



UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

**EDSC**  
École Doctorale des  
Sciences Chimiques

**ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES**

Laboratoire d'Innovation thérapeutique – UMR CNRS 7200

Laboratoire de biophotonique et de Pharmacologie – UMR CNRS 7213

# THÈSE

présentée par :

**Anne-Marie RAY**

soutenue le : 25 octobre 2013

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

Discipline/ Spécialité : Chimie biologique thérapeutique

## Conception et caractérisation d'antagonistes allostériques de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ pour le traitement des glioblastomes

### THÈSE dirigée par :

Dr. ROGNAN Didier

Dr. DONTENWILL Monique

Directeur de recherche, CNRS, Strasbourg

Directrice de recherche, CNRS, Strasbourg

### RAPPORTEURS :

Dr COLL Jean-Luc

Dr MORELLI Xavier

Directeur de recherche, INSERM, Grenoble

Chargé de recherche, CNRS, Marseille

### AUTRES MEMBRES DU JURY :

Dr DEJAEGERE Annick

Maître de conférence, Strasbourg

Dr MONBOISSE Jean-Claude

Maître de conférence, Reims



*Je souhaite exprimer ma plus sincère reconnaissance à mes deux Chefs, le Dr Monique Dontenwill et le Dr Didier Rognan pour m'avoir accueilli au sein de leurs équipes, me permettant ainsi de réaliser une thèse dans la continuité de mes études, à l'interface des domaines composant la recherche de molécules à visées thérapeutiques. Par leur disponibilité, leur patience, j'ai pu évoluer dans leurs domaines respectifs. Leur encadrement sans failles et nos discussions m'ont permis d'ouvrir mon esprit sur différentes perspectives.*

*Je tiens à remercier les Dr Jean-Luc Coll, Dr Xavier Morelli, Dr Annick Dejaegere et Dr Monboisse, membres de mon jury, d'avoir accepté de juger mon travail.*

*Mes sincères remerciements aux membres des deux équipes dans lesquelles j'ai évolué ces quatre dernières années, Dr Ester Kellenger, Dr Gwo-Yu Chuang, Pr. Maxime Lehmann, Dr Sophie Martin, Dr Isabelle Lelong-Rebel, Dr Schaffner Florence, Mme Fanny Noulet et Dr Choulier Laurence. Ils ont toujours su garder l'esprit ouvert me permettant, par nos discussions, d'enrichir mon quotidien et mes connaissances.*

*J'ai une pensée particulière pour mes collègues thésards passés et présents, Dr Jamel Meslamani (fiston) pour avoir eu la patience de m'apprendre les bases de l'informatique et du pearl, Dr Anne Maglott (Maître Jedi) pour avoir enseigné à son petit padawan les bases du travail dans un laboratoire de biologie, Dr Erika Cosset un soleil chaleureux de bonne humeur, Jérémy Desaphy la liste de ce que je lui dois serait trop longue..., Hana Janouskova (ma tchèque) pour son calme et sa patience permettant de calmer mon hyperactivité et mes coups de gueule, Noé Strum et Anne-Florence Blandin les derniers venus à qui je souhaite un bon voyage lors de leur thèse. Plus que de collègues, ils ont été un appui important et sont devenus des amis au travail comme à la ville.*

*J'ai eu la chance durant les trois premières années de ma thèse d'être entourée par une équipe d'enseignants qui m'ont permis de m'épanouir lors de mon monitorat en chimie organique. Merci au Dr Yveline Rival, Dr Karine Alarcon et Dr Philippe Pierrat, pour m'avoir enseigné les techniques d'enseignement.*

*Je n'oublie pas nos très chers voisins, l'équipe du Pr Philippe Boucher, Dr Véronique Bruban, Dr Rachel Matz, Dr Jérôme Terrand (Papi), Dr Mohamed Mlih, Dr Zeina El Asmar, Dr Lionel Host, et la petite Marion Jenty. Le partage des lieux fut un vrai plaisir, ainsi que nos repas et nos discussions. Je remercie l'ensemble des membres des deux UMR dans lesquelles j'ai travaillé, la liste des personnes que j'ai eu la chance de côtoyer est trop longue, j'espère qu'elles se reconnaîtront et ne m'en voudront pas de ne pas en faire la liste.*

*Je tiens également à remercier les personnels des trois plateformes avec lesquelles j'ai eu la chance de collaborer, Danièle Altschuh, Mireille Baltzinger, Gabrielle Zeder-Lutz, Pascal Villa, Christel Valencia, Sophie Goria, Adeline Obrecht, Laurent Brino, Benoit Fischer et Amélie Weiss*

*pour avoir toujours été à mon écoute et m'avoir laissé une autonomie dans la conception, la résolution et l'analyse de mes expériences (oui j'adore faire joujou avec de nouvelles machines...).*

*Grâce à l'ensemble de ces personnes ces quatre dernières années, loin d'être de toute tranquillité, se sont passées dans un environnement plein de rires et de bonne humeur.*

*Parce que sans eux, ces quatre dernières années n'auraient pas été si riches, je tiens à remercier mes amis. Malgré mon inhibition à communiquer mes sentiments, je suis sûre qu'ils savent toute l'amitié que je porte à ceux que j'aime qualifier comme ma famille de cœur qui s'est construite au cours des années, malgré la distance et mon emploi du temps. Dans le désordre, merci à : Claire, ma grande folle d'Audrey, la sophistiquée Ophélie, Emilie mon soleil réunionnais, mon biiiiiiii et sa lilly, mon poney américain, ma Nelly V... bleue et jaune, mon p'tit guinée pig, Charles le rugbyman, mon grand coloc Toto, la blonde littéraire Hélène, Piou alias David, Bénédicte, Eric, Bruno, Fany, Mathieu, Emma, Paco, Clément, Nini, Pierre l'Auvergnat, Arnaud, Alexandra, vous ne pouvez pas imaginer à quel point mon cœur est rempli de remerciements à votre égard.*

*Quelques mots pour ceux qui m'ont accompagnés pendant cette rédaction : James Hetfield, Serj Tankian, Tom Morello, Brian Hugh Warner, Billy Joe Armstrong, Chester Bennington, Steven Tyler, David Gahan, Joel O'Keeffe, Thomas Jacob, Didier Chappedelaine, Dexter Holland, Blaze Bayley, Alex Turner and Co.*

*Merci à l'ensemble de ma famille, mes grands-parents, oncles, tantes, cousins, cousines, grands-oncles, grandes-tantes, petits-cousins, petites-cousines et toutes les pièces rapportées (la liste est longue), parce que depuis plus de 27 ans, ils supportent le clown que je suis, m'acceptent avec mes rires, mes larmes et mes coups de gueule même s'ils ne les comprennent pas toujours. Je mesure la chance immense que la vie m'a donnée d'être entourée par une famille si grande et si aimante et je les remercie mille fois de leur présence à mes côtés. C'est le cœur serré que j'ai une pensée pour ma grand-mère et mon grand-père qui sont partis au cours de cette thèse. Je suis tellement fière de faire partie de cette famille.*

*À mes deux amours, les merveilles qui sont entrées dans ma vie ces dernières années, mes nièces (oui Val, maintenant tu passes après), parce que leur fraîcheur et leur joie de vivre sont une inspiration de tous les jours. Un grand merci à toi ma sœur Valérie et à mon beau-frère Michael ! Comment aurais-je tenu sans ces coups de fil interminables, ces apéros, sans vous tout simplement ?*

*Enfin ceux sans qui je ne serais celle que je suis, pour leur soutien, leur éducation, leur amour inconditionnel, les valeurs qu'ils m'ont transmises, mes parents Thérèse et Gilles.*

*A André, Denise, Marie, Maurice*

*« Lorsque tu ne sais pas où tu vas,  
Regarde d'où tu viens »  
Proverbe africain*



## Abréviations :

**ADMIDAS** : *Adjacent metal ion dependant adhesion site*

**BSA** : Albumine de Sérum de Bœuf

**DSF** : Fluorimétrie par balayage

**DMLA** : Dégénérescence maculaire liée à l'âge

**DMSO** : Diméthylsulfoxyde

**EDTA** : Acide éthylène diamine tétraacétique

**EGF** : *Epidermal Growth Factor*

**ELISA** : *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*

**EMEM** : *Eagle's Minimal Essential Medium*

**FAK** : *Focal Adhesion Kinase*

**FBS** : *Fœtal Bovin Serum*

**GAPDH** : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

**HEPES** : acide 4-(2-hydroxyléthyl)-1-piperazineethanesulfonique

**ICAM** : *Intracellular Adhesion Molecule*

**ILK** : *Integrin Linked Kinase*

**IMPD** : *integrin-mediated death pathway*

**MIDAS** : *metal ion dependant adhesion site*

**NSCLC** : *non-small cells lung carcinoma*

**PBS** : *Phosphate Buffer Saline*

**PSI** : plexine, semaphorine, intégrine domaine

**RMN** : Résonance magnétique nucléaire

**RMSD** : *Root Mean Square Deviation*

**RMSF** : *Root Mean Square Fluctuation*

**SPR** : Résonance plasmonique de surface

**SyMBS** : *Synergistic Metal-ion-Binding Site*

**VCAM** : *Vascular Cell Adhesion Molecule*

**VEGF** : *Vascular Endothelial Growth Factor*

## Tables des acides aminés

<p>Cas à part</p> <p>Glycine (G, Gly)</p>	<p>Sérine (S, Ser)</p> <p>Thréonine (T, Thr)</p>	<p>Asparagine (N, Asn)</p> <p>Glutamine (Q, Gln)</p>
<p>Acide glutamique (E, Glu)</p> <p>Acide aspartique (D, Asp)</p>	<p>Lysine (K, Lys)</p>	<p>Arginine (R, Arg)</p> <p>Histidine (H, His)</p>
<p>Négativement</p>	<p>Positivement</p>	
<p>Méthionine (M, Met)</p>	<p>Cystéine (C, Cys)</p>	<p>Tryptophane (W, Trp)</p>
<p>Contenant du soufre</p>	<p>Phénylalanine (F, Phe)</p>	<p>Tyrosine (Y, Tyr)</p>
<p>Aromatiques</p>		
<p>Alanine (A, Ala)</p> <p>Valine (V, Val)</p>	<p>Leucine (L, Leu)</p> <p>Isoleucine (I, Ile)</p>	<p>Proline (P, Pro)</p>
<p>Alphatiques</p>		

# Table des Matières

<b>Chapitre I. Introduction .....</b>	<b>9</b>
<b>I.A. Les intégrines .....</b>	<b>11</b>
I.A.1. Généralités.....	11
I.A.2. Structure des intégrines.....	12
I.A.3. Ligands extracellulaires et ions bivalents .....	15
I.A.4. Liaisons, structures et mouvements des parties transmembranaires et cytoplasmiques des intégrines .....	18
I.A.5. Relation Liaison-Conformation-Signalisation.....	22
<b>I.B. Stratégies de ciblage des intégrines.....</b>	<b>26</b>
I.B.1. Les mimes, antagonistes compétitifs de la liaison des protéines de la matrice extracellulaire.....	26
I.B.2. Les inhibiteurs allostériques inhibant la liaison des protéines de la matrice extracellulaire.....	30
I.B.3. Régulateurs ne ciblant pas la liaison des intégrines à la matrice extracellulaire.	
	33
<b>I.C. L'intégrine <math>\alpha 5\beta 1</math>.....</b>	<b>36</b>
I.C.1. L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ .....	36
I.C.2. L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ , cible thérapeutique contre le cancer .....	36
I.C.3. L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et l'angiogenèse .....	38
I.C.4. L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans les tumeurs solides.....	39
I.C.5. Les antagonistes de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ , généralités .....	40
I.C.6. Les anticorps ciblant l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ utilisés en thérapie .....	41
I.C.7. Les molécules mimes de la séquence RGD .....	42
I.C.8. Les mimes de la séquence synergique .....	43
<b>I.D. Objectifs de l'étude .....</b>	<b>46</b>
<b>I.E. Bibliographie.....</b>	<b>47</b>
<b>Chapitre II. Etude <i>in vitro</i> de l'implication de l'intégrine <math>\alpha 5\beta 1</math> dans l'adhérence et la migration de cellules de glioblastomes.....</b>	<b>59</b>
<b>II.A. Caractérisation des modèles cellulaires utilisés .....</b>	<b>61</b>
<b>II.B. Adhérence des cellules de glioblastomes et effets des antagonistes d'intégrines .....</b>	<b>62</b>
II.B.1. Adhérence des cellules U87MG .....	62
II.B.2. Adhérence des cellules U373MG.....	67
<b>II.C. Migration collective de cellules de glioblastomes et implication de l'intégrine <math>\alpha 5\beta 1</math> .....</b>	<b>71</b>
II.C.1. Migration collective des cellules U87MG.....	71
II.C.2. Migration collective des cellules U373MG .....	74
II.C.3. Analyse de l'activité de FAK dans les cellules U87MG .....	74
II.C.4. Analyse de la protéine FAK sur les cellules U373MG .....	77

<b>II.D.</b>	<b>Effet des intégrines <math>\alpha 5\beta 1</math> et <math>\alpha V\beta 3</math> dans la migration de cellules isolées de glioblastomes</b>	<b>79</b>
II.D.1.	Migration des cellules U87MG isolées .....	79
II.D.2.	Migration des cellules U373MG isolées .....	82
<b>II.E.</b>	<b>Conclusion et Discussion</b> .....	<b>84</b>
<b>II.F.</b>	<b>Matériel et méthodes</b> .....	<b>90</b>
II.F.1.	Culture cellulaire.....	90
II.F.2.	Cytométrie en flux.....	90
II.F.3.	Test de l'adhérence cellulaire.....	90
II.F.4.	Test de migration collective par blessure/cicatrisation.....	91
II.F.5.	Migration de cellules isolées .....	91
II.F.6.	Analyses Western Blot.....	92
II.F.7.	Microscopie confocale .....	92
II.F.8.	Analyses statistiques.....	93
<b>II.G.</b>	<b>Bibliographie</b> .....	<b>94</b>
<b>Chapitre III. Conception rationnelle d'antagonistes allostériques de l'intégrine <math>\alpha 5\beta 1</math></b>		<b>97</b>
<b>III.A.</b>	<b>Modélisation de l'intégrine <math>\alpha 5\beta 1</math> par homologie, recherche d'une poche et conception du pharmacophore</b> .....	<b>99</b>
<b>III.B.</b>	<b>Criblage <i>in silico</i> d'une chimiothèque sur le modèle de l'intégrine <math>\alpha 5\beta 1</math></b> .. <b>103</b>	
III.B.1.	Préparation de la banque de composés chimiques .....	103
III.B.2.	Criblage sur le pharmacophore .....	103
III.B.3.	Arrimage moléculaire et sélection des composés.....	104
III.B.4.	Sélection finale des touches .....	106
<b>III.C.</b>	<b>Résonance plasmonique de surface</b> .....	<b>107</b>
III.C.1.	Principe du Biacore® .....	107
III.C.2.	Résonance plasmonique de surface avec l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ purifiée commerciale .....	108
III.C.3.	Résonance plasmonique de surface réalisée avec l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ chimérique .....	113
<b>III.D.</b>	<b>Fluorimétrie différentielle à balayage</b> .....	<b>117</b>
III.D.1.	Principe de la fluorimétrie différentielle à balayage .....	117
III.D.2.	Utilisation de la DSF avec l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ .....	118
<b>III.E.</b>	<b>Criblage fonctionnel <i>in vitro</i></b> .....	<b>121</b>
III.E.1.	Toxicité et solubilité des composés.....	121
III.E.2.	Criblage des composés sur les cellules U87MG- $\alpha 5+$ .....	122
III.E.3.	Sélection des composés sur les cellules U87MG- $\alpha 5-$ .....	124
III.E.1.	Etude de l'effet des composés sur la migration collective des cellules U87MG- $\alpha 5+$ .....	125
III.E.2.	Adhésion cellulaire.....	127
III.E.3.	Effet des composés sur la prolifération cellulaire.....	128
<b>III.F.</b>	<b>Etude des analogues des composés 17 et 59</b> .....	<b>130</b>
III.F.1.	Etude des analogues du composé 59 sur les cellules U87MG.....	130
III.F.2.	Etude des analogues du composé 17 .....	135

<b>III.G.</b>	<b>Etude des relations structure activité.....</b>	<b>139</b>
III.G.1.	Relation structure activité des composés sélectionnés.....	139
III.G.2.	Etude du site criblé de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ .....	145
<b>III.H.</b>	<b>Conclusion et discussion .....</b>	<b>150</b>
<b>III.I.</b>	<b>Matériel et méthodes.....</b>	<b>159</b>
III.I.1.	Dynamique moléculaire .....	159
III.I.2.	Criblage <i>in silico</i> sur le pharmacophore.....	160
III.I.3.	Arrimage moléculaire.....	160
III.I.4.	Analyse <i>in silico</i> .....	161
III.I.5.	Résonance plasmonique de surface .....	161
III.I.6.	Culture des cellules NS0 .....	163
III.I.7.	Electrophorèse et Western Blot de la protéine $\alpha 5\beta 1$ -Fc .....	163
III.I.8.	Purification de la protéine.....	164
III.I.9.	Fluorimétrie différentielle à balayage.....	164
III.I.10.	Culture des cellules de gliobastomes .....	164
III.I.11.	Test de l'adhérence cellulaire.....	165
III.I.12.	Migration de cellules isolées.....	165
III.I.13.	Migration collective des cellules par blessure/cicatrisation.....	165
III.I.14.	Analyses statistiques.....	166
<b>III.J.</b>	<b>Bibliographie.....</b>	<b>167</b>
<b>Chapitre IV. Conclusion générale .....</b>		<b>177</b>
<b>Chapitre V. Annexes .....</b>		<b>181</b>
V.A.	Molécules sélectionnées <i>in silico</i> .....	182
V.B.	Manuscrits.....	187
V.B.1.	Integrin $\alpha 5\beta 1$ , the Fibronectin Receptor, as a Pertinent Therapeutic Target in Solid Tumors .....	187
V.B.2.	Activation of p53 pathway by Nutlin-3a inhibits the expression of the therapeutic target alpha5 integrin in colon cancer cells.....	187
V.B.3.	Single cell tracking assay as a tool to characterize selective small non peptidic antagonists of $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha v\beta 3$ integrins in U87MG glioma cells.....	187

# Table des Figures

Figure 1 La famille des intégrines.....	10
Figure 2 Structure schématique des intégrines.....	12
Figure 3 Réarrangements structuraux des domaines $\alpha/\beta A$ et des sites de liaison des ions.....	16
Figure 4 Ligands et liaisons cytoplasmiques des intégrines. ....	19
Figure 5 Séquences et structures des parties transmembranaires des intégrines.....	20
Figure 6 Modèles d'activation des intégrines.....	23
Figure 7 Modification conformationnelle induite par la liaison d'un ligand.....	23
Figure 8 Etats d'activation des intégrines.....	24
Figure 9 Liaison d'antagonistes mimant la séquence RGD au site MIDAS des intégrines. ....	27
Figure 10 Liaison des antagonistes RUC-1 et RUC-2 à l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$ . ....	31
Figure 11 Structure cristallographique de l'Efalizumab lié au domaine $\alpha A$ de l'intégrine $\alpha L\beta 2$ . ....	32
Figure 12 Les différentes stratégies des antagonistes d'intégrines.....	35
Figure 13 Structure et liaison de la fibronectine sur l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ . ....	37
Figure 14 Structure des antagonistes de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ .....	44
Figure 15 Expression des sous-unités $\alpha 5$ et $\alpha V$ dans les cellules U87MG et U373MG.....	60
Figure 16 Adhérence des cellules U87MG à la fibronectine et à la vitronectine. ....	62
Figure 17 Implication des sous-unités $\alpha 5$ et $\alpha V$ dans l'adhérence des U87MG. ....	63
Figure 18 Structure des différents antagonistes utilisés. ....	64
Figure 19 Effet des antagonistes non peptidiques « RGD-like » sur l'adhérence des U87MG.....	66
Figure 20 Adhérence des cellules U373MG à la fibronectine et à la vitronectine. ....	67
Figure 21 Implication des sous-unités $\alpha 5$ et $\alpha V$ dans l'adhérence des U373MG.....	68
Figure 22 Effet des antagonistes non peptidiques RGD-like sur l'adhérence des cellules U373MG. ....	69
Figure 23 Migration des cellules U87MG exprimant différents taux d'intégrine $\alpha 5\beta 1$ en fonction du temps.....	71
Figure 24 Migration collective des cellules U87MG.....	73
Figure 25 Migration collective des cellules U373MG. ....	74
Figure 26 Effet des antagonistes K34c et K34a sur la phosphorylation de la protéine FAK (lignée U87MG).....	75

Figure 27 Etude immunocytochimique de FAK-P et actine.....	76
Figure 28 Effet des antagonistes K34c et K34a sur la protéine FAK sur les U373MG.....	77
Figure 29 Migration des cellules U87MG isolées. ....	79
Figure 30 Effets des différents antagonistes sur la migration des cellules U87MG isolées. ....	81
Figure 31 Migration des cellules U373MG isolées et les effets des antagonistes.....	82
Figure 32 Représentation schématique de la procédure utilisée pour le criblage <i>in silico</i> . ....	98
Figure 33 Structure des modèles de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ .....	99
Figure 34 Composition du site sélectionné.....	100
Figure 35 Etude temporelle du RMSD et RMSF au cours de la dynamique moléculaire. ....	101
Figure 36 Conception du pharmacophore.....	102
Figure 37 Etude statistique des résultats du criblage sur le pharmacophore.....	104
Figure 38 Schéma représentatif de la résonance plasmonique de surface du Biacore..	107
Figure 39 Fixation de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et liaison de la fibronectine mesurée par Biacore. ....	109
Figure 40 Liaison des anticorps à l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ immobilisée par Biacore. ....	111
Figure 41 Fixation de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ à l'aide d'un anticorps pour la SPR. ....	112
Figure 42 Cinétiques de croissance des hybridomes NS0 et de production de la protéine $\alpha 5\beta 1$ -Fc.....	114
Figure 43 Purification de la protéine chimérique $\alpha 5\beta 1$ -Fc.....	115
Figure 44 Schéma explicatif du graphique obtenu lors de la DSF. ....	117
Figure 45 Modulation de la température de dénaturation de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ par l'EDTA et le peptide RGD.....	118
Figure 46 DSF de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ avec les différents composés criblés <i>in silico</i> . ....	119
Figure 47 Toxicité des composés observée après 24h sur un tapis cellulaire (U87MG- $\alpha 5+$ ). ....	121
Figure 48 Criblage des touches sur la migration des cellules U87MG- $\alpha 5+$ isolées. ....	122
Figure 49 Structure des 11 composés sélectionnés.....	123
Figure 50 Effets des composés sur la migration des cellules U87MG- $\alpha 5$ -.	124
Figure 51 Effet des composés criblés sur la migration collective des cellules U87MG..	126
Figure 52 Effets des composés sélectionnés sur l'adhérence des cellules U87MG- $\alpha 5+$ .	127
Figure 53 Etude de la prolifération des cellules U87MG- $\alpha 5+$ . ....	129
Figure 54 Etude des analogues du 59 sur la migration des cellules U87MG.....	131
Figure 55 Effets des analogues du composé 59 sur l'adhérence des cellules U87MG- $\alpha 5+$ . ....	132

Figure 56 Effet des analogues du 59 sur la migration collective des cellules U87MG....	133
Figure 57 Structure du composé 59 et de ses analogues.....	134
Figure 58 Effet des analogues du composé 17 sur la migration des cellules U87MG- $\alpha$ 5+.	
.....	135
Figure 59 Structure des analogues du composé 17 utilisés dans l'étude.....	136
Figure 60 Structure des analogues du composé 17 non utilisés dans l'étude.....	137
Figure 61 Validation des critères du pharmacophore par les composés sélectionnés..	139
Figure 62 Représentation des molécules arrimées dans le site de criblage.....	140
Figure 63 Comparaison des poses de nos composés sur le pharmacophore et à l'arrimage moléculaire.....	141
Figure 64 Interactions des composés A77, 59, 61 et 17 avec les résidus du site de liaison.	
.....	142
Figure 65 Comparaison des sites de l'intégrine $\alpha$ 5 $\beta$ 1, $\alpha$ V $\beta$ 3 et $\alpha$ IIb $\beta$ 3.....	146
Figure 66 Superposition des sites de l'intégrine $\alpha$ 5 $\beta$ 1 et $\alpha$ V $\beta$ 3.....	147
Figure 67 Alignement des séquences des sous-unités $\alpha$ et $\beta$ de la sous famille des intégrines reconnaissant le tripeptide RGD de leur ligand et matrice de similarité.	
.....	148
Figure 68 Schéma récapitulatif des résultats obtenus pour les 67 molécules sélectionnées <i>in silico</i> .....	153

## Table des Tableaux

Tableau 1 Les intégrines et leurs ligands.....	10
Tableau 2 Ligands extracellulaires des intégrines.....	14
Tableau 3 Séquences reconnues par les intégrines dans les protéines extracellulaires..	15
Tableau 4 Antagonistes de l'intégrine $\alpha$ 5 $\beta$ 1 en essai clinique.....	40
Tableau 5 Tableau des IC50 d'adhérence des différents antagonistes utilisés.....	64
Tableau 6 Tableau récapitulatif de l'implication des intégrines $\alpha$ 5 $\beta$ 1 et $\alpha$ V $\beta$ 3.....	89
Tableau 7 Interactions prises en compte pour la sélection des composés après l'arrimage moléculaire.....	105
Tableau 8 Calculs théoriques des réponses maximales attendues et obtenues par les différents analytes.....	108
Tableau 9 Conversion entre la numérotation des molécules à Osaka et celle de Strasbourg.....	120
Tableau 10 Inhibitions de la migration par les onze composés sur les cellules U87MG.	
.....	125

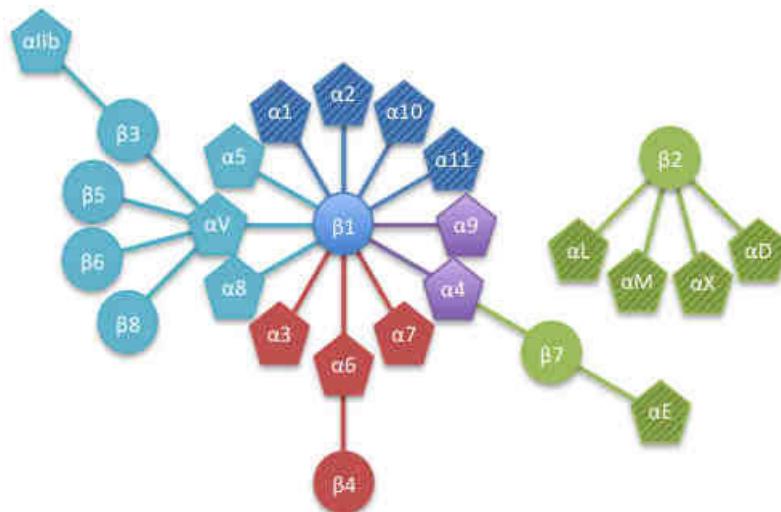
# Table des Equations

Équation 1 Mesure du score pour un couple conformère-pharmacophore .....	103
Équation 2 Equation permettant de prédire la réponse maximale d'un analyte. ....	108



# **Chapitre I. Introduction**

## I. Introduction



**Figure 1 La famille des intégrines.**

Représentation schématique des associations des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  existantes, les sous-unités  $\alpha$  hachées possèdent un domaine  $\alpha A$ , en cyan les intégrines qui reconnaissent la séquence RGD de leur ligand, en bleu les intégrines qui lient le collagène, en rouge celles qui lient la laminine, en vert les intégrines présentes exclusivement dans les leucocytes, en violet les intégrines présentes exclusivement chez les cordés (inspirée de la publication (Hynes, 2002)).

Nom commun	CD	Autres	Ligand principal
RGD	$\alpha 5\beta 1$	CD49e/CD29	nectine
	$\alpha 8\beta 1$		ectine, nephronectine
	$\alpha 11\beta 3$	CD41/CD61	fibronectine
	$\alpha V\beta 1$		, vitronectine
	$\alpha V\beta 3$	CD51/CD61	nectine, fibrinogène
	$\alpha V\beta 5$		nectine
	$\alpha V\beta 6$		nectine
	$\alpha V\beta 8$		nectine
Collagène	$\alpha 1\beta 1$	CD49a/CD29	agène
	$\alpha 2\beta 1$	CD49b/CD29	agène
	$\alpha 10\beta 1$		agène
	$\alpha 11\beta 1$		agène
Laminine	$\alpha 3\beta 1$	CD49c/CD29	inine
	$\alpha 6\beta 1$	CD49f/CD29	inine
	$\alpha 6\beta 4$		inine
	$\alpha 7\beta 1$		inine
Leucocytes	$\alpha D\beta 2$	CD11d/CD18	VCAM-1
	$\alpha 4\beta 7$	CD49d	onectine, VCAM-1
	$\alpha E\beta 7$	CD103	HML-1
	$\alpha L\beta 2$	CD11a/CD18	LFA-1
	$\alpha M\beta 2$	CD11b/CD18	Mac-1, CR3
	$\alpha X\beta 2$	CD11c/CD18	p150.95, CR4
Cordés	$\alpha 9\beta 1$		EGF-C, VEGF-D
	$\alpha 4\beta 1$	CD49d/CD29	ne, VCAM-1

**Tableau 1 Les intégrines et leurs ligands.**

Tableau présentant les différentes intégrines exprimées chez l'Homme en fonction de leur sous famille, les noms précédemment utilisés et leur ligand principal connu (inspiré de la publication (Barczyk et al., 2010))

## I.A. Les intégrines

### I.A.1. Généralités

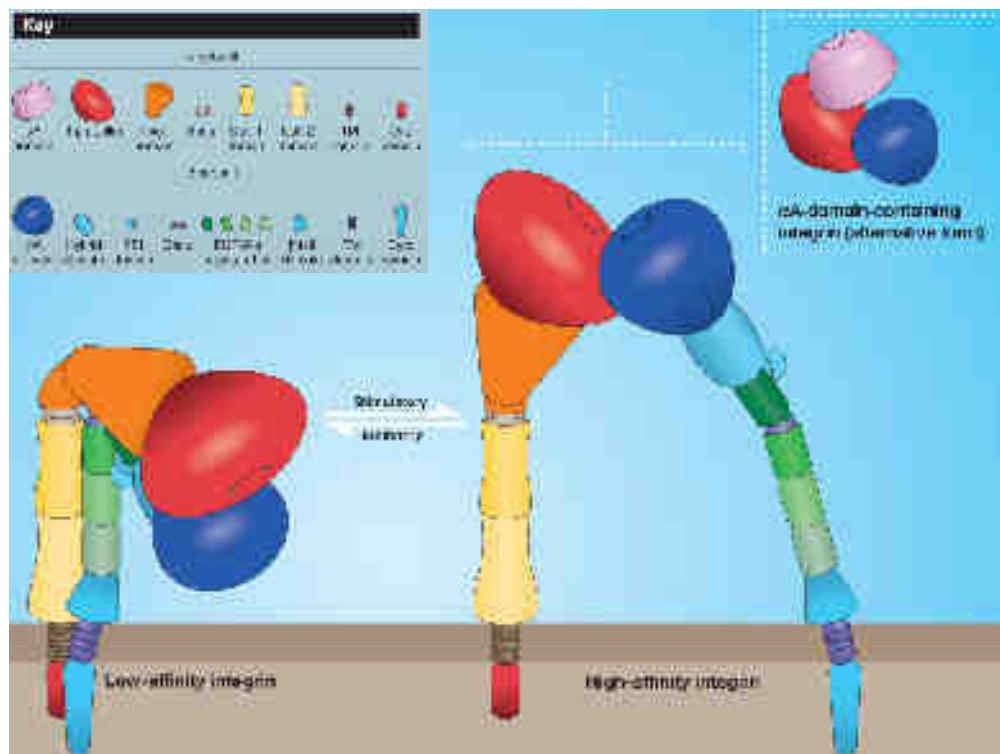
Les intégrines, présentes chez l'ensemble des métazoaires, sont des protéines qui font partie de la grande famille des récepteurs de l'adhérence cellulaire. Elles permettent, entre autre, la liaison des cellules entre elles et à la matrice extracellulaire.

Ce sont des protéines transmembranaires hétérodimériques constituées d'une sous-unité  $\alpha$  et d'une sous-unité  $\beta$ . Chez les mammifères, on dénombre 18 sous-unités  $\alpha$  et 8 sous-unités  $\beta$  qui s'associent pour former 24 hétérodimères (Figure 1). Les intégrines peuvent être regroupées en plusieurs sous-familles : les intégrines qui se lient au collagène, celles qui se lient à la laminine, celles qui reconnaissent la séquence RGD (arginine/glycine/aspartate) de leur ligand, celles qui ne sont exprimées que dans les leucocytes, et enfin les intégrines  $\alpha 4\beta 1$  et  $\alpha 9\beta 1$  sont des intégrines exclusivement exprimées chez les cordés. Avant d'utiliser la dénomination actuelle, certaines intégrines ont porté d'autres noms, en fonction des cellules et de la fonction pour laquelle elles ont été découvertes. L'ensemble des intégrines, de leurs dénominations et de leurs ligands principaux est répertorié dans le Tableau 1.

Découvertes comme de simples protéines de l'adhérence cellulaire (Hynes, 1987), les intégrines sont des récepteurs à part entière qui agissent sur la migration, la prolifération ou encore la survie des cellules (Giancotti & Ruoslahti, 1999). Leur action sur ces différents mécanismes cellulaires est due à leur capacité de transmettre de l'information de l'intérieur de la cellule vers l'extérieur (Inside-out) ou de l'extérieur vers l'intérieur (outside-in), déjà décrite au début des années 1990 (Hynes, 1992). La partie cytoplasmique des intégrines n'a pas de fonction enzymatique propre. La transmission de l'information se fait par des changements de conformations permettant ou non la liaison avec différents partenaires extra- et intracellulaires. La compréhension exacte de la relation entre la conformation de l'intégrine, la liaison du ligand et l'activité des intégrines sur la signalisation est très étudiée mais elle n'est pas entièrement résolue.

### I.A.2. Structure des intégrines

Grâce à leur étude par diffraction des rayons X et par résonance magnétique nucléaire (RMN), la structure des intégrines s'affine. A l'heure actuelle, plusieurs structures cristallographiques de domaines extracellulaires d'intégrines sont disponibles. Ce sont celles de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  (Xiong et al., 2009),  $\alpha IIb\beta 3$  (Zhu et al., 2008),  $\alpha X\beta 2$  (intégrine possédant un domaine  $\alpha A$ ) (Xie et al., 2010) et tout dernièrement de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  (Nagae et al., 2012). Plusieurs structures RMN des parties transmembranaires et cytoplasmiques ont été résolues, principalement pour l'intégrine  $\alpha IIb\beta 3$ , dont une assez complète pour les hélices transmembranaires (Lau et al., 2009), mais également pour les intégrines exprimées dans les leucocytes (Bhunia et al., 2009; Chua et al., 2011; Chua et al., 2012), et plus récemment pour l'intégrine  $\alpha 1\beta 1$  (Lai et al., 2013). Les intégrines sont composées d'une tête globulaire, à partir de laquelle deux jambes sont décrites pour rejoindre le fragment transmembranaire et enfin la partie cytoplasmique (Figure 2).



**Figure 2 Structure schématique des intégrines.**

Représentation schématique des intégrines issu de (Byron et al., 2009).

La tête globulaire de la sous-unité  $\alpha$  est un domaine formant un tonneau  $\beta$ . C'est la partie qui permet la liaison avec le ligand du côté  $\alpha$ . Le tonneau  $\beta$  est composé de 7 palmes d'environ 60 résidus repliés en 4 feuillets  $\beta$ . Plusieurs domaines de liaison d'ions calciques sont présents sur cette partie. Le reste de la partie extracellulaire de la sous-unité  $\alpha$  est composé d'un domaine « thigh » et de deux domaines « calf ». L'interface entre le domaine thigh et le premier domaine calf est décrite comme le genou de l'intégrine, il présente une certaine flexibilité et un site de liaison d'un ion métallique. La partie transmembranaire des sous-unités  $\alpha$  est formée d'une vingtaine d'acides aminés très conservés repliés en une hélice  $\alpha$ . Enfin la partie cytoplasmique des sous-unités  $\alpha$ , est composée de 15 à 176 acides aminés relativement variables. Seule la séquence GFFRK à la limite de la membrane est conservée. Neuf sous-unités  $\alpha$  ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 10$ ,  $\alpha 11$ ,  $\alpha D$ ,  $\alpha E$ ,  $\alpha L$ ,  $\alpha M$ , et  $\alpha X$ ) possèdent un domaine  $\alpha A$  (également nommé domaine  $\alpha I$ ). Il est constitué d'environ 200 acides aminés et inséré entre les palmes 2 et 3 du tonneau  $\beta$ . Sa structure correspond à un repliement dit de Rossman (feuillets  $\beta$  entourés d'hélices  $\alpha$ ). Il possède un site de liaison d'un ion métallique (magnésium  $Mg^{2+}$  ou calcium  $Ca^{2+}$ ). Ce site, permettant la liaison au ligand, est nommé site MIDAS (metal-ion-dependant adhesion site).

Les sous-unités  $\beta$  sont toutes constituées de huit domaines extracellulaires, un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique. La tête des sous-unités  $\beta$  correspond au domaine  $\beta A$  (ou  $\beta I$ ) et un domaine hybride. Le domaine  $\beta A$  est inséré entre les boucles B et C du domaine hybride, il possède une forte homologie avec le domaine  $\alpha A$ , dont le repliement de type Rossman. Trois sites de liaisons d'ions métalliques sont décrits dans le domaine  $\beta A$  : le site MIDAS comme pour le domaine  $\alpha A$ , mais également les sites ADMIDAS (Adjacent Metal-Ion-Dependant Adhesion Site) et SyMBS (Synergistic Metal-ion-Binding Site). Le domaine hybride correspond à une superposition de feuillets  $\beta$ . La jambe des sous-unités  $\beta$  est composée d'un domaine PSI (plexine, semaphorine, intégrine domaine) ainsi que quatre domaines EGF (Epidermal Growth Factor like domain), riches en cystéines et en ponts disulfures, et enfin d'un domaine à la limite de la membrane appelé  $\beta$ -tail. L'interface du domaine PSI et du premier domaine EGF est appelée genou, comme pour la sous-unité  $\alpha$ , il présente une forte flexibilité. Le domaine transmembranaire est constitué comme pour la sous-unité  $\alpha$  d'une simple hélice  $\alpha$  d'une trentaine de résidus, aboutissant au domaine cytoplasmique, très conservée d'une sous-unité  $\beta$  à l'autre.

