Striano S, et al. 2011. Urotensin II receptor predicts the clinical outcome of prostate cancer patients and is involved in the regulation of motility of prostate adenocarcinoma cells. *J Cell Biochem* **112**(1): 341–353. doi: 10.1002/jcb.22933
- Gritsenko PG, Iliina O, Friedl P. 2012. Interstitial guidance of cancer invasion. *The Journal of Pathology* **226**(2): 185–199. doi: 10.1002/path.3031
- Guo C, Liang C, Yang J, Hu H, Fan B, Liu X. 2019. LATS2 inhibits cell proliferation and metastasis through the Hippo signaling pathway in glioma. *Oncol Rep* **41**(5): 2753–2761. doi: 10.3892/or.2019.7065
- Hanyaloglu AC, Zastrow M von. 2008. Regulation of GPCRs by Endocytic Membrane Trafficking and Its Potential Implications. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **48**(1): 537–568. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.48.113006.094830
- Hong X, Jiang F, Kalkanis SN, Zhang ZG, Zhang X-P, DeCarvalho AC, Katakowski M, Bobbitt K, Mikkelsen T, Chopp M. 2006. SDF-1 and CXCR4 are up-regulated by VEGF and contribute to glioma cell invasion. *Cancer Lett* **236**(1): 39–45. doi: 10.1016/j.canlet.2005.05.011
- Ithychanda SS, Hsu D, Li H, Yan L, Liu D, Das M, Plow EF, Qin J. 2009. Identification and Characterization of Multiple Similar Ligand-binding Repeats in Filamin: implication on filamin-mediated receptor clustering and cross-talk. *Journal of Biological Chemistry* **284**(50): 35113–35121. doi: 10.1074/jbc.M109.060954
- Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG. 2001. HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* **292**(5516): 464–468. doi: 10.1126/science.1059817
- Jain RK. 2003. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* **9**(6): 685–693. doi: 10.1038/nm0603-685
- Jane EP, Premkumar DR, Cavaleri JM, Sutera PA, Rajasekar T, Pollack IF. 2016. Dinaciclib, a Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Promotes Proteasomal Degradation of Mcl-1 and Enhances ABT-737-Mediated Cell Death in Malignant Human Glioma Cell Lines. *J Pharmacol Exp Ther* **356**(2): 354–365. doi: 10.1124/jpet.115.230052
- Jean-Alphonse F, Hanyaloglu AC. 2011. Regulation of GPCR signal networks via membrane trafficking. *Molecular and Cellular Endocrinology* **331**(2): 205–214. doi: 10.1016/j.mce.2010.07.010

- Jiang X, Yue J, Lu H, Campbell N, Yang Q, Lan S, Haffty BG, Yuan C, Shen Z. 2012. Inhibition of Filamin-A Reduces Cancer Metastatic Potential. *Int J Biol Sci* **9**(1): 67–77. doi: 10.7150/ijbs.5577
- Jiménez-Baranda S, Gómez-Moutón C, Rojas A, Martínez-Prats L, Mira E, Ana Lacalle R, Valencia A, Dimitrov DS, Viola A, Delgado R, et al. 2007. Filamin-A regulates actin-dependent clustering of HIV receptors. *Nature Cell Biology* **9**(7): 838–846. doi: 10.1038/ncb1610
- Kalluri R. 2003. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nature Reviews Cancer* **3**(6): 422–433. doi: 10.1038/nrc1094
- Kenific CM, Wittmann T, Debnath J. 2016. Autophagy in adhesion and migration. *J Cell Sci* **129**(20): 3685–3693. doi: 10.1242/jcs.188490
- Keshamouni VG, Michailidis G, Grasso CS, Anthwal S, Strahler JR, Walker A, Arenberg DA, Reddy RC, Akulapalli S, Thannickal VJ, et al. 2006. Differential protein expression profiling by iTRAQ-2DLC-MS/MS of lung cancer cells undergoing epithelial-mesenchymal transition reveals a migratory/invasive phenotype. *J Proteome Res* **5**(5): 1143–1154. doi: 10.1021/pr050455t
- Kiema T, Lad Y, Jiang P, Oxley CL, Baldassarre M, Wegener KL, Campbell ID, Ylänne J, Calderwood DA. 2006. The Molecular Basis of Filamin Binding to Integrins and Competition with Talin. *Molecular Cell* **21**(3): 337–347. doi: 10.1016/j.molcel.2006.01.011
- Kim H, Nakamura F, Lee W, Hong C, Pérez-Sala D, McCulloch CA. 2010. Regulation of cell adhesion to collagen via $\beta 1$ integrins is dependent on interactions of filamin A with vimentin and protein kinase C epsilon. *Experimental Cell Research* **316**(11): 1829–1844. doi: 10.1016/j.yexcr.2010.02.007
- Kim K-M, Gainetdinov RR, Laporte SA, Caron MG, Barak LS. 2005. G Protein-coupled Receptor Kinase Regulates Dopamine D3 Receptor Signaling by Modulating the Stability of a Receptor-Filamin- β -Arrestin Complex A CASE OF AUTORECEPTOR REGULATION. *J Biol Chem* **280**(13): 12774–12780. doi: 10.1074/jbc.M408901200
- Koivunen P, Fell SM, Lu W, Rabinowitz JD, Kung AL, Schlisio S. 2016. The 2-oxoglutarate analog 3-oxoglutarate decreases normoxic hypoxia-inducible factor-1 α in cancer cells, induces cell death, and reduces tumor xenograft growth. *Hypoxia (Auckl)* **4**: 15–27. doi: 10.2147/HP.S96366
- Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV. 2011. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer* **11**(5): 325–337. doi: 10.1038/nrc3038
- Koshy M, Villano JL, Dolecek TA, Howard A, Mahmood U, Chmura SJ, Weichselbaum RR, McCarthy BJ. 2012. Improved survival time trends for glioblastoma using the SEER 17 population-based registries. *J Neurooncol* **107**(1): 207–212. doi: 10.1007/s11060-011-0738-7
- Kouno J, Nagai H, Nagahata T, Onda M, Yamaguchi H, Adachi K, Takahashi H, Teramoto A, Emi M. 2004. Up-regulation of CC chemokine, CCL3L1, and receptors, CCR3, CCR5 in human glioblastoma that promotes cell growth. *J Neurooncol* **70**(3): 301–307. doi: 10.1007/s11060-004-9165-3
- Lad Y, Jiang P, Ruskamo S, Harburger DS, Ylänne J, Campbell ID, Calderwood DA. 2008. Structural Basis of the Migfilin-Filamin Interaction and Competition with Integrin β Tails. *J Biol Chem* **283**(50): 35154–35163. doi: 10.1074/jbc.M802592200
- Lakka SS, Gondi CS, Yanamandra N, Olivero WC, Dinh DH, Gujrati M, Rao JS. 2004. Inhibition of cathepsin B and MMP-9 gene expression in glioblastoma cell line via RNA interference reduces tumor cell invasion, tumor growth and angiogenesis. *Oncogene* **23**(27): 4681–4689. doi: 10.1038/sj.onc.1207616

- Lange F, Kaemmerer D, Behnke-Mursch J, Brück W, Schulz S, Lupp A. 2018 Apr 25. Differential somatostatin, CXCR4 chemokine and endothelin A receptor expression in WHO grade I–IV astrocytic brain tumors. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, in press. doi: 10.1007/s00432-018-2645-1
- Lecointre C, Desrues L, Joubert JE, Perzo N, Guichet P-O, Le Joncour V, Brulé C, Chabbert M, Leduc R, Prézeau L, et al. 2015. Signaling switch of the urotensin II vasosactive peptide GPCR: prototypic chemotaxic mechanism in glioma. *Oncogene* **34**(39): 5080–5094. doi: 10.1038/onc.2014.433
- Liang Y, Bollen AW, Gupta N. 2008. CC chemokine receptor-2A is frequently overexpressed in glioblastoma. *J Neurooncol* **86**(2): 153–163. doi: 10.1007/s11060-007-9463-7
- Lin R, Karpa K, Kabbani N, Goldman-Rakic P, Levenson R. 2001. Dopamine D2 and D3 receptors are linked to the actin cytoskeleton via interaction with filamin A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(9): 5258–5263. doi: 10.1073/pnas.011538198
- Liu G, Thomas L, Warren RA, Enns CA, Cunningham CC, Hartwig JH, Thomas G. 1997. Cytoskeletal Protein ABP-280 Directs the Intracellular Trafficking of Furin and Modulates Proprotein Processing in the Endocytic Pathway. *J Cell Biol* **139**(7): 1719–1733.
- Liu Y, Carson-Walter E, Walter KA. 2015. Targeting Chemokine Receptor CXCR7 Inhibits Glioma Cell Proliferation and Mobility. *Anticancer Res* **35**(1): 53–64.
- Liu Y-J, Le Berre M, Lautenschlaeger F, Maiuri P, Callan-Jones A, Heuzé M, Takaki T, Voituriez R, Piel M. 2015. Confinement and Low Adhesion Induce Fast Amoeboid Migration of Slow Mesenchymal Cells. *Cell* **160**(4): 659–672. doi: 10.1016/j.cell.2015.01.007
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. 2007. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathologica* **114**(2): 97–109. doi: 10.1007/s00401-007-0243-4
- Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. 2016. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica* **131**(6): 803–820. doi: 10.1007/s00401-016-1545-1
- Lubanska D, Porter L. 2017. Revisiting CDK Inhibitors for Treatment of Glioblastoma Multiforme. *Drugs R D* **17**(2): 255–263. doi: 10.1007/s40268-017-0180-1
- Lv S, Teugels E, Sadones J, Quartier E, Huylebrouck M, Four SD, Mercier ML, Witte OD, Salmon I, Michotte A, et al. 2011. Correlation between IDH1 Gene Mutation Status and Survival of Patients Treated for Recurrent Glioma. *Anticancer Res* **31**(12): 4457–4463.
- Maehara K, Takahashi K, Saitoh S. 2010. CENP-A reduction induces a p53-dependent cellular senescence response to protect cells from executing defective mitoses. *Mol Cell Biol* **30**(9): 2090–2104. doi: 10.1128/MCB.01318-09
- Merighi S, Benini A, Mirandola P, Gessi S, Varani K, Leung E, Maclennan S, Borea PA. 2006. Adenosine modulates vascular endothelial growth factor expression via hypoxia-inducible factor-1 in human glioblastoma cells. *Biochem Pharmacol* **72**(1): 19–31. doi: 10.1016/j.bcp.2006.03.020
- Meyer SC, Zuerbig S, Cunningham CC, Hartwig JH, Bissell T, Gardner K, Fox JEB. 1997. Identification of the Region in Actin-binding Protein that Binds to the Cytoplasmic Domain of Glycoprotein Iba. *J Biol Chem* **272**(5): 2914–2919. doi: 10.1074/jbc.272.5.2914
- Minina S, Reichman-Fried M, Raz E. 2007. Control of Receptor Internalization, Signaling Level, and Precise Arrival at the Target in Guided Cell Migration. *Current Biology* **17**(13): 1164–1172. doi: 10.1016/j.cub.2007.05.073

- Minsaas L, Planagumà J, Madziva M, Krakstad BF, Masià-Balagué M, Katz AA, Aragay AM. 2010. Filamin A Binds to CCR2B and Regulates Its Internalization. *PLOS ONE* **5**(8): e12212. doi: 10.1371/journal.pone.0012212
- Miyazaki T, Uemae Y, Ishikawa E. 2017. CXCL12/CXCR4 signaling in glioma stem cells—prospects for therapeutic intervention. *Translational Cancer Research* **6**(2): S434–S437. doi: 10.21037/12833
- Najib S, Saint-Laurent N, Estève J-P, Schulz S, Boutet-Robinet E, Fourmy D, Lättig J, Mollereau C, Pyronnet S, Susini C, et al. 2012. A Switch of G Protein-Coupled Receptor Binding Preference from Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K)–p85 to Filamin A Negatively Controls the PI3K Pathway. *Molecular and Cellular Biology* **32**(5): 1004–1016. doi: 10.1128/MCB.06252-11
- Nakamura F, Hartwig JH, Stossel TP, Szymanski PT. 2005. Ca²⁺ and Calmodulin Regulate the Binding of Filamin A to Actin Filaments. *Journal of Biological Chemistry* **280**(37): 32426–32433. doi: 10.1074/jbc.M502203200
- Nakamura F, Stossel TP, Hartwig JH. 2011. The filamins: Organizers of cell structure and function. *Cell Adhesion & Migration* **5**(2): 160–169. doi: 10.4161/cam.5.2.14401
- Naslavsky N, Caplan S. 2018. The enigmatic endosome – sorting the ins and outs of endocytic trafficking. *J Cell Sci* **131**(13). doi: 10.1242/jcs.216499
- Ohta Y, Suzuki N, Nakamura S, Hartwig JH, Stossel TP. 1999. The small GTPase RalA targets filamin to induce filopodia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(5): 2122–2128.
- Onoprishvili I. 2003. Interaction Between the Opioid Receptor and Filamin A Is Involved in Receptor Regulation and Trafficking. *Molecular Pharmacology* **64**(5): 1092–1100. doi: 10.1124/mol.64.5.1092
- Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, Rouse C, Chen Y, Dowling J, Wolinsky Y, Kruchko C, Barnholtz-Sloan J. 2014. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007-2011. *Neuro-oncology* **16 Suppl 4**: iv1-63. doi: 10.1093/neuonc/nou223
- Pang X-X, Bai Q, Wu F, Chen G-J, Zhang A-H, Tang C-S. 2016. Urotensin II Induces ER Stress and EMT and Increase Extracellular Matrix Production in Renal Tubular Epithelial Cell in Early Diabetic Mice. *KBR* **41**(4): 434–449. doi: 10.1159/000443445
- Patel AP, Tirosch I, Trombetta JJ, Shalek AK, Gillespie SM, Wakimoto H, Cahill DP, Nahed BV, Curry WT, Martuza RL, et al. 2014. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science* **344**(6190): 1396–1401. doi: 10.1126/science.1254257
- Paulus W, Baur I, Schuppan D, Roggendorf W. 1993. Characterization of integrin receptors in normal and neoplastic human brain. *Am J Pathol* **143**(1): 154–163.
- Pentikäinen U, Jiang P, Takala H, Ruskamo S, Campbell ID, Ylännä J. 2011. Assembly of a Filamin Four-domain Fragment and the Influence of Splicing Variant-1 on the Structure. *J Biol Chem* **286**(30): 26921–26930. doi: 10.1074/jbc.M110.195958
- Peverelli E, Giardino E, Treppiedi D, Vitali E, Cambiaghi V, Locatelli M, Lasio GB, Spada A, Lania AG, Mantovani G. 2014. Filamin A (FLNA) Plays an Essential Role in Somatostatin Receptor 2 (SST2) Signaling and Stabilization After Agonist Stimulation in Human and Rat Somatotroph Tumor Cells. *Endocrinology* **155**(8): 2932–2941. doi: 10.1210/en.2014-1063
- Peverelli E, Giardino E, Vitali E, Treppiedi D, Lania AG, Mantovani G. 2014. Filamin A in Somatostatin and Dopamine Receptor Regulation in Pituitary and the Role of cAMP/PKA Dependent Phosphorylation. *Horm Metab Res* **46**(12): 845–853. doi: 10.1055/s-0034-1384520
- Pham K, Luo D, Siemann DW, Law BK, Reynolds BA, Hothi P, Foltz G, Harrison JK. 2015. VEGFR inhibitors upregulate CXCR4 in VEGF receptor-expressing glioblastoma in a

- TGF β R signaling-dependent manner. *Cancer Letters* **360**(1): 60–67. doi: 10.1016/j.canlet.2015.02.005
- Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, Misra A, Nigro JM, Colman H, Soroceanu L, et al. 2006. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* **9**(3): 157–173. doi: 10.1016/j.ccr.2006.02.019
- Planagumà J, Minsaas L, Pons M, Myhren L, Garrido G, Aragay AM. 2012. Filamin A-Hinge Region 1-EGFP: A Novel Tool for Tracking the Cellular Functions of Filamin A in Real-Time. *PLOS ONE* **7**(8): e40864. doi: 10.1371/journal.pone.0040864
- Pons M, Izquierdo I, Andreu-Carbó M, Garrido G, Planagumà J, Muriel O, Pozo MA del, Geli MI, Aragay AM. 2017. Phosphorylation of filamin A regulates chemokine receptor CCR2 recycling. *J Cell Sci* **130**(2): 490–501. doi: 10.1242/jcs.193821
- Proulx CD, Simaan M, Escher E, Laporte SA, Guillemette G, Leduc R. 2005. Involvement of a cytoplasmic-tail serine cluster in urotensin II receptor internalization. *Biochem J* **385**(Pt 1): 115–123. doi: 10.1042/BJ20040807
- Pudas R, Kiema T-R, Butler PJG, Stewart M, Ylänne J. 2005. Structural Basis for Vertebrate Filamin Dimerization. *Structure* **13**(1): 111–119. doi: 10.1016/j.str.2004.10.014
- Rempel SA, Dudas S, Ge S, Gutiérrez JA. 2000. Identification and localization of the cytokine SDF1 and its receptor, CXCR4 chemokine receptor 4, to regions of necrosis and angiogenesis in human glioblastoma. *Clin Cancer Res* **6**(1): 102–111.
- Ritter SL, Hall RA. 2009. Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(12): 819–830. doi: 10.1038/nrm2803
- Rosenkilde MM, Gerlach L-O, Jakobsen JS, Skerlj RT, Bridger GJ, Schwartz TW. 2004. Molecular Mechanism of AMD3100 Antagonism in the CXCR4 Receptor TRANSFER OF BINDING SITE TO THE CXCR3 RECEPTOR. *J Biol Chem* **279**(4): 3033–3041. doi: 10.1074/jbc.M309546200
- Sasaki A, Masuda Y, Ohta Y, Ikeda K, Watanabe K. 2001. Filamin Associates with Smads and Regulates Transforming Growth Factor- β Signaling. *J Biol Chem* **276**(21): 17871–17877. doi: 10.1074/jbc.M008422200
- Sciumè G, Soriani A, Piccoli M, Frati L, Santoni A, Bernardini G. 2010. CX3CR1/CX3CL1 axis negatively controls glioma cell invasion and is modulated by transforming growth factor- β 1. *Neuro-oncology* **12**(7): 701–710. doi: 10.1093/neuonc/nop076
- Seck T, Baron R, Horne WC. 2003. Binding of Filamin to the C-terminal Tail of the Calcitonin Receptor Controls Recycling. *J Biol Chem* **278**(12): 10408–10416. doi: 10.1074/jbc.M209655200
- Segain J-P, Rolli-Derkinderen M, Gervois N, Raingeard de la Blétière D, Loirand G, Pacaud P. 2007. Urotensin II is a new chemotactic factor for UT receptor-expressing monocytes. *J Immunol* **179**(2): 901–909. doi: 10.4049/jimmunol.179.2.901
- Segura I, Lange C, Knevels E, Moskalyuk A, Pulizzi R, Eelen G, Chaze T, Tudor C, Boulegue C, Holt M, et al. 2016. The Oxygen Sensor PHD2 Controls Dendritic Spines and Synapses via Modification of Filamin A. *Cell Reports* **14**(11): 2653–2667. doi: 10.1016/j.celrep.2016.02.047
- Sells MA, Boyd JT, Chernoff J. 1999. p21-Activated Kinase 1 (Pak1) Regulates Cell Motility in Mammalian Fibroblasts. *J Cell Biol* **145**(4): 837–849.
- Shieh DB, Godleski J, Herndon JE, Azuma T, Mercer H, Sugarbaker DJ, Kwiatkowski DJ. 1999. Cell motility as a prognostic factor in Stage I nonsmall cell lung carcinoma: the role of gelsolin expression. *Cancer* **85**(1): 47–57. doi: 10.1002/(sici)1097-0142(19990101)85:1<47::aid-cncr7>3.0.co;2-l

- Seifert S, Sontheimer H. 2014. Bradykinin enhances invasion of malignant glioma into the brain parenchyma by inducing cells to undergo amoeboid migration. *J Physiol (Lond)* 592(22): 5109–5127. doi: 10.1113/jphysiol.2014.274498
- Stupp R, Weller M, Belanger K, Bogdahn U, Ludwin SK, Lacombe D, Mirimanoff RO. 2005. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *The New England Journal of Medicine*: 10.
- Sun GG, Lu YF, Cheng YJ, Hu WN. 2014. Absent expression of FLNA is correlated with poor prognosis of nasopharyngeal cancer. *Tumor Biol* 35(4): 2967–2974. doi: 10.1007/s13277-013-1381-z
- Sun GG, Lu YF, Zhang J, Hu WN. 2014-1. Filamin A regulates MMP-9 expression and suppresses prostate cancer cell migration and invasion. *Tumor Biology* 35(4): 3819–3826. doi: 10.1007/s13277-013-1504-6
- Sun GG, Sheng SH, Jing SW, Hu WN. 2014-2. An antiproliferative gene FLNA regulates migration and invasion of gastric carcinoma cell in vitro and its clinical significance. *Tumor Biol* 35(3): 2641–2648. doi: 10.1007/s13277-013-1347-1
- Sun G-G, Wei C-D, Jing S-W, Hu W-N. 2014-3. Interactions between Filamin A and MMP-9 Regulate Proliferation and Invasion in Renal Cell Carcinoma. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 15(8): 3789–3795. doi: 10.7314/APJCP.2014.15.8.3789
- Surcel A, Schiffhauer ES, Thomas DG, Zhu Q, DiNapoli KT, Herbig M, Otto O, West-Foyle H, Jacobi A, Kräter M, et al. 2019 Jan 1. Targeting mechanoresponsive proteins in pancreatic cancer: 4-hydroxyacetophenone blocks dissemination and invasion by activating MYH14. *Cancer Res*: canres.3131.2018. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-3131
- Szeto SGY, Williams EC, Rudner AD, Lee JM. 2015. Phosphorylation of filamin A by Cdk1 regulates filamin A localization and daughter cell separation. *Experimental Cell Research* 330(2): 248–266. doi: 10.1016/j.yexcr.2014.10.024
- Takahashi K, Totsune K, Murakami O, Arihara Z, Noshiro T, Hayashi Y, Shibahara S. 2003. Expression of urotensin II and its receptor in adrenal tumors and stimulation of proliferation of cultured tumor cells by urotensin II. *Peptides* 24(2): 301–306. doi: 10.1016/s0196-9781(03)00039-1
- Takahashi K, Totsune K, Murakami O, Shibahara S. 2001. Expression of urotensin II and urotensin II receptor mRNAs in various human tumor cell lines and secretion of urotensin II-like immunoreactivity by SW-13 adrenocortical carcinoma cells. *Peptides* 22(7): 1175–1179. doi: 10.1016/s0196-9781(01)00441-7
- Talasila KM, Soentgerath A, Euskirchen P, Rosland GV, Wang J, Huszthy PC, Prestegarden L, Skafnesmo KO, Sakariassen PØ, Eskilsson E, et al. 2013. EGFR wild-type amplification and activation promote invasion and development of glioblastoma independent of angiogenesis. *Acta Neuropathol* 125(5): 683–698. doi: 10.1007/s00401-013-1101-1
- Tan W, Martin D, Gutkind JS. 2006. The $G_{\alpha 13}$ -Rho Signaling Axis Is Required for SDF-1-induced Migration through CXCR4. *Journal of Biological Chemistry* 281(51): 39542–39549. doi: 10.1074/jbc.M609062200
- Tian h-m, Liu x-h, Han w, Zhao l-l, Yuan b, Yuan c-j. 2013. Differential expression of filamin A and its clinical significance in breast cancer. *Oncol Lett* 6(3): 681–686. doi: 10.3892/ol.2013.1454
- Tian Z-Q, Shi J-W, Wang X-R, Li Z, Wang G-Y. 2015. New cancer suppressor gene for colorectal adenocarcinoma: Filamin A. *World J Gastroenterol* 21(7): 2199–2205. doi: 10.3748/wjg.v21.i7.2199

- Traub LM, Bonifacino JS. 2013. Cargo recognition in clathrin-mediated endocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**(11): a016790. doi: 10.1101/cshperspect.a016790
- Trejo J. 2005. Internal PDZ ligands: novel endocytic recycling motifs for G protein-coupled receptors. *Mol Pharmacol* **67**(5): 1388–1390. doi: 10.1124/mol.105.011288
- Ueda K, Ohta Y, Hosoya H. 2003. The carboxy-terminal pleckstrin homology domain of ROCK interacts with filamin-A. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **301**(4): 886–890. doi: 10.1016/S0006-291X(03)00048-2
- Uramoto H, Akyürek LM, Hanagiri T. 2010. A positive relationship between filamin and VEGF in patients with lung cancer. *Anticancer Res* **30**(10): 3939–3944.
- Vadlamudi RK, Li F, Adam L, Nguyen D, Ohta Y, Stossel TP, Kumar R. 2002. Filamin is essential in actin cytoskeletal assembly mediated by p21-activated kinase 1. *Nature Cell Biology* **4**(9): 681–690. doi: 10.1038/ncb838
- Velkova A, Carvalho MA, Johnson JO, Tavgigian SV, Monteiro ANA. 2010. Identification of Filamin A as a BRCA1-interacting protein required for efficient DNA repair. *Cell Cycle* **9**(7): 1421–1433. doi: 10.4161/cc.9.7.11256
- Verhaak Roel G. W., Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP, et al. 2010a. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* **17**(1): 98–110. doi: 10.1016/j.ccr.2009.12.020
- Wei H, Wei H, Yu X, Yu X, Xue X, Xue X, Liu H, Liu H, Wang M, Wang M, et al. 2017. Urotensin II receptor as a potential biomarker for the prognosis of hepatocellular carcinoma patients. *Oncology Letters* **14**(3): 2749–2756. doi: 10.3892/ol.2017.6545
- Wick W, Kessler T. 2018. New glioblastoma heterogeneity atlas - a shared resource. *Nat Rev Neurol* **14**(8): 453–454. doi: 10.1038/s41582-018-0038-3
- Wu Y-Q, Song Z, Zhou C-H, Xing S-H, Pei D-S, Zheng J-N. 2010. Expression of urotensin II and its receptor in human lung adenocarcinoma A549 cells and the effect of urotensin II on lung adenocarcinoma growth in vitro and in vivo. *Oncol Rep* **24**(5): 1179–1184. doi: 10.3892/or_00000970
- Yadav VN, Zamler D, Baker GJ, Kadiyala P, Erdreich-Epstein A, DeCarvalho AC, Mikkelsen T, Castro MG, Lowenstein PR. 2016. CXCR4 increases *in-vivo* glioma perivascular invasion, and reduces radiation induced apoptosis: A genetic knockdown study. *Oncotarget* **7**(50). doi: 10.18632/oncotarget.13295
- Yi K, Yu M, Wu L, Tan X. 2012. Effects of urotensin II on functional activity of late endothelial progenitor cells. *Peptides* **33**(1): 87–91. doi: 10.1016/j.peptides.2011.11.016
- Yoshida N, Ogata T, Tanabe K, Li S, Nakazato M, Kohu K, Takafuta T, Shapiro S, Ohta Y, Satake M, et al. 2005. Filamin A-Bound PEBP2 β /CBF β Is Retained in the Cytoplasm and Prevented from Functioning as a Partner of the Runx1 Transcription Factor. *Molecular and Cellular Biology* **25**(3): 1003–1012. doi: 10.1128/MCB.25.3.1003-1012.2005
- Yu X, Wang P, Shi Z, Dong K, Feng P, Wang H, Wang X. 2015. Urotensin-II-Mediated Reactive Oxygen Species Generation via NADPH Oxidase Pathway Contributes to Hepatic Oval Cell Proliferation. *PLoS ONE* **10**(12): e0144433. doi: 10.1371/journal.pone.0144433
- Zagzag D, Lukyanov Y, Lan L, Ali MA, Esencay M, Mendez O, Yee H, Voura EB, Newcomb EW. 2006. Hypoxia-inducible factor 1 and VEGF upregulate CXCR4 in glioblastoma: implications for angiogenesis and glioma cell invasion. *Lab Invest* **86**(12): 1221–1232. doi: 10.1038/labinvest.3700482
- Zhang K, Zhu T, Gao D, Zhang Y, Zhao Q, Liu S, Su T, Bernier M, Zhao R. 2014. Filamin A expression correlates with proliferation and invasive properties of human metastatic

- melanoma tumors: implications for survival in patients. *J Cancer Res Clin Oncol* **140**(11): 1913–1926. doi: 10.1007/s00432-014-1722-3
- Zhang Y, Zhong J, Cui Y, Chen D, Ji L, Zheng F, Zheng X, Xia W. 2019. GW28-e1067 Urotensin II induces endothelial-mesenchymal transition of cardiac microvascular endothelial cells via endoplasmic reticulum stress. *J Am Coll Cardiol* **70**(16 Supplement): C42. doi: 10.1016/j.jacc.2017.07.146
- Zhang Y-G, Kuang Z-J, Mao Y-Y, Wei R-H, Bao S-L, Wu L-B, Li Y-G, Tang C-S. 2011. Osteopontin is involved in urotensin II-induced migration of rat aortic adventitial fibroblasts. *Peptides* **32**(12): 2452–2458. doi: 10.1016/j.peptides.2011.10.018
- Zhao L, Wang Y, Xue Y, Lv W, Zhang Y, He S. 2015. Critical roles of chemokine receptor CCR5 in regulating glioblastoma proliferation and invasion. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* **47**(11): 890–898. doi: 10.1093/abbs/gmv095
- Zheng M, Zhang Xiaohan, Sun N, Min C, Zhang Xiaowei, Kim K-M. 2016. RalA employs GRK2 and β -arrestins for the filamin A-mediated regulation of trafficking and signaling of dopamine D2 and D3 receptor. *Biochim Biophys Acta* **1863**(8): 2072–2083. doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.05.010
- Zheng X, Zhou A-X, Rouhi P, Uramoto H, Borén J, Cao Y, Pereira T, Akyürek LM, Poellinger L. 2014. Hypoxia-induced and calpain-dependent cleavage of filamin A regulates the hypoxic response. *PNAS* **111**(7): 2560–2565. doi: 10.1073/pnas.1320815111
- Zhong Z, Yeow W-S, Zou C, Wassell R, Wang C, Pestell RG, Quong JN, Quong AA. 2010. Cyclin D1/Cyclin-Dependent Kinase 4 Interacts with Filamin A and Affects the Migration and Invasion Potential of Breast Cancer Cells. *Cancer Research* **70**(5): 2105–2114. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1108
- Zhou A-X, Hartwig JH, Akyürek LM. 2010. Filamins in cell signaling, transcription and organ development. *Trends in Cell Biology* **20**(2): 113–123. doi: 10.1016/j.tcb.2009.12.001
- Zhou A-X, Toylu A, Nallapalli RK, Nilsson G, Atabey N, Heldin C-H, Borén J, Bergo MO, Akyürek LM. 2011. Filamin A mediates HGF/c-MET signaling in tumor cell migration. *International Journal of Cancer* **128**(4): 839–846. doi: 10.1002/ijc.25417
- Zhu T-N, He H-J, Kole S, D’Souza T, Agarwal R, Morin PJ, Bernier M. 2007. Filamin A-mediated Down-regulation of the Exchange Factor Ras-GRF1 Correlates with Decreased Matrix Metalloproteinase-9 Expression in Human Melanoma Cells. *Journal of Biological Chemistry* **282**(20): 14816–14826. doi: 10.1074/jbc.M611430200
- Zhu Y, Yang P, Wang Q, Hu J, Xue J, Li G, Zhang G, Li X, Li W, Zhou C, et al. 2013. The Effect of CXCR4 Silencing on Epithelial-Mesenchymal Transition Related Genes in Glioma U87 Cells. *The Anatomical Record* **296**(12): 1850–1856. doi: 10.1002/ar.22821

Legend to figures

Figure 1: Expression of urotensinergic system components UT/UII and CXCR4/SDF-1 α system expression in glioma patient biopsies. (A) UT and CXCR4 receptor expression in different paraffin-embedded glioma grade biopsies. UT and CXCR4 were immunostained with corresponding antibodies (see materials and methods) on increasing glioma grades, pilocytic, diffuse (grade II) and anaplastic (grade III) astrocytoma and multiform glioblastoma (GBM). After labeling, biopsies were counterstained with eosin/hematoxylin. Scale bar 100 μ m. (B) UII and SDF-1 α ligand expression in different paraffin-embedded glioma grade biopsies. UT and SDF-1 α were immunostained with corresponding antibodies on increasing glioma grades, pilocytic, diffuse (grade II) and anaplastic (grade III) astrocytoma and multiform glioblastoma (GBM). Scale bar 100 μ m. (C) UT and CXCR4 and their respective ligands UII and SDF-1 α are coexpressed in all glioma grades, and more especially in typical GBM hypoxic necrotic (N) and pseudo-palisadic (PP) areas. (D) Schematic representation of signaling pathway implicated in chemokine receptors-mediated healthy brain parenchyma invasion. UT recruit Gai/o and Ga13 to respectively activate focal adhesion formation and actin polymerization and focal adhesion maturation in gliomas.

Figure 2: Interaction between UT and FlnA using two-hybrid screening. (A) Schematic representation of the two-hybrid experimental strategy. A cDNA bank made of 5 human brains were cloned onto pACT2 vector. The cDNA of human C-terminal fragment of UT containing a SL doublet in protein sequence which interacts with FlnA were cloned in pGBKT7 (pGBKT7-UT_{cterm}). (B) *S. cerevisiae* AH109 yeast were co-transformed with bait vectors pGBKT7-UT_{cterm} or negative control vector pGBKT7-lamin and with prey vector pACT2 containing protein of interests. Yeasts coexpressing p53 protein and T antigen (TAg) able to interact in the system were used as positive control. Yeasts expressing pGBKT7-lamin and TAg were used as negative control. Drop test were performed in control medium (-Leu/-Trp) or in selective medium (QDO/+3AT and -Leu/-Trp/+X- α -Gal. FlnA specifically interact with UT_{cterm} allowing yeast to growth in selective medium. Fusion protein DLA-UT_{cterm}/DA-FlnA are detected by western blot in co-transformed yeasts. (C) Identification of UT_{cterm} specific interaction sequence to FlnA. AH109 yeasts were cotransformed with UT_{cterm} full length vector or with truncated and/or mutated form of the C-terminal part (UT_{cterm}, UT_{cterm}P374-377A, UT_{cterm}P382-385A, UT₃₁₉₋₃₅₁, UT₃₁₉₋₃₇₀, UT₃₃₂₋₃₈₉, UT₃₅₁₋₃₈₉ or UT₃₇₀₋₃₈₉). (*) Vectors UT₃₅₁₋₃₈₉, UT₃₇₀₋₃₈₉ not

allowed yeasts growth in QDO/+3AT selective media. (Δ) Addition of 332-351 restore yeast growth in selective media.

Figure 3: FlnA expression levels in gliomas. (A) Bioinformatics study of FlnA expression in gliomas by using TCGA database. Patients were ranked according to their glioma type, glioblastomas were more especially classified according to their subtype. Two groups were also generated according to their IDH mutation status. Kaplan-Meier curves plot of patient overall survival and recurrence depending of their FlnA expression levels, median expression cut-off was chosen. Box plot showed median \pm min and max. Kruskal-wallis & Duns post-test: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. The database analysis showed that FlnA expression levels are correlated with glioma grades showing the highest levels for IDH_{wt} mesenchymal glioblastomas, high expression levels of FlnA are associated with a lower overall survival and a faster recurrence. (B) Table of most correlated gene with FlnA according to TCGA data base, Pearson correlation coefficient were calculated to ranked genes. (C) Gene ontology pathway of FlnA correlated gene in glioma according to KEGG database, allowing to characterized pathway associated with Focal adhesion, Regulation of actin cytoskeleton, Adherents junctions as well as ECM-receptor interaction and PI3K-Akt signaling pathway. (D) FlnA expression levels in various glioblastoma subdomains from IVY GAP database. Box plot showed median \pm min and max. Kruskal-wallis & Duns post-test: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$. FlnA is more expressed in the tumor core compared to healthy tissue, more especially, FlnA is highly express in perinecrotic and hypoxic areas as well as in microvascular proliferation and vessels in cellular tumor compartment. (E) FlnA and UT expression in paraffin-embedded glioblastoma biopsies. FlnA and UT are commonly expressed in vessels and microvascular proliferation areas in tumor and oftenly localized in cellular tumor. Scale bar = 25 μ m.

Figure 4: FlnA expression in patient glioma biopsies. (A) FlnA immunolabeling on paraffin-embedded glioma biopsies counterstained with eosin/hematoxylin. In healthy tissue and oligodendroglioma, FlnA is detected in vascular compartment. In astrocytoma, Fln A labeling increases with the tumor grade showing low and diffuse labeling associated with reactive astrocyte labeling in the low grade astrocytoma, the labeling becomes stronger in high grade gliomas. Scale bar = 50 μ m. (B) Focus on specific structures labeled with FlnA antibody. FlnA antibody labeled reactive astrocytes which seems to secrete FlnA positive vesicles. As mentioned upper, FlnA antibody labeled microvessels within brain parenchyma. In

glioblastoma, FlnA is strongly detected in characteristic hypoxic perinecrotic areas. Scale bar = 50 μm . **(C)** FlnA scoring depending of labeling intensity and area based on WHO 2007 glioma classification. Histograms showed mean \pm s.e.m. Scale bar = 50 μm . **(D)** Graphical representation of cohort distribution. The circle size defines the labeling area and the labeling intensity is defined by color gradient. **(E)** FlnA scoring depending of labeling intensity and area based on patients IDH status. Histograms showed mean \pm s.e.m, Kruskal-wallis & Duns post-test: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Kaplan-Meier curves plot of patient overall survival and recurrence depending of intensity and area FlnA scoring. Mantel-Cox test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Patients under the 25% cut-off of area labeling showed a significant decrease of their overall survival associated with a tendency of faster recurrence. Considering area scoring, patient with a strong FlnA labeling showed a lower survival and a faster recurrence.

Figure 5: FlnA, UT and UII expression in glioma cell lines. **(A)** FlnA mRNA and protein amount analysis by qPCR and western blotting in different glioma cell lines (8MG, 42MG, U251, U87, GL15 & SW1088). Histograms showed mean \pm s.e.m obtained from 1 experiment in triplicate. FlnA mRNA amount are normalized to UBC mRNA amount. Antibody against N-terminal FlnA was used to detect FlnA protein amounts (Ab_FlnA_{ABD}). FlnA is well expressed in all glioma cell lines including grade III astrocytoma SW1088 cell line. **(B)** Immunocytochemistry against FlnA in SW1088, 42MG and U87 glioma cell lines by using Ab_FlnA_{ABD} antibody. Scale bar 50 μm . FlnA antibody showed filamentous labeling in SW1088, 42MG and U87 cell lines, more especially, FlnA is strongly labeled at cell lamellipodium in U87 cell lines. **(C)** Effect of hypoxia (1% O₂) on FlnA mRNA amount in 42MG, U251 and U87 glioblastoma cells. FlnA mRNA amount were studied by qPCR, mRNA amount were normalized to UBC. Histograms showed mean \pm s.e.m obtained from 1 experiment in triplicate. Mann Whitney test, *** $P < 0.001$. After 12 h of hypoxia, FlnA mRNA amount are increased in 42MG, U251 and U87 under hypoxic conditions. **(D)** Effect of hypoxia and 3-oxoglutarate on FlnA protein amount in U87 cells. FlnA protein expression were studied by Western blot by using Ab_FlnA_{ABD} and an antibody against C-terminal part of FlnA Ab_FlnA_{D16-D24}. FlnA expression is increased after 12 h of culture under hypoxic conditions. Application of 1 mM of 3-oxoglutarate generate cleaved form of FlnA around 100 kDa using Ab_FlnA_{D16-D24} and 130 kDa using Ab_FlnA_{ABD}, such an absent effect under hypoxia. **(E)** UT/UII expression in glioblastoma cell lines. UT/UII mRNA levels were studied by qPCR,

mRNA amounts were normalized to those of UBC. UT mRNA are detected in 42MG and U87 as well as U118 mRNAs are detected in 8MG and U87 cells. **(F)** Effect of hypoxia on UT expression in U87 and 8MG cells. UT protein amount were detected by western blotting. UT-specific immunoreactive band is detected at 42 kDa in normoxia (N), under hypoxic conditions (H) this specific band intensity is increased.

Figure 6: FlnA down-regulation strategies in glioma cell lines and their effects on cell growth and resistance to chemotherapies. **(A)** Commercial lentiviral vectors containing FlnA specific shRNAs were produced in HEK293T cells, then viral particles were placed into U87 culture medium, after infection cells were selected by puromycin. Commercial plasmid coding for the Cas9 and 3 specific gRNAs designed to specifically generated FlnA knockout (KO) based on the GeCKO (2) database were transiently transfected in U87. After Cas 9 activity, cells were cloned to generate a homogenous U87 FlnA KO population (U87-FlnAKO), then the KO were validated by western blot. **(B)** Validation of shRNA efficiency by qPCR, mRNAs amounts were correlated to GAPDH mRNAs. All of 5 tested mRNA down-regulated FlnA expression, but ShFlnA1 is more efficient and show ~80% of mRNA production inhibition. **(C)** Validation of down-regulation strategies by western blott. The ShFlnAI drastically decreased FlnA protein levels detected by both Ab_FlnA_{ABD} and Ab_FlnA_{D16-D24} antibodies, CRISPR/Cas9 KO strategy totally depletes FlnA expression within U87-FlnAKO cells. **(D)** Evaluation of FlnA down-regulation on U87 cell growth *in vitro*. Cell growth were evaluated by counting cells each 24 h during 72 h. Down-regulation of FlnA doesn't impact significantly cell growth compared to cells infected with Shctrl vector. In contrast, U87-FlnAKO show a significant decrease of their growth after 72 h of counting, a tendency triggered at 48 h. Each point shows mean \pm s.e.m obtained from 3 experiments in triplicate. **(E)** Chemometec cell cycle kit uses DAPI chromatin labeling intensity to characterize cell cycle phases such as G1, S and G2/M. **(F)** Cell cycle profile of U87 and U87-FlnAKO cell lines. After 16 h of starving and 6 h of cell synchronization, cell cycle profile of U87 and U87-FlnAKO were obtained by using Chemometec cytometer. **(G)** Quantification of cell amount in the cell cycle phases. Cell amount in each cell cycle phase was quantified from cell cycle profile. Histograms show mean \pm s.e.m obtained from 2 experiments in triplicate. Kruskal-Wallis test, *** $P < 0.001$. U87-FlnAKO cells showed an accumulation of cell population in G1 phase at the expense of S and G2/M phases. **(H)** Impact of FlnA KO on chemotherapies effects. Chemotherapy effects were evaluated after 2 days of growing in 10^{-7} M and 10^{-5} M of TMZ as well as 10^{-7} M and 10^{-5} M of irinotecan.

Histograms show mean \pm s.e.m obtained from 1 experiment in triplicate. Kruskal-Wallis test *** $P < 0.001$. U87-FlnAKO cell growth is decreased by 10^{-7} M and 10^{-5} M of TMZ as well as 10^{-7} M and 10^{-5} M of irinotecan while U87 cell growth is decreased only by 10^{-5} M of TMZ.

Figure 7: Effects of FlnA knockout on U87 cell motility and migration-associated structures. (A) Immunofluorescence analysis of focal adhesion point and actin cytoskeleton network in U87 and U87-FlnAKO glioblastoma cells. Focal adhesion were labeled by phospho-paxillin (P_paxillin) antibody, actin were labeled using rhodamine-phalloidin. Scale bar = 12.5 μ m. (B) Quantification of relative cytoplasm and nucleus areas as well as P_paxillin FA amount. Histograms show mean \pm s.e.m obtained from 12 fields per condition. Mann Whitney test: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. U87-FlnAKO cells has significant smaller cytoplasm area nuclei as well as significantly less P_Paxillin FA. (C) Profile of actin stress fibers amount by using linear ROI (see dotted ROI in A) and quantification among cellular population. Histograms show mean \pm s.e.m. Mann Whitney test: *** $P < 0.001$. U87-FlnAKO have significantly less actin stress fibers, they only show cortical actin cytoskeleton. (D) U87 and U87-FlnAKO cell trajectories during 12 h of random motility assay. (E) Quantification of time-cumulated distance traveled by cells. (F) Quantification of average terminal cumulated-distance and Euclidian distance, as well as speed and migration efficiencies. Histograms show mean \pm s.e.m calculated from 8 cells of 1 experiment. Mann Whitney test: ns, non-significant, *** $P < 0.001$. U87-FlnAKO traveled less cumulated-distance but the same average Euclidian distance, *de facto* their average migration speed is slower than U87. (G) Transmission microphotography of U87 and U87-FlnAKO and quantification in various filed of membranes features generated by this cells. Histograms show mean \pm s.e.m. U87 cells are characterized by the formation of 1 or more lamellipodia (white arrows) allowing efficient migration, in contrast U87-FlnAKO does not produce this kind of membrane features and more especially create long aberrant membrane protrusions (yellow arrows).

Figure 8: Effects of FlnA knockout on U11-mediated U87 glioblastoma cell adhesion and migration. (A) Signaling pathways and molecular partners associated with UT-mediated directional migration in glioblastoma cells. (B) Immunofluorescence analysis of the focal adhesion points labeled with anti-vinculin antibody (cyan) in U87 and U87-FlnAKO treated-cells with 10^{-8} M of U11 during 5, 30 and 60 min. Scale bare = 25 μ m. (C) Focal adhesion number quantification after treatment in U87 and U87-FlnAKO glioblastoma cells. Number of FA after

5, 30 and 60 min of UII treatment were quantified using ImageJ. Histograms show mean \pm s.e.m obtained from 8 fields per condition of 1 experiment. Kruskal-Wallis & Duns post-test: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ and Kruskal-Wallis test: \$\$ $P < 0.01$, \$\$\$ $P < 0.001$. In U87 cells, FA number transiently increases at 5 and 30 min of treatment and then decrease around the base line after 60 min. In U87-FlnAKO, FA numbers stay low and stable after UII stimulation. **(D)** Schematic representation of a Boyden chamber used for directional migration assay. **(E)** Microphotographies of U87 and U87-FlnAKO cells on Boyden chamber membrane taken after 24 h of UII 10^{-12} M, 10^{-9} M and 10^{-7} M incubation to stimulate chemotactic migration. **(F)** Quantification of migrated cells on Boyden chamber after 24 h of UII 10^{-12} M, 10^{-9} M and 10^{-7} M incubation. Histograms show mean \pm s.e.m obtained from 8 fields per condition of 1 experiment. Kruskal-Wallis & Duns post-test: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ and Mann Whitney test: \$\$ $P < 0.01$, \$\$\$ $P < 0.001$. U87 cells significantly migrate in response to 10^{-9} M and 10^{-7} M of UII whereas U87-FlnAKO do not migrate in response to UII. **(G)** Effect of homogenous concentration of UII on U87 and U87-FlnAKO migration. U87 and U87-FlnAKO scratched cell layer were treated with 10^{-12} M and 10^{-7} M of UII, after 12 h of record, wound closure were quantified using ImageJ. Graphics show mean \pm s.e.m obtained from 2 experiments in sextuplicate. Kruskal-Wallis test: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Both 10^{-12} M and 10^{-7} M of UII inhibit U87 wound closure while only 10^{-7} M inhibits U87-FlnAKO that already close the wound slower than U87.

Figure 9: Effect of UT C-terminal peptidomimetics on glioblastoma cell migration. (A) Mapping of UT C-terminal domain, containing FlnA binding domain (AA 332-351) identify in our study by two-hybrid assay, a palmitoylation site (C334) and a polyproline motif (AA 370-389). **(B)** Effect of UT₃₁₉₋₃₈₉ peptidomimetic fragments on UII-mediated directional migration of U87. Quantification of control and UT₃₁₉₋₃₈₉ transfected migrating cells on Boyden chamber after 24 h of UII 10^{-12} M, 10^{-9} M and 10^{-7} M incubation. Histograms show mean \pm s.e.m obtained from 1 experiment in triplicate (8 fields per condition). Kruskal-Wallis & Duns post-test: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** and Mann Whitney test: \$\$ $P < 0.01$, \$\$\$ $P < 0.001$. UT₃₁₉₋₃₈₉-transfected cells doesn't migrate in response of 10^{-12} M, 10^{-9} M and 10^{-7} M of UII. **(C)** Effects of UT₃₁₉₋₃₈₉ and FlnA 16-24 peptidomimetic fragments on UII-mediated directional migration of 8MG glioblastoma cells. Quantification of control and UT₃₁₉₋₃₈₉, FlnA_{D16-D24} and ShFlnA transfected

migrating cells on Boyden chamber after 24 h of UII 10^{-9} M treatment. Histograms show mean \pm s.e.m. Kruskal-Wallis & Duns post-test: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and Mann Whitney test: \$\$ $P < 0.01$, \$\$\$ $P < 0.001$. $UT_{319-389}$, $FlnA_{D16-D24}$ and ShFlnA-transfected cells don't migrate in response of 10^{-9} M of UII. **(D)** Characterization of UT C-terminal fragment implicated in U87 directional migration inhibition. U87 cells were transfected with various fragment of UT C-terminal part (319-332, 319-389 and 352-389) and plated in Boyden chamber with 10^{-7} M of UII. Transfection of 319-389 and 371-389 fragments prevent UII-mediated directional migration.

Figure 10: Role of FlnA on UT subcellular dynamic distribution in U87 glioblastoma cell line. **(A)** Immunofluorescent study of recombinant UT_{eYFP} distribution after 10^{-8} M of UII treatment in U87 and U87-FlnKO cells by confocal microscopy. Scale bar = 25 μ m. In control condition, UT_{eYFP} is mainly expressed at U87 and U87-FlnAKO plasma membrane, and more especially in membrane ruffles in U87 cells. After UII treatment, UT_{eYFP} signal translocates to the cytosol forming high intensity dots while in U87-FlnAKO, the receptor signal stays detectable at the plasma membrane. **(B)** Experimental strategy used to quantify UT internalization. Cells were transfected with recombinant UT-Snap coding vector. After incubation with Lumi-4Tb (TB), cells were incubated with UII and fluorescein that quench Tb fluorescence (1), internalization allowed Tb to emit fluorescence in response to 340 nm stimulation. Ratio between Tb fluorescence emission (620 nm) and fluorescein (520 nm) was calculated to quantify the receptor internalization. **(C)** UT receptor internalization in U87 and U87-FlnAKO glioblastoma cells. U87 and U87-FlnAKO cells were treated with increasing concentration of UII (10^{-7} M, 10^{-9} M and 10^{-12} M) and fluorescences (620 nm and 520 nm) were recorded during 60 min. Data show mean \pm s.e.m. Multiple *t*-test: *** $P < 0.001$. UT_{eYFP} receptor internalizes after 10^{-7} M and 10^{-9} M of UII depending of peptide concentration. In U87-FlnAKO, receptor internalization is not detectable.

Figure 11: G protein switch signaling in U87-FlnAKO glioblastoma cells. **(A)** Immunofluorescence study of *Gai1* and *Gaq/11* colocalization with transfected UT_{eYFP} receptor in U87 and U87-FlnAKO cells after UII treatment (10^{-8} M: 5 and 40 min). Scale bar = 25 μ m. **(B)** ROI strategy used for protein subcellular distribution evaluation. **(C)** Quantification of UT-*Gai1* and *Gaq/11* colocalization at cell front, intracellular and cell rear. Histograms show mean \pm s.e.m. Mann Whitney test: * $P < 0.05$. *Gai1* and UT are strongly colocalized within U87

lamellipodia in control condition (arrows). After 5 min of treatment, Gαi1 and UT colocalization decreases. In U87-FlnAKO, UII treatment increases Gαi1 and UT colocalization in the intracellular compartment. The same phenomenon occurs at the cell front after 5 min of treatment between Gαq/11 and UT in U87-FlnAKO cells. **(D)** Fluorescence profile of UII-mediated calcium mobilization in U87 and U87-FlnAKO. Increasing concentration of UII induced a dose-dependent calcium mobilization in U87-FlnAKO (obtained from 2 experiments in triplicate).

Figure 12: Implication of Gai signaling on UT-FlnA distribution after UII treatment. **(A)** Immunofluorescence analysis of UT_{eYFP}-FlnA distribution in U87 after treatment with UII (10^{-8} M, 5 min and 40 min) by using Ab_{FlnA_{ABD}} Ab_{FlnA_{D16-D24}}. Scale bar = 25 μm **(B)** Quantification of UT_{eYFP}-FlnA_{ABD}, UT_{eYFP}-FlnA_{D16-D24} and FlnA_{ABD}-FlnA_{D16-D24} colocalization at cell front, intracellular and cell rear. Histograms show mean ± s.e.m. Mann Whitney test: * $P < 0.05$. Without inhibitor colocalization between UT_{eYFP}-FlnA_{ABD}, UT_{eYFP}-FlnA_{D16-D24} and FlnA_{ABD}-FlnA_{D16-D24} within cell lamellipodium stay stable after UII treatment. Pre-incubation with PTX induces a decrease of UT_{eYFP}-FlnA_{ABD}, UT_{eYFP}-FlnA_{D16-D24} and FlnA_{ABD}-FlnA_{D16-D24} colocalization within lamellipodium after UII treatment. **(C)** Quantification of UT_{eYFP} subcellular distribution in U87 after 5 min and 40 min with or without PTX preincubation. Histograms show mean ± s.e.m obtained from 1 experiment in duplicate (8 fields per condition). Mann Whitney test: * $P < 0.05$. UT_{eYFP} signal increase within the lamellipodium and in the intracellular compartment independently of the presence of PTX. **(D)** Effect of UII treatment on FlnA cleavage through Gai pathway. FlnA cleavage were studied by western blot using Ab_{FlnA_{ABD}}, Ab_{FlnA_{D16-D24}} and phosphorylation using anti-phospho-FlnA (Serine 2152; FlnA_{P_{S2152}}). In control condition 10^{-8} M of UII cleaved forms of FlnA increase at ~130 KDa, detectable with Ab_{FlnA_{D16-D24}}, associated with decrease of full length band intensity, detectable with Ab_{FlnA_{ABD}}. Intensity of FlnA cleaved band at ~130 kDa in cells preincubated with PTX decrease, a phenomenon associated with FlnA phosphorylation. **(E)** Schematic representation of UT-Gai pathway integrated with effects on calpain activity and FlnA cleavage. PTX: pertussis toxin, cAMP: cyclic Adenosine monophosphate, PKA: protein kinase A.

Figure 13: *In vivo* orthotropic xenograft of U87 and U87-FlnAKO glioblastoma cell lines.

(A) Experimental protocol used for intrastriatal injection. Adult NMRI Nude mice were injected with 50 000 U87 or U87-FlnAKO cells. 8 mice per cell line were injected for survival study, and 6 per group were injected for brain sampling after 15 days for immunohistochemistry labeling. (B) Kaplan-Meier survival plot of U87 and U87-FlnAKO injected mice. U87-FlnAKO survival median is significantly longer than that of U87 (56 vs 45 days, $P < 0.01$). (C) Immunohistolabeling of CAIX, MMP9 and FlnA on xenograft brains. U87 tumor is strongly labeled by CAIX, MMP9 and FlnA. U87-FlnAKO tumor is also strongly marked by CAIX antibody but in contrast to U87, U87-FlnAKO tumor shows a weak MMP9 labeling associated to a residual FlnA labeling. Scale bar = 200 μm . (D) Immunofluorescence characterization of UT and FlnA (white arrows) or UII in GBM cells xenografted in Nude mouse brains. UT and UII are strongly labeled within U87 tumor invasive processes, however FlnA, UT and UII are not detectable in U87-FlnA tumor. Dotted circle: tumor site injection. Scale bar = 25 μm .

Figure 14: Immunofluorescent study of U87 and U87-FlnKO tumor morphology and histological features.

(A) Laminin and FlnA immunofluorescent labeling in U87 and U87-FlnKO tumor. Scale bar = 500 μm . U87-FlnAKO tumors shows a very circumscribe phenotypes and are strongly vascularized, moreover tumor edges are labeled by Ab_FlnA_{ABD} tightly colocalized with laminin labeling (green arrow). U87 tumor exhibits a highly invasive phenotype associated with a strong FlnA labeling and laminin suggesting a robust tumor vascularization. (B) UT, FlnA and CD44 labeling in U87 and U87-FlnKO tumors. Scale bar = 500 μm . Although FlnA tumor still express CD44, tumor displays highly circumscribe phenotype associated to the lack of FlnA and UT expressions, in contrast U87 GBM exhibits invasive phenotype associated to UT and FlnA expressions (white arrows).

Figure 15: UT trafficking pathway depending on Filamin A expression during chemotaxis migration.

In resting cells, Filamin A allows UT/*Gai* precoupling within plasma membrane and prevent UT/*Gaq* coupling. Filamin A anchors UT to actin cytoskeleton at plasma membrane and within the cytosol. Filamin A expression also stabilizes Focal Adhesion (FA) without stimulation $t=0$ (1). UII treatment triggers fast FlnA cleavage through *Gai*-cAMP-PKA pathway that may activates calpain activity. Concomitantly, FlnA allows UT internalization through a β -arrestin dependent manner which allow UT relocation within membrane ruffles in lamellipodium, generated polarized UT expression. UII treatment may also free cytosolic

anchored UT (2). 15 min of UII treatment, increases transiently vinculin positive FA through FlnA dependent manner, a mechanism associated with the production of PIP3 by $\beta\gamma$ activated PI3K. Other UII sources triggers UT/Gai containing pseudopode formation that may reset cell migration directionality, and reset migration processes (3).

Figure S1. Study of FlnA role within UII mediated FA dynamics and directional migration of melanoma cells. (A) Immunolabeling of FA P_{paxillin} positive points in M2 and A7 cells after time-course treatment of 10^{-8} M of UII. Scale bar = 50 μm . (B) P_{paxillin} FA adhesion dynamic quantification after 5, 10, 30 and 60 min of 10^{-8} M UII. Histograms show mean \pm s.e.m. One-way ANOVA, Bonferroni post-test, ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. (C) Microphotography of A7 and M2 cells on Boyden chamber membrane taken after 24 h of incubation with 10^{-11} M, 10^{-10} M, 10^{-9} M and 10^{-8} M UII to stimulate chemotactic migration. (D) Quantification of A7 and M2 migrated cells on Boyden chamber after 24 h of UII 10^{-11} M, 10^{-10} M, 10^{-9} M and 10^{-8} M incubation. Histograms show mean \pm s.e.m. Kruskal-wallis & Duns post-test: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ and Mann Whitney test \$\$ $P < 0.01$, \$\$\$ $P < 0.001$.

Figure S2. Subcellular distribution of UT_{eGFP} within M2 and A7 melanoma cells. A. FlnA and UT visualization by using Ab_FlnA_{ABD} (red) and recombinant UT_{eGFP} (green) in A7 and M2 cells after 12 h of treatment with UII (10^{-8} M). White lines represent ROI used in (B). Scale bar = 50 μm B. FlnA and UT expression profile after 12 h of treatment with UII (10^{-8} M). UT_{eGFP} is mainly expressed within plasma membrane of M2 cells whereas it is expressed at both plasma membrane and cytosol in A7 cells.

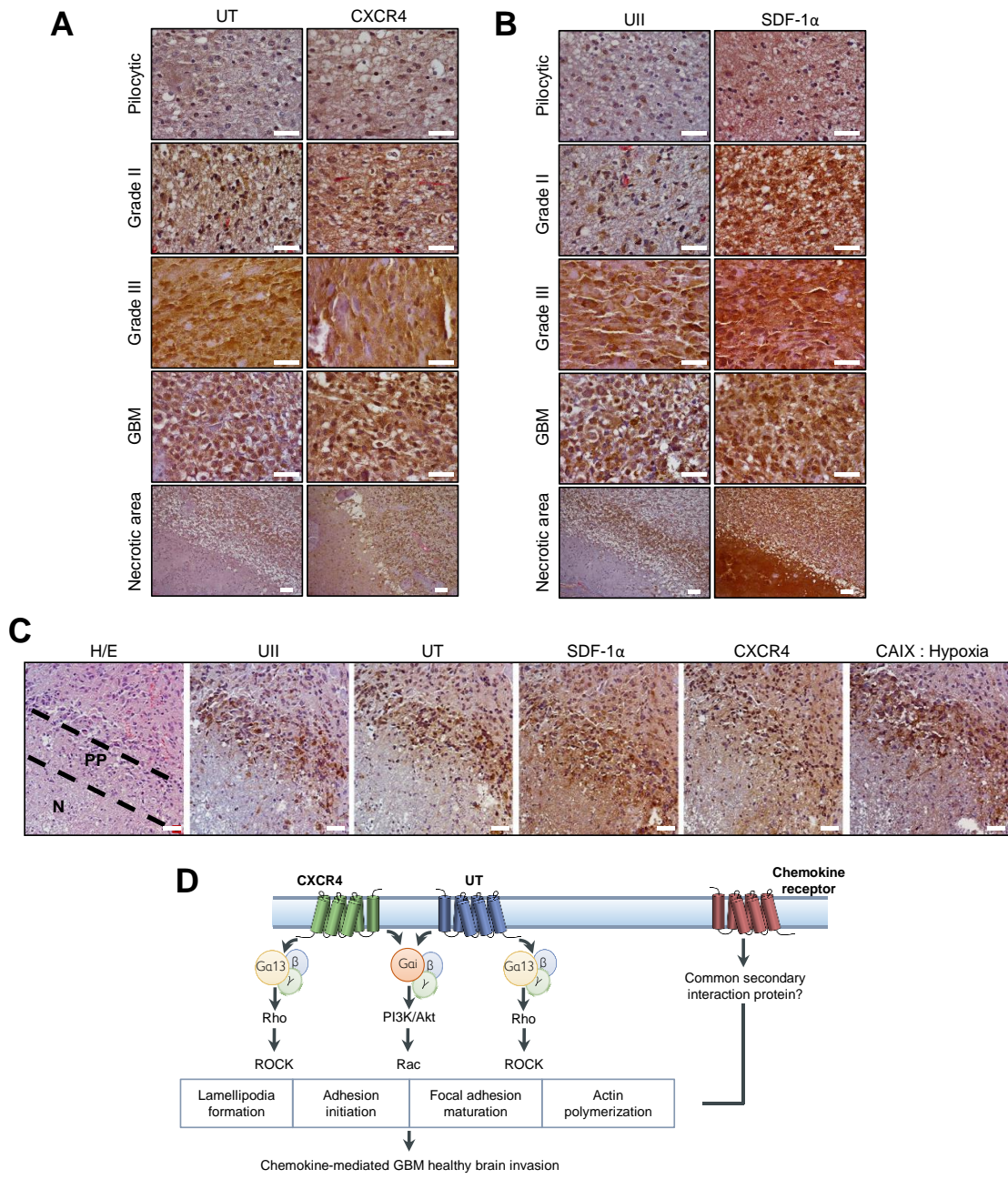


Figure 1, Mutel et al.

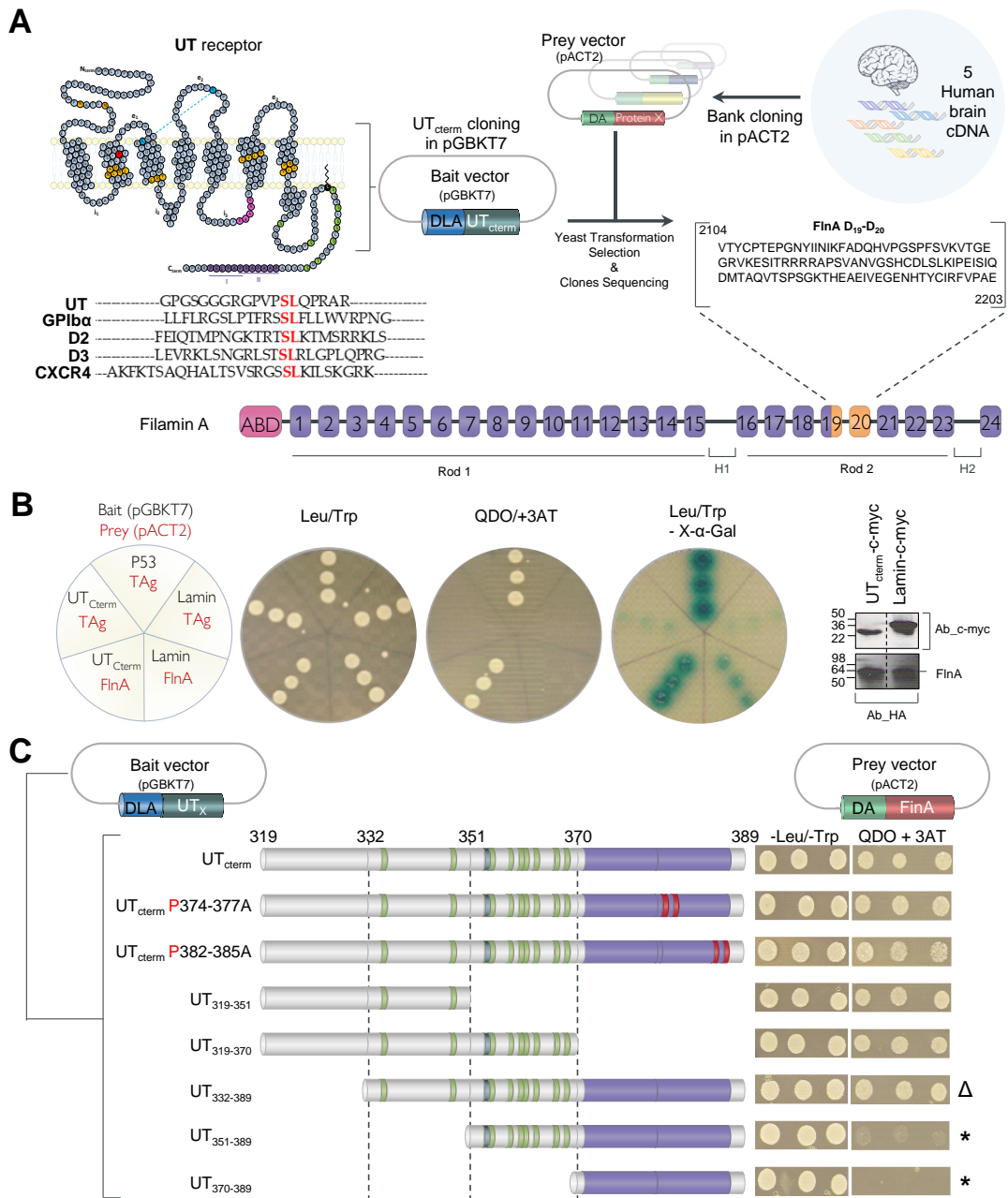


Figure 2, Mutel et al.

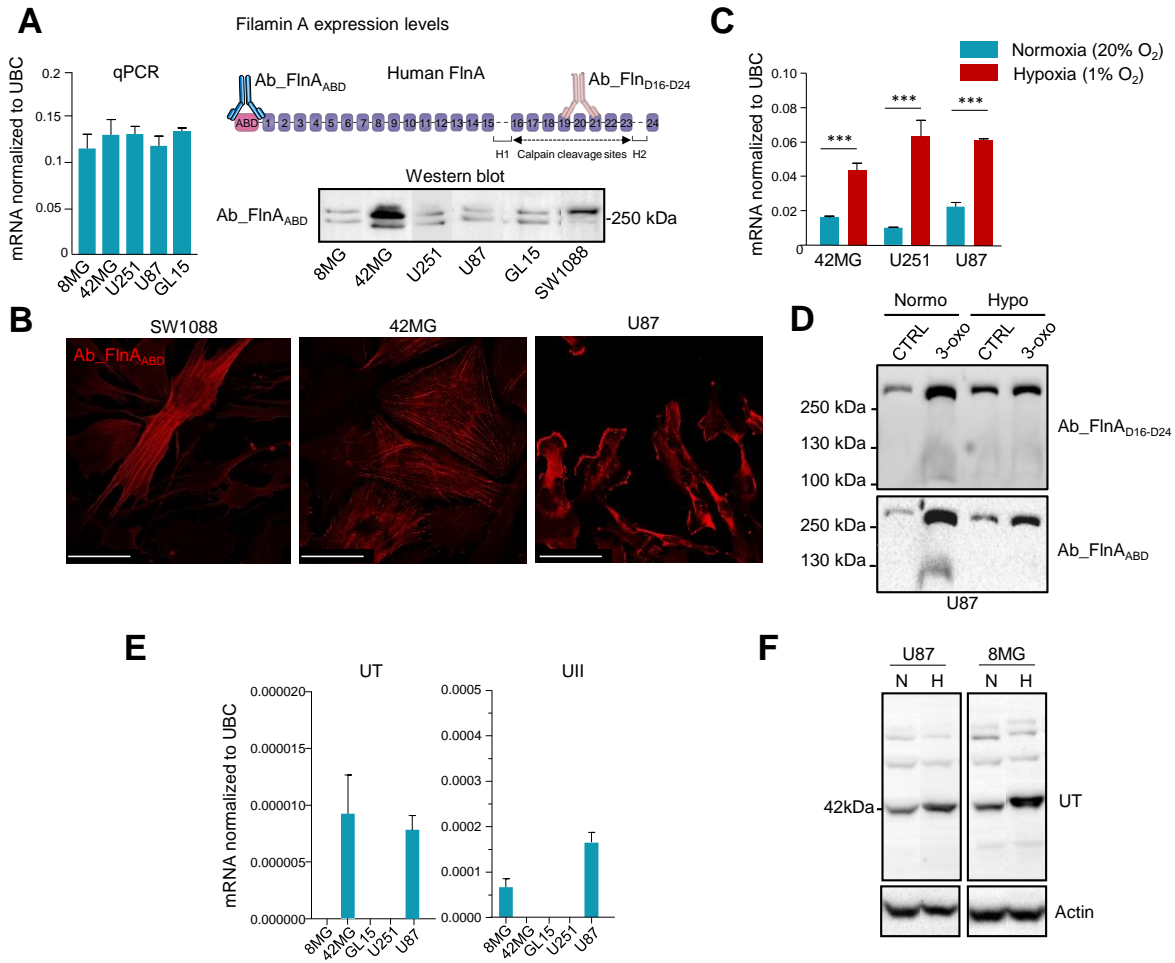


Figure 5, Mutel et al.

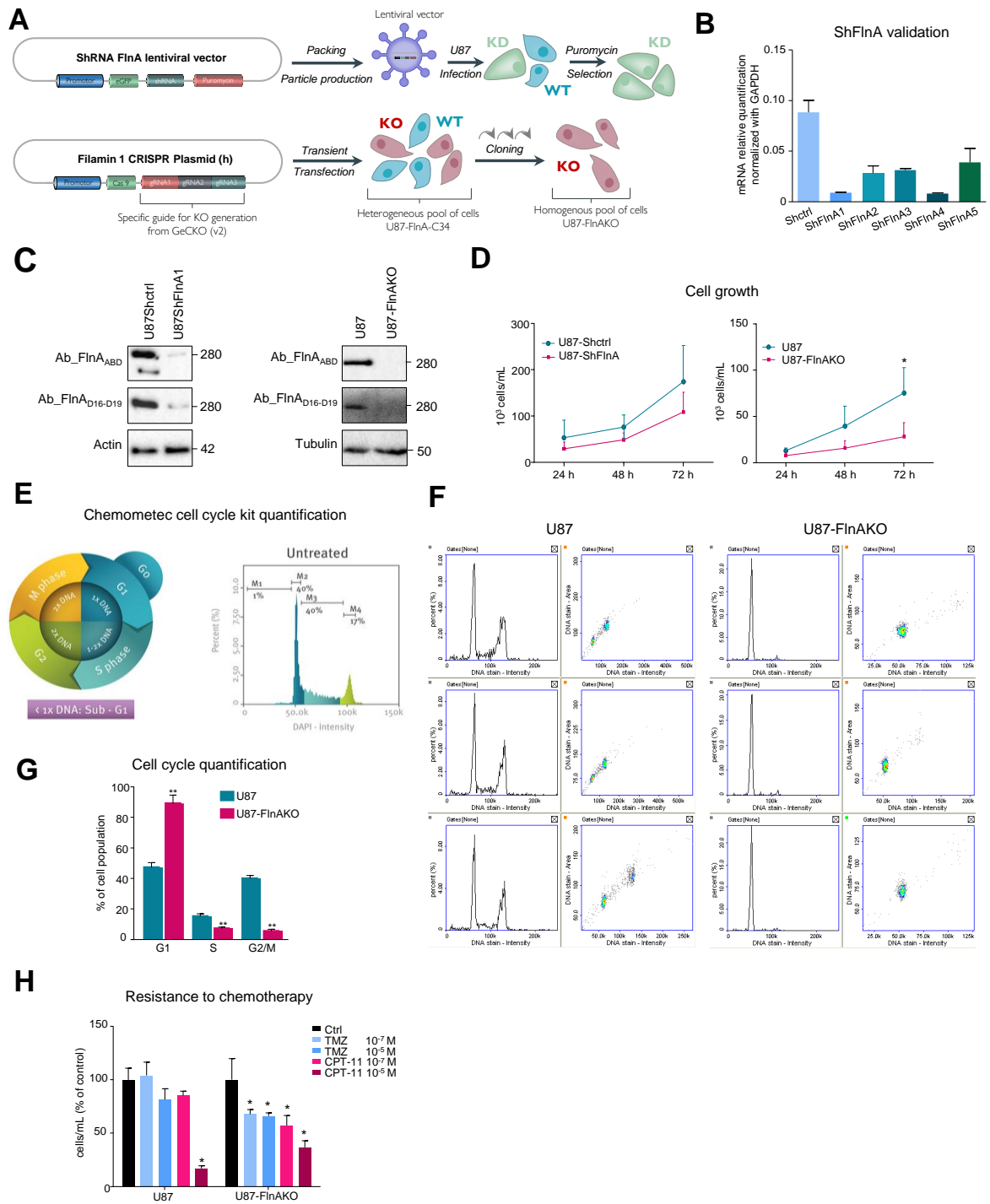


Figure 6, Mutel et al.

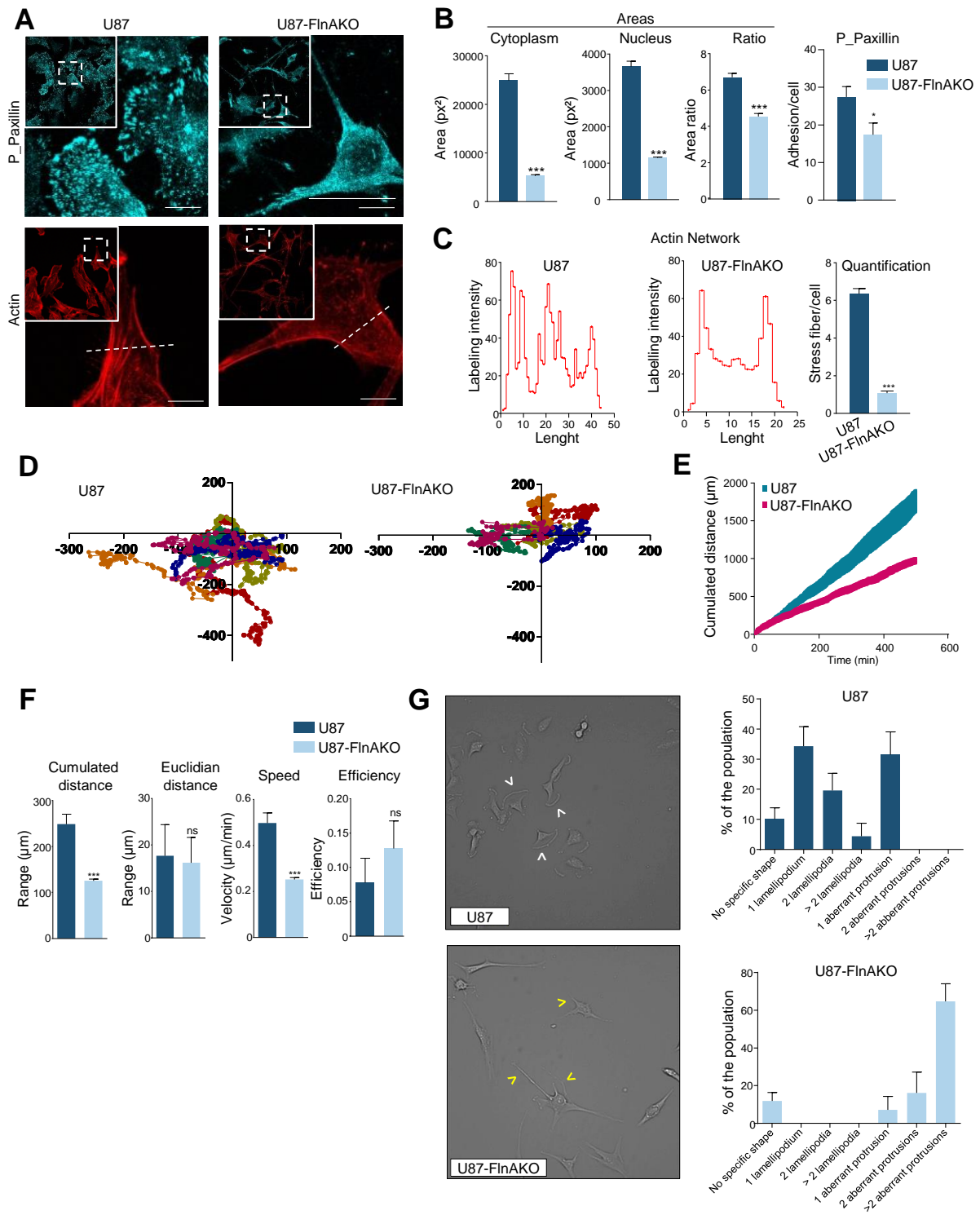


Figure 7, Mutel et al.

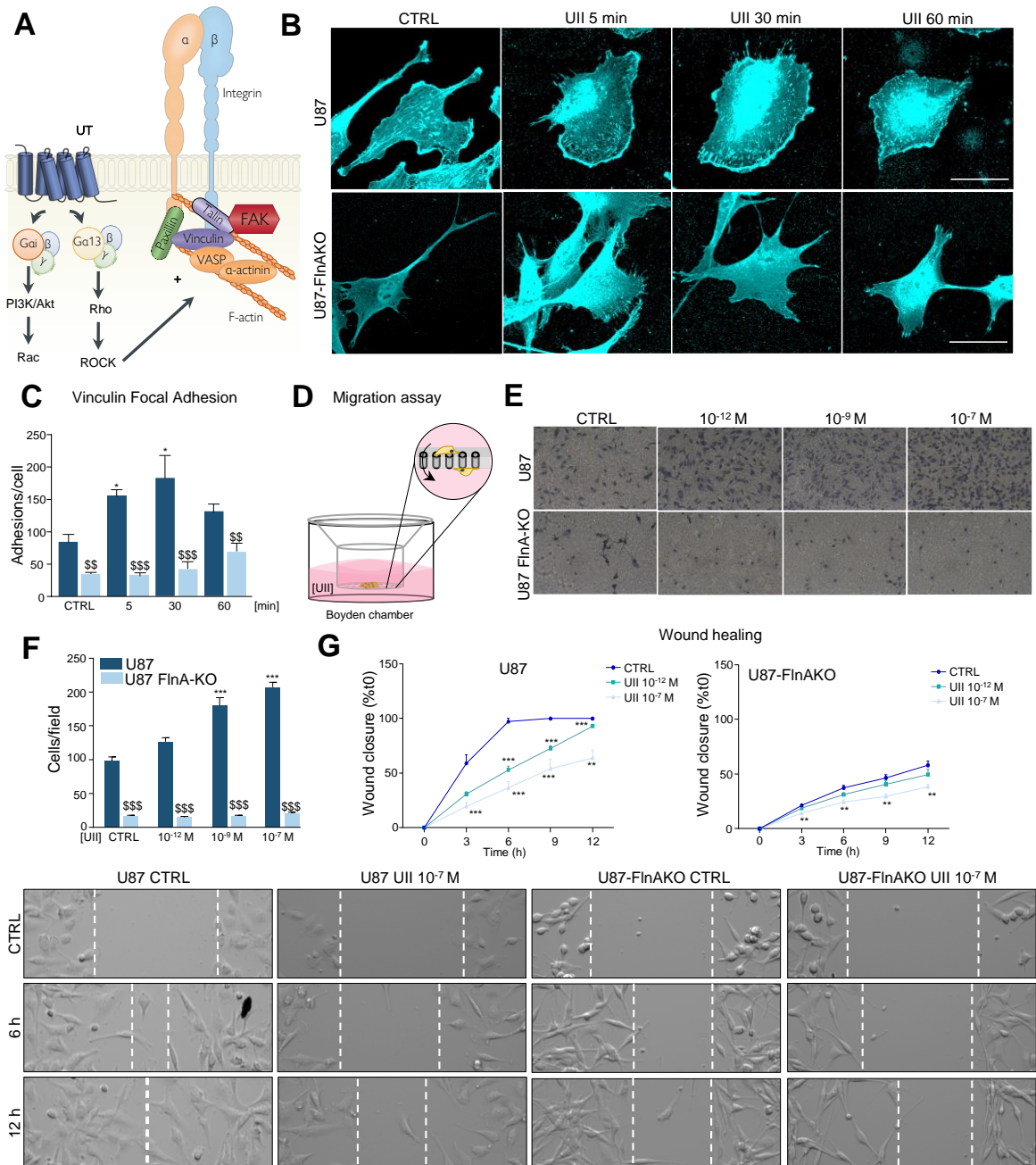


Figure 8, Mutel et al.

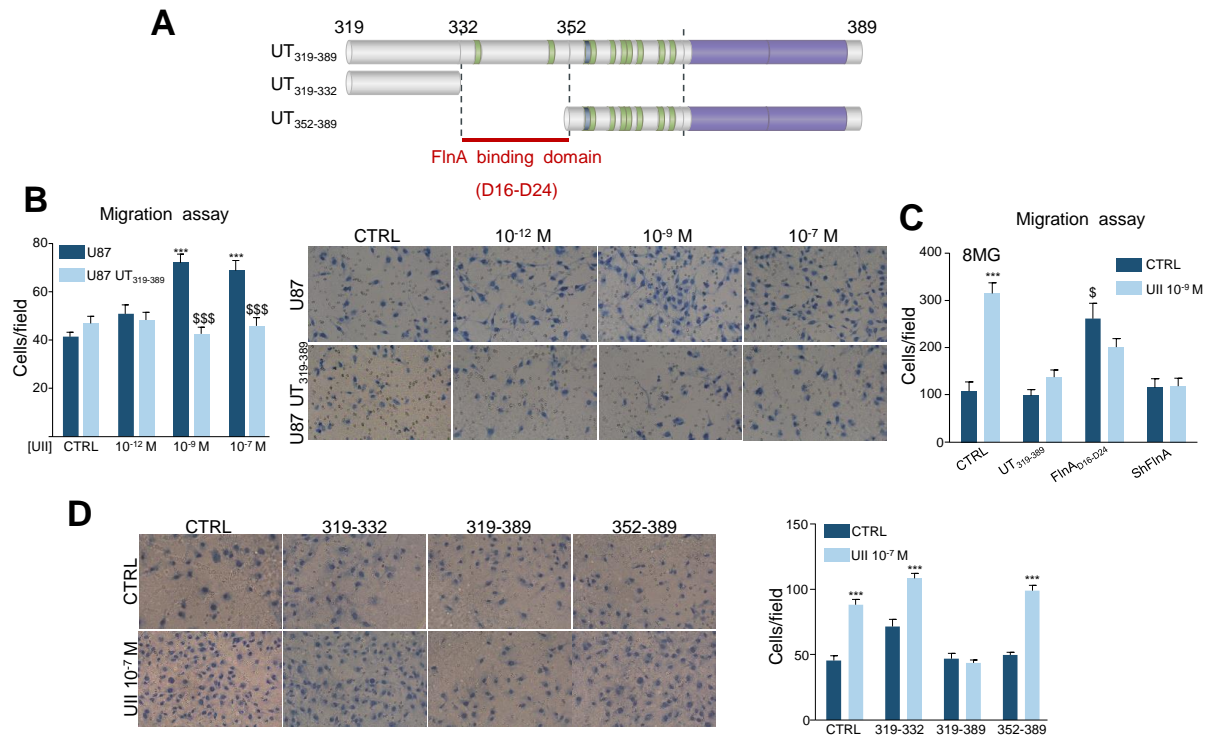


Figure 9, Mutel et al.

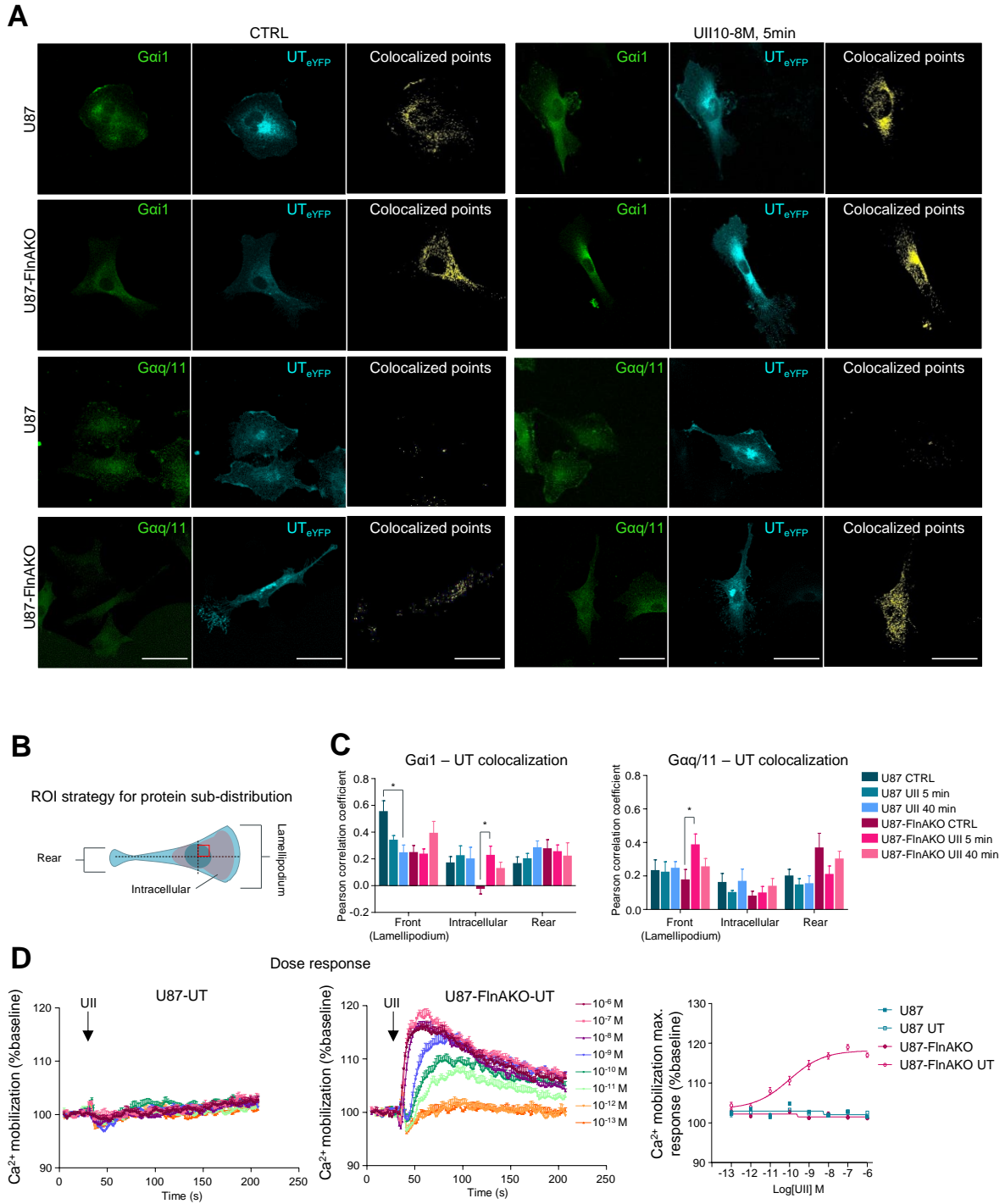


Figure 11, Mutel et al.

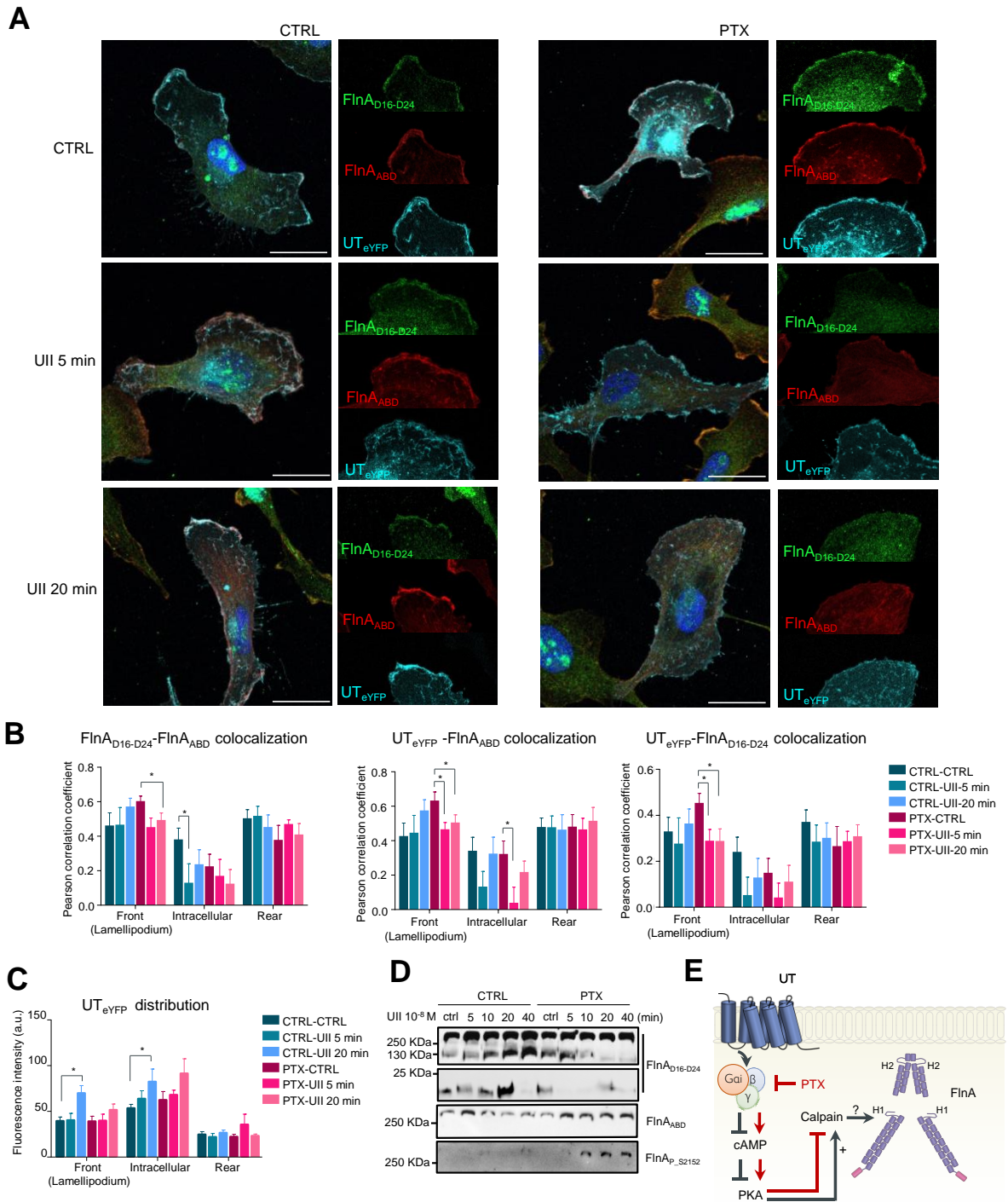


Figure 12, Mutel et al.

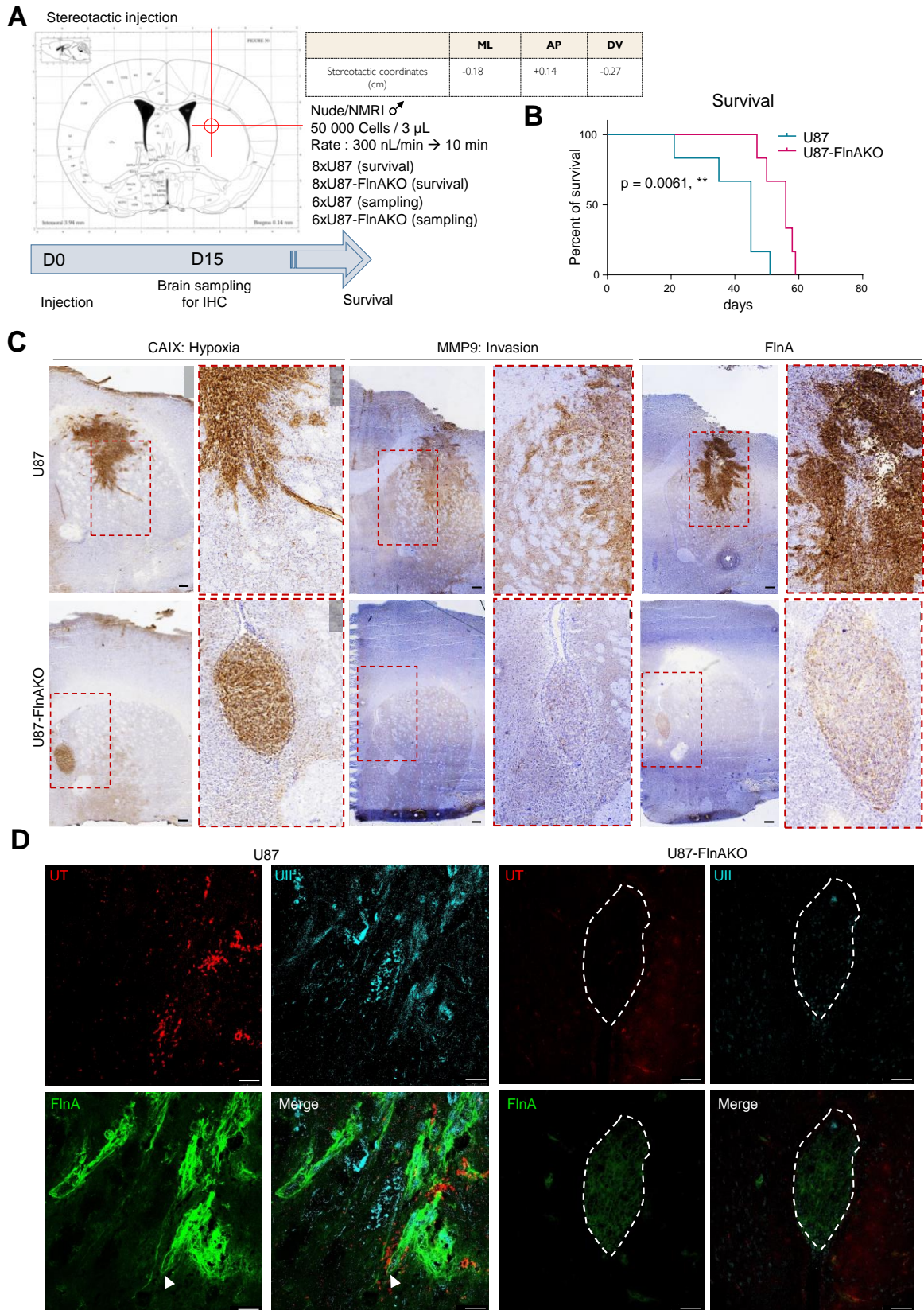


Figure 13, Mutel et al.

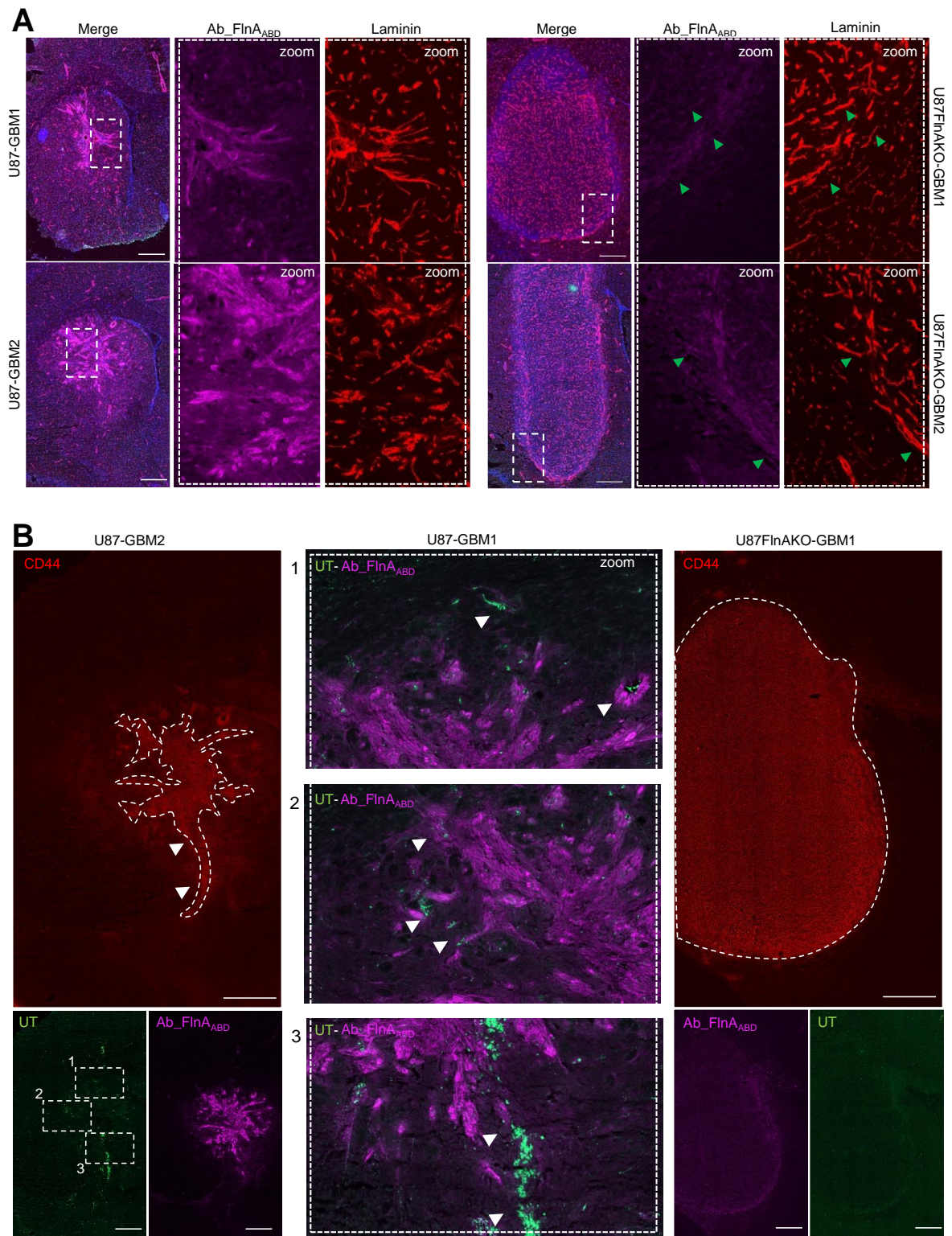


Figure 14, Mutel et al.

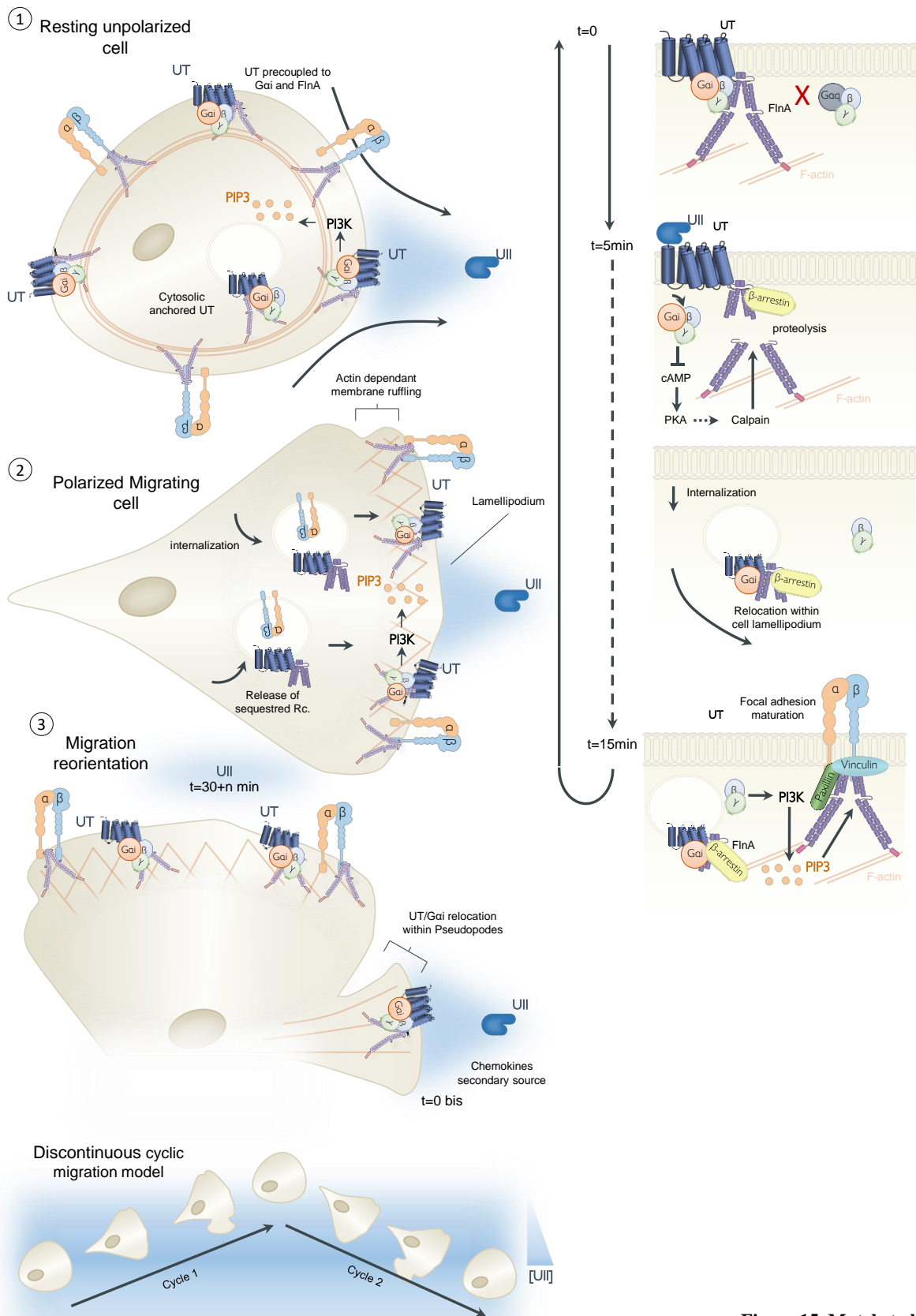


Figure 15, Mutel et al.