## I. Introduction

Ligand	Intégrine
Adenovirus penton base protein	$\alpha v\beta 3, \alpha v\beta 5$
Bone sialoprotein	$\alpha v\beta 3, \alpha v\beta 5$
Borrelia burgdorferi	$\alpha IIb\beta 3$
Candida albicans	$\alpha M\beta 2$
Collagènes	$\alpha 1\beta 1, \alpha 2\beta 1, \alpha 11\beta 1, \alpha Ib\beta 3$
Collagène dénaturé	$\alpha 5\beta 1, \alpha v\beta 3, \alpha IIb\beta 3$
Cytotactine/tenascine-C	$\alpha 8\beta 1, \alpha 9\beta 1, \alpha v\beta 3, \alpha v\beta 6$
Decor sine	$\alpha IIb\beta 3$
Disintegrines	$\alpha v\beta 3, \alpha IIb\beta 3$
E cadherine	$\alpha E\beta 7$
Echovirus 1	$\alpha 2\beta 1$
Epiligrine	$\alpha 3\beta 1$
Facteur X	$\alpha M\beta 2$
Fibronectine	$\alpha 2\beta 1, \alpha 3\beta 1, \alpha 4\beta 1, \alpha 4\beta 7, \alpha 5\beta 1, \alpha 8\beta 1, \alpha v\beta 1, \alpha v\beta 3, \alpha v\beta 5, \alpha v\beta 6, \alpha v\beta 8, \alpha IIb\beta 3$
Fibrinogène	$\alpha 5\beta 1, \alpha M\beta 2, \alpha v\beta 3, \alpha x\beta 2, \alpha IIb\beta 3$
HIV Tat protein	$\alpha v\beta 3, \alpha v\beta 5$
iC3b	$\alpha M\beta 2, \alpha x\beta 2$
ICAM-1	$\alpha L\beta 2, \alpha M\beta 2$
ICAM-2,3,4,5	$\alpha L\beta 2$
Invasine	$\alpha 3\beta 1, \alpha 4\beta 1, \alpha 5\beta 1, \alpha 6\beta 1$
Laminine	$\alpha 1\beta 1, \alpha 2\beta 1, \alpha 6\beta 1, \alpha 7\beta 1, \alpha 6\beta 4, \alpha v\beta 3$
MAdCAM-1	$\alpha 4\beta 7$
Matrix metalloproteinase-2	$\alpha v\beta 3$
Neutrophil inhibitory factor	$\alpha M\beta 2$
Osteopontine	$\alpha v\beta 3$
Plasminogène	$\alpha IIb\beta 3$
Prothrombine	$\alpha v\beta 3, \alpha IIb\beta 3$
Sperm fertiline	$\alpha 6\beta 1$
Thrombospondine	$\alpha 3\beta 1, \alpha v\beta 3, \alpha IIb\beta 3$
VCAM-1	$\alpha 4\beta 1, \alpha 4\beta 7$
Vitronectine	$\alpha v\beta 1, \alpha v\beta 3, \alpha v\beta 5, \alpha IIb\beta 3$
von Willebrand factor	$\alpha v\beta 3, \alpha IIb\beta 3$

**Tableau 2 Ligands extracellulaires des intégrines.**

Tableau adapté (Plow et al., 2000)

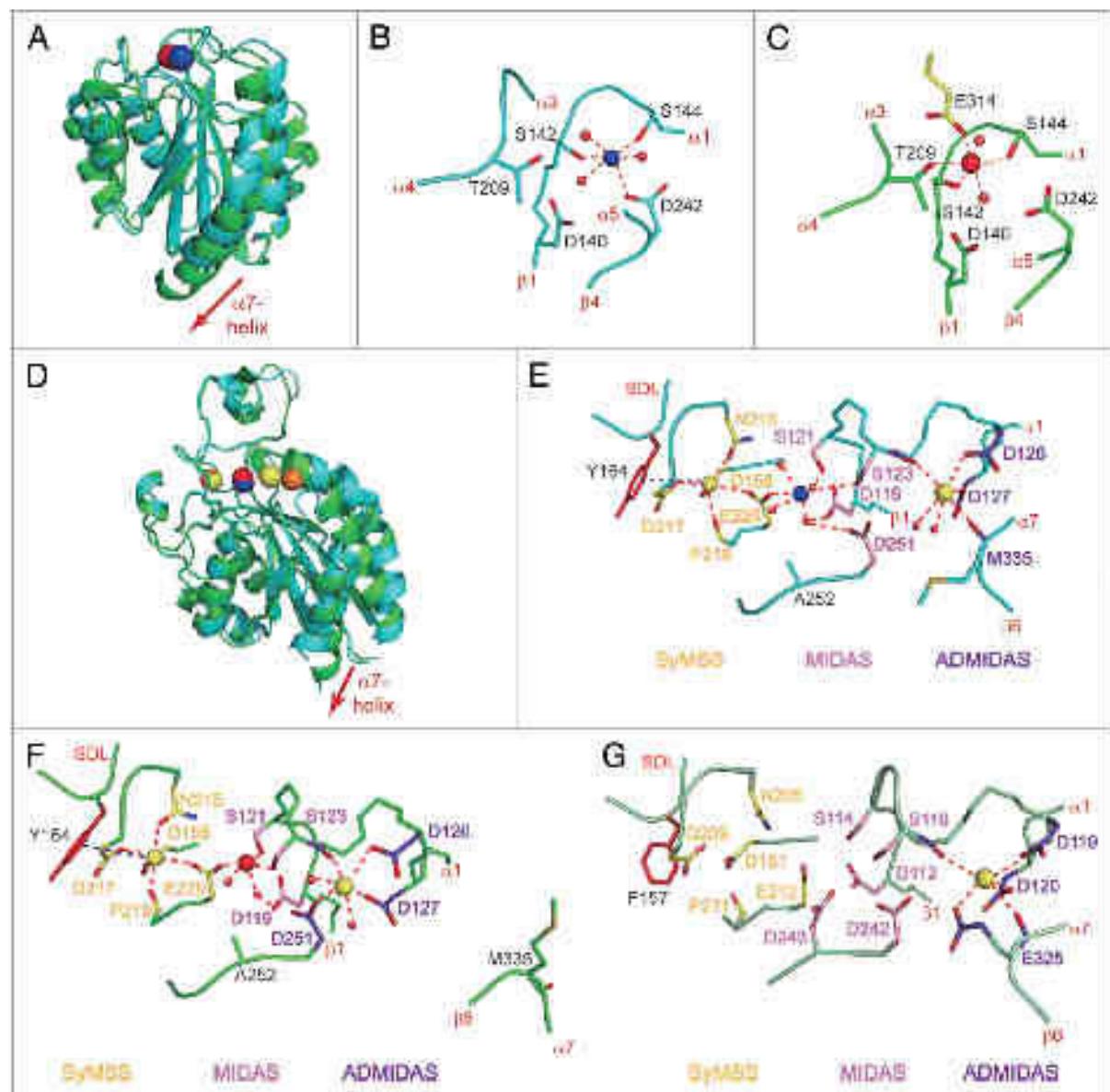
### I.A.3. Ligands extracellulaires et ions bivalents

La tête de l'intégrine (domaine tonneau de la sous-unité  $\alpha$  et  $\beta A$  de la sous-unité  $\beta$ ) est le lieu de liaison des ligands extracellulaires des intégrines. Les ligands extracellulaires des différentes intégrines sont répertoriés dans le Tableau 2. La liaison de ces ligands aux intégrines se fait généralement par de petites séquences d'acides aminés, dont les principales sont présentées dans le Tableau 3. Leur liaison entraîne des réarrangements conformationnels qui sont de plus en plus détaillés. Lorsque l'intégrine lie son ligand extracellulaire, on parle d'une conformation active, ou liante.

Séquence reconnue	Protéine	Intégrine
RGD	Adenovirus penton base protein, bone sialoprotein, collagène, decorsine, disintegrines, fibrinogène, fibronectine, prothrombine, tenascine, thrombospondine, vitronectine, von Willebrand factor	$\alpha 3\beta 1, \alpha 5\beta 1, \alpha 8\beta 1, \alpha v\beta 1, \alpha v\beta 3, \alpha v\beta 5, \alpha v\beta 6, \alpha IIb\beta 3$
HHLGGAKQAGDV	chaîne $\gamma$ du fibrinogène	$\alpha IIb\beta 3$
GPR	chaîne $\alpha$ du fibrinogène	$\alpha x\beta 2$
P1 peptide	chaîne $\gamma$ du fibrinogène	$\alpha M\beta 2$
P2 peptide	chaîne $\gamma$ du fibrinogène	$\alpha M\beta 2$
AEIDGIEL	Tenascine	$\alpha 9\beta 1$
QIDS	VCAM-1	$\alpha 4\beta 1$
LDT	MAdCAM-1	$\alpha 4\beta 7$
CS-1 peptide	Fibronectine	$\alpha 4\beta 1, \alpha 4\beta 7$
CS-5 peptide	Fibronectine	$\alpha 4\beta 1$
IDAPS	Fibronectine	$\alpha 4\beta 1$
ICAM peptides	ICAM-1, -2, -3	$\alpha L\beta 2, \alpha M\beta 2$
DLXXL	Tenascine	$\alpha v\beta 6$
GFOGERa	Collagène	$\alpha 1\beta 1, \alpha 2\beta 1$

**Tableau 3 Séquences reconnues par les intégrines dans les protéines extracellulaires.**  
Tableau adapté (Plow et al., 2000)

On connaît depuis longtemps l'importance des ions métalliques dans la liaison des ligands extracellulaires de l'intégrine (Mould et al., 1995). La présence d'ions calciques a un effet inhibiteur de la liaison, tandis que les ions manganèses l'activent. La résolution des différentes structures cristallographiques a permis de découvrir un total de huit sites de liaison de cations divalents, cinq sur la sous-unité  $\alpha$ , trois sur la sous-unité  $\beta$ , un site de liaison existe également sur le domaine  $\alpha A$ .



**Figure 3 Réarrangements structuraux des domaines  $\alpha/\beta$ A et des sites de liaison des ions.**

A. Superposition du domaine  $\alpha$ A de la sous-unité  $\alpha$ M libre (PDB 1JLM cyan, ion en bleu) et lié (PDB 1IDO vert, ion en rouge). B. Détail du site MIDAS de la sous-unité  $\alpha$ M libre. C. Détail du site MIDAS de la sous-unité  $\alpha$ M lié. D. Superposition du domaine  $\beta$ A de la sous-unité  $\beta$ 3 libre (PDB 1FCS, cyan, ion en bleu pour MIDAS, en orange pour ADMIDAS et SyMBS) ou lié (PDB 3FCU vert, ion rouge pour MIDAS, jaune pour ADMIDAS et SyMBS). E. Structure des sites MIDAS, ADMIDAS et SyMBS de la sous-unité  $\beta$ 3 libre. F. Structure des sites MIDAS, ADMIDAS et SyMBS de la sous-unité  $\beta$ 3 liés. G. Structure des sites MIDAS, ADMIDAS et SyMBS de la sous-unité  $\beta$ 2 non liés (PDB 3K6S). Figure extraite de la publication (Zhang & Chen, 2012).

Trois des sites de liaison du calcium sont présents sur la tête de la sous-unité  $\alpha$  (quatre pour les intégrines reconnaissant la séquence RGD). Ils sont situés sur la face extérieure du tonneau  $\beta$ , à l'opposé de l'interface des deux sous-unités. Ces sites de liaison sont importants pour le repliement de la protéine et la biogénèse des intégrines, la mutation des acides aminés de ces sites empêche le passage de l'intégrine du réticulum endoplasmique à l'appareil de Golgi (Mitchell et al., 2003). Un autre site de liaison d'un ion calcique se situe sur le genou de la sous-unité  $\alpha$ . La liaison d'un ion calcique dans ce site semble être liée à une stabilisation de la conformation active de l'intégrine (Xiong et al., 2001) par la neutralisation des charges négatives des résidus acides environnants, mais cette fonction reste hypothétique. Pour les sous-unités  $\alpha$ , un dernier site de liaison cationique est présent sur le domaine  $\alpha A$ , dans la poche de liaison du ligand, c'est le site MIDAS. Ce site a une affinité plus forte pour un ion magnésium que pour un ion calcium. L'étude des structures cristallographiques des domaines  $\alpha I$  de la sous-unité  $\alpha M$  détermine différents modes de coordination du site MIDAS liés à l'affinité pour le ligand (Lee et al., 1995a; Lee et al., 1995b; Shimaoka et al., 2003) (Figure 3A, B). La position du métal dans ce site diffère d'environ 2 $\text{\AA}$  entre la structure dite active et celle dite inactive, créant des modifications dans son environnement. D'après la taille et la géométrie du site MIDAS du domaine  $\alpha A$ , il paraît peu probable qu'un ion calcium, par l'augmentation de sa concentration, entre en compétition avec la liaison d'un ion manganèse. L'inhibition de la liaison d'un ligand par la présence d'ions calciques provient certainement des sites de liaison situés sur la partie  $\beta A$  (Onley et al., 2000).

La sous-unité  $\beta$  présente trois sites permettant la liaison d'un ion, tous situés dans le domaine  $\beta A$  (Figure 3D). Dans le cas des intégrines qui ne possèdent pas de domaine  $\alpha A$ , c'est le domaine  $\beta A$  qui lie les protéines de la matrice extracellulaire (Takagi et al., 2003). Dans le cas des intégrines qui possèdent un domaine  $\alpha A$ , le domaine  $\beta A$  régule allostériquement la liaison des ligands avec le domaine  $\alpha A$  (Luo et al., 2007) par l'interaction avec un résidu acide du domaine  $\alpha A$ . A la différence du domaine  $\alpha A$ , le domaine  $\beta A$  compte trois sites de liaison d'un ion métallique : MIDAS, ADMIDAS et SyMBS. Comme pour le domaine  $\alpha A$ , le site MIDAS du domaine  $\beta A$  est décrit comme liant un magnésium permettant la liaison de l'aspartate du tripeptide RGD par exemple (Xiong et al., 2002), mais il n'y a pas de déplacement de l'ion durant la liaison du ligand. D'après les données cristallographiques, le site ADMIDAS lie un ion calcique. Il influe sur la liaison du ligand avec le site MIDAS, mais son mode d'action exacte reste encore peu

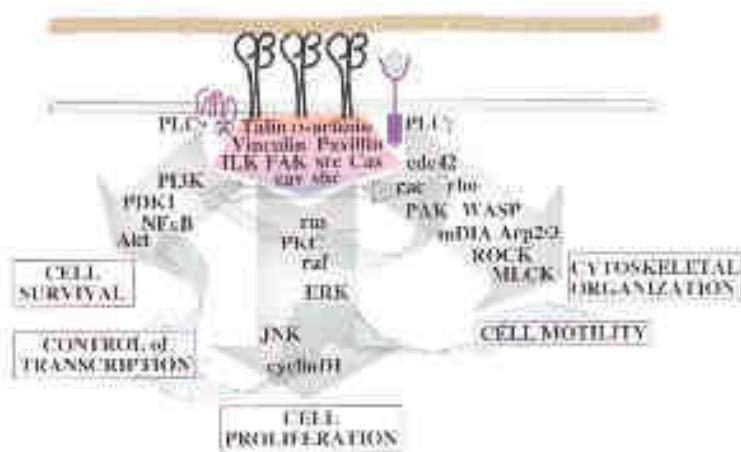
## *I. Introduction*

connu et semble dépendant de la sous-unité  $\beta$  (Chen et al., 2001; Valdramidou et al., 2008). Dans le cas de la sous-unité  $\beta 3$  (Figure 3E et F), dans la conformation non liante, le site ADMIDAS se lie avec l'oxygène de la chaîne principale de la méthionine 335. Lors de la liaison d'un ligand, l'aspartate 251 va se lier au site ADMIDAS, rendant le site MIDAS plus affin pour le ligand et déplaçant la méthionine présente sur l'hélice  $\alpha 7$ . Le site ADMIDAS est décrit comme un site de régulation négatif de la liaison de l'intégrine avec son ligand. A l'opposé, le site SyMBS est décrit comme un régulateur positif de la liaison intégrine-ligand. La liaison d'un ligand à l'intégrine engendre donc des modifications dans la coordination et l'organisation des sites de liaison MIDAS, ADMIDAS et SyMBS (Figure 3E, F et G).

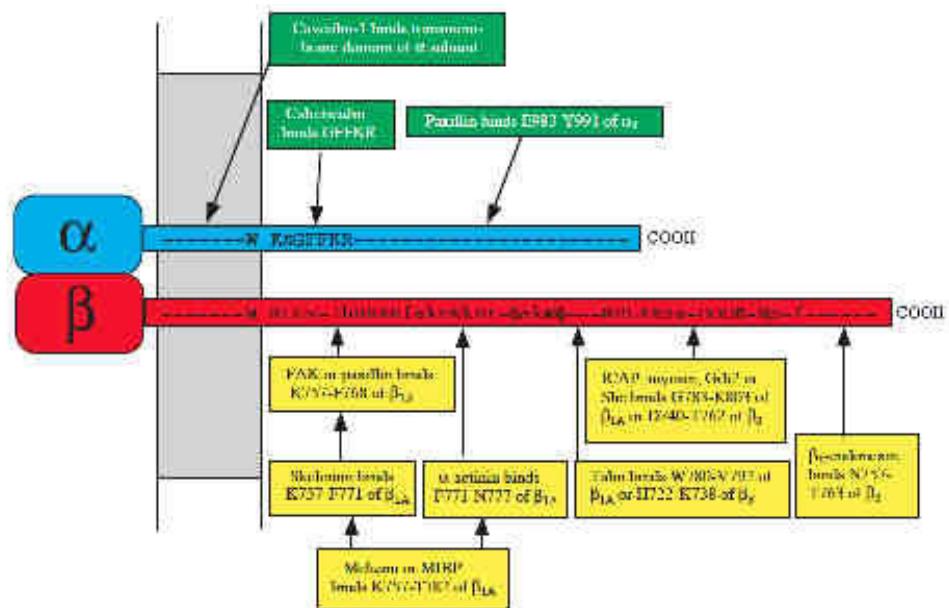
### **I.A.4. Liaisons, structures et mouvements des parties transmembranaires et cytoplasmiques des intégrines**

Plusieurs protéines sont connues pour se lier à la partie cytoplasmique des sous-unités  $\alpha$  ou  $\beta$ . L'ensemble des protéines permettant la signalisation et l'adhérence est l'adhésome. L'adhésome possède au moins 156 constituants liés par plus de 690 interactions (Zade-Bar et al., 2007). La taline, les kindlines, la filamine, ILK (Integrin Linked Kinase) et FAK (focal adhesion kinase), sont des constituants importants de l'adhésome. Les voies de signalisation activées par les protéines de l'adhésome permettent la modulation de la survie, la migration ou encore la prolifération des cellules (Figure 4A). La taline est une protéine constituée d'une tête globulaire d'environ 50kDa et d'un domaine allongé de 220kDa. La liaison de sa tête (domaines FERM) avec la première séquence NPXY conservée de la partie cytoplasmique des sous-unités  $\beta$  active l'intégrine (Wegener et al., 2007) (Figure 4B). De la même manière, les protéines de la famille des kindlines possèdent des domaines FERM qui vont se lier à la seconde séquence NPXY de la sous-unité  $\beta$  et déclencher son activation ou son inactivation (Harburger et al., 2009) (Figure 4B). La filamine quand à elle va inhiber l'activation de l'intégrine. Son site de liaison se superpose en partie sur celui la taline, sa liaison bloque donc celle de la taline (Kiema et al., 2006). Les protéines telles que FAK, ILK ou la paxilline ont, quant à elles, montré la capacité de se lier à la fois aux parties cytoplasmiques des sous-unité  $\alpha$  et  $\beta$  (Liu et al., 2000; Zaidel-Bar et al., 2007).

A.



B.

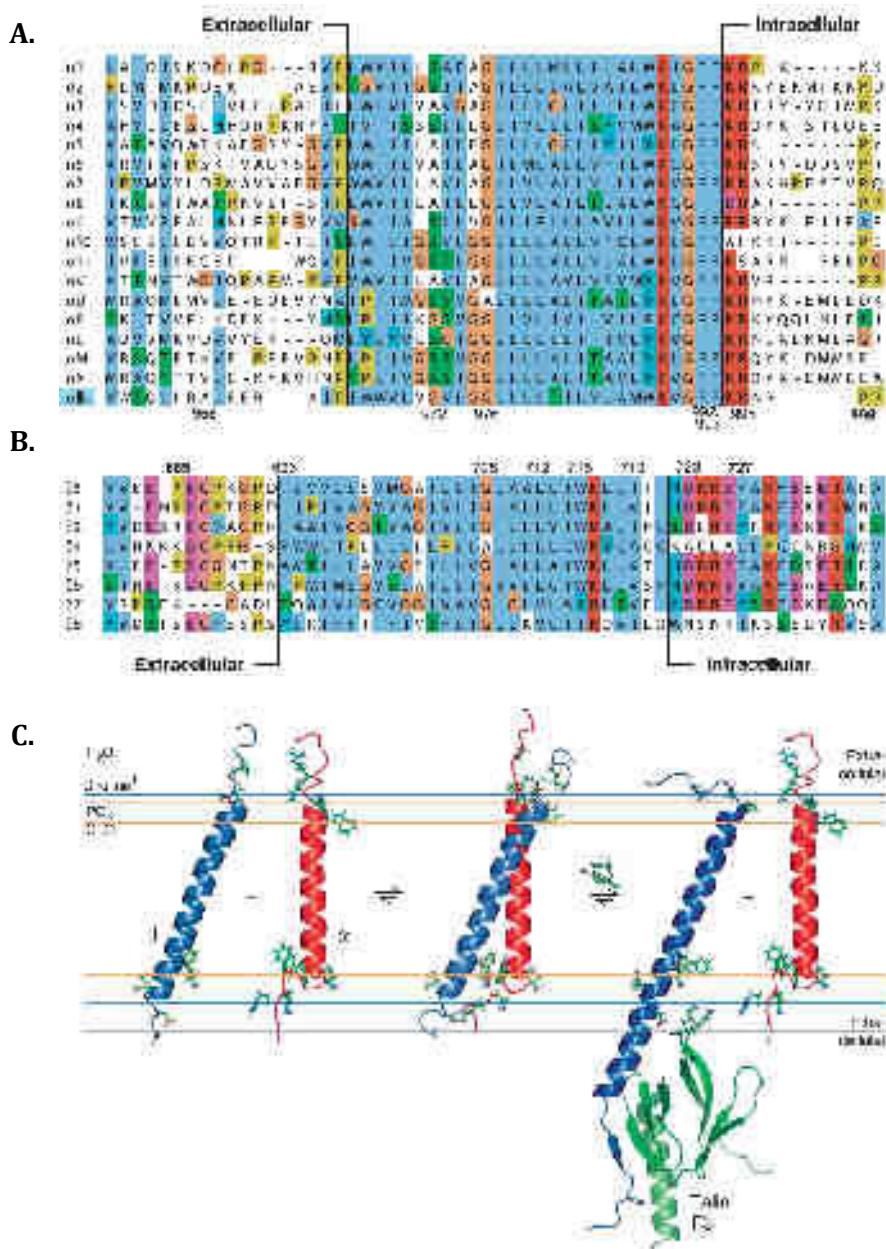


**Figure 4 Ligands et liaisons cytoplasmiques des intégrines.**

**A.** Représentation schématique des principales voies et des acteurs principaux de la signalisation induite par les intégrines (Hynes, 2002). **B.** Schéma représentant les principaux sites de liaison des protéines cytoplasmiques sur les intégrines. Les acides aminés conservés sont reportés sur chaque sous-unité. (Majuscule pour les résidus très conservés, minuscules pour les résidus conservés dans au moins 3 sous-unités, pour les caractères chimiques des résidus conservés : O pour hydroxyle, π apolaire et η polaire. (Liu et al., 2000)).

La protéine FAK est une protéine kinase cytoplasmique qui est recrutée dès le début de la formation des adhésomes. La liaison du domaine FERM de FAK avec les intégrines va libérer le domaine catalytique de FAK et ainsi la rendre active. La libération du domaine catalytique permet l'autophosphorylation de la tyrosine 397 (dite site d'autophosphorylation) qui va mener à l'activation de la protéine Src. L'activité de la protéine FAK est reliée à la formation des points focaux d'adhérence et à la migration des cellules (Mitra et al., 2005).

## I. Introduction



**Figure 5 Séquences et structures des parties transmembranaires des intégrines.**

**A,B.** Alignement des séquences des parties transmembranaires des sous-unités  $\alpha$  (A) et  $\beta$  (B) d'intégrines humaines. Les acides aminés sont colorés avec Jalview selon les couleurs de ClustalX. C. Prédiction de l'orientation des segments transmembranaires, de gauche à droite, les structures des sous-unités  $\alpha IIb$  (rouge) et  $\beta 3$  (bleu) seules, structure des parties transmembranaires dimériques, enfin, prédiction de la structure activée avec le complexe de la partie cytoplasmique de  $\beta 3$  et de la taline (PDB 2H7E), la partie transmembranaire de  $\beta 3$  (PDB 2RMZ) et de  $\alpha IIb$ . (Issu de (Lau et al., 2009)).

Les mouvements des domaines transmembranaires et cytoplasmiques sont très importants pour les intégrines. Ils permettent l'interaction avec des protéines du cytoplasme et la transmission de l'information entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. Les deux hélices transmembranaires ainsi que les parties cytoplasmiques des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  maintiennent une conformation inactive lorsqu'elles sont proches. Cette une conclusion est tirée d'études de microscopie électronique (Adair & Yeager, 2002), de mutations (Partridge et al., 2005) ou de FRET (Kim et al., 2003). Les séquences des domaines transmembranaires des sous-unités  $\alpha$  ou  $\beta$  sont conservées (Figure 5A et B). Les études RMN permettant d'obtenir la structure de la partie transmembranaire sont longtemps restées infructueuses. Les premiers modèles, réalisés dans des micelles de dodecylphosphocholine, ne permettaient pas d'observer l'hétérodimère  $\alpha/\beta$ , mais seulement des homodimères  $\alpha/\alpha$  ou  $\beta/\beta$  (Li et al., 2001). Plus récemment, les structures des domaines transmembranaires des sous-unités  $\alpha$ IIb et  $\beta$ 3 seules (Lau et al., 2008a; Lau et al., 2008b) ou en complexe (Lau et al., 2009) ont été résolues par RMN dans des bicelles (micelles de petites tailles constituées d'une bicouche lipidique). L'hélice transmembranaire de la sous-unité  $\beta$  continue dans le domaine cytoplasmique et possède une inclinaison à la différence de celle de la sous-unité  $\alpha$ IIb. Dans la Figure 5C on peut observer la variation prédictive de la conformation des intégrines en fonction de leur activation.

Les parties cytoplasmiques des intégrines sont très petites (environ 50 acides aminés pour la plupart). Du côté de la sous-unité  $\alpha$ , la partie cytoplasmique est très variable. D'après plusieurs études c'est cette variabilité qui va définir la fonction de l'intégrine (Kassner et al., 1995; Weber et al., 1999). Cependant, la séquence GFFKR, à la limite de la membrane cytoplasmique, est la seule partie conservée. Son importance dans la liaison avec la partie cytoplasmique de la sous-unité  $\beta$  a été démontrée par résonance plasmonique de surface (Kim et al., 2003). Du côté de la sous-unité  $\beta$ , la partie cytoplasmique est légèrement plus importante et plus conservée. Le motif NPXY permet la liaison avec différentes protéines cytoplasmiques. Un aspartate (D273 chez  $\beta$ 3) conservé est indispensable à la liaison avec une arginine de la sous-unité  $\alpha$  (R995 chez  $\alpha$ IIb), certainement par la formation d'un pont salin (Kim et al., 2003). La mutation de ces résidus crée une protéine constitutivement active. Cependant la liaison des deux parties cytoplasmiques est faible (Kim et al., 2003), ce qui peut expliquer qu'une partie des structures RMN reportées ne permet pas la détection du dimère (Ulmer et al., 2001;

## I. Introduction

Vinogradova et al., 2004) tandis que d'autres le décrivent (Vinogradova et al., 2002; Weljie et al., 2002). La flexibilité de cette partie peut aussi expliquer le peu de données présentes.

### I.A.5. Relation Liaison-Conformation-Signalisation

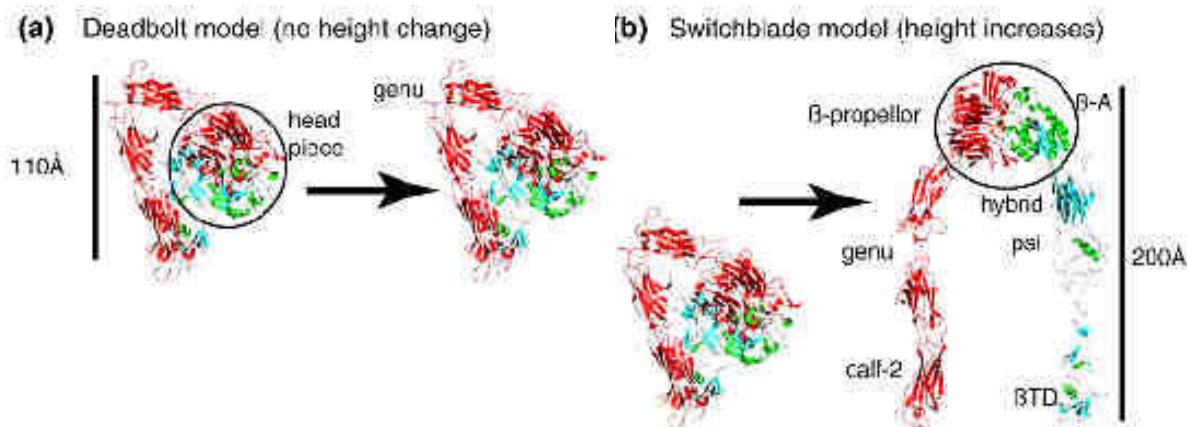
Les intégrines ont rapidement été décrites comme des protéines pouvant évoluer pour influer sur la liaison des différents ligands. Ainsi, une forme ouverte et une forme fermée ont tout d'abord été décrites (Hynes, 1992). Les données de plus en plus précises sur la liaison des ligands de l'intégrine, sa structure et ses conformations permettent de mieux comprendre l'allostérie qui définit l'activité de ces protéines.

Deux modèles de transition de l'une à l'autre des conformations sont décrits : le modèle à cran d'arrêt (switchblade (Takagi et al., 2002)) et le modèle à verrou (deadbolt (Arnaout et al., 2005)) (Figure 6).

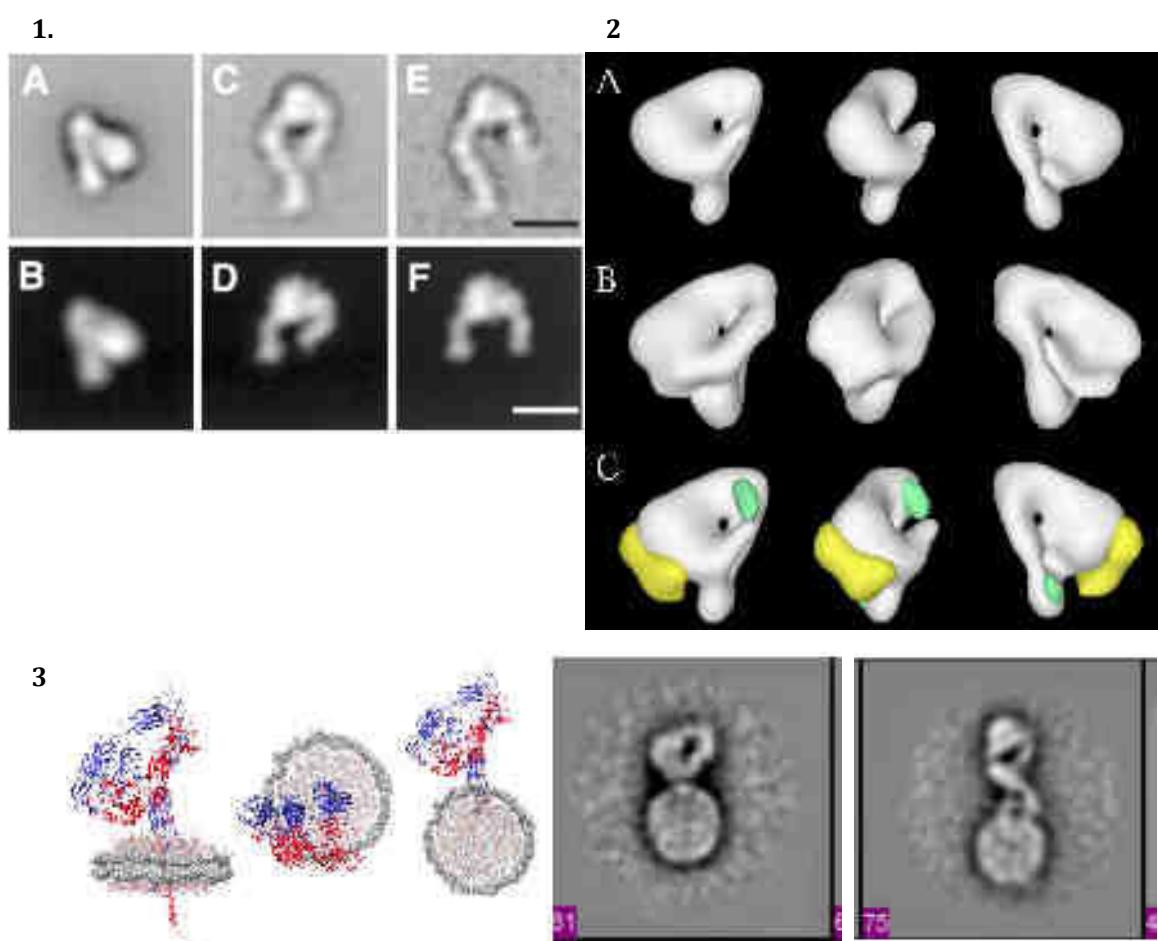
Dans le premier modèle décrit, le modèle à cran d'arrêt, la dissociation des parties cytoplasmiques et transmembranaires entraîne un dégagement des domaines EGF, et un dépliement circulaire de l'intégrine, comme le mouvement d'un couteau à cran d'arrêt (Figure 6B).

L'existence de la conformation totalement dépliée est remise en cause par les structures cristallographiques des domaines extracellulaires des intégrines (Nagae et al., 2012; Xiao et al., 2004; Xiong et al., 2002) qui présentent toujours une conformation pliée, qu'elles soient ou non liées au ligand RGD. Les contraintes du cristal, la préparation des échantillons, l'utilisation d'un ligand de petite taille (comparée aux ligands endogènes) ou l'absence des parties transmembranaires sont les causes potentielles de l'absence de structure dépliée décrite par les différents auteurs.

Les études de la conformation de l'intégrine par microscopie électronique (EM) ne sont pas des plus concluantes (Figure 7). La première étude de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  par EM montre une forme dépliée de l'intégrine lorsqu'elle est liée à un ligand ou en présence de manganèse (Takagi et al., 2002) (Figure 7.1). Cette étude décrit trois conformations, une repliée inactive, une semi-dépliée et une totalement dépliée. Cette conformation est moins visible dans l'étude suivante (Adair et al., 2005) (Figure 7.2). Une étude récente de l'intégrine  $\alpha IIb\beta 3$  incrustée dans un nanodisque (Ye et al., 2010) (Figure 7.3) semble montrer une conformation totalement ouverte de l'intégrine.

**Figure 6 Modèles d'activation des intégrines.**

Représentation schématique de l'activation des intégrines basée sur la structure cristallographique de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  du modèle à verrou (a) et du modèle à cran d'arrêt (b) (schéma issu de la publication (Ye et al., 2008))

**Figure 7 Modification conformationnelle induite par la liaison d'un ligand.**

1 : Projection moyenne du dimère  $\alpha V\beta 3$  lié par un pont disulfure (A, C, E) ou non (B, D, F) observé en présence d'ions calcium (A et B), d'ion manganèse (C et D) ou d'ion calcium et d'un peptide RGD cyclique (E et F). Image tirée de la publication (Takagi et al., 2002). 2 : Surfaces ombragées obtenues à partir de l'observation par microscopie électronique de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  non liée (A) ou en complexe avec la Fn (B), ainsi que la différence de surface des deux structures (C) (Fibronectine en jaune, intégrine en vert) (Adair et al., 2005). 3 : Modélisation de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  dans une conformation repliée insérée dans un nanodisque. Utilisation des structures PDB 3FCS, 2H7E et 2K9J pour l'intégrine ainsi que les photos par EM de l'intégrine non liée et liée à la taline, adaptée de (Ye et al., 2010).

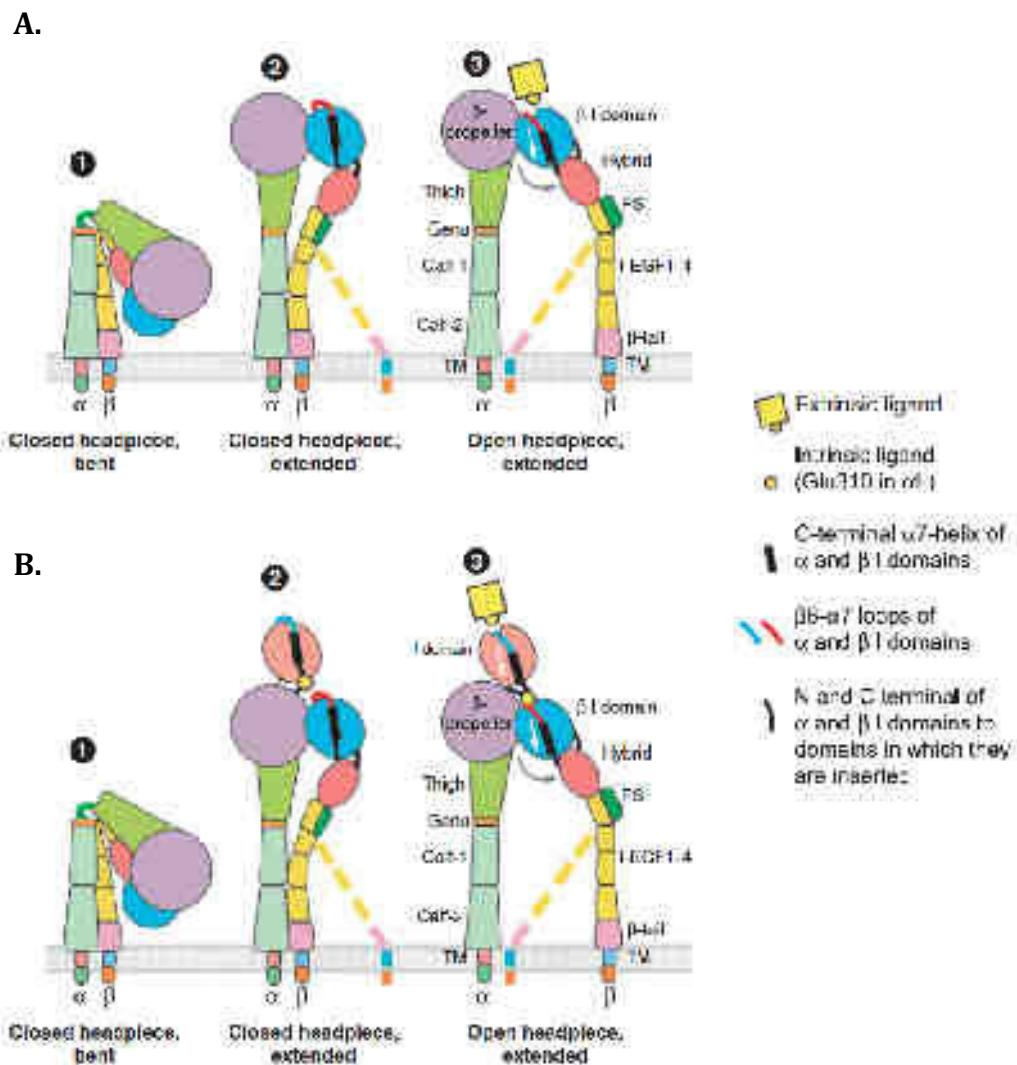


Figure 8 Etats d'activation des intégrines.

Représentation schématique de l'activation des intégrines contenant (B) ou non (A) un domaine  $\alpha A$ . L'activation est décrite en trois étapes : un état totalement refermé ne liant pas de ligand (a), d'un état activé non liant (b) et de l'état activé liant le ligand (c). Issu de (Luo et al., 2007)

Ces remarques ont fait naître un deuxième modèle, le modèle à verrou, pour lequel le déplacement des parties transmembranaires entraîne une dissociation légère des jambes de la sous-unité  $\beta$  avec la tête de l'intégrine à proximité de la membrane, la conformation active est une conformation qui reste repliée (Figure 6A).

Les états de conformation ouverts et fermés ne sont que deux étapes d'un mouvement de plus en plus étudié. Ainsi les deux modèles s'accordent sur les bases de ce mouvement.

La liaison d'un ligand entraîne un changement de coordination des ions métalliques présents dans les sites MIDAS et ADMIDAS. Ce changement se répercute par un mouvement des hélices  $\alpha 1$  et  $\alpha 7$  du domaine  $\beta A$  contenant les résidus qui coordonnent les ions. Enfin, le déplacement de ces hélices entraîne une rotation du domaine hybride. Dans le cas des intégrines contenant un domaine  $\alpha A$ , la liaison du ligand va produire un déplacement de l'hélice  $\alpha 7$  de ce domaine. Un résidu glutamate présent à une extrémité de cette hélice va agir comme un ligand du site MIDAS du domaine  $\beta A$ , entraînant la cascade précédente. C'est une partie du mouvement déclenchant la signalisation outside-in (Figure 8).

Du côté de la signalisation inside-out, d'après les différentes structures RMN obtenues, la liaison d'une protéine cytoplasmique décale le domaine transmembranaire de la sous-unité  $\beta$ , engageant plusieurs résidus cytoplasmiques dans la membrane. Le domaine transmembranaire de la sous-unité  $\alpha$  ne varie pas selon les études de Lau (Lau et al., 2008a; Lau et al., 2009). La séparation des domaines transmembranaires engendre alors des modifications conformationnelles du domaine cytoplasmique, permettant l'accessibilité du site MIDAS à un ligand.

De plus en plus d'intermédiaires de la dynamique des intégrines sont décrits. Dans une publication récente, l'étude par structure cristallographique de l'intégrine  $\alpha IIb\beta 3$  a permis la description de huit étapes (Zhu et al., 2013).

Les changements conformationnels de l'intégrine sont la clef qui permettrait de comprendre le lien entre la liaison du ligand et la signalisation induite par les intégrines.

## I.B. Stratégies de ciblage des intégrines

Depuis la découverte des intégrines il y a bientôt trente ans, le moyen de les inhiber est de plus en plus recherché. Les intégrines régulent l'adhérence, la migration ou encore la survie des cellules. Elles ont un potentiel thérapeutique dans une variété de maladies dont le cancer. Un grand nombre d'antagonistes d'intégrines ont été décrits, en phases précliniques, cliniques ou approuvés.