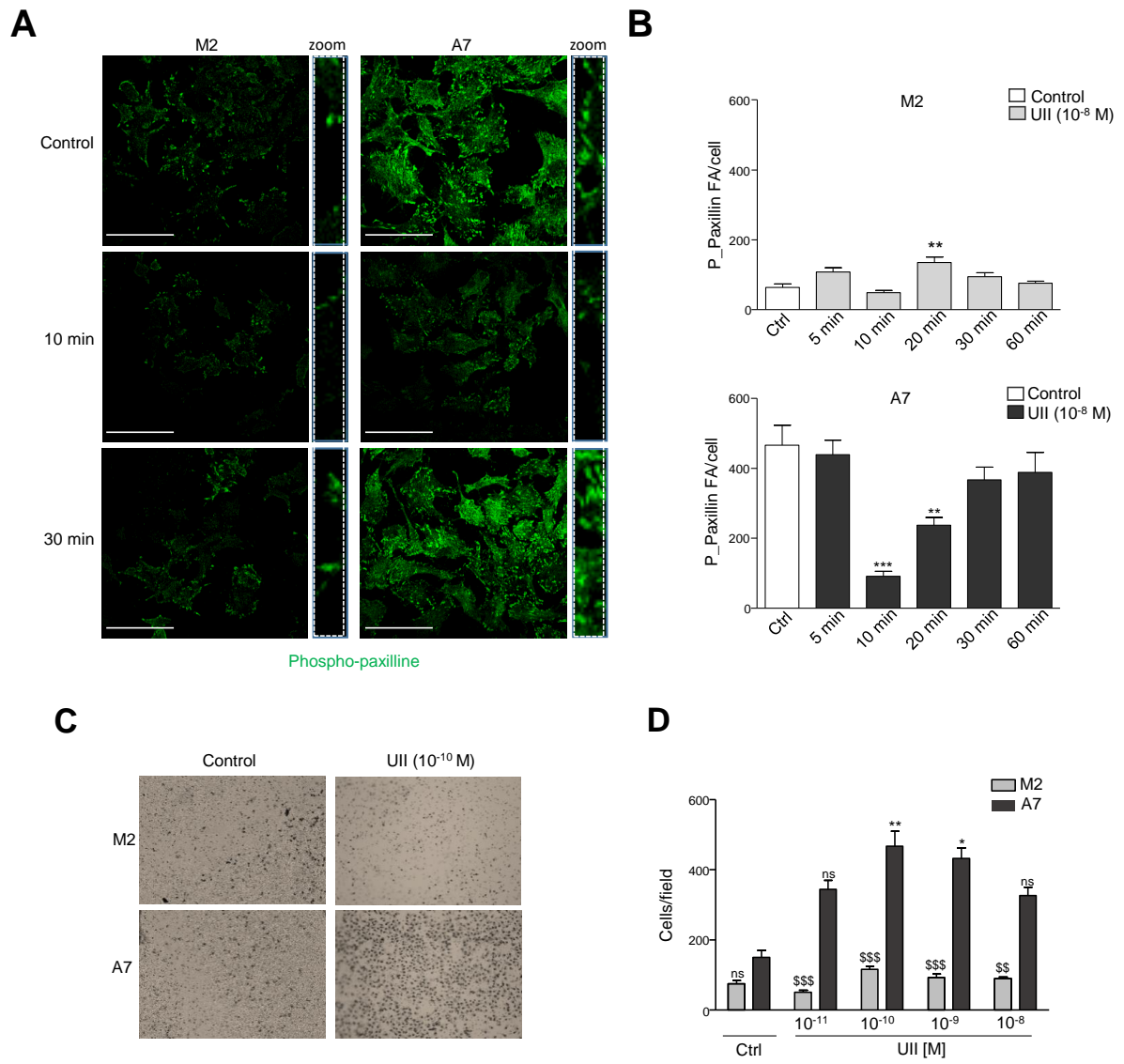


Figure S1, Mutel et al.

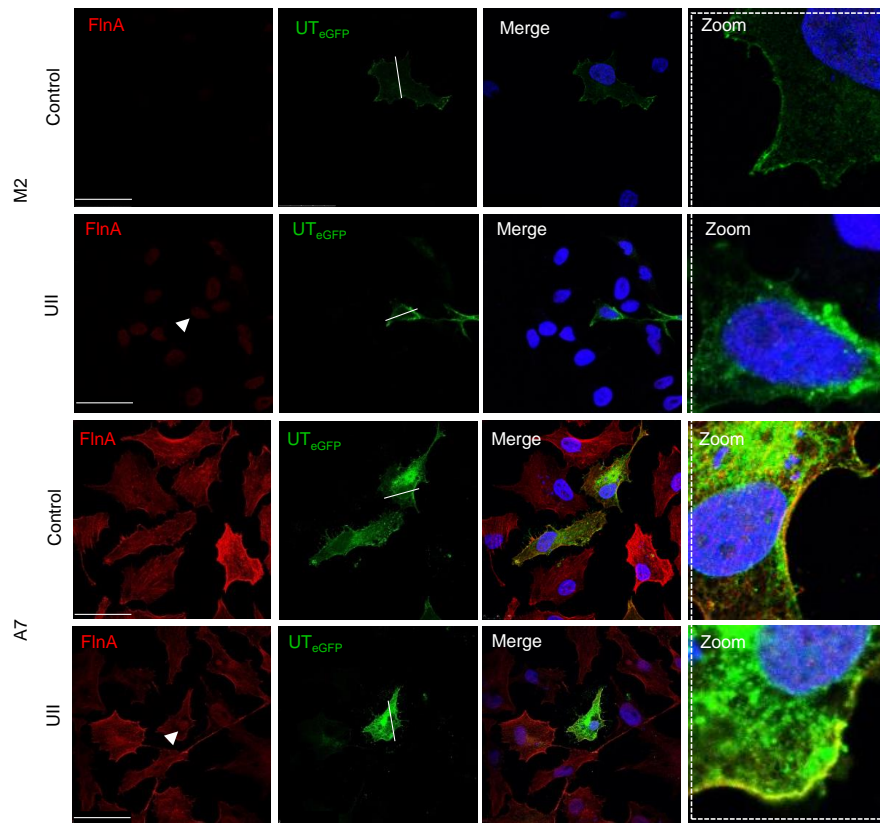
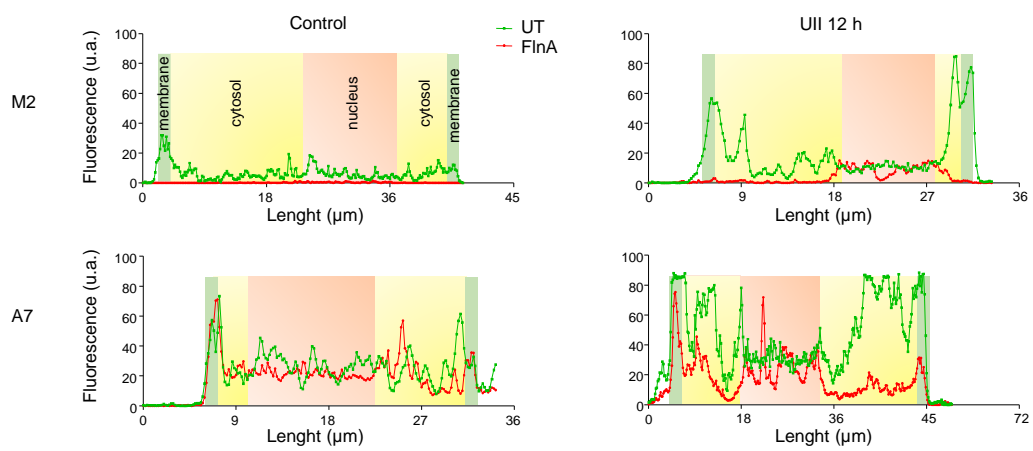
A**B**

Figure S2, Mutel et al.

Discussion

L'origine neurobiologique des gliomes ainsi que l'hétérogénéité tumorale associée au micro-environnement hypoxique sont autant de facteurs à l'origine de l'invasion du parenchyme sain cérébral par les cellules de gliome. La sécrétion de facteurs de croissance et de chimiokines est à l'origine de l'initiation de l'invasion des cellules de gliome, avec pour voies préférentielle, les tractus de substance blanche ainsi que les réseaux micro-vasculaires. Bien que soumises à de multiples contraintes mécaniques, les cellules tumorales migrent sur de relatives longues distances, cette invasivité étant à l'origine de foyers de récurrence en bordure de zones de résection après radio/chimiothérapie concomitante. Ainsi la compréhension des mécanismes qui sous-tendent les phénomènes associés à l'invasion cérébrale constitue un enjeu stratégique majeur permettant d'identifier de nouvelles approches pour le développement de thérapies ciblées visant à traiter les gliomes de haut grade ou GBM.

I | RCPG chimiotactiques et glioblastomes mésoenchymateux

Les GBM sont les tumeurs du SNC montrant des caractéristiques invasives importantes, responsables d'une récurrence quasi-systématique en bordure de cavité de résection (Giese *et al.*, 2016). Les RCPGs chimiotactiques représentés par le CXCR4 dont le ligand est SDF-1 α , mais incluant aussi les CCR5 (Zhao *et al.*, 2015), CCR2A (Liang *et al.*, 2008), CCR3 (Kouno *et al.*, 2004), CX3CR1 (Sciumè *et al.*, 2010), CXCR1 (Desbaillets *et al.*, 1997) ou CXCR2 (Desbaillets *et al.*, 1997), ont été décrits comme ayant un rôle central dans la stimulation de l'invasion des GBM et comme étant associés à un pronostic plus sombre. De plus, le récepteur UT de l'UII, un récepteur chimiotactique atypique qui partage des homologies de structure avec les RCPGs de type CHEM (pour *chemokine*) (Castel *et al.*, 2017), est capable de percevoir et de relayer l'effet d'un gradient d'UII *via* l'activation des voies G α i/PI3K et G α 13/Rho/ROCK pour stimuler la migration directionnelle (Lecointre *et al.*, 2015 ; Coly *et al.*, 2016). Dans la présente étude, nous avons montré que les ligands UII et SDF-1 α ainsi que leurs récepteurs, sont systématiquement coexprimés dans les biopsies de gliome de patients et que leurs niveaux d'expression augmentent dans les astrocytomes de grade III et les GBM. De façon intéressante, les systèmes UT/UII et CXCR4/SDF-1 α colocalisent plus spécifiquement dans les régions hypoxiques péri-nécrotiques, montrant une forte colocalisation avec CAIX, confirmant ainsi le lien direct entre hypoxie, expression de récepteurs de chimiokines et malignité associée à

l'invasion. En 2003, Takahashi et collaborateurs ont en effet montré pour la première fois que le récepteur UT était exprimé dans de nombreux types de cellules tumorales, notamment dans des lignées issues de cancer colorectal ainsi que de neuroblastomes et de GBM (lignée T98). Plus récemment, notre équipe a pu démontrer que ce récepteur est bien exprimé dans des lignées d'astrocytome de grade III et de GBM (lignée U87 notamment), et qu'il est plus particulièrement détecté dans les régions péri-nécrotiques sur des prélèvements de GBM de patients (Takahashi *et al.*, 2003 ; Lecointre *et al.*, 2015). L'expression de l'UT a également pu être caractérisée dans les régions hypoxiques de tumeurs colorectales et hépatiques (Federico *et al.*, 2014 ; Yu *et al.*, 2015 ; Wei *et al.*, 2017). De façon intéressante, le nombre de publications relatant un effet chimioattractant de l'UII sur différents types cellulaires a drastiquement augmenté, ainsi l'UII stimule la migration de progéniteurs endothéliaux murins (Zhang *et al.*, 2011 ; Yi *et al.*, 2012), monocytes humains (Segain *et al.*, 2007), mais aussi de cellules cancéreuses prostatiques et colorectales *via* des mécanismes auto/paracrines (Grieco *et al.*, 2011 ; Federico *et al.*, 2014). Les mêmes propriétés ont également pu être décrites par notre équipe sur des lignées d'astrocytomes et de GBM U87 (Lecointre *et al.*, 2015). Ces observations sont à associer aux données disponibles concernant le récepteur chimiotactique « professionnel » CXCR4, montrant qu'il est particulièrement exprimé dans les régions pseudopalisadiques hypoxiques des GBM (Rempel *et al.*, 2000 ; Ehtesham *et al.* 2006 ; Zagzag *et al.*, 2006 ; Hong *et al.*, 2006). Ces conditions hypoxiques régnant en périphérie de zones nécrotiques peuvent stimuler l'expression de CXCR4, puisqu'*in vitro*, il a été montré que la stabilisation de HIF-1 α en condition hypoxique dans les lignées de GBM LN308 et U87 peut stimuler l'expression de CXCR4. Ce mécanisme est associé à l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux, provoqué par les conditions hypoxiques elles-mêmes, ou par un switch moléculaire à l'origine de la sécrétion de TGF- β 1 pouvant initier la TM, et par extension potentialiser l'expression de CXCR4 et de SDF-1 α dans la tumeur (Zagzag *et al.*, 2006 ; Pham *et al.*, 2015 ; Miyazaki *et al.*, 2017). Réciproquement, il a été montré que le SDF-1 α semble capable de contrôler la TM des cellules U87, en induisant l'expression de TGF- β 1, Smad2, NF- κ B, Snail et Twist1 (Zhu *et al.*, 2013). Ainsi l'expression du couple ligand/récepteur SDF-1 α /CXCR4 est capable d'initier et de maintenir l'acquisition du phénotype mésenchymateux *via* une boucle de stimulation autocrine/paracrine. De la même manière, il a été montré que l'UII participe à l'EMT de cellules épithéliales rénales et cardiaques murines (Pang *et al.*, 2016 ; Zhang *et al.*, 2019). Ces deux études ont plus particulièrement montré que les effets de l'UII sur l'EMT sont inhibés par l'application d'un inhibiteur du stress du réticulum endoplasmique, l'acide 4-phénylbutyrique,

suggérant des effets de l'UII sur l'activité du réticulum endoplasmique, et associés à l'EMT. Ainsi la surexpression des éléments du système urotensinergique dans les gliomes de haut grade suggère que, comme le système SDF-1 α /CXCR4, le système UII/UT est capable de promouvoir la TM dans les GBM *via* une boucle autocrine/paracrine. Ces observations sur la colocalisation systématique ainsi que la convergence de fonctions illustrent la redondance fonctionnelle que possèdent ces systèmes. Dès lors, il convient de questionner la pertinence et l'efficacité potentielle du ciblage de ces systèmes de manière indépendante, avec la possibilité d'un échappement thérapeutique reposant sur l'exploitation des propriétés du système chimiokine non ciblé par la thérapie. A ce jour, trois essais cliniques portent actuellement sur l'activité de CXCR4, et son inhibition à l'aide de l'inhibiteur AMD3100 (plerixafor), un antagoniste du site de liaison du SDF-1 α , utilisé seul ou en combinaison avec la lomustine (essais cliniques : NCI2012-00149, NCI2013-02012, NCT02765165). Bien que pionnières dans l'inhibition des systèmes chimiokines pour le traitement des GBM, l'efficacité future de ces stratégies sur la survie sans progression et la survie globale des patients reste actuellement à démontrer. Dans ce contexte, il semble intéressant d'isoler des acteurs moléculaires communs, « nœuds » ou « routeurs », intervenant dans la régulation de l'activité de ces récepteurs chimiokines, et contrôlant l'invasivité des GBM, afin de pouvoir cibler la voie essentielle de la migration chimiotactique directionnelle.

Il est aujourd'hui admis que les RCPGs interagissent avec diverses protéines G de la famille des protéines *Gai/o*, *Gas*, *Gaq/11* et *Ga12/13* *via* leur boucle i2 cytosolique portant un motif conservé E/DRY, permettant ainsi au récepteur de relayer leurs effets ainsi que leurs trafic (Ritter et Hall 2009). Les RCPGs interagissent également avec des protéines dites « GIPs » (*GPCR-interacting proteins*) comme les GRK (*GPCR receptor kinases*) ou β -arrestines qui contrôlent entre-autres les phénomènes d'internalisation clathrine-dépendante, des protéines solubles interagissant avec des séquences spécifiques, les domaines intracellulaires des RCPGs (C-terminal ou boucle intracellulaire i3). En effet l'interaction de l'UT avec les β -arrestines est responsable de son internalisation (Proulx *et al.*, 2005) ainsi que de la transactivation l'EGFR dans des cellules HEK exprimant le récepteur recombinant (Esposito *et al.*, 2011). Dans notre étude, nous montrons pour la première fois par double-hybride, que le récepteur UT interagit directement physiquement avec la FlnA. Nous démontrons plus précisément que la séquence C-terminale du récepteur UT au niveau des acides aminés 332-351, interagit avec la séquence peptidique contenant les acides aminés 2104-2203 de la FlnA, qui correspond à la fin du domaine répété 19 et le début du domaine 20. Il faut préciser que la FlnA est composée de

domaines répétés formés de l'agencement anti-parallèle de 7 feuillets β (A, B, C, D, E, F et G). Le segment *rod 2* qui comporte les domaines répétés 19 et 20, est composé de la répétition d'un triplet de tandem représenté par les paires 16-17, 18-19 et 20-21. A l'exception du tandem 16-17, les paires sont capables de prendre une conformation auto-inhibée dans laquelle le feuillet β A du domaine précédant se lie à la face de liaison C/D du domaine suivant, prévenant ainsi toute liaison de ce domaine de la FlnA à des partenaires. La face C/D est en effet caractérisée comme étant l'interface de liaison d'un domaine répété de FlnA. Il a de plus été montré que la déformation cellulaire résultant de la polymérisation des fibres de stress d'actine peut entraîner l'ouverture de la conformation auto-inhibée, permettant une liaison sélective de la FlnA dépendante de l'état de tension cellulaire, avec un pool spécifique de protéines proches au niveau sub-cellulaire (Lad *et al.*, 2008 ; Pentikäinen *et al.*, 2011). Notre étude nous a permis d'isoler une séquence d'interaction de l'UT à la FlnA correspondant au feuillet E, F et G du domaine 19 et A, B, C et D du domaine 20. Or, il a été proposé que le domaine 20 ne pouvait pas prendre de conformation auto-inhibée, dans la mesure où il joue le rôle d'inhibiteur du domaine 21. Ainsi nous émettons l'hypothèse que la liaison d'une protéine telle que l'UT dans le domaine 20 de la FlnA, n'est pas régulée par le degré d'étirement et de contrainte appliqué au cytosquelette d'actine.

Un grand nombre de RCPGs ont déjà pu être caractérisés comme partenaires du segment *rod 2* de la FlnA. De façon intéressante, les plus étudiés d'entre eux, à savoir D2R/D3R, SST2 et CCR2B, interagissent avec le domaine répété 19. Un grand nombre d'autres RCPGs interagissent avec la FlnA, cependant la séquence précise de cette interaction n'est pas encore complètement élucidée à ce jour mais aucun d'entre eux ne lie le domaine 20. Une étude intéressante (Ithychanda *et al.*, 2009) a rapporté que les domaines répétés de la FlnA peuvent être ordonnés entre quatre classes (A, B, C et D) sur la base d'analogies de séquences. Ainsi le domaine *rod 2* est composé d'une alternance de domaines de la classe A et B, issus de la duplication ancestrale du tandem à l'origine du doublet d'auto-inhibition. De façon intéressante, le récepteur CXCR4 se lie *via* sa boucle i3 au domaine 10 appartenant à la classe D présente dans le segment *rod 1* de la FlnA, alors que l'UT interagit dans le domaine *rod 2* avec un domaine de classe B. Ces résultats suggèrent que l'UT et le CXCR4 sont régulés différemment par la FlnA dans la mesure où le complexe UT-FlnA peut être libéré de son ancrage à l'actine par un clivage calpaïne-dépendant au niveau du site H1, tandis que le complexe CXCR4-FlnA doit pouvoir rester stablement ancré au cytosquelette d'actine. L'UT et CXCR4 partagent

cependant la propriété de se lier à un domaine insensible aux changements de conformation liées aux variations d'étirement du cytosquelette.

II | Ré-expression de la Filamine A dans les gliomes de haut-grade : un facteur pronostic d'agressivité

L'expression et l'implication de la FlnA dans la tumorigenèse ont déjà largement été décrites dans la littérature. Bien que son expression ne soit pas systématiquement augmentée, les variations d'expression de FlnA sont cependant systématiquement associées à un mauvais pronostic et sont corrélées à l'agressivité tumorale. En effet la FlnA est surexprimée dans les cancers mammaires (Jiang *et al.*, 2013 ; Tian *et al.*, 2013), dans les adénocarcinomes pulmonaires (Shieh *et al.*, 1999 ; Uramoto *et al.*, 2010), dans les cancers pancréatiques (Zhou *et al.*, 2011 ; Surcel *et al.*, 2019) et dans les mélanomes (Zhang *et al.*, 2014), montrant les niveaux les plus élevés systématiquement associés à un mauvais pronostic en terme de survie, caractérisé par un nombre plus élevé de métastases et une récurrence plus précoce. La diminution du niveau d'expression de FlnA a pu être constatée dans le cancer de la prostate (Sun *et al.*, 2014), dans des adénocarcinomes colorectaux (Tian *et al.*, 2015) ainsi que dans les carcinomes gastriques, rénaux et nasopharyngés (Sun *et al.*, 2014-1 ; Sun *et al.*, 2014-2 ; Sun *et al.*, 2014-3). Dans ces cas, la diminution d'expression de FlnA est très souvent associée à un mauvais pronostic. Ensemble, les effets de variations d'expression de FlnA dans les tumeurs suggèrent que cette protéine joue un rôle central dans la régulation des mécanismes associés à la tumorigenèse. Elle semble constituer un bon marqueur diagnostique et pronostic, potentiellement utile dans le cadre de la prise en charge de tumeurs. Dans cette étude nous montrons que les niveaux d'expression de FlnA augmentent avec le grade des gliomes et est le plus élevé dans la forme la plus agressive, le GBM IDHwt. Il a déjà été proposé qu'une « forme » de FlnA peut être sécrétée et que ses niveaux plasmatiques étaient également corrélés aux grades des tumeurs chez les patients atteints de gliome (Alper *et al.*, 2009). Ainsi l'utilisation de la FlnA en tant que marqueur diagnostique/pronostic rapide peut être aussi une stratégie pour le suivi non invasif de la réponse thérapeutique au cours de la prise en charge des patients. Les gliomes de haut-grade se caractérisent par des zones péri-tumorales fortement invasives et de régions intra-tumorales fortement hypoxiques associées à une augmentation de la proportion des cellules présentant une signature moléculaire et phénotypique mésenchymateuse (Verhaak *et al.*, 2010 ; Carro *et al.*, 2010 ; Louis *et al.*, 2016). L'acquisition du phénotype mésenchymateux s'opère au détriment de l'expression de gènes proneuraux, avec une augmentation d'expression des gènes caractéristiques de la signature mésenchymateuse, tels que ceux codant cinq facteurs de

transcription clés : C/EBP β (*CCAAT Enhancer Binding Protein β*), STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*), bHLH-B2 (*Basic helix-loop-helix transcription factors*), FOLS2 (*FOS Like 2*) et RUNX1 (*RUNX Family Transcription Factor 1*). De façon intéressante, deux de ces facteurs de transcription sont capables de se lier à la région promotrice de la FlnA, pouvant ainsi potentiellement stimuler l'expression de la FlnA dans les GBM mésenchymateux (Carro *et al.*, 2010). En accord avec ces observations, il a été décrit que l'induction de l'EMT par le TGF- β *in vitro* sur des cellules d'adénocarcinomes pulmonaires A549 induit l'expression conjointe de FlnA, d'intégrine β 1, de tropomyosine et de moésine (Keshamouni *et al.*, 2006). Dans cette étude, nous montrons que l'expression de la FlnA est fortement corrélée à celle de l'intégrine β 1 et de la moésine avec d'autres gènes intervenant dans des processus cellulaires associés aux adhésions focales (ACTN1, ACTN4, FLNA, ITGB1, LAMB2, TNC, VCL), à la régulation du cytosquelette d'actine (ACTN1, ACTN4, IQGAP1, ITGB1, MSN, VCL), aux jonctions adhérentes (ACTN1, ACTN4, IQGAP1, VCL), à la migration amiboïde (ACTN1, ACTN4, LAMB2, VCL) ainsi qu'aux jonctions serrées (ACTN1, ACTN4, ITGB1, MSN). Par conséquent l'augmentation *de novo* de l'expression de FlnA dans les GBM est fortement corrélée à la signature mésenchymateuse et associée aux programmes de la migration. De plus, l'analyse ontologique des gènes corrélés à la FlnA fait ressortir un axe interconnectant la laminine β 2 (LAMB2)/Tenascine C (TNC), l'intégrine β 1 (ITGB1), la FlnA, ainsi que la vinculine (VCL), la moésine (MSN)/caldesmone 1 et la kinase LATS2 (*Large Tumor Suppressor kinase 2*). Il est intéressant de relever que la protéine LATS2 présente dans ce réseau, est un inhibiteur de la voie oncogénique Hippo/Yap-Taz. Il a été montré que la surexpression de LATS2 dans des lignées de GBM U-372MG inhibe la prolifération et l'invasion de ces cellules (Guo *et al.*, 2019). L'aspect fonctionnel liant LATS2 à la caldesmone et la moésine reste cependant non élucidé à ce jour. Les observations relatives aux corrélations d'expression associées à un mauvais pronostic des patients suggèrent fortement que l'effet onco-suppresseur de LATS2 est antagonisé par la FlnA dans les GBM *via* une voie caldesmone/moésine-dépendante.

L'analyse de données de RNA-seq réalisée par le TCGA à été réalisé à partir d'échantillons histologiques hétérogènes composés d'un mélange de cellules gliomales et de cellules non-tumorales telles que des cellules endothéliales, des astrocytes réactifs, ainsi que des péricytes et des macrophages, suggérant qu'une fraction de la FlnA détectée par RNA-seq est issue de types cellulaires non-tumoraux. Cette analyse globale a pu être complétée par l'analyse de la base de données IVYgap, montrant que la FlnA est fortement exprimée dans les composantes

vasculaires natives présentes dans la tumeur, ainsi que dans les régions de prolifération microvasculaire caractéristiques des GBM. En accord avec ces résultats nous avons montré que la FlnA était fortement exprimée dans les vaisseaux sanguins cérébraux de biopsies de cerveaux sains ainsi que dans les vaisseaux sanguins tumoraux. La FlnA est en effet impliquée dans la stabilisation des jonctions serrées chez l'adulte ainsi que dans l'angiogenèse lors du développement embryonnaire (Feng *et al.*, 2006). De plus l'analyse ontologique des gènes dont l'expression est corrélée à celle de la FlnA a fait ressortir la présence de réseaux fonctionnels associés aux jonctions serrées et adhérentes.

Nous avons également montré que la FlnA est fortement exprimée dans les régions hypoxiques péri-nécrotiques de prélèvements de GBM, des observations corroborées par l'analyse de l'IVYgap montrant des niveaux importants de FlnA dans les régions pseudopalisadiques et nécrotiques. L'homéostasie de l'O₂ régule étroitement la stabilité de la FlnA dans des neurones adultes en induisant sa dégradation constitutive en condition normoxique (Segura *et al.*, 2016). Comme pour HIF-1 α , les PHD1/2 utilisent l' α -cétoglutarate en normoxie pour hydroxyler la FlnA sur ses prolines P2309, P2316 et potentiellement P2312. Cette hydroxylation déclenche l'adressage de la FlnA au protéasome *via* une hydroxylation VHL dépendante (Epstein *et al.*, 2001). Les cellules de GBM présentent dans les régions hypoxiques subissent un switch métabolique connu sous le nom d'effet Warburg réduisant l'utilisation du cycle de Krebs au détriment de la glycolyse, associé de fait à l'augmentation de la production de lactate (Koppenol *et al.*, 2011). Ce switch a pour conséquence de diminuer la production d' α -cétoglutarate réduisant *in fine* l'hydroxylation et la dégradation de la FlnA, et de HIF-1 α , par les PHD. Dans notre étude nous avons utilisé un analogue perméable de l' α -cétoglutarate, le 3-oxoglutarate (3-oxo), pour induire la dégradation de FlnA en conditions hypoxique (voire normoxique). Étonnamment, le traitement d'1h de 3-oxo (1 mM) s'est avéré n'avoir aucun effet sur la dégradation de la FlnA après 12 h d'incubation des cellules en condition hypoxique, bien qu'une dégradation ait pu être constatée en normoxie. L'absence d'effet du traitement par le 3-oxo n'est à ce jour pas compris, mais pourrait s'expliquer par un accès limité aux sites d'hydroxylation par les PHD en condition hypoxique. L'augmentation de l'expression de la FlnA semble être une particularité des GBM puisqu'il a en effet été montré que les niveaux d'expression d'ARNm de FlnA ne variaient pas dans des cellules U2OS, HeLa et HEK293T cultivées en condition hypoxique (Zheng *et al.*, 2014). L'hypoxie permet la stabilisation du facteur HIF-1 α , qui peut quant à lui fixer spécifiquement des régions promotrices HRE. La présence de ce type de région promotrice sur le promoteur de la FlnA

permettrait l'augmentation des niveaux d'ARN codant la FlnA en condition hypoxique. Cette spécificité observée dans la lignée U87, pourrait s'expliquer par le statut de méthylation des promoteurs dans certains cancers et aussi les GBM, ce qui est notamment le cas du promoteur de la MGMT dans les GBM (Stupp *et al.*, 2005). Ainsi nous supposons que le statut mésenchymateux induit de profondes modifications épigénétiques pouvant être à l'origine de l'exposition de la séquence HRE potentiellement présente dans la région promotrice de la FlnA. Des études montrent en effet que la TM dans les gliomes est associée à un remaniement à l'échelle génomique du statut de méthylation et d'acétylation des histones H3 qui potentialise localement l'expression d'ARNm spécifiques (McDonald *et al.*, 2011 ; Peixoto *et al.*, 2019).

III | Fonction de la Filamine A dans l'agressivité des GBM

Suite aux observations données et informations obtenues à partir des analyses des bases de données et des résultats d'immunomarquage provenant de l'échantillonnage des gliomes de patients (CHU de Rouen, service d'anatomocytopathologie, Pr A. Laquerrière), nous avons étudié le rôle fondamental de la FlnA dans les processus oncogéniques associés à la prolifération et la résistance aux traitements des cellules de GBM 8MG, 42MG, U251, U87, GL15 ainsi que d'astrocytome de grade III, SW1088. Nous confirmons ici par qPCR et Western blot que la FlnA est bien présente en termes d'ARNm et de protéine et que son expression est stimulée en condition hypoxique. Après développement et optimisation d'une lignée U87 délétée du gène codant la FlnA (chromosome X, cellules U87 XY), la lignée de U87-FlnAKO, nous avons évalué la prolifération cellulaire ainsi que l'état du cycle cellulaire dans ces lignées. Nous montrons que la prolifération cellulaire des cellules FlnAKO est significativement réduite comparativement à la lignée sauvage après 72h de culture. Ce phénomène est associé dans les cellules FlnAKO à une accumulation des cellules en phase G1 au détriment de la phase G2/M, ce qui est caractéristique de l'inhibition de la progression du cycle cellulaire voire la sénescence mais pas d'un mécanisme apoptotique. Le complexe cycline D1/CDK4-6 est connu pour initier la progression de la phase G1 vers la phase S, alors que ce complexe est aussi capable de modifier le statut de phosphorylation de la FlnA dans des cellules de cancer mammaire MDA-MD-231 (Zhong *et al.*, 2010). Plus particulièrement, le complexe cycline D1/CDK4-6 peut phosphoryler la FlnA sur le site S2152 ainsi que sur un autre résidu serine présent en position 1459. La phosphorylation du site S2152 protège la FlnA du clivage protéolytique par les calpaïnes impliqué dans la restructuration dynamique de structures membranaires. D'autres études ont montré que le site secondaire (S1459) de phosphorylation de la FlnA par le complexe

cycline D1/CDK4-6 est également phosphorylable par le complexe cycline B1/CDK1. De façon intéressante, ce site se situe dans le segment secondaire d'interaction à l'actine de la FlnA présent entre les domaines répétés 9 et 15. Ainsi il a été montré que la phosphorylation de ce site perturbe la liaison du segment secondaire 9-15 à l'actine, ceci permettant une déstructuration du cytosquelette d'actine durant la mitose (Cukier *et al.*, 2007 ; Szeto *et al.*, 2015). Au vu des étapes se déroulant lors de la phase G1, telles que la préparation de la réplication, nous spéculons que le rôle de la FlnA contrôle la transition G1/S en agissant comme une plateforme permettant l'organisation du cytosquelette et prévenant la sénescence. Les cellules U87 expriment un gène TP53 sauvage permettant l'entrée en sénescence et prévenant les défauts de mitose (Maehara *et al.*, 2010), mécanisme ici contrecarré potentiellement par la FlnA. Ces observations ressemblent étroitement aux effets du dinaciclib qui inhibe sélectivement les CDK1, CDK2, CDK5 et CDK9 dans les GBM, responsable d'une inhibition de la prolifération indépendante du statut p53 (Jane *et al.*, 2016) ou du palbociclib, un inhibiteur de CDK4/6 sur l'inhibition du cycle cellulaire par une inhibition de la phosphorylation de Rb1 (Lubanska et Porter 2017). Dans les GBM, il existerait donc une interaction fonctionnelle entre la FlnA et CDK4/6 ou CDK1, essentielle à la progression de la phase G1 vers le cycle cellulaire et la prolifération, quand TP53 n'est pas muté. L'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 relayé par la FlnA apparaît comme déterminant dans la sensibilisation des cellules U87 aux chimiothérapies TMZ et CPT-11 (irinotecan). En accord avec ces résultats, les inhibiteurs de CDK montrent un effet significatif lors qu'ils sont administrés conjointement à des chimiothérapies dans des modèles précliniques. Cependant la plupart d'entre eux ont échoué lors des phases de transposition en essai clinique, faisant de la FlnA une nouvelle cible thérapeutique d'intérêt.

En plus d'être directement impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, la FlnA régule l'activité de certains facteurs de croissance, en intervenant dans une boucle de rétrocontrôle positif de la voie des MAPK consécutivement à l'activation d'un RTK (Figure 41 | Voies associées à la prolifération tumorale impliquant une régulation par la Filamine A). En effet, l'activité de la GTPase k-Ras est inhibée en absence de FlnA dans des cellules d'adénocarcinome pulmonaire, conduisant à une diminution de l'activation de ERK1/2 et Akt (Nallapalli *et al.*, 2012). De même, la FlnA potentialise l'activation par phosphorylation de SMAD2 suivant l'activation du récepteur du TGF- β (Sasaki *et al.*, 2001). Ainsi nous émettons l'hypothèse que la FlnA régule la prolifération des cellules de GBM en contrôlant l'activité de facteurs de croissance *in vitro* dans les lignées U87 et plus largement dans les GBM.

IV | Propriétés mécaniques de la Filamine A dans l'adhésion et la migration des cellules de GBM

Il est intéressant de noter que la phosphorylation de la FlnA par le complexe cycline D1/CDK4-6 est associée à une potentialisation des capacités invasives et migratoires de cellules de tumeur mammaire MDA-MB-231, faisant de la FlnA une passerelle fonctionnelle interconnectant les mécanismes distincts de prolifération et de migration.

Le récepteur UT est maintenant considéré comme un récepteur chimiokine pouvant stimuler la migration directionnelle de cellules d'astrocytome de grade III SW1088 et de GBM U87 le long d'un gradient d'U111 généré en chambre de Boyden (Lecointre *et al.*, 2015 ; Coly *et al.*, 2016 ; Castel *et al.*, 2017). En premier lieu nous avons testé les propriétés intrinsèques de la FlnA sur les adhésions et les propriétés migratoires des cellules de GBM. Lorsque le gène de la FlnA est délété dans les cellules U87-FlnAKO, les cellules présentent une réduction de leurs axes cytoplasmiques et nucléaires associée à une réduction du nombre de fibres de stress d'actine. De plus, le nombre d'adhésions focales contenant de la Paxilline est réduit significativement alors que l'émission des lamellipodes est drastiquement inhibée. Le rôle de la FlnA dans les processus d'adhésion a largement été étudié, *i.e.* la FlnA interagit avec la sous-unité β des dimères $\alpha\beta$ d'intégrines, et cette interaction stabilise les adhésions dans des cellules CHO et A7 exprimant stablement la FlnA (Cunningham *et al.*, 1992 ; Calderwood *et al.*, 2000). Ce phénomène, associé à l'absence de fibres de stress d'actine dans les cellules FlnAKO, aboutit à un défaut de structuration du cytosquelette d'actine essentiel au maintien de protrusions membranaires telles que les lamellipodes. Au delà de son rôle mécanique structurel, la FlnA peut réguler la structuration du réseau d'actine *via* son interaction avec les GTPases de la famille Rho qui potentialisent la polymérisation d'actine, ainsi qu'en permettant la formation de clusters protéiques fonctionnels nécessaires à la migration cellulaire (Ohta *et al.*, 1999 ; Sells *et al.*, 1999 ; Vadlamudi *et al.*, 2002 ; Ueda, *et al.*, 2003).

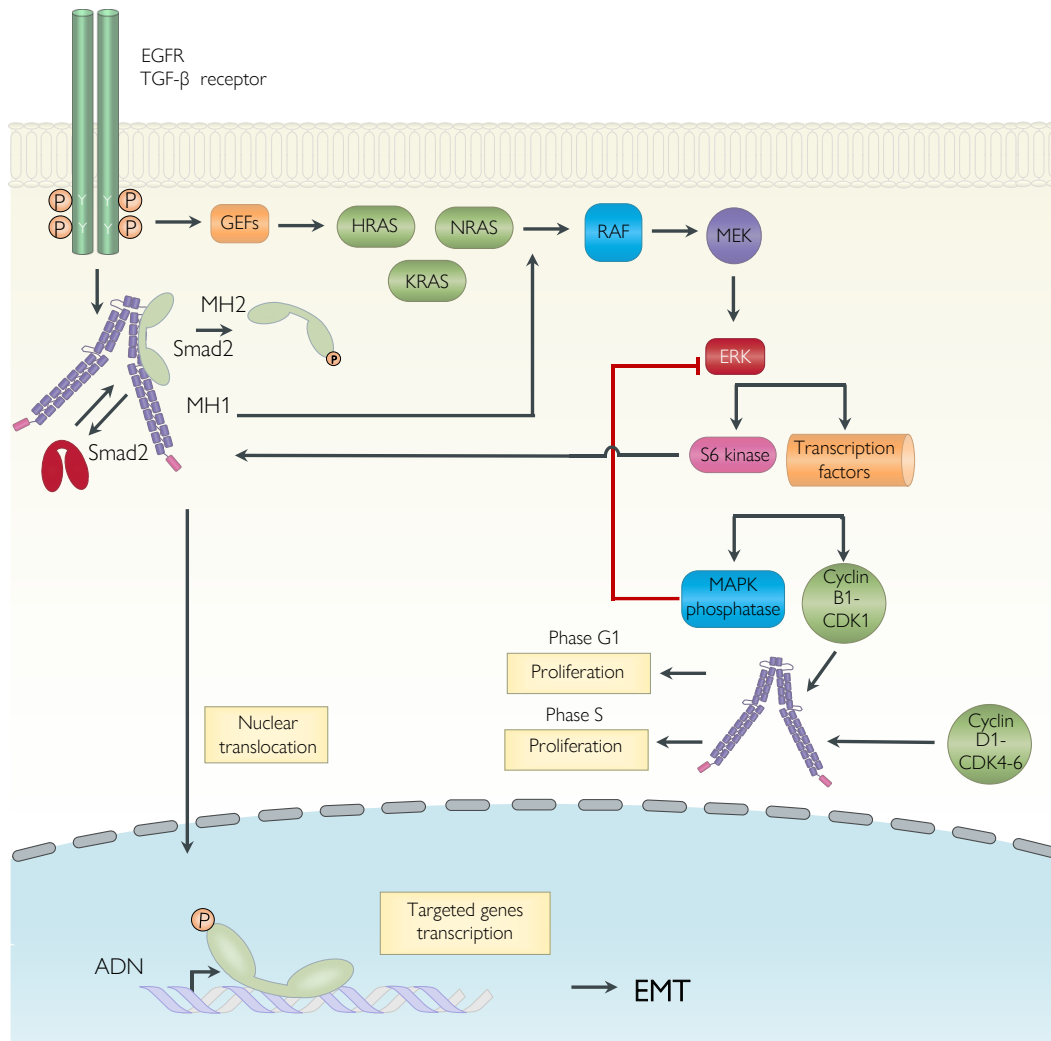


Figure 41 | Voies associées à la prolifération tumorale impliquant une régulation par la Filamine A. La FlnA potentialise l'activité de l'EGFR et du récepteur du TGFβ en stimulant la phosphorylation de SMAD2 consécutive à l'activation de ces RTK, stimulant de fait l'expression des gènes cibles de SMAD2. La FlnA régule également positivement l'activité oncogénique de la kinase K-Ras. De plus les couples cycline D1- CDK4/6 et cycline B1-CDK1 modifient le statut de phosphorylation de la FlnA, un mécanisme impliqué dans la progression du cycle cellulaire.

Nous avons précédemment établi que la migration des GBM induite par l'activation du récepteur UT s'effectue *via* l'activation concomitante de deux voies dépendantes des protéines G. En premier lieu, la stimulation du récepteur engendre l'activation d'une protéine Gai/o précouplée permettant la formation du lamellipode *via* l'activation séquentielle de PIK3 et la production de PIP3. Dans un second temps la stimulation soutenue du récepteur est relayée par l'activation de la voie Gα13/Rho/ROCK qui soutient la polymérisation d'actine et la contraction cellulaire. Sur la base de ces données, nous avons étudié la dynamique de formation des adhésions focales après un traitement d'UII dans les lignées U87 et U87-FlnAKO même si les cellules FlnAKO présentent constitutivement moins d'adhésions focales. Les cellules U87 présentent une augmentation transitoire du nombre d'adhésions focales exprimant la vinculine

suggérant l'existence d'un cycle de protrusion/adhésion/contraction et de dé-adhésion, essentiel à la migration directionnelle. De tels cycles d'adhésion-dé-adhésion ont pu être observés à travers le *turn-over* d'adhésions positives pour la paxilline, relayé par un processus de dégradation autophagique permettant la polarisation cellulaire le long d'un gradient de concentration d'EGF (Kenific *et al.*, 2016). Cependant en l'absence de FlnA, l'UII n'exerce aucun effet sur la formation transitoire d'adhésions focales. Ces observations sont corroborées par l'abolition totale de la migration directionnelle des cellules U87-FlnAKO en chambre de Boyden, démontrant de fait un rôle majeur de la FlnA dans la migration chimiotactique des GBM relayée par l'activation de l'UT. Considérant que l'application de concentrations homogènes d'UII stimule la formation non polarisée d'adhésions, associée à la réduction du recouvrement de zone lésée dans le test de *wound-healing* dans les cellules U87-FlnAKO, il semble donc que la FlnA joue un rôle majeur dans la polarisation cellulaire et la migration directionnelle stimulées par l'UII et l'UT, mais pas dans les adhésions stables à la matrice. Des expériences de transfection de vecteurs codant des segments du domaine C-terminal de l'UT ou le domaine 16-24 de la FlnA, ont eu pour but ici de d'évaluer le potentiel inhibiteur de peptidomimétiques interactants capables de bloquer respectivement la liaison de la FlnA à l'UT_{cterm} et de l'UT_{cterm} à la FlnA. Les données permettent d'envisager qu'il est possible d'inhiber la migration directionnelle évoquée par l'activation de l'UT en chambre de Boyden, en bloquant la liaison du domaine 16-24 de la FlnA au domaine 332-351 de l'UT. L'expression de ces peptidomimétiques reste à démontrer et l'interaction UT-FlnA doit être prouvée par des études de co-immunoprécipitation voir des méthodes de FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) *in situ*, afin de prouver que c'est bien l'interaction UT-FlnA qui contrôle la migration induite par l'UII.

V | La Filamine A régule le trafic et le couplage de l'UT : impacte sur la migration ?

L'internalisation/endocytose des RCPGs est un mécanisme essentiel de la perception polarisée d'un gradient de chimiokine permettant à la cellule de migrer efficacement le long d'un gradient de chimiokines. Les cycles d'internalisation permettraient aux cellules d'effectuer des pauses migratoires, mais pas forcément de signalisation, leur permettant de se rediriger pour une migration efficace. Ce mécanisme original a été décrit dans une étude montrant que l'internalisation du récepteur CXCR4 dépend de la séquence C-terminale cytosolique, et que cette internalisation relaye une sensibilité accrue des cellules au gradient de SDF-1 α et permet une migration directionnelle efficace le long d'un gradient *in vitro* et *in vivo* (Minina *et al.*,

2007). Le recyclage des RCPGs à la membrane plasmique après activation requiert l'expression d'un motif consensus sur le récepteur de tri permettant le recyclage spécifique de ces récepteurs. Le motif PDZ constitue l'un de ces motifs impliqué notamment dans le recyclage du récepteur ET_A de l'endothéline (Trejo 2005 ; Hanyaloglu et Zastrow 2008). Dans notre étude, il n'a pas été décrit de séquence PDZ, mais nous détectons une forte densité de récepteur UT-eYFP dans les *ruffles* membranaires (une surface cellulaire mobile qui contient un réseau de filaments d'actine nouvellement polymérisés) au niveau des lamellipodes de cellules U87. Après stimulation par l'UII (40 min), le marquage de l'UT apparaît dans le cytosol sous la forme de points intenses correspondant à des récepteurs internalisés/endocytés à proximité du compartiment périnucléaire de recyclage. De récentes études décrivent deux voies différentes impliquées dans le devenir des RCPG après internalisation : le recyclage à la membrane plasmique et la dégradation lysosomale. Il a notamment été montré que l'inhibition de l'ubiquitination *via* la tyrosine kinase Her-2/ErB2 des récepteurs PAR1 (*Protease-activated receptor 1*) et CXCR4 conduit à une augmentation de l'expression membranaire de ces récepteurs et à la progression tumorale (Bhandari *et al.*, 2009) probablement par recyclage rapide à la membrane. Afin d'élucider les mécanismes impliquant la FlnA dans le recyclage de l'UT et la polarisation cellulaire, nous étudierons grâce au marqueur de vésicules de recyclage rapide rab5, et l'accumulation de PIP3 dépendante de l'activation des PI3K (Naslavsky et Caplan 2018), la possibilité d'un recyclage rapide de l'UT depuis les endosomes précoces vers de nouveaux lamellipodes dans les cellules de GBM exprimant la FlnA. Le défaut d'expression de FlnA dans les lignées U87-FlnAKO prévient la formation de *ruffles* membranaires mais permet la présence à la membrane plasmique du récepteur UT. Cependant aucun mécanisme d'endocytose ou d'internalisation n'est détecté dans le cytosol après traitement par l'UII (40 min). L'endocytose/internalisation de l'UT relayée par la FlnA est confirmée par nos expériences réalisées dans les lignées de mélanomes A7 (FlnA+). De plus ces résultats sont en accord avec l'étude de Minsaas et collaborateurs qui montre que le récepteur CCR2B n'internalise pas dans les cellules M2 après stimulation par un agoniste (Minsaas *et al.*, 2010). De plus les auteurs ont montré que le déplacement des vésicules contenant CCR2B est significativement plus lent dans les cellules dépourvues de FlnA, suggérant que cette dernière promeut la liaison du récepteur à des protéines cargo impliquées dans la régulation du trafic intracellulaire, telles que les SNARE ou les β -arrestines-1/2 permettant un recyclage endosomal rapide (Traub et Bonifacino 2013 ; Pons *et al.*, 2017). En accord avec ces observations, il a été montré que la FlnA, la β -arrestine2 et le récepteur dopaminergique D3R forment un complexe hétérotrimérique dans des cellules

HEK293 en absence de stimulation. Plus précisément, c'est la FlnA qui sert de plateforme en interagissant avec les deux partenaires sans que ces derniers n'interagissent entre eux en absence de traitement. L'activation de GRK2/3 consécutive à l'activation du récepteur induit la dissociation de la FlnA de D3R, associée alors à un recrutement de β -arrestine-2 par D3R accompagné par une endocytose du récepteur (Kim *et al.*, 2005). Notre équipe a déjà pu démontrer que le récepteur UT recrute la β -arrestine-2 et que ce recrutement est accompagné d'une signalisation ERK1/2 (Brulé *et al.*, 2014), potentiellement intracellulaire. Ensemble ces résultats permettent de poser l'hypothèse que la FlnA conduit au recrutement efficace de β -arrestine-2 à l'origine de l'endocytose rapide de l'UT, permettant une signalisation ERK1/2 puis un recyclage à la membrane plasmique au niveau d'un nouveau lamellipode pour migrer de façon directionnelle (Figure 42 | Voie hypothétique de trafic du récepteur UT dépendant de l'expression de la Filamine A). Cette hypothèse devra être confirmée.