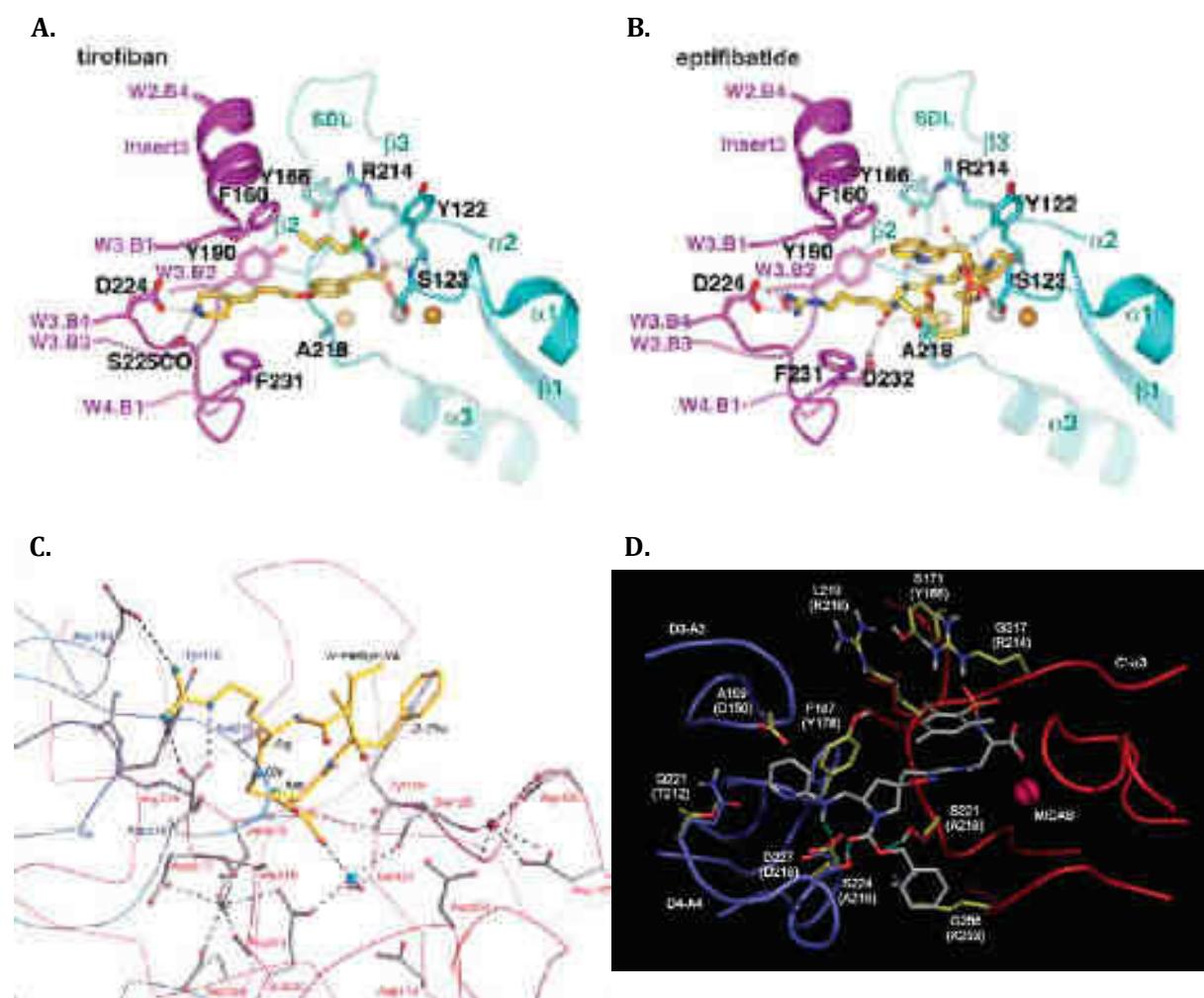
Ayant été découvertes comme des protéines permettant l'adhérence, les antagonistes des intégrines ont longtemps été choisis pour leur capacité à inhiber la liaison aux protéines de la matrice extracellulaire. L'avancée des connaissances sur le fonctionnement et la structure des intégrines ainsi que l'apparition des premières données cliniques font évoluer la conception des antagonistes d'intégrines. De plus en plus de stratégies de ligands allostériques apparaissent. Différents types d'allostéries sont utilisées, certaines jouant sur un site différent du site MIDAS pour inhiber la liaison du ligand, d'autres sur la sélection d'une conformation de l'intégrine ou encore sur l'inhibition sélective de la liaison de protéines cytoplasmiques.

### I.B.1. Les mimes, antagonistes compétitifs de la liaison des protéines de la matrice extracellulaire

La plupart des antagonistes d'intégrines étudiés ces dernières années ont été conçus pour imiter la séquence du ligand extracellulaire de l'intégrine ciblée.

Cette stratégie est soutenue par la mise sur le marché de deux molécules mimant la séquence RGD du fibrinogène, l'Eptifibatide et le Tirofiban. Ces deux composés ciblent l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 et sont utilisés en prévention de l'infarctus du myocarde. L'inhibition de l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 permet l'inhibition de l'agrégation plaquettaire. L'Eptifibatide (Integrilin, Millenium Pharmaceutical) est un peptide cyclique tandis que le Tirofiban (Aggrastat, Merck) est un antagoniste non peptidique. D'après la structure cristallographique de l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 en leur présence, ces deux antagonistes se lient au site MIDAS de la sous-unité  $\beta$ 3 (Xiao et al., 2004) (Figure 9A et B), comme la séquence RGD du fibrinogène.

A la suite de la découverte de ces molécules, plusieurs autres antagonistes d'intégrines reconnaissant la séquence RGD ont été mis au point et certains sont actuellement en essai clinique. C'est le cas du cilengitide (Dechantsreiter et al., 1999), pentapeptide cyclique inhibiteur des intégrines  $\alpha V\beta 3$  et  $\alpha V\beta 5$ . Il bloque leur liaison à leur ligand principal, la vitronectine. Sa liaison avec le site MIDAS a été confirmée par structure cristallographique (Xiong et al., 2002) (Figure 9C). Il est actuellement en phase III comme traitement contre les glioblastomes en combinaison avec la radiothérapie et la chimiothérapie au témozolomide. Plusieurs autres essais cliniques de phase I et II ont également été réalisés ou sont en cours comme traitement de différentes tumeurs solides, tel que le cancer du poumon, de la prostate, ou des voies aéro-pharyngées.



**Figure 9 Liaison d'antagonistes mimant la séquence RGD au site MIDAS des intégrines.**

**A.** Liaison du Tirofiban (jaune) dans le site MIDAS de l'intégrine  $\alpha IIb\beta 3$  (rose et cyan respectivement) obtenue par résolution de la structure cristallographique (tirée de (Xiao et al., 2004)). **B.** Liaison de l'Eptifibatide (jaune) dans le site MIDAS de l'intégrine  $\alpha IIb\beta 3$  (rose et cyan respectivement) obtenue par résolution de la structure cristallographique (tirée de (Xiao et al., 2004)). **C.** Liaison du cilengitide (jaune) dans le site MIDAS de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  (bleu et rouge respectivement) obtenue par résolution de la structure cristallographique (tirée de (Xiong et al., 2002)). **D.** Modélisation de la liaison du SJ7449 (gris) dans le site MIDAS de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  (bleu et rouge respectivement) (tirée de (Marinelli et al., 2005)).

## I. Introduction

Plusieurs intégrines reconnaissent la séquence RGD de leur ligand (Figure 1). La recherche de molécules sélectives d'une intégrine donnée mimant cette séquence est donc un défi et une nécessité. En effet, un antagoniste de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  qui se lierait également à l'intégrine  $\alpha IIb\beta 3$  risque de déclencher des hémorragies. Les résolutions des structures cristallographiques des intégrines  $\alpha V\beta 3$  et  $\alpha IIb\beta 3$  complexées à leurs ligands ont permis de réaliser des études *in silico*, permettant de mieux guider la conception de ces antagonistes (Marinelli et al., 2003; Marinelli et al., 2005). Plusieurs groupes travaillent sur la conception d'antagonistes RGD-mimétiques (Delouvrie et al., 2012a; Delouvrie et al., 2012b; Raboisson et al., 2007; Raboisson et al., 2006; Rerat et al., 2009; Zhou et al., 2006). L'équipe du Pr Kessler (Munich, Allemagne) a conçu différentes classes d'antagonistes non peptidiques dont l'affinité pour les différentes intégrines à RGD est mesurée par des tests d'adhérence effectués avec des intégrines purifiées (Heckmann & Kessler, 2007; Heckmann et al., 2008). D'après leurs structures, tous se lient au site MIDAS de la sous-unité  $\beta$  (Figure 9D). La sélectivité est obtenue par la modification de l'écart entre la fonction acide (simulant l'aspartate du RGD) et le groupement aminé (simulant l'arginine du RGD) ainsi que par l'encombrement stérique de différentes parties reliant ces fonctions.

Les intégrines reconnaissant la séquence RGD de leur ligand ne sont pas les seules pour lesquelles des antagonistes mimant la séquence du ligand sont conçus. Dans le cas de l'intégrine  $\alpha 4$ , plusieurs antagonistes sont décrits. Le Natalizumab (Tysabri, Elan Pharmaceutical et Biogen Inc.) est un anticorps monoclonal humanisé approuvé en clinique puis retiré pour le traitement de la maladie de Crohn et la sclérose en plaques. On ne connaît pas son mode de liaison à l'intégrine, mais il inhibe la liaison des intégrines  $\alpha 4\beta 1$  et  $\alpha 4\beta 7$  au VCAM-1 et empêche ainsi la diapédèse des leucocytes (WO1997018838A1). Cependant l'apparition d'infections opportunistes entraînant la mort de patients (leuco encéphalopathies multifocales progressives) a causé son retrait du marché. Le lien entre l'anticorps et ces infections opportunistes étant controversé (Yousry et al., 2006), de nouveaux antagonistes de l'intégrine  $\alpha 4$  apparaissent. Deux principales classes d'antagonistes d'intégrine  $\alpha 4$  sont décrites, ceux dérivés de l'urée et ceux dérivés de la phénylalanine. Aucune donnée cristallographique n'est disponible, mais il semble que ces nouveaux antagonistes se lient au site MIDAS de la sous-unité  $\beta 1$  et  $\beta 7$  (Davenport & Munday, 2007). Le problème de la sélectivité de ces composés est également posé. Ils se lient indifféremment à  $\alpha 4\beta 1$  et  $\alpha 4\beta 7$ . L'anticorps monoclonal

humanisé MLN-02, dérivé de l'anticorps Act-1 (Vedolizumab, Millenium Pharmaceutical) est sélectif de l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$ . Il se lie au site MIDAS de la sous-unité  $\beta 7$  (Soler et al., 2009). Il est actuellement en essai clinique de phase II contre la maladie de Crohn.

Certains groupes présentent des antagonistes possédant des squelettes originaux, tels que celui présenté par l'équipe du Dr Marahiel (Marbourg, Allemagne). Ils se servent du squelette d'un peptide « lasso » bactérien dans lequel la séquence RGD a été incorporée (Knappe et al., 2011). Ce peptide n'est pas sélectif, mais bloque la formation de tubes *in vitro* par des cellules endothéliales, bloquant ainsi potentiellement l'angiogenèse.

Une publication récente présente également un anticorps couplé à un antagoniste non peptidique de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . Dans ce modèle, l'anticorps n'est présent non pas pour sa liaison à l'intégrine, mais pour ses capacités à augmenter la biodisponibilité de l'antagoniste (Goswami et al., 2013).

Cependant, la stratégie utilisée pour la conception de l'ensemble de ces composés a récemment été remise en question. En effet, les deux antagonistes se liant au site MIDAS de l'intégrine  $\alpha IIb\beta 3$  actuellement utilisés en clinique (le tirofiban et l'eptifibatide) présentent des effets secondaires (Peter et al., 2001). En se liant au site MIDAS de l'intégrine, ils déclenchent la conformation active de l'intégrine, ce qui entraîne des thromboses. Ce point remet en question le terme d'antagoniste pour les intégrines. En effet, ces composés sont des antagonistes de l'adhérence, mais il semblerait qu'ils soient des agonistes au moins partiels de la signalisation induite par l'intégrine  $\alpha IIb\beta 3$ . D'après les données cristallographiques obtenues pour les composés cités, il semblerait que les intégrines soient toujours en conformation active lors de la liaison des composés au site MIDAS.

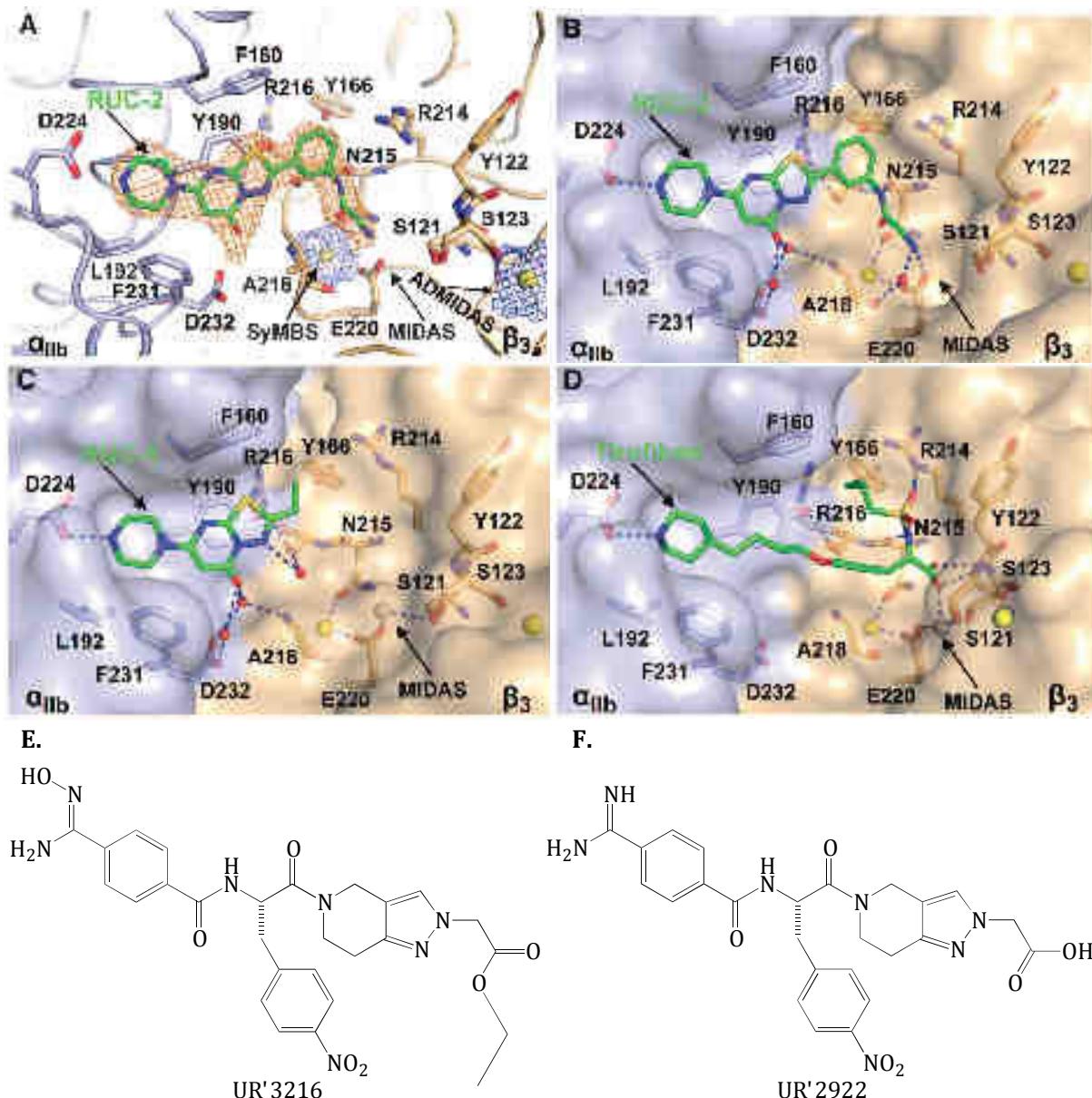
De la même manière, en ce qui concerne les intégrines contenant la sous-unité  $\alpha 4$ , l'utilisation des antagonistes « mimes » peut induire un effet agoniste de sur-activation des lymphocytes T, expliquant le risque d'apparition de maladies opportunistes (Kummer & Ginsberg, 2006).

### I.B.2. Les inhibiteurs allostériques inhibant la liaison des protéines de la matrice extracellulaire

La dénomination d'antagonistes allostériques est particulière dans le domaine des intégrines. En effet, le site orthostérique n'est pas défini comme l'ensemble du site de liaison du ligand endogène, mais exclusivement comme le site de liaison d'un ion métallique, le MIDAS.

Le seul antagoniste approuvé en clinique qui inhibe la liaison à la matrice extracellulaire sans se lier au site MIDAS des intégrines est l'Abcixumab (ReoPro, Janssen Biologics BV). C'est un fragment (Fab) d'anticorps chimérique humanisé, il cible l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 et est utilisé comme le Tirofiban et l'Eptifibatide comme anti-thrombotique. D'après les études de mutagénèse (Artoni et al., 2004), l'Abcixumab se lie à un site proche du MIDAS, et inhiberait l'interaction avec le fibrinogène par un encombrement stérique. Tout comme le Tirofiban et l'Eptifibatide, il bloque l'intégrine dans une conformation active, ce qui entraîne des thromboses. Pour pallier à ce problème, deux molécules ont été conçues, le RUC-1 et le RUC-2. Le RUC-1 est issu d'un criblage à haut débit et sélectionné pour sa capacité à inhiber la liaison entre l'intégrine et le fibrinogène (Blue et al., 2008). Il a la particularité de se lier dans le site de liaison du fibrinogène, mais de ne pas interférer avec l'ion présent dans le site MIDAS (Figure 10C). Son efficacité *in vitro* est cependant plus faible que le Tirofiban. Le RUC-2 est un dérivé du RUC-1 (Zhu et al., 2012). Il ne se lie pas au site MIDAS (Figure 10A et B), Ses effets *in vitro* sont beaucoup plus forts que ceux du RUC-1. D'après le test réalisé avec un anticorps reconnaissant la forme active de l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, ils n'induisent pas la conformation active de l'intégrine. Leur site de liaison a été validé par une étude cristallographique. Cependant toutes ces données, prometteuses, sont obtenues sur des tests *in vitro*. L'hypothèse selon laquelle l'inhibition de la liaison au fibrinogène sans induction de la conformation active de l'intégrine empêchera la thrombose devra être validée *in vivo*.

Les laboratoires UBE ont également publié la découverte de l'antagoniste UR-2922 et de sa forme prodrogue UR-3216, antagoniste de l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (Baba et al., 2001). D'après leurs résultats, ce composé se lie de la même manière que l'Abcixumab, sans pour autant activer la conformation active de l'intégrine. Les détails de son mécanisme d'action ne sont pas présentés, mais les premiers résultats *in vivo* semblent prometteurs.



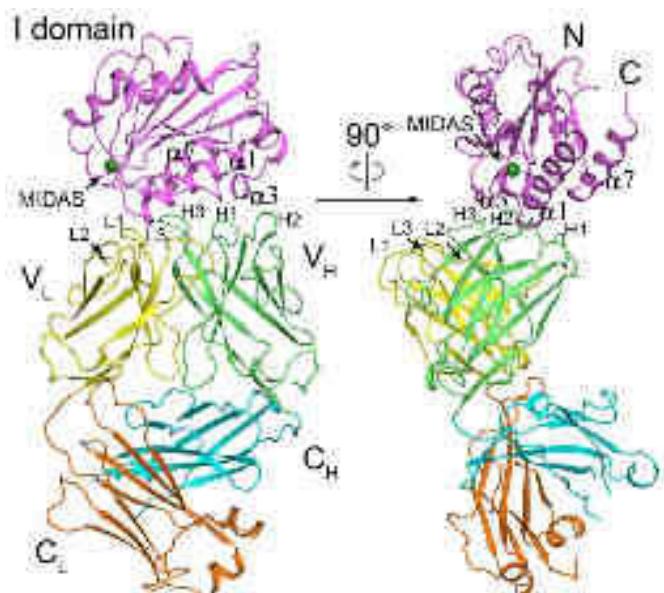
**Figure 10 Liaison des antagonistes RUC-1 et RUC-2 à l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3.**

A. et B. Liaison du RUC-2 (vert) dans le site de l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (bleu clair et beige respectivement), en présence des ions métallique (jaune), représentation de la densité électronique (A) du composé RUC-2 (orange) et des ions métalliques (bleu). C. Liaison du composé RUC-1 (vert) dans le site de l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (PDB 3NIF). D. Liaison du tirofiban (vert) dans le site de liaison de l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (PDB 2VDM). Tiré de (Zhu et al., 2012). E. Structure du composé UR-3216. F. Structure du composé UR-2922.

Des antagonistes allostériques de l'intégrine  $\alpha$ L $\beta$ 2 ont également été décrits. L'Efalizumab (Raptiva, Merck), un anticorps humanisé, se lie à un site proche du MIDAS, sur les hélices  $\alpha$ 1 et  $\alpha$ 7 bloquant l'intégrine dans une conformation inactive (Li et al., 2009), d'après les résultats de la structure cristallographique obtenue avec une partie de cet anticorps (Fab) et le domaine  $\alpha$ A de l'intégrine  $\alpha$ L $\beta$ 2 (Figure 11). Les auteurs concluent également à la présence d'un encombrement stérique, empêchant la liaison du

## I. Introduction

ligand. Il fut d'abord mis sur le marché en 2003 pour le traitement du psoriasis. Il fut ensuite retiré pour les mêmes raisons que le Natalizumab. Plusieurs antagonistes de l'intégrine  $\alpha$ L $\beta$ 2 ont été mis au point pour inhiber la conformation active de l'intégrine  $\alpha$ L $\beta$ 2 de la même manière que l'Efalizumab. C'est le cas de la molécule SAR-1118 (Lifitegrast, SARCode Corporation) utilisée contre la conjonctivite (Rao et al., 2010), ou encore le Cytolin (CytoDyn) un anticorps humanisé, en essai clinique pour le traitement du SIDA (Rychert et al., 2013).



**Figure 11 Structure cristallographique de l'Efalizumab lié au domaine  $\alpha$ A de l'intégrine  $\alpha$ L $\beta$ 2.**  
Structure cristallographique des domaines variables (V) et une partie des domaines constant (C) de la chaîne légère (L en jaune et orange) et de la chaîne lourde (H en vert et cyan) de l'Efalizumab en présence du domaine  $\alpha$ A (magenta) de l'intégrine  $\alpha$ L $\beta$ 2 tiré de (Li et al., 2009).

Cette stratégie semble porter ses fruits ; les premiers résultats sont encourageants. Ces antagonistes permettent de contrôler la conformation de l'intégrine ciblée, et donc de limiter l'effet potentiellement agoniste des molécules présentées dans la partie précédente.

### I.B.3. Régulateurs ne ciblant pas la liaison des intégrines à la matrice extracellulaire

Tous les antagonistes précédents inhibent la liaison de l'intégrine à son ligand endogène. Une dernière famille de composés n'inhibe pas cette liaison, voir l'active. Ils ont été sélectionnés pour leur capacité à agir sur la signalisation induite par les intégrines.

Le groupe du Dr DeGrado (Pennsylvanie, USA) a mis au point une méthode informatique (CHAMP) pour concevoir des peptides sélectifs du domaine transmembranaire des protéines ciblées (Caputo et al., 2008; Shandler et al., 2011; Yin et al., 2007). Dans le cas des intégrines, les peptides obtenus sont capables de différencier les intégrines  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 et  $\alpha$ V $\beta$ 3. Ces peptides se lient au domaine transmembranaire de la sous-unité  $\alpha$ IIb, inhibant la liaison avec le domaine transmembranaire de la sous-unité  $\beta$ 3 et permettant l'activation de l'intégrine. Ces peptides sont donc des antagonistes de l'interaction entre les parties cytoplasmiques de l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 et des agonistes de la liaison au fibrinogène. Ils activent l'agrégation plaquettaire.

Pour contrecarrer les problèmes dus à l'utilisation des antagonistes des intégrines possédant la sous-unité  $\alpha$ 4, le ciblage de la signalisation induite par ces intégrines est proposé (Kummer & Ginsberg, 2006), en particulier l'inhibition de la liaison entre la partie cytoplasmique de la sous-unité  $\alpha$ 4 et la paxilline, qui est un acteur indispensable dans l'induction de la migration par les intégrines  $\alpha$ 4. Récemment, un antagoniste de cette liaison a été décrit (Kummer et al., 2010). Il a été sélectionné par test ELISA permettant de mesurer l'inhibition de la liaison entre la paxilline et la partie cytoplasmique de l'intégrine  $\alpha$ 4. *In vitro*, il est capable d'inhiber la migration induite par les intégrines  $\alpha$ 4 et d'augmenter l'attachement des cellules au fragment CS-1 de la fibronectine, ligand spécifique des intégrines  $\alpha$ 4. La résolution de la structure de la partie cytoplasmique de la sous-unité  $\alpha$ 4 par RMN (Chua et al., 2013) ainsi que la prédiction *in silico* de son mode de liaison avec la paxilline devraient permettre l'amélioration de cette forme d'inhibiteur ayant un potentiel thérapeutique comme anti-inflammatoire.

## *I. Introduction*

Ces molécules sont des agonistes de la liaison de l'intégrine à son ligand endogène. Cependant, par leur liaison ils vont avoir un effet sur la signalisation induite par les intégrines qu'ils ciblent.

Prenant en compte les effets secondaires, observés en clinique, des composés des deux premières catégories, cette dernière famille est composée de peptides innovants qui ouvrent la voie vers une conception d'antagonistes d'intégrines capables de discriminer l'adhérence de l'intégrine à son ligand de son rôle dans la migration ou la survie des cellules.

L'ensemble des stratégies décrites est synthétisé dans la Figure 12.

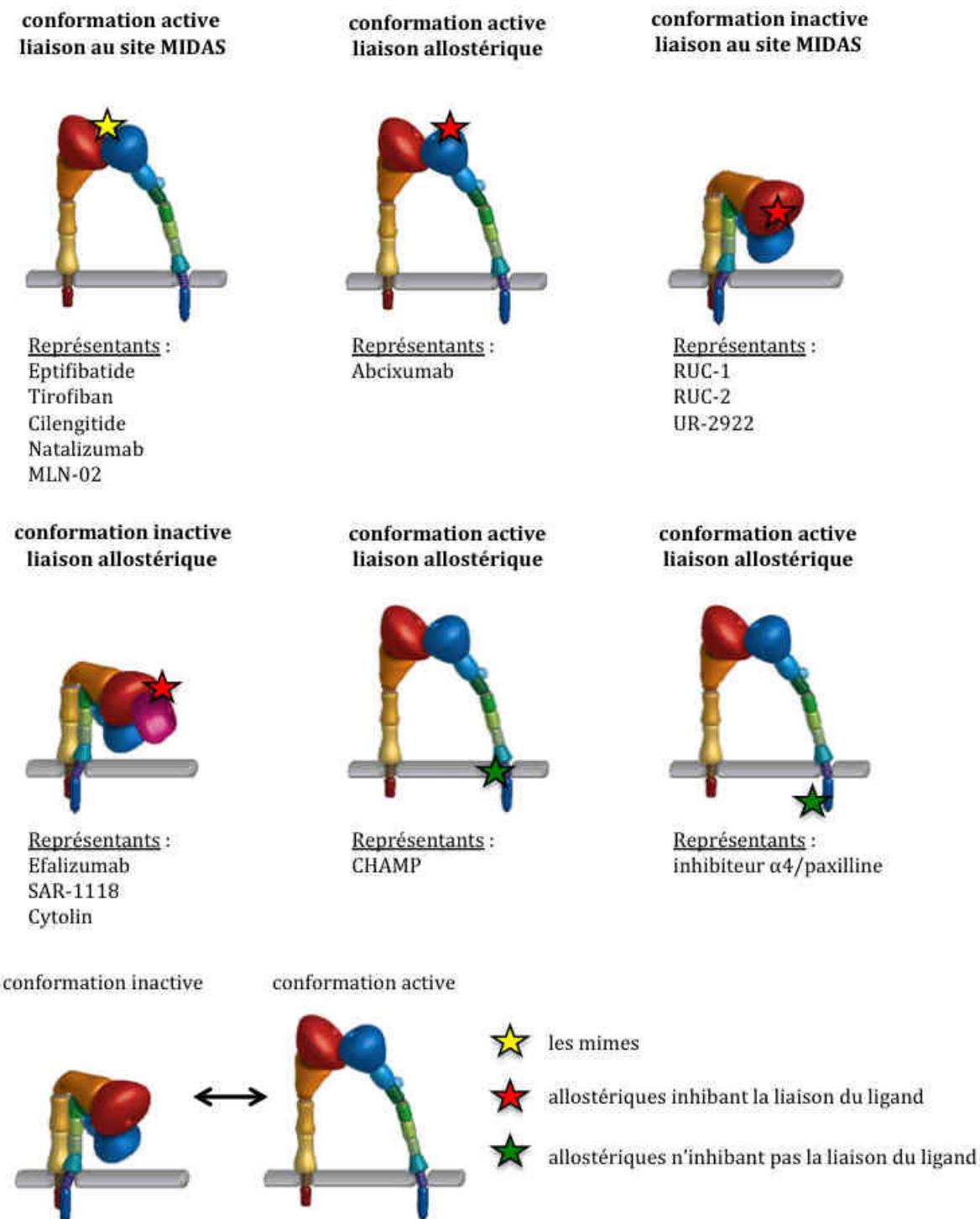


Figure 12 Les différentes stratégies des antagonistes d'intégrines.

## I.C. L'intégrine $\alpha 5\beta 1$

### I.C.1. L'intégrine $\alpha 5\beta 1$

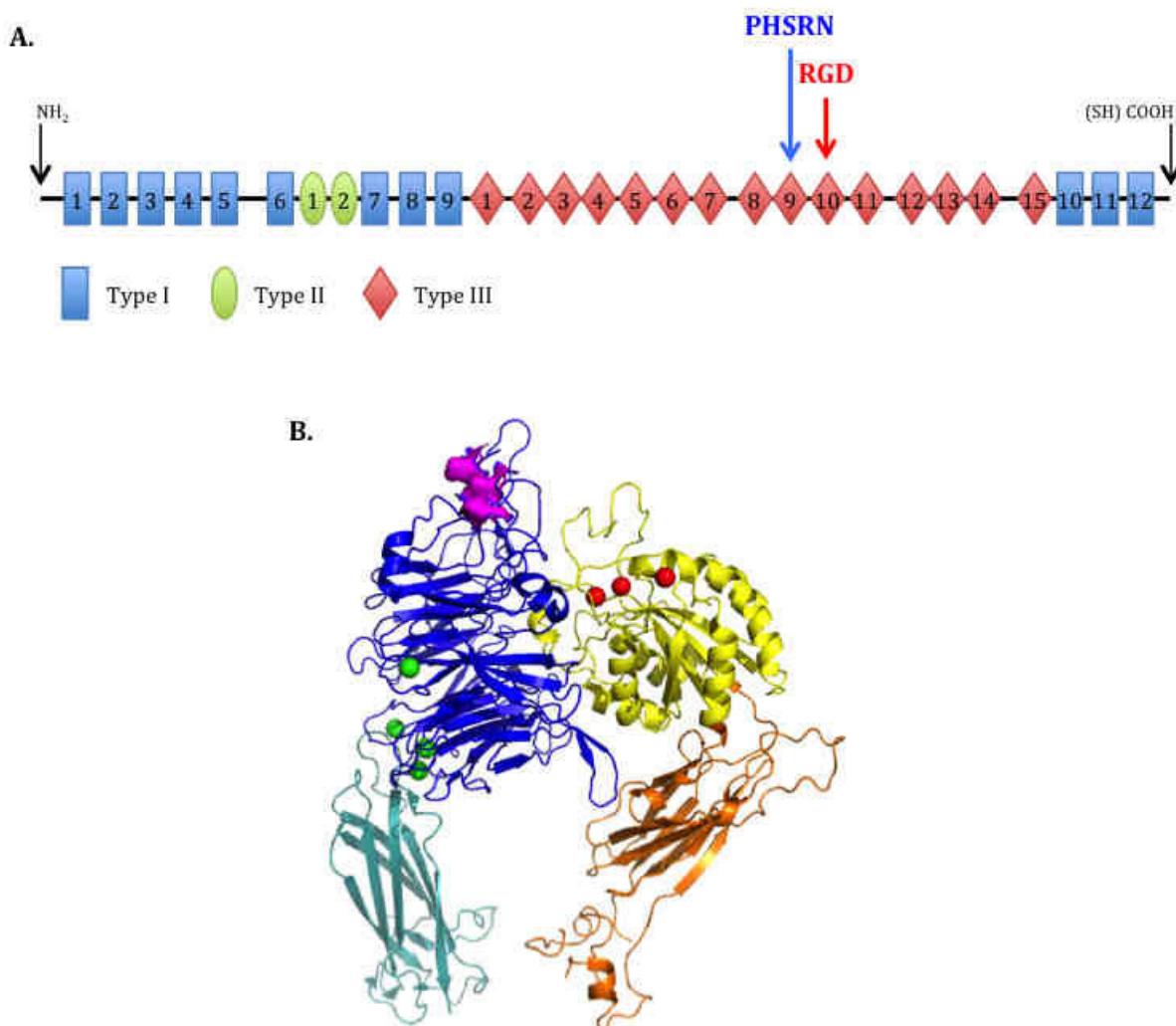
L'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  fait partie de la famille des intégrines qui reconnaissent la séquence RGD de leur ligand, la fibronectine dans son cas. Elle est souvent appelée le récepteur de la fibronectine.

La fibronectine est un dimère de deux protéines très similaires liées par deux ponts disulfures. Elle est constituée de trois unités répétées : douze unités de type I, deux unités de type II et entre quinze et dix sept unités de type III. Toutes les protéines qui constituent la fibronectine proviennent d'un même gène, leurs variations sont dues à un épissage alternatif (Figure 13A). Deux séquences peptidiques de la fibronectine permettent la liaison avec l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . La séquence RGD de la fibronectine, située sur la dixième unité de type III ( $\text{III}_{10}$ ), se lie à la poche comprenant le site MIDAS. La séquence synergique, PHSRN, située sur la neuvième unité de type III ( $\text{III}_9$ ), interagit avec les résidus E89, E124 et D154 situés à l'extrémité du domaine tonneau de la sous-unité  $\alpha 5$  (Figure 13B) (Nagae et al., 2012). L'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  est la seule intégrine à reconnaître ces deux séquences simultanément, ce qui lui permet de créer une liaison forte avec la fibronectine.

### I.C.2. L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ , cible thérapeutique contre le cancer

Depuis quelques années, les intégrines sont devenues des cibles attrayantes dans la recherche contre le cancer (Desgroiselle & Cheresh, 2010; Goodman & Picard, 2012). Elles sont des médiateurs du dialogue entre les cellules et leur environnement et donc des acteurs clefs dans différents aspects de la progression tumorale. En fonction du type tumoral, l'expression de certaines intégrines diffère entre les cellules tumorales et les cellules saines. La surexpression des intégrines dans les cellules cancéreuses influence la prolifération, la survie, la résistance aux thérapies et la récurrence tumorale. De plus, un rôle important dans l'angiogenèse est souligné pour plusieurs intégrines dont les intégrines  $\alpha V\beta 3$ ,  $\alpha V\beta 5$  et  $\alpha 5\beta 1$ . Leur surexpression dans les néo-vaisseaux pendant l'angiogenèse tumorale en a fait des candidats pour de nouvelles thérapies anti-angiogéniques (Avraamides et al., 2008).

Le rôle de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  dans les cancers a quelque peu été controversé. Certaines données la décrivaient comme un facteur pro-tumoral tandis que d'autres étaient en faveur d'un effet suppresseur de tumeurs. Ces dix dernières années, la relation entre l'expression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  dans les tumeurs et la faible survie des patients a été démontrée dans plusieurs cancers tel que ceux du colon, des ovaires, du sein, des poumons, le mélanome ou encore le glioblastome.



**Figure 13 Structure et liaison de la fibronectine sur l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ .**

**A.** Représentation linéaire de la structure d'une protéine de fibronectine constituée des différents domaines. Les positions des séquences RGD et synergique permettant la liaison avec l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  sont annotées. **B.** Représentation en ruban de la structure de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  (PDB 3VI3), le domaine tonneau de  $\alpha$  est représenté en bleu, le domaine thigh en cyan, le domaine  $\beta A$  en jaune, le domaine hybride en orange, les différents ions métalliques de la sous-unité  $\alpha 5$  en sphères vertes, les ions métalliques présents dans les sites MIDAS, ADMIDAS et SyMBS sont représentés en rouge, la surface permettant le contact avec le site synergique en rose.

### I.C.3. L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et l'angiogenèse

L'angiogenèse est un phénomène indispensable à la croissance tumorale, elle est régulée par les intégrines. Parmi toutes les intégrines, les sous-unités  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha V$  ou  $\beta 1$  sont décrites comme requises pour la vasculogenèse ou l'angiogenèse au cours du développement (Bader et al., 1998; Carlson et al., 2008; Yang et al., 1993). L'étude *in vivo* par délétions de gènes met en avant une importance de ces différentes intégrines dans l'angiogenèse. La délétion du gène de la sous-unité  $\alpha 5$  est létale pour les souris. Des études ont été menées sur la délétion conditionnelle du gène de la sous-unité  $\alpha 5$  dans les cellules endothéliales ou hématopoïétiques (Flier et al., 2010). Aucune n'est létale. Dans le cas du tissu endothérial, les intégrines  $\alpha V$  compensent l'absence de la sous-unité  $\alpha 5$ . La suppression des deux gènes  $\alpha 5$  et  $\alpha V$  dans les cellules endothéliales montre un développement anormal des vaisseaux et des problèmes cardiaques pour la plupart des embryons. Ces résultats montrent l'importance de chaque intégrine individuelle dans l'angiogenèse au cours du développement mais également qu'il existe une compensation par les autres intégrines. Les mécanismes de compensation peuvent jouer un rôle important et doivent être pris en considération lors de l'analyse des résultats des thérapies ciblant les intégrines.

L'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  est peu exprimée dans les vaisseaux matures, tandis qu'elle est surexprimée dans les vaisseaux tumoraux et les néo-vaisseaux de la cornée (Bussolati et al., 2003; Kim et al., 2000; Magnussen et al., 2005; Zhang et al., 2002). Le marquage de la sous-unité  $\alpha 5$  par un anticorps monoclonal spécifique dans différents modèles tumoraux murins montre une expression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  dans la lumière des vaisseaux tumoraux, donc accessible à des agents thérapeutiques (Parsons-Wingerter et al., 2005). L'expression de la sous-unité  $\alpha 5$  dans les cellules endothéliales angiogéniques permet la survie et bloque les signaux d'apoptose indépendamment de l'attachement des cellules à la matrice extracellulaire *in vitro* et *in vivo* (Kim et al., 2002). L'inhibition de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  par une molécule ou un anticorps induit un effet anti-angiogénique et réduit la taille des tumeurs. Ces effets sont obtenus par l'activation des voies de mort cellulaire induite par les intégrines (IMDP : integrin-mediated death pathway). Le rôle sans ambiguïté de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  dans l'angiogenèse en fait une cible de choix pour les thérapies anti-angiogéniques.

#### I.C.4. L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans les tumeurs solides

L'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  a un rôle controversé en tant que protéine pro- ou anti-tumoriale dans le cancer du colon. Ceci provient principalement de son étude dans la lignée cellulaire HT29. Certaines études montrent que l'expression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  est liée au caractère peu agressif dans cette lignée (O'Brien et al., 1996; Schmidt et al., 1998; Varner et al., 1995). Inversement, il a été montré que l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  était exprimée dans des cellules de cancer du colon peu différenciées, donc agressives (Gong et al., 1997), et qu'elle était liée à un faible pronostique vital (Murillo et al., 2004).

Tout comme dans le cancer du colon, les premières études de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  dans le cancer du sein la décrivent comme un facteur anti-tumoral (Seftor et al., 1998). Mais plusieurs autres études démontrent le caractère pro-invasif de cette intégrine (Jia et al., 2004; Maschler et al., 2005). Enfin, il a été montré que la radiothérapie de cellules du cancer du sein cultivées en 3D induit une augmentation de l'expression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . Le traitement de ces cellules par un antagoniste de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  déclenche l'apoptose (Nam et al., 2010).

Lors de l'étude de différentes cohortes de patientes, l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  s'est avérée être un marqueur pronostique du cancer des ovaires (Li Q. et al., 2010; Sawada et al., 2008). Cette intégrine régule la formation d'ensembles multicellulaires de carcinomes ovariens de type sphéroïdes, modèle *in vitro* de micro-métastases (Burleson et al., 2004). Une revue récente met en avant l'utilisation d'inhibiteurs de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  dans le traitement du cancer des ovaires (Sawada et al., 2012).

Dans le cas du cancer du poumon, la surexpression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  au niveau des ARNm et de la protéine est liée à une faible survie des patients (Dingemans et al., 2010; Han et al., 2003). L'étude de l'implication de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  et de son ligand, la fibronectine, dans la progression du cancer du poumon a fait l'objet d'une revue très complète (Caccavari et al., 2010).

L'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  est également décrite comme un acteur important dans la métastases des mélanomes (Arpaia et al., 2012; Qian et al., 2005).

Les glioblastomes sont les cancers cérébraux les plus agressifs. L'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  est exprimée à un plus fort taux dans ce cancer que dans le tissu cérébral environnant. Elle peut donc jouer un rôle dans le développement ou la progression des gliomes (Gingras et al., 1995). Le lien entre l'expression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  et l'agressivité des gliomes a été validé sur plusieurs cohortes de patients (Cosset et al., 2012; Holmes et al., 2012;

## I. Introduction

Janouskova et al., 2012). Un fort taux d'expression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  est donc lié à un faible pronostic vital pour les patients atteints d'un gliome de haut grade. Par l'utilisation d'antagonistes non peptidiques sélectifs de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , son rôle dans la prolifération, la migration, l'invasion et la résistance aux chimiothérapies a été mis en évidence dans des lignées de glioblastomes par des travaux au sein de notre équipe (Janouskova et al., 2012; Maglott et al., 2006; Martinkova et al., 2010).

### I.C.5. Les antagonistes de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ , généralités

La recherche d'antagonistes sélectifs de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  n'a cessé de croître ces dernières années, tant pour l'étude préclinique de l'implication de l'intégrine dans les pathologies que comme agents thérapeutiques en clinique (Goodman & Picard, 2012). Les derniers essais cliniques et leurs statuts sont répertoriés dans le Tableau 4. L'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  étant décrite comme une intégrine pro-angiogénique, ces antagonistes sont généralement présentés comme des agents potentiels anti-angiogéniques. Trois grandes classes d'antagonistes sont décrites : des anticorps spécifiques, des peptides, et des molécules non peptidiques qui miment la séquence RGD de la fibronectine.

Antagoniste	Clinique	Maladie testée	Combinaison	Statuts/Remarques
PF-046005412	Phase I	Tumeurs solides		balance risque/avantage négative
Volociximab	Phase II	Melanome stage IV		activité clinique insuffisante
	Phase II	Cancer pancréatique	Gemcitabine	Complétée
	Phase II	Cancer du rein		Stabilisation de la maladie
	Phase II	Cancer ovarien		Manque d'efficacité
	Phase II	Mélanome	Dacarbazine	Complétée
	Phase I/II	Cancer ovarien	doxorubicine	Complétée
	Phase I/II	NSCLC	Carboplatin, Paclitaxel	Complétée
	Phase I/II	NSCLC	Carboplatin, Paclitaxel, Bevacizumab	Complétée
ATN-161	Phase I	DMLA		Complétée
	Phase I/II	Gliomes	carboplatine	Complétée
	Phase II	Cancer du rein		Terminée
JSM6427	Phase I	DMLA		Terminée

**Tableau 4 Antagonistes de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  en essai clinique.**

Tableau récapitulatif des antagonistes de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  présents en essai cliniques, d'après les données de clinicaltrials.gov, complétée : l'étude s'est terminée comme prévue par le protocole de départ, terminée : l'étude a été stoppée et ne redémarrera pas, NSCLC : cancer du poumon à cellules « non petites », DMLA : dégénérescence maculaire liée à l'âge.

### I.C.6. Les anticorps ciblant l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ utilisés en thérapie

Deux anticorps spécifiques de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  sont utilisés pour les études précliniques et cliniques.

Le IIA1 est un anticorps murin inhibiteur de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  humaine. Il est utilisé pour des études précliniques (Nam et al., 2010; Sawada et al., 2008). Il est capable d'inhiber *in vitro* l'invasion de cellules tumorales du cancer ovarien cultivées dans du Matrigel et l'adhésion des cellules tumorales aux cellules mésothéliales. Il diminue le nombre et la taille des métastases intra-abdominales et augmente la survie des souris (Sawada et al., 2008). Cet anticorps induit également l'apoptose des cellules du cancer du sein cultivées dans des conditions 3D (Nam et al., 2010). A partir du IIA1, un anticorps humanisé a été mis au point appelé Volociximab (PDL Biopharma). Il a la même affinité que le IIA1 pour l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  humaine et une activité similaire pour bloquer l'adhésion à la fibronectine (Ramakrishnan et al., 2006). Le Volociximab inhibe *in vitro* l'angiogénèse des cellules fortement prolifératives par l'induction de l'apoptose mais n'a pas d'effet sur les cellules endothéliales dormantes. Il réduit la densité vasculaire et la croissance de carcinomes xenogreffés chez le lapin (Bhaskar et al., 2008; Ramakrishnan et al., 2006). Les premiers résultats du Volociximab en essais cliniques ont été publiés récemment (Almokadem & Belani, 2012). Le Volociximab se révèle non toxique et bien toléré dans les études de phase I (Besse et al., 2012; Ricart et al., 2008) chez les patients atteints de différentes tumeurs solides. Les effets secondaires reportés sont des effets gastro-intestinaux, maux de tête, œdème et hypertension. Malgré l'expression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  dans les monocytes, il n'y a pas de complications infectieuses apparentes observées. L'essai clinique de phase II, effectué sur des patients résistants au platinium atteints d'un cancer ovarien, a montré que l'administration hebdomadaire d'une monothérapie au Volociximab est bien tolérée sans pour autant montrer d'efficacité chez ces patients (Bell-McGuinn et al., 2011). Chez les patients résistants ou en rechute d'un cancer du rein, le Volociximab stabilise la maladie pour 80% d'entre eux.

Un autre anticorps spécifique de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  et développé par Pfizer est actuellement en phase I d'essai clinique sur des patients atteints de tumeurs solides résistantes aux thérapies classiques, le PF-04605412. Cet anticorps a été mis au point pour cibler l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  et restreindre la cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps (Li G. et al., 2010). Les études précliniques montrent la capacité de cet

## I. Introduction

anticorps à inhiber les voies de signalisation induites par l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , l'adhésion, la migration cellulaire ainsi que l'angiogenèse. Son efficacité sur la croissance tumorale est validée dans les études *in vivo* et corrélée à l'expression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  et à l'infiltration de macrophages et de cellules NK (natural killer cells) (Li Q. et al., 2010). D'après les résultats de l'essai clinique de phase I récemment obtenus, il semblerait que la balance risques/avantages n'est pas en faveur de l'utilisation de cet anticorps, pour lequel il n'y aura donc pas de poursuite d'étude.

### I.C.7. Les molécules mimes de la séquence RGD

Le motif RGD de la fibronectine est reconnu par au moins trois intégrines ciblées en clinique, les intégrines  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha V\beta 3$ ,  $\alpha IIb\beta 3$ . Le défi de ces dernières années a été de concevoir des antagonistes sélectifs de chacune de ces intégrines.

Le premier antagoniste non peptique sélectif de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  a été le SJ749 (Figure 14) (molécule 20 dans (Smallheer et al., 2004)). Cette molécule bloque efficacement l'adhérence à la fibronectine des cellules du carcinome du colon HT-29 qui expriment l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  mais pas l'adhérence aux autres protéines de la matrice extracellulaire. Il inhibe également les fonctions pro-angiogéniques de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  dans les modèles murins et d'embryons de poulet agissant ainsi comme un inhibiteur potentiel de la croissance tumorale et de l'angiogenèse induite par les tumeurs (Kim et al., 2000). Notre équipe a également décrit son activité inhibitrice *in vitro* de la prolifération des cellules de gliomes corrélée à l'expression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  (Maglott et al., 2006; Martin et al., 2009) et sa capacité à sensibiliser les cellules de gliomes à la chimiothérapie par la modulation de la voie de signalisation de la protéine p53 (Martinkova et al., 2010).

Il a également été utilisé dans des études *in silico* pour la conception du modèle de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  par homologie à la structure cristallographique de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  (Marinelli et al., 2005). A partir des caractéristiques du SJ749 et de la relation entre sa structure et son activité, des analogues du SJ749 (Marinelli et al., 2005) ainsi que des composés originaux (Heckmann et al., 2008; Heckmann et al., 2007; Meyer et al., 2006) ont pu être conçus par le groupe du Pr Kessler (Munich, Allemagne) et leurs affinités pour différentes intégrines ont pu être évaluées. Des composés sélectifs de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  ont ainsi été trouvés. Peu de données sur leurs activités biologiques sont décrites. Notre équipe a évalué les effets de l'un d'entre eux, le K34c (Figure 14) sur des lignées

cellulaires de glioblastomes. Nous avons montré que le K34c affectait la survie des cellules de glioblastomes ainsi que la résistance aux chimiothérapies (Cosset et al., 2012; Martinkova et al., 2010).

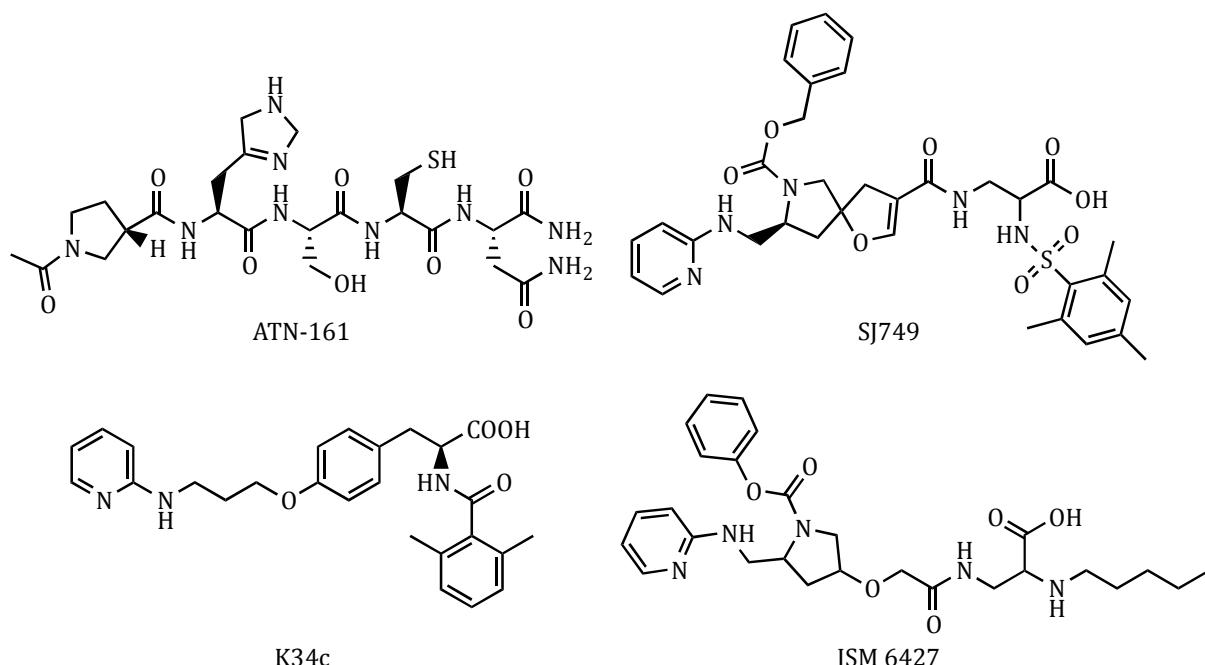
Le laboratoire Jerini AG (Berlin, Allemagne) a également décrit de nouveaux composés non peptidiques sélectifs de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  (Stragies et al., 2007). Ces molécules ont été testées sur des modèles pathologiques de néo-vascularisation pour lesquels l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  joue un rôle primordial (Muether et al., 2007; Okazaki et al., 2009; Umeda et al., 2006; Zahn et al., 2010; Zahn et al., 2009). L'un d'entre eux, le JSM6427 (Figure 14), atténue la croissance des gliomes (Okazaki et al., 2009). De nouveaux antagonistes de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  utilisables par voie orale ont été décrits par ce groupe pharmaceutique (Zischinsky et al., 2010a; Zischinsky et al., 2010b). D'autres molécules non peptidiques ont été synthétisées par AstraZeneca et montrent également une certaine sélectivité pour l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  par rapport à l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  (Delouvie et al., 2012a; Delouvie et al., 2012b).

### I.C.8. Les mimes de la séquence synergique

La séquence synergique PHSRN, permettant la liaison de la fibronectine à la l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , a également permis la conception d'un antagoniste peptidique sélectif de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , l'ATN-161 (Attenuon, USA) (Figure 14). Le peptide PHSRN induit l'invasion de cellules de cancer de la prostate par l'induction de MMP-1 (Livant et al., 2000a; Livant et al., 2000b) et stimule l'angiogenèse (Zeng et al., 2009). Cette dernière est inhibée par l'inhibiteur compétitif PHSCN. L'ATN-161 correspond à la séquence PHSCN acétylée et amidée (Livant et al., 2000b). Il est plus efficace que la séquence seule pour inhiber les effets du peptide PHSRN. Le traitement de tumeurs de la prostate par ATN-161 bloque la récurrence, la métastase et les micrométastases (Golen et al., 2002). Il réduit les métastases colorectales dans le foie et augmente la survie lorsqu'il est utilisé en association avec la chimiothérapie (Stoeltzing et al., 2003). Il inhibe la croissance et les métastases du cancer du sein (Khalili et al., 2006) dans des modèles murins précliniques. Cibler l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  par l'ATN-161 en combinaison avec une radiothérapie permet d'augmenter l'apoptose des cellules de cancer du sein cultivées en 3D (Nam et al., 2010). L'ATN-161 est également capable de bloquer la néo-vascularisation choroïdale (Wang et al., 2011). D'après les résultats de l'essai clinique de

## I. Introduction

phase I, l'ATN-161 est bien toléré par les patients atteints de tumeurs solides. Aucun effet secondaire n'apparaît ou n'empire lors de la prise continue et chronique de l'ATN-161 (Cianfrocca et al., 2006). Récemment, des dendrimères de la séquence PHSCN ont été synthétisés et montrent une efficacité supérieure à l'utilisation du monomère quant à l'inhibition *in vitro* de la sécrétion de la protéine MMP-1 induite par l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . Ils inhibent également l'invasion, l'extravasion et la métastase de cellules cancéreuses de la prostate (Yao et al., 2010). Des résultats similaires ont été obtenus pour les cellules du cancer du sein (Yao et al., 2011).



**Figure 14 Structure des antagonistes de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ .**

En conclusion, le rôle de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  dans l'angiogenèse normale au cours du développement est reconnu depuis 20 ans. La description de l'implication de cette intégrine dans la néoangiogénèse tumorale est plus récente. Tout récemment, elle a été décrite comme un marqueur pronostique et diagnostique dans plusieurs tumeurs solides. La relation entre la surexpression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  dans des sous populations de patient atteints de tumeurs solides et le faible pronostic vital pour ces patients suggère l'implication de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  dans la résistance aux thérapies conventionnelles. Comme décrit précédemment, l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  est impliquée dans différents aspects de la progression tumorale et apparaît particulièrement surexprimée dans les tumeurs de plus haut grade. La surexpression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  par les tumeurs est certainement dépendante du tissu duquel provient la tumeur. Peu d'antagonistes ont été caractérisés d'un point de vu fonctionnel mais certains sont inclus dans des essais cliniques. Les traitements ciblant l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  ne semblent pas induire d'effets délétères pour les patients dans les quelques essais cliniques réalisés. A ce jour, la recherche d'antagonistes de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  est en plein essor car les données résumées ici soulignent l'importance qu'elle peut avoir dans la thérapie des cancers. La résolution récente de la structure du domaine extracellulaire de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  va permettre de concevoir des antagonistes plus efficaces et plus sélectifs de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ .

## I.D. Objectifs de l'étude

L'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  est une cible thérapeutique de choix en cancérologie. Les travaux précédents du laboratoire ont plus particulièrement démontré l'implication de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  dans la prolifération et la résistance aux chimiothérapies des tumeurs cérébrales de type glioblastomes. Une stratégie thérapeutique incluant des antagonistes de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  serait donc pertinente pour le traitement de ces tumeurs.

Les échecs thérapeutiques du traitement des glioblastomes sont particulièrement dus à la capacité des cellules tumorales à envahir le tissu cérébral sain. La résection chirurgicale ne permet pas d'éradiquer la totalité de la tumeur et entraîne des récurrences tumorales. Inhiber la migration des cellules tumorales apparaît donc intéressant pour lutter contre ces tumeurs. D'après la littérature, l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  participe à la migration de différentes cellules tumorales. De même, les antagonistes de cette intégrine sont décrits comme des agents anti-migratoires et anti-métastatiques.

Dans ce contexte, les objectifs de ma thèse ont été les suivants :

- la caractérisation du rôle de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  dans la migration des cellules de glioblastomes humains,
- l'évaluation de la capacité d'antagonistes mimant la séquence RGD sur cette migration en fonction de leur sélectivité pour les intégrines  $\alpha 5\beta 1/\alpha V\beta 3$ ,
- la conception d'antagonistes originaux en se basant sur trois concepts : 1) l'identification d'un site de liaison allostérique au site de reconnaissance de la séquence RGD, 2) le criblage *in silico* de chimiothèques commerciales afin de proposer des molécules capables de se lier à ce site allostérique, 3) la validation des touches virtuelles au moyen d'un test fonctionnel *in vitro* basé sur la migration de cellules de glioblastomes.

## I.E. Bibliographie

- Adair, B. D., Xiong, J.-P., Maddock, C., Goodman, S. L., Arnaout, M. A., & Yeager, M. (2005) Three-dimensional EM structure of the ectodomain of integrin  $\{\alpha\}\beta\{3\}$  in a complex with fibronectin *J Cell Biol* 168, 1109-18.
- Adair, B. D. & Yeager, M. (2002) Three-dimensional model of the human platelet integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 based on electron cryomicroscopy and x-ray crystallography *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 14059-64.
- Almokadem, S. & Belani, C. P. (2012) Volociximab in cancer. *Expert Opin Biol Ther* 12, 251-257.
- Arnaout, M. A., Mahalingam, B., & Xiong, J.-P. (2005) Integrin structure, allosteric, and bidirectional signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 381-410.
- Arpaia, E., Blaser, H., Quintela-Fandino, M., Duncan, G., Leong, H. S., Ablack, A., Nambiar, S. C., Lind, E. F., Silvester, J., Fleming, C. K., Rufini, A., Tusche, M. W., Brüstle, A., Ohashi, P. S., Lewis, J. D., & Mak, T. W. (2012) The interaction between caveolin-1 and Rho-GTPases promotes metastasis by controlling the expression of  $\alpha$ 5-integrin and the activation of Src, Ras and Erk *Oncogene* 31, 884-96.
- Artoni, A., Li, J., Mitchell, B., Ruan, J., Takagi, J., Springer, T. A., French, D. L., & Coller, B. S. (2004) Integrin  $\beta$ 3 regions controlling binding of murine mAb 7E3: implications for the mechanism of integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 activation *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 13114-20.
- Avraamides, C. J., Garmy-Susini, B., & Varner, J. A. (2008) Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis *Nat Rev Cancer* 8, 604-17.
- Baba, K., Aga, Y., Nakanishi, T., Motoyama, T., & Ueno, H. (2001) UR-3216: a manageable oral GPIIb/IIIa antagonist *Cardiovasc Drug Rev* 19, 25-40.
- Bader, B. L., Rayburn, H., Crowley, D., & Hynes, R. O. (1998) Extensive vasculogenesis, angiogenesis, and organogenesis precede lethality in mice lacking all  $\alpha$  v integrins *Cell* 95, 507-19.
- Bell-McGuinn, K. M., Matthews, C. M., Ho, S. N., Barve, M., Gilbert, L., Penson, R. T., Lengyel, E., Palaparthi, R., Gilder, K., Vassos, A., McAuliffe, W., Weymer, S., Barton, J., & Schilder, R. J. (2011) A phase II, single-arm study of the anti- $\alpha$ 5 $\beta$ 1 integrin antibody volociximab as monotherapy in patients with platinum-resistant advanced epithelial ovarian or primary peritoneal cancer. *Gynecol Oncol* 121, 273-279.
- Besse, B., Tsao, L. C., Chao, D. T., Fang, Y., Soria, J.-C., Almokadem, S., & Belani, C. P. (2012) Phase Ib safety and pharmacokinetic study of volociximab, an anti- $\alpha$ 5 $\beta$ 1 integrin antibody, in combination with carboplatin and paclitaxel in advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* ,.
- Bhaskar, V., Fox, M., Breinberg, D., Wong, M. H.-L., Wales, P. E., Rhodes, S., DuBridge, R. B., & Ramakrishnan, V. (2008) Volociximab, a chimeric integrin  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 antibody, inhibits the growth of VX2 tumors in rabbits. *Invest New Drugs* 26, 7-12.
- Bhunia, A., Tang, X.-Y., Mohanram, H., Tan, S.-M., & Bhattacharjya, S. (2009) NMR solution conformations and interactions of integrin  $\alpha$ L $\beta$ 2 cytoplasmic tails *J Biol Chem* 284, 3873-84.

## I. Introduction

- Blue, R., Murcia, M., Karan, C., Jirousková, M., & Coller, B. S. (2008) Application of high-throughput screening to identify a novel  $\alpha$ IIb-specific small-molecule inhibitor of  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-mediated platelet interaction with fibrinogen *Blood* 111, 1248-56.
- Burleson, K. M., Casey, R. C., Skubitz, K. M., Pambuccian, S. E., Oegema, Jr, T. R., & Skubitz, A. P. N. (2004) Ovarian carcinoma ascites spheroids adhere to extracellular matrix components and mesothelial cell monolayers *Gynecol Oncol* 93, 170-81.
- Bussolati, B., Deambrosis, I., Russo, S., Deregibus, M. C., & Camussi, G. (2003) Altered angiogenesis and survival in human tumor-derived endothelial cells *FASEB J* 17, 1159-61.
- Byron, A., Humphries, J. D., Askari, J. a., Craig, S. E., Mould, a. P., & Humphries, M. J. (2009) {Anti-integrin monoclonal antibodies.} *J Cell Sci* 122, 4009-11.
- Caccavari, F., Valdembri, D., Sandri, C., Bussolino, F., & Serini, G. (2010) Integrin signaling and lung cancer *Cell Adhesion & Migration* 4, 124-129.
- Caputo, G. A., Litvinov, R. I., Li, W., Bennett, J. S., Degrado, W. F., & Yin, H. (2008) Computationally designed peptide inhibitors of protein-protein interactions in membranes *Biochemistry* 47, 8600-6.
- Carlson, T. R., Hu, H., Braren, R., Kim, Y. H., & Wang, R. A. (2008) Cell-autonomous requirement for  $\beta$ 1 integrin in endothelial cell adhesion, migration and survival during angiogenesis in mice *Development* 135, 2193-202.
- Chen, L. L., Whitty, A., Scott, D., Lee, W. C., Cornebise, M., Adams, S. P., Petter, R. C., Lobb, R. R., & Pepinsky, R. B. (2001) Evidence that ligand and metal ion binding to integrin  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 are regulated through a coupled equilibrium *J Biol Chem* 276, 36520-9.
- Chua, G.-L., Patra, A. T., Tan, S.-M., & Bhattacharjya, S. (2013) NMR structure of integrin  $\alpha$ 4 cytosolic tail and its interactions with paxillin *PLoS One* 8, e55184.
- Chua, G.-L., Tang, X.-Y., Amalraj, M., Tan, S.-M., & Bhattacharjya, S. (2011) Structures and interaction analyses of integrin  $\alpha$ M $\beta$ 2 cytoplasmic tails *J Biol Chem* 286, 43842-54.
- Chua, G.-L., Tang, X.-Y., Patra, A. T., Tan, S.-M., & Bhattacharjya, S. (2012) Structure and binding interface of the cytosolic tails of  $\alpha$ X $\beta$ 2 integrin *PLoS One* 7, e41924.
- Cianfrocca, M. E., Kimmel, K. A., Gallo, J., Cardoso, T., Brown, M. M., Hudes, G., Lewis, N., Weiner, L., Lam, G. N., Brown, S. C., Shaw, D. E., Mazar, A. P., & Cohen, R. B. (2006) Phase 1 trial of the antiangiogenic peptide ATN-161 (Ac-PHSCN-NH(2)), a  $\beta$  integrin antagonist, in patients with solid tumours. *Br J Cancer* 94, 1621-1626.
- Cosset, E. C., Godet, J., Entz-Werlé, N., Guérin, E., Guenot, D., Froelich, S., Bonnet, D., Pinel, S., Plenat, F., Chastagner, P., Dontenwill, M., & Martin, S. (2012) Involvement of the TGF $\beta$  pathway in the regulation of  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 integrins by caveolin-1 in human glioblastoma *Int J Cancer* 131, 601-611.
- Davenport, R. J. & Munday, J. R. (2007) A4-integrin antagonism-an effective approach for the treatment of inflammatory diseases? *Drug Discov Today* 12, 569-76.
- Dechantsreiter, M. A., Planker, E., Mathä, B., Lohof, E., Hölzemann, G., Jonczyk, A., Goodman, S. L., & Kessler, H. (1999) N-Methylated cyclic RGD peptides as highly active and selective  $\alpha$ (V) $\beta$ (3) integrin antagonists *J Med Chem* 42, 3033-40.

Delouvrie, B., Al-Kadhimi, K., Arnould, J.-C., Barry, S. T., Cross, D. A. E., Didelot, M., Gavine, P. R., Germain, H., Harris, C. S., Hughes, A. M., Jude, D. A., Kendrew, J., Lambert-van der Brempt, C., Lohmann, J.-J., Menard, M., Mortlock, A. A., Pass, M., Rooney, C., Vautier, M., Vincent, J. L., & Warin, N. (2012a) Structure-activity relationship of a series of non peptidic RGD integrin antagonists targeting  $\alpha 5\beta 1$ : part 1. *Bioorg Med Chem Lett* 22, 4111-4116.

Delouvrie, B., Al-Kadhimi, K., Arnould, J.-C., Barry, S. T., Cross, D. A. E., Didelot, M., Gavine, P. R., Germain, H., Harris, C. S., Hughes, A. M., Jude, D. A., Kendrew, J., Lambert-van der Brempt, C., Lohmann, J.-J., Menard, M., Mortlock, A. A., Pass, M., Rooney, C., Vautier, M., Vincent, J. L., & Warin, N. (2012b) Structure-activity relationship of a series of non peptidic RGD integrin antagonists targeting  $\alpha 5\beta 1$ : part 2. *Bioorg Med Chem Lett* 22, 4117-4121.

Desgrosellier, J. S. & Cheresh, D. A. (2010) Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 10, 9-22.

Dingemans, A.-M. C., van den Boogaart, V., Vosse, B. A., van Suylen, R.-J., Griffioen, A. W., & Thijssen, V. L. (2010) Integrin expression profiling identifies integrin  $\alpha 5$  and  $\beta 1$  as prognostic factors in early stage non-small cell lung cancer *Mol Cancer* 9, 152.

Giancotti, F. G. & Ruoslahti, E. (1999) Integrin signaling *Science* 285, 1028-32.

Gingras, M. C., Roussel, E., Bruner, J. M., Branch, C. D., & Moser, R. P. (1995) Comparison of cell adhesion molecule expression between glioblastoma multiforme and autologous normal brain tissue *J Neuroimmunol* 57, 143-53.

Gong, J., Wang, D., Sun, L., Zborowska, E., Willson, J. K., & Brattain, M. G. (1997) Role of  $\alpha 5\beta 1$  integrin in determining malignant properties of colon carcinoma cells *Cell Growth Differ* 8, 83-90.

Goodman, S. L. & Picard, M. (2012) Integrins as therapeutic targets. *Trends Pharmacol Sci* 33, 405-412.

Goswami, R. K., Liu, Y., Liu, C., Lerner, R. A., & Sinha, S. C. (2013) Synthesis and evaluation of the aldolase antibody-derived chemical-antibodies targeting  $\alpha 5\beta 1$  integrin *Mol Pharm* 10, 538-43.

Han, J. Y., Kim, H. S., Lee, S. H., Park, W. S., Lee, J. Y., & Yoo, N. J. (2003) Immunohistochemical expression of integrins and extracellular matrix proteins in non-small cell lung cancer: correlation with lymph node metastasis *Lung Cancer* 41, 65-70.

Harburger, D. S., Bouaouina, M., & Calderwood, D. A. (2009) Kindlin-1 and -2 directly bind the C-terminal region of  $\beta$  integrin cytoplasmic tails and exert integrin-specific activation effects *J Biol Chem* 284, 11485-97.

Heckmann, D. & Kessler, H. (2007) Design and chemical synthesis of integrin ligands. *Methods Enzymol* 426, 463-503.

Heckmann, D., Meyer, A., Laufer, B., Zahn, G., Stragies, R., & Kessler, H. (2008) Rational design of highly active and selective ligands for the  $\alpha 5\beta 1$  integrin receptor. *Chembiochem* 9, 1397-1407.

Heckmann, D., Meyer, A., Marinelli, L., Zahn, G., Stragies, R., & Kessler, H. (2007) Probing integrin selectivity: rational design of highly active and selective ligands for the  $\alpha 5\beta 1$  and  $\alpha v\beta 3$  integrin receptor. *Angew Chem Int Ed Engl* 46, 3571-3574.

## I. Introduction

Holmes, K. M., Annala, M., Chua, C. Y. X., Dunlap, S. M., Liu, Y., Hugen, N., Moore, L. M., Cogdell, D., Hu, L., Nykter, M., Hess, K., Fuller, G. N., & Zhang, W. (2012) Insulin-like growth factor-binding protein 2-driven glioma progression is prevented by blocking a clinically significant integrin, integrin-linked kinase, and NF- $\kappa$ B network *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 3475-80.

Hynes, R. O. (1987) Integrins: a family of cell surface receptors *Cell* 48, 549-54.

Hynes, R. O. (1992) Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion *Cell* 69, 11-25.

Hynes, R. O. (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110, 673-687.

Janouskova, H., Maglott, A., Leger, D. Y., Bossert, C., Noulet, F., Guerin, E., Guenot, D., Pinel, S., Chastagner, P., Plenat, F., Entz-Werle, N., Lehmann-Che, J., Godet, J., Martin, S., Teisinger, J., & Dontenwill, M. (2012) Integrin  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 plays a critical role in resistance to temozolomide by interfering with the p53 pathway in high-grade glioma. *Cancer Res* 72, 3463-3470.

Jia, Y., Zeng, Z.-Z., Markwart, S. M., Rockwood, K. F., Ignatoski, K. M. W., Ethier, S. P., & Livant, D. L. (2004) Integrin fibronectin receptors in matrix metalloproteinase-1-dependent invasion by breast cancer and mammary epithelial cells *Cancer Res* 64, 8674-81.

Kassner, P. D., Alon, R., Springer, T. A., & Hemler, M. E. (1995) Specialized functional properties of the integrin  $\alpha$ 4 cytoplasmic domain *Mol Biol Cell* 6, 661-74.

Khalili, P., Arakelian, A., Chen, G., Plunkett, M. L., Beck, I., Parry, G. C., Donate, F., Shaw, D. E., Mazar, A. P., & Rabbani, S. A. (2006) A non-RGD-based integrin binding peptide (ATN-161) blocks breast cancer growth and metastasis in vivo. *Mol Cancer Ther* 5, 2271-2280.

Kiema, T., Lad, Y., Jiang, P., Oxley, C. L., Baldassarre, M., Wegener, K. L., Campbell, I. D., Yläne, J., & Calderwood, D. A. (2006) The molecular basis of filamin binding to integrins and competition with talin *Mol Cell* 21, 337-47.

Kim, M., Carman, C. V., & Springer, T. A. (2003) Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins *Science* 301, 1720-5.

Kim, S., Bakre, M., Yin, H., & Varner, J. A. (2002) Inhibition of endothelial cell survival and angiogenesis by protein kinase A *J Clin Invest* 110, 933-41.

Kim, S., Bell, K., Mousa, S. A., & Varner, J. A. (2000) Regulation of angiogenesis in vivo by ligation of integrin  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 with the central cell-binding domain of fibronectin *Am J Pathol* 156, 1345-62.

Knappe, T. A., Manzenrieder, F., Mas-Moruno, C., Linne, U., Sasse, F., Kessler, H., Xie, X., & Marahiel, M. A. (2011) Introducing lasso peptides as molecular scaffolds for drug design: engineering of an integrin antagonist. *Angew Chem Int Ed Engl* 50, 8714-8717.

Kummer, C. & Ginsberg, M. H. (2006) New approaches to blockade of  $\alpha$ 4-integrins, proven therapeutic targets in chronic inflammation *Biochem Pharmacol* 72, 1460-8.

Kummer, C., Petrich, B. G., Rose, D. M., & Ginsberg, M. H. (2010) A small molecule

that inhibits the interaction of paxillin and  $\alpha$  4 integrin inhibits accumulation of mononuclear leukocytes at a site of inflammation *J Biol Chem* 285, 9462-9.

Lai, C., Liu, X., Tian, C., & Wu, F. (2013) Integrin  $\alpha$ 1 has a long helix, extending from the transmembrane region to the cytoplasmic tail in detergent micelles *PLoS One* 8, e62954.

Lau, T.-L., Dua, V., & Ulmer, T. S. (2008a) Structure of the integrin  $\alpha$ IIb transmembrane segment *J Biol Chem* 283, 16162-8.

Lau, T.-L., Kim, C., Ginsberg, M. H., & Ulmer, T. S. (2009) The structure of the integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 transmembrane complex explains integrin transmembrane signalling *EMBO J* 28, 1351-61.

Lau, T.-L., Partridge, A. W., Ginsberg, M. H., & Ulmer, T. S. (2008b) Structure of the integrin  $\beta$ 3 transmembrane segment in phospholipid bicelles and detergent micelles *Biochemistry* 47, 4008-16.

Lee, J. O., Bankston, L. A., Arnaout, M. A., & Liddington, R. C. (1995a) Two conformations of the integrin A-domain (I-domain): a pathway for activation? *Structure* 3, 1333-1340.

Lee, J. O., Rieu, P., Arnaout, M. A., & Liddington, R. (1995b) Crystal structure of the A domain from the  $\alpha$  subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18). *Cell* 80, 631-638.

Li, G., Zhang, L., Chen, E., Wang, J., Jiang, X., Chen, J. H., Wickman, G., Amundson, K., Bergqvist, S., Zobel, J., Buckman, D., Baxi, S. M., Bender, S. L., Casperson, G. F., & Hu-Lowe, D. D. (2010a) Dual functional monoclonal antibody PF-04605412 targets integrin  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 and elicits potent antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Cancer Res* 70, 10243-10254.

Li, Q., Liu, S., Lin, B., Yan, L., Wang, Y., Wang, C., & Zhang, S. (2010b) Expression and correlation of Lewis y antigen and integrins  $\alpha$ 5 and  $\beta$ 1 in ovarian serous and mucinous carcinoma *Int J Gynecol Cancer* 20, 1482-9.

Li, R., Babu, C. R., Lear, J. D., Wand, A. J., Bennett, J. S., & DeGrado, W. F. (2001) Oligomerization of the integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3: roles of the transmembrane and cytoplasmic domains *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 12462-7.

Li, S., Wang, H., Peng, B., Zhang, M., Zhang, D., Hou, S., Guo, Y., & Ding, J. (2009) Efalizumab binding to the LFA-1  $\alpha$ L I domain blocks ICAM-1 binding via steric hindrance *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 4349-54.

Liu, S., Calderwood, D. A., & Ginsberg, M. H. (2000) Integrin cytoplasmic domain-binding proteins *J Cell Sci* 113 ( Pt 20), 3563-71.

Livant, D. L., Brabec, R. K., Kurachi, K., Allen, D. L., Wu, Y., Haaseth, R., Andrews, P., Ethier, S. P., & Markwart, S. (2000a) The PHSRN sequence induces extracellular matrix invasion and accelerates wound healing in obese diabetic mice *J Clin Invest* 105, 1537-45.

Livant, D. L., Brabec, R. K., Pienta, K. J., Allen, D. L., Kurachi, K., Markwart, S., & Upadhyaya, A. (2000b) Anti-invasive, antitumorigenic, and antimetastatic activities of the PHSCN sequence in prostate carcinoma *Cancer Res* 60, 309-20.

Luo, B.-H., Carman, C. V., & Springer, T. A. (2007) Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol* 25, 619-647.

## I. Introduction

- Maglott, A., Bartik, P., Cosgun, S., Klotz, P., Ronde, P., Fuhrmann, G., Takeda, K., Martin, S., & Dontenwill, M. (2006) The small  $\alpha 5\beta 1$  integrin antagonist, SJ749, reduces proliferation and clonogenicity of human astrocytoma cells. *Cancer Res* 66, 6002-6007.
- Magnussen, A., Kasman, I. M., Norberg, S., Baluk, P., Murray, R., & McDonald, D. M. (2005) Rapid access of antibodies to  $\alpha 5\beta 1$  integrin overexpressed on the luminal surface of tumor blood vessels *Cancer Res* 65, 2712-21.
- Marinelli, L., Lavecchia, A., Gottschalk, K.-E., Novellino, E., & Kessler, H. (2003) Docking studies on  $\alpha v\beta 3$  integrin ligands: pharmacophore refinement and implications for drug design. *J Med Chem* 46, 4393-4404.
- Marinelli, L., Meyer, A., Heckmann, D., Lavecchia, A., Novellino, E., & Kessler, H. (2005) Ligand binding analysis for human  $\alpha 5\beta 1$  integrin: strategies for designing new  $\alpha 5\beta 1$  integrin antagonists. *J Med Chem* 48, 4204-4207.
- Martin, S., Cosset, E. C., Terrand, J., Maglott, A., Takeda, K., & Dontenwill, M. (2009) Caveolin-1 regulates glioblastoma aggressiveness through the control of  $\alpha(5)\beta(1)$  integrin expression and modulates glioblastoma responsiveness to SJ749, an  $\alpha(5)\beta(1)$  integrin antagonist. *Biochim Biophys Acta* 1793, 354-367.
- Martinkova, E., Maglott, A., Leger, D. Y., Bonnet, D., Stiborova, M., Takeda, K., Martin, S., & Dontenwill, M. (2010)  $\alpha 5\beta 1$  integrin antagonists reduce chemotherapy-induced premature senescence and facilitate apoptosis in human glioblastoma cells. *Int J Cancer* 127, 1240-1248.
- Maschler, S., Wirl, G., Spring, H., Bredow, D. V., Sordat, I., Beug, H., & Reichmann, E. (2005) Tumor cell invasiveness correlates with changes in integrin expression and localization *Oncogene* 24, 2032-41.
- Meyer, A., Auernheimer, J., Modlinger, A., & Kessler, H. (2006) Targeting RGD recognizing integrins: drug development, biomaterial research, tumor imaging and targeting. *Curr Pharm Des* 12, 2723-2747.
- Mitchell, W. B., Li, J. H., Singh, F., Michelson, A. D., Bussel, J., Coller, B. S., & French, D. L. (2003) Two novel mutations in the  $\alpha$  IIb calcium-binding domains identify hydrophobic regions essential for  $\alpha$  IIb $\beta$  3 biogenesis *Blood* 101, 2268-76.
- Mitra, S. K., Hanson, D. A., & Schlaepfer, D. D. (2005) Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 56-68.
- Mould, A. P., Akiyama, S. K., & Humphries, M. J. (1995) Regulation of integrin  $\alpha 5\beta 1$ -fibronectin interactions by divalent cations. Evidence for distinct classes of binding sites for Mn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, and Ca<sup>2+</sup> *J Biol Chem* 270, 26270-7.
- Muether, P. S., Dell, S., Kociok, N., Zahn, G., Stragies, R., Vossmeyer, D., & Joussen, A. M. (2007) The role of integrin  $\alpha 5\beta 1$  in the regulation of corneal neovascularization. *Exp Eye Res* 85, 356-365.
- Murillo, C. A., Rychahou, P. G., & Evers, B. M. (2004) Inhibition of  $\alpha 5$  integrin decreases PI3K activation and cell adhesion of human colon cancers *Surgery* 136, 143-9.
- Nagae, M., Re, S., Mihara, E., Nogi, T., Sugita, Y., & Takagi, J. (2012) Crystal structure of  $\alpha 5\beta 1$  integrin ectodomain: atomic details of the fibronectin receptor. *J Cell Biol* 197, 131-140.