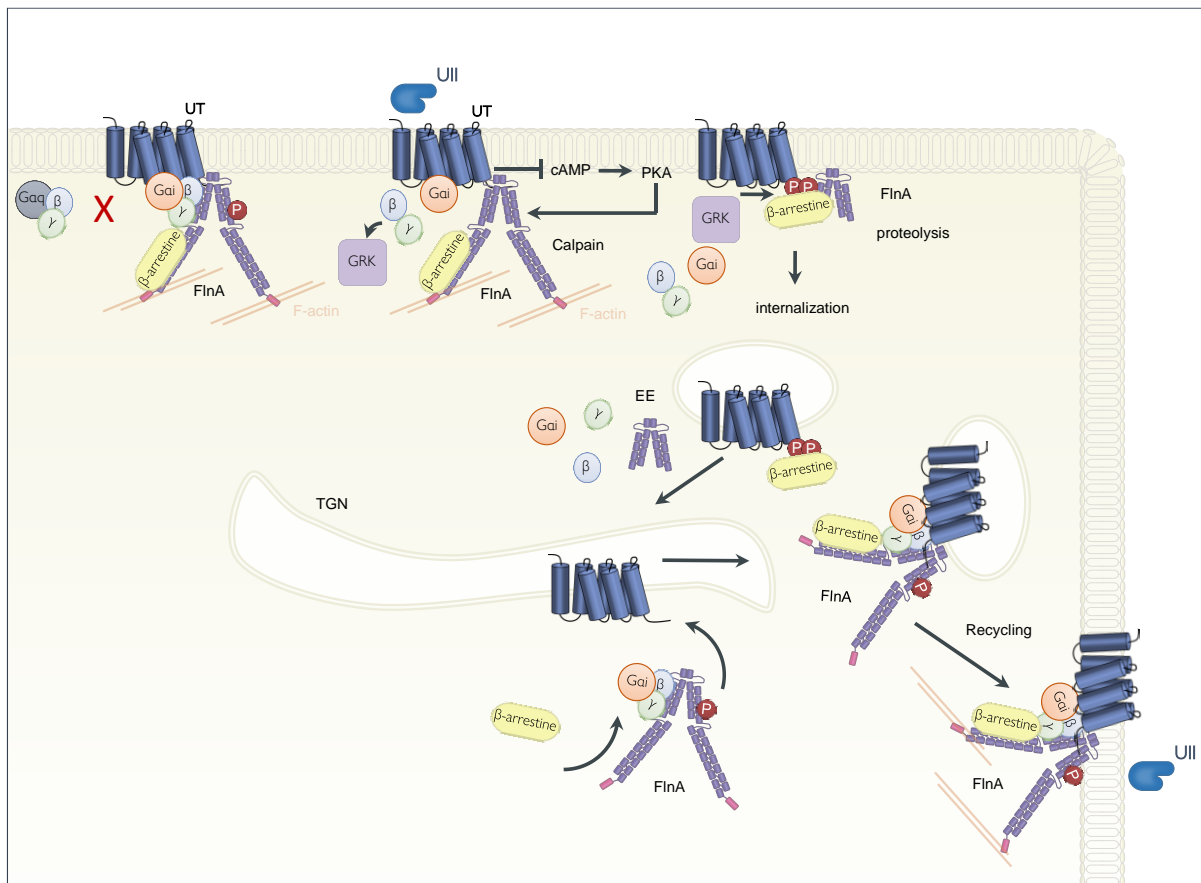


Figure 42 | Voie hypothétique de trafic du récepteur UT dépendant de l'expression de la Filamine A. En condition basale, le récepteur UT est exprimé comme étant possiblement précouplé à Gai à la membrane plasmique grâce à la FlnA. La FlnA prévient de plus la liaison de Gai au récepteur et rapproche la β -arrestine près du récepteur, prête à être recrutée suite à l'activation de ce dernier. L'activation du récepteur UT stimule la protéine Gai ce qui conduit à la diminution de la production d'AMPc et réduit par conséquent l'activité des PKA. L'activité des PKA ainsi réduite potentialise le clivage calpaïne dépendant de la FlnA. Concomitamment les sous-unités β stimulent l'activation des GRK. Les GRK peuvent ainsi phosphoryler l'UT ce qui potentialise le

recrutement de β -arrestine. A ce stade, il est possible que s'opère alors une dissociation de la liaison de l'UT à la FlnA clivée dans le cytosol. L'UT peut être recyclé depuis le réseau Trans-Golgien (TGN) vers la membrane plasmique pour un recyclage rapide, avec une unité protéique fonctionnelle constitué de $G\alpha i$ -FlnA-(β -arrestine) pouvant ré-initier un cycle de signalisation.

Le précouplage des RCPGs aux protéines G a pu être caractérisé dans de rares cas, cependant les conditions physiopathologiques de ce mécanisme ne sont pas encore pleinement élucidées à ce jour. Le précouplage du récepteur $\beta 2AR$ (récepteur $\beta 2$ adrénergique) à $G\alpha i$ permet une activation pour de très faibles concentrations de ligand de l'ordre du femtomolaire (Civciristov *et al.*, 2018). Les auteurs ont plus particulièrement montré que ce précouplage est dépendant de l'expression d'une protéine plateforme nommée AKAP79 (*A kinase anchoring protein 79*) qui facilite donc le précouplage $\beta 2AR$ - $G\alpha i$. De façon intéressante, le récepteur PAR1 est capable de former des complexes pré-associés avec la protéine $G\alpha i$ sans précouplage à la sous-unité $G\alpha 12$. Ce précouplage est à l'origine d'une activation rapide et transitoire de la voie $G\alpha i$ suivit par une activation soutenue de $G\alpha 12$ accompagnée par une activation de β -arrestine-1 (Ayoub *et al.*, 2010). Nous avons de plus récemment démontré que l'UT précouplé à la protéine $G\alpha i$ pouvait relayer une signalisation rapide et efficace lors de la migration directionnelle, suivie de la transduction du signal *via* la protéine $G\alpha 13$ qui transit du cytosol vers la membrane plasmique, et recrute des effecteurs associés à la voie Rho et à la migration cellulaire (Lecointre *et al.*, 2015). Dans la présente étude, nous confirmons que l'UT et la protéine $G\alpha i$ sont spécifiquement co-localisés/précouplés à la membrane plasmique des lamellipodes des cellules U87 et ainsi que dans le cytosol après stimulation par l'U11, un phénomène absent des cellules U87-FlnAKO. Cette observation originale indique que la FlnA joue un rôle clé dans le précouplage de l'UT à $G\alpha i$ comme cela a pu être décrit pour la liaison du récepteur D3R à $G\alpha o$ (Kim *et al.*, 2005), ce qui permettrait ici de détecter de faibles concentrations d'U11, une signature potentielle d'un effet chimiokine. Sachant que l'UT possède des effets pléiotropes *via* ses couplages aux sous-unités $G\alpha i/o$, $G\alpha q$ et $G\alpha 13$ (Brulé *et al.*, 2014 ; Castel *et al.*, 2017), et que ce récepteur montre des préférences de signalisation indépendantes du couplage $G\alpha q/Ca^{2+}$ dans les GBM (Lecointre *et al.*, 2015), nous avons testé le possible lien entre la FlnA et le couplage de l'UT à $G\alpha q$ dans la lignée U87. De façon intéressante, nous confirmons que le récepteur UT ne colocalise pas avec la sous-unité $G\alpha q$ dans les cellules U87, tandis qu'une proximité entre UT et $G\alpha q$ est faiblement observée dans les cellules U87-FlnAKO. Une augmentation majeure de cette colocalisation après activation de l'UT est finalement révélée,

et semble associée à une augmentation de la concentration cytosolique de Ca^{2+} dont le rôle doit être élucidé dans les GBM.

L'ensemble de ces observations, montre que l'expression de FlnA dans les GBM détermine un switch de signalisation favorisant le précouplage à $G_{\alpha i}$ au détriment de $G_{\alpha q}$. Ainsi le précouplage à $G_{\alpha i}$ impliqué dans la migration directionnelle est entièrement contrôlé par la FlnA. La FlnA fournit ainsi une plateforme fonctionnelle permettant à l'UT de relayer des effets chimioattracteurs dans les cellules de GBM en *i*) prévenant le couplage $G_{\alpha q}$ et potentialisant celui à $G_{\alpha i}$ *ii*) en permettant la désensibilisation rapide ainsi que le recyclage du récepteur à la membrane après stimulation *iii*) en potentialisant l'endocytose du complexe FlnA-UT- β -arrestine-1/2 permettant l'activation de ERK1/2, un mécanisme potentiellement impliqué dans la dynamique de formation des adhésions focales (Figure 43 | Trafic du récepteur UT dépendant de la Filamine A lors de la migration directionnelle).

VI | L'activation de $G_{\alpha i}$ par l'UT régule le clivage de la Filamine A

Le grand nombre de fonction qu'occupe la FlnA dans la cellule est contrôlée par diverses modifications post-traductionnelles, incluant des hydroxylations, des ubiquitinations ainsi que des phosphorylations qui contrôlent respectivement sa dégradation protéasomale et son clivage. La FlnA possède plus particulièrement 2 sites de clivage par les calpaïnes, le site H1 qui sépare les domaines *rod 1* et *2* et le site H2 séparant le domaine *rod 2* du *repeat 24* (Gorlin *et al.*, 1990). La phosphorylation de la sérine S2152 protège la région H1 du clivage par les calpaïnes. La stimulation des cellules U87 par l'UII (10^{-8} M) pendant 40 min provoque une augmentation de l'immunodétection par l'anticorps Ab_FlnA_{D16-D24} d'une forme de FlnA de 130-110 kDa (Western blot), suggérant l'induction d'un clivage de la FlnA. Concomitamment nous observons par immunomarquage une augmentation de la colocalisation entre l'UT et la FlnA au lamellipode après 20 min de traitement à l'UII, un mécanisme accompagné par une augmentation de la densité de récepteur au lamellipode ainsi que d'une diminution de la colocalisation entre la FlnA et l'UT dans le cytosol. Ainsi l'activation de $G_{\alpha i}$ par le récepteur UT pourrait libérer le complexe UT/FlnA de son ancrage à l'actine, et conduire à l'internalisation/endocytose du récepteur et sa redistribution polarisée à la membrane plasmique. Pour valider l'implication de la voie $G_{\alpha i}/o/AMPC/PKA$ dans ce mécanisme nous avons traité les cellules U87 avec un inhibiteur de $G_{\alpha i}$, la PTX (*pertusis toxin*). Dans cette condition, l'UII stimule la phosphorylation de la sérine S2152 conduisant à une stabilisation de la forme longue de FlnA (280 kDa). Les cellules traitées avec la PTX présentent de larges

lamellipodes, probablement à cause du maintien de l'activation des sous-unités $\beta\gamma$ libérées de la G α i, capables de stimuler de manière continue les PI3K et donc la taille des lamellipodes. Dans ces conditions, une diminution de la colocalisation entre UT et FlnA est constatée au lamellipode. Ces données mettent en évidence le rôle clé de l'axe UT/G α i/PKA qui peut catalyser le clivage de la FlnA par les calpaïnes *via* l'inhibition de la phosphorylation de la sérine S2152. Ce clivage pourrait être essentiel dans l'internalisation et/ou le trafic efficace du récepteur précouplé à G α i (Jean-Alphonse et Hanyaloglu 2011). Sur la base de ces observations et sur ce qui est connu sur le rôle de la β -arrestine-2 dans l'internalisation du récepteur UT, nous proposons que le complexe FlnA- β -arrestine-2 interagisse avec l'UT-G α i $\beta\gamma$ et peut ensuite relayer l'endocytose consécutive à l'activation du récepteur, puis l'activation des calpaïnes, et le clivage de la FlnA. Le rôle de la FlnA dans l'endocytose est aussi sous-tendu par son implication dans l'adressage de la furine des endosomes précoces vers le réseau Trans-Golgien, puis son recyclage à la membrane plasmique après internalisation (Liu *et al.*, 1997). Ainsi l'UT associé à la FlnA pourrait être transporté à travers le réseau Trans-Golgien et ré-adressé à la membrane lors de la polarisation cellulaire, un mécanisme de régulation de la migration directionnelle supportée par la FlnA (Figure 42 | Voie hypothétique de trafic du récepteur UT dépendant de l'expression de la Filamine A).

VII | Impact de l'expression de la FlnA sur la croissance des GBM et la survie des animaux

L'ensemble des données de la littérature suggèrent que la FlnA joue un rôle clé dans la régulation des processus de tumorigenèse, ainsi que sa capacité à réguler l'activité de récepteurs chimiotactiques suggèrent que cibler la FlnA *in vivo* constitue une nouvelle option thérapeutique permettant de prévenir l'invasion des GBM à l'origine de la récurrence. Ainsi nous avons xéno-greffé au niveau striatal des souris Nude/NMRI avec des cellules U87 et U87-FlnAKO dans 2 séries d'expériences, afin d'évaluer l'impact de la délétion de la FlnA d'une part sur la survie des animaux, et d'autre part sur la morphologie tumorale ainsi que sur l'expression de certains marqueurs clés de type mésenchymateux (prélèvement à 15 jours). De façon intéressante la survie des animaux xéno-greffés par les lignées U87-FlnAKO est significativement améliorée comparativement aux animaux recevant la lignée contrôle. Les tumeurs FlnAKO présentent un phénotype large, circonscrit alors que les tumeurs issues de cellules U87 apparaissent moins circonscrites avec de nombreux processus invasifs.

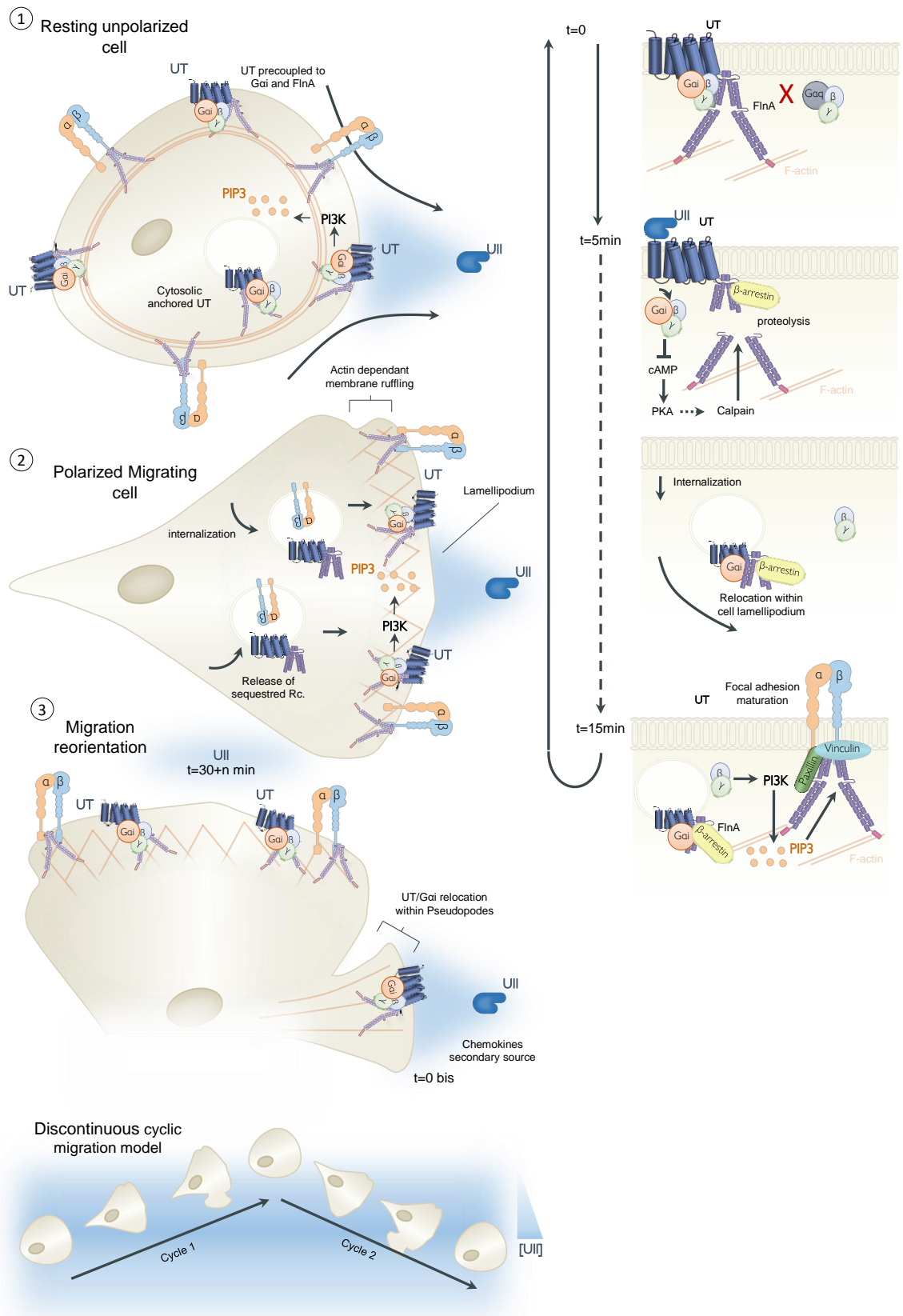


Figure 43 | Trafic du récepteur UT dépendant de la Filamine A lors de la migration directionnelle.

Dans les cellules au repos, la FlnA permet l'expression d'UT précouplé à G α i à la membrane plasmique et prévient la fixation d'une sous-unité G α q. La FlnA permet l'ancrage de l'UT au cytosquelette à la membrane plasmique ainsi que dans le cytosol. L'expression de FlnA stabilise également les complexes d'adhésions focales (FA) t=0 (1). L'application d'Ull engendre un clivage rapide de la FlnA via la voie G α i-cAMP-PKA activant le clivage protéolytique de la FlnA par les calpaïnes. La FlnA permet l'internalisation de l'UT en potentialisant le recrutement de β -arrestine ainsi que la relocalisation rapide du récepteur dans les ruffles membranaires du lamellipode permettant une expression polarisé d'UT. Le traitement permet également la libération de l'UT ancré dans le cytosol (2). 15 min de traitement à l'Ull augmente transitoirement le nombre de FA via un mécanisme dépendant de la FlnA et de l'induction de la production de PIP3 par l'axe β y/PI3K. L'apparition d'une source secondaire d'Ull déclenche l'émission d'un pseudopode contenant le complexe UT/G α i permettant la réinitialisation du cycle de migration (3).

Ces processus sont caractérisés par un fort marquage FlnA co-exprimant l'UT au front de migration entourés par des cellules exprimant le peptide Ull. Les tumeurs U87-FlnAKO présentent quant à elle une diminution drastique de l'expression de l'UT et de l'Ull suggérant l'absence de condition induisant classiquement l'expression du système urotensinergique dans les gliomes tel que l'hypoxie, l'environnement inflammatoire ou des cascades de signalisation associées à la TM comme NF- κ B (Castel *et al.*, 2017). Le phénotype circonscrit des tumeurs FlnA est associé à une disparition de l'expression de MMP-9, suggérant un rôle clé de la FlnA dans l'expression des MMPs. D'autres études montrent paradoxalement que la surexpression de la FlnA dans des cellules de mélanome A7, de carcinomes nasopharyngés CNE2, de cancer de la prostate PC-3 et de carcinome rénal ACHN, est corrélée à une diminution de l'expression de MMP-9 (Sun *et al.*, 2014-1 ; Sun *et al.*, 2014-2 ; Sun *et al.*, 2014-3 ; Zhu *et al.*, 2007). La surexpression de FlnA dans ces études est réalisée *via* la surexpression exogène de la FlnA tandis que nous avons dans notre étude stablement réprimé l'expression de FlnA dans une lignée l'exprimant initialement. Ici, nos lignées FlnAKO présente toujours une forte expression du marqueur mésenchymateux CD44, suggérant que l'expression de l'ensemble des acteurs associés au phénotype mésenchymateux n'est pas complètement altérée en l'absence de FlnA. De façon intéressante les cellules U87 et dans une moindre mesure les cellules U87-FlnAKO envahissent le parenchyme cérébrale à travers le corps calleux. La migration directionnelle le long de fibres myélinisées requière la sécrétion de MMP-14 et MMP-2 pouvant cliver les éléments freinatoires de la migration, exprimés à la surface de la gaine de myéline tel que la *myelin glycoprotein associated protein* (Giger *et al.*, 2008). De plus les cellules peuvent utiliser un mode de migration amiboïde lorsqu'elles sont soumises à des environnements de faibles contraintes et de faible adhésion (Liu *et al.*, 2015; Callan-Jones et Voituriez 2016). Ainsi les longues structures fibrillaires formées par les gaines de myéline agencées parallèlement semblent pouvoir fournir ce type de microenvironnement de faible contrainte et adhésion pouvant expliquer l'invasion des cellules U87 et U87-FlnAKO *via* un processus de migration

amiboïde (Figure 44 | Voie de migration possiblement utilisée par les cellules U87 et U87-FlnAKO via un mécanisme de migration amiboïde, et suggère que la FlnA permet la sécrétion des MMP-14 ou MMP-2). Ensemble ces résultats montrent qu'il est possible d'inhiber la migration mésoenchymateuse des GBM *in vivo* via l'inhibition des fonctions de la FlnA, et des RCPG dont la fonction dépend de la FlnA tel que le récepteur UT couplé aux voies de migration chimiotactique impliquant au moins G α i.

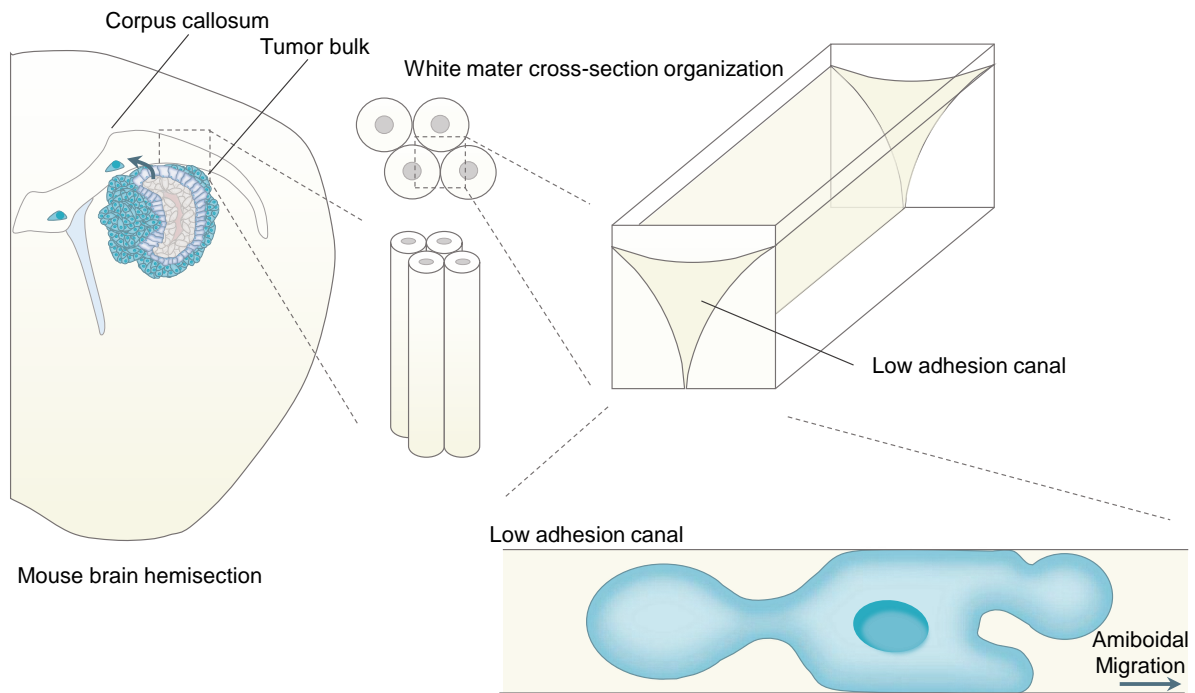


Figure 44 | Voie de migration possiblement utilisée par les cellules U87 et U87-FlnAKO via un mécanisme de migration amiboïde. Les cellules adoptent un mode de migration amiboïde lorsqu'elles sont soumises à des conditions de fortes contraintes et d'adhésion réduite, ainsi les fibres myélinisées du corps calleux organisées de manière parallèles semblent pouvoir fournir ce type de canaux favorables à l'adoption d'un mode de migration amiboïde.

Conclusion

En conclusion notre travail a permis de mettre en évidence que la FlnA est ré-exprimée dans les gliomes, et que son expression est corrélée au grade de la tumeur montrant une expression particulièrement forte dans les régions hypoxiques péri-nécrotiques des GBM. Nous montrons également que la surexpression de FlnA est de mauvais pronostic pour la survie des patients et que son expression est accompagnée d'une signature mésenchymateuse, de la mise en place d'un programme pro-migratoire faisant intervenir des protéines participant aux mécanismes d'adhésion à la MEC ainsi que dans le remaniement du cytosquelette. De plus nous montrons que la FlnA joue un rôle clé dans la mise en place des adhésions focales ainsi que dans l'organisation du cytosquelette d'actine dans les cellules de GBM. Par ailleurs la déstabilisation de ces processus associé à l'incapacité de former et de maintenir des lamellipodes impactent significativement la motilité des cellules de GBM. De plus, nos travaux ont permis de mettre en évidence une interaction fonctionnelle entre la FlnA et le récepteur UT. En effet l'interaction entre la queue C-terminale du récepteur UT (aa332-351) et les domaines D19-D20 de la FlnA permettrait entre autre la migration chimiotactique stimulée par l'U118, et la coexpression de la FlnA avec le récepteur UT permet de précoupler le récepteur à la protéine Gαi au lamellipode. Ce mécanisme permet l'activation rapide de la voie Gαi et semble jouer un rôle clé dans la polarisation cellulaire lors de la migration. En effet nous avons mis en évidence que l'UT provoque le clivage calpaïne-dépendant de la FlnA et que ce mécanisme est nécessaire à la relocalisation du récepteur au lamellipode après endocytose. *In vivo*, les tumeurs issues de la greffe de cellules U87 montrent un phénotype hautement invasif parfois multifocal, les cellules tumorales délétées du gène codant la FlnA présentent un phénotype très circonscrit dépourvu de processus invasif associé à l'inhibition totale d'expression de MMP-9. Ainsi, la FlnA semble constituer une cible thérapeutique d'intérêt pouvant permettre de prévenir l'invasion du parenchyme sain cérébral par les cellules mésenchymateuses de GBM. Il n'est cependant pas délicat d'inhiber complètement les fonctions de la FlnA de façon systémique chez le patient, de par sa large distribution et son implication majeure dans le maintien de l'intégrité des structures vasculaires dans lesquelles la FlnA est exprimée de manière massive. En revanche nous avons montré qu'il est possible d'agir sur l'interaction FlnA-UT. C'est la raison pour laquelle nous avons d'ores et déjà construit des peptidomimétiques interactants « intelligents » capables de franchir la BHE et de s'accumuler dans la tumeur ciblant spécifiquement l'interaction entre la FlnA et le récepteur UT, dans le but de prévenir l'invasion du parenchyme sain relayée par l'U118.

Perspectives

Propriétés intrinsèques de la Filamine A dans la tumorigenèse gliale

Au terme de cette étude nous avons montré que la FlnA joue un rôle majeur dans les mécanismes tumoraux associés à la prolifération ainsi qu'à l'adhésion cellulaire. Bien que l'objectif initial de nos travaux était d'étudier l'interaction entre RCPGs chimiotactiques et FlnA, il semble pertinent de poursuivre l'étude des propriétés intrinsèques de la FlnA impliquées dans la gliomagenèse ainsi que dans la sensibilisation des gliomes résistants aux chimiothérapies telles que le TMZ. Dans un premier temps, et grâce à une collaboration avec le Pr A. Idbaih (ICM, Paris), nous envisageons de vérifier les niveaux d'expression en ARNm et protéiques de la FlnA dans différentes lignées de patients (PDCLs) dont le statut mutationnel (IDHwt et IDHmut) et transcriptomique est connu. Les mécanismes de résistances aux traitements de chimiothérapie, d'adhésion et de migration seront étudiés par analyse du cycle et évaluation de l'apoptose (caspase-3, Kits MTT), immunomarquages des FA (Paxilline et vinculine) et en chambre de Boyden, puis la répression de l'expression de la FlnA par siRNA permettra de rechercher si les mécanismes décrits ici sont confirmés dans tous les types de gliome et de GBM. Il a été démontré que la FlnA peut interagir physiquement et fonctionnellement avec les systèmes de recombinaison homologue et NHEJ par l'intermédiaire des protéines BRCA1, BRCA2 et Ku80 respectivement. Ainsi dans les différentes lignées déjà établies et PDCLs, nous étudierons les niveaux de cassures double brin et simple brin de l'ADN en condition basale et après traitement avec différentes chimiothérapies (TMZ, CPT-11, carmustine) *in vitro* et en combinaison avec une radiothérapie grâce à un irradiateur cellulaire. De plus il est admis que des cellules de gliome en migration dans le tissu cérébral peuvent subir d'importantes contraintes physiques (0,26-049kPa) lors de l'invasion notamment le long des structures vasculaires. Ces contraintes peuvent être à l'origine d'une réorganisation de la chromatine, de cassure double brin ou même d'une rupture de l'enveloppe nucléaire à l'origine de la fuite dans le cytosol des composantes des systèmes de réparation. Ces mécanismes pourraient, dans les gliomes, avoir pour conséquences l'accumulation de dommages de l'ADN pouvant à terme potentialiser la malignité tumoral ou bien engendrer la mort cellulaire, en fonction potentiellement de la rigidité cellulaire et nucléaire. La FlnA interviendrait potentiellement à deux niveaux dans la régulation de ces mécanismes, dans l'accumulation de mutations lors de l'invasion en régulant l'activité des systèmes de réparation de l'ADN d'une part, et en apportant de l'élasticité - rigidité en réticulant le cytosquelette d'actine ainsi qu'en

permettant d'adhérer à la MEC par l'activation des intégrines. Dans ce dernier cas, la FlnA pourrait relier ces intégrines membranaires au nucléosquelette *via* son interaction à l'actine, qui elle-même interagit avec les nesprines liant des protéines de la membrane nucléaire.

Ainsi nous étudierons le nombre de cassures double brin de l'ADN sur des coupes de cerveaux de souris xéno greffées par des cellules U87 invasives et U87-FlnAKO non invasives ainsi que sur des prélèvements de GBM de patients, notamment dans les zones d'interface tumeur/cerveau sain à l'aide d'anticorps dirigés contre les marqueurs de réparation de cassures double brin RAD51 et 53-BP1. Afin d'évaluer plus précisément quelles modalités physiques sont à l'origine des cassures d'ADN et de la rupture de l'enveloppe nucléaire, nous réaliserons des études *in vitro* sur des systèmes microfluidiques développés en collaboration avec les Dr C.Tarhan et D.Collard (UMR8520, Univ. Lille & LIMMS / CNRS-IISUMI2820 University of Tokyo). Ces systèmes peuvent mimer les conformations et les contraintes présentes lors de la migration dans le parenchyme cérébral. Dans des cellules de GBM sauvage, délétée du gène de la FlnA, ou dans lesquelles l'expression de la FlnA est juste diminuée, et qui exprimeront des protéines recombinantes fluorescentes (53-BP1-apple, RAD51eYFP) de facteurs de réparation de l'ADN, nous étudierons de façon dynamique la rupture de l'enveloppe nucléaire et diffusion de ces facteurs de réparation dans le cytosol par vidéomicroscopie.

Implication de la Filamine A dans le couplage et le trafic du récepteur UT

Notre étude a permis de mettre en évidence que la FlnA permet le précouplage du récepteur UT à la protéine $G\alpha_i$ et prévient la liaison le couplage à la protéine $G\alpha_q$ même après activation du récepteur. Ainsi nous validerons nos observations immunocytochimiques par co-immunoprécipitation du récepteur UT-eYFP recombinant dans les cellules U87 et U87-FlnAKO après plusieurs temps de traitement en présence d'UUI. Des analyses des échantillons en protéomique (Plate-forme PISSARO) par LC-MS/MS et par Western blot, permettront de caractériser les partenaires de l'UT dans ces différentes étapes de l'émission du lamellipode et la migration, et de confirmer l'association à la FlnA et potentiellement à $G\alpha_i$ ou directement à $G\alpha_q$. De plus nous confirmerons que la mobilisation calcique observée après traitement à l'UUI dans cellules U87-FlnAKO est bien dû au couplage à $G\alpha_q$ en utilisant différents inhibiteurs de $G\alpha_q$ lors d'expériences de fluorimétries calciques (YM-254890, UBO-QIC), et si c'est l'association à la FlnA ou le précouplage à $G\alpha_i$ qui prévient le couplage $G\alpha_q$, en préincubant les cellules U87 en présence de PTX. De même nous évaluerons grâce au kit cAMP HTRF de

Cisbio International l'activation de $G\alpha_i$ en quantifiant les variations de concentrations d'AMPc dans les cellules U87 et U87-FlnAKO. Les données permettraient de vérifier si le précouplage de l'UT à $G\alpha_i$ détermine l'interaction à la FlnA ou le contraire.

L'interaction physique entre la FlnA et les β -arrestines a déjà été suggérée dans la littérature et son implication fonctionnelle est déjà décrite en ce qui concerne les récepteurs dopaminergique, angiotensinergique et cholinergique. Nous avons de plus montré dans notre étude que la FlnA est nécessaire aux mécanismes d'endocytoses du récepteur UT dans les cellules de GBM bien que pour l'instant nous n'ayons pas clairement établi l'étape de phosphorylation de l'UT dans sa partie C-terminale par une GRK, le couplage à la β -arrestin-1 ou -2, l'internalisation potentiellement clathrine/AP2-dépendante ou indépendante puis le potentiel recyclage rapide de l'UT vers la membrane plasmique. Ainsi nous étudierons à l'aide des lignées U87 et U87-FlnAKO l'implication de la FlnA dans le recrutement des β -arrestines et notamment la β -arrestine-2 grâce à des études de BRET (*Bioluminescence resonance energy transfert*) déjà menées en collaboration avec le Dr L. Prézeau (IGF, Montpellier). Et *in cellulo*, nous rechercherons si la dynamique d'endocytose de l'UT comprend donc l'association au complexe FlnA- β -arrestine, et si l'endocytose vésiculaire est un processus dépendant de Rab5, et si les recyclages rapides et tardifs à la membrane sont dépendants de Rab4 et Rab11, respectivement. Concomitamment, il serait fondamental de vérifier la possible signalisation ERK1/2 de l'UT au cours de l'endocytose. L'équipe a en effet précédemment montré en Collaboration avec L. Prézeau et R. Leduc (Université de Sherbrooke, Québec, Canada) que l'activation de ERK1/2 par le récepteur UT peut montrer deux phases, l'une intense et transitoire et l'autre moins intense et plus soutenue dépendantes de l'internalisation de l'UT- β -arrestines. En l'absence et en présence de FlnA, l'implication des β -arrestines-pmKate-2 dans la régulation fine et spatio-temporelle des processus de recyclage des récepteurs UTeYFP et de de-assemblage des FA, sera testée par imagerie sur cellules vivantes par la technique de microscopie de fluorescence par réflexion totale interne (TIRF).

Dans cette étude nous avons montré que l'internalisation et la relocalisation du récepteur UT après stimulation était dépendante d'un clivage de la FlnA associée à l'activation de la voie $G\alpha_i$. Nous validerons que ce clivage est bien dépendant de l'activité des calpaïnes. En effet, il a été précédemment proposé que l'inhibition de l'activité de la PKA concomitante à la phosphorylation par ERK1/2 à la membrane, conduirait à l'activation de la m-calpaïne à l'arrière de la cellule pour favoriser le de-assemblage des FA points et la polarisation cellulaire. Ainsi, nous émettons l'hypothèse que l'activation par l'UII du complexe UT précouplé à $G\alpha_i$

entraîne une diminution de l'activité de la PKA, puis l'endocytose et l'activation de ERK1/2 à la membrane responsable de l'activation de calpaïnes. Pour vérifier cette hypothèse, des agents pharmacologiques seront testés pour inhiber la PKA (H89), stimuler la PKA via la production d'AMPc (Bt2APMc), mais surtout des inhibiteurs de calpaïnes (calpeptines et ALLN (N-[N-(N-Acetyl-L-leucyl)-L-leucyl]-L-norleucine) ou des siRNA dirigés contre la calpaïne-1 ou calpaïne-2) seront testés sur les lignées U87 et U87-FlnAKO et le recyclage de l'UT au lamellipode sera vérifié. Parallèlement, à partir des lignées U87, le clivage de la FlnA sera testée dans ces conditions de tests pharmacologiques en Western blot mais aussi par immunocytochimie. Afin de valider que c'est bien le clivage de la région souple H1 de la FlnA qui participe à la relocalisation du récepteur après activation, nous transfecterons transitoirement un vecteur codant une forme de FlnA délétée de cette région souple (FlnA Δ H1) dans les cellules U87-FlnAKO en combinaison avec une forme recombinante fluorescente de l'UTeYFP, la dynamique de ces deux partenaires sera mesurée par microscopie de fluorescence confocale dynamique en l'absence et en présence d'U11.

Généralisation du rôle de la FlnA aux autres récepteurs chimiokines ?

L'interaction fonctionnelle entre la FlnA et certains membres de la famille des récepteurs de chimiokines a déjà pu être décrite (CXCR4, CCR2B et CCR5). Afin de pouvoir transposer nos travaux à d'autres récepteurs fortement impliqués dans l'invasion des cellules de gliome, nous réaliserons des microdissections laser à partir de prélèvement de GBM de patients (Tumorotheque CHU de Rouen, Cohorte Nationale d'Angers), afin de pouvoir isoler et caractériser l'expression RCPG de la famille des chimiokines par *single cell RNAseq* dans des cellules ayant migrées à distance du cœur tumoral, dans le parenchyme sain. Nous évaluerons dans le même temps la redondance d'expression de ces récepteurs avec la FlnA dans plusieurs zones de la tumeur notamment, les zones vasculaire et hypoxique peri-nécrotique. Leurs niveaux d'expression et co-localisations seront corrélés à la récurrence et la survie des patients et en utilisant les banques de données du TCGA et IVYgap. Nous chercherons à identifier si ces récepteurs peuvent interagir physiquement avec la FlnA dans les lignées de GBM par co-immunoprécipitation. Cette étude nous permettra de valider notre concept à un ensemble plus large de récepteurs de la famille des RCPG chimiokines dans les GBM, voire aux RTK chimiotactiques dans l'avenir.

Ciblage de l'interaction UT-Filamin A ou RCPG-Filamin A à des fins thérapeutiques

Notre étude montre que la FlnA joue un rôle majeur dans la signalisation du récepteur UT, nous montrons également qu'il est possible de bloquer la migration directionnelle évoquée par l'UT grâce à des vecteurs codant des formes peptidomimétiques de la liaison FlnA/UT. C'est dans ce cadre et afin de pouvoir cibler *in vivo* cette interaction, que nous sommes actuellement en train de développer des peptidomimétiques interactants « intelligents » capables de franchir la BHE et de cibler spécifiquement l'interaction UT/FlnA dans la tumeur. En premier lieu l'efficacité et la toxicité de ces peptides sera évaluée grâce des expériences de comptage cellulaire et d'évaluation de l'apoptose ainsi que par quantification de la dynamique d'adhésion focale et de migration en chambre de Boyden consécutive à l'activation du récepteur UT. Par la suite l'efficacité de ces peptides sera évaluée dans un modèle préclinique de xénogreffes de GBM exprimant ou non la FlnA. Après croissance tumorale et prélèvements des cerveaux pour coupes, et afin d'étudier les propriétés des cellules greffées invasives, nous mesurerons la proportion de cellules invasives dans le corps calleux et dans l'hémisphère controlatéral, territoires fréquemment envahis. Les coupes entières du cerveau seront analysées pour évaluer les morphologies cellulaires de gliomes migrants, à distance de la masse tumorale, au moyen des techniques *i*) de transparisation iDisco disponibles au laboratoire pour une visualisation 3D globale, *ii*) de migration dynamique sous macroconfocal time-lapse vidéo microscopie (Primacén, Rouen) et par immunohistochimie. La prolifération et l'angiogenèse seront aussi recherchés par évaluation de l'expression des marqueurs clés appartenant à la signature mésenchymateuse ou pro-neuronale par exemple. La survie des souris xénogreffées et traitées constituera le point terminal du projet pour suggérer l'efficacité thérapeutique.

Références bibliographiques

- Albertin G, Guidolin D, Sorato E, Spinazzi R, Mascarin A, Oselladore B, Montopoli M, Antonello M, Ribatti D. 2009. Pro-angiogenic activity of Urotensin-II on different human vascular endothelial cell populations. *Regul Pept* **157**(1–3): 64–71. doi: 10.1016/j.regpep.2009.04.006
- Alper Ö, Stetler-Stevenson WG, Harris LN, Leitner WW, Özdemirli M, Hartmann D, Raffeld M, Abu-Asab M, Byers S, Zhuang Z, et al. 2009 Sep 1. Novel anti-filamin-A antibody detects a secreted variant of filamin-A in plasma from patients with breast carcinoma and high-grade astrocytoma. *Cancer Science*. doi: 10.1111/j.1349-7006.2009.01244.x
- Ames RS, Sarau HM, Chambers JK, Willette RN, Aiyar NV, Romanic AM, Loudon CS, Foley JJ, Sauermelch CF, Coatney RW, et al. 1999. Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14. *Nature* **401**(6750): 282–286. doi: 10.1038/45809
- Amirian ES, Scheurer ME, Zhou R, Wrensch MR, Armstrong GN, Lachance D, Olson SH, Lau CC, Claus EB, Barnholtz-Sloan JS, et al. 2016. History of chickenpox in glioma risk: a report from the glioma international case-control study (GICC). *Cancer Med* **5**(6): 1352–1358. doi: 10.1002/cam4.682
- Ang C-S, Nice EC. 2010. Targeted in-gel MRM: a hypothesis driven approach for colorectal cancer biomarker discovery in human feces. *J Proteome Res* **9**(9): 4346–4355. doi: 10.1021/pr100509e
- Argentaro A, Yang J-C, Chapman L, Kowalczyk MS, Gibbons RJ, Higgs DR, Neuhaus D, Rhodes D. 2007. Structural consequences of disease-causing mutations in the ATRX-DNMT3-DNMT3L (ADD) domain of the chromatin-associated protein ATRX. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**(29): 11939–11944. doi: 10.1073/pnas.0704057104
- Awata H, Huang C, Handlogten ME, Miller RT. 2001. Interaction of the calcium-sensing receptor and filamin, a potential scaffolding protein. *J Biol Chem* **276**(37): 34871–34879. doi: 10.1074/jbc.M100775200
- Ayoub MA, Trinquet E, Pflieger KDG, Pin J-P. 2010. Differential association modes of the thrombin receptor PAR₁ with Gα_{i1}, Gα₁₂, and β-arrestin 1. *The FASEB Journal* **24**(9): 3522–3535. doi: 10.1096/fj.10-154997
- Bachmann AS, Howard JP, Vogel C-W. 2006. Actin-binding protein filamin A is displayed on the surface of human neuroblastoma cells. *Cancer Science* **97**(12): 1359–1365. doi: 10.1111/j.1349-7006.2006.00327.x
- Bady P, Sciuscio D, Diserens A-C, Bloch J, van den Bent MJ, Marosi C, Dietrich P-Y, Weller M, Mariani L, Heppner FL, et al. 2012. MGMT methylation analysis of glioblastoma on the Infinium methylation BeadChip identifies two distinct CpG regions associated with gene silencing and outcome, yielding a prediction model for comparisons across datasets, tumor grades, and CIMP-status. *Acta Neuropathol* **124**(4): 547–560. doi: 10.1007/s00401-012-1016-2
- Bai R-Y, Staedtke V, Riggins GJ. 2011. Molecular targeting of glioblastoma: drug discovery and therapies. *Trends Mol Med* **17**(6): 301–312. doi: 10.1016/j.molmed.2011.01.011
- Balss J, Meyer J, Mueller W, Korshunov A, Hartmann C, von Deimling A. 2008. Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathol* **116**(6):597-602. doi: 10.1007/s00401-008-0455-2.
- Batchelor TT, Duda DG, di Tomaso E, Ancukiewicz M, Plotkin SR, Gerstner E, Eichler AF, Drappatz J, Hochberg FH, Benner T, et al. 2010. Phase II study of cediranib, an oral pan-vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol* **28**(17): 2817–2823. doi: 10.1200/JCO.2009.26.3988
- Batchelor TT, Gerstner ER, Ye X, Desideri S, Duda DG, Peereboom D, Lesser GJ, Chowdhary S, Wen PY, Grossman S, et al. 2017. Feasibility, phase I, and phase II studies of tandutinib, an oral platelet-derived growth factor receptor-β tyrosine kinase inhibitor, in patients with recurrent glioblastoma. *Neuro-oncology* **19**(4): 567–575. doi: 10.1093/neuonc/now185

- Bayat Mokhtari R, Homayouni TS, Baluch N, Morgatskaya E, Kumar S, Das B, Yeger H. 2017. Combination therapy in combating cancer. *Oncotarget* **8**(23): 38022–38043. doi: 10.18632/oncotarget.16723
- Bedolla RG, Wang Y, Asuncion A, Chamie K, Siddiqui S, Mudryj MM, Prihoda TJ, Siddiqui J, Chinnaiyan AM, Mehra R, et al. 2009. Nuclear versus cytoplasmic localization of Filamin A in Prostate Cancer: immunohistochemical correlation with metastases. *Clin Cancer Res* **15**(3): 788–796. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1402
- Bellanger J-M, Astier C, Sardet C, Ohta Y, Stossel TP, Debant A. 2000. The Rac1- and RhoG-specific GEF domain of Trio targets filamin to remodel cytoskeletal actin. *Nature Cell Biology* **2**(12): 888–892. doi: 10.1038/35046533
- van den Bent MJ, Brandes AA, Rampling R, Kouwenhoven MCM, Kros JM, Carpentier AF, Clement PM, Frenay M, Campone M, Baurain J-F, et al. 2009. Randomized phase II trial of erlotinib versus temozolomide or carmustine in recurrent glioblastoma: EORTC brain tumor group study 26034. *J Clin Oncol* **27**(8): 1268–1274. doi: 10.1200/JCO.2008.17.5984
- Bent MJ van den, Carpentier AF, Brandes AA, Sanson M, Taphoorn MJB, Bernsen HJJA, Frenay M, Tijssen CC, Grisold W, Sips L, et al. 2006. Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine improves progression-free survival but not overall survival in newly diagnosed anaplastic oligodendrogliomas and oligoastrocytomas: a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer phase III trial. *J Clin Oncol* **24**(18): 2715–22. doi: 10.1200/JCO.2005.04.6078
- Beppu T, Kamada K, Yoshida Y, Arai H, Ogasawara K, Ogawa A. 2002. Change of oxygen pressure in glioblastoma tissue under various conditions. *J Neurooncol* **58**(1): 47–52.
- Bergers G. 2009. Bone Marrow-Derived Cells in GBM Neovascularization. In: Meir EG, editor. *CNS Cancer: Models, Markers, Prognostic Factors, Targets, and Therapeutic Approaches*. Totowa, NJ: Humana Press. p. 749–773. doi: 10.1007/978-1-60327-553-8_31
- Berndt MC, Gregory C, Kabral A, Zola H, Fournier D, Castaldi PA. 1985. Purification and preliminary characterization of the glycoprotein Ib complex in the human platelet membrane. *European Journal of Biochemistry* **151**(3): 637–649. doi: 10.1111/j.1432-1033.1985.tb09152.x
- Bernhart E, Damm S, Wintersperger A, Nussold C, Brunner AM, Plastira I, Rechberger G, Reicher H, Wadsack C, Zimmer A, et al. 2015. Interference with distinct steps of sphingolipid synthesis and signaling attenuates proliferation of U87MG glioma cells. *Biochemical Pharmacology* **96**(2): 119–130. doi: 10.1016/j.bcp.2015.05.007
- Berry FB, O'Neill MA, Coca-Prados M, Walter MA. 2005. FOXC1 Transcriptional regulatory activity is impaired by PBX1 in a Filamin A-Mediated manner. *Molecular and Cellular Biology* **25**(4): 1415–1424. doi: 10.1128/MCB.25.4.1415-1424.2005
- Bhandari D, Robia SL, Marchese A. 2009. The E3 ubiquitin ligase atrophin interacting protein 4 binds directly to the chemokine receptor CXCR4 via a novel WW domain-mediated interaction. *Mol Biol Cell* **20**(5): 1324–1339. doi: 10.1091/mbc.e08-03-0308
- Bien-Möller S, Lange S, Holm T, Böhm A, Paland H, Küpper J, Herzog S, Weitmann K, Havemann C, Vogelgesang S, et al. 2016. Expression of S1P metabolizing enzymes and receptors correlate with survival time and regulate cell migration in glioblastoma multiforme. *Oncotarget* **7**(11): 13031–13046. doi: 10.18632/oncotarget.7366
- Bousquet C, Guillermet-Guibert J, Saint-Laurent N, Archer-Lahlou E, Lopez F, Fanjul M, Ferrand A, Fourmy D, Pichereaux C, Monsarrat B, et al. 2006. Direct binding of p85 to sst2 somatostatin receptor reveals a novel mechanism for inhibiting PI3K pathway. *EMBO J* **25**(17): 3943–3954. doi: 10.1038/sj.emboj.7601279
- Boutet A, De Frutos CA, Maxwell PH, Mayol MJ, Romero J, Nieto MA. 2006. Snail activation disrupts tissue homeostasis and induces fibrosis in the adult kidney. *EMBO J* **25**(23): 5603–5613. doi: 10.1038/sj.emboj.7601421

- Brada M, Ford D, Ashley S, Bliss JM, Crowley S, Mason M, Rajan B, Traish D. 1992. Risk of second brain tumour after conservative surgery and radiotherapy for pituitary adenoma. *BMJ* **304**(6838): 1343–1346. doi: 10.1136/bmj.304.6838.1343
- Brat DJ, Castellano-Sanchez AA, Hunter SB, Pecot M, Cohen C, Hammond EH, Devi SN, Kaur B, Van Meir EG. 2004. Pseudopalisades in glioblastoma are hypoxic, express extracellular matrix proteases, and are formed by an actively migrating cell population. *Cancer Res* **64**(3): 920–927.
- Bröcker, F, Bardenheuer W, Vieten L, Jülicher K, Werner N, Marquitan G, Michael D, Opalka B, Schütte J. 1999. Assignment¹ of human filamin gene FLNB to human chromosome band 3p14.3 and identification of YACs containing the complete FLNB transcribed region. *Cytogenet Genome Res* **85**(3–4): 267–268. doi: 10.1159/000015309
- Bronner SM, Merrick KA, Murray J, Salphati L, Moffat JG, Pang J, Sneeringer CJ, Dompe N, Cyr P, Purkey H, et al. 2019. Design of a brain-penetrant CDK4/6 inhibitor for glioblastoma. *Bioorg Med Chem Lett* **29**(16): 2294–2301. doi: 10.1016/j.bmcl.2019.06.021
- Browne KA, Johnstone RW, Jans DA, Trapani JA. 2000. Filamin (280-kDa Actin-binding Protein) is a caspase substrate and is also cleaved directly by the Cytotoxic T Lymphocyte Protease Granzyme B during Apoptosis. *J Biol Chem* **275**(50): 39262–39266. doi: 10.1074/jbc.C000622200
- Burger JA, Kipps TJ. 2006. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood* **107**(5): 1761–1767. doi: 10.1182/blood-2005-08-3182
- Brulé C, Perzo N, Joubert J-E, Sainsily X, Leduc R, Castel H, Prézeau L. 2014. Biased signaling regulates the pleiotropic effects of the urotensin II receptor to modulate its cellular behaviors. *The FASEB Journal* **28**(12): 5148–5162. doi: 10.1096/fj.14-249771
- Burns JM, Summers BC, Wang Y, Melikian A, Berahovich R, Miao Z, Penfold MET, Sunshine MJ, Littman DR, Kuo CJ, et al. 2006. A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J Exp Med* **203**(9): 2201–2213. doi: 10.1084/jem.20052144
- Burridge K, Chrzanowska-Wodnicka M. 1996. Focal Adhesions, Contractility, and Signaling. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **12**(1): 463–519. doi: 10.1146/annurev.cellbio.12.1.463
- Cairncross G, Berkey B, Shaw E, Jenkins R, Scheithauer B, Brachman D, Buckner J, Fink K, Souhami L, Mehta M, et al. 2006. Phase III trial of chemotherapy plus radiotherapy compared with radiotherapy alone for pure and mixed anaplastic oligodendroglioma: Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402. *J Clin Oncol* **24**(18): 2707–14. doi: 10.1200/JCO.2005.04.3414
- Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, Hogg TL, Fuller C, Hamner B, Oh EY, Gaber MW, Finklestein D, Allen M, et al. 2007. A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell* **11**(1): 69–82. doi: 10.1016/j.ccr.2006.11.020
- Calderwood DA, Huttenlocher A, Kiosses WB, Rose DM, Woodside DG, Schwartz MA, Ginsberg MH. 2001. Increased filamin binding to β -integrin cytoplasmic domains inhibits cell migration. *Nature Cell Biology* **3**(12): 1060–1068. doi: 10.1038/ncb1201-1060
- Callan-Jones AC, Voituriez R. 2016. Actin flows in cell migration: from locomotion and polarity to trajectories. *Current Opinion in Cell Biology* **38**: 12–17. doi: 10.1016/j.ceb.2016.01.003
- Carmeliet P, Jain RK. 2000. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* **407**(6801): 249–257. doi: 10.1038/35025220
- Carro MS, Lim WK, Alvarez MJ, Bollo RJ, Zhao X, Snyder EY, Sulman EP, Anne SL, Doetsch F, Colman H, et al. 2010. The transcriptional network for mesenchymal transformation of brain tumours. *Nature* **463**(7279): 318–325. doi: 10.1038/nature08712
- Caspani EM, Crossley PH, Redondo-Garcia C, Martinez S. 2014. Glioblastoma: a pathogenic crosstalk between tumor cells and pericytes. Castro MG, editor. *PLoS ONE* **9**(7): e101402. doi: 10.1371/journal.pone.0101402

- Castañón MJ, Walko G, Winter L, Wiche G. 2013. Plectin–intermediate filament partnership in skin, skeletal muscle, and peripheral nerve. *Histochem Cell Biol* **140**(1): 33–53. doi: 10.1007/s00418-013-1102-0
- Castel H, Desrues L, Joubert J-E, Tonon M-C, Prézeau L, Chabbert M, Morin F, Gandolfo P. 2017. The G Protein-Coupled Receptor UT of the Neuropeptide Urotensin II displays structural and functional chemokine features. *Front Endocrinol* **8**. doi: 10.3389/fendo.2017.00076
- Catalona WJ. 1994. Management of cancer of the prostate. *N Engl J Med* **331**(15): 996–1004. doi: 10.1056/NEJM199410133311507
- Chai R-C, Zhang K-N, Chang Y-Z, Wu F, Liu Y-Q, Zhao Z, Wang K-Y, Chang Y-H, Jiang T, Wang Y-Z. 2019. Systematically characterize the clinical and biological significances of 1p19q genes in 1p/19q non-codeletion glioma. *Carcinogenesis*, **40**(10):1229-123. doi: 10.1093/carcin/bgz102
- Chakarova C, Wehnert MS, Uhl K, Sakthivel S, Vosberg H-P, van der Ven PFM, Fürst DO. 2000. Genomic structure and fine mapping of the two human filamin gene paralogues FLNB and FLNC and comparative analysis of the filamin gene family. *Human Genetics* **107**(6): 597–611. doi: 10.1007/s004390000414
- Chan AK-Y, Yao Y, Zhang Z, Chung NY-F, Liu JS-M, Li KK-W, Shi Z, Chan DT-M, Poon WS, Zhou L, et al. 2015. TERT promoter mutations contribute to subset prognostication of lower-grade gliomas. *Modern Pathology* **28**(2): 177–186. doi: 10.1038/modpathol.2014.94
- Chao H-H, Sung L-C, Chen C-H, Liu J-C, Chen J-J, Cheng T-H. 2014. Lycopene inhibits urotensin-II-induced cardiomyocyte hypertrophy in neonatal rat cardiomyocytes. *Evid Based Complement Alternat Med* **2014**: 724670. doi: 10.1155/2014/724670
- Chen H, Zhu X, Cong P, Sheetz MP, Nakamura F, Yan J. 2011. Differential mechanical stability of Filamin a rod segments. *Biophys J* **101**(5): 1231–1237. doi: 10.1016/j.bpj.2011.07.028
- Chen M, Stracher A. 1989. In situ phosphorylation of platelet actin-binding protein by cAMP-dependent protein kinase stabilizes it against proteolysis by calpain. *J Biol Chem* **264**(24): 14282–14289.
- Cheng P, Wang J, Waghmare I, Sartini S, Coviello V, Zhang Z, Kim S-H, Mohyeldin A, Pavlyukov MS, Minata M, et al. 2016. FOXD1-ALDH1A3 signaling is a determinant for the self-renewal and tumorigenicity of mesenchymal glioma stem cells. *Cancer Res* **76**(24): 7219–7230. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-2860
- Cheng W-Y, Kandel JJ, Yamashiro DJ, Canoll P, Anastassiou D. 2012. A multi-cancer mesenchymal transition gene expression signature is associated with prolonged time to recurrence in glioblastoma. *PLoS ONE* **7**(4): e34705. doi: 10.1371/journal.pone.0034705
- Chetty C, Vanamala SK, Gondi CS, Dinh DH, Gujrati M, Rao JS. 2012. MMP-9 induces CD44 cleavage and CD44 mediated cell migration in Glioblastoma xenograft cells. *Cell Signal* **24**(2): 549–559. doi: 10.1016/j.cellsig.2011.10.008
- Chiche J, Ilc K, Laferrière J, Trottier E, Dayan F, Mazure NM, Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J. 2009. Hypoxia-inducible carbonic anhydrase IX and XII promote tumor cell growth by counteracting acidosis through the regulation of the intracellular pH. *Cancer Res* **69**(1): 358–368. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2470
- Chinot OL, Wick W, Mason W, Henriksson R, Saran F, Nishikawa R, Carpentier AF, Hoang-Xuan K, Kavan P, Cernea D, et al. 2014. Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med* **370**(8): 709–722. doi: 10.1056/NEJMoa1308345
- Chistiakov DA, Chekhonin IV, Chekhonin VP. 2017. The EGFR variant III mutant as a target for immunotherapy of glioblastoma multiforme. *Eur J Pharmacol* **810**: 70–82. doi: 10.1016/j.ejphar.2017.05.064
- Christensen JR, Hocky GM, Homa KE, Morganthaler AN, Hitchcock-DeGregori SE, Voth GA, Kovar DR. n.d. Competition between Tropomyosin, Fimbrin, and ADF/Cofilin drives their sorting to distinct actin filament networks. *eLife* **6**. doi: 10.7554/eLife.23152
- Ciombor KK, Berlin J. 2014. Aflibercept--a decoy VEGF receptor. *Curr Oncol Rep* **16**(2): 368. doi: 10.1007/s11912-013-0368-7

- Cirillo P, De Rosa S, Pacileo M, Gargiulo A, Angri V, Fiorentino I, Prevete N, Petrillo G, De Palma R, Leonardi A, et al. 2008. Human urotensin II induces tissue factor and cellular adhesion molecules expression in human coronary endothelial cells: an emerging role for urotensin II in cardiovascular disease. *J Thromb Haemost* **6**(5): 726–736. doi: 10.1111/j.1538-7836.2008.02923.x
- Civciristov S, Ellisdon AM, Suderman R, Pon CK, Evans BA, Kleifeld O, Charlton SJ, Hlavacek WS, Canals M, Halls ML. 2018. Preassembled GPCR signaling complexes mediate distinct cellular responses to ultralow ligand concentrations. *Science Signaling* **11**(551): eaan1188. doi: 10.1126/scisignal.aan1188
- Clark AR, Sawyer GM, Robertson SP, Sutherland-Smith AJ. 2009. Skeletal dysplasias due to filamin A mutations result from a gain-of-function mechanism distinct from allelic neurological disorders. *Hum Mol Genet* **18**(24): 4791–4800. doi: 10.1093/hmg/ddp442
- Cohen MH, Shen YL, Keegan P, Pazdur R. 2009. FDA drug approval summary: bevacizumab (Avastin) as treatment of recurrent glioblastoma multiforme. *Oncologist* **14**(11): 1131–1138. doi: 10.1634/theoncologist.2009-0121
- Collins VP, Jones DTW, Giannini C. 2015. Pilocytic astrocytoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol* **129**(6): 775–788. doi: 10.1007/s00401-015-1410-7
- Colwell N, Larion M, Giles AJ, Seldomridge AN, Sizdahkhani S, Gilbert MR, Park DM. 2017. Hypoxia in the glioblastoma microenvironment: shaping the phenotype of cancer stem-like cells. *Neuro-Oncology* **19**(7): 887–896. doi: 10.1093/neuonc/now258
- Coly P-M, Perzo N, Le Joncour V, Lecointre C, Schouft M-T, Desrues L, Tonon M-C, Wurtz O, Gandolfo P, Castel H, et al. 2016. Chemotactic G protein-coupled receptors control cell migration by repressing autophagosome biogenesis. *Autophagy* **12**(12): 2344–2362. doi: 10.1080/15548627.2016.1235125
- Condeelis J, Geosits S, Vahey M. 1982. Isolation of a new actin-binding protein from dictyostelium discoideum. *Cell Motility* **2**(3): 273–285. doi: 10.1002/cm.970020307
- Conlon JM, Tostivint H, Vaudry H. 1997. Somatostatin- and urotensin II-related peptides: molecular diversity and evolutionary perspectives. *Regul Pept* **69**(2): 95–103. doi: 10.1016/s0167-0115(97)02135-6
- Cooper LAD, Gutman DA, Chisolm C, Appin C, Kong J, Rong Y, Kurc T, Van Meir EG, Saltz JH, Moreno CS, et al. 2012. The tumor microenvironment strongly impacts master transcriptional regulators and gene expression class of glioblastoma. *The American Journal of Pathology* **180**(5): 2108–2119. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.01.040
- Cortes JE, Pazdur R. 1995. Docetaxel. *JCO* **13**(10): 2643–2655. doi: 10.1200/JCO.1995.13.10.2643
- Coudeelis J, Salisbury J, Fujiwara K. 1981. A new protein that gels F actin in the cell cortex of Dictyostelium discoideum. *Nature* **292**(5819): 161–162. doi: 10.1038/292161a0
- Coulouarn Y, Lihmann I, Jegou S, Anouar Y, Tostivint H, Beauvillain JC, Conlon JM, Bern HA, Vaudry H. 1998. Cloning of the cDNA encoding the urotensin II precursor in frog and human reveals intense expression of the urotensin II gene in motoneurons of the spinal cord. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**(26): 15803–15808. doi: 10.1073/pnas.95.26.15803
- Covello KL, Kehler J, Yu H, Gordan JD, Arsham AM, Hu C-J, Labosky PA, Simon MC, Keith B. 2006. HIF-2 α regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes Dev* **20**(5): 557–570. doi: 10.1101/gad.1399906
- Cox D, Condeelis J, Wessels D, Soll D, Kern H, Knecht DA. 1992. Targeted disruption of the ABP-120 gene leads to cells with altered motility. *J Cell Biol* **116**(4): 943–955. doi: 10.1083/jcb.116.4.943
- Cox D, Wessels D, Soll DR, Hartwig J, Condeelis J. 1996. Re-expression of ABP-120 rescues cytoskeletal, motility, and phagocytosis defects of ABP-120- Dictyostelium mutants. *Mol Biol Cell* **7**(5): 803–823. doi: 10.1091/mbc.7.5.803
- Cuddapah VA, Turner KL, Seifert S, Sontheimer H. 2013. Bradykinin-induced chemotaxis of human gliomas requires the activation of KCa3.1 and ClC-3. *J Neurosci* **33**(4): 1427–1440. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3980-12.2013

- Cukier IH, Li Y, Lee JM. 2007. Cyclin B1/Cdk1 binds and phosphorylates Filamin A and regulates its ability to cross-link actin. *FEBS Letters* **581**(8): 1661–1672. doi: 10.1016/j.febslet.2007.03.041
- Davies PJ, Wallach D, Willingham MC, Pastan I, Yamaguchi M, Robson RM. 1978. Filamin-actin interaction. Dissociation of binding from gelation by Ca²⁺-activated proteolysis. *J Biol Chem* **253**(11): 4036–4042.
- Décaillot FM, Kazmi MA, Lin Y, Ray-Saha S, Sakmar TP, Sachdev P. 2011. CXCR7/CXCR4 heterodimer constitutively recruits beta-arrestin to enhance cell migration. *J Biol Chem* **286**(37): 32188–32197. doi: 10.1074/jbc.M111.277038
- Delbaldo C, Faivre S, Dreyer C, Raymond E. 2012. Sunitinib in advanced pancreatic neuroendocrine tumors: latest evidence and clinical potential. *Therapeutic Advances in Medical Oncology* **4**(1): 9–18. doi: 10.1177/1758834011428147
- Deng W, Lopez-Camacho C, Tang J-Y, Mendoza-Villanueva D, Maya-Mendoza A, Jackson DA, Shore P. 2012. Cytoskeletal protein filamin A is a nucleolar protein that suppresses ribosomal RNA gene transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**(5): 1524–1529. doi: 10.1073/pnas.1107879109
- Desbaillets I, Diserens AC, Tribolet N, Hamou MF, Van Meir EG. 1997. Upregulation of interleukin 8 by oxygen-deprived cells in glioblastoma suggests a role in leukocyte activation, chemotaxis, and angiogenesis. *J Exp Med* **186**(8): 1201–1212. doi: 10.1084/jem.186.8.1201
- Di Renzo MF, Poulson R, Olivero M, Comoglio PM, Lemoine NR. 1995. Expression of the Met/hepatocyte growth factor receptor in human pancreatic cancer. *Cancer Res* **55**(5): 1129–1138.
- Diebold I, Petry A, Burger M, Hess J, Görlach A. 2011. NOX4 mediates activation of FoxO3a and matrix metalloproteinase-2 expression by urotensin-II. *Mol Biol Cell* **22**(22): 4424–4434. doi: 10.1091/mbc.E10-12-0971
- Diebold I, Petry A, Sabrane K, Djordjevic T, Hess J, Görlach A. 2012. The HIF1 target gene NOX2 promotes angiogenesis through urotensin-II. *J Cell Sci* **125**(Pt 4): 956–964. doi: 10.1242/jcs.094060
- Djordjevic T, Belaiba RS, Bonello S, Pfeilschifter J, Hess J, Görlach A. 2005. Human urotensin II is a novel activator of NADPH oxidase in human pulmonary artery smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**(3): 519–525. doi: 10.1161/01.ATV.0000154279.98244.eb
- Doan ND, Nguyen TTM, Létourneau M, Turcotte K, Fournier A, Chatenet D. 2012. Biochemical and pharmacological characterization of nuclear urotensin-II binding sites in rat heart. *British Journal of Pharmacology* **166**(1): 243–257. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01710.x
- Douglas SA, Ohlstein EH. 2000. Human urotensin-II, the most potent mammalian vasoconstrictor identified to date, as a therapeutic target for the management of cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med* **10**(6): 229–237. doi: 10.1016/s1050-1738(00)00069-4
- Douglas SA, Tayara L, Ohlstein EH, Halawa N, Giaid A. 2002. Congestive heart failure and expression of myocardial urotensin II. *Lancet* **359**(9322): 1990–1997. doi: 10.1016/S0140-6736(02)08831-1
- Drappatz J, Lee EQ, Hammond S, Grimm SA, Norden AD, Beroukhi R, Gerard M, Schiff D, Chi AS, Batchelor TT, et al. 2012. Phase I study of panobinostat in combination with bevacizumab for recurrent high-grade glioma. *J Neurooncol* **107**(1): 133–138. doi: 10.1007/s11060-011-0717-z
- Du X-J, Li X-M, Cai L-B, Sun J-C, Wang S-Y, Wang X-C, Pang X-L, Deng M-L, Chen F-F, Wang Z-Q, et al. 2019. Efficacy and safety of nimotuzumab in addition to radiotherapy and temozolomide for cerebral glioblastoma: a phase II multicenter clinical trial. *J Cancer* **10**(14): 3214–3223. doi: 10.7150/jca.30123
- Dubreuil RR. 1991. Structure and evolution of the actin crosslinking proteins. *BioEssays* **13**(5): 219–226. doi: 10.1002/bies.950130504
- Dvorak HF. 2015. Tumors: wounds that do not heal-redux. *Cancer Immunol Res* **3**(1): 1–11. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0209

- Eckel-Passow JE, Lachance DH, Molinaro AM, Walsh KM, Decker PA, Sicotte H, Pekmezci M, Rice T, Kosel ML, Smirnov IV, et al. 2015. Glioma Groups Based on 1p/19q, IDH, and TERT Promoter Mutations in Tumors. *N Engl J Med* **372**(26): 2499–2508. doi: 10.1056/NEJMoa1407279
- Eckerich C, Zapf S, Fillbrandt R, Loges S, Westphal M, Lamszus K. 2007. Hypoxia can induce c-Met expression in glioma cells and enhance SF/HGF-induced cell migration. *Int J Cancer* **121**(2): 276–283. doi: 10.1002/ijc.22679
- Ehrlicher AJ, Nakamura F, Hartwig JH, Weitz DA, Stossel TP. 2011. Mechanical strain in actin networks regulates FilGAP and integrin binding to filamin A. *Nature* **478**(7368): 260–263. doi: 10.1038/nature10430
- Ehtesham M, Winston JA, Kabos P, Thompson RC. 2006. CXCR4 expression mediates glioma cell invasiveness. *Oncogene* **25**(19): 2801–2806. doi: 10.1038/sj.onc.1209302
- El Hallani S, Boisselier B, Peglion F, Rousseau A, Colin C, Idbaih A, Marie Y, Mokhtari K, Thomas J-L, Eichmann A, et al. 2010. A new alternative mechanism in glioblastoma vascularization: tubular vasculogenic mimicry. *Brain* **133**(Pt 4): 973–982. doi: 10.1093/brain/awq044
- Elias MC, Tozer KR, Silber JR, Mikheeva S, Deng M, Morrison RS, Manning TC, Silbergeld DL, Glackin CA, Reh TA, et al. 2005. TWIST is expressed in human gliomas and promotes invasion. *Neoplasia* **7**(9): 824–837. doi: 10.1593/neo.04352
- Englund GD, Bodnar RJ, Li Z, Ruggeri ZM, Du X. 2001. Regulation of von Willebrand factor binding to the platelet glycoprotein Ib-IX by a membrane skeleton-dependent inside-out signal. *J Biol Chem* **276**(20): 16952–16959. doi: 10.1074/jbc.M008048200
- Enz R. 2002. The actin-binding protein Filamin-A interacts with the metabotropic glutamate receptor type 7. *FEBS Letters* **514**(2–3): 184–188. doi: 10.1016/S0014-5793(02)02361-X
- Enz R, Croci C. 2003. Different binding motifs in metabotropic glutamate receptor type 7b for filamin A, protein phosphatase 1C, protein interacting with protein kinase C (PICK) 1 and syntenin allow the formation of multimeric protein complexes. *Biochem J* **372**(Pt 1): 183–191. doi: 10.1042/BJ20021750
- Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A, et al. 2001. C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* **107**(1): 43–54. doi: 10.1016/S0092-8674(01)00507-4
- Erecińska M, Silver IA. 2001. Tissue oxygen tension and brain sensitivity to hypoxia. *Respir Physiol* **128**(3): 263–276. doi: 10.1016/S0034-5687(01)00306-1
- Esencay M, Sarfraz Y, Zagzag D. 2013. CXCR7 is induced by hypoxia and mediates glioma cell migration towards SDF-1 α . *BMC Cancer* **13**(1). doi: 10.1186/1471-2407-13-347
- Esposito G, Perrino C, Cannavo A, Schiattarella GG, Borgia F, Sannino A, Pironti G, Gargiulo G, Serafino LD, Franzone A, et al. 2011. EGFR trans-activation by urotensin II receptor is mediated by β -arrestin recruitment and confers cardioprotection in pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Basic Res Cardiol* **106**(4): 577–589. doi: 10.1007/s00395-011-0163-2
- Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, Baylin SB, Herman JG. 2000. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* **343**(19): 1350–1354. doi: 10.1056/NEJM200011093431901
- Fagerholm SC, Hilden TJ, Nurmi SM, Gahmberg CG. 2005. Specific integrin alpha and beta chain phosphorylations regulate LFA-1 activation through affinity-dependent and -independent mechanisms. *J Cell Biol* **171**(4): 705–715. doi: 10.1083/jcb.200504016
- Farashi S, Hartevelde CL. 2018. Molecular basis of α -thalassemia. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* **70**: 43–53. doi: 10.1016/j.bcmd.2017.09.004
- Farin A, Suzuki SO, Weiker M, Goldman JE, Bruce JN, Canoll P. 2006. Transplanted glioma cells migrate and proliferate on host brain vasculature: A dynamic analysis. *Glia* **53**(8): 799–808. doi: 10.1002/glia.20334
- Federico A, Zappavigna S, Romano M, Grieco P, Luce A, Marra M, Gravina AG, Stiuso P, D'Armiento FP, Vitale G, et al. 2014. Urotensin-II receptor is over-expressed in colon cancer cell lines and in

- colon carcinoma in humans. *European Journal of Clinical Investigation* **44**(3): 285–294. doi: 10.1111/eci.12231
- Feng Y, Chen MH, Moskowitz IP, Mendonza AM, Vidali L, Nakamura F, Kwiatkowski DJ, Walsh CA. 2006. Filamin A (FLNA) is required for cell–cell contact in vascular development and cardiac morphogenesis. *PNAS* **103**(52): 19836–19841. doi: 10.1073/pnas.0609628104
- Finer JT, Simmons RM, Spudich JA. 1994. Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanometre steps. *Nature* **368**(6467): 113–119. doi: 10.1038/368113a0
- Fisher PR, Noegel AA, Fechheimer M, Rivero F, Prassler J, Gerisch G. 1997. Photosensory and thermosensory responses in Dictyostelium slugs are specifically impaired by absence of the F-actin cross-linking gelation factor (ABP-120). *Curr Biol* **7**(11): 889–892. doi: 10.1016/s0960-9822(06)00379-4
- Flannery T, McQuaid S, McGoohan C, McConnell RS, McGregor G, Mirakhur M, Hamilton P, Diamond J, Cran G, Walker B, et al. 2006. Cathepsin S expression: An independent prognostic factor in glioblastoma tumours—a pilot study. *International Journal of Cancer* **119**(4): 854–860. doi: 10.1002/ijc.21911
- Fucini P, Renner C, Herberhold C, Noegel AA, Holak TA. 1997. The repeating segments of the F-actin cross-linking gelation factor (ABP-120) have an immunoglobulin-like fold. *Nat Struct Biol* **4**(3): 223–230. doi: 10.1038/nsb0397-223
- van der Flier A, Kuikman I, Kramer D, Geerts D, Kreft M, Takafuta T, Shapiro SS, Sonnenberg A. 2002. Different splice variants of filamin-B affect myogenesis, subcellular distribution, and determine binding to integrin β subunits. *J Cell Biol* **156**(2): 361–376. doi: 10.1083/jcb.200103037
- Folberg R, Maniotis AJ. 2004. Vasculogenic mimicry. *APMIS* **112**(7–8): 508–525. doi: 10.1111/j.1600-0463.2004.apm11207-0810.x
- Foster GV. 1968. Calcitonin (Thyrocalcitonin). *N Engl J Med* **279**(7):349-60.doi: 10.1056/NEJM19680815279070
- Fox JW, Lamperti ED, Ekşioğlu YZ, Hong SE, Feng Y, Graham DA, Scheffer IE, Dobyns WB, Hirsch BA, Radtke RA, et al. 1998. Mutations in filamin 1 prevent migration of cerebral cortical neurons in human periventricular heterotopia. *Neuron* **21**(6): 1315–1325. doi: 10.1016/s0896-6273(00)80651-0
- Friedman HS, McLendon RE, Kerby T, Dugan M, Bigner SH, Henry AJ, Ashley DM, Krischer J, Lovell S, Rasheed K, et al. 1998. DNA mismatch repair and O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase analysis and response to Temodal in newly diagnosed malignant glioma. *J Clin Oncol* **16**(12): 3851–3857. doi: 10.1200/JCO.1998.16.12.3851
- Friedman HS, Prados MD, Wen PY, Mikkelsen T, Schiff D, Abrey LE, Yung WKA, Paleologos N, Nicholas MK, Jensen R, et al. 2009. Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol* **27**(28): 4733–4740. doi: 10.1200/JCO.2008.19.8721
- Friedman JM. 1993. Neurofibromatosis 1. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Stephens K, Amemiya A, editors. *GeneReviews*®. Seattle (WA): University of Washington, Seattle. Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1109/>. Accessed 2019 Sep 22.
- Furuhashi K, Inagaki M, Hatano S, Fukami K, Takenawa T. 1992. Inositol phospholipid — Induced suppression of F-actin-gelating activity of smooth muscle filamin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **184**(3): 1261–1265. doi: 10.1016/S0006-291X(05)80018-X
- Gagner J-P, Sarfraz Y, Ortenzi V, Alotaibi FM, Chiriboga LA, Tayyib AT, Douglas GJ, Chevalier E, Romagnoli B, Tuffin G, et al. 2017. Multifaceted C-X-C chemokine receptor 4 (CXCR4) inhibition interferes with anti-vascular endothelial growth factor therapy-induced glioma dissemination. *Am J Pathol* **187**(9): 2080–2094. doi: 10.1016/j.ajpath.2017.04.020
- Galanis E, Anderson SK, Twohy EL, Carrero XW, Dixon JG, Tran DD, Jeyapalan SA, Anderson DM, Kaufmann TJ, Feathers RW, et al. 2019 Jul 10. A phase 1 and randomized, placebo-controlled phase 2 trial of bevacizumab plus dasatinib in patients with recurrent glioblastoma:

- Alliance/North Central Cancer Treatment Group N0872. *Cancer*, in press. doi: 10.1002/cncr.32340
- Galanis E, Buckner JC, Maurer MJ, Kreisberg JI, Ballman K, Boni J, Peralba JM, Jenkins RB, Dakhil SR, Morton RF, et al. 2005. Phase II trial of temsirolimus (CCI-779) in recurrent glioblastoma multiforme: a North Central Cancer Treatment Group Study. *J Clin Oncol* **23**(23): 5294–5304. doi: 10.1200/JCO.2005.23.622
- Galanis E, Jaeckle KA, Maurer MJ, Reid JM, Ames MM, Hardwick JS, Reilly JF, Loboda A, Nebozhyn M, Fantin VR, et al. 2009. Phase II trial of vorinostat in recurrent glioblastoma multiforme: a north central cancer treatment group study. *J Clin Oncol* **27**(12): 2052–2058. doi: 10.1200/JCO.2008.19.0694
- García E, Stracher A, Jay D. 2006. Calcineurin dephosphorylates the C-terminal region of filamin in an important regulatory site: A possible mechanism for filamin mobilization and cell signaling. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **446**(2): 140–150. doi: 10.1016/j.abb.2005.12.006
- Gardel ML, Nakamura F, Hartwig JH, Crocker JC, Stossel TP, Weitz DA. 2006. Prestressed F-actin networks cross-linked by hinged filamins replicate mechanical properties of cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(6): 1762–1767. doi: 10.1073/pnas.0504777103
- Gerstner ER, Emblem KE, Chi AS, Eichler AF, Hochberg F, Drappatz J, Quant EC, Norden AD, Pinho MC, Polaskova P, et al. 2012. Effects of cediranib, a VEGF signaling inhibitor, in combination with chemoradiation on tumor blood flow and survival in newly diagnosed glioblastoma. *JCO* **30**(15_suppl): 2009–2009. doi: 10.1200/jco.2012.30.15_suppl.2009
- Gibbons RJ, McDowell TL, Raman S, O'Rourke DM, Garrick D, Ayyub H, Higgs DR. 2000. Mutations in ATRX, encoding a SWI/SNF-like protein, cause diverse changes in the pattern of DNA methylation. *Nat Genet* **24**(4): 368–371. doi: 10.1038/74191
- Giese A, Bjerkvig R, Berens ME, Westphal M. 2003. Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment. *J Clin Oncol* **21**(8): 1624–1636. doi: 10.1200/JCO.2003.05.063
- Giese A, Westphal M. 1996. Glioma invasion in the central nervous system. *Neurosurgery* **39**(2): 235–250; discussion 250-252. doi: 10.1097/00006123-199608000-00001
- Giger RJ, Venkatesh K, Chivatakarn O, Raiker SJ, Robak L, Hofer T, Lee H, Rader C. 2008. Mechanisms of CNS myelin inhibition: evidence for distinct and neuronal cell type specific receptor systems. *Restor Neurol Neurosci* **26**(2–3): 97–115.
- Gimona M, Djinovic-Carugo K, Kranewitter WJ, Winder SJ. 2002. Functional plasticity of CH domains. *FEBS Letters* **513**(1): 98–106. doi: 10.1016/S0014-5793(01)03240-9
- Gingras MC, Roussel E, Bruner JM, Branch CD, Moser RP. 1995. Comparison of cell adhesion molecule expression between glioblastoma multiforme and autologous normal brain tissue. *J Neuroimmunol* **57**(1–2): 143–153. doi: 10.1016/0165-5728(94)00178-q
- Goldmann WH, Teodoridis JM, Sharma CP, Hu B, Isenberg G. 1999. Fragments from actin binding protein (ABP-280; Filamin) insert into reconstituted lipid layers. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **259**(1): 108–112. doi: 10.1006/bbrc.1999.0735
- Gordan JD, Bertout JA, Hu C-J, Diehl JA, Simon MC. 2007. HIF-2alpha promotes hypoxic cell proliferation by enhancing c-myc transcriptional activity. *Cancer Cell* **11**(4): 335–347. doi: 10.1016/j.ccr.2007.02.006
- Gorlin RJ, Cohen MM. 1969. Frontometaphyseal dysplasia. A new syndrome. *Am J Dis Child* **118**(3): 487–494. doi: 10.1001/archpedi.1969.02100040489014
- Gorlin JB, Yamin R, Egan S, Stewart M, Stossel TP, Kwiatkowski DJ, Hartwig JH. 1990. Human endothelial actin-binding protein (ABP-280, nonmuscle filamin): a molecular leaf spring. *J Cell Biol* **111**(3):1089-105. doi: 10.1083/jcb.111.3.1089
- Gravina GL, Mancini A, Marampon F, Colapietro A, Delle Monache S, Sferra R, Vitale F, Richardson PJ, Patient L, Burbidge S, et al. 2017. The brain-penetrating CXCR4 antagonist, PRX177561, increases the antitumor effects of bevacizumab and sunitinib in preclinical models of human glioblastoma. *J Hematol Oncol* **10**(1): 5. doi: 10.1186/s13045-016-0377-8

- Grieco P, Franco R, Bozzuto G, Toccaceli L, Sgambato A, Marra M, Zappavigna S, Migaldi M, Rossi G, Striano S, et al. 2011. Urotensin II receptor predicts the clinical outcome of prostate cancer patients and is involved in the regulation of motility of prostate adenocarcinoma cells. *J Cell Biochem* **112**(1): 341–353. doi: 10.1002/jcb.22933
- de Groot JF, Lamborn KR, Chang SM, Gilbert MR, Cloughesy TF, Aldape K, Yao J, Jackson EF, Lieberman F, Robins HI, et al. 2011. Phase II study of aflibercept in recurrent malignant glioma: a North American Brain Tumor Consortium study. *J Clin Oncol* **29**(19): 2689–2695. doi: 10.1200/JCO.2010.34.1636
- Groves MD, Puduvali VK, Hess KR, Jaeckle KA, Peterson P, Alfred Yung W k., Levin VA. 2002. Phase II trial of temozolomide plus the matrix metalloproteinase inhibitor, marimastat, in recurrent and progressive glioblastoma multiforme. *JCO* **20**(5): 1383–1388. doi: 10.1200/JCO.2002.20.5.1383
- Gruson D, Ginion A, Decroly N, Lause P, Vanoverschelde JL, Ketelslegers JM, Bertrand L, Thissen JP. 2010. Urotensin II induction of adult cardiomyocytes hypertrophy involves the Akt/GSK-3beta signaling pathway. *Peptides* **31**(7): 1326–1333. doi: 10.1016/j.peptides.2010.04.009
- Guerrini R, Mei D, Sisodiya S, Sicca F, Harding B, Takahashi Y, Dorn T, Yoshida A, Campistol J, Krämer G, et al. 2004. Germline and mosaic mutations of FLN1 in men with periventricular heterotopia. *Neurology* **63**(1): 51–56. doi: 10.1212/01.wnl.0000132818.84827.4d
- Guidolin D, Albertin G, Ribatti D. 2010. Urotensin-II as an angiogenic factor. *Peptides* **31**(6): 1219–1224. doi: 10.1016/j.peptides.2010.03.022
- Guo C, Liang C, Yang J, Hu H, Fan B, Liu X. 2019. LATS2 inhibits cell proliferation and metastasis through the Hippo signaling pathway in glioma. *Oncol Rep* **41**(5): 2753–2761. doi: 10.3892/or.2019.7065
- Gustavsson H, Welén K, Damber J-E. 2005. Transition of an androgen-dependent human prostate cancer cell line into an androgen-independent subline is associated with increased angiogenesis. *The Prostate* **62**(4): 364–373. doi: 10.1002/pros.20145
- Hammer A, Rider L, Oladimeji P, Cook L, Li Q, Mattingly RR, Diakonova M. 2013. Tyrosyl Phosphorylated PAK1 regulates Breast Cancer Cell motility in response to Prolactin through Filamin A. *Molecular Endocrinology* **27**(3): 455–465. doi: 10.1210/me.2012-1291
- Hanyaloglu AC, Zastrow M von. 2008. Regulation of GPCRs by Endocytic Membrane Trafficking and Its Potential Implications. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **48**(1): 537–568. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.48.113006.094830
- Hardee ME, Zagzag D. 2012. Mechanisms of glioma-associated neovascularization. *Am J Pathol* **181**(4): 1126–1141. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.06.030
- Harms KL, Chen X. 2006. The functional domains in p53 family proteins exhibit both common and distinct properties. *Cell Death & Differentiation* **13**(6): 890–897. doi: 10.1038/sj.cdd.4401904
- Hartmann C, Hentschel B, Tatagiba M, Schramm J, Schnell O, Seidel C, Stein R, Reifenberger G, Pietsch T, von Deimling A, et al. 2011. Molecular markers in low-grade gliomas: predictive or prognostic? *Clinical Cancer Research* **17**(13): 4588–4599. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-3194
- Hartwig JH. 1980. Actin-binding protein promotes the bipolar and perpendicular branching of actin filaments. *The Journal of Cell Biology* **87**(3): 841–848. doi: 10.1083/jcb.87.3.841
- Hartwig JH, Stossel TP. 1975. Isolation and properties of actin, myosin, and a new actinbinding protein in rabbit alveolar macrophages. *J Biol Chem* **250**(14): 5696–5705.
- Hartwig JH, Stossel TP. 1981. Structure of macrophage actin-binding protein molecules in solution and interacting with actin filaments. *Journal of Molecular Biology* **145**(3): 563–581. doi: 10.1016/0022-2836(81)90545-3
- Hattermann K, Held-Feindt J, Lucius R, Mürköster SS, Penfold MET, Schall TJ, Mentlein R. 2010. The chemokine receptor CXCR7 is highly expressed in human glioma cells and mediates antiapoptotic effects. *Cancer Res* **70**(8): 3299–3308. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3642

- Hayashi K, Altman A. 2006. Filamin A is required for T Cell activation mediated by Protein Kinase C- θ . *The Journal of Immunology* **177**(3): 1721–1728. doi: 10.4049/jimmunol.177.3.1721
- Heikkinen OK, Ruskamo S, Konarev PV, Svergun DI, Iivanainen T, Heikkinen SM, Permi P, Koskela H, Kilpeläinen I, Yläne J. 2009. Atomic structures of two novel immunoglobulin-like domain pairs in the actin cross-linking protein Filamin. *J Biol Chem* **284**(37): 25450–25458. doi: 10.1074/jbc.M109.019661
- Helmlinger G, Yuan F, Dellian M, Jain RK. 1997. Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nat Med* **3**(2): 177–182. doi: 10.1038/nm0297-177
- Himmel M, Van Der Ven PFM, Stöcklein W, Fürst DO. 2003. The limits of promiscuity: isoform-specific dimerization of filamins. *Biochemistry* **42**(2): 430–439. doi: 10.1021/bi026501+
- Hoffman EP, Brown RH, Kunkel LM. 1987. Dystrophin: The protein product of the duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* **51**(6): 919–928. doi: 10.1016/0092-8674(87)90579-4
- Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, Boland P, Alexander CR, Zagzag D, Yancopoulos GD, Wiegand SJ. 1999. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* **284**(5422): 1994–1998. doi: 10.1126/science.284.5422.1994
- Hong X, Jiang F, Kalkanis SN, Zhang ZG, Zhang X-P, DeCarvalho AC, Katakowski M, Bobbitt K, Mikkelsen T, Chopp M. 2006. SDF-1 and CXCR4 are up-regulated by VEGF and contribute to glioma cell invasion. *Cancer Lett* **236**(1): 39–45. doi: 10.1016/j.canlet.2005.05.011
- Humphrey PA, Wong AJ, Vogelstein B, Zalutsky MR, Fuller GN, Archer GE, Friedman HS, Kwatra MM, Bigner SH, Bigner DD. 1990. Anti-synthetic peptide antibody reacting at the fusion junction of deletion-mutant epidermal growth factor receptors in human glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**(11): 4207–4211. doi: 10.1073/pnas.87.11.4207
- Hynes R. 1987. Integrins: A family of cell surface receptors. *Cell* **48**(4): 549–554. doi: 10.1016/0092-8674(87)90233-9
- Hynes RO. 1992. Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**(1): 11–25. doi: 10.1016/0092-8674(92)90115-5
- Imai T, Horiuchi A, Wang C, Oka K, Ohira S, Nikaido T, Konishi I. 2003. Hypoxia attenuates the expression of E-cadherin via up-regulation of SNAIL in ovarian carcinoma cells. *Am J Pathol* **163**(4): 1437–1447. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63501-8
- Insall RH, Weiner OD. 2001. PIP₃, PIP₂, and Cell Movement—Similar Messages, Different Meanings? *Developmental Cell* **1**(6): 743–747. doi: 10.1016/S1534-5807(01)00086-7
- Itano N. 2008. Simple primary structure, complex turnover regulation and multiple roles of hyaluronan. *J Biochem* **144**(2): 131–137. doi: 10.1093/jb/mvn046
- Ithychanda SS, Das M, Ma Y-Q, Ding K, Wang X, Gupta S, Wu C, Plow EF, Qin J. 2009-1. Migfilin, a molecular switch in regulation of Integrin activation. *J Biol Chem* **284**(7): 4713–4722. doi: 10.1074/jbc.M807719200
- Ithychanda SS, Hsu D, Li H, Yan L, Liu D, Das M, Plow EF, Qin J. 2009-2. Identification and characterization of multiple similar ligand-binding repeats in Filamin: IMPLICATION ON FILAMIN-MEDIATED RECEPTOR CLUSTERING AND CROSS-TALK. *Journal of Biological Chemistry* **284**(50): 35113–35121. doi: 10.1074/jbc.M109.060954
- Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG. 2001. HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* **292**(5516): 464–468. doi: 10.1126/science.1059817
- Ivanov S, Liao SY, Ivanova A, Danilkovitch-Miagkova A, Tarasova N, Weirich G, Merrill MJ, Proescholdt MA, Oldfield EH, Lee J, et al. 2001. Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer. *Am J Pathol* **158**(3): 905–919. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64038-2
- Ivaska J, Vuoriluoto K, Huovinen T, Izawa I, Inagaki M, Parker PJ. 2005. PKC ϵ -mediated phosphorylation of vimentin controls integrin recycling and motility. *EMBO J* **24**(22): 3834–3845. doi: 10.1038/sj.emboj.7600847

- Jahed Z, Shams H, Mehrbod M, Mofrad MRK. 2014. Mechanotransduction pathways linking the extracellular matrix to the nucleus. In: *International Review of Cell and Molecular Biology*. Elsevier. p. 171–220. doi: 10.1016/B978-0-12-800180-6.00005-0
- Jahn O, Tenzer S, Werner HB. 2009. Myelin proteomics: molecular anatomy of an insulating sheath. *Mol Neurobiol* **40**(1): 55–72. doi: 10.1007/s12035-009-8071-2
- Jain RK. 2003. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* **9**(6): 685–693. doi: 10.1038/nm0603-685
- Jain RK. 2013. Normalizing Tumor Microenvironment to Treat Cancer: Bench to Bedside to Biomarkers. *J Clin Oncol* **31**(17): 2205–2218. doi: 10.1200/JCO.2012.46.3653
- Jane EP, Premkumar DR, Cavaleri JM, Sutera PA, Rajasekar T, Pollack IF. 2016. Dinaciclib, a Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Promotes Proteasomal Degradation of Mcl-1 and Enhances ABT-737-Mediated Cell Death in Malignant Human Glioma Cell Lines. *J Pharmacol Exp Ther* **356**(2): 354–365. doi: 10.1124/jpet.115.230052
- Jarry M, Diallo M, Lecointre C, Desrues L, Tokay T, Chatenet D, Leprince J, Rossi O, Vaudry H, Tonon M-C, et al. 2010. The vasoactive peptides urotensin II and urotensin II-related peptide regulate astrocyte activity through common and distinct mechanisms: involvement in cell proliferation. *Biochem J* **428**(1): 113–124. doi: 10.1042/BJ20090867
- Jay D, García EJ, de la Luz Ibarra M. 2004. In situ determination of a PKA phosphorylation site in the C-terminal region of filamin. *Mol Cell Biochem* **260**(1–2): 49–53.
- Jean-Alphonse F, Hanyaloglu AC. 2011. Regulation of GPCR signal networks via membrane trafficking. *Molecular and Cellular Endocrinology* **331**(2): 205–214. doi: 10.1016/j.mce.2010.07.010
- Jenkins RB, Blair H, Ballman KV, Giannini C, Arusell RM, Law M, Flynn H, Passe S, Felten S, Brown PD, et al. 2006. A t(1;19)(q10;p10) Mediates the Combined Deletions of 1p and 19q and Predicts a Better Prognosis of Patients with Oligodendroglioma. *Cancer Research* **66**(20): 9852–9861. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1796
- Jensen RL. 2009. Brain tumor hypoxia: tumorigenesis, angiogenesis, imaging, pseudoprogression, and as a therapeutic target. *J Neurooncol* **92**(3): 317–335. doi: 10.1007/s11060-009-9827-2
- Ji Z-M, Yang L-L, Ni J, Xu S-P, Yang C, Duan P, Lou L-P, Ruan Q-R. 2018. Silencing Filamin A Inhibits the Invasion and Migration of Breast Cancer Cells by Up-regulating 14-3-3 σ . *Curr Med Sci* **38**(3): 461–466. doi: 10.1007/s11596-018-1901-6
- Jiang X, Yue J, Lu H, Campbell N, Yang Q, Lan S, Haffty BG, Yuan C, Shen Z. 2012. Inhibition of Filamin-A reduces cancer metastatic potential. *Int J Biol Sci* **9**(1): 67–77. doi: 10.7150/ijbs.5577
- Jiao Y, Killela PJ, Reitman ZJ, Rasheed AB, Heaphy CM, de Wilde RF, Rodriguez FJ, Rosemberg S, Oba-Shinjo SM, Nagahashi Marie SK, et al. 2012. Frequent ATRX, CIC, FUBP1 and IDH1 mutations refine the classification of malignant gliomas. *Oncotarget* **3**(7): 709–722. doi: 10.18632/oncotarget.588
- Jiménez-Baranda S, Gómez-Moutón C, Rojas A, Martínez-Prats L, Mira E, Ana Lacalle R, Valencia A, Dimitrov DS, Viola A, Delgado R, et al. 2007. Filamin-A regulates actin-dependent clustering of HIV receptors. *Nature Cell Biology* **9**(7): 838–846. doi: 10.1038/ncb1610
- Joester A, Faissner A. 2001. The structure and function of tenascins in the nervous system. *Matrix Biology* **20**(1): 13–22. doi: 10.1016/S0945-053X(00)00136-0
- Joseph JV, Conroy S, Pavlov K, Sontakke P, Tomar T, Eggens-Meijer E, Balasubramanian V, Wagemakers M, den Dunnen WFA, Kruyt FAE. 2015. Hypoxia enhances migration and invasion in glioblastoma by promoting a mesenchymal shift mediated by the HIF1 α -ZEB1 axis. *Cancer Lett* **359**(1): 107–116. doi: 10.1016/j.canlet.2015.01.010
- Karnati H, Panigrahi M, A. Shaik N, H. Greig N, Appala R, Bagadi S, A. Kamal M, Kapalavayi N. 2014. Down regulated expression of Claudin-1 and Claudin-5 and up regulation of β -Catenin: association with human glioma progression. Available at <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cnsnddt/2014/00000013/00000008/art00013>. Accessed 2019 Oct 29.