- Nam, J.-M., Onodera, Y., Bissell, M. J., & Park, C. C. (2010) Breast cancer cells in three-dimensional culture display an enhanced radioresponse after coordinate targeting of integrin  $\alpha 5\beta 1$  and fibronectin. *Cancer Res* 70, 5238-5248.
- O'Brien, V., Frisch, S. M., & Juliano, R. L. (1996) Expression of the integrin  $\alpha 5$  subunit in HT29 colon carcinoma cells suppresses apoptosis triggered by serum deprivation. *Exp Cell Res* 224, 208-13.
- Okazaki, T., Ni, A., Ayeni, O. A., Baluk, P., Yao, L.-C., Vossmeyer, D., Zischinsky, G., Zahn, G., Knolle, J., Christner, C., & McDonald, D. M. (2009)  $\alpha 5\beta 1$  Integrin blockade inhibits lymphangiogenesis in airway inflammation. *Am J Pathol* 174, 2378-2387.
- Onley, D. J., Knight, C. G., Tuckwell, D. S., Barnes, M. J., & Farndale, R. W. (2000) Micromolar  $Ca^{2+}$  concentrations are essential for  $Mg^{2+}$ -dependent binding of collagen by the integrin  $\alpha 2\beta 1$  in human platelets. *J Biol Chem* 275, 24560-4.
- Parsons-Wingerter, P., Kasman, I. M., Norberg, S., Magnussen, A., Zanivan, S., Rissone, A., Baluk, P., Favre, C. J., Jeffry, U., Murray, R., & McDonald, D. M. (2005) Uniform overexpression and rapid accessibility of  $\alpha 5\beta 1$  integrin on blood vessels in tumors. *Am J Pathol* 167, 193-211.
- Partridge, A. W., Liu, S., Kim, S., Bowie, J. U., & Ginsberg, M. H. (2005) Transmembrane domain helix packing stabilizes integrin  $\alpha IIb\beta 3$  in the low affinity state. *J Biol Chem* 280, 7294-300.
- Peter, K., Schwarz, M., Nordt, T., & Bode, C. (2001) Intrinsic activating properties of GP IIb/IIIa blockers. *Thromb Res* 103 Suppl 1, S21-7.
- Plow, E. F., Haas, T. A., Zhang, L., Loftus, J., & Smith, J. W. (2000) Ligand binding to integrins. *J Biol Chem* 275, 21785-8.
- Qian, F., Zhang, Z.-C., Wu, X.-F., Li, Y.-P., & Xu, Q. (2005) Interaction between integrin  $\alpha(5)$  and fibronectin is required for metastasis of B16F10 melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 333, 1269-75.
- Raboisson, P., Desjarlais, R. L., Reed, R., Lattanze, J., Chaikin, M., Manthey, C. L., Tomczuk, B. E., & Marugán, J. J. (2007) Identification of novel short chain 4-substituted indoles as potent  $\alpha v\beta 3$  antagonist using structure-based drug design. *Eur J Med Chem* 42, 334-43.
- Raboisson, P., Manthey, C. L., Chaikin, M., Lattanze, J., Crysler, C., Leonard, K., Pan, W., Tomczuk, B. E., & Marugán, J. J. (2006) Novel potent and selective  $\alpha v\beta 3/\alpha v\beta 5$  integrin dual antagonists with reduced binding affinity for human serum albumin. *Eur J Med Chem* 41, 847-61.
- Ramakrishnan, V., Bhaskar, V., Law, D. A., Wong, M. H. L., DuBridge, R. B., Breinberg, D., O'Hara, C., Powers, D. B., Liu, G., Grove, J., Hevezi, P., Cass, K. M., Watson, S., Evangelista, F., Powers, R. A., Finck, B., Wills, M., Caras, I., Fang, Y., McDonald, D., Johnson, D., Murray, R., & Jeffry, U. (2006) Preclinical evaluation of an anti- $\alpha 5\beta 1$  integrin antibody as a novel anti-angiogenic agent. *J Exp Ther Oncol* 5, 273-286.
- Rao, V. R., Prescott, E., Shelke, N. B., Trivedi, R., Thomas, P., Struble, C., Gadek, T., O'Neill, C. A., & Kompella, U. B. (2010) Delivery of SAR 1118 to the retina via ophthalmic drops and its effectiveness in a rat streptozotocin (STZ) model of diabetic retinopathy (DR). *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51, 5198-204.

## I. Introduction

Rerat, V., Dive, G., Cordi, A. A., Tucker, G. C., Bareille, R., Amédée, J., Bordenave, L., & Marchand-Brynaert, J. (2009)  $\alpha\text{v}\beta 3$  Integrin-targeting Arg-Gly-Asp (RGD) peptidomimetics containing oligoethylene glycol (OEG) spacers *J Med Chem* 52, 7029-43.

Ricart, A. D., Tolcher, A. W., Liu, G., Holen, K., Schwartz, G., Albertini, M., Weiss, G., Yazji, S., Ng, C., & Wilding, G. (2008) Volociximab, a chimeric monoclonal antibody that specifically binds  $\alpha 5\beta 1$  integrin: a phase I, pharmacokinetic, and biological correlative study. *Clin Cancer Res* 14, 7924-7929.

Rychert, J., Jones, L., McGrath, G., Bazner, S., & Rosenberg, E. S. (2013) A monoclonal antibody against lymphocyte function-associated antigen-1 decreases HIV-1 replication by inducing the secretion of an antiviral soluble factor *Virol J* 10, 120.

Sawada, K., Mitra, A. K., Radjabi, A. R., Bhaskar, V., Kistner, E. O., Tretiakova, M., Jagadeeswaran, S., Montag, A., Becker, A., Kenny, H. A., Peter, M. E., Ramakrishnan, V., Yamada, S. D., & Lengyel, E. (2008) Loss of E-cadherin promotes ovarian cancer metastasis via  $\alpha 5$ -integrin, which is a therapeutic target *Cancer Res* 68, 2329-39.

Sawada, K., Ohyagi-Hara, C., Kimura, T., & Morishige, K.-I. (2012) Integrin inhibitors as a therapeutic agent for ovarian cancer *J Oncol* 2012, 915140.

Schaffner, F., Ray, A. M., & Dontenwill, M. (2013) Integrin  $\alpha 5\beta 1$ , the Fibronectin Receptor, as a Pertinent Therapeutic Target in Solid Tumors *Cancers* 5, 27-47.

Schmidt, R., Streit, M., Kaiser, R., Herzberg, F., Schirner, M., Schramm, K., Kaufmann, C., Henneken, M., Schäfer-Korting, M., Thiel, E., & Kreuser, E. D. (1998) De novo expression of the  $\alpha 5\beta 1$ -fibronectin receptor in HT29 colon-cancer cells reduces activity of C-SRC. Increase of C-SRC activity by attachment on fibronectin *Int J Cancer* 76, 91-8.

Seftor, R. E., Seftor, E. A., Sheng, S., Pemberton, P. A., Sager, R., & Hendrix, M. J. (1998) maspin suppresses the invasive phenotype of human breast carcinoma *Cancer Res* 58, 5681-5.

Shandler, S. J., Korendovych, I. V., Moore, D. T., Smith-Dupont, K. B., Streu, C. N., Litvinov, R. I., Billings, P. C., Gai, F., Bennett, J. S., & DeGrado, W. F. (2011) Computational design of a  $\beta$ -peptide that targets transmembrane helices *J Am Chem Soc* 133, 12378-81.

Shimaoka, M., Xiao, T., Liu, J.-H., Yang, Y., Dong, Y., Jun, C.-D., McCormack, A., Zhang, R., Joachimiak, A., Takagi, J., Wang, J.-H., & Springer, T. A. (2003) Structures of the  $\alpha$  L I domain and its complex with ICAM-1 reveal a shape-shifting pathway for integrin regulation *Cell* 112, 99-111.

Smallheer, J. M., Weigelt, C. A., Woerner, F. J., Wells, J. S., Daneker, W. F., Mousa, S. A., Wexler, R. R., & Jadhav, P. K. (2004) Synthesis and biological evaluation of nonpeptide integrin antagonists containing spirocyclic scaffolds *Bioorg Med Chem Lett* 14, 383-7.

Soler, D., Chapman, T., Yang, L.-L., Wyant, T., Egan, R., & Fedyk, E. R. (2009) The binding specificity and selective antagonism of vedolizumab, an anti- $\alpha 4\beta 7$  integrin therapeutic antibody in development for inflammatory bowel diseases *J Pharmacol Exp Ther* 330, 864-75.

Stoeltzing, O., W., L., N., R., Fan, F., Parry, G. C., Parikh, A. A., McCarty, M. F., Bucana, C. D., Mazar, A. P., & Ellis, L. M. (2003) Inhibition of integrin  $\alpha 5\beta 1$  function with a small peptide (ATN-161) plus continuous 5-fu infusion reduces colorectal liver metastases

and improves survival in mice *International Journal of Cancer* 104, 496-503.

Stragies, R., Osterkamp, F., Zischinsky, G., Vossmeyer, D., Kalkhof, H., Reimer, U., & Zahn, G. (2007) Design and synthesis of a new class of selective integrin  $\alpha 5\beta 1$  antagonists. *J Med Chem* 50, 3786-3794.

Takagi, J., Petre, B. M., Walz, T., & Springer, T. A. (2002) Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell* 110, 599-511.

Takagi, J., Strokovich, K., Springer, T. A., & Walz, T. (2003) Structure of integrin  $\alpha 5\beta 1$  in complex with fibronectin. *EMBO J* 22, 4607-4615.

Ulmer, T. S., Yaspan, B., Ginsberg, M. H., & Campbell, I. D. (2001) NMR analysis of structure and dynamics of the cytosolic tails of integrin  $\alpha IIb \beta 3$  in aqueous solution *Biochemistry* 40, 7498-508.

Umeda, N., Kachi, S., Akiyama, H., Zahn, G., Vossmeyer, D., Stragies, R., & Campochiaro, P. A. (2006) Suppression and regression of choroidal neovascularization by systemic administration of an  $\alpha 5\beta 1$  integrin antagonist. *Mol Pharmacol* 69, 1820-1828.

Valdramidou, D., Humphries, M. J., & Mould, A. P. (2008) Distinct roles of  $\beta 1$  metal ion-dependent adhesion site (MIDAS), adjacent to MIDAS (ADMIDAS), and ligand-associated metal-binding site (LIMBS) cation-binding sites in ligand recognition by integrin  $\alpha 2\beta 1$ . *J Biol Chem* 283, 32704-14.

Varner, J. A., Emerson, D. A., & Juliano, R. L. (1995) Integrin  $\alpha 5\beta 1$  expression negatively regulates cell growth: reversal by attachment to fibronectin. *Mol Biol Cell* 6, 725-40.

Vinogradova, O., Vaynberg, J., Kong, X., Haas, T. A., Plow, E. F., & Qin, J. (2004) Membrane-mediated structural transitions at the cytoplasmic face during integrin activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 4094-9.

Vinogradova, O., Velyvis, A., Velyviene, A., Hu, B., Haas, T., Plow, E., & Qin, J. (2002) A structural mechanism of integrin  $\alpha(IIb)\beta(3)$  "inside-out" activation as regulated by its cytoplasmic face. *Cell* 110, 587-97.

Wang, W., Wang, F., Lu, F., Xu, S., Hu, W., Huang, J., Gu, Q., & Sun, X. (2011) The antiangiogenic effects of integrin  $\alpha 5\beta 1$  inhibitor (ATN-161) in vitro and in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52, 7213-7220.

Weber, K. S., Klickstein, L. B., & Weber, C. (1999) Specific activation of leukocyte  $\beta 2$  integrins lymphocyte function-associated antigen-1 and Mac-1 by chemokines mediated by distinct pathways via the  $\alpha$  subunit cytoplasmic domains. *Mol Biol Cell* 10, 861-73.

Wegener, K. L., Partridge, A. W., Han, J., Pickford, A. R., Liddington, R. C., Ginsberg, M. H., & Campbell, I. D. (2007) Structural basis of integrin activation by talin. *Cell* 128, 171-82.

Weljie, A. M., Hwang, P. M., & Vogel, H. J. (2002) Solution structures of the cytoplasmic tail complex from platelet integrin  $\alpha IIb$ - and  $\beta 3$ -subunits. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 5878-83.

## I. Introduction

- Xiao, T., Takagi, J., Coller, B. S., Wang, J.-H., & Springer, T. A. (2004) Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics. *Nature* 432, 59-67.
- Xie, C., Zhu, J., Chen, X., Mi, L., Nishida, N., & Springer, T. A. (2010) Structure of an integrin with an  $\alpha I$  domain, complement receptor type 4. *EMBO J* 29, 666-679.
- Xiong, J. P., Stehle, T., Diefenbach, B., Zhang, R., Dunker, R., Scott, D. L., Joachimiak, A., Goodman, S. L., & Arnaout, M. A. (2001) Crystal structure of the extracellular segment of integrin  $\alpha V\beta 3$ . *Science* 294, 339-345.
- Xiong, J.-P., Mahalingham, B., Alonso, J. L., Borrelli, L. A., Rui, X., Anand, S., Hyman, B. T., Rysiek, T., Muller-Pompalla, D., Goodman, S. L., & Arnaout, M. A. (2009) Crystal structure of the complete integrin  $\alpha V\beta 3$  ectodomain plus an  $\alpha/\beta$  transmembrane fragment. *J Cell Biol* 186, 589-600.
- Xiong, J.-P., Stehle, T., Zhang, R., Joachimiak, A., Frech, M., Goodman, S. L., & Arnaout, M. A. (2002) Crystal structure of the extracellular segment of integrin  $\alpha V\beta 3$  in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science* 296, 151-155.
- Yang, J. T., Rayburn, H., & Hynes, R. O. (1993) Embryonic mesodermal defects in  $\alpha 5$  integrin-deficient mice. *Development* 119, 1093-105.
- Yao, H., Veine, D. M., Fay, K. S., Staszewski, E. D., Zeng, Z.-Z., & Livant, D. L. (2011) The PHSCN dendrimer as a more potent inhibitor of human breast cancer cell invasion, extravasation, and lung colony formation. *Breast Cancer Res Treat* 125, 363-375.
- Yao, H., Veine, D. M., Zeng, Z.-Z., Fay, K. S., Staszewski, E. D., & Livant, D. L. (2010) Increased potency of the PHSCN dendrimer as an inhibitor of human prostate cancer cell invasion, extravasation, and lung colony formation. *Clin Exp Metastasis* 27, 173-84.
- Ye, F., Hu, G., Taylor, D., Ratnikov, B., Bobkov, A. A., McLean, M. A., Sligar, S. G., Taylor, K. A., & Ginsberg, M. H. (2010) Recreation of the terminal events in physiological integrin activation. *J Cell Biol* 188, 157-73.
- Ye, F., Liu, J., Winkler, H., & Taylor, K. A. (2008) Integrin  $\alpha IIb \beta 3$  in a membrane environment remains the same height after  $Mn^{2+}$  activation when observed by cryoelectron tomography. *J Mol Biol* 378, 976-86.
- Yin, H., Slusky, J. S., Berger, B. W., Walters, R. S., Vilaire, G., Litvinov, R. I., Lear, J. D., Caputo, G. A., Bennett, J. S., & DeGrado, W. F. (2007) Computational design of peptides that target transmembrane helices. *Science* 315, 1817-1822.
- Youssry, T. A., Major, E. O., Ryschewitsch, C., Fahle, G., Fischer, S., Hou, J., Curfman, B., Miszkiel, K., Mueller-Lenke, N., Sanchez, E., Barkhof, F., Radue, E.-W., Jäger, H. R., & Clifford, D. B. (2006) Evaluation of patients treated with natalizumab for progressive multifocal leukoencephalopathy. *N Engl J Med* 354, 924-33.
- Zahn, G., Volk, K., Lewis, G. P., Vossmeyer, D., Stragies, R., Heier, J. S., Daniel, P. E. J., Adamis, A. P., Chapin, E. A., Fisher, S. K., Holz, F. G., Loffler, K. U., & Knolle, J. (2010) Assessment of the integrin  $\alpha 5\beta 1$  antagonist JSM6427 in proliferative vitreoretinopathy using in vitro assays and a rabbit model of retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51, 1028-1035.

- Zahn, G., Vossmeyer, D., Stragies, R., Wills, M., Wong, C. G., Loffler, K. U., Adamis, A. P., & Knolle, J. (2009) Preclinical evaluation of the novel small-molecule integrin  $\alpha 5\beta 1$  inhibitor JS6427 in monkey and rabbit models of choroidal neovascularization. *Arch Ophthalmol* 127, 1329-1335.
- Zaidel-Bar, R., Itzkovitz, S., Ma'ayan, A., Iyengar, R., & Geiger, B. (2007) Functional atlas of the integrin adhesome *Nat Cell Biol* 9, 858-67.
- Zeng, Z.-Z., Yao, H., Staszewski, E. D., Rockwood, K. F., Markwart, S. M., Fay, K. S., Spalding, A. C., & Livant, D. L. (2009)  $\alpha(5)\beta(1)$  Integrin Ligand PHSRN Induces Invasion and  $\alpha(5)$  mRNA in Endothelial Cells to Stimulate Angiogenesis. *Transl Oncol* 2, 8-20.
- Zhang, H., Li, C., & Baciu, P. C. (2002) Expression of integrins and MMPs during alkaline-burn-induced corneal angiogenesis *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43, 955-62.
- Zhang, K. & Chen, J. (2012) The regulation of integrin function by divalent cations *Cell Adh Migr* 6, 20-9.
- Zhou, Y., Peng, H., Ji, Q., Qi, J., Zhu, Z., & Yang, C. (2006) Discovery of small molecule inhibitors of integrin  $\alpha v\beta 3$  through structure-based virtual screening *Bioorg Med Chem Lett* 16, 5878-82.
- Zhu, J., Choi, W.-S., McCoy, J. G., Negri, A., Zhu, J., Naini, S., Li, J., Shen, M., Huang, W., Bougie, D., Rasmussen, M., Aster, R., Thomas, C. J., Filizola, M., Springer, T. A., & Coller, B. S. (2012) Structure-guided design of a high-affinity platelet integrin  $\alpha IIb\beta 3$  receptor antagonist that disrupts Mg(2)(+) binding to the MIDAS. *Sci Transl Med* 4, 125ra32.
- Zhu, J., Luo, B.-H., Xiao, T., Zhang, C., Nishida, N., & Springer, T. A. (2008) Structure of a complete integrin ectodomain in a physiologic resting state and activation and deactivation by applied forces. *Mol Cell* 32, 849-861.
- Zhu, J., Zhu, J., & Springer, T. A. (2013) Complete integrin headpiece opening in eight steps. *J Cell Biol* 201, 1053-1068.
- Zischinsky, G., Osterkamp, F., Vossmeyer, D., Zahn, G., Scharn, D., Zwintscher, A., & Stragies, R. (2010a) Discovery of orally available integrin  $\alpha 5\beta 1$  antagonists. *Bioorg Med Chem Lett* 20, 380-382.
- Zischinsky, G., Osterkamp, F., Vossmeyer, D., Zahn, G., Scharn, D., Zwintscher, A., & Stragies, R. (2010b) SAR of N-phenyl piperidine based oral integrin  $\alpha 5\beta 1$  antagonists. *Bioorg Med Chem Lett* 20, 65-68.
- van Golen, K. L., Bao, L., Brewer, G. J., Pienta, K. J., Kamradt, J. M., Livant, D. L., & Merajver, S. D. (2002) Suppression of tumor recurrence and metastasis by a combination of the PHSCN sequence and the antiangiogenic compound tetrathiomolybdate in prostate carcinoma. *Neoplasia* 4, 373-379.
- van der Flier, A., Badu-Nkansah, K., Whittaker, C. A., Crowley, D., Bronson, R. T., Lacy-Hulbert, A., & Hynes, R. O. (2010) Endothelial  $\alpha 5$  and  $\alpha v$  integrins cooperate in remodeling of the vasculature during development *Development* 137, 2439-49.



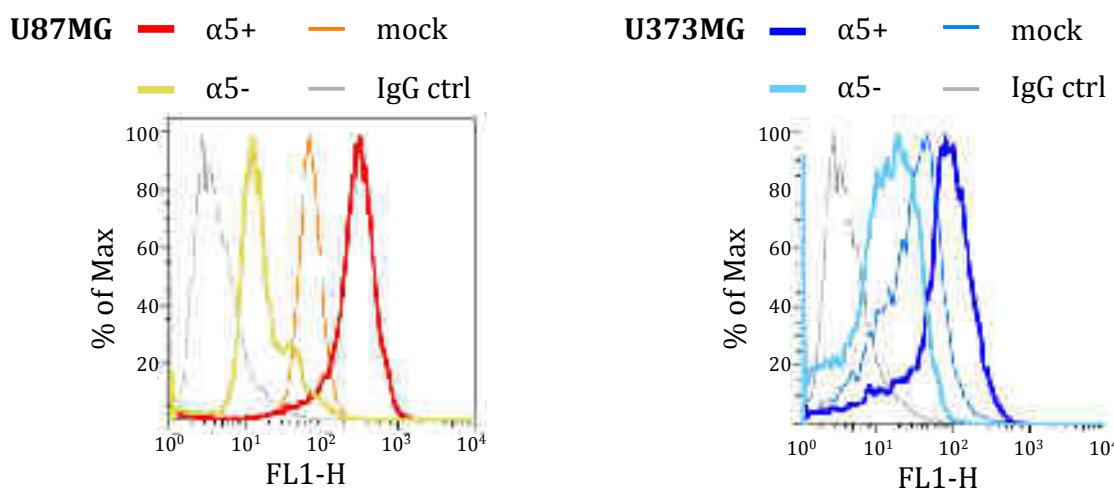
## **Chapitre II. Etude *in vitro* de l'implication de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans l'adhérence et la migration de cellules de glioblastomes**

Dans cette étude, nous nous proposons d'analyser l'implication respective des intégrines  $\alpha 5\beta 1$  et  $\alpha V\beta 3$  dans l'adhérence et la migration de cellules de glioblastomes. Pour cela, deux stratégies sont appliquées, la modulation de l'expression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  et l'utilisation d'antagonistes non peptidiques qui miment la séquence RGD et possèdent des sélectivités différentes pour les intégrines  $\alpha 5\beta 1$  et  $\alpha V\beta 3$ .

**A**



**B**



**Figure 15 Expression des sous-unités  $\alpha 5$  et  $\alpha V$  dans les cellules U87MG et U373MG.**

**A.** Western blot montrant l'expression globale des sous-unités  $\alpha 5$  et  $\alpha V$  d'intégrines dans les cellules U87MG (gauche) et U373MG (droite) manipulées génétiquement. **B.** Analyses par cytométrie en flux de l'expression à la membrane de la sous-unité  $\alpha 5$  dans les cellules U87MG (gauche) et U373MG (droite) manipulées génétiquement.

## II.A. Caractérisation des modèles cellulaires utilisés

Nous avons à notre disposition deux lignées de glioblastomes, U87MG et U373MG, que nous avons manipulées génétiquement pour sur- ou sous- exprimer la sous-unité  $\alpha 5$  de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . L'expression de cette sous-unité est mesurée par western blot (Figure 15A) et par cytométrie en flux (Figure 15B). L'expression de la sous-unité  $\alpha V$  est également mesurée par western blot (Figure 15A).

On observe que la lignée U87MG exprime plus fortement l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  que la lignée U373MG (moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) : 83 contre 41). La surexpression de l'intégrine  $\alpha 5$  dans la lignée U373MG (U373MG- $\alpha 5+$ ) conduit à un niveau d'expression équivalent aux cellules U87MG (MFI 99). L'expression d' $\alpha 5$  est multipliée par quatre dans les cellules U87MG- $\alpha 5+$  (MFI 310) par rapport aux cellules U87MG-mock. L'expression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  dans les lignées U87MG- $\alpha 5-$  (MFI 25) et U373MG- $\alpha 5-$  (MFI 19) est encore légèrement détectable par les techniques utilisées.

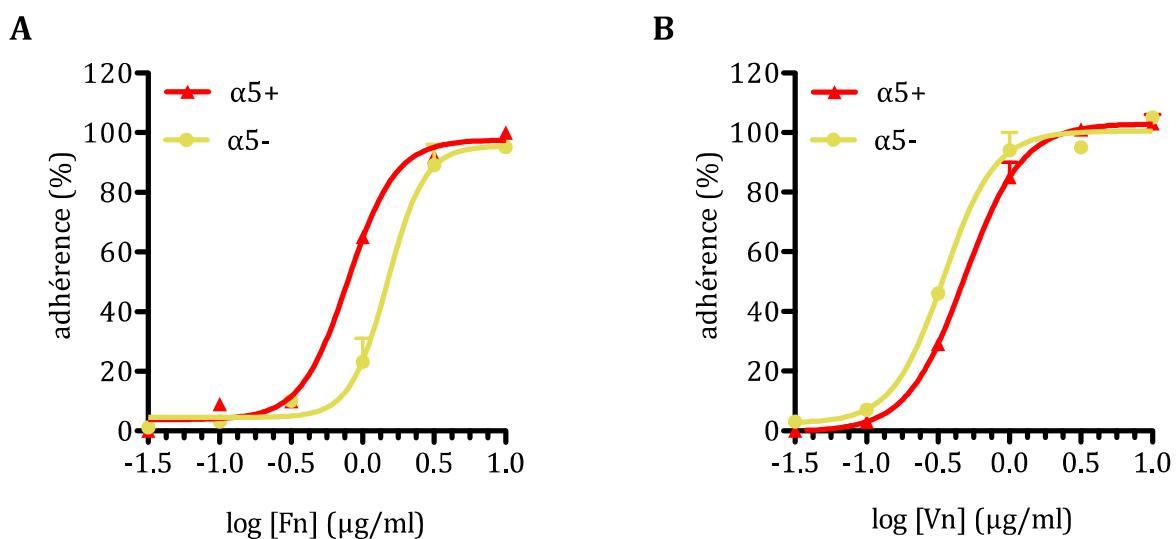
L'expression de la sous-unité  $\alpha V$  est quant à elle inchangée, quel que soit le taux d'expression d' $\alpha 5$  dans les deux lignées.

*Nous avons donc deux lignées cellulaires de glioblastomes qui expriment différents niveaux de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  pour un niveau constant d'intégrine  $\alpha V\beta 3$ .*

## II.B. Adhérence des cellules de glioblastomes et effets des antagonistes d'intégrines

### II.B.1. Adhérence des cellules U87MG

Le ligand endogène de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  est la fibronectine (Fn). L'intégrine  $\alpha V\beta 3$  se lie préférentiellement à la vitronectine (Vn) mais reconnaît également la fibronectine. Nous avons donc mesuré l'adhérence des U87MG- $\alpha 5+$  et U87MG- $\alpha 5-$  sur une gamme de concentrations de fibronectine et de vitronectine (de 0,03 à 10 $\mu$ g/ml) (Figure 16). L'adhérence des cellules à la fibronectine (Figure 16A) varie en fonction de l'expression de la sous-unité  $\alpha 5$ . Plus cette sous-unité est exprimée et plus les cellules adhèrent à la fibronectine. L'adhérence de ces mêmes cellules sur la vitronectine (Figure 16B) ne varie pas avec l'expression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ .



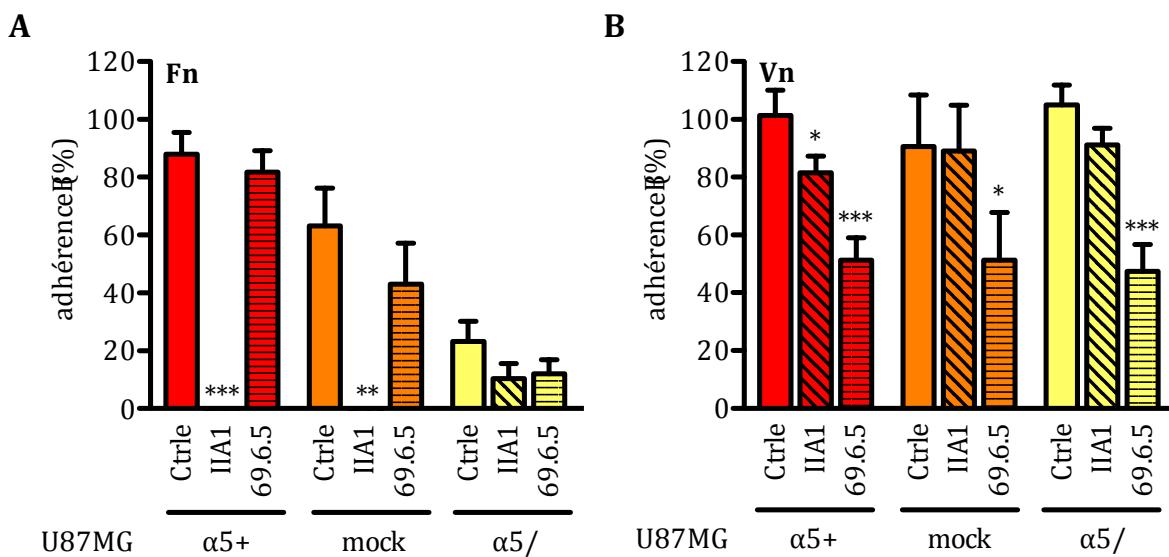
**Figure 16 Adhérence des cellules U87MG à la fibronectine et à la vitronectine.**

**A.** Courbes dose réponse de l'adhérence des cellules U87MG- $\alpha 5+$  et U87MG- $\alpha 5-$  en fonction de la quantité de fibronectine. **B.** Courbes dose réponse de l'adhérence des cellules U87MG- $\alpha 5+$  et U87MG- $\alpha 5-$  en fonction de la quantité de vitronectine. Courbes d'une expérience représentative de l'ensemble des résultats obtenus.

Pour la suite de notre étude nous choisissons de nous restreindre à une seule concentration pour chaque matrice. Nous choisissons la concentration de fibronectine pour laquelle l'adhérence des cellules exprimant le plus fortement la sous-unité  $\alpha 5$  est supérieure à 50% mais non saturée, soit 1 $\mu$ g/ml. La même démarche conduit à une utilisation de la vitronectine à 1 $\mu$ g/ml.

L'implication respective des intégrines  $\alpha 5\beta 1$  et des intégrines à  $\alpha V$  est mesurée par l'utilisation d'anticorps les ciblant, l'anticorps IIA1 pour la sous-unité  $\alpha 5$  (Ramakrishnan et al., 2006), l'anticorps 69.6.5 pour la sous-unité  $\alpha V$  (Lehmann et al., 1994) (Figure 17).

L'adhérence des cellules U87MG- $\alpha 5+$  et U87MG-mock sur la fibronectine est totalement inhibée par l'anticorps IIA1 mais inchangée avec l'anticorps 69.6.5 (Figure 17A). L'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  est donc responsable de l'adhérence des cellules U87MG sur la fibronectine. L'anticorps IIA1 inhibe 20% de l'adhérence des cellules U87MG- $\alpha 5+$  à la vitronectine (Figure 17B). L'anticorps 69.6.5 inhibe 50% de l'adhérence à la vitronectine. L'adhérence des cellules U87MG à la vitronectine est donc due majoritairement aux intégrines  $\alpha V$  mais l'intégrine  $\alpha 5$  semble y participer légèrement.



**Figure 17 Implication des sous-unités  $\alpha 5$  et  $\alpha V$  dans l'adhérence des U87MG.**

A. Inhibition de l'adhérence des cellules U87MG- $\alpha 5+$ , U87MG-mock et U87MG- $\alpha 5-$  par l'anticorps IIA1 et 69.6.5 (10 $\mu$ g/ml) sur la fibronectine (1 $\mu$ g/ml), B. Inhibition de l'adhérence des cellules U87MG- $\alpha 5+$ , U87MG-mock et U87MG- $\alpha 5-$  par l'anticorps IIA1 et 69.6.5 (10 $\mu$ g/ml) sur la vitronectine (1 $\mu$ g/ml).

Grâce à notre collaboration avec le Pr Kessler (Munich, Allemagne), nous avons à notre disposition un ensemble de composés antagonistes des intégrines  $\alpha 5\beta 1$  et  $\alpha V\beta 3$ . Toutes ces molécules sont des mimes de la séquence RGD (Heckmann et al., 2008; Rechenmacher et al., 2013). Leurs affinités pour les différentes intégrines ont été extrapolées à partir de tests d'inhibition de l'adhérence réalisés sur intégrines purifiées (Figure 18, Tableau 5). On peut définir trois classes de composés à partir de ce tableau, les composés sélectifs de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  : le Fr248 et le K34c ; et les composés sélectifs de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  : le cilengitide, le Sn243, le Sn242 et le K34a qui n'est pas sélectif.

II Etude de l'implication l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  dans l'adhérence et la migration de cellules de GBM

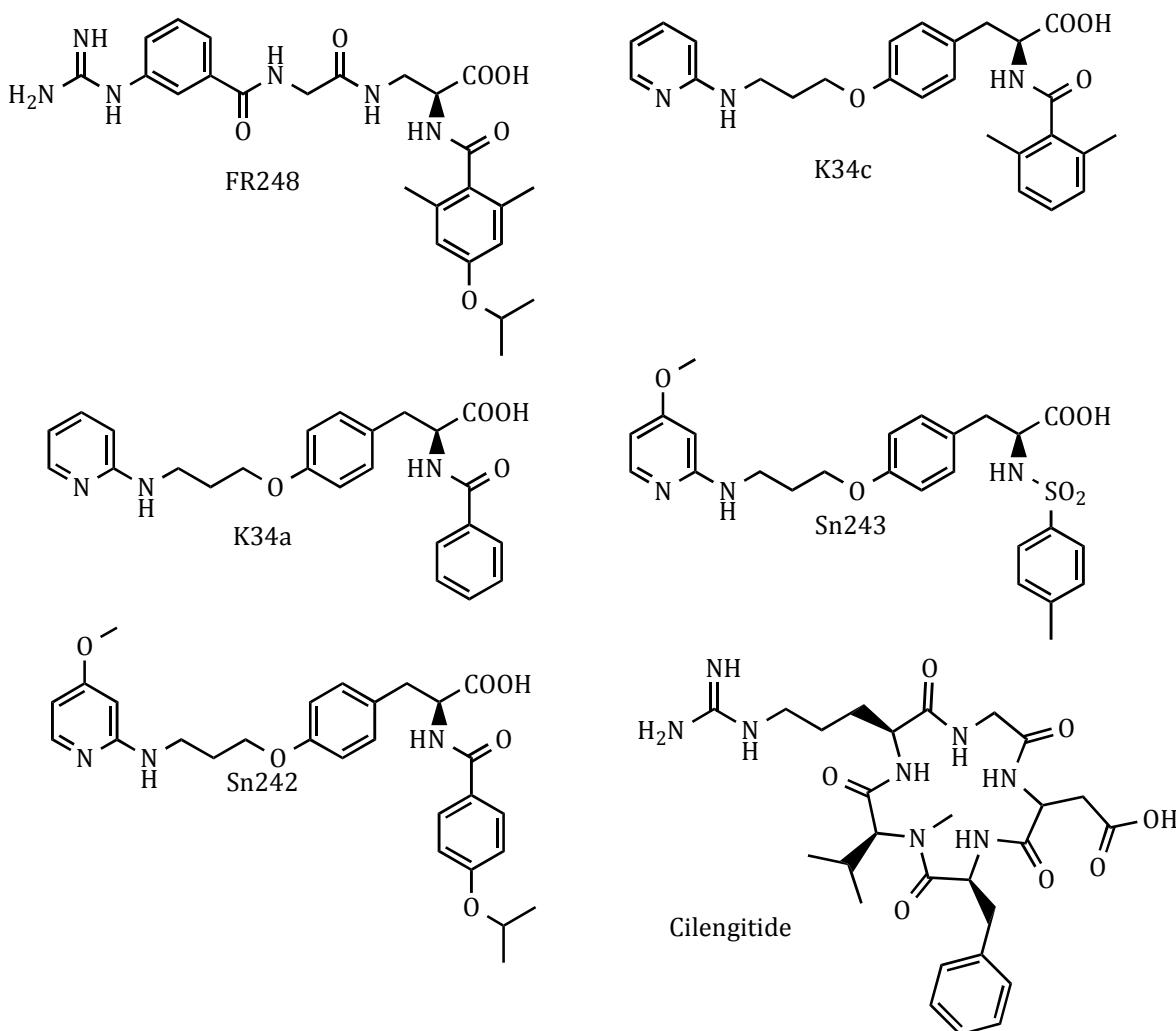


Figure 18 Structure des différents antagonistes utilisés.

Nom	IC50 [nM] $\alpha 5\beta 1$	IC50 [nM] $\alpha V\beta 3$	Ratio $\alpha 5\beta 1/\alpha V\beta 3$
Fr248	2,3	3000	0,0007
K34c	3,1	1624	0,002
Sn242	127	0,86	148
Sn243	108	0,65	166
K34a	243	190	1,3
Cilengitide	11	0,2	55

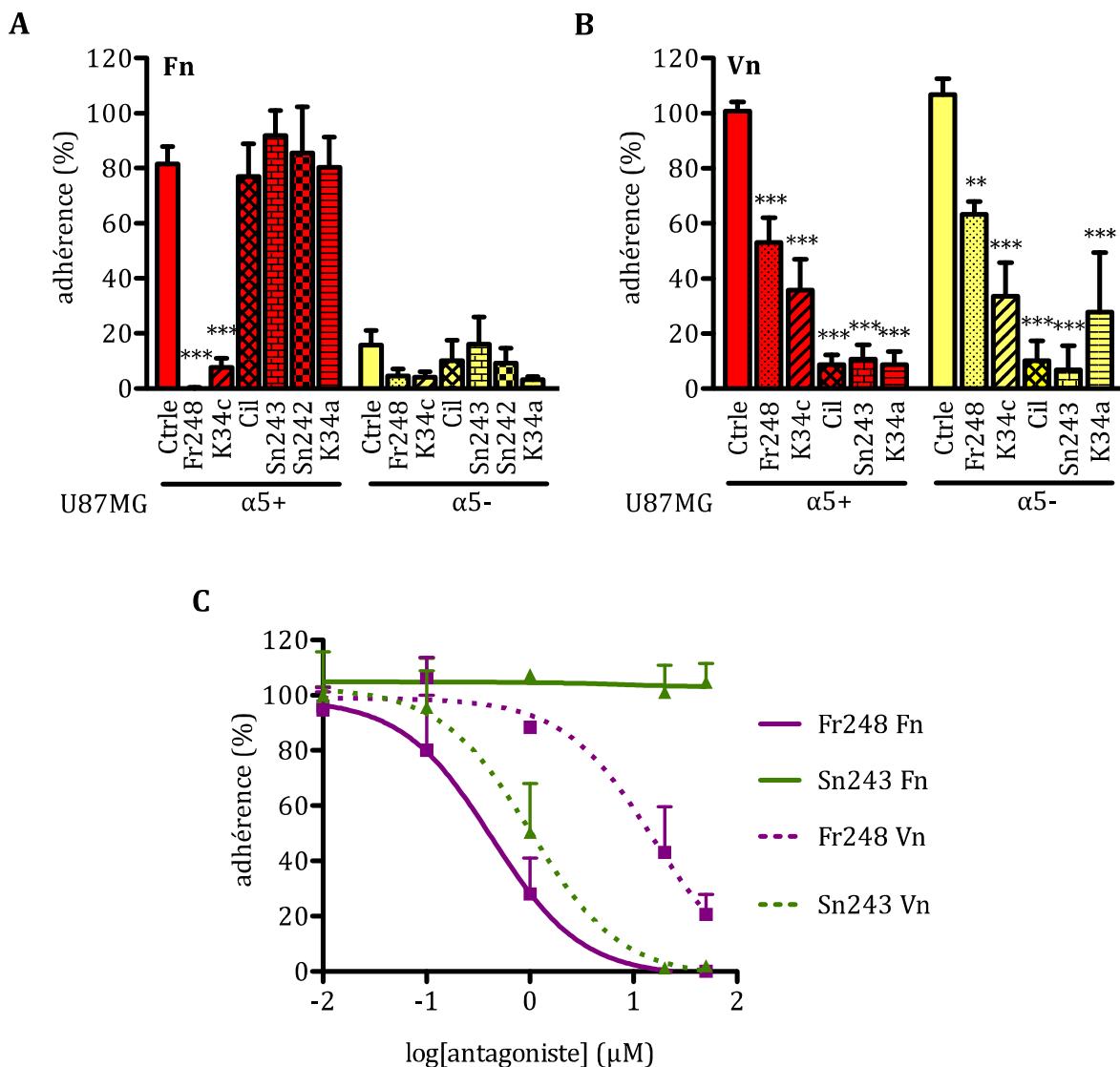
Tableau 5 Tableau des IC50 d'adhérence des différents antagonistes utilisés.

Nous avons testé ces différents composés sur l'adhérence cellulaire, à 20 $\mu$ M (Figure 19). L'adhérence des cellules U87MG- $\alpha$ 5- sur la fibronectine est trop faible pour pouvoir quantifier les effets des différents composés.

Les antagonistes sélectifs de l'intégrine  $\alpha$ V $\beta$ 3, le cilengitide (Cil), le Sn243, le Sn242 et ainsi que le K34a n'inhibent pas l'adhérence à la fibronectine des cellules U87MG- $\alpha$ 5+ (Figure 19A). Ils inhibent l'adhérence à la vitronectine des cellules U87MG- $\alpha$ 5+ et U87MG- $\alpha$ 5- (entre 80 et 90% d'inhibition), donc indépendamment de l'expression de l'intégrine  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 (Figure 19B). Ces composés ont donc un effet sur l'adhérence des cellules en adéquation avec les IC50 (de l'ordre du nanomolaire) mesurées sur l'adhérence de l'intégrine  $\alpha$ V $\beta$ 3 purifiée à la vitronectine.