- Kalluri R. 2003. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nature Reviews Cancer* **3**(6): 422–433. doi: 10.1038/nrc1094
- Kalluri R, Weinberg RA. 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* **119**(6): 1420–1428. doi: 10.1172/JCI39104
- Kelly E, Bailey C P, Henderson G. 2008. Agonist-selective mechanisms of GPCR desensitization. *Br J Pharmacol* **153**(Suppl 1): S379–S388. doi: 10.1038/sj.bjp.0707604
- Kenific CM, Wittmann T, Debnath J. 2016. Autophagy in adhesion and migration. *J Cell Sci* **129**(20): 3685–3693. doi: 10.1242/jcs.188490
- Keshamouni VG, Michailidis G, Grasso CS, Anthwal S, Strahler JR, Walker A, Arenberg DA, Reddy RC, Akulapalli S, Thannickal VJ, et al. 2006. Differential protein expression profiling by iTRAQ–2DLC–MS/MS of Lung Cancer Cells undergoing Epithelial-Mesenchymal Transition reveals a Migratory/Invasive Phenotype. *J Proteome Res* **5**(5): 1143–1154. doi: 10.1021/pr050455t
- Khaire N, Müller R, Blau-Wasser R, Eichinger L, Schleicher M, Rief M, Holak TA, Noegel AA. 2007. Filamin-regulated F-actin assembly is essential for morphogenesis and controls phototaxis in *Dictyostelium*. *Journal of Biological Chemistry* **282**(3): 1948–1955. doi: 10.1074/jbc.M610262200
- Khattab A, Monga DK. 2019. Turcot Syndrome. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534782/>. Accessed 2019 Sep 22.
- Kiema T, Lad Y, Jiang P, Oxley CL, Baldassarre M, Wegener KL, Campbell ID, Ylännä J, Calderwood DA. 2006. The molecular basis of Filamin binding to Integrins and competition with Talin. *Molecular Cell* **21**(3): 337–347. doi: 10.1016/j.molcel.2006.01.011
- Kim E-J, Park J-S, Um S-J. 2007. Filamin A negatively regulates the transcriptional activity of p73 α in the cytoplasm. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **362**(4): 1101–1106. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.08.148
- Kim EK, Choi E-J. 2010. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta* **1802**(4): 396–405. doi: 10.1016/j.bbadis.2009.12.009
- Kim H, Nakamura F, Lee W, Shifrin Y, Arora P, McCulloch CA. 2010. Filamin A is required for vimentin-mediated cell adhesion and spreading. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **298**(2): C221–C236. doi: 10.1152/ajpcell.00323.2009
- Kim K-M, Gainetdinov RR, Laporte SA, Caron MG, Barak LS. 2005. G Protein-coupled receptor kinase regulates dopamine D3 Receptor signaling by modulating the stability of a receptor-Filamin- β -Arrestin complex: a case of autoreceptor regulation. *J Biol Chem* **280**(13): 12774–12780. doi: 10.1074/jbc.M408901200
- Konishi Y, Muragaki Y, Iseki H, Mitsuhashi N, Okada Y. 2012. Patterns of intracranial Glioblastoma recurrence after aggressive surgical resection and adjuvant management: retrospective analysis of 43 cases. *Neurologia medico-chirurgica* **52**(8): 577–586. doi: 10.2176/nmc.52.577
- Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV. 2011. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer* **11**(5): 325–337. doi: 10.1038/nrc3038
- Koschmann C, Calinescu A-A, Nunez FJ, Mackay A, Fazal-Salom J, Thomas D, Mendez F, Kamran N, Dzaman M, Mulpuri L, et al. 2016. ATRX loss promotes tumor growth and impairs nonhomologous end joining DNA repair in glioma. *Sci Transl Med* **8**(328): 328ra28. doi: 10.1126/scitranslmed.aac8228
- Koshy M, Villano JL, Dolecek TA, Howard A, Mahmood U, Chmura SJ, Weichselbaum RR, McCarthy BJ. 2012. Improved survival time trends for glioblastoma using the SEER 17 population-based registries. *J Neurooncol* **107**(1): 207–212. doi: 10.1007/s11060-011-0738-7
- Kouno J, Nagai H, Nagahata T, Onda M, Yamaguchi H, Adachi K, Takahashi H, Teramoto A, Emi M. 2004. Up-regulation of CC chemokine, CCL3L1, and receptors, CCR3, CCR5 in human glioblastoma that promotes cell growth. *J Neurooncol* **70**(3): 301–307. doi: 10.1007/s11060-004-9165-3

- Krebs HA, Salvin E, Johnson WA. 1938. The formation of citric and α -ketoglutaric acids in the mammalian body. *Biochem J*, 1938. **32**(1): 113–117. doi: 10.1042/bj0320113
- Kreisl TN, Lassman AB, Mischel PS, Rosen N, Scher HI, Teruya-Feldstein J, Shaffer D, Lis E, Abrey LE. 2009. A pilot study of everolimus and gefitinib in the treatment of recurrent glioblastoma (GBM). *J Neurooncol* **92**(1): 99–105. doi: 10.1007/s11060-008-9741-z
- Kumar S, Weaver VM. 2009. Mechanics, malignancy, and metastasis: The force journey of a tumor cell. *Cancer and Metastasis Reviews* **28**(1–2): 113–127. doi: 10.1007/s10555-008-9173-4
- Kunkel P, Ulbricht U, Bohlen P, Brockmann MA, Fillbrandt R, Stavrou D, Westphal M, Lamszus K. 2001. Inhibition of glioma angiogenesis and growth in vivo by systemic treatment with a monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor receptor-2. **61**(18):6624–8.
- Labussière M, Di Stefano AL, Gleize V, Boisselier B, Giry M, Mangesius S, Bruno A, Pattera R, Marie Y, Rahimian A, et al. 2014. TERT promoter mutations in gliomas, genetic associations and clinicopathological correlations. *Br J Cancer* **111**(10): 2024–2032. doi: 10.1038/bjc.2014.538
- Lad Y, Jiang P, Ruskamo S, Harburger DS, Yläne J, Campbell ID, Calderwood DA. 2008. Structural basis of the Migfilin-Filamin interaction and competition with Integrin β tails. *J Biol Chem* **283**(50): 35154–35163. doi: 10.1074/jbc.M802592200
- Lad Y, Kiema T, Jiang P, Pentikäinen OT, Coles CH, Campbell ID, Calderwood DA, Yläne J. 2007. Structure of three tandem filamin domains reveals auto-inhibition of ligand binding. *The EMBO Journal* **26**(17): 3993–4004. doi: 10.1038/sj.emboj.7601827
- Lai A, Tran A, Nghiemphu PL, Pope WB, Solis OE, Selch M, Filka E, Yong WH, Mischel PS, Liao LM, et al. 2011. Phase II study of bevacizumab plus temozolomide during and after radiation therapy for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol* **29**(2): 142–148. doi: 10.1200/JCO.2010.30.2729
- Lakka SS, Gondi CS, Yanamandra N, Olivero WC, Dinh DH, Gujrati M, Rao JS. 2004. Inhibition of cathepsin B and MMP-9 gene expression in glioblastoma cell line via RNA interference reduces tumor cell invasion, tumor growth and angiogenesis. *Oncogene* **23**(27): 4681–4689. doi: 10.1038/sj.onc.1207616
- Lal A, Peters H, St Croix B, Haroon ZA, Dewhirst MW, Strausberg RL, Kaanders JH, van der Kogel AJ, Riggins GJ. 2001. Transcriptional response to hypoxia in human tumors. *J Natl Cancer Inst* **93**(17): 1337–1343. doi: 10.1093/jnci/93.17.1337
- Langham RG, Kelly DJ, Gow RM, Zhang Y, Dowling JK, Thomson NM, Gilbert RE. 2004. Increased expression of urotensin II and urotensin II receptor in human diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis* **44**(5): 826–831.
- Lassman AB, Rossi MR, Raizer JJ, Razier JR, Abrey LE, Lieberman FS, Greife CN, Lamborn K, Pao W, Shih AH, et al. 2005. Molecular study of malignant gliomas treated with epidermal growth factor receptor inhibitors: tissue analysis from North American Brain Tumor Consortium Trials 01-03 and 00-01. *Clin Cancer Res* **11**(21): 7841–7850. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-0421
- Lauffenburger DA, Horwitz AF. 1996. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* **84**(3): 359–369. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81280-5
- Lecointre C, Desrues L, Joubert JE, Perzo N, Guichet P-O, Le Joncour V, Brulé C, Chabbert M, Leduc R, Prézeau L, et al. 2015. Signaling switch of the urotensin II vasosactive peptide GPCR: prototypic chemotactic mechanism in glioma. *Oncogene* **34**(39): 5080–5094. doi: 10.1038/onc.2014.433
- Lee C-Y, Tsai Y-T, Loh S-H, Liu J-C, Chen T-H, Chao H-H, Cheng T-H, Chen J-J. 2014. Urotensin II induces interleukin 8 expression in human umbilical vein endothelial cells. *PLoS ONE* **9**(2): e90278. doi: 10.1371/journal.pone.0090278
- Lee EQ, Kaley TJ, Duda DG, Schiff D, Lassman AB, Wong ET, Mikkelsen T, Purow BW, Muzikansky A, Ancukiewicz M, et al. 2015. A multicenter, phase II, randomized, noncomparative clinical trial of radiation and temozolomide with or without vandetanib in newly diagnosed glioblastoma patients. *Clin Cancer Res* **21**(16): 3610–3618. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-3220
- Lee EQ, Reardon DA, Schiff D, Drappatz J, Muzikansky A, Grimm SA, Norden AD, Nayak L, Beroukhi R, Rinne ML, et al. 2015-1. Phase II study of panobinostat in combination with bevacizumab for

- recurrent glioblastoma and anaplastic glioma. *Neuro-oncology* **17**(6): 862–867. doi: 10.1093/neuonc/nou350
- Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW. 2006. The epithelial–mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol* **172**(7): 973–981. doi: 10.1083/jcb.200601018
- Leonard AD, Thompson JP, Hutchinson EL, Young SP, McDonald J, Swanevelder J, Lambert DG. 2009. Urotensin II receptor expression in human right atrium and aorta: effects of ischaemic heart disease. *Br J Anaesth* **102**(4): 477–484. doi: 10.1093/bja/aep011
- Leung JW-C, Ghosal G, Wang W, Shen X, Wang J, Li L, Chen J. 2013. Alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked gene product ATRX is required for proper replication restart and cellular resistance to replication stress. *J Biol Chem* **288**(9): 6342–6350. doi: 10.1074/jbc.M112.411603
- Levin VA, Phuphanich S, Alfred Yung WK, Forsyth PA, Del Maestro R, Perry JR, Fuller GN, Baillet M. 2006. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of marimastat in glioblastoma multiforme patients following surgery and irradiation. *Journal of Neuro-Oncology* **78**(3): 295–302. doi: 10.1007/s11060-005-9098-5
- Levine AJ, Puzio-Kuter AM. 2010. The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes. *Science* **330**(6009): 1340–1344. doi: 10.1126/science.1193494
- Li C, Yu S, Nakamura F, Pentikäinen OT, Singh N, Yin S, Xin W, Sy M-S. 2010. Pro-prion binds Filamin A, facilitating its interaction with Integrin β 1, and contributes to Melanomagenesis. *J Biol Chem* **285**(39): 30328–30339. doi: 10.1074/jbc.M110.147413
- Li C, Yu S, Nakamura F, Yin S, Xu J, Petrolla AA, Singh N, Tartakoff A, Abbott DW, Xin W, et al. 2009. Binding of pro-prion to filamin A disrupts cytoskeleton and correlates with poor prognosis in pancreatic cancer. *J Clin Invest* **119**(9): 2725–2736. doi: 10.1172/JCI39542
- Li Y, Shi Z, Yu X, Feng P, Wang X-J. 2017. The effects of urotensin II on migration and invasion are mediated by NADPH oxidase-derived reactive oxygen species through the c-Jun N-terminal kinase pathway in human hepatoma cells. *Peptides* **88**: 106–114. doi: 10.1016/j.peptides.2016.12.005
- Liang Y, Bollen AW, Gupta N. 2008. CC chemokine receptor-2A is frequently overexpressed in glioblastoma. *J Neurooncol* **86**(2): 153–163. doi: 10.1007/s11060-007-9463-7
- Lin R, Canfield V, Levenson R. 2002. Dominant Negative Mutants of Filamin A block cell surface expression of the D2 Dopamine Receptor. *PHA* **66**(4): 173–181. doi: 10.1159/000065531
- Lin R, Karpa K, Kabbani N, Goldman-Rakic P, Levenson R. 2001. Dopamine D2 and D3 receptors are linked to the actin cytoskeleton via interaction with filamin A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(9): 5258–5263. doi: 10.1073/pnas.011538198
- Lindsey S, Langhans SA. 2014. Crosstalk of oncogenic signaling pathways during Epithelial–Mesenchymal Transition. *Front Oncol* **4**. doi: 10.3389/fonc.2014.00358
- Lino MM, Merlo A, Boulay J-L. 2010. Notch signaling in glioblastoma: a developmental drug target? *BMC Medicine* **8**(1). doi: 10.1186/1741-7015-8-72
- Liu B, Cheng J, Zhang X, Wang R, Zhang W, Lin H, Xiao X, Cai S, Chen X, Cheng H. 2010. Global histone modification patterns as prognostic markers to classify glioma patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **19**(11): 2888–2896. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-10-0454
- Liu D-G, Wang J, Zhang Z-T, Wang Y. 2009. The urotension II antagonist SB-710411 arrests fibrosis in CCL4 cirrhotic rats. *Mol Med Rep* **2**(6): 953–961. doi: 10.3892/mmr_00000198
- Liu Q, Liu Y, Li W, Wang X, Sawaya R, Lang FF, Yung WKA, Chen K, Fuller GN, Zhang W. 2015. Genetic, epigenetic, and molecular landscapes of multifocal and multicentric glioblastoma. *Acta Neuropathologica* **130**(4): 587–597. doi: 10.1007/s00401-015-1470-8
- Liu T, Mendes DE, Berkman CE. 2014. Prolonged androgen deprivation leads to overexpression of calpain 2: implications for prostate cancer progression. *Int J Oncol* **44**(2): 467–472. doi: 10.3892/ijo.2013.2196

- Liu X-Y, Gerges N, Korshunov A, Sabha N, Khuong-Quang D-A, Fontebasso AM, Fleming A, Hadjadj D, Schwartzenruber J, Majewski J, et al. 2012. Frequent ATRX mutations and loss of expression in adult diffuse astrocytic tumors carrying IDH1/IDH2 and TP53 mutations. *Acta Neuropathol* **124**(5): 615–625. doi: 10.1007/s00401-012-1031-3
- Liu Y, Carson-Walter E, Walter KA. 2015. Targeting chemokine receptor CXCR7 inhibits Glioma Cell proliferation and mobility. *Anticancer Res* **35**(1): 53–64.
- Long H, Xie R, Xiang T, Zhao Z, Lin S, Liang Z, Chen Z, Zhu B. 2012. Autocrine CCL5 signaling promotes invasion and migration of CD133+ ovarian cancer stem-like cells via NF- κ B-mediated MMP-9 upregulation. *STEM CELLS* **30**(10): 2309–2319. doi: 10.1002/stem.1194
- Loo DT, Kanner SB, Aruffo A. 1998. Filamin Binds to the Cytoplasmic Domain of the β 1-Integrin IDENTIFICATION OF AMINO ACIDS RESPONSIBLE FOR THIS INTERACTION. *J Biol Chem* **273**(36): 23304–23312. doi: 10.1074/jbc.273.36.23304
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. 2007. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathologica* **114**(2): 97–109. doi: 10.1007/s00401-007-0243-4
- Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. 2016. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica* **131**(6): 803–820. doi: 10.1007/s00401-016-1545-1
- Loy CJ, Sim KS, Yong EL. 2003. Filamin-A fragment localizes to the nucleus to regulate androgen receptor and coactivator functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(8): 4562–4567. doi: 10.1073/pnas.0736237100
- Lubanska D, Porter L. 2017. Revisiting CDK Inhibitors for Treatment of Glioblastoma Multiforme. *Drugs R D* **17**(2): 255–263. doi: 10.1007/s40268-017-0180-1
- Luwor RB, Johns TG, Murone C, Huang H-JS, Cavenee WK, Ritter G, Old LJ, Burgess AW, Scott AM. 2001. Monoclonal antibody 806 inhibits the growth of tumor xenografts expressing either the de 2–7 or amplified epidermal growth factor receptor (EGFR) but not wild-type EGFR. *61*(14):5355-61.
- Lv S, Teugels E, Sadones J, Quartier E, Huylebrouck M, Four SD, Mercier ML, Witte OD, Salmon I, Michotte A, et al. 2011. Correlation between IDH1 gene mutation status and survival of patients treated for recurrent glioma. *Anticancer Res* **31**(12): 4457–4463.
- Maceyka M, Alvarez SE, Milstien S, Spiegel S. 2008. Filamin A links Sphingosine Kinase 1 and Sphingosine-1-Phosphate receptor 1 at lamellipodia to orchestrate cell migration. *Mol Cell Biol* **28**(18): 5687–5697. doi: 10.1128/MCB.00465-08
- Macheda ML, Rogers S, Best JD. 2005. Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *J Cell Physiol* **202**(3): 654–662. doi: 10.1002/jcp.20166
- Maehara K, Takahashi K, Saitoh S. 2010. CENP-A reduction induces a p53-dependent cellular senescence response to protect cells from executing defective mitoses. *Mol Cell Biol* **30**(9): 2090–2104. doi: 10.1128/MCB.01318-09
- Maguire JJ, Kuc RE, Kleinz MJ, Davenport AP. 2008. Immunocytochemical localization of the urotensin-II receptor, UT, to rat and human tissues: relevance to function. *Peptides* **29**(5): 735–742. doi: 10.1016/j.peptides.2007.08.021
- Mahabir R, Tanino M, Elmansuri A, Wang L, Kimura T, Itoh T, Ohba Y, Nishihara H, Shirato H, Tsuda M, et al. 2014. Sustained elevation of Snail promotes glial-mesenchymal transition after irradiation in malignant glioma. *Neuro-oncology* **16**(5): 671–685. doi: 10.1093/neuonc/not239
- Malagon MM, Molina M, Gahete MD, Duran-Prado M, Martinez-Fuentes AJ, Alcain FJ, Tonon M-C, Leprince J, Vaudry H, Castaño JP, et al. 2008. Urotensin II and urotensin II-related peptide activate somatostatin receptor subtypes 2 and 5. *Peptides* **29**(5): 711–720. doi: 10.1016/j.peptides.2007.12.015

- Mammoto A, Huang S, Ingber DE. 2007. Filamin links cell shape and cytoskeletal structure to Rho regulation by controlling accumulation of p190RhoGAP in lipid rafts. *Journal of Cell Science* **120**(3): 456–467. doi: 10.1242/jcs.03353
- Mao P, Joshi K, Li J, Kim SH, Li P, Santana-Santos L, Luthra S, Chandran UR, Benos PV, Smith L, Wang M, Hu B, Cheng SY, Sobol RW, Nakano I. 2013. Mesenchymal glioma stem cells are maintained by activated glycolytic metabolism involving aldehyde dehydrogenase 1A3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(21):8644-9. doi: 10.1073/pnas.1221478110
- Marano RJ, Ben-Jonathan N. 2014. Minireview: Extrapituitary prolactin: an update on the distribution, regulation, and functions. *Mol Endocrinol* **28**(5): 622–633. doi: 10.1210/me.2013-1349
- Marchese A, Heiber M, Nguyen T, Heng HHQ, Saldivia VR, Cheng R, Murphy PM, Tsui L-C, Shi X, Gregor P, et al. 1995. Cloning and chromosomal mapping of three novel genes, GPR9, GPR10, and GPR14, encoding receptors related to Interleukin 8, Neuropeptide Y, and Somatostatin Receptors. *Genomics* **29**(2): 335–344. doi: 10.1006/geno.1995.9996
- Mazin AV, Alexeev AA, Kowalczykowski SC. 2003. A Novel Function of Rad54 Protein stabilization on the Rad51 nucleoprotein filament. *J Biol Chem* **278**(16): 14029–14036. doi: 10.1074/jbc.M212779200
- McCormick F. 2016. K-Ras protein as a drug target. *J Mol Med (Berl)* **94**: 253–258. doi: 10.1007/s00109-016-1382-7
- McCoy AJ, Fucini P, Noegel AA, Stewart M. 1999. Structural basis for dimerization of the Dictyostelium gelation factor (ABP120) rod. *nature structural biology* **6**(9): 6.
- McDonald OG, Wu H, Timp W, Doi A, Feinberg AP. 2011. Genome-scale epigenetic reprogramming during epithelial-to-mesenchymal transition. *Nature Structural & Molecular Biology* **18**(8): 867–874. doi: 10.1038/nsmb.2084
- Melnick JC, Needles CF. 1966. An undiagnosed bone dysplasia. A 2 family study of 4 generations and 3 generations. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med* **97**(1): 39–48. doi: 10.2214/ajr.97.1.39
- Mercurio L, Ajmone-Cat MA, Cecchetti S, Ricci A, Bozzuto G, Molinari A, Manni I, Pollo B, Scala S, Carpinelli G, et al. 2016. Targeting CXCR4 by a selective peptide antagonist modulates tumor microenvironment and microglia reactivity in a human glioblastoma model. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* **35**(1): 55. doi: 10.1186/s13046-016-0326-y
- Meyer SC, Zuerbig S, Cunningham CC, Hartwig JH, Bissell T, Gardner K, Fox JEB. 1997. Identification of the region in Actin-binding protein that binds to the cytoplasmic domain of glycoprotein Iba. *J Biol Chem* **272**(5): 2914–2919. doi: 10.1074/jbc.272.5.2914
- Mikheeva SA, Mikheev AM, Petit A, Beyer R, Oxford RG, Khorasani L, Maxwell J-P, Glackin CA, Wakimoto H, González-Herrero I, et al. 2010. TWIST1 promotes invasion through mesenchymal change in human glioblastoma. *Mol Cancer* **9**: 194. doi: 10.1186/1476-4598-9-194
- Minina S, Reichman-Fried M, Raz E. 2007. Control of Receptor Internalization, Signaling Level, and Precise Arrival at the Target in Guided Cell Migration. *Current Biology* **17**(13): 1164–1172. doi: 10.1016/j.cub.2007.05.073
- Minniti G, Traish D, Ashley S, Gonsalves A, Brada M. 2005. Risk of second brain tumor after conservative surgery and radiotherapy for pituitary adenoma: update after an additional 10 years. *J Clin Endocrinol Metab* **90**(2): 800–804. doi: 10.1210/jc.2004-1152
- Minsaas L, Planagumà J, Madziva M, Krakstad BF, Masià-Balagué M, Katz AA, Aragay AM. 2010. Filamin A binds to CCR2B and regulates its internalization. *PLOS ONE* **5**(8): e12212. doi: 10.1371/journal.pone.0012212
- Mishima K, Johns TG, Luwor RB, Scott AM, Stockert E, Jungbluth AA, Ji X-D, Suvarna P, Volland JR, Old LJ, et al. 2001. Growth suppression of intracranial xenografted glioblastomas overexpressing mutant epidermal growth factor receptors by systemic administration of monoclonal antibody (mAb) 806, a novel monoclonal antibody directed to the receptor. : 7.

- Mistry N, Cranmer SL, Yuan Y, Mangin P, Dopheide SM, Harper I, Giuliano S, Dunstan DE, Lanza F, Salem HH, et al. 2000. Cytoskeletal regulation of the platelet glycoprotein Ib/V/IX–von Willebrand factor interaction. *Blood* **96**(10): 3480–3489.
- Miyazaki T, Uemae Y, Ishikawa E. 2017. CXCL12/CXCR4 signaling in glioma stem cells—prospects for therapeutic intervention. *Translational Cancer Research* **6**(2): S434-S437–S437. doi: 10.21037/12833
- Mohan H, Krumbholz M, Sharma R, Eisele S, Junker A, Sixt M, Newcombe J, Wekerle H, Hohlfeld R, Lassmann H, et al. 2010. Extracellular matrix in multiple sclerosis lesions: Fibrillar collagens, biglycan and decorin are upregulated and associated with infiltrating immune cells. *Brain Pathol* **20**(5): 966–975. doi: 10.1111/j.1750-3639.2010.00399.x
- Mollica Poeta V, Massara M, Capucetti A, Bonocchi R. 2019. Chemokines and chemokine receptors: new targets for cancer immunotherapy. *Front Immunol* **10**. doi: 10.3389/fimmu.2019.00379
- Mooso BA, Vinall RL, Tepper CG, Savoy RM, Cheung JP, Singh S, Siddiqui S, Wang Y, Bedolla RG, Martinez A, et al. 2012. Enhancing the effectiveness of androgen deprivation in prostate cancer by inducing Filamin A nuclear localization. *Endocr Relat Cancer* **19**(6). doi: 10.1530/ERC-12-0171
- Moreno-Manzano V, Rodríguez-Jiménez FJ, Aceña-Bonilla JL, Fustero-Lardies S, Erceg S, Dopazo J, Montaner D, Stojkovic M, Sánchez-Puelles JM. 2010. FM19G11, a new hypoxia-inducible factor (HIF) modulator, affects stem cell differentiation status. *J Biol Chem* **285**(2): 1333–1342. doi: 10.1074/jbc.M109.008326
- Mori M, Sugo T, Abe M, Shimomura Y, Kurihara M, Kitada C, Kikuchi K, Shintani Y, Kurokawa T, Onda H, et al. 1999. Urotensin II is the endogenous ligand of a G-protein-coupled orphan receptor, SENR (GPR14). *Biochem Biophys Res Commun* **265**(1): 123–129. doi: 10.1006/bbrc.1999.1640
- Moro F, Carozzo R, Veggiotti P, Tortorella G, Toniolo D, Volzone A, Guerrini R. 2002. Familial periventricular heterotopia: missense and distal truncating mutations of the FLN1 gene. *Neurology* **58**(6): 916–921. doi: 10.1212/wnl.58.6.916
- Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, Hutson TE, Porta C, Bracarda S, Grünwald V, Thompson JA, Figlin RA, Hollaender N, et al. 2008. Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. *The Lancet* **372**(9637): 449–456. doi: 10.1016/S0140-6736(08)61039-9
- Mughal A, Zhang L, Fayzullin A, Server A, Li Y, Wu Y, Glass R, Meling T, Langmoen I, Leegaard T, Vik-Mo E. 2018. Patterns of invasive growth in malignant gliomas—the hippocampus emerges as an invasion-spared brain region. *Neoplasia*. **20**(7):643-656. doi: 10.1016/j.neo.2018.04.001
- Murakami M. 2012. Signaling required for blood vessel maintenance: molecular basis and pathological manifestations. *Int J Vasc Med* **2012**: 293641. doi: 10.1155/2012/293641
- Myung JK, Choi SA, Kim S-K, Wang K-C, Park S-H. 2014. Snail plays an oncogenic role in glioblastoma by promoting epithelial mesenchymal transition. *Int J Clin Exp Pathol* **7**(5): 1977–1987.
- Najib S, Saint-Laurent N, Estève J-P, Schulz S, Boutet-Robinet E, Fourmy D, Lättig J, Mollereau C, Pyronnet S, Susini C, et al. 2012. A switch of G Protein-Coupled receptor binding preference from Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K)–p85 to Filamin A negatively controls the PI3K Pathway. *Molecular and Cellular Biology* **32**(5): 1004–1016. doi: 10.1128/MCB.06252-11
- Nakada M, Kita D, Futami K, Yamashita J, Fujimoto N, Sato H, Okada Y. 2001. Roles of membrane type 1 matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinases 2 in invasion and dissemination of human malignant glioma. *J Neurosurg* **94**(3): 464–473. doi: 10.3171/jns.2001.94.3.0464
- Nakamura F, Hartwig JH, Stossel TP, Szymanski PT. 2005. Ca²⁺ and Calmodulin regulate the binding of Filamin A to Actin filaments. *Journal of Biological Chemistry* **280**(37): 32426–32433. doi: 10.1074/jbc.M502203200
- Nakamura F, Osborn TM, Hartemink CA, Hartwig JH, Stossel TP. 2007. Structural basis of filamin A functions. *J Cell Biol* **179**(5): 1011–1025. doi: 10.1083/jcb.200707073

- Nakamura F, Stossel TP, Hartwig JH. 2011. The filamins: Organizers of cell structure and function. *Cell Adhesion & Migration* **5**(2): 160–169. doi: 10.4161/cam.5.2.14401
- Nallapalli RK, Ibrahim MX, Zhou AX, Bandaru S, Sunkara SN, Redfors B, Pazooki D, Zhang Y, Borén J, Cao Y, et al. 2012. Targeting filamin A reduces K-RAS–induced lung adenocarcinomas and endothelial response to tumor growth in mice. *Molecular Cancer* **11**(1): 50. doi: 10.1186/1476-4598-11-50
- Naslavsky N, Caplan S. 2018. The enigmatic endosome – sorting the ins and outs of endocytic trafficking. *J Cell Sci* **131**(13). doi: 10.1242/jcs.216499
- Neglia JP, Robison LL, Stovall M, Liu Y, Packer RJ, Hammond S, Yasui Y, Kasper CE, Mertens AC, Donaldson SS, et al. 2006. New primary neoplasms of the central nervous system in survivors of childhood cancer: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *J Natl Cancer Inst* **98**(21): 1528–1537. doi: 10.1093/jnci/djj411
- Nekrutenko A, Hillis DM, Patton JC, Bradley RD, Baker RJ. 1998. Cytosolic isocitrate dehydrogenase in humans, mice, and voles and phylogenetic analysis of the enzyme family. *Molecular Biology and Evolution* **15**(12): 1674–1684. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a025894
- Neyns B, Sadones J, Chaskis C, Dujardin M, Everaert H, Lv S, Duerinck J, Tynninen O, Nuppenon N, Michotte A, et al. 2011. Phase II study of sunitinib malate in patients with recurrent high-grade glioma. *J Neurooncol* **103**(3): 491–501. doi: 10.1007/s11060-010-0402-7
- Neyns B, Sadones J, Joosens E, Bouttens F, Verbeke L, Baurain J-F, D’Hondt L, Strauven T, Chaskis C, In’t Veld P, et al. 2009. Stratified phase II trial of cetuximab in patients with recurrent high-grade glioma. *Ann Oncol* **20**(9): 1596–1603. doi: 10.1093/annonc/mdp032
- Nobes CD, Hall A. 1995. Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility. *Biochemical Society Transactions* **23**(3): 456–459. doi: 10.1042/bst0230456
- Noble M, Pröschel C, Mayer-Pröschel M. 2004. Getting a GR(i)P on oligodendrocyte development. *Dev Biol* **265**(1): 33–52. doi: 10.1016/j.ydbio.2003.06.002
- Nordfors K, Haapasalo J, Mäkelä K, Granberg KJ, Nykter M, Korja M, Paavonen T, Haapasalo H, Soini Y. 2015. Twist predicts poor outcome of patients with astrocytic glioma. *J Clin Pathol* **68**(11): 905–912. doi: 10.1136/jclinpath-2015-202868
- Nothacker HP, Wang Z, McNeill AM, Saito Y, Merten S, O’Dowd B, Duckles SP, Civelli O. 1999. Identification of the natural ligand of an orphan G-protein-coupled receptor involved in the regulation of vasoconstriction. *Nat Cell Biol* **1**(6): 383–385. doi: 10.1038/14081
- Oberstein PE, Saif MW. 2012. Safety and efficacy of everolimus in adult patients with neuroendocrine tumors. *Clin Med Insights Oncol* **6**: CMO.S7319. doi: 10.4137/CMO.S7319
- O’Connell MP, Fiori JL, Baugher KM, Indig FE, French AD, Camilli TC, Frank BP, Earley R, Hoek KS, Hasskamp JH, et al. 2009. Wnt5A activates the calpain-mediated cleavage of Filamin A. *Journal of Investigative Dermatology* **129**(7): 1782–1789. doi: 10.1038/jid.2008.433
- Odemis V, Boosmann K, Heinen A, Küry P, Engele J. 2010. CXCR7 is an active component of SDF-1 signalling in astrocytes and Schwann cells. *J Cell Sci* **123**(Pt 7): 1081–1088. doi: 10.1242/jcs.062810
- Oh S-J, Ahn E-J, Kim O, Kim D, Jung T-Y, Jung S, Lee J-H, Kim K-K, Kim H, Kim EH, et al. 2019. The role played by SLUG, an Epithelial-Mesenchymal Transition Factor, in invasion and therapeutic resistance of malignant glioma. *Cell Mol Neurobiol* **39**(6): 769–782. doi: 10.1007/s10571-019-00677-5
- Ohgaki H, Kim Y-H, Steinbach JP. 2010. Nervous system tumors associated with familial tumor syndromes. *Curr Opin Neurol* **23**(6): 583–591. doi: 10.1097/WCO.0b013e3283405b5f
- Ohta Y, Hartwig JH. 1995. Actin filament cross-linking by chicken gizzard filamin is regulated by phosphorylation in vitro. *Biochemistry* **34**(20): 6745–6754. doi: 10.1021/bi00020a020
- Ohta Y, Hartwig JH. 1996. Phosphorylation of actin-binding protein 280 by growth factors is mediated by p90 ribosomal protein S6 kinase. *J Biol Chem* **271**(20): 11858–11864. doi: 10.1074/jbc.271.20.11858

- Ohta Y, Hartwig JH, Stossel TP. 2006. FilGAP, a Rho- and ROCK-regulated GAP for Rac binds filamin A to control actin remodelling. *Nature Cell Biology* **8**(8): 803–814. doi: 10.1038/ncb1437
- Ohta Y, Suzuki N, Nakamura S, Hartwig JH, Stossel TP. 1999. The small GTPase RalA targets filamin to induce filopodia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(5): 2122–2128.
- Olar A, Aldape KD. 2014. Using the molecular classification of glioblastoma to inform personalized treatment. *J Pathol* **232**(2): 165–177. doi: 10.1002/path.4282
- Onan D, Hannan RD, Thomas WG. 2004. Urotensin II: the old kid in town. *Trends Endocrinol Metab* **15**(4): 175–182. doi: 10.1016/j.tem.2004.03.007
- Onoprishvili I, Ali S, Andria ML, Shpigel A, Simon EJ. 2008. Filamin A mutant lacking actin-binding domain restores μ Opioid Receptor regulation in melanoma cells. *Neurochem Res* **33**(10): 2054–2061. doi: 10.1007/s11064-008-9684-y
- Onoprishvili I, Andria ML, Kramer HK, Ancevska-Taneva N, Hiller JM, Simon EJ. 2003. Interaction between the μ Opioid Receptor and Filamin A is Involved in receptor regulation and trafficking. *Mol Pharmacol* **64**(5): 1092–1100. doi: 10.1124/mol.64.5.1092
- Orr BA, Clay MR, Pinto EM, Kesserwan C. 2019. An update on the central nervous system manifestations of Li–Fraumeni syndrome. *Acta Neuropathol*, in press. doi: 10.1007/s00401-019-02055-3
- Ostrom QT, Barnholtz-Sloan JS. 2011. Current state of our knowledge on brain tumor epidemiology. *Curr Neurol Neurosci Rep* **11**(3): 329–335. doi: 10.1007/s11910-011-0189-8
- Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, Rouse C, Chen Y, Dowling J, Wolinsky Y, Kruchko C, Barnholtz-Sloan J. 2014. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007–2011. *Neuro-oncology* **16** (4): 1–63. doi: 10.1093/neuonc/nou223
- Ozanne DM, Brady ME, Cook S, Gaughan L, Neal DE, Robson CN. 2000. Prostate research group school of surgical and reproductive sciences medical school, University of Newcastle upon Tyne Newcastle. England NE2 4HH. **14**(10): 9.
- Page RC, Clark JG, Misra S. 2011. Structure of filamin A immunoglobulin-like repeat 10 from Homo sapiens. *Acta Cryst F* **67**(8): 871–876. doi: 10.1107/S1744309111024249
- Pang X-X, Bai Q, Wu F, Chen G-J, Zhang A-H, Tang C-S. 2016. Urotensin II Induces ER Stress and EMT and increase extracellular matrix production in renal tubular epithelial cell in early diabetic mice. *KBR* **41**(4): 434–449. doi: 10.1159/000443445
- Papadopoulos MC, Verkman AS. 2013. Aquaporin water channels in the nervous system. *Nat Rev Neurosci* **14**(4): 265–277. doi: 10.1038/nrn3468
- Park DM, Rich JN. 2009. Biology of glioma cancer stem cells. *Mol Cells* **28**(1): 7–12. doi: 10.1007/s10059-009-0111-2
- Parrini E, Mei D, Wright M, Dorn T, Guerrini R. 2004. Mosaic mutations of the FLN1 gene cause a mild phenotype in patients with periventricular heterotopia. *Neurogenetics* **5**(3): 191–196. doi: 10.1007/s10048-004-0187-y
- Parrini E, Ramazzotti A, Dobyns WB, Mei D, Moro F, Veggiotti P, Marini C, Brilstra EH, Bernardina BD, Goodwin L, et al. 2006. Periventricular heterotopia: phenotypic heterogeneity and correlation with Filamin A mutations. *Brain* **129**(7): 1892–1906. doi: 10.1093/brain/awl125
- Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu IM, Gallia GL, Olivi A, McLendon R, Rasheed BA, Keir S, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Busam DA, Tekleab H, Diaz LA Jr, Hartigan J, Smith DR, Strausberg RL, Marie SK, Shinjo SM, Yan H, Riggins GJ, Bigner DD, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW. 2008. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*. **321**(5897):1807-12. doi: 10.1126/science
- Patel AP, Tirosh I, Trombetta JJ, Shalek AK, Gillespie SM, Wakimoto H, Cahill DP, Nahed BV, Curry WT, Martuza RL, et al. 2014. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science* **344**(6190): 1396–1401. doi: 10.1126/science.1254257
- Patterns of Invasive Growth in Malignant Gliomas—The Hippocampus Emerges as an Invasion-Spared Brain Region | Elsevier Enhanced Reader. n.d. doi: 10.1016/j.neo.2018.04.001

- Paulsson AK, Holmes JA, Peiffer AM, Miller LD, Liu W, Xu J, Hinson WH, Lesser GJ, Laxton AW, Tatter SB, et al. 2014. Comparison of clinical outcomes and genomic characteristics of single focus and multifocal glioblastoma. *J Neurooncol* **119**(2): 429–435. doi: 10.1007/s11060-014-1515-1
- Paulus W, Baur I, Schuppan D, Roggendorf W. 1993. Characterization of integrin receptors in normal and neoplastic human brain. *Am J Pathol* **143**(1): 154–163.
- Peixoto P, Etcheverry A, Aubry M, Missey A, Lachat C, Perrard J, Hendrick E, Delage-Mourroux R, Mosser J, Borg C, et al. 2019. EMT is associated with an epigenetic signature of ECM remodeling genes. *Cell Death & Disease* **10**(3). doi: 10.1038/s41419-019-1397-4
- Perrin BJ, Huttenlocher A. 2002. Calpain. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **34**(7): 722–725. doi: 10.1016/S1357-2725(02)00009-2
- Peverelli E, Giardino E, Treppiedi D, Vitali E, Cambiagli V, Locatelli M, Lasio GB, Spada A, Lania AG, Mantovani G. 2014. Filamin A (FLNA) plays an essential role in Somatostatin Receptor 2 (SST2) signaling and stabilization after agonist stimulation in Human and Rat Somatotroph Tumor Cells. *Endocrinology* **155**(8): 2932–2941. doi: 10.1210/en.2014-1063
- Pham K, Luo D, Siemann DW, Law BK, Reynolds BA, Hothi P, Foltz G, Harrison JK. 2015. VEGFR inhibitors upregulate CXCR4 in VEGF receptor-expressing glioblastoma in a TGF β R signaling-dependent manner. *Cancer Letters* **360**(1): 60–67. doi: 10.1016/j.canlet.2015.02.005
- Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, Misra A, Nigro JM, Colman H, Soroceanu L, et al. 2006. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* **9**(3): 157–173. doi: 10.1016/j.ccr.2006.02.019
- Picketts DJ, Higgs DR, Bachoo S, Blake DJ, Quarrell OW, Gibbons RJ. 1996. ATRX encodes a novel member of the SNF2 family of proteins: mutations point to a common mechanism underlying the ATR-X syndrome. *Hum Mol Genet* **5**(12): 1899–1907. doi: 10.1093/hmg/5.12.1899
- Pons M, Izquierdo I, Andreu-Carbó M, Garrido G, Planagumà J, Muriel O, Pozo MA del, Geli MI, Aragay AM. 2017. Phosphorylation of filamin A regulates chemokine receptor CCR2 recycling. *J Cell Sci* **130**(2): 490–501. doi: 10.1242/jcs.193821
- Popowicz GM, Müller R, Noegel AA, Schleicher M, Huber R, Holak TA. 2004. Molecular structure of the Rod domain of Dictyostelium Filamin. *Journal of Molecular Biology* **342**(5): 1637–1646. doi: 10.1016/j.jmb.2004.08.017
- Porrás-González C, Ureña J, Egea-Guerrero JJ, Gordillo-Escobar E, Murillo-Cabezas F, González-Montelongo M del C, Muñoz-Sánchez MA. 2014. Contractile responses to rat urotensin II in resting and depolarized basilar arteries. *J Physiol Biochem* **70**(1): 193–199. doi: 10.1007/s13105-013-0293-0
- Poteet E, Choudhury GR, Winters A, Li W, Ryou M-G, Liu R, Tang L, Ghorpade A, Wen Y, Yuan F, et al. 2013. Reversing the Warburg effect as a treatment for glioblastoma. *J Biol Chem* **288**(13): 9153–9164. doi: 10.1074/jbc.M112.440354
- Price LS, Leng J, Schwartz MA, Bokoch GM. 1998. Activation of Rac and Cdc42 by Integrins Mediates Cell Spreading. *Mol Biol Cell* **9**(7): 1863–1871.
- Price MG, Caprette DR, Gomer RH. 1994. Different temporal patterns of expression result in the same type, amount, and distribution of filamin (ABP) in cardiac and skeletal myofibrils. *Cell Motility and the Cytoskeleton* **27**(3): 248–261. doi: 10.1002/cm.970270306
- Proescholdt MA, Mayer C, Kubitza M, Schubert T, Liao S-Y, Stanbridge EJ, Ivanov S, Oldfield EH, Brawanski A, Merrill MJ. 2005. Expression of hypoxia-inducible carbonic anhydrases in brain tumors. *Neuro-oncology* **7**(4): 465–475. doi: 10.1215/S1152851705000025
- Proulx CD, Simaan M, Escher E, Laporte SA, Guillemette G, Leduc R. 2005. Involvement of a cytoplasmic-tail serine cluster in urotensin II receptor internalization. *Biochem J* **385**(Pt 1): 115–123. doi: 10.1042/BJ20040807
- Pudas R, Kiema T-R, Butler PJG, Stewart M, Ylänné J. 2005. Structural basis for vertebrate Filamin dimerization. *Structure* **13**(1): 111–119. doi: 10.1016/j.str.2004.10.014

- Pyne NJ, Pyne S. 2010. Sphingosine 1-phosphate and cancer. *Nat Rev Cancer* **10**(7): 489–503. doi: 10.1038/nrc2875
- Rajagopal S, Kim J, Ahn S, Craig S, Lam CM, Gerard NP, Gerard C, Lefkowitz RJ. 2010. Beta-arrestin- but not G protein-mediated signaling by the “decoy” receptor CXCR7. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**(2): 628–632. doi: 10.1073/pnas.0912852107
- Ravid D, Chuderland D, Landsman L, Lavie Y, Reich R, Liscovitch M. 2008. Filamin A is a novel caveolin-1-dependent target in IGF-I-stimulated cancer cell migration. *Exp Cell Res* **314**(15): 2762–2773. doi: 10.1016/j.yexcr.2008.06.004
- Rayahin JE, Buhrman JS, Zhang Y, Koh TJ, Gemeinhart RA. 2015. High and low molecular weight hyaluronic acid differentially influence macrophage activation. *ACS Biomater Sci Eng* **1**(7): 481–493. doi: 10.1021/acsbiomaterials.5b00181
- Razinia Z, Baldassarre M, Cantelli G, Calderwood DA. 2013. ASB2 α , an E3 ubiquitin ligase specificity subunit, regulates cell spreading and triggers proteasomal degradation of filamins by targeting the filamin calponin homology 1 domain. *J Biol Chem* **288**(44): 32093–32105. doi: 10.1074/jbc.M113.496604
- Reardon DA, Lassman AB, Schiff D, Yunus SA, Gerstner ER, Cloughesy TF, Lee EQ, Gaffey SC, Barrs J, Bruno J, et al. 2018. Phase 2 and biomarker study of trebananib, an angiopoietin-blocking peptibody, with and without bevacizumab for patients with recurrent glioblastoma. *Cancer* **124**(7): 1438–1448. doi: 10.1002/cncr.31172
- Reifenberger G, Wirsching H-G, Knobbe-Thomsen CB, Weller M. 2017. Advances in the molecular genetics of gliomas — implications for classification and therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology* **14**(7): 434–452. doi: 10.1038/nrclinonc.2016.204
- Reifenberger J, Reifenberger G, Liu L, James CD, Wechsler W, Collins VP. 1994. Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors shows preferential allelic deletions on 19q and 1p. *Am J Pathol* **145**(5): 1175–1190.
- Rempel SA, Dudas S, Ge S, Gutiérrez JA. 2000. Identification and localization of the cytokine SDF1 and its receptor, CXC chemokine receptor 4, to regions of necrosis and angiogenesis in human glioblastoma. *Clin Cancer Res* **6**(1): 102–111.
- Reuss DE, Sahm F, Schrimpf D, Wiestler B, Capper D, Koelsche C, Schweizer L, Korshunov A, Jones DTW, Hovestadt V, et al. 2015. ATRX and IDH1-R132H immunohistochemistry with subsequent copy number analysis and IDH sequencing as a basis for an “integrated” diagnostic approach for adult astrocytoma, oligodendroglioma and glioblastoma. *Acta Neuropathol* **129**(1): 133–146. doi: 10.1007/s00401-014-1370-3
- Rhee J, Mahfooz NS, Arregui C, Lilien J, Balsamo J, VanBerkum MFA. 2002. Activation of the repulsive receptor Roundabout inhibits N-cadherin-mediated cell adhesion. *Nat Cell Biol* **4**(10): 798–805. doi: 10.1038/ncb858
- Ricci-Vitiani L, Pallini R, Biffoni M, Todaro M, Invernici G, Cenci T, Maira G, Parati EA, Stassi G, Larocca LM, et al. 2010. Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature* **468**(7325): 824–828. doi: 10.1038/nature09557
- Ridley AJ. 2003. Cell Migration: integrating signals from front to back. *Science* **302**(5651): 1704–1709. doi: 10.1126/science.1092053
- Ridley AJ. 2015. Rho GTPase signalling in cell migration. *Current Opinion in Cell Biology* **36**: 103–112. doi: 10.1016/j.ceb.2015.08.005
- Ritchie K, Seah C, Moulin J, Isaac C, Dick F, Bérubé NG. 2008. Loss of ATRX leads to chromosome cohesion and congression defects. *J Cell Biol* **180**(2): 315–324. doi: 10.1083/jcb.200706083
- Ritter SL, Hall RA. 2009. Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(12): 819–830. doi: 10.1038/nrm2803
- Rivera AL, Pelloski CE, Gilbert MR, Colman H, De La Cruz C, Sulman EP, Bekele BN, Aldape KD. 2010. MGMT promoter methylation is predictive of response to radiotherapy and prognostic in the absence of adjuvant alkylating chemotherapy for glioblastoma. *Neuro-Oncology* **12**(2): 116–121. doi: 10.1093/neuonc/nop020

- Robertson SP. 2005. Filamin A: phenotypic diversity. *Current Opinion in Genetics & Development* **15**(3): 301–307. doi: 10.1016/j.gde.2005.04.001
- Robertson SP, Twigg SRF, Sutherland-Smith AJ, Biancalana V, Gorlin RJ, Horn D, Kenwrick SJ, Kim CA, Morava E, Newbury-Ecob R, et al. 2003. Localized mutations in the gene encoding the cytoskeletal protein filamin A cause diverse malformations in humans. *Nat Genet* **33**(4): 487–491. doi: 10.1038/ng1119
- Rollison DEM, Helzlsouer KJ, Alberg AJ, Hoffman S, Hou J, Daniel R, Shah KV, Major EO. 2003. Serum antibodies to JC virus, BK virus, simian virus 40, and the risk of incident adult astrocytic brain tumors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **12**(5): 460–463.
- Ropponen KM, Eskelinen MJ, Lipponen PK, Alhava E, Kosma V-M. 1997. Prognostic value of tumour-infiltrating lymphocytes (TILs) in colorectal cancer. *The Journal of Pathology* **182**(3): 318–324. doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(199707)182:3<318::AID-PATH862>3.0.CO;2-6
- Rosenberg S, Stracher A, Lucas RC. 1981. Isolation and characterization of actin and actin-binding protein from human platelets. *The Journal of Cell Biology* **91**(1): 201–211. doi: 10.1083/jcb.91.1.201
- Rosenkilde MM, Gerlach L-O, Jakobsen JS, Skerlj RT, Bridger GJ, Schwartz TW. 2004. Molecular Mechanism of AMD3100 Antagonism in the CXCR4 Receptor TRANSFER OF BINDING SITE TO THE CXCR3 RECEPTOR. *J Biol Chem* **279**(4): 3033–3041. doi: 10.1074/jbc.M309546200
- Ruskamo S, Gilbert R, Hofmann G, Jiang P, Campbell ID, Yläanne J, Pentikäinen U. 2012. The C-terminal rod 2 fragment of filamin A forms a compact structure that can be extended. *Biochemical Journal* **446**(2): 261–269. doi: 10.1042/BJ20120361
- Russell FD, Molenaar P. 2004. Investigation of signaling pathways that mediate the inotropic effect of urotensin-II in human heart. *Cardiovasc Res* **63**(4): 673–681. doi: 10.1016/j.cardiores.2004.05.009
- Sainsily X, Cabana J, Boulais PE, Holleran BJ, Escher E, Lavigne P, Leduc R. 2013. Identification of transmembrane domain 3, 4 & 5 residues that contribute to the formation of the ligand-binding pocket of the urotensin-II receptor. *Biochem Pharmacol* **86**(11): 1584–1593. doi: 10.1016/j.bcp.2013.09.015
- Salazar N, Carlson JC, Huang K, Zheng Y, Oderup C, Gross J, Jang AD, Burke TM, Lewén S, Scholz A, et al. 2018. A chimeric antibody against ACKR3/CXCR7 in combination with TMZ activates immune responses and extends survival in mouse GBM models. *Mol Ther* **26**(5): 1354–1365. doi: 10.1016/j.ymthe.2018.02.030
- Salimi R, Bandaru S, Devarakonda S, Gökalp S, Ala C, Alvandian A, Yener N, Akyürek LM. 2018. Blocking the cleavage of Filamin A by calpain inhibitor decreases tumor cell growth. *Anticancer Res* **38**(4): 2079–2085.
- Sansal I, Sellers WR. 2004. The biology and clinical relevance of the *PTEN* tumor suppressor pathway. *Journal of Clinical Oncology* **22**(14): 2954–2963. doi: 10.1200/JCO.2004.02.141
- Sanson M, Marie Y, Paris S, Idbaih A, Laffaire J, Ducray F, Hallani SE, Boisselier B, Mokhtari K, Hoang-Xuan K, et al. 2009. Isocitrate Dehydrogenase 1 Codon 132 Mutation Is an Important Prognostic Biomarker in Gliomas. *Journal of Clinical Oncology*, in press. doi: 10.1200/JCO.2009.21.9832
- Santoni M, Burattini L, Nabissi M, Morelli MB, Berardi R, Santoni G, Cascinu S. 2013. Essential role of Gli proteins in glioblastoma multiforme. *Curr Protein Pept Sci* **14**(2): 133–140.
- Sasaki A, Masuda Y, Ohta Y, Ikeda K, Watanabe K. 2001. Filamin associates with Smads and regulates Transforming Growth Factor- β signaling. *J Biol Chem* **276**(21): 17871–17877. doi: 10.1074/jbc.M008422200
- Savinko T, Guenther C, Uotila LM, Lloret Asens M, Yao S, Tojkander S, Fagerholm SC. 2018. Filamin A is required for optimal T cell Integrin-mediated force transmission, flow adhesion, and T cell trafficking. *J Immunol* **200**(9): 3109–3116. doi: 10.4049/jimmunol.1700913
- Savoy RM, Ghosh PM. 2013. The dual role of filamin A in cancer: can't live with (too much of) it, can't live without it. *Endocrine Related Cancer* **20**(6): R341–R356. doi: 10.1530/ERC-13-0364

- Schiffer D, Annovazzi L, Casalone C, Corona C, Mellai M. 2018. Glioblastoma: microenvironment and niche concept. *Cancers (Basel)* **11**(1). doi: 10.3390/cancers11010005
- Sciumè G, Santoni A, Bernardini G. 2010-1. Chemokines and glioma: Invasion and more. *Journal of Neuroimmunology* **224**(1): 8–12. doi: 10.1016/j.jneuroim.2010.05.019
- Sciumè G, Soriani A, Piccoli M, Frati L, Santoni A, Bernardini G. 2010. CX3CR1/CX3CL1 axis negatively controls glioma cell invasion and is modulated by transforming growth factor- β 1. *Neuro-oncology* **12**(7): 701–710. doi: 10.1093/neuonc/nop076
- Scott AM, Lee F-T, Tebbutt N, Herbertson R, Gill SS, Liu Z, Skrinos E, Murone C, Saunder TH, Chappell B, et al. 2007. A phase I clinical trial with monoclonal antibody ch806 targeting transitional state and mutant epidermal growth factor receptors. *PNAS* **104**(10): 4071–4076. doi: 10.1073/pnas.0611693104
- Scott MGH, Pierotti V, Storez H, Lindberg E, Thuret A, Muntaner O, Labbé-Jullié C, Pitcher JA, Marullo S. 2006. Cooperative regulation of extracellular signal-regulated kinase activation and cell shape change by Filamin A and β -Arrestins. *Molecular and Cellular Biology* **26**(9): 3432–3445. doi: 10.1128/MCB.26.9.3432-3445.2006
- Seck T, Baron R, Horne WC. 2003. Binding of Filamin to the C-terminal tail of the Calcitonin Receptor controls recycling. *J Biol Chem* **278**(12): 10408–10416. doi: 10.1074/jbc.M209655200
- Seftor REB, Seftor EA, Koshikawa N, Meltzer PS, Gardner LMG, Bilban M, Stetler-Stevenson WG, Quaranta V, Hendrix MJC. 2001. Cooperative interactions of laminin 5 γ 2 chain, matrix metalloproteinase-2, and membrane type-1-matrix/metalloproteinase are required for mimicry of embryonic vasculogenesis by aggressive melanoma. *Cancer Res* **61**(17): 6322–6327.
- Segain J-P, Rolli-Derkinderen M, Gervois N, Raingeard de la Blétière D, Loirand G, Pacaud P. 2007. Urotensin II is a new chemotactic factor for UT receptor-expressing monocytes. *J Immunol* **179**(2): 901–909. doi: 10.4049/jimmunol.179.2.901
- Segura I, Lange C, Knevels E, Moskalyuk A, Pulizzi R, Eelen G, Chaze T, Tudor C, Boulegue C, Holt M, et al. 2016. The oxygen sensor PHD2 controls dendritic spines and synapses via modification of Filamin A. *Cell Reports* **14**(11): 2653–2667. doi: 10.1016/j.celrep.2016.02.047
- Seidel S, Garvalov BK, Wirta V, von Stechow L, Schänzer A, Meletis K, Wolter M, Sommerlad D, Henze A-T, Nistér M, et al. 2010. A hypoxic niche regulates glioblastoma stem cells through hypoxia inducible factor 2 alpha. *Brain* **133**(Pt 4): 983–995. doi: 10.1093/brain/awq042
- Sells MA, Boyd JT, Chernoff J. 1999. p21-Activated Kinase 1 (Pak1) regulates cell motility in mammalian fibroblasts. *J Cell Biol* **145**(4): 837–849.
- Semenza GL. 2003. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **3**(10): 721–732. doi: 10.1038/nrc1187
- Semenza GL. 2010. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr Opin Genet Dev* **20**(1): 51–56. doi: 10.1016/j.gde.2009.10.009
- Sepúlveda-Sánchez JM, Vaz MÁ, Balañá C, Gil-Gil M, Reynés G, Gallego Ó, Martínez-García M, Vicente E, Quindós M, Luque R, et al. 2017. Phase II trial of dacomitinib, a pan-human EGFR tyrosine kinase inhibitor, in recurrent glioblastoma patients with EGFR amplification. *Neuro-oncology* **19**(11): 1522–1531. doi: 10.1093/neuonc/nox105
- Servant G, Weiner OD, Herzmark P, Balla T, Sedat JW, Bourne HR. 2000. Polarization of chemoattractant receptor signaling during neutrophil chemotaxis. *Science* **287**(5455): 1037–1040. doi: 10.1126/science.287.5455.1037
- Shah KV. 2000. Polyoma Viruses (JC Virus, BK Virus, and Simian Virus 40) and Human Cancer. In: Goedert JJ, editor. *Infectious Causes of Cancer: Targets for Intervention*. Totowa, NJ: Humana Press. p. 461–474. doi: 10.1007/978-1-59259-024-7_26
- Sharma CP, Goldmann WH. 2004. Phosphorylation of actin-binding protein (ABP-280; filamin) by tyrosine kinase p56lck modulates actin filament cross-linking. *Cell Biology International* **28**(12): 935–941. doi: 10.1016/j.cellbi.2004.09.006