Comme prévu, le Fr248 et le K34c, ligands sélectifs de l'intégrine  $\alpha$ 5 $\beta$ 1, inhibent la totalité de l'adhérence à la fibronectine des U87MG- $\alpha$ 5+ (Figure 19A). Curieusement, ils inhibent l'adhérence à la vitronectine des cellules U87MG- $\alpha$ 5+ et U87MG  $\alpha$ 5-, donc indépendamment de l'expression de l'intégrine  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 (Figure 19B). Ces composés ont été utilisés à 20 $\mu$ M, dans ces expériences, ce qui correspond à environ 10 à 20 fois leur IC50. Pour néanmoins confirmer la sélectivité du composé Fr248 pour l'intégrine  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 par rapport à l'intégrine  $\alpha$ V $\beta$ 3 dans nos conditions expérimentales (adhérence de cellules exprimant les deux intégrines par rapport à l'adhérence de chaque intégrine purifiée), nous avons effectué des courbes dose-réponse du composé en comparant l'adhérence des cellules U87MG- $\alpha$ 5+ sur fibronectine et sur vitronectine. Parallèlement, les effets du Fr248 ont été comparés aux effets du Sn243 (sélectif de l'intégrine  $\alpha$ V $\beta$ 3) réalisés dans les mêmes conditions.

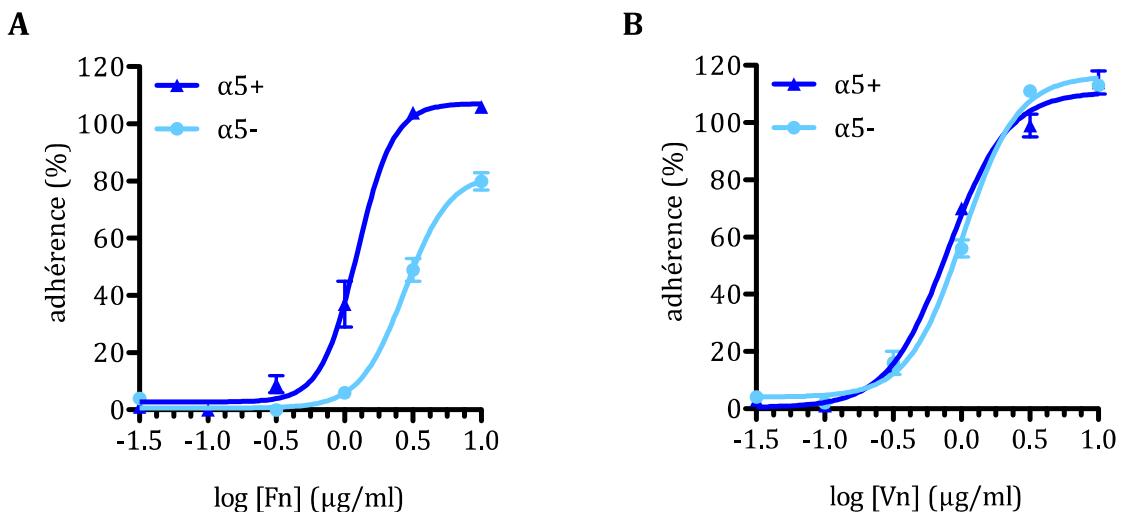
L'IC50 du Fr248 pour l'adhérence à la fibronectine est plus faible que celle pour l'adhérence à la vitronectine (0,42 $\mu$ M vs 15 $\mu$ M) (Figure 19C). Le Fr248 est donc bien sélectif de l'intégrine  $\alpha$ 5, mais est également capable d'inhiber une autre intégrine liant la vitronectine, certainement une intégrine  $\alpha$ V. Le Sn243 a une IC50 de 1 $\mu$ M pour l'adhérence à la vitronectine, l'IC50 pour l'adhérence à la fibronectine est supérieur à 50 $\mu$ M. Ce composé est donc bien un antagoniste sélectif de l'intégrine  $\alpha$ V $\beta$ 3.



**Figure 19 Effet des antagonistes non peptidiques « RGD-like » sur l'adhérence des U87MG.**  
**A.** Effet des différents composés ( $20\mu M$ ) sur l'adhérence des U87MG- $\alpha 5+$  et U87MG- $\alpha 5-$  à la fibronectine ( $1\mu g/ml$ ). **B.** Effet des différents composés ( $20\mu M$ ) sur l'adhérence des U87MG- $\alpha 5+$  et U87MG- $\alpha 5-$  à la vitronectine ( $1\mu g/ml$ ). **C.** Courbes de dose-réponse de Fr248 (violet) et Sn243 (vert) sur l'adhérence des cellules U87MG- $\alpha 5+$  à la fibronectine (traits pleins) et à la vitronectine (traits pointillés) à  $1\mu g/ml$  chacune.

### II.B.2. Adhérence des cellules U373MG

Nous avons réalisé la même étude sur la deuxième lignée de glioblastome (U373MG). Comme précédemment, l'adhérence de ces cellules à la fibronectine est dépendante de l'expression de la sous-unité  $\alpha 5$  (Figure 20). Les cellules U373MG- $\alpha 5+$  adhèrent à de plus faibles quantités de fibronectine que les cellules U373MG- $\alpha 5-$ . L'adhérence à la vitronectine n'est, elle, pas dépendante de l'expression d' $\alpha 5$ , les courbes d'adhérence des cellules U87MG- $\alpha 5+$  et U87MG- $\alpha 5-$  se superposent. Nous choisissons donc de poursuivre notre étude à 3 $\mu$ g/ml de fibronectine et 1 $\mu$ g/ml de vitronectine. La concentration de fibronectine utilisée est plus forte que pour les cellules U87MG car les cellules U373MG nécessitent une plus grande quantité de fibronectine pour adhérer dans les mêmes proportions que les cellules U87MG.

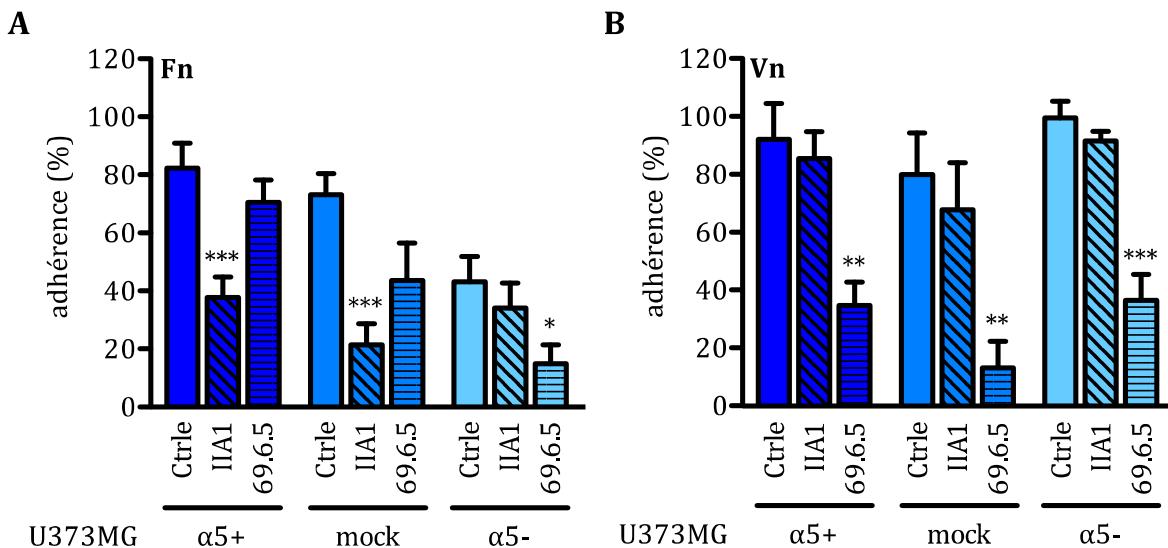


**Figure 20 Adhérence des cellules U373MG à la fibronectine et à la vitronectine.**

**A.** Courbes dose-réponse de l'adhérence des cellules U373MG- $\alpha 5+$  et U373MG- $\alpha 5-$  en fonction de la quantité de fibronectine. **B.** Courbes dose-réponse de l'adhérence des cellules U373MG- $\alpha 5+$  et U373MG- $\alpha 5-$  en fonction de la concentration de vitronectine. Courbes d'une expérience représentative de l'ensemble des résultats obtenus.

L'adhérence des cellules U373MG à la fibronectine (Figure 21) est inhibée à 50% par l'anticorps IIA1 pour les cellules exprimant l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , et se retrouve au niveau de l'adhérence des cellules U373MG- $\alpha 5-$ . L'adhérence à la fibronectine est également inhibée partiellement par l'anticorps 69.6.5 pour les cellules U373MG-mock et U373MG- $\alpha 5-$ . L'adhérence des cellules U373MG à la fibronectine est donc dépendante d'une balance entre les taux d'expression respectifs des sous-unités  $\alpha 5$  et  $\alpha V$ . Plus on exprime  $\alpha 5$  dans ces cellules, plus l'adhérence à la fibronectine est dépendante de cette intégrine et moins elle l'est des intégrines  $\alpha V$ . L'adhérence de ces cellules à la vitronectine n'est

inhibée que par l'anticorps 69.6.5, quelque soit l'expression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , les intégrines  $\alpha V$  sont donc les principales actrices de la liaison de ces cellules à la vitronectine.



**Figure 21 Implication des sous-unités  $\alpha 5$  et  $\alpha V$  dans l'adhérence des U373MG.**

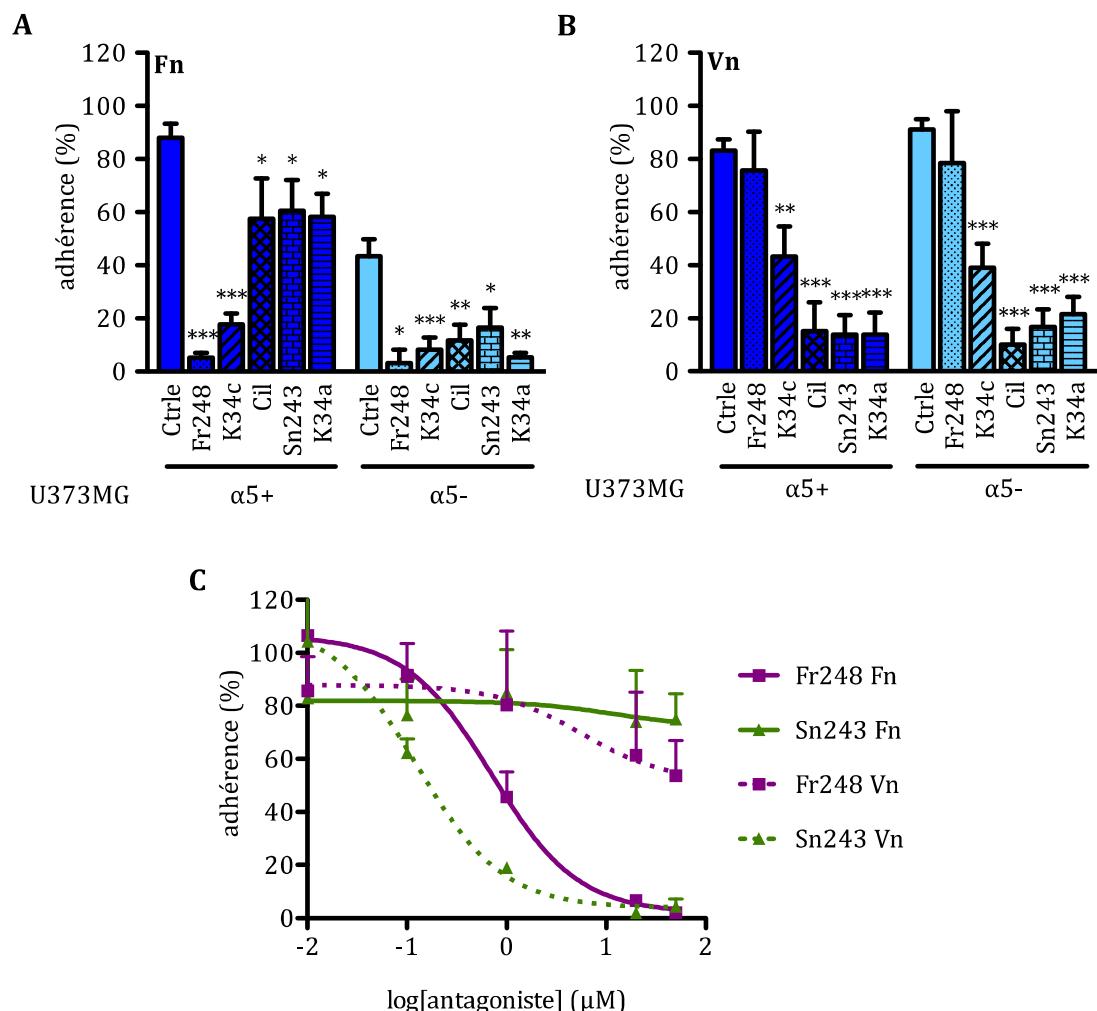
**A.** Inhibition de l'adhérence des cellules U373MG- $\alpha 5+$ , U373MG-mock et U373MG- $\alpha 5-$  par l'anticorps IIA1 et 69.6.5 (10 $\mu$ g/ml) à la fibronectine (3 $\mu$ g/ml). **B.** Inhibition de l'adhérence des cellules U373MG- $\alpha 5+$ , U373MG-mock et U373MG- $\alpha 5-$  par l'anticorps IIA1 et 69.6.5 (10 $\mu$ g/ml) à la vitronectine (1 $\mu$ g/ml).

Nous avons évalué l'effet des antagonistes sur ces cellules (Figure 22). Les antagonistes de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  inhibent une partie de l'adhérence à la fibronectine des deux lignées U373MG- $\alpha 5+$  et U373MG- $\alpha 5-$  (30% d'inhibition pour les U373MG- $\alpha 5+$  et entre 60 et 87% pour les U373MG- $\alpha 5-$ ) confirmant ainsi une implication de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  dans l'adhérence à la fibronectine (Figure 22A). Ils inhibent environ 80% de l'adhérence des cellules  $\alpha 5+$  et  $\alpha 5-$  à la vitronectine. Ces composés ont donc un effet totalement indépendant de l'intégrine  $\alpha 5$  sur cette lignée (Figure 22B).

Les deux composés Fr248 et K34c inhibent la majeure partie de l'adhérence à la fibronectine des cellules U373MG- $\alpha 5+$  (94% pour le Fr248, 80% pour le K34c) (Figure 22A). Curieusement, ces deux composés sont également capables d'inhiber l'adhérence à la fibronectine des cellules  $\alpha 5-$ , révélant ainsi une composante indépendante de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . Cette composante ne semble pas être l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  pour le Fr248 car il n'inhibe pas l'adhérence des cellules à la vitronectine (Figure 22B). Par contre, le K34c a clairement une activité inhibitrice de l'adhérence à la vitronectine de ces cellules.

Les courbes dose-réponse effectuées avec les composés Fr248 et Sn343 sur les cellules U373MG- $\alpha$ 5+ confirment leur sélectivité dans ce modèle cellulaire (Figure 22C).

Le Fr248 inhibe l'adhérence à la fibronectine avec une IC50 de 0,70 $\mu$ M et n'a pas d'impact sur l'adhérence des cellules à la vitronectine. Inversement, le Sn243 inhibe l'adhérence à la vitronectine avec une IC50 de 0,12 $\mu$ M et n'a pas d'impact sur l'adhérence à la fibronectine.



**Figure 22 Effet des antagonistes non peptidiques RGD-like sur l'adhérence des cellules U373MG.**  
**A.** Effet des différents composés (20 $\mu$ M) sur l'adhérence des cellules U373MG- $\alpha$ 5+ et U373MG- $\alpha$ 5- sur la fibronectine (3 $\mu$ g/ml). **B.** Effet des différents composés (20 $\mu$ M) sur l'adhérence des cellules U373MG- $\alpha$ 5+ et U373MG- $\alpha$ 5- sur la vitronectine (1 $\mu$ g/ml). **C.** Courbes de dose-réponse de Fr248 (violet) et Sn243 (vert) sur l'adhérence des cellules U373MG- $\alpha$ 5+ sur la fibronectine (3 $\mu$ g/ml, traits pleins) et la vitronectine (1 $\mu$ g/ml, traits pointillés).

*Nos deux lignées cellulaires se comportent différemment pour l'adhérence et les traitements. Dans les cas des cellules U87MG, l'adhérence à la fibronectine est dépendante de l'intégrine  $\alpha$ 5, tandis que l'adhérence à la vitronectine implique les deux intégrines  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 et  $\alpha$ V $\beta$ 3. Dans le cas des cellules U373MG, l'adhérence à la*

*fibronectine est dépendante d'une balance entre l'expression des intégrines  $\alpha 5\beta 1$  et  $\alpha V\beta 3$  tandis que l'adhérence à la vitronectine est dépendante de l'intégrine  $\alpha V$ .*

*La corrélation entre les affinités des antagonistes mesurées dans les tests d'adhérence sur intégrines purifiées et leurs effets observés sur l'adhérence des cellules n'est pas parfaite. En effet, même si on retrouve globalement les sélectivités attendues, les expériences ont révélé des effets inattendus. Ainsi le Fr248, ligand sélectif de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  semble reconnaître une intégrine pour le moment non identifiée. De plus le K34c, malgré une sélectivité de plus de 500 fois en faveur de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  est capable de reconnaître également l'intégrine  $\alpha V\beta 3$ .*

*Le test d'adhérence sur protéines purifiées permet de déduire les affinités des composés pour les différentes intégrines que l'on teste. Mais les molécules ont des effets plus mitigés lorsque ce test est transposé dans un modèle cellulaire où plusieurs intégrines sont exprimées conjointement. Il reste à savoir si ces molécules peuvent être utilisées pour bloquer les fonctions pro-tumorales des cellules de glioblastomes. Pour répondre à cette question, nous décidons de tester l'impact de ces composés sur la migration de nos cellules.*

## II.C. Migration collective de cellules de glioblastomes et implication de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$

Le test de blessure-cicatrisation sur nos modèles cellulaires est utilisé pour mesurer l'implication de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  dans la migration collective des cellules, ainsi que l'effet de nos différents composés. Dans ce test, une blessure est réalisée au milieu d'un tapis cellulaire. Le recouvrement de la blessure est mesurée en fonction du temps. C'est un test facile à mettre en place, qui permet l'observation de la migration d'un ensemble de cellules dans une direction définie (celui visant à combler la blessure).

### II.C.1. Migration collective des cellules U87MG

L'analyse de la migration des cellules U87MG exprimant différents taux d'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  montre que cette migration n'est pas dépendante de l'expression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . En effet, les cellules U87MG- $\alpha 5-$  recouvrent la blessure avec la même efficacité que les cellules U87MG- $\alpha 5+$  (Figure 23). Pour la suite de notre étude, nous analyserons les résultats à 20h, c'est à dire au moment où les cellules recouvrent la majeure partie de la blessure, mais où les deux bords ne sont pas encore en contact.

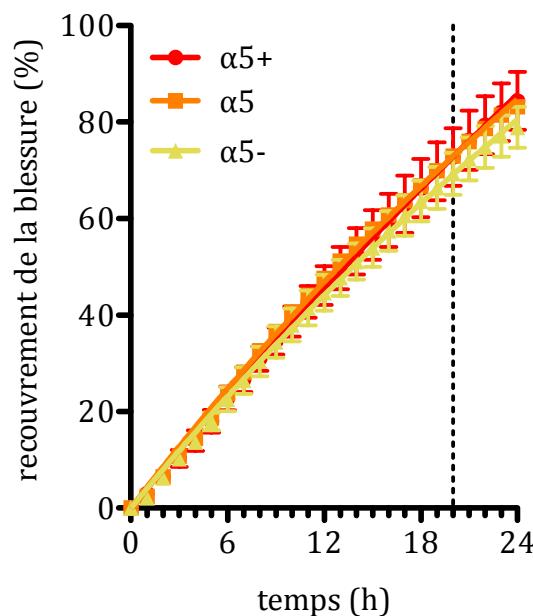
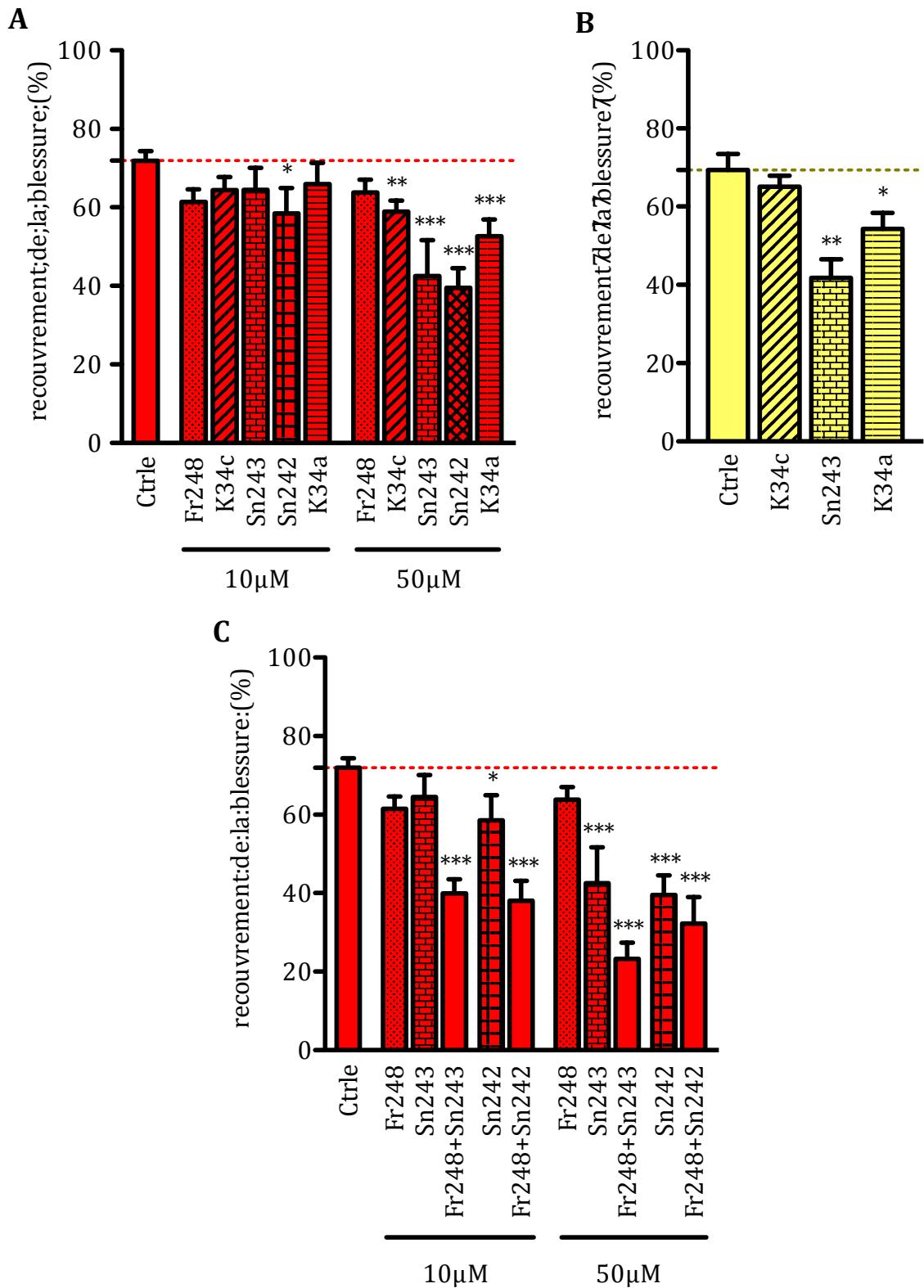


Figure 23 Migration des cellules U87MG exprimant différents taux d'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  en fonction du temps.

Les molécules antagonistes d'intégrines ont été utilisées à 10 $\mu$ M et 50 $\mu$ M sur les cellules U87MG- $\alpha 5+$  (Figure 24A). A 10 $\mu$ M aucun composé n'est capable d'inhiber la fermeture de la blessure, à l'exception du Sn242 (20% d'inhibition), tandis qu'à 50 $\mu$ M tous les composés inhibent la migration collective, à l'exception du Fr248. Pour vérifier l'implication de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  dans cette migration, les composés K34c, Sn243 et K34a ont été testés sur les cellules U87MG- $\alpha 5-$  (Figure 24B). Le K34c n'inhibe pas la migration de ces cellules, son effet est donc dépendant de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . Le Sn243 et le K34a inhibent la migration des cellules U87MG- $\alpha 5-$ , leur action semble donc indépendante de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , mais liée à l'intégrine  $\alpha V\beta 3$ .

Les deux intégrines  $\alpha 5\beta 1$  et  $\alpha V\beta 3$  semblent être impliquées dans la migration collective des cellules. Nous avons donc testé l'efficacité d'un co-traitement par le Fr248 et le Sn243 ou le Sn242 (Figure 24C). A la différence des cellules traitées avec un seul composé, les cellules traitées avec les deux composés à faible concentration (10 $\mu$ M) ont une migration fortement diminuée (de 47% avec le Sn242+Fr248 et 44% avec le Sn243+Fr248). Les résultats à 10 $\mu$ M sont identiques de ceux à 50 $\mu$ M, l'effet maximum est atteint avec le co-traitement à 10 $\mu$ M.

Le cilengitide a une action particulière, utilisé aux mêmes concentrations que les autres composés, il décolle régulièrement une partie du tapis cellulaire des U87MG- $\alpha 5+$ , ce qui rend l'analyse impossible. Il n'a aucun effet sur les cellules U87MG- $\alpha 5-$ , ce qui suggère un effet du cilengitide sur l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  dans ce modèle.



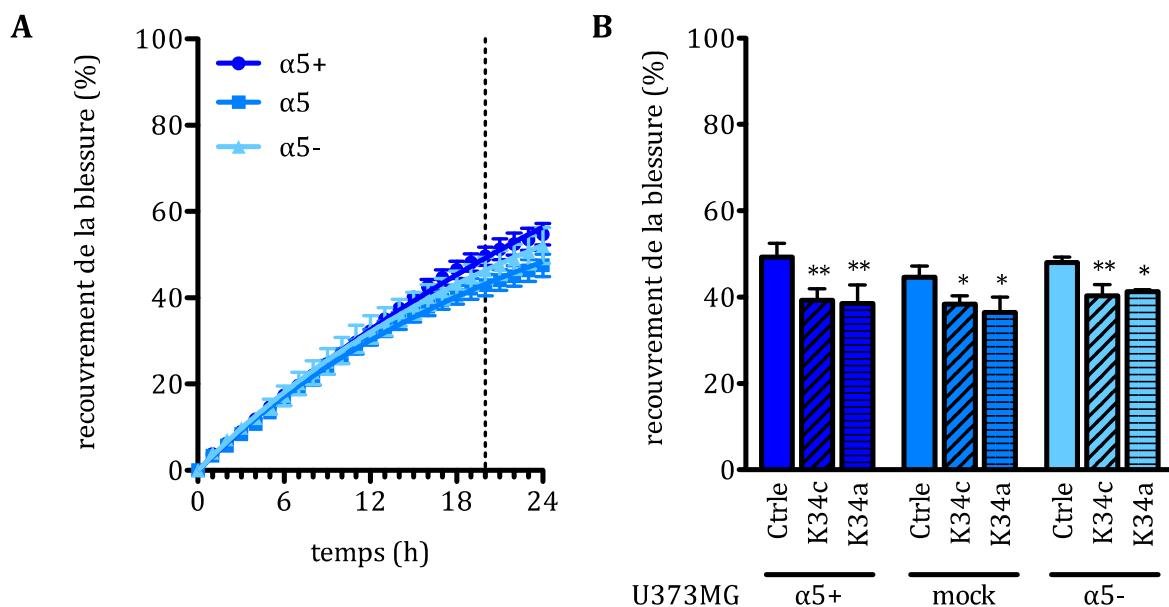
**Figure 24 Migration collective des cellules U87MG.**

**A.** Effet des différents antagonistes sur la migration des cellules U87MG- $\alpha 5+$  à 20h. **B.** Effet des antagonistes sur les cellules U87MG- $\alpha 5-$  à 20h. **C.** Effet des co-traitements sur la migration collective des cellules U87MG- $\alpha 5+$  à 20h.

### II.C.2. Migration collective des cellules U373MG

Le test est réalisé sur la deuxième lignée, les U373MG (Figure 25). Comme pour les cellules U87MG, la vitesse de recouvrement des cellules U373MG n'est pas dépendante de l'expression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  (Figure 25A). En effet les cellules recouvrent la même surface de la blessure qu'elles expriment fortement (U373MG- $\alpha 5+$ ) ou peu (U373- $\alpha 5-$ ) l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . Tous les résultats suivants sont analysés à 20h.

Les composés K34c et K34a sont testés sur ces cellules à 50 $\mu$ M (Figure 25B). On observe que les deux composés inhibent la migration de toutes les cellules de la même manière (de 15 à 20%) quelque soit l'expression de la sous-unité  $\alpha 5$ . L'inhibition observée est donc indépendante de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  puisqu'elle est présente sur les cellules U373MG- $\alpha 5-$ , et donc certainement due à l'intégrine  $\alpha V\beta 3$ . Un co-traitement n'aurait donc pas d'intérêt.



**Figure 25 Migration collective des cellules U373MG.**

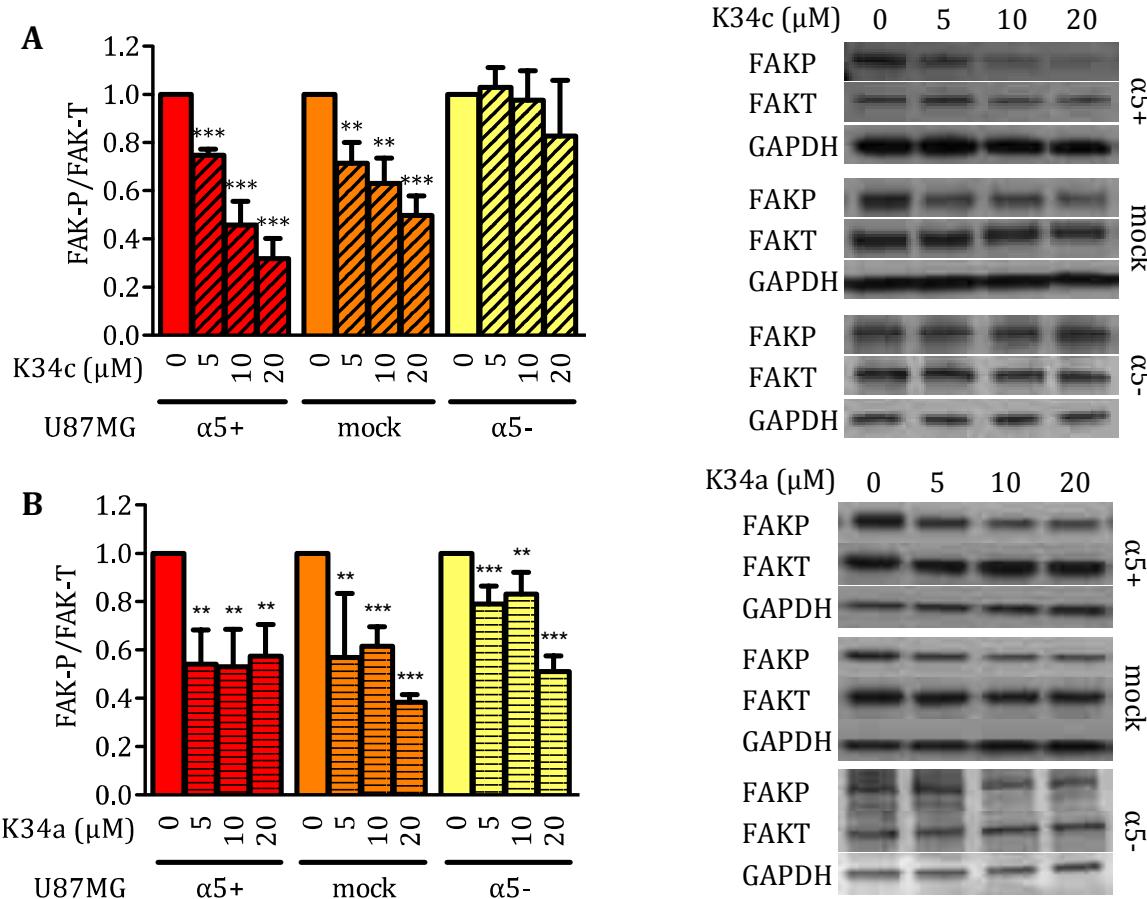
A. Migration collective des cellules U373MG en fonction de l'expression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  et du temps. B. Effets des antagonistes sur la migration collective des cellules U373MG à 20h.

### II.C.3. Analyse de l'activité de FAK dans les cellules U87MG

La migration collective des cellules U87MG est dépendante des intégrines  $\alpha 5\beta 1$  et  $\alpha V\beta 3$ . Afin de savoir si ces deux intégrines utilisent les mêmes voies de signalisation dans ce processus, nous avons sélectionné deux de nos composés et testé par Western Blot l'activité de la protéine FAK sur les cellules U87MG. La protéine FAK (Focal Adhesion Kinase) est une protéine connue pour son rôle dans les points focaux

d'adhérence et comme intermédiaire dans l'action des intégrines sur la migration. Cette protéine possède un site d'autophosphorylation sur la tyrosine 397 qui permet le recrutement des autres protéines de la cascade signalétique.

Nous avons traité les lignées U87MG avec le K34c et le K34a (seuls composés disponibles au moment de l'étude) (Figure 26).



**Figure 26 Effet des antagonistes K34c et K34a sur la phosphorylation de la protéine FAK (lignée U87MG).**

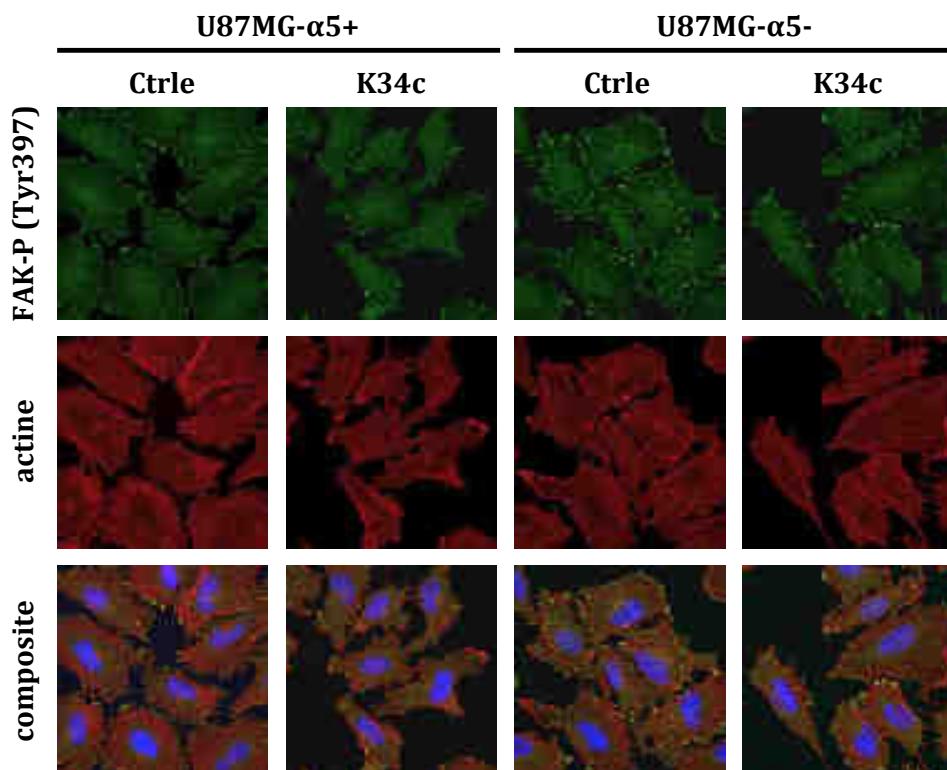
**A.** Histogramme représentant l'effet du K34c sur la phosphorylation de la protéine FAK par rapport à la protéine FAK totale (gauche) mesurée par Western Blot (droite). **B.** Histogramme représentant l'effet du K34a sur la phosphorylation de la protéine FAK par rapport à la protéine FAK totale (gauche) mesurée par Western Blot (droite).

Le K34c inhibe la phosphorylation de FAK de manière dose-dépendante pour les cellules  $\alpha 5^+$  et mock mais pas pour les cellules  $\alpha 5^-$ . Il a donc une action sur FAK clairement dépendante de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  dans ce modèle. Le K34a inhibe la phosphorylation de FAK sur les cellules quelque soit leur niveau d'expression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . Il est plus actif sur les cellules qui expriment l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  que sur les cellules qui ne l'expriment pas. Il semble avoir un effet sur les intégrines  $\alpha 5\beta 1$  et  $\alpha V\beta 3$ , ce qui est en accord avec son affinité pour les deux protéines (Tableau 5). Ces

## II Etude de l'implication l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans l'adhérence et la migration de cellules de GBM

deux composés sont tous les deux capables d'inhiber la phosphorylation de FAK, suggérant que les deux intégrines régulent cette voie de signalisation.

FAK étant un composant des points focaux d'adhérence, structures importantes dans la migration, l'étude par immunocytochimie de cellules U87MG- $\alpha 5+$  et U87MG- $\alpha 5-$  traitées au K34c est en cours de réalisation afin d'observer la localisation de FAK-P (Tyr397) (Figure 27). D'après les premières images présentées ici, on observe que dans les cellules U87MG- $\alpha 5+$  et les cellules U87MG- $\alpha 5-$  la localisation de la protéine FAK active n'est pas la même. Dans le cas des cellules U87MG- $\alpha 5+$ , FAK-P se situerait principalement sur des points d'adhérence en périphérie de la cellule, tandis que pour les cellules U87MG- $\alpha 5-$  une répartition plus aléatoire dans le centre de la cellule est observée en plus de la présence en périphérie. La répression de l'expression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  influerait donc sur la répartition de la protéine FAK activée dans les cellules.



**Figure 27 Etude immunocytochimique de FAK-P et actine.**

Photos d'immunocytochimie réalisées sur les cellules U87MG- $\alpha 5+$  et U87MG- $\alpha 5-$  traitées au K34c pour FAK-P (vert), l'actine (rouge) et le noyau (bleu). Résultats préliminaires.

Lors du traitement des cellules par le K34c on observe un changement morphologique pour les cellules U87MG- $\alpha 5+$  ainsi qu'une diminution des points d'adhérence. Le K34c diminue la présence de FAK-P au centre de la cellule mais pas en

périphérie des cellules U87MG- $\alpha 5$ -. Ces résultats nécessitent une étude plus approfondie réalisée avec nos autres composés pour pouvoir en tirer des conclusions solides.

#### II.C.4. Analyse de la protéine FAK sur les cellules U373MG

L'étude de l'activité de la protéine FAK par Western blot a été réalisée sur les cellules U373MG avec le K34c et le K34a (Figure 28).

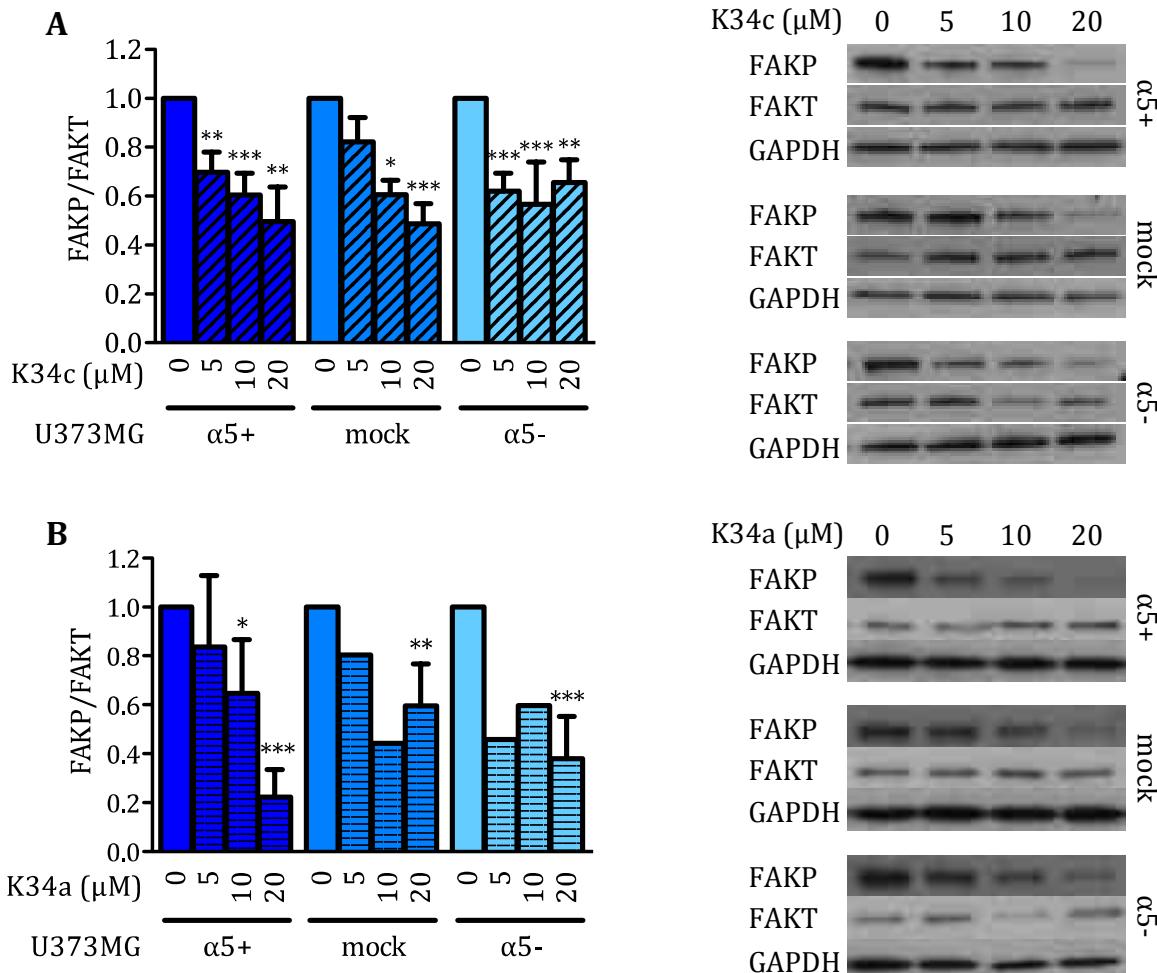


Figure 28 Effet des antagonistes K34c et K34a sur la protéine FAK sur les U373MG.