- Sheehan JP, Shaffrey ME, Gupta B, Larner J, Rich JN, Park DM. 2010. Improving the radiosensitivity of radioresistant and hypoxic glioblastoma. *Future Oncol* **6**(10): 1591–1601. doi: 10.2217/fon.10.123
- Sheen VL. 2002. Filamin A and Filamin B are co-expressed within neurons during periods of neuronal migration and can physically interact. *Human Molecular Genetics* **11**(23): 2845–2854. doi: 10.1093/hmg/11.23.2845
- Sheen VL, Dixon PH, Fox JW, Hong SE, Kinton L, Sisodiya SM, Duncan JS, Dubeau F, Scheffer IE, Schachter SC, et al. 2001. Mutations in the X-linked filamin 1 gene cause periventricular nodular heterotopia in males as well as in females. *Hum Mol Genet* **10**(17): 1775–1783. doi: 10.1093/hmg/10.17.1775
- Shenouda A, Douglas SA, Ohlstein EH, Giaid A. 2002. Localization of urotensin-II immunoreactivity in normal human kidneys and renal carcinoma. *J Histochem Cytochem* **50**(7): 885–889. doi: 10.1177/002215540205000702
- Shieh DB, Godleski J, Herndon JE, Azuma T, Mercer H, Sugarbaker DJ, Kwiatkowski DJ. 1999. Cell motility as a prognostic factor in Stage I nonsmall cell lung carcinoma: the role of gelsolin expression. *Cancer* **85**(1): 47–57. doi: 10.1002/(sici)1097-0142(19990101)85:1<47::aid-cncr7>3.0.co;2-l
- Shields MB, Buckley E, Klintworth GK, Thresher R. 1985. Axenfeld-Rieger syndrome. A spectrum of developmental disorders. *Survey of Ophthalmology* **29**(6): 387–409. doi: 10.1016/0039-6257(85)90205-X
- Shin H-J, Rho SB, Jung DC, Han I-O, Oh E-S, Kim J-Y. 2011. Carbonic anhydrase IX (CA9) modulates tumor-associated cell migration and invasion. *J Cell Sci* **124**(Pt 7): 1077–1087. doi: 10.1242/jcs.072207
- Shukla A, Shukla GS, Srimal RC. 1996. Cadmium-induced alterations in blood-brain barrier permeability and its possible correlation with decreased microvessel antioxidant potential in rat. *Hum Exp Toxicol* **15**(5): 400–405. doi: 10.1177/096032719601500507
- Siebzehnruhl FA, Silver DJ, Tugertimur B, Deleyrolle LP, Siebzehnruhl D, Sarkisian MR, Devers KG, Yachnis AT, Kupper MD, Neal D, et al. 2013. The ZEB1 pathway links glioblastoma initiation, invasion and chemoresistance. *EMBO Mol Med* **5**(8): 1196–1212. doi: 10.1002/emmm.201302827
- Sigismund S, Avanzato D, Lanzetti L. 2018. Emerging functions of the EGFR in cancer. *Molecular Oncology* **12**(1): 3–20. doi: 10.1002/1878-0261.12155
- Soeda A, Park M, Lee D, Mintz A, Androutsellis-Theotokis A, McKay RD, Engh J, Iwama T, Kunisada T, Kassam AB, et al. 2009. Hypoxia promotes expansion of the CD133-positive glioma stem cells through activation of HIF-1alpha. *Oncogene* **28**(45): 3949–3959. doi: 10.1038/onc.2009.252
- Sordillo LA, Sordillo PP, Helson L. 2016. Sphingosine kinase inhibitors as maintenance therapy of glioblastoma after ceramide-induced response. *Anticancer Res* **36**(5): 2085–2095.
- Sottoriva A, Spiteri I, Piccirillo SGM, Touloumis A, Collins VP, Marioni JC, Curtis C, Watts C, Tavare S. 2013. Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**(10): 4009–4014. doi: 10.1073/pnas.1219747110
- Spinazzi R, Albertin G, Nico B, Guidolin D, Di Liddo R, Rossi GP, Ribatti D, Nussdorfer GG. 2006. Urotensin-II and its receptor (UT-R) are expressed in rat brain endothelial cells, and urotensin-II via UT-R stimulates angiogenesis in vivo and in vitro. *International Journal of Molecular Medicine* **18**(6): 1107–1112. doi: 10.3892/ijmm.18.6.1107
- Stefanik DF, Fellows WK, Rizkalla LR, Rizkalla WM, Stefanik PP, Deleo AB, Welch WC. 2001. Monoclonal antibodies to vascular endothelial growth factor (VEGF) and the VEGF receptor, FLT-1, inhibit the growth of C6 glioma in a mouse xenograft. *J Neurooncol* **55**(2): 91–100. doi: 10.1023/a:1013329832067
- Stirrat A, Gallagher M, Douglas SA, Ohlstein EH, Berry C, Kirk A, Richardson M, MacLean MR. 2001. Potent vasodilator responses to human urotensin-II in human pulmonary and abdominal

- resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**(2): H925-928. doi: 10.1152/ajpheart.2001.280.2.H925
- Stupp R, Hegi ME, Gorlia T, Erridge SC, Perry J, Hong Y-K, Aldape KD, Lhermitte B, Pietsch T, Grujicic D, et al. 2014. Cilengitide combined with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CENTRIC EORTC 26071-22072 study): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* **15**(10): 1100–1108. doi: 10.1016/S1470-2045(14)70379-1
- Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJB, Janzer RC, Ludwin SK, Allgeier A, Fisher B, Belanger K, et al. 2009. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* **10**(5): 459–466. doi: 10.1016/S1470-2045(09)70025-7
- Stupp R, Weller M, Belanger K, Bogdahn U, Ludwin SK, Lacombe D, Mirimanoff RO. 2005. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *The New England Journal of Medicine* **352**(10):987-96. doi : 10.1056/NEJMoa043330
- Sugawa N, Ekstrand AJ, James CD, Collins VP. 1990. Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**(21): 8602–8606. doi: 10.1073/pnas.87.21.8602
- Sugo T, Murakami Y, Shimomura Y, Harada M, Abe M, Ishibashi Y, Kitada C, Miyajima N, Suzuki N, Mori M, et al. 2003. Identification of urotensin II-related peptide as the urotensin II-immunoreactive molecule in the rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* **310**(3): 860–868. doi: 10.1016/j.bbrc.2003.09.102
- Sun GG, Lu YF, Cheng YJ, Hu WN. 2014-1. Absent expression of FLNA is correlated with poor prognosis of nasopharyngeal cancer. *Tumor Biol* **35**(4): 2967–2974. doi: 10.1007/s13277-013-1381-z
- Sun GG, Lu YF, Zhang J, Hu WN. 2014-2. Filamin A regulates MMP-9 expression and suppresses prostate cancer cell migration and invasion. *Tumor Biology* **35**(4): 3819–3826. doi: 10.1007/s13277-013-1504-6
- Sun GG, Sheng SH, Jing SW, Hu WN. 2014-3. An antiproliferative gene FLNA regulates migration and invasion of gastric carcinoma cell in vitro and its clinical significance. *Tumor Biol* **35**(3): 2641–2648. doi: 10.1007/s13277-013-1347-1
- Sun G-G, Wei C-D, Jing S-W, Hu W-N. 2014. Interactions between Filamin A and MMP-9 Regulate Proliferation and Invasion in Renal Cell Carcinoma. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* **15**(8): 3789–3795. doi: 10.7314/APJCP.2014.15.8.3789
- Surcel A, Schiffhauer ES, Thomas DG, Zhu Q, DiNapoli KT, Herbig M, Otto O, West-Foyle H, Jacobi A, Kräter M, et al. 2019 Jan 1. Targeting mechanoresponsive proteins in pancreatic cancer: 4-hydroxyacetophenone blocks dissemination and invasion by activating MYH14. *Cancer Res: canres.3131.2018*. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-3131
- Swietach P, Hulikova A, Vaughan-Jones RD, Harris AL. 2010. New insights into the physiological role of carbonic anhydrase IX in tumour pH regulation. *Oncogene* **29**(50): 6509–6521. doi: 10.1038/onc.2010.455
- Sy M-S, Li C, Yu S, Xin W. 2010. The fatal attraction between pro-prion and filamin A: prion as a marker in human cancers. *Biomark Med* **4**(3): 453–464. doi: 10.2217/bmm.10.14
- Syková E, Nicholson C. 2008. Diffusion in brain extracellular space. *Physiol Rev* **88**(4): 1277–1340. doi: 10.1152/physrev.00027.2007
- Szeto SGY, Williams EC, Rudner AD, Lee JM. 2015. Phosphorylation of filamin A by Cdk1 regulates filamin A localization and daughter cell separation. *Experimental Cell Research* **330**(2): 248–266. doi: 10.1016/j.yexcr.2014.10.024
- Takahashi K, Totsune K, Murakami O, Shibahara S. 2001. Expression of urotensin II and urotensin II receptor mRNAs in various human tumor cell lines and secretion of urotensin II-like immunoreactivity by SW-13 adrenocortical carcinoma cells. *Peptides* **22**(7): 1175–1179. doi: 10.1016/S0196-9781(01)00441-7

- Takahashi K, Totsune K, Murakami O, Arihara Z, Noshiro T, Hayashi Y, Shibahara S. 2003. Expression of urotensin II and its receptor in adrenal tumors and stimulation of proliferation of cultured tumor cells by urotensin II. *Peptides* **24**(2): 301–306. doi: 10.1016/s0196-9781(03)00039-1
- Takala H., Nurminen E, Nurmi SM, Aatonen M, Strandin T, Takatalo M, Kiema T, Gahmberg CG, Ylanne J, Fagerholm SC. 2008-1. α 2 integrin phosphorylation on Thr758 acts as a molecular switch to regulate 14-3-3 and filamin binding. *Blood* **112**(5): 1853–1862. doi: 10.1182/blood-2007-12-127795
- Takala Heikki, Nurminen E, Nurmi SM, Aatonen M, Strandin T, Takatalo M, Kiema T, Gahmberg CG, Ylänne J, Fagerholm SC. 2008-2. β 2 integrin phosphorylation on Thr758 acts as a molecular switch to regulate 14-3-3 and filamin binding. *Blood* **112**(5): 1853–1862. doi: 10.1182/blood-2007-12-127795
- Tal M, Ammar DA, Karpuj M, Krizhanovsky V, Naim M, Thompson DA. 1995. A novel putative neuropeptide receptor expressed in neural tissue, including sensory epithelia. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **209**(2): 752–759. doi: 10.1006/bbrc.1995.1563
- Talasila KM, Røslund GV, Hagland HR, Eskilsson E, Flønes IH, Fritah S, Azuaje F, Atai N, Harter PN, Mittelbronn M, et al. 2017. The angiogenic switch leads to a metabolic shift in human glioblastoma. *Neuro Oncol* **19**(3): 383–393. doi: 10.1093/neuonc/now175
- Tang J, Wu S, Liu H, Stratt R, Barak OG, Shiekhattar R, Picketts DJ, Yang X. 2004. A novel transcription regulatory complex containing death domain-associated protein and the ATR-X syndrome protein. *J Biol Chem* **279**(19): 20369–20377. doi: 10.1074/jbc.M401321200
- Tano K, Shiota S, Collier J, Foote RS, Mitra S. 1990. Isolation and structural characterization of a cDNA clone encoding the human DNA repair protein for O6-alkylguanine. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**(2): 686–690. doi: 10.1073/pnas.87.2.686
- Tasaki K, Hori M, Ozaki H, Karaki H, Wakabayashi I. 2004. Mechanism of human urotensin II-induced contraction in rat aorta. *J Pharmacol Sci* **94**(4): 376–383. doi: 10.1254/jphs.94.376
- Taylor JW, Parikh M, Phillips JJ, James CD, Molinaro AM, Butowski NA, Clarke JL, Oberheim-Bush NA, Chang SM, Berger MS, et al. 2018. Phase-2 trial of palbociclib in adult patients with recurrent RB1-positive glioblastoma. *J Neurooncol* **140**(2): 477–483. doi: 10.1007/s11060-018-2977-3
- Tews DS. 2000. Adhesive and invasive features in gliomas. *Pathology - Research and Practice* **196**(10): 701–711. doi: 10.1016/S0344-0338(00)80122-3
- Thibaudeau TA, Smith DM. 2019. A practical review of proteasome pharmacology. *Pharmacol Rev* **71**(2): 170–197. doi: 10.1124/pr.117.015370
- Thiery JP. 2002. Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* **2**(6): 442–454. doi: 10.1038/nrc822
- Thorne RG, Nicholson C. 2006. In vivo diffusion analysis with quantum dots and dextrans predicts the width of brain extracellular space. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**(14): 5567–5572. doi: 10.1073/pnas.0509425103
- Tian H-M, Liu X-H, Han W, Zhao L-L, Yuan B, Yuanc C-J. 2013. Differential expression of filamin A and its clinical significance in breast cancer. *Oncol Lett* **6**(3): 681–686. doi: 10.3892/ol.2013.1454
- Tian Z-Q, Shi J-W, Wang X-R, Li Z, Wang G-Y. 2015. New cancer suppressor gene for colorectal adenocarcinoma: Filamin A. *World J Gastroenterol* **21**(7): 2199–2205. doi: 10.3748/wjg.v21.i7.2199
- Tigges U, Koch B, Wissing J, Jockusch BM, Ziegler WH. 2003. The F-actin cross-linking and focal adhesion protein filamin A is a ligand and in vivo substrate for protein kinase C alpha. *J Biol Chem* **278**(26): 23561–23569. doi: 10.1074/jbc.M302302200
- Tostivint H, Lihmann I, Vaudry H. 2006. Urotensin II and somatostatin: two old cousins get together again. *Med Sci (Paris)* **22**(5): 476–478. doi: 10.1051/medsci/2006225476
- Totsune K, Takahashi K, Arihara Z, Sone M, Satoh F, Ito S, Kimura Y, Sasano H, Murakami O. 2001. Role of urotensin II in patients on dialysis. *Lancet* **358**(9284): 810–811. doi: 10.1016/S0140-6736(01)06002-0

- Traub LM, Bonifacino JS. 2013. Cargo recognition in clathrin-mediated endocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**(11): a016790. doi: 10.1101/cshperspect.a016790
- Trejo J. 2005. Internal PDZ ligands: novel endocytic recycling motifs for G protein-coupled receptors. *Mol Pharmacol* **67**(5): 1388–1390. doi: 10.1124/mol.105.011288
- Truglia JA, Stracher A. 1981. Purification and characterization of a calcium dependent sulfhydryl protease from human platelets. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **100**(2): 814–822. doi: 10.1016/S0006-291X(81)80247-1
- Tsuji T, Ibaragi S, Hu G. 2009. Epithelial-Mesenchymal Transition and cell cooperativity in metastasis. *Cancer Res* **69**(18): 7135–7139. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1618
- Tu C-L, You M. 2014. Obligatory roles of filamin A in E-cadherin-mediated cell-cell adhesion in epidermal keratinocytes. *J Dermatol Sci* **73**(2): 142–151. doi: 10.1016/j.jdermsci.2013.09.007
- Tzanidis A, Hannan RD, Thomas WG, Onan D, Autelitano DJ, See F, Kelly DJ, Gilbert RE, Krum H. 2003. Direct actions of urotensin II on the heart: implications for cardiac fibrosis and hypertrophy. *Circ Res* **93**(3): 246–253. doi: 10.1161/01.RES.0000084382.64418.BC
- Ueda K, Ohta Y, Hosoya H. 2003. The carboxy-terminal pleckstrin homology domain of ROCK interacts with filamin-A. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **301**(4): 886–890. doi: 10.1016/S0006-291X(03)00048-2
- Ullah MS, Davies AJ, Halestrap AP. 2006. The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1 α -dependent mechanism. *J Biol Chem* **281**(14): 9030–9037. doi: 10.1074/jbc.M511397200
- Uramoto H, Akyürek LM, Hanagiri T. 2010. A positive relationship between filamin and VEGF in patients with lung cancer. *Anticancer Res* **30**(10): 3939–3944.
- Vadlamudi RK, Li F, Adam L, Nguyen D, Ohta Y, Stossel TP, Kumar R. 2002. Filamin is essential in actin cytoskeletal assembly mediated by p21-activated kinase 1. *Nature Cell Biology* **4**(9): 681–690. doi: 10.1038/ncb838
- Vakilian A, Khorramdelazad H, Heidari P, Sheikh Rezaei Z, Hassanshahi G. 2017. CCL2/CCR2 signaling pathway in glioblastoma multiforme. *Neurochem Int* **103**: 1–7. doi: 10.1016/j.neuint.2016.12.013
- Vázquez-Victorio G, González-Espinosa C, Espinosa-Riquer ZP, Macías-Silva M. 2016. Chapter 9 - GPCRs and actin–cytoskeleton dynamics. In: K. Shukla A, editor. *Methods in Cell Biology*. Academic Press. p. 165–188. doi: 10.1016/bs.mcb.2015.10.003
- Veeravalli KK, Rao JS. 2012. MMP-9 and uPAR regulated glioma cell migration. *Cell Adh Migr* **6**(6): 509–512. doi: 10.4161/cam.21673
- Velkova A, Carvalho MA, Johnson JO, Tavtigian SV, Monteiro ANA. 2010. Identification of Filamin A as a BRCA1-interacting protein required for efficient DNA repair. *Cell Cycle* **9**(7): 1421–1433. doi: 10.4161/cc.9.7.11256
- van der Ven PFM, Wiesner S, Salmikangas P, Auerbach D, Himmel M, Kempa S, Hayeß K, Pacholsky D, Taivainen A, Schröder R, et al. 2000. Indications for a novel muscular dystrophy pathway. *J Cell Biol* **151**(2): 235–248.
- Vengoji R, Macha MA, Nimmakayala RK, Rachagani S, Siddiqui JA, Mallya K, Gorantla S, Jain M, Ponnusamy MP, Batra SK, et al. 2019. Afatinib and Temozolomide combination inhibits tumorigenesis by targeting EGFRvIII-cMet signaling in glioblastoma cells. *J Exp Clin Cancer Res* **38**(1): 266. doi: 10.1186/s13046-019-1264-2
- Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP, et al. 2010. Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* **17**(1): 98–110. doi: 10.1016/j.ccr.2009.12.020
- Viapiano MS, Hockfield S, Matthews RT. 2008. BEHAB/brevican requires ADAMTS-mediated proteolytic cleavage to promote glioma invasion. *J Neurooncol* **88**(3): 261–272. doi: 10.1007/s11060-008-9575-8

- Virga J, Szemcsák CD, Reményi-Puskár J, Tóth J, Hortobágyi T, Csósz É, Zahuczky G, Szivos L, Bognár L, Klekner A. 2017. Differences in extracellular matrix composition and its role in invasion in primary and secondary intracerebral malignancies. *Anticancer Res* **37**(8): 4119–4126.
- Vitali E, Cambiaghi V, Zerbi A, Carnaghi C, Colombo P, Peverelli E, Spada A, Mantovani G, Lania AG. 2016. Filamin-A is required to mediate SST2 effects in pancreatic neuroendocrine tumours. *Endocrine-Related Cancer* **23**(3): 181–190. doi: 10.1530/ERC-15-0358
- Waisberg M, Joseph P, Hale B, Beyersmann D. 2003. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* **192**(2–3): 95–117. doi: 10.1016/s0300-483x(03)00305-6
- Waldt N, Seifert A, Demiray YE, Devroe E, Turk BE, Reichardt P, Mix C, Reinhold A, Freund C, Müller AJ, et al. 2018. Filamin A phosphorylation at Serine 2152 by the Serine/Threonine Kinase Ndr2 controls TCR-Induced LFA-1 activation in T Cells. *Front Immunol* **9**. doi: 10.3389/fimmu.2018.02852
- Walenta S, Mueller-Klieser WF. 2004-1. Lactate: mirror and motor of tumor malignancy. *Semin Radiat Oncol* **14**(3): 267–274. doi: 10.1016/j.semradonc.2004.04.004
- Walenta S, Schroeder T, Mueller-Klieser W. 2004-2. Lactate in solid malignant tumors: potential basis of a metabolic classification in clinical oncology. *Curr Med Chem* **11**(16): 2195–2204. doi: 10.2174/0929867043364711
- Wang J, Xu S-L, Duan J-J, Yi L, Guo Y-F, Shi Y, Li L, Yang Z-Y, Liao X-M, Cai J, et al. 2019. Invasion of white matter tracts by glioma stem cells is regulated by a NOTCH1–SOX2 positive-feedback loop. *Nature Neuroscience* **22**(1): 91–105. doi: 10.1038/s41593-018-0285-z
- Wang K, Ash JF, Singer SJ. 1975. Filamin, a new high-molecular-weight protein found in smooth muscle and non-muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**(11): 4483–4486.
- Wang R, Chadalavada K, Wilshire J, Kowalik U, Hovinga KE, Geber A, Fligelman B, Leversha M, Brennan C, Tabar V. 2010. Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. *Nature* **468**(7325): 829–833. doi: 10.1038/nature09624
- Wang Y, Kreisberg JI, Bedolla RG, Mikhailova M, deVere White RW, Ghosh PM. 2007. A 90 kDa fragment of filamin A promotes Casodex-induced growth inhibition in Casodex-resistant androgen receptor positive C4-2 prostate cancer cells. *Oncogene* **26**(41): 6061–6070. doi: 10.1038/sj.onc.1210435
- Wang Y, Liu T, Yang N, Xu S, Li X, Wang D. 2016. Hypoxia and macrophages promote glioblastoma invasion by the CCL4-CCR5 axis. *Oncol Rep* **36**(6): 3522–3528. doi: 10.3892/or.2016.5171
- Wang Y-L, Zhao X-M, Shuai Z-F, Li C-Y, Bai Q-Y, Yu X-W, Wen Q-T. 2015. Snail promotes epithelial-mesenchymal transition and invasiveness in human ovarian cancer cells. *Int J Clin Exp Med* **8**(5): 7388–7393.
- Wei H, Wei H, Yu X, Yu X, Xue X, Xue X, Liu H, Liu H, Wang M, Wang M, et al. 2017. Urotensin II receptor as a potential biomarker for the prognosis of hepatocellular carcinoma patients. *Oncology Letters* **14**(3): 2749–2756. doi: 10.3892/ol.2017.6545
- Wei K-C, Huang C-Y, Chen P-Y, Feng L-Y, Wu T-WE, Chen S-M, Tsai H-C, Lu Y-J, Tsang N-M, Tseng C-K, et al. 2010. Evaluation of the prognostic value of CD44 in glioblastoma multiforme. *Anticancer Res* **30**(1): 253–259.
- Weller M, Stupp R, Hegi ME, van den Bent M, Tonn JC, Sanson M, Wick W, Reifenberger G. 2012. Personalized care in neuro-oncology coming of age: why we need MGMT and 1p/19q testing for malignant glioma patients in clinical practice. *Neuro-Oncology* **14**(suppl 4): iv100–iv108. doi: 10.1093/neuonc/nos206
- Weller M, Wick W, Aldape K, Brada M, Berger M, Pfister SM, Nishikawa R, Rosenthal M, Wen PY, Stupp R, et al. 2015. Glioma. *Nature Reviews Disease Primers* **1**(1). doi: 10.1038/nrdp.2015.17
- Wellner U, Schubert J, Burk UC, Schmalhofer O, Zhu F, Sonntag A, Waldvogel B, Vannier C, Darling D, zur Hausen A, et al. 2009. The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nat Cell Biol* **11**(12): 1487–1495. doi: 10.1038/ncb1998
- Welti J, Loges S, Dimmeler S, Carmeliet P. 2013. Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer. *J Clin Invest* **123**(8): 3190–3200. doi: 10.1172/JCI70212

- Wen PY, Omuro A, Ahluwalia MS, Fathallah-Shaykh HM, Mohile N, Lager JJ, Laird AD, Tang J, Jiang J, Egile C, et al. 2015. Phase I dose-escalation study of the PI3K/mTOR inhibitor voxalisib (SAR245409, XL765) plus temozolomide with or without radiotherapy in patients with high-grade glioma. *Neuro-oncology* **17**(9): 1275–1283. doi: 10.1093/neuonc/nov083
- Wen PY, Touat M, Alexander BM, Mellinshoff IK, Ramkissoon S, McCluskey CS, Pelton K, Haidar S, Basu SS, Gaffey SC, et al. 2019. Buparlisib in patients with recurrent glioblastoma harboring phosphatidylinositol 3-kinase pathway activation: an open-label, multicenter, multi-arm, phase II trial. *J Clin Oncol* **37**(9): 741–750. doi: 10.1200/JCO.18.01207
- Wen PY, Yung WKA, Lamborn KR, Dahia PL, Wang Y, Peng B, Abrey LE, Raizer J, Cloughesy TF, Fink K, et al. 2006. Phase I/II study of imatinib mesylate for recurrent malignant gliomas: North American Brain Tumor Consortium Study 99-08. *Clin Cancer Res* **12**(16): 4899–4907. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0773
- Wesseling C, Pukkala E, Neuvonen K, Kauppinen T, Boffetta P, Partanen T. 2002. Cancer of the brain and nervous system and occupational exposures in Finnish women. *J Occup Environ Med* **44**(7): 663–668. doi: 10.1097/00043764-200207000-00013
- Wesseling P, van den Bent M, Perry A. 2015. Oligodendroglioma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol* **129**(6): 809–827. doi: 10.1007/s00401-015-1424-1
- Wesseling P, Ruiter DJ, Burger PC. 1997. Angiogenesis in brain tumors; pathobiological and clinical aspects. *J Neurooncol* **32**(3): 253–265. doi: 10.1023/a:1005746320099
- Westphal M, Lamszus K. 2011. The neurobiology of gliomas: from cell biology to the development of therapeutic approaches. *Nat Rev Neurosci* **12**(9): 495–508. doi: 10.1038/nrn3060
- Wick W, Hartmann C, Engel C, Stoffels M, Felsberg J, Stockhammer F, Sabel MC, Koeppe S, Ketter R, Meyermann R, et al. 2009. NOA-04 Randomized phase III trial of sequential radiochemotherapy of Anaplastic Glioma with Procarbazine, Lomustine, and Vincristine or Temozolomide. *Journal of Clinical Oncology* **27**(35): 5874–5880. doi: 10.1200/JCO.2009.23.6497
- Wick W, Weller M, van den Bent M, Sanson M, Weiler M, von Deimling A, Plass C, Hegi M, Platten M, Reifenberger G. 2014. MGMT testing—the challenges for biomarker-based glioma treatment. *Nature Reviews Neurology* **10**(7): 372–385. doi: 10.1038/nrneurol.2014.100
- Wickstrand CJ, Stanley SD, Humphrey PA, Pegram CN, Archer GE, Kurpad S, Shibuya M, Bigner DD. 1993. Investigation of a synthetic peptide as immunogen for a variant epidermal growth factor receptor associated with gliomas. *J Neuroimmunol* **46**(1-2):165-73. doi: 10.1016/0165-5728(93)90246-u
- Wiemels JL, Wiencke JK, Kelsey KT, Moghadassi M, Rice T, Urayama KY, Miike R, Wrensch M. 2007. Allergy-Related Polymorphisms Influence Glioma Status and Serum IgE Levels. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* **16**(6): 1229–1235. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-07-0041
- Wilson TA, Karajannis MA, Harter DH. 2014. Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics. *Surg Neurol Int* **5**: 64. doi: 10.4103/2152-7806.132138
- Wootten D, Christopoulos A, Marti-Solano M, Babu MM, Sexton PM. 2018. Mechanisms of signalling and biased agonism in G protein-coupled receptors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **19**(10): 638–653. doi: 10.1038/s41580-018-0049-3
- Wu Y-Q, Song Z, Zhou C-H, Xing S-H, Pei D-S, Zheng J-N. 2010. Expression of urotensin II and its receptor in human lung adenocarcinoma A549 cells and the effect of urotensin II on lung adenocarcinoma growth in vitro and in vivo. *Oncol Rep* **24**(5): 1179–1184. doi: 10.3892/or_00000970
- Xie S, Wang Z, Okano M, Nogami M, Li Y, He WW, Okumura K, Li E. 1999. Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family. *Gene* **236**(1): 87–95. doi: 10.1016/s0378-1119(99)00252-8

- Xie Y, Huo S, Zhang G, Zhang F, Lian Z, Tang X, Jin C. 2012. CDA-2 induces cell differentiation through suppressing Twist/SLUG signaling via miR-124 in glioma. *J Neurooncol* **110**(2): 179–186. doi: 10.1007/s11060-012-0961-x
- Xie Z, Xu W, Davie EW, Chung DW. 1998. Molecular cloning of human ABPL, an actin-binding protein homologue. *Biochem Biophys Res Commun* **251**(3): 914–919. doi: 10.1006/bbrc.1998.9506
- Xu Yingjie, Bismar TA, Su J, Xu B, Kristiansen G, Varga Z, Teng L, Ingber DE, Mammoto A, Kumar R, et al. 2010. Filamin A regulates focal adhesion disassembly and suppresses breast cancer cell migration and invasion. *J Exp Med* **207**(11): 2421–2437. doi: 10.1084/jem.20100433
- Xu Yin, Stamenkovic I, Yu Q. 2010. CD44 attenuates activation of the hippo signaling pathway and is a prime therapeutic target for glioblastoma. *Cancer Res* **70**(6): 2455–2464. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2505
- Xu W, Xie Z, Chung DW, Davie EW. 1998. A Novel Human Actin-Binding Protein Homologue That Binds to Platelet Glycoprotein Ib α . *Blood* **92**(4): 1268–1276.
- Yamaguchi Y. 2000. Lecticans: organizers of the brain extracellular matrix. *Cellular and Molecular Life Sciences* **57**(2): 276–289. doi: 10.1007/PL00000690
- Yamazaki H, Ohba Y, Tamaoki N, Shibuya M. 1990. A deletion mutation within the ligand binding domain is responsible for activation of epidermal growth factor receptor gene in human brain tumors. *Jpn J Cancer Res* **81**(8): 773–779. doi: 10.1111/j.1349-7006.1990.tb02644.x
- Yan G-N, Yang L, Lv Y-F, Shi Y, Shen L-L, Yao X-H, Guo Q-N, Zhang P, Cui Y-H, Zhang X, et al. 2014. Endothelial cells promote stem-like phenotype of glioma cells through activating the Hedgehog pathway. *J Pathol* **234**(1): 11–22. doi: 10.1002/path.4349
- Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, Kos I, Batinic-Haberle I, Jones S, Riggins GJ, et al. 2009. *IDH1* and *IDH2* Mutations in Gliomas. *New England Journal of Medicine* **360**(8): 765–773. doi: 10.1056/NEJMoa0808710
- Yan Y, Zuo X, Wei D. 2015. Concise Review: Emerging Role of CD44 in Cancer Stem Cells: a promising biomarker and therapeutic target. *STEM CELLS Translational Medicine* **4**(9): 1033–1043. doi: 10.5966/sctm.2015-0048
- Yang L, Jackson E, Woerner BM, Perry A, Piwnica-Worms D, Rubin JB. 2007. Blocking CXCR4-mediated cyclic AMP suppression inhibits brain tumor growth in vivo. *Cancer Res* **67**(2): 651–658. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2762
- Yang L, Lin C, Wang L, Guo H, Wang X. 2012. Hypoxia and hypoxia-inducible factors in glioblastoma multiforme progression and therapeutic implications. *Exp Cell Res* **318**(19): 2417–2426. doi: 10.1016/j.yexcr.2012.07.017
- Yang M-H, Wu M-Z, Chiou S-H, Chen P-M, Chang S-Y, Liu C-J, Teng S-C, Wu K-J. 2008. Direct regulation of TWIST by HIF-1 α promotes metastasis. *Nat Cell Biol* **10**(3): 295–305. doi: 10.1038/ncb1691
- Yao X-H, Ping Y-F, Chen J-H, Xu C-P, Chen D-L, Zhang R, Wang JM, Bian X-W. 2008. Glioblastoma stem cells produce vascular endothelial growth factor by activation of a G-protein coupled formylpeptide receptor FPR. *J Pathol* **215**(4): 369–376. doi: 10.1002/path.2356
- Yi K, Yu M, Wu L, Tan X. 2012. Effects of urotensin II on functional activity of late endothelial progenitor cells. *Peptides* **33**(1): 87–91. doi: 10.1016/j.peptides.2011.11.016
- Yoshida N, Ogata T, Tanabe K, Li S, Nakazato M, Kohu K, Takafuta T, Shapiro S, Ohta Y, Satake M, et al. 2005. Filamin A-bound PEBP2 β /CBF β is retained in the cytoplasm and prevented from functioning as a partner of the Runx1 Transcription factor. *Mol Cell Biol* **25**(3): 1003–1012. doi: 10.1128/MCB.25.3.1003-1012.2005
- Yoshida Y, Nakada M, Sugimoto N, Harada T, Hayashi Yasuhiko, Kita D, Uchiyama N, Hayashi Yutaka, Yachie A, Takuwa Y, et al. 2010. Sphingosine-1-phosphate receptor type 1 regulates glioma cell proliferation and correlates with patient survival. *International Journal of Cancer* **126**(10): 2341–2352. doi: 10.1002/ijc.24933

- Young N, Van Brocklyn JR. 2007. Roles of sphingosine-1-phosphate (S1P) receptors in malignant behavior of glioma cells. Differential effects of S1P2 on cell migration and invasiveness. *Experimental Cell Research* **313**(8): 1615–1627. doi: 10.1016/j.yexcr.2007.02.009
- Yu F-X, Zhao B, Panupinthu N, Jewell JL, Lian I, Wang LH, Zhao J, Yuan H, Tumaneng K, Li H, et al. 2012. Regulation of the Hippo-YAP Pathway by G-Protein-Coupled Receptor Signaling. *Cell* **150**(4): 780–791. doi: 10.1016/j.cell.2012.06.037
- Yu X, Wang P, Shi Z, Dong K, Feng P, Wang H, Wang X. 2015. Urotensin-II-mediated reactive oxygen species generation via NADPH oxidase pathway contributes to hepatic oval cell proliferation. *PLoS ONE* **10**(12): e0144433. doi: 10.1371/journal.pone.0144433
- Yuan Y, Shen Z. 2001. Interaction with BRCA2 suggests a role for Filamin-1 (hsFLNa) in DNA damage response. *J Biol Chem* **276**(51): 48318–48324. doi: 10.1074/jbc.M102557200
- Yue J, Wang Q, Lu H, Brenneman M, Fan F, Shen Z. 2009. The cytoskeleton protein Filamin-A is required for an efficient recombinational DNA double strand break repair. *Cancer Res* **69**(20): 7978–7985. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2177
- Zagzag D, Lukyanov Y, Lan L, Ali MA, Esencay M, Mendez O, Yee H, Voura EB, Newcomb EW. 2006. Hypoxia-inducible factor 1 and VEGF upregulate CXCR4 in glioblastoma: implications for angiogenesis and glioma cell invasion. *Lab Invest* **86**(12): 1221–1232. doi: 10.1038/labinvest.3700482
- Zagzag D, Zhong H, Scalzitti JM, Laughner E, Simons JW, Semenza GL. 2000. Expression of hypoxia-inducible factor 1 α in brain tumors: association with angiogenesis, invasion, and progression. *Cancer* **88**(11): 2606–2618.
- Zakaria R, Lamsoul I, Uttenweiler-Joseph S, Erard M, Monsarrat B, Burlet-Schiltz O, Moog-Lutz C, Lutz PG. 2013. Phosphorylation of serine 323 of ASB2 α is pivotal for the targeting of filamin A to degradation. *Cellular Signalling* **25**(12): 2823–2830. doi: 10.1016/j.cellsig.2013.09.011
- Zeisberg M, Neilson EG. 2009. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest* **119**(6): 1429–1437. doi: 10.1172/JCI36183
- Zhang ET, Inman CB, Weller RO. 1990. Interrelationships of the pia mater and the perivascular (Virchow-Robin) spaces in the human cerebrum. *J Anat* **170**: 111–123.
- Zhang Jin-feng, Chen Y, Qiu X, Tang W, Zhang Jian-dong, Huang J, Lin G, Wang X, Lin Z. 2016. The vascular delta-like ligand-4 (DLL4)-Notch4 signaling correlates with angiogenesis in primary glioblastoma: an immunohistochemical study. *Tumor Biol* **37**(3): 3797–3805. doi: 10.1007/s13277-015-4202-8
- Zhang K, Zhu T, Gao D, Zhang Y, Zhao Q, Liu S, Su T, Bernier M, Zhao R. 2014. Filamin A expression correlates with proliferation and invasive properties of human metastatic melanoma tumors: implications for survival in patients. *J Cancer Res Clin Oncol* **140**(11): 1913–1926. doi: 10.1007/s00432-014-1722-3
- Zhang M, Breitwieser GE. 2005. High affinity interaction with filamin A protects against calcium-sensing receptor degradation. *J Biol Chem* **280**(12): 11140–11146. doi: 10.1074/jbc.M412242200
- Zhang Y, Zhong J, Cui Y, Chen D, Ji L, Zheng F, Zheng X, Xia W. 2019. GW28-e1067 Urotensin II induces endothelial-mesenchymal transition of cardiac microvascular endothelial cells via endoplasmic reticulum stress. *J Am Coll Cardiol* **70**(16 Supplement): C42. doi: 10.1016/j.jacc.2017.07.146
- Zhang Y-G, Kuang Z-J, Mao Y-Y, Wei R-H, Bao S-L, Wu L-B, Li Y-G, Tang C-S. 2011. Osteopontin is involved in urotensin II-induced migration of rat aortic adventitial fibroblasts. *Peptides* **32**(12): 2452–2458. doi: 10.1016/j.peptides.2011.10.018
- Zhao C, Wang H, Xiong C, Liu Y. 2018. Hypoxic glioblastoma release exosomal VEGF-A induce the permeability of blood-brain barrier. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **502**(3): 324–331. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.05.140
- Zhao H, Chen G, Liang H. 2019. Dual PI3K/mTOR Inhibitor, XL765, suppresses glioblastoma growth by inducing ER stress-dependent apoptosis. *Onco Targets Ther* **12**: 5415–5424. doi: 10.2147/OTT.S210128

- Zhao H, Feng J, Seidel K, Shi S, Klein O, Sharpe P, Chai Y. 2014. Secretion of shh by a neurovascular bundle niche supports mesenchymal stem cell homeostasis in the Adult Mouse Incisor. *Cell Stem Cell* **14**(2): 160–173. doi: 10.1016/j.stem.2013.12.013
- Zhao L, Wang Y, Xue Y, Lv W, Zhang Y, He S. 2015. Critical roles of chemokine receptor CCR5 in regulating glioblastoma proliferation and invasion. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* **47**(11): 890–898. doi: 10.1093/abbs/gmv095
- Zhao S, Lin Y, Xu W, Jiang W, Zha Z, Wang P, Yu W, Li Z, Gong L, Peng Y, et al. 2009. Glioma-Derived Mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and Induce HIF-1 α . *Science* **324**(5924): 261–265. doi: 10.1126/science.1170944
- Zheng M, Zhang Xiaohan, Sun N, Min C, Zhang Xiaowei, Kim K-M. 2016. RalA employs GRK2 and β -arrestins for the filamin A-mediated regulation of trafficking and signaling of dopamine D2 and D3 receptor. *Biochim Biophys Acta* **1863**(8): 2072–2083. doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.05.010
- Zheng X, Zhou A-X, Rouhi P, Uramoto H, Borén J, Cao Y, Pereira T, Akyürek LM, Poellinger L. 2014. Hypoxia-induced and calpain-dependent cleavage of filamin A regulates the hypoxic response. *PNAS* **111**(7): 2560–2565. doi: 10.1073/pnas.1320815111
- Zhong Z, Yeow W-S, Zou C, Wassell R, Wang C, Pestell RG, Quong JN, Quong AA. 2010. Cyclin D1/Cyclin-Dependent Kinase 4 interacts with Filamin A and affects the migration and invasion potential of breast cancer cells. *Cancer Research* **70**(5): 2105–2114. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1108
- Zhou A-X, Hartwig JH, Akyürek LM. 2010. Filamins in cell signaling, transcription and organ development. *Trends in Cell Biology* **20**(2): 113–123. doi: 10.1016/j.tcb.2009.12.001
- Zhou A-X, Toylu A, Nallapalli RK, Nilsson G, Atabey N, Heldin C-H, Borén J, Bergo MO, Akyürek LM. 2011. Filamin a mediates HGF/c-MET signaling in tumor cell migration. *International Journal of Cancer* **128**(4): 839–846. doi: 10.1002/ijc.25417
- Zhu TS, Costello MA, Talsma CE, Flack CG, Crowley JG, Hamm LL, He X, Hervey-Jumper SL, Heth JA, Muraszko KM, et al. 2011. Endothelial cells create a stem cell niche in glioblastoma by providing NOTCH ligands that nurture self-renewal of cancer stem-like cells. *Cancer Res* **71**(18): 6061–6072. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-4269
- Zhu Y, Yang P, Wang Q, Hu J, Xue J, Li G, Zhang G, Li X, Li W, Zhou C, et al. 2013. The Effect of CXCR4 Silencing on Epithelial-Mesenchymal Transition Related Genes in Glioma U87 Cells. *The Anatomical Record* **296**(12): 1850–1856. doi: 10.1002/ar.22821
- Zimmermann DR, Dours-Zimmermann MT. 2008. Extracellular matrix of the central nervous system: from neglect to challenge. *Histochem Cell Biol* **130**(4): 635–653. doi: 10.1007/s00418-008-0485-9

Publication annexe

Clavier T, Mutel A, Desrues L, Lefevre-Scelles A, Gastaldi G, El Amki M, Dubois M, Melot A, Wurtz V, Curey S, Gérardin E, Proust F, Compère V, Castel H. Association between vasoactive peptide urotensin II and cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a potential therapeutic target. *J Neurosurg* 2018 Oct

Association between vasoactive peptide urotensin II in plasma and cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a potential therapeutic target

*Thomas Clavier, MD,¹⁻³ Alexandre Mutel,^{1,2} Laurence Desrues, PhD,^{1,2} Antoine Lefevre-Scelles, MD,¹⁻³ Gioia Gastaldi, MD,³ Mohamad El Amki, PhD,^{1,2} Martine Dubois, PhD,^{1,2} Anthony Melot, MD,^{1,2,4} Véronique Wurtz, MD,¹⁻³ Sophie Curey, MD,⁴ Emmanuel Gérardin, MD, PhD,^{1,2,5} François Proust, MD, PhD,^{1,2,4} Vincent Compère, MD, PhD,¹⁻³ and Hélène Castel, PhD^{1,2}

¹Normandie Université, UNIROUEN, INSERM, DC2N; ²Institute for Research and Innovation in Biomedicine; and Departments of ³Anesthesiology and Critical Care, ⁴Neurosurgery, and ⁵Radiology, Rouen University Hospital, Rouen, France

OBJECTIVE Cerebral vasospasm (VS) is a severe complication of aneurysmal subarachnoid hemorrhage (SAH). Urotensin II (Ull) is a potent vasoactive peptide activating the urotensin (UT) receptor, potentially involved in brain vascular pathologies. The authors hypothesized that Ull/UT system antagonism with the UT receptor antagonist/biased ligand urantide may be associated with post-SAH VS. The objectives of this study were 2-fold: 1) to leverage an experimental mouse model of SAH with VS in order to study the effect of urotensinergic system antagonism on neurological outcome, and 2) to investigate the association between plasma Ull level and symptomatic VS after SAH in human patients.

METHODS A mouse model of SAH was used to study the impacts of Ull and the UT receptor antagonist/biased ligand urantide on VS and neurological outcome. Then a clinical study was conducted in the setting of a neurosurgical intensive care unit. Plasma Ull levels were measured in SAH patients daily for 9 days, starting on the 1st day of hospitalization, and were compared with plasma Ull levels in healthy volunteers.

RESULTS In the mouse model, urantide prevented VS as well as SAH-related fine motor coordination impairment. Seventeen patients with SAH and external ventricular drainage were included in the clinical study. The median plasma Ull level was 43 pg/ml (IQR 14–80 pg/ml). There was no significant variation in the daily median plasma Ull level (median value for the 17 patients) from day 0 to day 8. The median level of plasma Ull during the 9 first days post-SAH was higher in patients with symptomatic VS than in patients without VS (77 pg/ml [IQR 33.5–111.5 pg/ml] vs 37 pg/ml [IQR 21–46 pg/ml], $p < 0.05$). Concerning daily measures of plasma Ull levels in VS, non-VS patients, and healthy volunteers, we found a significant difference between SAH patients with VS (median 66 pg/ml [IQR 30–110 pg/ml]) and SAH patients without VS (27 pg/ml [IQR 15–46 pg/ml], $p < 0.001$) but no significant difference between VS patients and healthy volunteers (44 pg/ml [IQR 27–51 pg/ml]) or between non-VS patients and healthy volunteers.

CONCLUSIONS The results of this study suggest that UT receptor antagonism with urantide prevents VS and improves neurological outcome after SAH in mice and that an increase in plasma Ull is associated with cerebral VS subsequent to SAH in humans. The causality link between circulating Ull and VS after SAH remains to be established, but according to our data the UT receptor is a potential therapeutic target in SAH.

<https://thejns.org/doi/abs/10.3171/2018.4.JNS172313>

KEYWORDS urotensin II; subarachnoid hemorrhage; cerebral vasospasm; human; intensive care unit; mouse; vascular disorders

ABBREVIATIONS ACA = anterior cerebral artery; AUC = area under the curve; CSF = cerebrospinal fluid; DCI = delayed cerebral ischemia; EVD = external ventricular drainage; ICU = intensive care unit; IQR = interquartile range; IRB = institutional review board; MCA = middle cerebral artery; mRS = modified Rankin Scale; ROC = receiver operating characteristic; SAH = subarachnoid hemorrhage; SAPS II = Simplified Acute Physiology Score II; SE = standard error; Ull = urotensin II; UT = urotensin (receptor); VS = vasospasm; WFNS = World Federation of Neurosurgical Societies.

SUBMITTED September 15, 2017. **ACCEPTED** April 23, 2018.

INCLUDE WHEN CITING Published online October 19, 2018; DOI: 10.3171/2018.4.JNS172313.

* V.C. and H.C. share senior authorship of this work.

STROKE is the second leading cause of death worldwide, and death due to subarachnoid hemorrhage (SAH) represents about 30% of the total stroke-related mortality.^{14,17} Cerebral vasospasm (VS) is a frequent complication of aneurysmal SAH and is often associated with delayed cerebral ischemia.^{11,34} SAH patients commonly experience sequelae, including motor and/or cognitive deficits, that affect their day-to-day functioning and quality of life.²⁴ VS been reported to occur in 50%–70% of cases between 4 and 21 days after aneurysmal rupture and can persist for up to 4 weeks, but its pathophysiology is complex and not fully understood.^{26,28} Currently, treatments are mainly symptomatic and rely on calcium channel antagonists, euvolemia, targeted hypertension, and in some cases, endovascular therapy (transluminal angioplasty, intraarterial vasodilators).^{10,18} Biomarkers have been proposed for prediction or early diagnosis of SAH-associated VS; of these biomarkers, copeptin and cellular microparticles in plasma and neuropeptide Y in cerebrospinal fluid (CSF) have been the most studied in humans.^{15,19,20,29,30} Among vasoconstrictive peptides, the level of endothelin-1 (ET-1) in plasma can be considered as an early marker of VS, but a specific ET-1 receptor antagonist did not improve mortality or functional clinical outcome.^{4,23}

Urotensin II (UII), a potent vasoactive peptide, represents a new potential marker of brain vascular pathology. Human UII (hUII) and UII-related peptide (URP) possess a common highly conserved cyclic biologically active sequence and are endogenous ligands of the G protein-coupled receptor, referred to as the UT (urotensin) receptor (or simply as UT).^{3,31} The level of UII in plasma often varies during vascular pathologies, such as endothelium dysfunction, arterial blood pressure elevation, and/or vasoconstriction.^{1,13} In addition, UII induces proinflammatory activity in human endothelial cells,^{8,24} astrocyte proliferation,^{6,17} cerebral vasoconstrictor effects,²⁷ and brain damage during ischemic insult.⁷ Thus, through its vasoconstrictive action and its neuroinflammatory effects, UII could play a role during cerebral VS. We postulated that UII, in the blood and/or secreted in the subarachnoid space during the SAH, would activate UT expressed in the cerebral arterial network, participating in the symptomatic VS and potentially affecting clinical outcome, and that UII levels in plasma would be associated with the occurrence of VS.

The primary objective of this study was to determine if UII/UT system antagonism with urantide improves VS and neurological outcome in a mouse model of SAH. Secondary objectives were: 1) in the mouse, to establish UII/UT expression in cerebral main arteries after SAH, the effect of SAH, and to study the kinetics of UII variation in plasma after SAH; and 2) in humans, to assess the association between the UII level in plasma and in CSF and symptomatic VS; to assess the association between the UII level in plasma and CSF, blood pressure, SAPS II, age, and duration of intensive care unit (ICU) hospitalization; to compare UII levels in plasma between patients with SAH and healthy volunteers; and to study the temporal variation of UII levels in plasma and CSF in SAH patients during the first days of ICU hospitalization.

Methods

In an experimental mouse model of SAH, we first validated the urotensinergic system as a potential therapeutic target. Then, because of the absence of previously published data on the potential association between UII and VS in SAH, the present adapted assay (choice of antibody to detect UII-like peptides), and the variable levels of UII in plasma depending on the study or the patient, we performed a pilot study in human patients to determine the optimum method to measure UII in plasma as a possible biomarker to predict the occurrence of symptomatic VS after aneurysmal SAH in humans. In both the mouse model and human patients, we investigated the effects of UII/UT system antagonism with urantide on VS and neurological outcome after SAH.

Animal Study

Animal Care

Male C57Bl/6 J Rj mice (Janvier) aged 8–12 weeks were housed under controlled standard environmental conditions: 22°C ± 1°C, 12 hours/12 hours light/dark cycle, and water and food available ad libitum. All procedures were performed under the supervision of H. Castel in accordance with the French Ethical Committee and guidelines of European Parliament Directive 2010/63/EU and the Council for the Protection of Animals Used for Scientific Purposes. This project was approved by the local ethics committee.