**A.** Histogramme représentant l'effet du K34c sur la phosphorylation de la protéine FAK phosphorylée par rapport à la protéine FAK totale (gauche) mesurée par Western Blot (droite). **B.** Histogramme représentant l'effet du K34a sur la phosphorylation de la protéine FAK phosphorylée par rapport à la protéine FAK totale (gauche) mesurée par Western Blot (droite), résultats préliminaires.

Le K34c inhibe la phosphorylation de FAK sur la tyrosine 397 quelque soit sa concentration et l'expression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  par les cellules. D'après les résultats préliminaires obtenus avec le K34a (N=1 pour les concentrations de 5 et 10  $\mu$ M pour les cellules U373MG-mock et U373MG- $\alpha 5$ -), il semble que le composé inhibe également la

phosphorylation de FAK quelque soit l'expression d' $\alpha 5\beta 1$ . Ces deux composés ont donc un effet indépendant de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  dans les cellules U373MG. Ces résultats correspondent aux résultats obtenus pour la migration collective de ces cellules.

Le K34c et le K34a inhibent donc la migration des cellules U373MG indépendamment de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  potentiellement en inhibant la phosphorylation de la protéine FAK sur la tyrosine 397.

*La migration collective des cellules de glioblastomes que nous avons étudiée n'est pas dépendante de l'expression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . Les antagonistes utilisés ont des effets dépendants du contexte cellulaire révélant une composant  $\alpha 5$ ,  $\alpha V$  ou mixte. Les antagonistes d'intégrines, qu'ils ciblent l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  ou  $\alpha V\beta 3$  semblent être de bons candidats pour inhiber la migration collective des cellules de glioblastome U87MG. Pour les cellules U373MG seule l'inhibition de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  semble avoir un impact sur la migration.*

*Ces résultats montrent encore une réelle complexité dans la réponse des cellules aux traitements par les antagonistes d'intégrines. Ce test ne permet pas de faire la différence entre les effets des antagonistes de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  de ceux de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$ . Nous souhaitons étudier si cette complexité est toujours présente lors de la migration de cellules individuelles.*

## II.D. Effet des intégrines $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha V\beta 3$ dans la migration de cellules isolées de glioblastomes

Pour observer la migration des cellules isolées, les cellules sont ensemencées à très faible densité pour permettre leur isolement. Nous suivons par microscopie le noyau de cellules marquées par un fluorophore non toxique durant les 6h qui suivent le traitement par nos composés. Cette technique permet de définir exactement le comportement de cellules seules (vitesse, persistance du mouvement), sans contrainte directionnelle.

### II.D.1. Migration des cellules U87MG isolées

L'analyse de la migration des cellules isolées U87MG (Figure 29A) montre une corrélation entre l'expression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  et la vitesse de migration des cellules. Les cellules U87MG- $\alpha 5+$  ( $0,24\mu\text{m}/\text{min} \pm 0,005$ ) migrent plus vite que les cellules qui ont un niveau basal d'expression ( $0,21\mu\text{m}/\text{min} \pm 0,005$ ) et que les cellules qui expriment peu l'intégrine ( $0,15\mu\text{m}/\text{min} \pm 0,002$ ). Cette différence de migration est très visible sur les tracés migratoires des cellules (Figure 29B).

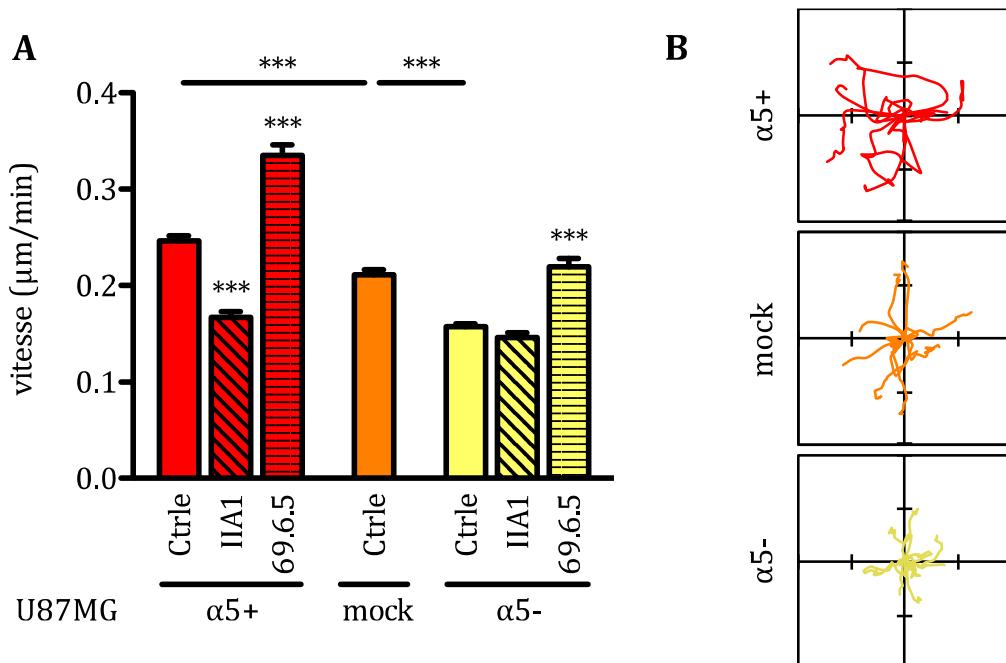


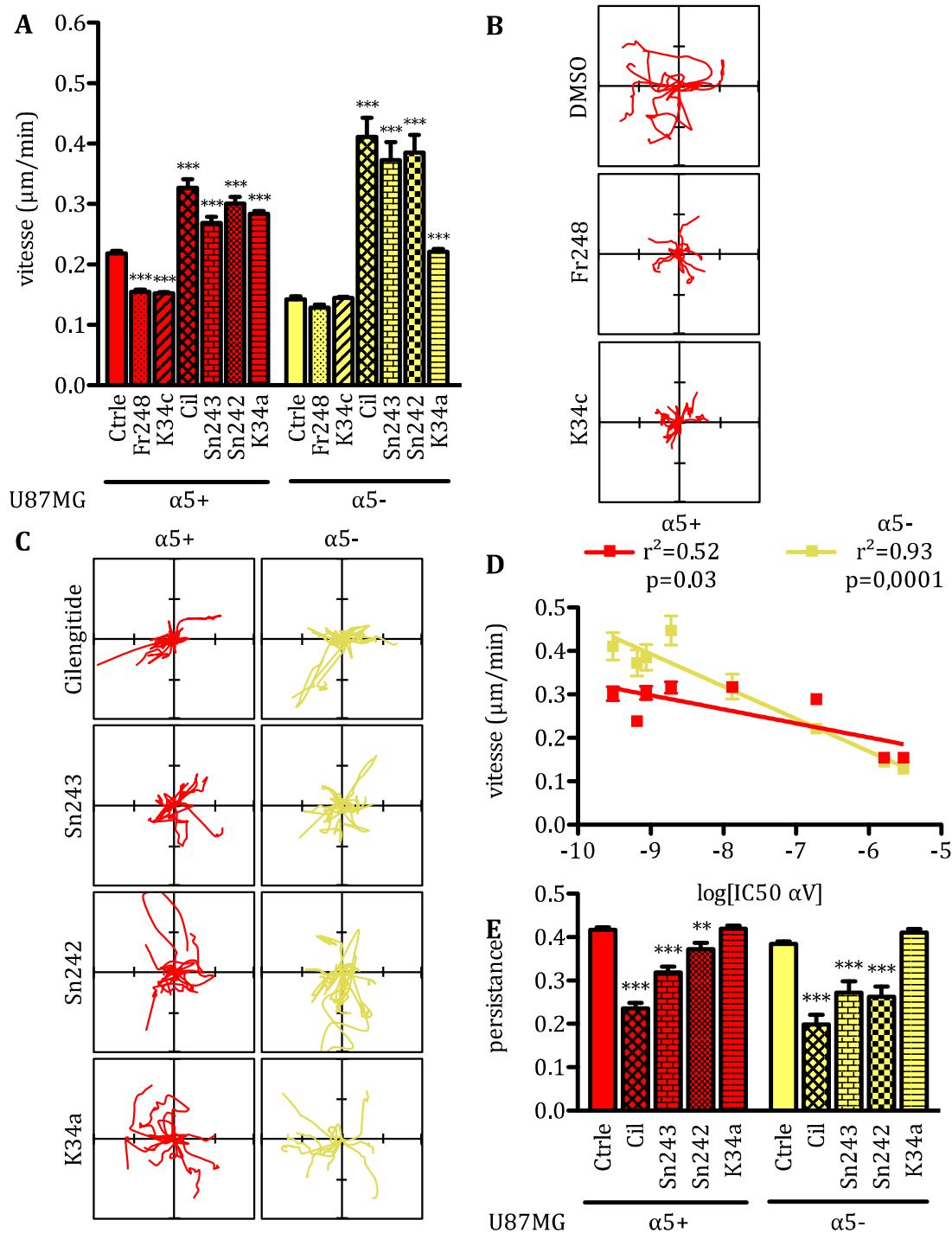
Figure 29 Migration des cellules U87MG isolées.

A. Histogramme représentant la vitesse des cellules U87MG seules ou traitées avec les anticorps IIA1 et 69.6.5 ( $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ). B. Rose des vents représentant le trajet effectué par 10 cellules représentatives, graduation à  $50\mu\text{m}$ .

L'utilisation des anticorps IIA1 et 69.6.5 nous permettent de définir l'implication des intégrines  $\alpha 5\beta 1$  et  $\alpha V$  dans cette migration. On remarque que le IIA1 inhibe la vitesse de migration des cellules U87MG- $\alpha 5+$ , mais n'a pas d'impact sur la migration des cellules  $\alpha 5-$ . Ces résultats confirment la qualité pro-migratoire de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  dans ce modèle. Curieusement, le 69.6.5 active la migration des cellules quelque soit le taux d'expression d' $\alpha 5\beta 1$ . Les intégrines  $\alpha V$  semblent avoir un rôle anti-migratoire dans ce modèle.

Nous avons testé les différents antagonistes sur les cellules U87MG- $\alpha 5+$  et U87MG- $\alpha 5-$  (Figure 30). Le K34c et le Fr248 inhibent la migration des cellules  $\alpha 5+$  (31% et 33% d'inhibition respectivement) (Figure 30A) mais n'ont pas d'effet sur les cellules  $\alpha 5-$ . Ce résultat est cohérent avec l'inhibition observée lors du traitement avec l'anticorps IIA1. On remarque bien cette inhibition sur les tracés migratoires (Figure 30B). Le blocage de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  inhibe la migration des cellules isolées U87MG, l'effet observé est totalement dépendant de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ .

Les molécules sélectives de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  et le K34a activent la migration des cellules  $\alpha 5+$  et  $\alpha 5-$  (Sn243 : 23%, Sn242 : 38%, Cilengitide : 50% d'activation sur les cellules U87MG- $\alpha 5+$ ), comme dans le cas du 69.6.5 (Figure 30A). L'inhibition de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  active donc la migration des cellules. Il existe une corrélation entre l'affinité de ces composés pour l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  et la vitesse de migration des cellules (Figure 30D). Cette corrélation est meilleure dans les cellules qui expriment peu l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . Sur les tracés migratoires l'activation de la migration est difficilement visible (Figure 30C), en effet les cellules semblent rester dans un rayon très proche de leur point de départ. On a donc mesuré la persistance du mouvement des cellules en divisant la distance totale parcourue par les cellules dans le temps, par la distance entre le point d'origine et le point d'arrivée des cellules dans ce même laps de temps. On observe que les molécules sélectives de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  diminuent la persistance du mouvement des cellules (Figure 30E). Seul le K34a, dont les affinités sont équivalentes pour les deux intégrines, n'a pas d'effet sur la persistance du mouvement des cellules.

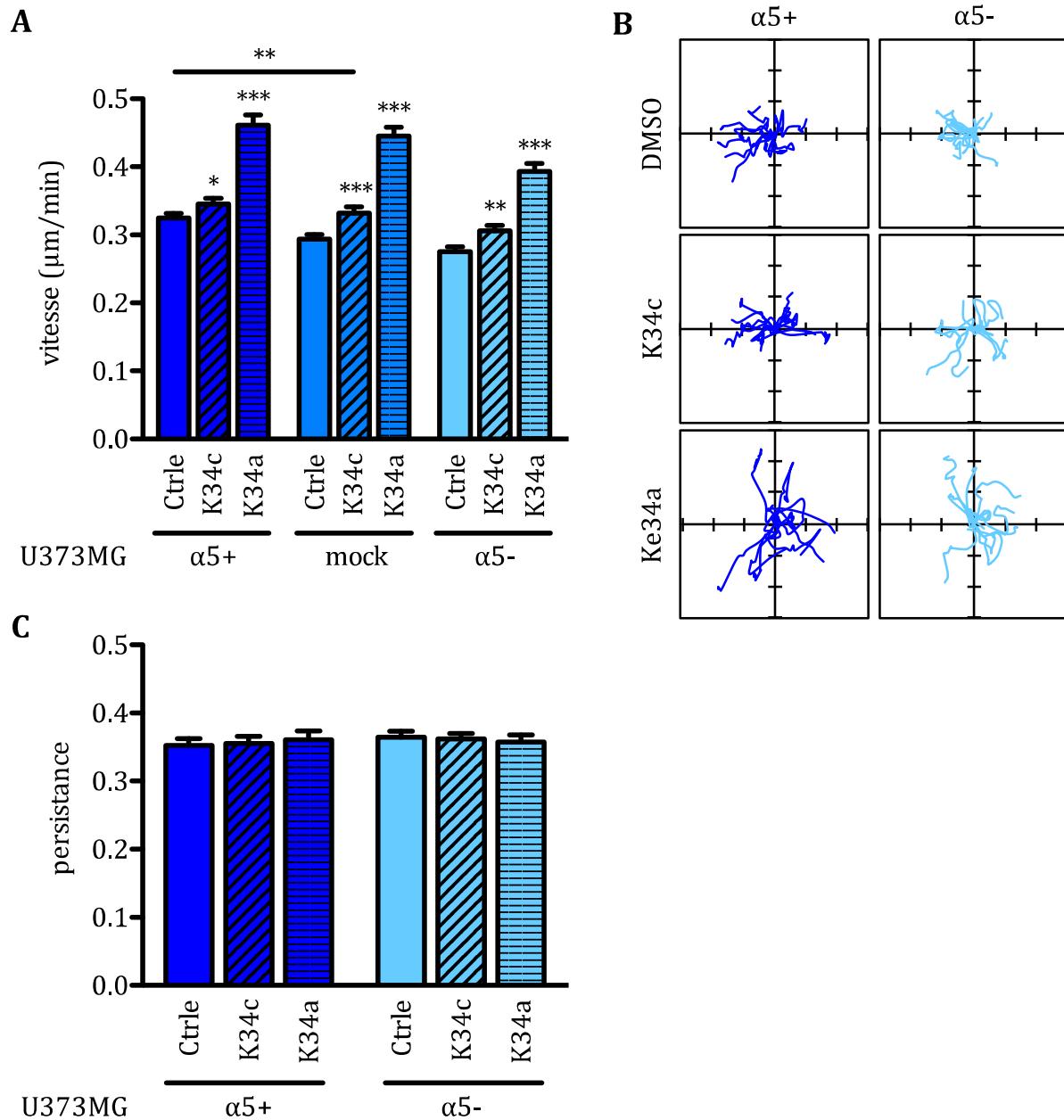


**Figure 30 Effets des différents antagonistes sur la migration des cellules U87MG isolées.**

**A.** Histogramme représentant les vitesses des cellules traitées avec les antagonistes ( $20\mu\text{M}$ ) ou le solvant (DMSO 0,02%). **B.** Roses des vents représentant le trajet migratoire de 10 cellules U87MG- $\alpha 5+$  représentatives des résultats obtenus pour les traitements au K34c et Fr248. **C.** Roses des vents représentant le trajet migratoire de 10 cellules représentatives des résultats pour les traitements des antagonistes de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$ . **D.** Corrélation entre l'IC50 pour l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  des différents antagonistes et la vitesse de migration des cellules U87MG- $\alpha 5+$  et U87MG- $\alpha 5-$ . **E.** Histogramme représentant la persistance des cellules traitées avec les antagonistes de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  ( $20\mu\text{M}$ ) ou le solvant (DMSO 0,2%).

### II.D.2. Migration des cellules U373MG isolées

Nous avons réalisé le même type d'expérience sur les cellules U373MG (Figure 31).



**Figure 31 Migration des cellules U373MG isolées et les effets des antagonistes.**

A. Histogramme représentant la vitesse de migration des cellules U373MG en fonction de l'expression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  et des différents antagonistes utilisés (20 $\mu\text{M}$ ). B. Roses des vents des différentes conditions étudiées de 10 cellules représentatives, 50 $\mu\text{m}$  par graduation. C. Histogramme représentant la persistance du mouvement de migration des cellules U373MG- $\alpha 5^+$  et U373MG- $\alpha 5^-$  traitées au DMSO (0,2%) ou avec le K34c ou le K34a (20 $\mu\text{M}$ ).

On observe d'abord que seule la surexpression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  augmente faiblement la vitesse de migration des cellules (augmentation de 10% par rapport aux cellules mock), sa sous-expression n'a pas d'impact sur la migration des cellules (Figure 31A). Cette variation est légèrement visible sur les tracés migratoires des cellules (Figure 31B). L'antagoniste de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , le K34c, augmente la vitesse de migration des cellules quelque soit leur taux d'expression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . Son effet est donc indépendant de l'intégrine, et on peut penser qu'il agit sur l'intégrine  $\alpha V\beta 3$ . Le K34a augmente lui aussi la migration des cellules indépendamment de l'expression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . Aucun effet sur la persistance de la migration n'est mesuré dans ces expériences (Figure 31C) ni avec le K34c ni avec le K34a. Il est à noter que le K34a n'a pas d'effet non plus sur la persistance de migration des cellules U87MG (Figure 30E) dû, peut-être, à son affinité équivalente et faible sur les 2 intégrines considérées. D'autres antagonistes de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  devront être évalués dans les cellules U373MG.

*Pour les cellules U87MG, la vitesse de migration des cellules est dépendante de l'expression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . Les antagonistes sélectifs de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , le Fr248 et le K34c, ainsi que l'anticorps IIA1 inhibent la migration des cellules en fonction du taux d'expression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . Ces résultats montrent que la migration des cellules U87MG isolées est dépendante de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . L'intégrine  $\alpha V\beta 3$  a un effet inverse de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  sur la migration dans ce modèle et de plus semble réguler la persistance du mouvement des cellules U87MG.*

*La surexpression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  augmente légèrement la vitesse de migration des cellules U373MG, mais l'antagoniste K34c de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  a un effet activateur de migration dans ce modèle. Ces cellules n'ont donc pas une migration dépendante de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . L'étude de l'implication de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  dans la persistance du mouvement des cellules U373MG nécessite l'utilisation d'autres antagonistes sélectifs de cette intégrine.*

*L'utilisation des cellules U87MG nous permet de différencier clairement les effets des antagonistes de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  de ceux de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$ .*

## II.E. Conclusion et Discussion

Les intégrines, de par leur implication dans l'adhérence, la migration et la prolifération des cellules, sont de plus en plus étudiées comme cibles thérapeutiques dans différents cancers (Cox et al., 2010; Desgroellier & Cheresh, 2010). Nous abordons ici la question de l'implication de deux intégrines,  $\alpha 5\beta 1$  et  $\alpha V\beta 3$ , dans l'adhérence et la migration de cellules de glioblastomes par l'utilisation d'antagonistes sélectifs de ces intégrines. Nos résultats montrent que l'expression de ces intégrines impactent non seulement l'adhérence et la migration mais également la réponse aux traitements par des antagonistes spécifiques dans un contexte cellulaire. De plus, nous avons mis au point un test de migration sur cellules isolées permettant la caractérisation fonctionnelle de nouveaux antagonistes sélectifs.

Les intégrines ont tout d'abord été décrites comme des protéines impliquées dans l'adhérence des cellules à la matrice extracellulaire. Elles sont à l'heure actuelle de plus en plus étudiées pour leur rôle dans la migration et la prolifération des cellules. Nous nous sommes servis de deux lignées de glioblastomes, U87MG et U373MG, exprimant différentes intégrines dont  $\alpha 5\beta 1$  et  $\alpha V\beta 3$ . Seule l'expression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  a été génétiquement manipulée. Ces modèles nous permettent de mieux rendre compte de l'effet de ces deux intégrines,  $\alpha 5\beta 1$  et  $\alpha V\beta 3$ , sur des tissus tumoraux par l'utilisation d'antagonistes ciblant ces intégrines. Les deux lignées cellulaires ont des comportements bien distincts en ce qui concerne l'adhérence et la migration (Tableau 6A). Tout d'abord, la lignée U87MG montre une dépendance claire à l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  pour l'adhérence à la fibronectine des cellules et pour la migration de cellules isolées. Cependant l'adhérence à la vitronectine et la migration après blessure semblent dépendantes des deux intégrines  $\alpha 5\beta 1$  et  $\alpha V\beta 3$ . Pour les cellules U373MG, l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  régit l'adhérence à la vitronectine, ainsi que la migration collective et isolée des cellules. Mais une balance impliquant les deux intégrines  $\alpha 5\beta 1$  et  $\alpha V\beta 3$  semble guider l'adhérence à la fibronectine. Ces résultats suggèrent qu'au moins deux populations de glioblastomes pourraient être séparées, dont l'une serait dépendante de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  pour son caractère invasif du tissu cérébral et de ce fait plus sensible aux antagonistes de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . Ces résultats sont cohérents avec une étude plus ancienne des cellules de glioblastome U251 (Kita et al., 2001) montrant l'implication de l'intégrine

$\alpha 5\beta 1$  dans l'adhérence, l'étalement et la migration des cellules sur fibronectine au dépend de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  (Pijuan-Thompson & Gladson, 1997). L'étude *in vivo* de lignées de glioblastomes murins implantées dans les cerveaux des souris montrent également le rôle important des intégrines  $\beta 1$  dans la diffusion des glioblastomes (Paulus et al., 1996). De la même manière, deux phénotypes de glioblastomes résistants à une thérapie anti-angiogénique ont été récemment décrits (DeLay et al., 2012). L'un d'entre eux est caractérisé par une forte prolifération et l'autre par une forte invasion. Seule la population caractérisée par une forte invasion possède une surexpression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  ainsi que de son ligand, la fibronectine.

L'implication respective de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  et  $\alpha V\beta 3$  dans la migration des cellules est le sujet de nombreuses études. Une ancienne étude montre la collaboration entre ces deux intégrines pour la migration cellulaire (Bauer et al., 1992). Mais les études plus récentes distinguent les effets des deux intégrines dans l'adhérence (Roca-Cusachs et al., 2009; Rossier et al., 2012), l'étalement (Stachurska et al., 2012) et la migration (Jeanes et al., 2012; White et al., 2007). De plus, la suppression (Worth et al., 2010) ou l'inhibition par le cilengitide (Caswell et al., 2008) de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  augmente la vitesse de migration par l'activation de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . En accord avec ces données de la littérature, dans notre modèle, la migration des cellules est plus rapide et moins persistante lorsque l'on utilise des antagonistes d' $\alpha V\beta 3$ , elle est inhibée avec des antagonistes sélectifs de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . Les antagonistes des deux intégrines inactivent la même phosphorylation de la protéine FAK. La différence d'action des deux intégrines sur la migration n'est donc pas due à l'effet des composés sur la phosphorylation de la protéine FAK. Les recherches actuelles s'orientent vers un contrôle mutuel des deux intégrines sur leur endocytose et leur recyclage, ainsi que le rôle de ces deux phénomènes dans la migration des cellules (Bridgewater et al., 2012; Danen et al., 2005; White et al., 2007). Une étude complémentaire avec nos modèles permettrait de définir le rôle de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  dans l'activation des voies de recyclage et d'endocytose de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ .

Des antagonistes sélectifs de l'une ou l'autre des intégrines sont des outils importants pour étudier le rôle respectif des intégrines  $\alpha 5\beta 1$  et  $\alpha V\beta 3$  dans les processus tumoraux tels que la migration ou la prolifération des cellules. Nous nous sommes servis

de différents antagonistes des intégrines  $\alpha 5\beta 1$  et  $\alpha V\beta 3$  que nous classons en trois catégories : les antagonistes sélectifs de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  (Fr248 et K34c), les antagonistes sélectifs de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  (Sn243, Sn242 et cilengitide) et les antagonistes non sélectifs (K34a). Ce classement est réalisé à partir des IC50 de ces composés sur l'adhérence d'intégrines purifiées à leur ligand principal. Nous avons résumé l'ensemble de nos résultats dans le Tableau 6B.

Dans le cas des antagonistes de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  (Sn243, Cilengitide), une partie des données n'a pas encore été produite, mais nos premiers résultats montrent que, quelque soit la lignée, l'effet de ces molécules semble passer par l'intégrine  $\alpha V\beta 3$ . Des expériences supplémentaires permettront de compléter ces résultats et appuyer cette conclusion.

Pour le K34a, qui n'est sélectif d'aucune des deux intégrines étudiées, seule l'inhibition de la phosphorylation de la protéine FAK sur la lignée U87MG est dépendante des deux intégrines, les effets sur l'adhérence, la migration collective et la migration isolée pour les deux lignées cellulaires, ainsi que l'inhibition de la phosphorylation de la protéine FAK pour les cellules U373MG sont dépendants de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$ .

Mais l'effet des antagonistes de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  semble dépendant du contexte cellulaire. En effet, le K34c et le Fr248 ont un effet dépendant de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  pour la lignée U87MG, dans laquelle cette intégrine a un rôle prépondérant pour les migrations étudiées et l'inhibition de la phosphorylation de la protéine FAK. Par contre, ils inhibent partiellement l'adhérence des cellules U87MG à la vitronectine suggérant une interaction avec d'autres acteurs de cette adhérence (Tableau 6A). Des résultats différents sont obtenus dans le contexte des cellules U373MG qui sont principalement dépendantes de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$ . Le K34c agit comme un antagoniste de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  dans l'ensemble des tests sauf pour l'adhérence cellulaire où il agit sur l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  et l'intégrine  $\alpha V\beta 3$ . Le Fr248 évalué pour le moment uniquement sur l'adhérence cellulaire à la fibronectine et à la vitronectine, montre une activité sur l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  mais également sur une autre intégrine non identifiée. Le rapport entre l'affinité mesurée, la sélectivité qui en découle et l'effet sur les cellules tumorales, semble donc soumis à la dépendance d'une cellule à une intégrine donnée.

Les sélectivités des composés sont déduites de test d'adhérence sur protéines purifiées et non à partir de forces de liaison mesurées. Plusieurs tests d'adhérence

permettant de déduire les IC50 des composés ont été mis au point, ils sont réalisés soit sur protéines purifiées par ELISA (Heckmann et al., 2008) ou par technologie ECL<sup>1</sup> (« Enhanced ChemiLuminescence ») (Delouvrie et al., 2012a; Delouvrie et al., 2012b), soit sur des cellules n'exprimant principalement que l'intégrine ciblée (Tolomelli et al., 2011). La question de la relation entre les IC50 mesurées à partir de tests sur protéines purifiées et les IC50 de ces mêmes composés sur des cellules doit se poser. Dans une étude récente (Frank et al., 2010), les peptides cycliques de type RGD ont été sélectionnés pour leur IC50 grâce à des tests d'inhibition d'adhérence utilisant des intégrines purifiées. Ils ont ensuite été testés sur l'adhérence de fibroblastes de souris exprimant soit l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , soit l'intégrine  $\alpha V\beta 3$ . Dans cette étude, un rapport d'environ deux unités logarithmiques est trouvé entre l'IC50 mesurée pour l'inhibition de l'adhérence de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  purifiée à celle mesurée sur des cellules exprimant uniquement cette intégrine sur fibronectine. Un rapport beaucoup plus faible peut être calculé pour l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  (en dessous d'un log) mais le test de la liaison des cellules exprimant l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  est réalisé sur fibronectine alors que celui utilisant l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  purifiée a été réalisé sur vitronectine. Les résultats ne sont donc pas directement comparables. Cependant, l'ordre d'efficacité des composés est toujours conservé, les molécules dont l'IC50 est la plus faible dans les tests sur intégrines purifiées restent les meilleures dans les tests sur cellules. Pour les tests sur cellules, les auteurs ne souhaitent plus parler de sélectivité. L'expression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  par la première lignée de fibroblastes n'est pas équivalente à l'expression de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  par la seconde lignée de fibroblastes. La quantité d'intégrine n'étant pas la même dans ces deux lignées, on ne peut pas comparer l'effet d'une molécule sur la lignée exprimant  $\alpha 5\beta 1$  à son effet sur les cellules qui expriment  $\alpha V\beta 3$ . Seule la comparaison des effets de deux molécules sur la même lignée est effectuée par les auteurs.

Dans notre cas, on observe une frontière entre les affinités déduites des IC50 mesurées dans les tests réalisés sur intégrines purifiées et l'effet mesuré sur les cellules dépendantes de l'intégrine étudiée. Si on prend le cas de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$ , les composés cilengitide, Sn243, Sn242 et K34a ont les mêmes effets sur l'adhérence quelque soit la cellule ou la matrice observée (Figure 19 et Figure 22) et leur effet est toujours

---

<sup>1</sup> Technique breveté par les auteurs de l'étude (WO2007/141473) basé sur une technologie produite par Roche, permettant la détection de la liaison d'un composé en solution par l'utilisation d'un complexe au Ruthénium.

dépendant de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  (Tableau 6). Or leur IC50 mesurée sur intégrine purifiée varie de 0,3nM à 190nM (Tableau 5). Même le K34c, dont l'IC50 est de 1624nM, ou le Fr248, avec une IC50 de 10000nM pour l'intégrine  $\alpha V\beta 3$ , inhibent l'adhérence des cellules U87MG sur la vitronectine en agissant potentiellement sur l'intégrine  $\alpha V\beta 3$ . Il semblerait, d'après nos résultats, que les composés de faible affinité pour l'intégrine  $\alpha V\beta 3$ , seraient néanmoins capables (à forte concentration) de déplacer la liaison entre l'intégrine et la vitronectine. Par contre, dans le cas de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , même le cilengitide, avec une IC50 de 10nM pour cette intégrine, n'a pas d'effet inhibiteur de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  sur les cellules utilisées. Seuls les composés K34c et Fr248 (IC50 de 3,1 et 2,8nM respectivement) agissent sur les cellules par l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . Ainsi, seuls les composés à très forte affinité pour l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  semblent capables d'inhiber la liaison de l'intégrine à la fibronectine dans nos modèles cellulaires. Cette disparité est certainement due à la différence entre la liaison de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  à la fibronectine et celle de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  à la vitronectine. La taille et l'ouverture de la poche de liaison des deux intégrines a été suggérée comme différence probable (Altroff et al., 2004). De plus, l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  se lie à la fibronectine par la séquence synergique (Aota et al., 1994) en plus de la séquence RGD. Plusieurs études montrent que cette partie permet de stabiliser la liaison à la fibronectine et donc la rendre plus difficile à inhiber (Livant et al., 2000a; Livant et al., 2000b)

Dans ce travail, nous avons mis au point un test fonctionnel basé sur l'étude de la migration de cellules isolées. Nous avons montré que les antagonistes de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  inhibaient cette migration alors que ceux de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  l'augmentaient. Ce test permet donc une bonne discrimination de la sélectivité des antagonistes. L'utilisation d'un tel test fonctionnel, non plus basé sur la fonction d'adhérence des intégrines, mais sur leur implication dans la migration, permettrait de passer outre les problèmes soulevés par les tests d'adhérence et de discriminer directement les antagonistes de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  de ceux de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$ . Il permet également la sélection non plus de compétiteurs de la fibronectine, mais d'antagonistes fonctionnels et allostériques.

**A**

	Adhérence	Migration collective	Migration isolée
U87MG	Fn	Fn	
U373MG	Vn	Vn	

■  $\alpha 5\beta 1$ 
■  $\alpha V\beta 3$

**B**

	Adhérence	Migration collective	FAK-P	Migration isolée
Fr248	U87MG	?	NE	
	U373MG	?	NE	NE
K34c	U87MG	?		
	U373MG	?		
Sn243	U87MG		NE	
	U373MG		NE	NE
K34a	U87MG			?
	U373MG			
Cilengitide	U87MG		NE	NE
	U373MG		NE	NE

**Tableau 6 Tableau récapitulatif de l'implication des intégrines  $\alpha 5\beta 1$  et  $\alpha V\beta 3$ .**

**A.** Tableau récapitulatif des résultats précédents de l'implication des intégrines  $\alpha 5\beta 1$  (rouge) et  $\alpha V\beta 3$  (vert) dans les deux lignées cellulaires étudiées pour les différents tests réalisés. **B.** Tableau récapitulatif des résultats précédents de l'implication des intégrines  $\alpha 5\beta 1$  (rouge) et  $\alpha V\beta 3$  (vert) dans l'effet des différents antagonistes utilisés (NE : non évalué).

## II.F. Matériel et méthodes

### II.F.1. Culture cellulaire

Les lignées de cellules tumorales humaines U87MG (ATCC) et U373MG (ECACC) de glioblastomes sont maintenues dans du milieu EMEM (Lonza) supplémenté à 10% de sérum de veau fœtal (FBS) (Lonza), 200IU/ml de peniciline/streptomycine (Lonza) et 0,6mg/ml de glutamine (Lonza), dans un incubateur sous atmosphère humide à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>.

Les cellules ont été transfectées de manière stable pour sur-exprimer (par transfection avec un plasmide pcDNA3.1 contenant le gène de l'intégrine  $\alpha 5$  humaine, donné par le Dr Ruoshlati, Université de Californie, Santa Barbara) ou sous-exprimer (par transfection d'un plasmide pSM2 codant pour un shRNA ciblant l'ARNm de l'intégrine  $\alpha 5$ , OpenBiosystems) la sous-unité  $\alpha 5$  de l'intégrine en utilisant jetPRIME (Polyplus transfection) selon les instructions du fabricant.

### II.F.2. Cytométrie en flux

Les cellules sont collectées avec de l'EDTA/PBS (2mM). Elles sont incubées avec l'anticorps monoclonal de souris reconnaissant l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  IIA1 (1:100, BD Bioscience) durant 30min à 4°C puis avec l'anticorps secondaire couplé à l'Alexa-Fluor 488 de chèvre ciblant les anticorps de souris (1 :500, JacksonImmunoResearch Laboratories) pendant 30min à 4°C. Un total de 20 000 cellules sont analysées avec le cytomètre en flux FACS Calibur (Bectom-Dikinson, San Diego, USA). L'intensité de fluorescence caractérisant l'expression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  à la surface des cellules est mesurée par le logiciel FlowJo (Tree Star Inc).

### II.F.3. Test de l'adhérence cellulaire

Les cellules sont collectées à l'aide de l'EDTA/PBS (2mM). Elles (4 500cellules/puits) sont ensuite incubées avec les antagonistes (20 $\mu$ M) ou du solvant (DMSO 0,2%) dans du milieu EMEM/HEPES (Lonza) supplémenté avec 0,2% BSA durant 30min, puis ensemencées (4 500cellules/puits) dans une plaque 96 puits coatée la veille avec de la fibronectine (Pr Carreira, Cergy-Pontoise, France) ou de la vitronectine (Pr Luis, Marseille, France) et bloquée (PBS/BSA 0,2%) pendant 1h. Chaque condition est réalisée

en triplicat. L'adhérence cellulaire est mesurée après rinçage, fixation (PBS/glutaraldéhyde 0,1%) et coloration au crystal violet (0,25% éthanol, w/v). Un rinçage et une dilution dans une solution de SDS à 0,5% sont ensuite réalisés puis une lecture de l'absorbance à 595nm. Le coating à la poly-L-lysine (10µg/ml, Sigma) est utilisé pour mesurer 100% de l'adhérence des cellules, celui à la BSA pour définir le bruit de fond.

#### **II.F.4. Test de migration collective par blessure/cicatrisation**

Après leur collecte à l'aide de la trypside/EDTA (Lonza), les cellules (25 000cellules/ml, 0,5mL/puits) sont ensemencées dans des plaques 24puits ImageLock™ (Essen Bioscience). Après 24h d'incubation, une blessure est réalisée au milieu de la monocouche confluente de cellules avec le wound-maker™, cet outil permet d'obtenir une blessure précise et reproductible sur l'ensemble des puits. Les débris cellulaires sont éliminés par lavage au PBS et les cellules sont incubées dans du milieu neuf complémenté à 10% de FBS avec le solvant ou les antagonistes aux concentrations indiquées dans chaque test. Chaque condition est réalisée en dupliquat. Le logiciel Incucyte™ Scratch Wound est utilisé pour la capture et l'analyse des images pendant 24h (3 images par puits et par heure). La fermeture de la blessure est automatiquement calculée en utilisant la densité cellulaire relative.

#### **II.F.5. Migration de cellules isolées**

Après collecte à l'aide de trypsine/EDTA (Lonza), les cellules sont ensemencées à très faible densité (500 cellules/puits) avec 1µg/ml de Hoechst33423 (Sigma) dans une plaque noire 96 puits µClear (Dutscher, France) dans du milieu L-15 (Sigma) supplémenté avec 10% de FBS. Après 24h, le milieu est retiré, et du milieu contenant le Hoechst ainsi que les antagonistes ou le solvant est ajouté. La migration des cellules est suivie par un microscope à fluorescence (In Cell Analyzer 1000, GE Healthcare) pendant 8h. Les analyses sont réalisées seulement sur les cellules suivies sur la totalité du temps de l'expérience. La vitesse et les trajectoires sont exploitées avec Excel à partir du fichier contenant la position de chaque cellule et à chaque temps. La persistance correspond au rapport entre la distance totale parcourue et la distance entre le point de départ et le point d'arrivée des cellules.

#### **II.F.6. Analyses Western Blot**

Après récupération des cellules à l'aide de la trypsine/EDTA, les cellules (20 000cellules/puits) sont ensemencées dans une plaque 6 puits traitée pour la culture cellulaire. Elles sont incubées pendant 2h dans du milieu EMEM complémentée avec 2% de FBS avec les antagonistes ou le solvant. Les cellules non adhérées sont récupérées, centrifugées et mis en commun avec les cellules adhérées lysées dans du tampon Laemmli (BioRad). Les protéines sont séparées sur un gel SDS-PAGE (Biorad) précoulé et transférées sur une membrane de PVDF (GE Healthcare). Les membranes sont incubées avec les anticorps primaires puis avec les anticorps secondaire couplés HRP (1:10 000, Promega). Les protéines sont visualisées avec la technique « enhanced chemiluminescence » (ECL, Biorad), et les analyses effectuées avec le logiciel ImageJ.

Anticorps primaires utilisés : FAK-T (1:1 000, 610088, BDTransduction Laboratories), FAK-P Tyr397 (1:1 000, 04-974, Millipore) ou GAPDH (1:50 000, MAB374, Chemicon).

#### **II.F.7. Microscopie confocale**

Après récupération par trypsine/EDTA, les cellules (2 000cellules/puits) sont ensemencées à faible densité sur des boites  $\mu$ -Dishes (Ibidi) coatées la veille à la fibronectine (10 $\mu$ g/ml) durant 24h. Les cellules sont ensuite incubées avec les antagonistes (20 $\mu$ M) ou le solvant (0,2%). Après 4h d'incubation, les cellules sont fixées (4% de paraformaldehyde) pendant 10min, perméabilisées (Triton-X100 à 0,1%) pendant 5min, bloquées (PBS/BSA 1%) pendant 1h et incubées avec les anticorps primaires dilués (1:300 ; PBS/BSA 1%) durant 1h à température ambiante. Après plusieurs lavages (PBS), les cellules sont incubées avec les anticorps secondaires (1:400 ; PBS/BSA 1%) pour 1h, lavées (PBS) et observées au microscope confocal (Leica TCS SPE-II, HXC PL APO 63x/1.40 OIL CS). Les images de coupes (axe Z) de 0.2 $\mu$ m sont réalisées grâce au logiciel LAS-AF. Le logiciel ImageJ est utilisé pour le traitement et l'analyse des images.