SAH Mouse Model Procedure

This model of SAH was performed through intracisternal injection of arterial blood into the magna cisterna of the mice in the SAH animal groups as previously described.^{12,22} Briefly, mice were anesthetized with isoflurane (5% induction and 2% maintenance) and the transparent atlanto-occipital membrane was exposed and a pulled hematological glass micropipette (GC150F-15; Harvard Apparatus) was introduced into the cisterna magna. A C57Bl/6 J Rj mouse (age 12 weeks) was used as a donor for arterial blood, which was obtained via intracrotid puncture. Freshly drawn blood (60 µl) was injected into the cisterna magna over a period of 1 minute. Sham-operated mice underwent the same procedure but received 60 µl of normal saline (NaCl 0.9%). After surgery, mice were placed into their home cage and fed with mashed lab chow. Postoperative analgesia was ensured, according to the protocols of the National Cancer Institute (Frederick, Maryland), by ropivacaine hydrochloride (2 mg/ml) at the site of blood injection and under the skin and paracetamol administered orally in drinking water (1.6 mg/ml) for 48 hours.

To evaluate the impact of the direct effect of human UII and the antagonist/biased ligand of UT receptor urantide, we administered UII (PolyPeptide Laboratories) or urantide (Phoenix Pharmaceuticals) at day 0 (D0) into the cisterna magna (2 µg/kg in 50 µl of UII or 2 µg/kg in 50 µl of urantide) in animals that had undergone blood injection as well as animals that had undergone the Sham procedure (NaCl 0.9% injection). Control animals received 50 µl of NaCl 0.9%. On D2 (48 hours post-SAH), an intravenous

tail injection of 50 μ l of UII, urantide, or NaCl was carried out under brief inhaled anesthesia (isoflurane).

The number of animals used in the different series of experiments is provided in Supplementary Table S1.

Radioimmunoassay of UII in Mouse Plasma

At D1 and D10 postsurgery, blood samples were transcardially taken at the time of euthanization of Sham and SAH mice. The samples were centrifuged at 3000g for 15 minutes and plasma was frozen at -20°C before analysis. The concentration of UII in mouse plasma was also determined by radioimmunoassay using a commercial kit purchased from Phoenix Pharmaceuticals, Inc. (RK-071-08). The assay was performed according to the commercial instructions.

Cerebral Vasospasm and Immunohistochemistry

Immunohistochemistry procedures to study cerebral VS and animal behaviors are described in the Supplementary Information. Briefly, the animals were deeply anesthetized and decapitated, and the brains were removed and postfixed with paraformaldehyde 4% (PFA).

Frozen brains were serially sectioned using a cryomicrotome (CM 3050S, Leica, PRIMACEN platform) into 20- μ m transverse slices. Slice collection began at the anterior part of the prefrontal cortex (bregma + 3.2) and extended rostrocaudally to the posterior cerebellum, using previously coated glass slides (gelatin 0.5% and alum chrome 5% in distilled water) according to a stereotaxic brain atlas. For VS identification (H & E staining) or microscopic fluorescence imaging procedures, see Supplementary Information.

Behavioral Experimental Procedures

Activity of mice was evaluated as previously described.¹² The distance crossed and the number of times the animals reared up on their hind legs were recorded during a test of 5 minutes' duration. Behaviors were recorded with the videotracking software ANY-maze (Stoelting). Muscular strength, dynamic equilibrium (beam walking test), or locomotion was investigated in selected groups of mice (see Supplementary Information).

Human Study

Patient Population

This prospective observational study was conducted at the Rouen University Hospital in accordance with the Declaration of Helsinki and its later amendments. It was approved by the hospital's institutional review board (IRB). Written consent was systematically obtained. This paper adheres to the applicable EQUATOR (Enhancing the QUALity and Transparency Of health Research) guidelines.

Patients admitted to the neurosurgical intensive care unit (ICU) with SAH from aneurysmal origin and external ventricular drainage (EVD) were included. Exclusion criteria were age under 18 years, patient under guardianship, pregnancy, or patient refusal. Data collection included demographic characteristics, aneurysm localization, sur-

vival, Fisher and World Federation of Neurosurgical Societies (WFNS) grades, Simplified Acute Physiology Score II (SAPS II), daily mean systolic arterial blood pressure, duration of hospitalization, and neurological outcome on the 10th day (D10) and 6th month (M6) after SAH. Neurological outcome was assessed with the modified Rankin Scale (mRS) and dichotomized as favorable (mRS score 0–3) or unfavorable (mRS score 4–6). The occurrence of a delayed cerebral ischemia (DCI) diagnosed on the basis of neurological symptoms (aphasia, hemiparesis or hemiplegia, disorders of consciousness) associated with a proven VS on neuroradiology explorations (angiography and/or tomodensitometry [TDM] angiography) was also recorded. The assessment of VS was performed by a senior neuroradiologist (E.G.) with long experience, according to the following criteria: decrease in caliber of cerebral arteries (from D2 to D15) in comparison with previous reference neuroradiology exploration of cerebral arteries (D0 or D1), rosary bead–like appearance, and left/right asymmetry of artery caliber. Radiological assessments were performed blinded to the neurological condition of the patient. The diagnosis was retained after exclusion of other confounding causes (hematoma, rebleeding, meningitis, or abscess). Patients with DCI without VS were not included in the VS group, and the diagnosis of VS was only based on the arterial caliber neuroradiological conclusions. In this pilot study, the occurrence of VS was monitored from D0 to D15.

In order to compare the UII-like peptide levels in plasma in SAH patients to levels in individuals without SAH, volunteers with no evidence of severe acute or chronic concomitant disease and not following any regular medication regimen were included, with the support of our local clinical investigation center. Single venous blood samples were collected between 8:00 and 9:00 AM under the IRB-approved study protocol. Written consent was systematically obtained.

Sample Collection and UII-Like Radioimmunoassay

Collection of samples from the SAH patients during hospitalization was scheduled for 8:00–9:00 AM, consistent with a circadian rhythm potentially influencing the release of UII. Each patient who had an external ventricular drain in place had daily plasma and CSF sampling during a total period of 9 days following ICU admission (from D0 to D8). The duration of daily blood or CSF samplings (9 days) was chosen because of the time points usually described concerning the occurrence of VS after the SAH event.^{10,11} Blood was centrifuged at 2000g (10 minutes) at 4°C and samples were stored at -80°C until radioimmunoassay. CSF was taken from EVD and immediately stored at -80°C until radioimmunoassay. Blood and CSF samplings were stopped after ICU discharge and/or EVD ablation.

Calibration curves for the assessment of UII in plasma of patients and volunteers and procedures of UII-like radioimmunoassay in plasma and CSF are detailed in the Supplementary Information.

Statistical Analysis

In the text, values are presented as mean and stand-

ard error (SE) or median with interquartile range (IQR; 25th to 75th percentile). For figures, values and intervals used are specified in the legends. The significance level was 0.05 for all tests performed. Statistics were calculated using GraphPad Prism software.

Statistical Analysis of Animal Data

Data were analyzed with parametric tests unless a normal distribution and variance homogeneity were not present. In such instances, nonparametric analyses were performed (for example, see Fig. 2) by using Kruskal-Wallis ANOVA followed by Dunn's multiple comparison test.

Statistical Analysis of Human Data

The number of patients and the standard deviation of our data gave a power of 80% to detect a doubling of UII levels in plasma of patients with a VS (2-sided test; alpha risk = 0.05).

We first analyzed variations of UII levels in plasma and CSF in SAH patients with Friedman's test (for testing the difference between several related samples: multiple comparisons of UII in plasma and CSF from D0 to D8 in patients with or without VS). Then, the group of patients with symptomatic VS was compared to the group of SAH patients without VS by means of Mann-Whitney (UII plasma/CSF levels) and Fisher's exact (neurological outcome) tests. Afterward, associations between UII level in plasma/CSF and blood pressure, SAPS II, age, and duration of ICU hospitalization were tested using Spearman's rank correlation coefficient (r_s). Comparisons of daily UII levels in SAH patients with VS, SAH patients without VS, and healthy volunteers were made using the Kruskal-Wallis test with a Dunn's posttest as these 3 groups were not related to each other. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis, including area under the ROC curve (AUC), was used to determine a threshold level of UII that would enable differentiation of groups with and without VS.

Results

Animal Study

In our model, the mortality rates for the SAH groups were 35.9% and 30.7% for SAH-NaCl and SAH-urantide mice, respectively, whereas in the Sham groups, the mortality rates were only 8.8% and 7.9% for Sham-NaCl and Sham-urantide mice, respectively, occurring during surgery or the first 24 hours following SAH. This model displayed evidence of VS in the MCA at both D2 and D7 (Fig. 1A). In the Sham and SAH mice, brain arteries expressed UT receptor (Fig. 1B), whereas UII was observed in the MCA only in the SAH mice (Fig. 1B), indicating expression of both UII and UT receptor in vasospasmed brain arteries during SAH. To assess whether the uroterogenic system is involved in a macroscopic VS within a cerebral brain artery after blood diffusion in the subarachnoid space, we calculated the luminal area/wall area ratio from H & E-stained brain slices obtained at D7 post-SAH from animals in the Sham, Sham-UII, SAH, SAH-UII, and SAH-urantide groups (Fig. 1C). SAH induced by a single injection of blood in the cisterna magna induced VS

of the large anterior cerebral artery (ACA) and middle cerebral artery (MCA), highlighted by a significant decrease of the lumen/wall area ratio compared with the ratio in Sham-operated mice (ACA: mean \pm SE] 0.17 ± 0.023 in the SAH group vs 0.32 ± 0.026 in the Sham-NaCl group, $p = 0.0004$; MCA: 0.23 ± 0.013 in the SAH group vs 0.32 ± 0.025 in the Sham-NaCl group, $p = 0.02$). Interestingly, there was no statistically significant difference between Sham-operated mice and urantide-treated SAH mice with respect to the ACA or MCA, and significance was reached when comparing MCA in SAH mice and mice in the SAH-urantide group (0.23 ± 0.013 vs 0.33 ± 0.03 , respectively; $p = 0.02$), suggesting that urantide probably prevents the VS associated with SAH at D7. Note that although a slight tendency was observed when UII was added, no additional effect of UII on VS of these arteries was detected (Fig. 1C). Detectable levels of UII were found in plasma by radioimmunoassay at D1 and D10 post-SAH and did not show any significant difference between Sham and SAH animals (Fig. 1D).

To investigate the long-term impact of SAH on sensorimotor function, behavioral tests were carried out on Sham and SAH mice. To specifically explore a potential role of the UT receptor, the aggravating role of UII or the preventive role of the UT antagonist/biased ligand urantide was also challenged (Fig. 2). The weight gain of SAH-NaCl mice was significantly reduced from D2 to D10 compared with that of control mice and at D2 and D8 compared with that of Sham-NaCl mice (Kruskal-Wallis and Dunn's multiple comparison test; Fig. 2A). The spontaneous activity of the mice was not significantly affected by SAH as evaluated by distance crossed (Fig. 2B) and number of times the animals reared (data not shown). Urantide administration did not significantly affect this activity (Fig. 2B). No significant difference in muscle strength, static equilibrium, or motor coordination was observed between Sham and SAH, in the absence or the presence of urantide (Fig. 2C–E). However, in the beam walking test, the slip frequency of SAH-NaCl animals was significantly increased compared with that of Sham-NaCl mice ($p = 0.004$) at D7, indicating a selective sensorimotor deficit induced by the hemorrhage. The SAH mice that received urantide showed significantly better performance than SAH-NaCl mice (Kruskal-Wallis, Dunn's posttest, $p = 0.04$; Fig. 2F). Mice receiving UII in the injected blood did not show a significant difference in the number of slips per minute compared with SAH-NaCl mice (Fig. 2F).

Human Study

In 17 patients, 2 SAHs were linked to an aneurysm localized in the posterior cerebral circulation and 15 SAHs were secondary to a rupture of an aneurysm from the anterior cerebral circulation. The clinical and demographic characteristics of the patients are summarized in Table 1. The median levels of UII at D0 (the 1st day of hospitalization) were 43 pg/ml (IQR 14–80 pg/ml) in plasma and 22 fg/ml (IQR 5–68 fg/ml) in CSF. The values of UII levels in plasma and CSF for each day are summarized in Fig. 3A and B. There was no statistically significant variation of UII levels in plasma or CSF from D0 to D8. Moreover, we did not find any significant correlation between daily

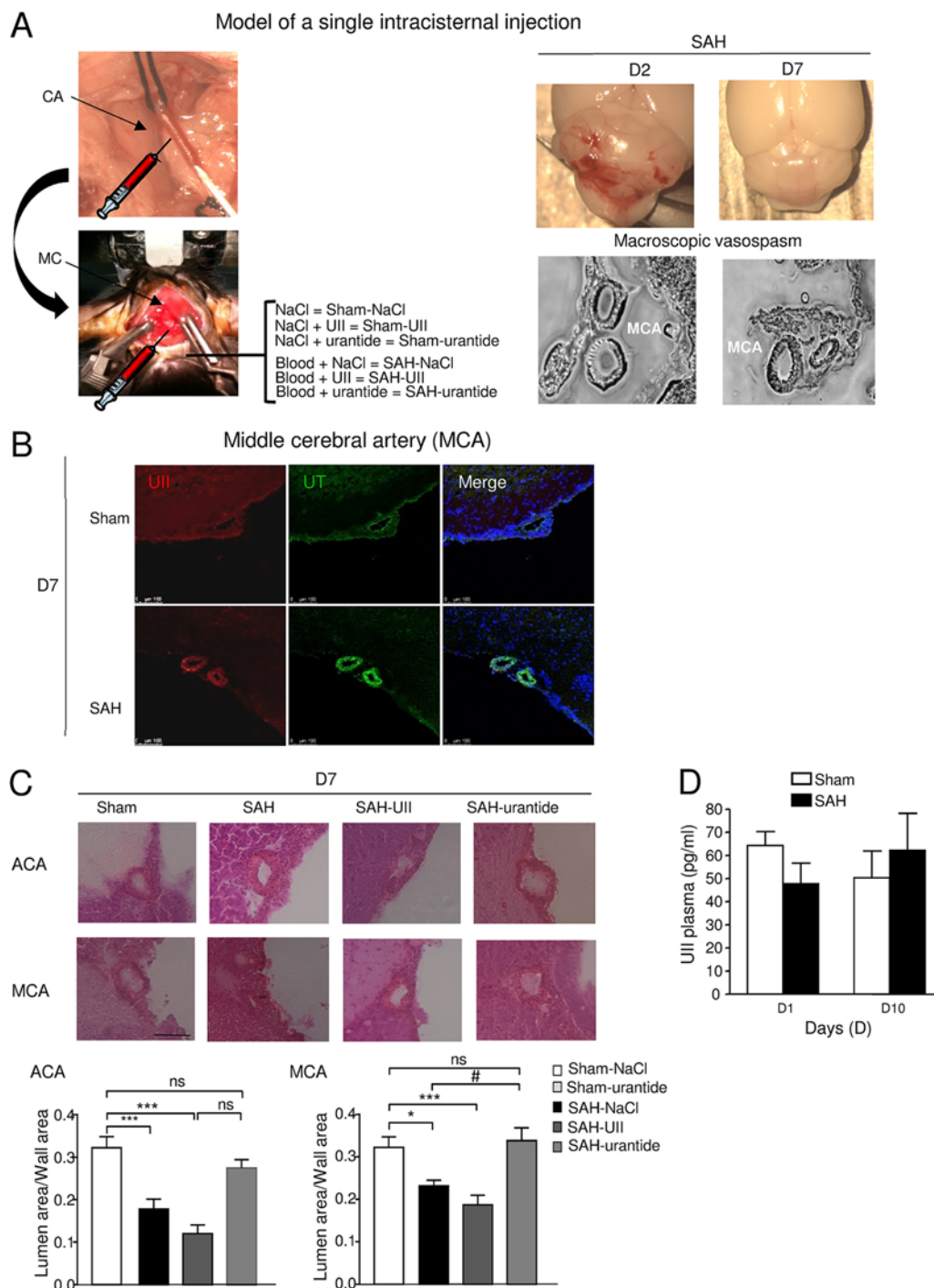


FIG. 1. The urotensinergic system in plasma and main cerebral arteries in the mouse model of SAH. **A:** Creation of SAH model by intracisternal injection of arterial blood. As shown in the images on the *left*, arterial blood is drawn by the carotid route from a C57Bl/6 J mouse and immediately injected with a glass micropipette into the cisterna magna (MC) of another mouse to create the SAH model. The photographs on the *upper right* of this panel show direct visualization of the distribution of blood (D2 and D7) within the cerebellum after administration in the cisterna magna. The photomicrographs show the optical microscopic visualization of vascular parietal morphology suggestive of VS of the MCA at D2 and D7 ($n = 3/\text{group}$). CA = carotid artery. **B:** Immunolabeling of Ull (*red*) and UT (*green*) in MCA from Sham and SAH mouse brains 7 days after SAH. UT was found to be expressed in the MCA wall in the Sham and SAH mice, while Ull was likely neo-expressed in the vascular wall of the MCA in the SAH mice. DAPI in *blue*. Scale bar = 100 μm . **C:** Vasospasm of large cerebral arteries after SAH, in the absence or the presence of Ull or urantide in the cisterna magna. Representative photomicrographs showing the morphology (lumen and wall thickness) of the ACA (bregma + 1.10 mm) and the MCA (bregma - 1.22 mm) in Sham and SAH-NaCl, SAH-Ull, and SAH-urantide brain sections at D7. H & E; scale bar = 50 μm . Quantification histograms of lumen area/wall area ratio showing significant VS in the ACA and MCA in SAH-NaCl mice compared with Sham-NaCl mice and significant VS prevention in SAH-urantide compared with SAH-NaCl mice. One-way ANOVA, Tukey's multiple comparison test (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, # $p < 0.05$, ns = not significant). **D:** Schematic values of Ull level in plasma following the occurrence of SAH in mice. Results are presented as mean with SEM ($n = 3$ to 5/group). No significant variation of Ull level in plasma at D1 and D10 between Sham and SAH (Kruskal-Wallis). Figure is available in color online only.

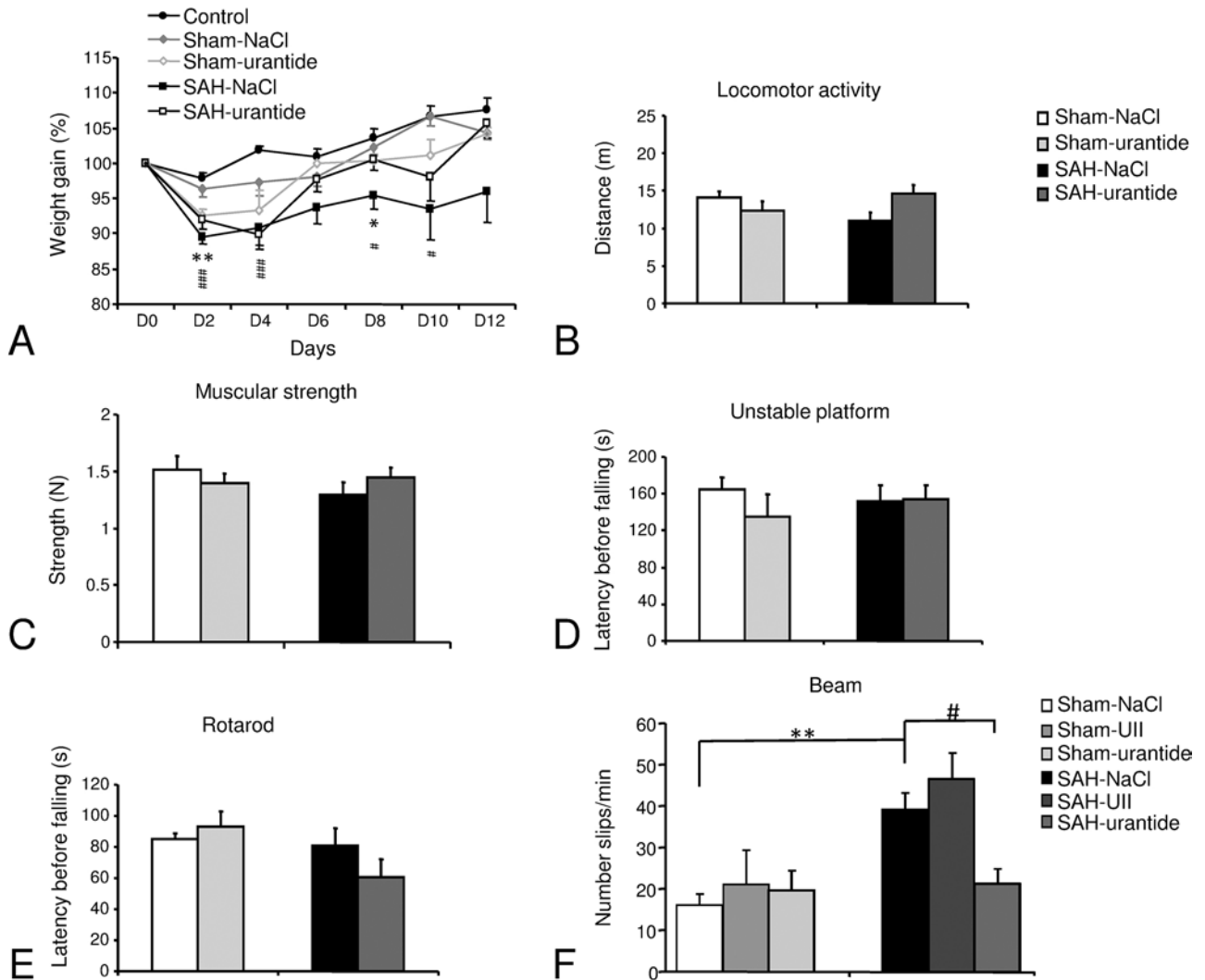


FIG. 2. Behavioral characterization of the SAH mouse model and the effect of the antagonist/biased ligand urantide. **A:** Weight gain of SAH mice in the presence or the absence of urantide from D0 to D12. SAH-NaCl mice displayed significantly reduced weight gain on days 2, 4, 6, 8, and 10 compared to control mice and on days 2 and 8 compared with Sham-NaCl mice. Weight gain of Sham-NaCl mice was reduced compared to that of control mice only on D4, and weight gain of Sham-urantide mice was reduced on D2 compared to Sham-NaCl mice (Kruskal-Wallis, Dunn's multiple comparison test; #*p* < 0.05, ###*p* < 0.001, SAH-NaCl vs control; **p* < 0.05, ***p* < 0.01, SAH-NaCl vs Sham-NaCl; *n* = 5 [at D12] to 31 [at D0]). **B and C:** Spontaneous activity and muscular strength in SAH mice and impact of urantide. Locomotion (B) and muscular strength (C) were not modified in SAH-NaCl compared with Sham-NaCl mice (*p* > 0.05). Urantide was associated with an increase of locomotor activity in SAH compared with SAH-NaCl mice (Student *t*-test, **p* < 0.05, *n* = 6/group). **D and E:** Equilibrium, motor coordination, and impact of urantide treatment. SAH mice treated with NaCl or urantide did not show alteration of static equilibrium performances evaluated in the unstable platform test (D) and did not show deficits in motor coordination in the rotarod test (E) compared with Sham-NaCl or Sham-urantide mice (Student *t*-test, 6/group). **F:** SAH-NaCl mice displayed selective impairment of dynamic equilibrium and fine motor coordination performance in the beam test compared with Sham-NaCl mice (Kruskal-Wallis, Dunn's multiple comparison test, ***p* < 0.01, 9–12/group). Urantide-treated SAH mice demonstrated improved performance in the beam test compared with SAH-NaCl mice (#*p* < 0.05, *n* = 9–13). There was no significant effect of Ull in the Sham-NaCl and SAH-NaCl groups.

Ull levels in plasma and those in CSF ($r_s = -0.08$ [95% CI -0.27 to 0.11], *p* = 0.4).

Twenty-three healthy volunteers were also included in this study. There was no statistically significant difference between the volunteers and the patients with respect to age (median 38 years [IQR 29–58 years] vs 48 years [IQR 42–56 years]) or sex ratio (M/F ratio 0.9 vs 1.1). Among the 17 patients included, 6 had VS during the first 10 days of hospitalization. Comparison of daily measures of Ull levels in the plasma of VS patients, non-VS patients, and volun-

teers showed a statistically significant difference between VS and non-VS patients (median 66 pg/ml [IQR 30–110 pg/ml] vs 27 pg/ml [IQR 15–46 pg/ml], *p* < 0.001). But no significant difference was observed between the VS group and the volunteers (median 66 pg/ml [IQR 30–110 pg/ml] vs 44 pg/ml [IQR 27–51 pg/ml]) or between the non-VS patient group and the volunteers (median 27 pg/ml [IQR 15–46 pg/ml] vs 44 pg/ml [IQR 27–51 pg/ml]; Fig. 3C).

The plasma level of Ull in plasma during the 9 first days after SAH was significantly higher in patients with

TABLE 1. Summary of clinical and demographic characteristics of the 17 SAH patients included in the study

Characteristic	Value
Age in yrs	48 (41.5–56)
Sex, n	
Male	8
Female	9
SAPS II	34 (20–48)
Fisher grade	4 (3–4)
WFNS grade	3 (2–4)
Duration of mechanical ventilation in days	10 (2–23)
Length of hospital stay in days	27 (19–60)

Values are median (IQR) unless otherwise indicated.

symptomatic VS than in patients without VS (77 pg/ml [IQR 33.5–111.5 pg/ml] vs 37 pg/ml [IQR 21–46 pg/ml], $p = 0.04$; Fig. 4A). No significant difference was found concerning the mean level of UII in CSF between patients with and without symptomatic VS (Fig. 4B). With respect to level of UII in plasma, the AUC allowing discrimination of patients with symptomatic VS from patients without

symptomatic VS was 0.81 (95% CI 0.57–1, $p = 0.04$). With a cutoff value of 61.5 pg/ml of UII in plasma, the sensitivity was 66.7% (95% CI 22.3%–95.7%) and the specificity was 100% (95% CI 71.5%–100%) (Fig. 4C). When comparing the VS and no-VS groups, there was a significant difference in the neurological outcome at D10, with a more favorable outcome in the no-VS group (100% vs 0%, $p = 0.02$; Fig. 4D), whereas no difference was measured at M6 (82% vs 50%, $p = 0.12$; Fig. 4D). Individual mRS scores of each patient are provided in Supplementary Table S2. The sole deceased patient of the cohort had symptomatic VS. In addition, a negative correlation was found between the SAPS II and UII level in plasma on D0 ($r_s = -0.57$ [95% CI -0.84 to -0.09], $p = 0.02$; Fig. 4E), without correlation between CSF UII level at D0 and SAPS II ($r_s = -0.34$ [95% CI -0.72 to 0.21], $p = 0.2$; Fig. 4F). There was no correlation between daily UII levels in plasma and daily mean systolic blood pressure, age, duration of hospitalization, or duration of mechanical ventilation.

Discussion

Aneurysmal SAH is a common disease responsible for significant mortality and morbidity related to extremely debilitating neurological sequelae in survivors.² After the

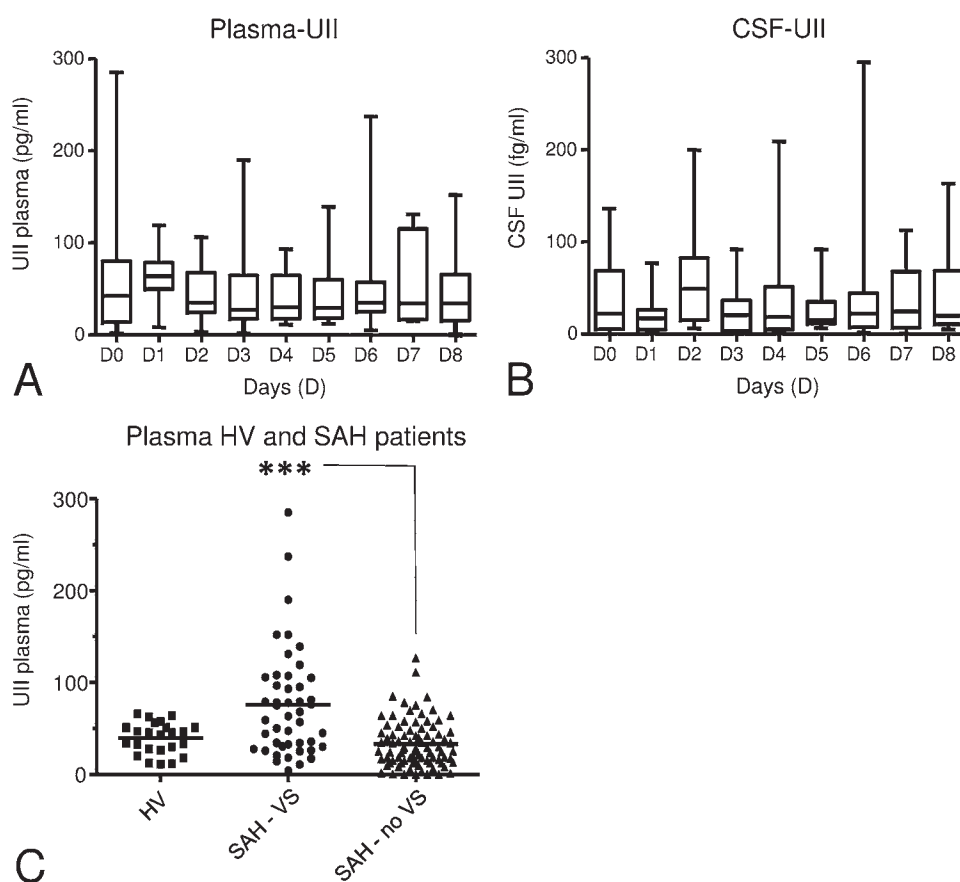


FIG. 3. Schematic values of UII in plasma and CSF during the 9 days following the occurrence of SAH. **A and B:** Box and whiskers plot showing the median values (*horizontal lines*) with IQRs (*boxes*) and extreme values (*whiskers*). There was no significant variation of UII levels in plasma or CSF from D0 to D8 (Kruskal-Wallis test). **C:** Daily measures of UII levels in plasma in SAH patients with VS (SAH-VS), SAH patients without VS (SAH-no VS), and healthy volunteers (HV). The mean value for each group is indicated by a *horizontal line*. *** $p < 0.001$ (VS vs no-VS group) (Kruskal-Wallis test).

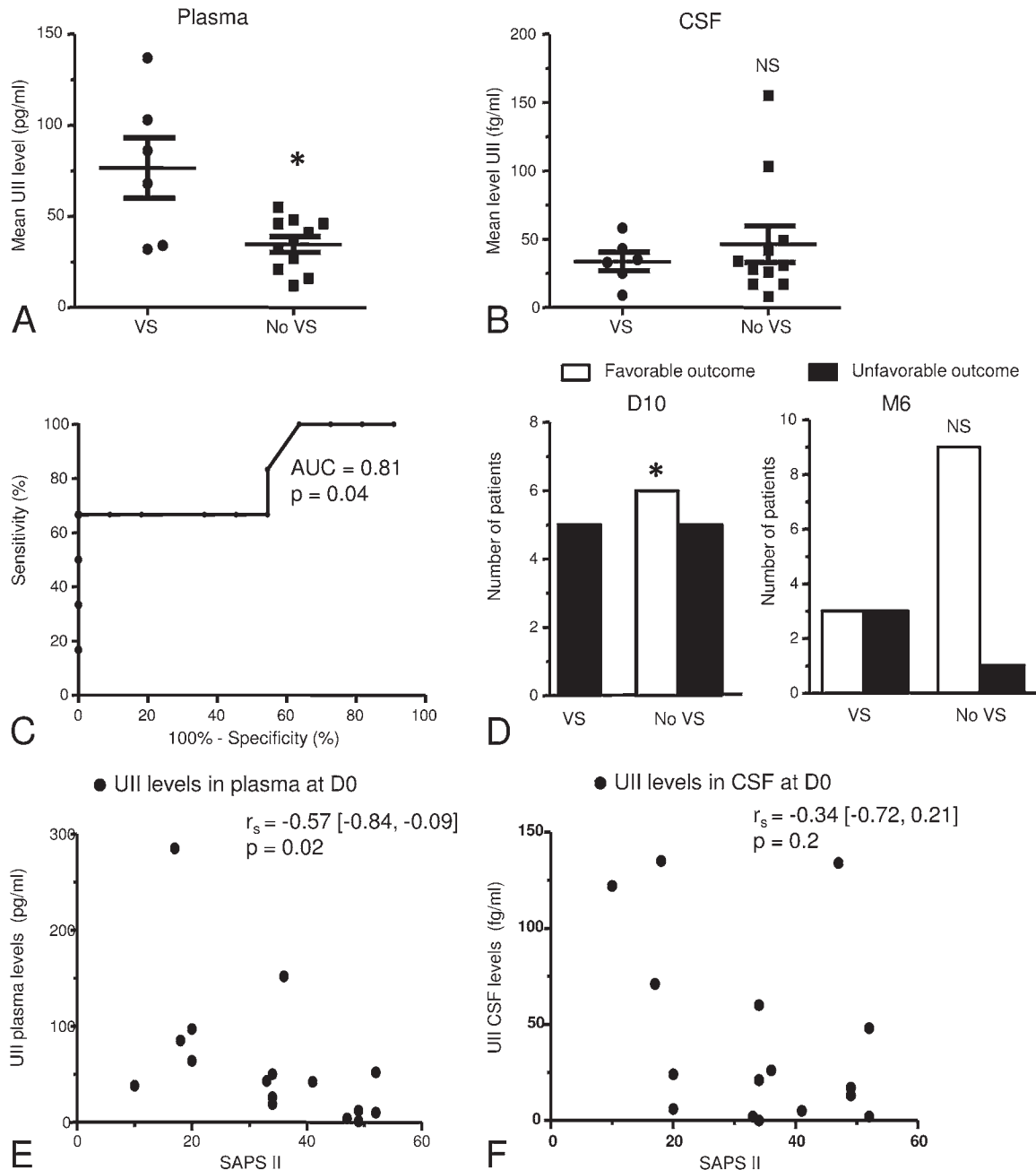


FIG. 4. Mean levels of UII in plasma (A) and CSF (B), ROC (C), and neurological outcome (D) following SAH in patients with and without symptomatic VS. **A and B:** Results are presented as mean with SEM for patients with (black circle) or without (black square) symptomatic VS. * $p < 0.05$ (for comparison with VS group, Mann-Whitney test). NS = not significant. **C:** ROC curve generated with mean levels of UII in plasma in the VS and no-VS patient groups. The ROC curve is the plot of the true-positive rate (sensitivity) versus the false-positive rate (100% – specificity) for different positivity thresholds (i.e., different cutoff levels of plasma UII). The calculated value of the AUC was 0.81 (superior to the random value of 0.5), indicating that the mean UII level in plasma discriminated patients with and without VS ($p < 0.05$). **D:** Neurological outcome in the VS and no-VS groups at 10 days (D10) and 6 months (M6) post-SAH. Results are presented as absolute values. Neurological outcome was assessed with the mRS and dichotomized as favorable (mRS score 0–3) and unfavorable (mRS score 4–6). * $p < 0.05$ (1-tailed Fisher’s exact test, comparison with VS group). **E and F:** Correlation between UII levels in plasma (E) and CSF (F) on the 1st day of hospitalization (D0) and SAPS II. Spearman’s coefficients (r_s) are shown with upper and lower bounds of 95% confidence intervals.

first part of our work, conducted in a preclinical mouse model, suggested a preventive effect of urotensinergic system inhibition on neurological deficits after VS, we explored the potential link between this peptide system and SAH in human patients.

In humans, VS is followed by complications including secondary brain ischemia, which likely leads to cognitive deficits in executive functions such as planning, attention, and decision making.² Thus in our murine model of SAH, which is a relatively nonsevere model, there was an in-

creased slip frequency in the beam walking test, suggesting that fine motor coordination and dynamic equilibrium are altered 7 days post-SAH. In accordance with these findings, beam walking deficits and spatial memory alteration were previously described in different rodent models of SAH.^{16,32} The urotensinergic system has been linked to numerous pathophysiological states, and previous studies have validated UT antagonists such as urantide. It exerts potent antagonism with no intrinsic activity in *ex vivo* models^{21,25} or biased activity in human embryonic kidney (HEK) cells expressing human UT receptor.⁵ We showed here that urantide, administered during the hemorrhage event, allowed a functional improvement of SAH-induced deficits in motor coordination and dynamic equilibrium. In contrast, when UII was co-applied with blood in the subarachnoid space, the SAH-sensorimotor defects were not exacerbated, suggesting that the urotensinergic system is likely to be widely recruited during SAH.

This finding opens the question of the involvement of the urotensinergic system in the VS pathophysiology often associated with neurological disorders. As observed in patients, the mean UII level in plasma is higher in SAH patients with VS than in those without VS. Our hypothesis is that the presence of this peptide in plasma may act directly on cerebral vascular cell walls expressing the UT receptor. We show here that the UT receptor is mainly expressed in brain vessels of SAH mice at D7, according to previous description of UT receptor expression at the endothelial and vascular levels in humans, mice, and rats.^{13,31} Our data show a localized expression of UII in cerebral arteries mainly during SAH, suggesting that UII may be expressed by lesioned circle of Willis arteries, leading to activation of UT receptors expressed by vascular components. Here, the evaluation of VS showed a narrowing of the ACA and MCA 7 days post-SAH. In SAH mice receiving urantide, VS appeared to be markedly reduced, suggesting that neurological impairment, associated with long-lasting vascular defects, is at least in part mediated by UII.

The pathophysiological mechanisms responsible for VS after SAH likely involve intracranial cerebral pressure, nitric oxide, oxidative stress, and/or apoptosis of vascular components, but also neuroinflammation.⁹ We and others previously demonstrated that UT receptor couplings to Gq/Gi/o/G13 proteins allow activation of key signaling cascades, including polyphosphoinositide metabolism, Ca²⁺, cAMP, nuclear factor- κ B, and ERK1/2 in HEK cells expressing human UT,⁵ and the vasoconstriction capacity of UII at de-endothelialized aortic rings.^{3,25} Taken together, these data suggest that the urotensinergic system plays a direct or indirect triggering role in the occurrence of VS.²⁷ In light of the effect shown for urantide in the prevention of post-SAH VS and neurological morbidities, we propose that the UT receptor may constitute a new therapeutic target for the treatment of SAH patients.

Our findings in patients show that the UII level in plasma was significantly higher in those with symptomatic VS than in those without symptomatic VS in the acute phase post-SAH, suggesting that further evaluation of UII as a potential marker for early detection of VS is warranted. The higher level of UII in the plasma of VS patients calls

into question the causal link between UII and the occurrence of VS. A possible explanation is that levels of UII in plasma of patients with VS may be globally higher without any variation over time. It is also possible that a higher basal UII level prior to SAH could be a risk factor for VS. Measurements performed on blood samples obtained in healthy volunteers showed no significant difference in the UII level in plasma between these volunteers and SAH patients with and without VS. In our murine preclinical SAH model, we observed that the plasma UII level did not differ between Sham and SAH mice at D1 or D10 post-SAH. Taken together, these data indicate that an elevated UII level in plasma is probably not a consequence of the hemorrhage event and may rather be a physiological factor arising in patients—and predictive of VS. Thus, patients with high basal UII levels in plasma could be more at risk for symptomatic VS than those with lower UII levels.

In previous studies, patients with symptomatic VS have tended to have poorer neurological outcomes than those without VS.^{34,35} As SAH is a severe cerebrovascular disease, we chose to put the superior cutoff for favorable outcome at 3 on the mRS as previously suggested.³³ Thus, in the early phase of SAH, high levels of UII in plasma are significantly associated with VS and worse neurological status, but the difference in neurological examination findings was not observed 6 months after hospitalization, likely due to the low number of patients in this pilot study.

Although our results are encouraging, this study has several limitations. The sample size is too small to draw any solid inference about the association between UII and cerebral VS and does not allow clear conclusions on the reasons for finding elevated UII levels in plasma of SAH patients with VS. At this stage, UII should be investigated in larger future studies as a diagnostic/predictive tool of VS since the difference of UII mean concentrations seems to indicate an association of UII in plasma with VS. However, our data provide new information on UII and its receptor and the pathophysiology of VS and SAH. Our work is a pilot study, and the findings that we report here are preliminary and need to be validated in larger studies; the lack of statistical power could have led us to miss some associations or correlations with secondary phenomena with respect to DCI, patient outcome, fatigue, or cognitive deficits. Many confounding and indirect previous observations in both animals and human patients currently support our findings, and the results of this study, albeit in a small cohort, highlight the role of UII in the pathophysiology of SAH and VS.

Conclusions

We have documented a preventive effect of UT receptor antagonism with urantide, on VS and long-term sensorimotor deficits in a preclinical model. Our prospective clinical study, although inherently limited by sample size, provides the first available evaluation of UII in plasma of SAH patients. A new clinical trial with a larger patient cohort is needed to clarify the role of plasma UII level as a possible diagnostic or prognostic marker for VS prediction, which would also allow the implementation of a new treatment targeting the urotensinergic system.

Acknowledgments

We thank the PRIMACEN platform (Normandie Rouen University, France) for imaging equipment and Mr. Arnaud Arabo and Mrs. Huguette Lemonnier (INSERM, DC2N, Mont-Saint-Aignan, France) for research animal housing.

References

- Al Kindi H, Hafiane A, You Z, Albanese I, Pilote L, Genest J, et al: Circulating levels of the vasoactive peptide urotensin II in patients with acute coronary syndrome and stable coronary artery disease. **Peptides** **55**:151–157, 2014
- Al-Khindi T, Macdonald RL, Schweizer TA: Cognitive and functional outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. **Stroke** **41**:e519–e536, 2010
- Ames RS, Sarau HM, Chambers JK, Willette RN, Aiyar NV, Romanic AM, et al: Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14. **Nature** **401**:282–286, 1999
- Bellapart J, Jones L, Bandeshe H, Boots R: Plasma endothelin-1 as screening marker for cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. **Neurocrit Care** **20**:77–83, 2014
- Brulé C, Perzo N, Joubert JE, Sainsily X, Leduc R, Castel H, et al: Biased signaling regulates the pleiotropic effects of the urotensin II receptor to modulate its cellular behaviors. **FASEB J** **28**:5148–5162, 2014
- Castel H, Diallo M, Chatenet D, Leprince J, Desrues L, Schouft MT, et al: Biochemical and functional characterization of high-affinity urotensin II receptors in rat cortical astrocytes. **J Neurochem** **99**:582–595, 2006
- Chuquet J, Lecrux C, Chatenet D, Leprince J, Chazalviel L, Roussel S, et al: Effects of urotensin-II on cerebral blood flow and ischemia in anesthetized rats. **Exp Neurol** **210**:577–584, 2008
- Cirillo P, De Rosa S, Pacileo M, Gargiulo A, Angri V, Fiorentino I, et al: Human urotensin II induces tissue factor and cellular adhesion molecules expression in human coronary endothelial cells: an emerging role for urotensin II in cardiovascular disease. **J Thromb Haemost** **6**:726–736, 2008
- Ciurea AV, Palade C, Voinescu D, Nica DA: Subarachnoid hemorrhage and cerebral vasospasm—literature review. **J Med Life** **6**:120–125, 2013
- Connolly ES Jr, Rabinstein AA, Carhuapoma JR, Derdeyn CP, Dion J, Higashida RT, et al: Guidelines for the management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. **Stroke** **43**:1711–1737, 2012
- Dehdashti AR, Mermillod B, Rufenacht DA, Reverdin A, de Tribolet N: Does treatment modality of intracranial ruptured aneurysms influence the incidence of cerebral vasospasm and clinical outcome? **Cerebrovasc Dis** **17**:53–60, 2004
- El Amki M, Dubois M, Lefevre-Scelles A, Magne N, Roussel M, Clavier T, et al: Long-lasting cerebral vasospasm, microthrombosis, apoptosis and paravascular alterations associated with neurological deficits in a mouse model of subarachnoid hemorrhage. **Mol Neurobiol** **55**:2763–2779, 2018
- ElSharkawy RM, Moiety FMS, Hegab HM: Study of urotensin II gene and serum levels in relation to pre-eclampsia. **Clin Exp Obstet Gynecol** **41**:394–398, 2014
- Feigin VL, Forouzanfar MH, Krishnamurthi R, Mensah GA, Connor M, Bennett DA, et al: Global and regional burden of stroke during 1990–2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. **Lancet** **383**:245–254, 2014
- Fung C, De Marchis GM, Katan M, Seiler M, Arnold M, Gralla J, et al: Copeptin as a marker for severity and prognosis of aneurysmal subarachnoid hemorrhage. **PLoS One** **8**:e53191, 2013
- Germanò A, Caffo M, Angileri FF, Arcadi F, Newcomb-Fernandez J, Caruso G, et al: NMDA receptor antagonist felbamate reduces behavioral deficits and blood-brain barrier permeability changes after experimental subarachnoid hemorrhage in the rat. **J Neurotrauma** **24**:732–744, 2007
- Jarry M, Diallo M, Lecointre C, Desrues L, Tokay T, Chatenet D, et al: The vasoactive peptides urotensin II and urotensin II-related peptide regulate astrocyte activity through common and distinct mechanisms: involvement in cell proliferation. **Biochem J** **428**:113–124, 2010
- Johnston SC, Selvin S, Gress DR: The burden, trends, and demographics of mortality from subarachnoid hemorrhage. **Neurology** **50**:1413–1418, 1998
- Keyrouz SG, Diringner MN: Clinical review: prevention and therapy of vasospasm in subarachnoid hemorrhage. **Crit Care** **11**:220, 2007
- Lackner P, Dietmann A, Beer R, Fischer M, Broessner G, Helbok R, et al: Cellular microparticles as a marker for cerebral vasospasm in spontaneous subarachnoid hemorrhage. **Stroke** **41**:2353–2357, 2010
- Lecointre C, Desrues L, Joubert JE, Perzo N, Guichet PO, Le Joncour V, et al: Signaling switch of the urotensin II vasoactive peptide GPCR: prototypic chemotactic mechanism in glioma. **Oncogene** **34**:5080–5094, 2015
- Lin CL, Calisaneller T, Ukita N, Dumont AS, Kassell NF, Lee KS: A murine model of subarachnoid hemorrhage-induced cerebral vasospasm. **J Neurosci Methods** **123**:89–97, 2003
- Macdonald RL, Higashida RT, Keller E, Mayer SA, Molyneux A, Raabe A, et al: Clazosentan, an endothelin receptor antagonist, in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage undergoing surgical clipping: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial (CONSCIOUS-2). **Lancet Neurol** **10**:618–625, 2011
- Park SL, Lee BK, Kim YA, Lee BH, Jung YS: Inhibitory effect of an urotensin II receptor antagonist on proinflammatory activation induced by urotensin II in human vascular endothelial cells. **Biomol Ther (Seoul)** **21**:277–283, 2013
- Patacchini R, Santicoli P, Giuliani S, Grieco P, Novellino E, Rovero P, et al: Urotensin II receptor antagonist peptide in the rat aorta. **Br J Pharmacol** **140**:1155–1158, 2003
- Pluta RM, Hansen-Schwartz J, Dreier J, Vajkoczy P, Macdonald RL, Nishizawa S, et al: Cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage: time for a new world of thought. **Neurol Res** **31**:151–158, 2009
- Porrás-González C, Ureña J, Egea-Guerrero JJ, Gordillo-Escobar E, Murillo-Cabezas F, González-Montelongo M del C, et al: Contractile responses to rat urotensin II in resting and depolarized basilar arteries. **J Physiol Biochem** **70**:193–199, 2014
- Rabinstein AA, Friedman JA, Nichols DA, Pichelmann MA, McClelland RL, Manno EM, et al: Predictors of outcome after endovascular treatment of cerebral vasospasm. **AJNR Am J Neuroradiol** **25**:1778–1782, 2004
- Ronne-Engström E, Enblad P, Lundström E: Health-related quality of life at median 12 months after aneurysmal subarachnoid hemorrhage, measured with EuroQoL-5D. **Acta Neurochir (Wien)** **155**:587–593, 2013
- Schebesch KM, Brawanski A, Bele S, Schödel P, Herbst A, Bründl E, et al: Neuropeptide Y—an early biomarker for cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. **Neurol Res** **35**:1038–1043, 2013
- Sugo T, Murakami Y, Shimomura Y, Harada M, Abe M, Ishibashi Y, et al: Identification of urotensin II-related peptide as the urotensin II-immunoreactive molecule in the rat brain. **Biochem Biophys Res Commun** **310**:860–868, 2003
- Takata K, Sheng H, Borel CO, Laskowitz DT, Warner DS, Lombard FW: Long-term cognitive dysfunction following experimental subarachnoid hemorrhage: new perspectives. **Exp Neurol** **213**:336–344, 2008

33. Uyttenboogaart M, Lijckx GJ, Vroomen PC, Stewart RE, De Keyser J: Measuring disability in stroke: relationship between the modified Rankin scale and the Barthel index. **J Neurol** **254**:1113–1117, 2007
34. Vergouwen MDI, Vermeulen M, van Gijn J, Rinkel GJE, Wijdicks EF, Muizelaar JP, et al: Definition of delayed cerebral ischemia after aneurysmal subarachnoid hemorrhage as an outcome event in clinical trials and observational studies: proposal of a multidisciplinary research group. **Stroke** **41**:2391–2395, 2010
35. Zhao B, Yang H, Zheng K, Li Z, Xiong Y, Tan X, et al: Preoperative and postoperative predictors of long-term outcome after endovascular treatment of poor-grade aneurysmal subarachnoid hemorrhage. **J Neurosurg** **126**:1764–1771, 2017

Disclosures

This work was supported by the OSEO program (grant no. A1006002P/10B0180205), Seinari Normandy maturation program (grant no. HEMORAG-UII/12B01806FM), Fondation pour la recherche sur les AVC (FRM), Normandie Rouen University, INSERM, and Rouen University Hospital. The funding sources had no role in the design and conduct of the study; collection, management, analysis, or interpretation of the data; preparation, review, or approval of the manuscript; and decision to submit the manuscript for publication.

Author Contributions

Conception and design: Castel, Gastaldi, Gérardin, Proust, Compère. Acquisition of data: Clavier, Mutel, Desrues, Lefevre-Scelle,

Gastaldi, El Amki, Dubois, Melot, Wurtz, Curey, Proust. Analysis and interpretation of data: Castel, Clavier, Desrues, Gastaldi, El Amki, Dubois, Melot, Curey, Compère. Drafting the article: Castel, Clavier, Dubois, Compère. Critically revising the article: Castel, Clavier, Gérardin, Compère. Reviewed submitted version of manuscript: Castel. Approved the final version of the manuscript on behalf of all authors: Castel. Statistical analysis: Clavier, Dubois, Compère. Administrative/technical/material support: Castel, Desrues. Study supervision: Castel, Proust, Compère.

Supplemental Information

Online-Only Content

Supplemental material is available with the online version of the article.

Supplementary Information. <https://thejns.org/doi/suppl/10.3171/2018.4.JNSI72313>.

Previous Presentations

Preliminary portions of this work were presented in poster form at the annual congress of the French Society of Anesthesiology in September 2014, Paris, France.

Correspondence

Hélène Castel: Normandie Université, Mont-Saint-Aignan, France. helene.castel@univ-rouen.fr.