Les anticorps primaires et sondes utilisés sont : p-FAK (44-625G, Invitrogen), Anti-lapin couplé Alexa Fluor® 488 (A11008, Invitrogen), la phalloïdine et le DAPI.

#### **II.F.8. Analyses statistiques**

Les résultats sont représentés par la moyenne  $\pm$  SEM. Les valeurs sont obtenues à partir d'au moins 3 expériences indépendantes (sauf mention contraire). Les analyses statistiques sont réalisées par test t de Student avec le logiciel GraphPad Prism pour lequel  $p<0,05$  est considéré comme significatif.

## II.G. Bibliographie

- Altroff, H., Schlinkert, R., van der Walle, C. F., Bernini, A., Campbell, I. D., Werner, J. M., & Mardon, H. J. (2004) Interdomain tilt angle determines integrin-dependent function of the ninth and tenth FIII domains of human fibronectin. *J Biol Chem* 279, 55995-56003.
- Aota, S., Nomizu, M., & Yamada, K. M. (1994) The short amino acid sequence Pro-His-Ser-Arg-Asn in human fibronectin enhances cell-adhesive function. *J Biol Chem* 269, 24756-24761.
- Bauer, J. S., Schreiner, C. L., Giancotti, F. G., Ruoslahti, E., & Juliano, R. L. (1992) Motility of fibronectin receptor-deficient cells on fibronectin and vitronectin: collaborative interactions among integrins. *J Cell Biol* 116, 477-487.
- Bridgewater, R. E., Norman, J. C., & Caswell, P. T. (2012) Integrin trafficking at a glance. *J Cell Sci* 125, 3695-3701.
- Caswell, P. T., Chan, M., Lindsay, A. J., McCaffrey, M. W., Boettiger, D., & Norman, J. C. (2008) Rab-coupling protein coordinates recycling of  $\alpha 5\beta 1$  integrin and EGFR1 to promote cell migration in 3D microenvironments *J Cell Biol* 183, 143-55.
- Cox, D., Brennan, M., & Moran, N. (2010) Integrins as therapeutic targets: lessons and opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 9, 804-820.
- Danen, E. H. J., van Rheenen, J., Franken, W., Huvemeers, S., Sonneveld, P., Jalink, K., & Sonnenberg, A. (2005) Integrins control motile strategy through a Rho-cofilin pathway. *J Cell Biol* 169, 515-526.
- DeLay, M., Jahangiri, A., Carbonell, W. S., Hu, Y.-L., Tsao, S., Tom, M. W., Paquette, J., Tokuyasu, T. A., & Aghi, M. K. (2012) Microarray analysis verifies two distinct phenotypes of glioblastomas resistant to antiangiogenic therapy. *Clin Cancer Res* 18, 2930-2942.
- Delouvie, B., Al-Kadhimi, K., Arnould, J.-C., Barry, S. T., Cross, D. A. E., Didelot, M., Gavine, P. R., Germain, H., Harris, C. S., Hughes, A. M., Jude, D. A., Kendrew, J., Lambert-van der Brempt, C., Lohmann, J.-J., Menard, M., Mortlock, A. A., Pass, M., Rooney, C., Vautier, M., Vincent, J. L., & Warin, N. (2012a) Structure-activity relationship of a series of non peptidic RGD integrin antagonists targeting  $\alpha 5\beta 1$ : part 1. *Bioorg Med Chem Lett* 22, 4111-4116.
- Delouvie, B., Al-Kadhimi, K., Arnould, J.-C., Barry, S. T., Cross, D. A. E., Didelot, M., Gavine, P. R., Germain, H., Harris, C. S., Hughes, A. M., Jude, D. A., Kendrew, J., Lambert-van der Brempt, C., Lohmann, J.-J., Menard, M., Mortlock, A. A., Pass, M., Rooney, C., Vautier, M., Vincent, J. L., & Warin, N. (2012b) Structure-activity relationship of a series of non peptidic RGD integrin antagonists targeting  $\alpha 5\beta 1$ : part 2. *Bioorg Med Chem Lett* 22, 4117-4121.
- Desgrosellier, J. S. & Cheresh, D. A. (2010) Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 10, 9-22.
- Frank, A. O., Otto, E., Mas-Moruno, C., Schiller, H. B., Marinelli, L., Cosconati, S., Bochen, A., Vossmeyer, D., Zahn, G., Stragies, R., Novellino, E., & Kessler, H. (2010) Conformational control of integrin-subtype selectivity in isoDGR peptide motifs: a

biological switch. *Angew Chem Int Ed Engl* 49, 9278-9281.

Heckmann, D., Meyer, A., Laufer, B., Zahn, G., Stragies, R., & Kessler, H. (2008) Rational design of highly active and selective ligands for the  $\alpha 5\beta 1$  integrin receptor. *Chembiochem* 9, 1397-1407.

Jeanes, A. I., Wang, P., Moreno-Layseca, P., Paul, N., Cheung, J., Tsang, R., Akhtar, N., Foster, F. M., Brennan, K., & Streuli, C. H. (2012) Specific  $\beta$ -containing integrins exert differential control on proliferation and two-dimensional collective cell migration in mammary epithelial cells. *J Biol Chem* 287, 24103-24112.

Kita, D., Takino, T., Nakada, M., Takahashi, T., Yamashita, J., & Sato, H. (2001) Expression of dominant-negative form of Ets-1 suppresses fibronectin-stimulated cell adhesion and migration through down-regulation of integrin  $\alpha 5$  expression in U251 glioma cell line. *Cancer Res* 61, 7985-7991.

Lehmann, M., Rabenandrasana, C., Tamura, R., Lissitzky, J. C., Quaranta, V., Pichon, J., & Marvaldi, J. (1994) A monoclonal antibody inhibits adhesion to fibronectin and vitronectin of a colon carcinoma cell line and recognizes the integrins  $\alpha v\beta 3$ ,  $\alpha v\beta 5$ , and  $\alpha v\beta 6$ . *Cancer Res* 54, 2102-2107.

Livant, D. L., Brabec, R. K., Kurachi, K., Allen, D. L., Wu, Y., Haaseth, R., Andrews, P., Ethier, S. P., & Markwart, S. (2000a) The PHSRN sequence induces extracellular matrix invasion and accelerates wound healing in obese diabetic mice. *J Clin Invest* 105, 1537-45.

Livant, D. L., Brabec, R. K., Pienta, K. J., Allen, D. L., Kurachi, K., Markwart, S., & Upadhyaya, A. (2000b) Anti-invasive, antitumorigenic, and antimetastatic activities of the PHSCN sequence in prostate carcinoma. *Cancer Res* 60, 309-20.

Paulus, W., Baur, I., Beutler, A. S., & Reeves, S. A. (1996) Diffuse brain invasion of glioma cells requires  $\beta 1$  integrins. *Lab Invest* 75, 819-826.

Pijuan-Thompson, V. & Gladson, C. L. (1997) Ligation of integrin  $\alpha 5\beta 1$  is required for internalization of vitronectin by integrin  $\alpha v\beta 3$ . *J Biol Chem* 272, 2736-2743.

Ramakrishnan, V., Bhaskar, V., Law, D. A., Wong, M. H. L., DuBridge, R. B., Breinberg, D., O'Hara, C., Powers, D. B., Liu, G., Grove, J., Hevezi, P., Cass, K. M., Watson, S., Evangelista, F., Powers, R. A., Finck, B., Wills, M., Caras, I., Fang, Y., McDonald, D., Johnson, D., Murray, R., & Jeffry, U. (2006) Preclinical evaluation of an anti- $\alpha 5\beta 1$  integrin antibody as a novel anti-angiogenic agent. *J Exp Ther Oncol* 5, 273-286.

Rechenmacher, F., Neubauer, S., Polleux, J., Mas-Moruno, C., De Simone, M., Cavalcanti-Adam, E. A., Spatz, J. P., Fassler, R., & Kessler, H. (2013) Functionalizing  $\alpha v\beta 3$ - or  $\alpha 5\beta 1$ -Selective Integrin Antagonists for Surface Coating: A Method To Discriminate Integrin Subtypes In Vitro. *Angew Chem Int Ed Engl* 52, 1572-1575.

Roca-Cusachs, P., Gauthier, N. C., Del Rio, A., & Sheetz, M. P. (2009) Clustering of  $\alpha(5)\beta(1)$  integrins determines adhesion strength whereas  $\alpha(v)\beta(3)$  and talin enable mechanotransduction. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 16245-16250.

Rossier, O., Octeau, V., Sibarita, J.-B., Leduc, C., Tessier, B., Nair, D., Gatterdam, V., Destaing, O., Albiges-Rizo, C., Tampe, R., Cognet, L., Choquet, D., Lounis, B., & Giannone, G. (2012) Integrins  $\beta 1$  and  $\beta 3$  exhibit distinct dynamic nanoscale organizations inside focal adhesions. *Nat Cell Biol* 14, 1057-1067.

Stachurska, A., Elbanowski, J., & Kowalczynska, H. M. (2012) Role of  $\alpha 5\beta 1$  and  $\alpha v\beta 3$  integrins in relation to adhesion and spreading dynamics of prostate cancer cells interacting with fibronectin under in vitro conditions. *Cell Biol Int* 36, 883-892.

Tolomelli, A., Gentilucci, L., Mosconi, E., Viola, A., Dattoli, S. D., Baiula, M., Spampinato, S., Belvisi, L., & Civera, M. (2011) Development of isoxazoline-containing peptidomimetics as dual  $\alpha v\beta 3$  and  $\alpha 5\beta 1$  integrin ligands. *ChemMedChem* 6, 2264-2272.

White, D. P., Caswell, P. T., & Norman, J. C. (2007)  $\alpha v\beta 3$  and  $\alpha 5\beta 1$  integrin recycling pathways dictate downstream Rho kinase signaling to regulate persistent cell migration. *J Cell Biol* 177, 515-525.

Worth, D. C., Hodivala-Dilke, K., Robinson, S. D., King, S. J., Morton, P. E., Gertler, F. B., Humphries, M. J., & Parsons, M. (2010) A  $v\beta 3$  integrin spatially regulates VASP and RIAM to control adhesion dynamics and migration. *J Cell Biol* 189, 369-383.

# **Chapitre III. Conception rationnelle d'antagonistes allostériques de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$**

L'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  est une cible thérapeutique importante en cancérologie, et particulièrement pour le traitement des glioblastomes. Peu d'antagonistes de cette intégrine sont décrits à l'heure actuelle. Comme les autres antagonistes d'intégrines, ils sont sélectionnés pour leur capacité à inhiber la liaison entre l'intégrine et son ligand. Ce mode de fonctionnement est remis en cause par les études récentes des antagonistes de l'intégrine  $\alpha IIb\beta 3$  qui induisent une conformation active de l'intégrine. Nous avons donc choisi de concevoir des antagonistes allostériques de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  en alliant des techniques *in silico* et *in vitro*. Une chimiothèque a tout d'abord été ciblée sur un modèle de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . Des techniques de biophysique ont ensuite été mises en œuvre pour mesurer la liaison de nos composés à l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . Nous avons enfin caractérisé les effets fonctionnels de ces composés sur la migration des cellules de glioblastomes.

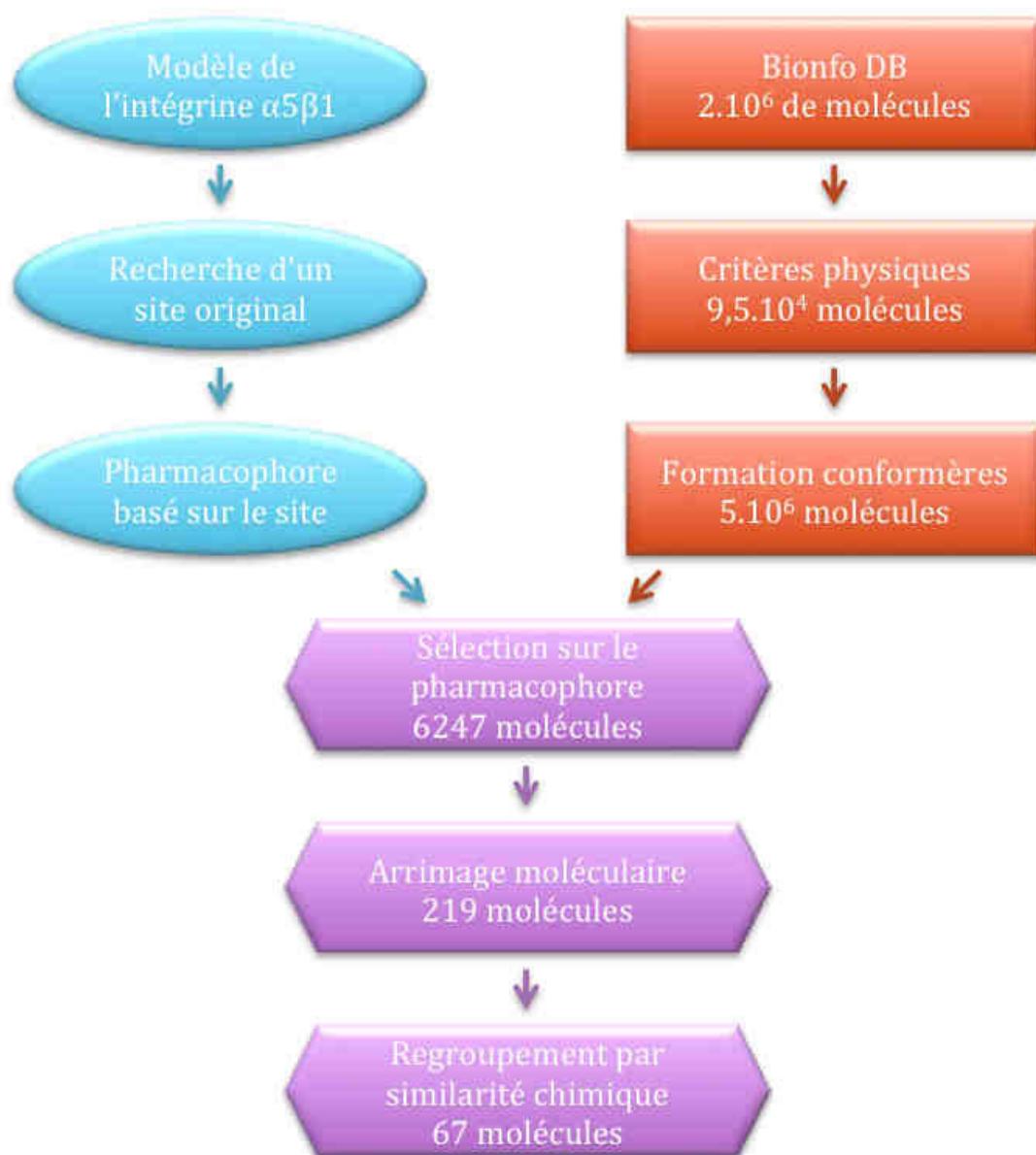


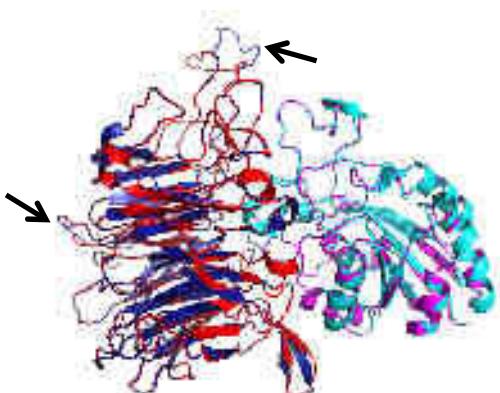
Figure 32 Représentation schématique de la procédure utilisée pour le criblage *in silico*.

Afin de découvrir des antagonistes allostériques novateurs de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , nous avons choisi d'utiliser un protocole qui allie des techniques *in silico* et *in vitro*. Au moment de notre étude, la structure cristallographique de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  n'étant pas encore résolue, le modèle tridimensionnel de l'hétérodimère a été généré par homologie à la structure de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$ . Le criblage a été réalisé sur un site allostérique, choisi sur ce modèle, pour lequel aucun ligand n'est connu. Parmi la banque de molécules commercialement disponibles, mise au point au laboratoire, Bioinfo DB (<http://bioinfo-pharma.u-strasbg.fr/bioinfo>), une première sélection est faite sur un pharmacophore conçu à partir de la structure de la protéine. Les meilleurs ligands sont ensuite arrimés dans le site de liaison sélectionné, puis regroupés par similarité chimique. Une à deux molécules sont sélectionnées par famille (Figure 32).

### III.A. Modélisation de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ par homologie, recherche d'une poche et conception du pharmacophore

Le modèle tridimensionnel d'une partie de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  est disponible au laboratoire, il a été réalisé par homologie avec l'intégrine  $\alpha V\beta 3$ , dont la structure a été résolue en 2001 (Xiong et al., 2001). Le modèle comprend la séquence de la sous-unité  $\alpha 5$  de la phénylalanine 1 à l'arginine 449 et la séquence de la sous-unité  $\beta 1$  de l'asparatate 120 et la leucine 358.

L'alignement de notre modèle avec celui décrit précédemment dans la littérature (Marinelli et al., 2005) montre deux structures très proches. La déviation de la position des carbones  $\alpha$  des structures est de 0,12 $\text{\AA}$  et de 0,19 $\text{\AA}$  pour la totalité des atomes de la structure. Les différences entre les deux modèles se situent dans les boucles non structurées de la protéine (Figure 33).



**Figure 33 Structure des modèles de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ .**

Figure représentant en rubans notre modèle de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  ( $\alpha 5$  en rouge,  $\beta 1$  en magenta) superposé au modèle publié par le Pr. Kessler ( $\alpha 5$  en bleu,  $\beta 1$  en cyan). Les flèches indiquent les boucles non structurées qui présentent de fortes différences entre les modèles.

### III. Conception rationnelle d'antagonistes allostériques de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$

Une recherche de site, à l'aide de SiteID™ (Amber, Tripos Inc), est réalisée sur notre modèle. Ce programme détecte les cavités en inspectant la totalité de la surface de la protéine accessible au solvant et en localisant les endroits où les sphères de solvant se regroupent. Un site différent du site de liaison du tripeptide RGD de la fibronectine, ligand endogène de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , paraît particulièrement intéressant. Il est situé à proximité du site de liaison du tripeptide RGD, et est composé de résidus aromatiques, hydrophobes, acides et basiques. Malgré son faible enfouissement, il semble posséder la géométrie et la diversité chimique nécessaires pour lier une molécule de faible poids moléculaire (Figure 34).

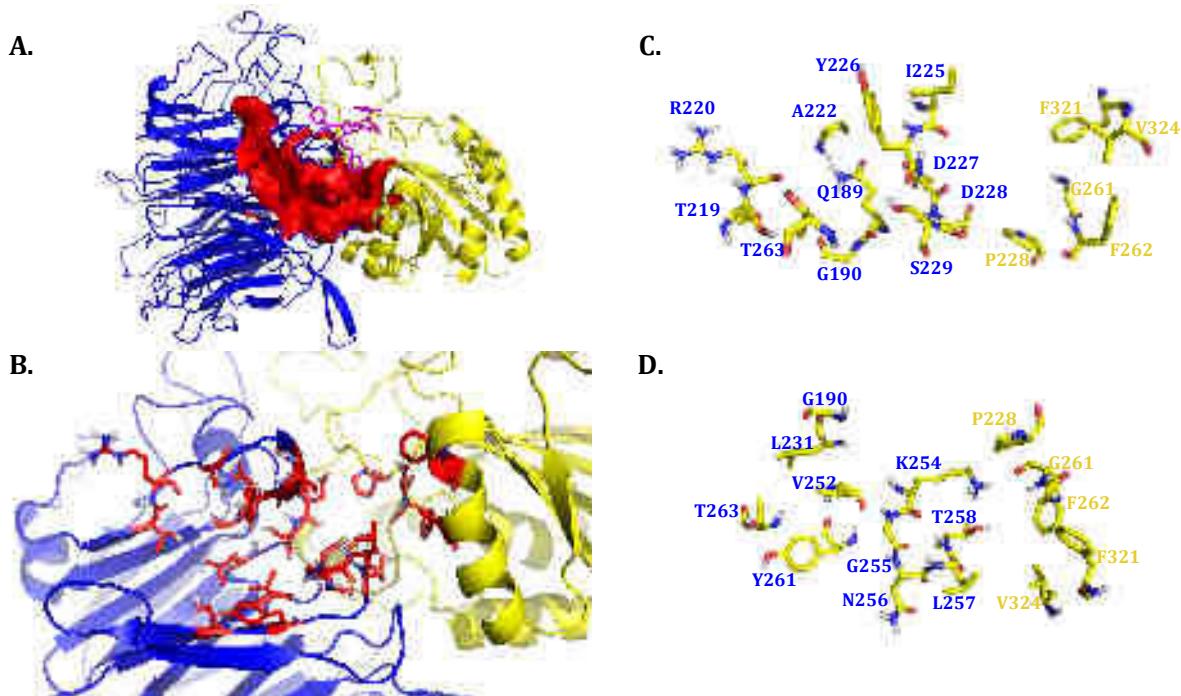
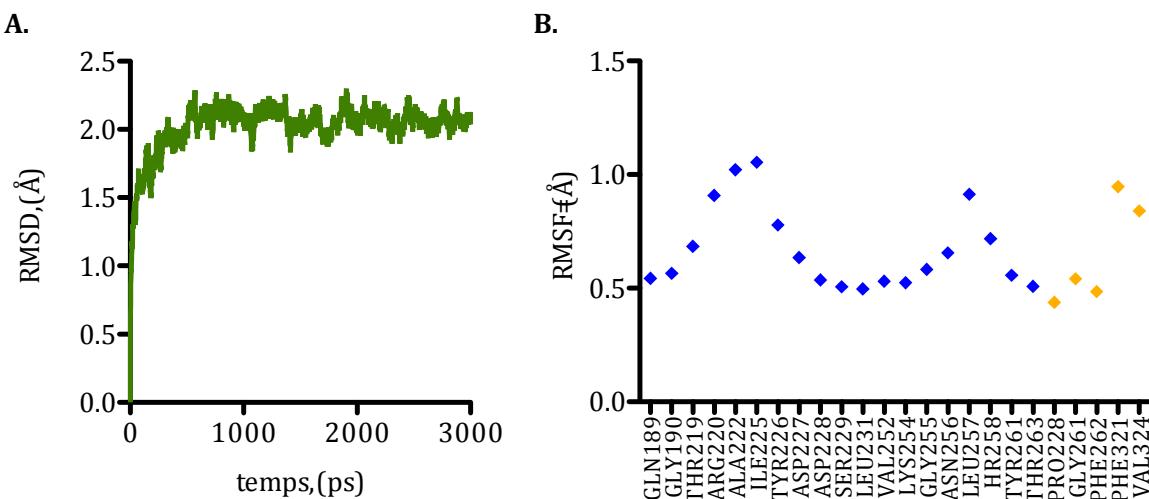


Figure 34 Composition du site sélectionné.

**A.** Représentation du site sélectionné dans la protéine (surface en rouge, sous-unité  $\alpha 5$  en bleu, sous-unité  $\beta 1$  en jaune, SJ749 antagoniste mimant le tripeptide RGD de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  en magenta). **B.** Agrandissement du site sélectionné (bâtons rouges pour le site, sous-unité  $\alpha 5$  en bleu, sous-unité  $\beta 1$  en jaune) **C.** Composition du site vu de dessous (nom des résidus appartenant à la sous-unité  $\alpha 5$  en bleu, nom des résidus appartenant à la sous-unité  $\beta 1$  en jaune). **D.** Composition du site vu de dessus (nom des résidus appartenant à la sous-unité  $\alpha 5$  en bleu, nom des résidus appartenant à la sous-unité  $\beta 1$  en jaune).

Une dynamique moléculaire de 3ns (1 500 000 étapes de 2fs) à 300K est réalisée à l'aide du module Sander (Amber, Université de Californie du Sud) sur la structure solvatée de la protéine. Elle permet l'étude de la flexibilité des résidus qui composent notre site. La variation des positions des atomes composant le squelette de la totalité de la protéine en fonction du temps (mesure du RMSD) est relativement faible et reste, après équilibration, autour de 2Å par rapport à leur position initiale (Figure 35A). En ce qui concerne plus précisément les résidus qui composent le site de liaison que nous

avons choisi, la fluctuation de la position des atomes du squelette de ces résidus varie peu (RMSF), moins de 1 Å (Figure 35B). Le site est donc suffisamment stable pour permettre la réalisation du criblage.



**Figure 35 Etude temporelle du RMSD et RMSF au cours de la dynamique moléculaire.**

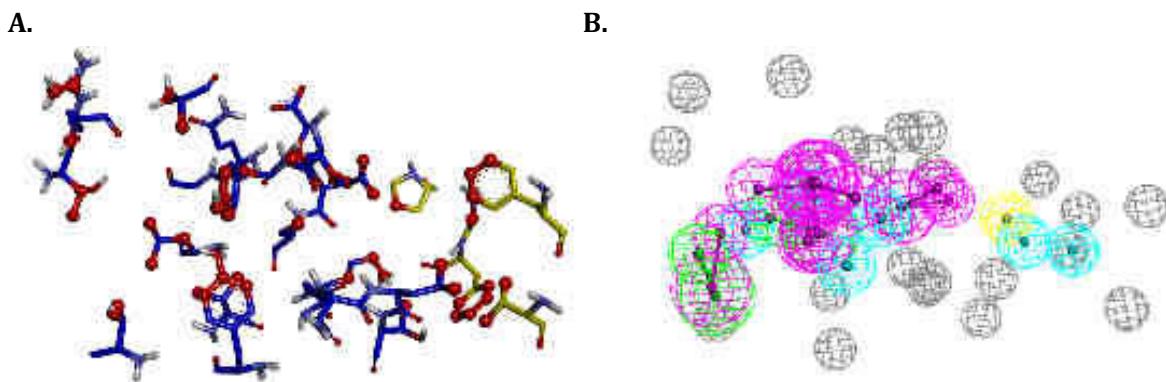
**A.** Graphique représentant la déviation de la position des atomes du squelette de la protéine (RMSD) en fonction du temps au cours de la dynamique. **B.** Graphique représentant la fluctuation (RMSF) de la position des atomes du squelette des résidus de la poche sélectionnée (bleu pour la sous-unité  $\alpha 5$  et jaune pour la sous-unité  $\beta 1$ ) pendant la totalité de la dynamique par rapport au temps 0.

Après la dynamique moléculaire, 251 structures composant la trajectoire créée sont regroupées en 10 familles par l'utilisation de la fonction cluster du module ptraj (Amber). L'algorithme « means » est utilisé pour le regroupement des structures en famille (Shao et al., 2007). Il fonctionne par raffinement. Autant de structures que de familles désirées sont choisies, les plus différentes possibles les unes des autres (RMSD le plus grand possible). On les nomme centres. On affecte à chaque centre une famille. On répartit chacune des 241 structures de la trajectoire dans le groupe pour lequel le centre est le plus proche (RMSD le plus faible possible). A partir des groupes formés, un nouveau centre est calculé pour être représentatif de la moyenne du groupe, et l'opération est réitérée jusqu'à ce que les centres ne changent plus. La structure moyenne de chaque cluster est récupérée, notre site est extrait de chacune d'entre elles.

Le protocole HS-Pharm (Barillari et al., 2008), permet de définir les « hot-spots », atomes créant potentiellement une liaison avec un ligand. Ce programme utilise une machine d'apprentissage à partir de complexes protéine-ligand de structures connues afin de prédire les atomes de la protéine qui ont la plus grande probabilité d'interagir avec un ligand potentiel. Appliquée à nos structures, une moyenne de 33 hot spots par structure est obtenue. Après une identification visuelle nous choisissons d'en conserver

### III. Conception rationnelle d'antagonistes allostériques de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$

47 (Figure 36A). La structure moyenne qui contient un maximum de ces hot spot est choisie pour réaliser la suite de l'étude. Les hot spot sélectionnés permettent la conception d'un pharmacophore constitué de 17 critères : 1 positif ionisable (D228), 2 accepteurs de liaison hydrogène (Y261 et T263), 8 donneurs de liaison hydrogène et enfin 6 caractères hydrophobes. On ajoute à ces critères des sphères d'exclusion à la place des carbones  $\alpha$  des différents résidus qui composent notre site (Figure 36B).



**Figure 36 Conception du pharmacophore.**

**A.** Représentation du site sélectionné (bleu pour les résidus de la sous-unité  $\alpha 5$ , jaune pour les résidus de la sous-unité  $\beta 1$ ) avec les hot spots (sphères rouges). **B.** Représentation du pharmacophore obtenu, composé d'un critère positif ionisable (jaune), de caractères hydrophobes (cyan) de donneurs (vert) et d'accepteurs (magenta) de liaison hydrogène ainsi que des sphères d'exclusion (gris).

## III.B. Criblage *in silico* d'une chimiothèque sur le modèle de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$

### III.B.1. Préparation de la banque de composés chimiques

Pour réaliser le criblage, nous avons utilisé la banque de molécules commerciales Bioinfo DB composée de plus de 3 millions de composés au moment de notre étude. Seules les molécules qui possèdent au moins un atome d'azote chargé positivement, deux cycles aromatiques, un accepteur et deux donneurs de liaison H ainsi qu'une solubilité prédictive supérieure ou égale à  $10^{-5}M$  sont conservées. Nous obtenons un peu plus de 95 000 molécules. Les conformères de ces molécules sont générés à l'aide du logiciel Discovery Studio (Accelrys). On obtient plus de 5 millions de conformères à tester sur le pharmacophore, soit une moyenne de 55 conformères par molécule.

### III.B.2. Criblage sur le pharmacophore

Les 5 millions de conformères sont criblés sur le pharmacophore avec Discovery Studio. La contrainte de valider le caractère positif ionisable est appliquée. 91 424 molécules sont sélectionnées pour contenir 3 à 4 points de notre pharmacophore. Discovery Studio mesure la compatibilité entre la structure 3D de nos molécules (poses) et le pharmacophore par l'assignation d'un score (Fit) pour chaque couple.

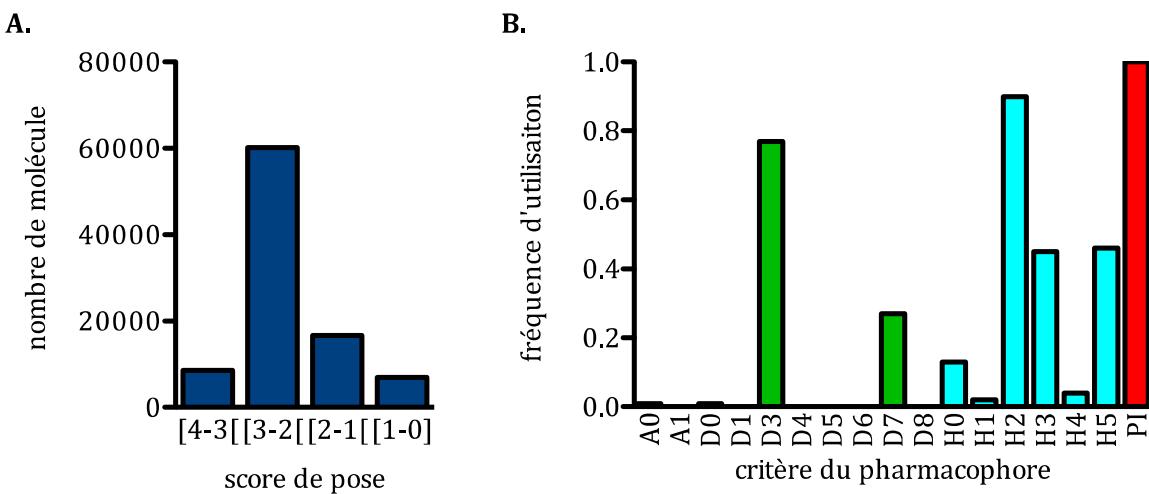
Pour chaque point du pharmacophore ( $f$ ), la précision de la position de l'atome du conformère par rapport au point du pharmacophore est mesuré (SSE). Le SSE correspond au carré du rapport entre la distance entre la fonction chimique et le centre du point du pharmacophore ( $D(c)$ ) sur le rayon de la sphère de tolérance ( $T(c)$ ) de ce même point. Le score correspond à la somme des SSE pour chaque point du pharmacophore (Équation 1).

$$Fit = \sum_f (1 - SSE(f))$$
$$SSE(f) = \left( \frac{D(c)}{T(c)} \right)^2$$

Équation 1 Mesure du score pour un couple conformère-pharmacophore

### III. Conception rationnelle d'antagonistes allostériques de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$

La plupart des composés ont un score de pose compris entre 2 et 3 (Figure 37A), seuls les composés dont le score est supérieur à 3 sont conservés (8560 composés). Si on observe la fréquence de validation des points du pharmacophore par ces composés, on remarque que les caractéristiques hydrophobes sont les éléments du pharmacophore les plus souvent utilisés. Les conformères qui ne valident que des éléments hydrophobes du pharmacophore (en dehors du positif ionisable obligatoire) sont exclus de l'étude, soit un peu plus de 34 000 conformères (Figure 37B). Pour la suite de l'étude 6 247 composés sont retenus.



**Figure 37 Etude statistique des résultats du criblage sur le pharmacophore.**

**A.** Histogramme représentant le nombre de structures présentes en fonction de leur score de pose sur le pharmacophore pour la totalité des molécules. **B.** Histogramme représentant la fréquence de validation d'un point du pharmacophore pour les molécules ayant un score de pose supérieur à 3.

#### III.B.3. Arrimage moléculaire et sélection des composés

Un arrimage moléculaire est réalisé avec le logiciel Gold (CCDC) sur les 6 247 molécules sélectionnées lors du criblage sur le pharmacophore. L'arrimage moléculaire permet de placer le ligand dans la totalité de la poche que nous avons sélectionnée et ainsi de mesurer la compatibilité des molécules avec les résidus qui constituent notre poche. L'utilisation de l'algorithme génétique de Gold permet de rechercher la meilleure conformation du complexe protéine-ligand en mimant le phénomène naturel de l'évolution (Jones et al., 1995; Jones et al., 1997). Succinctement, chaque conformation du complexe protéine-ligand est appelé chromosome, l'obtention d'un nouveau chromosome (fils) est obtenu par l'utilisation de deux chromosomes parents à partir de la population de chromosomes. Des phénomènes de mutations et de recombinaison sont ajoutés pour l'obtention d'un chromosome fils. Ce dernier est conservé si sa

conformation est meilleure que la moins bonne conformation de la population des parents. La qualité de la conformation du complexe protéine-ligand est mesurée ici par un score basé sur un champ de force nommé GoldScore (Verdonk et al., 2003).

Les stéréo-isomères des 6 247 molécules sélectionnées précédemment sont générés avec Corina (Molecular Network), 9 284 stéréo-isomères sont obtenus et arrimés au site sélectionné. Plusieurs filtres sont réalisés pour obtenir les molécules qui présenteront le plus de chance de se lier à notre site. Tout d'abord, seules les molécules dont le score d'arrimage de Gold est supérieur à 25 sont conservées, soit 6 410 stéréo-isomères (5 592 molécules, 45 269 poses).

Deux filtres basés sur les interactions protéine-ligand sont réalisés grâce à l'utilisation de d'empreintes d'interaction (Marcou & Rognan, 2007). Brièvement, cette technique permet de créer une empreinte binaire qui définit une interaction idéale avec des résidus sélectionnés, et de la comparer aux empreintes d'interaction mesurées pour chaque pose. Tout d'abord nous souhaitons que les molécules se lient obligatoirement à l'aspartate 228 ou à la sérine 229 ; on réduit ainsi le nombre de touches potentielles à 4 727 molécules (5 335 stéréo-isomères, 25 906 poses). Le deuxième filtre prend en compte les résidus importants lors de la sélection du pharmacophore. La composition des interactions prises en compte sont présentes dans le Tableau 7. Ce filtre réduit enfin notre liste de touches à 219 molécules.

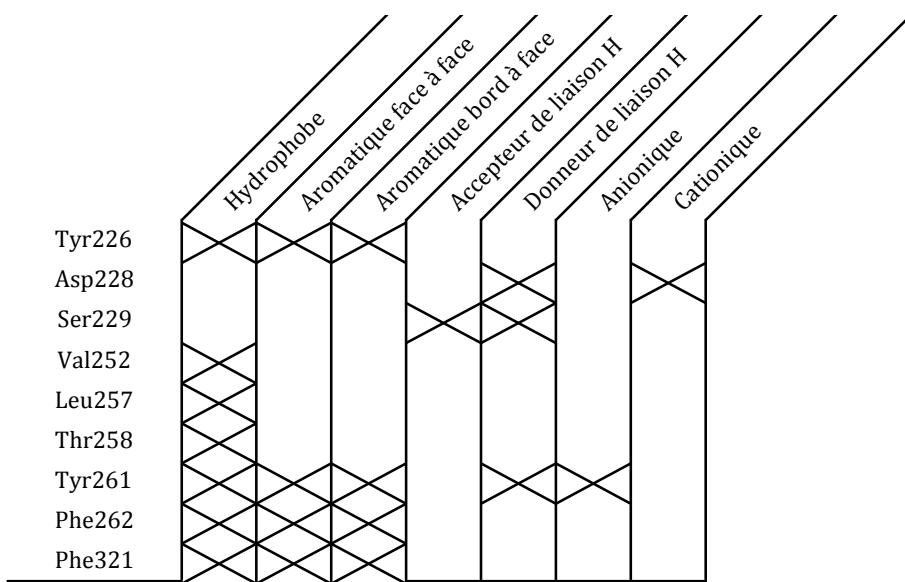


Tableau 7 Interactions prises en compte pour la sélection des composés après l'arrimage moléculaire.

#### III.B.4. Sélection finale des touches

La sélection finale des touches a pour but d'obtenir l'espace chimique le plus diversifié possible. La totalité des 219 molécules est observée pour supprimer celles qui ont une énergie stérique importante, puis les molécules sont regroupées grâce au protocole MCS (ChemAxon). Cet algorithme recherche les sous-structures communes les plus grandes possible, avec dans notre cas un minimum de 15 atomes par sous structures. Nous obtenons 76 familles de molécules. Chacune d'entre elle est inspectée visuellement, et 83 molécules sont sélectionnées. Malheureusement, certaines ne sont plus disponibles commercialement, nous obtenons ainsi un ensemble de 67 molécules à tester *in vitro*.

*Nous avons réalisé un criblage *in silico* d'une banque de molécules disponibles dans le commerce sur un site du modèle tridimensionnel de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ .*

*La modélisation moléculaire par homologie, la recherche des poches et la dynamique moléculaire nous ont permis de définir un site potentiel de liaison qui possède une géométrie et une composition intéressantes.*

*Grâce aux protocoles mis au point au laboratoire, nous avons généré un pharmacophore à partir du site choisi, et sélectionné les molécules en fonction de ce dernier. Nous avons ainsi réduit de 3 millions à un peu plus de 6000 la liste des touches potentielles. Un arrimage moléculaire de ces composés nous a permis de réduire encore la liste à 219 molécules. Enfin le regroupement des molécules par structure chimique nous a conduit à 67 molécules de châssis moléculaires différents avec lesquelles nous allons poursuivre notre étude.*

*Afin de détecter la liaison de ces molécules avec notre cible, l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , le Biacore, utilisant la résonance plasmonique de surface, a été expérimenté. L'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  est un hétérodimère transmembranaire. Sa purification à partir de placenta humain et sa conservation dans une conformation native sont fastidieuses. Elle est cependant commercialisée sous sa forme entière. Parmi toutes les techniques de biophysique existantes, la résonance plasmonique de surface permet une détection sans marquage de la liaison protéine-ligand pour un grand nombre de composés tout en ne consommant que très peu de protéine.*

## III.C. Résonance plasmonique de surface

### III.C.1. Principe du Biacore®

La technologie Biacore® (GE Healthcare) permet d'étudier les interactions moléculaires en temps réel. L'appareil fonctionne sur le principe d'un biosenseur qui utilise la résonance plasmonique de surface (SPR). Une molécule (appelé alors ligand) est couplée via différents polymères fonctionnalisés sur une surface de verre recouverte d'une mince pellicule d'or (senseur de surface). Un faisceau de lumière polarisée illumine la face opposée de la surface de verre avec un angle qui lui permet d'être totalement réfléchi. L'interaction entre le faisceau lumineux et les plasmons de l'or entraîne une perte de l'énergie lumineuse et, par conséquent, l'absence d'une partie du rayon réfléchi, à un angle défini appelé angle de résonance (Figure 38A). Cet angle de résonance est proportionnel à l'indice de réfraction du milieu et donc à la masse fixée sur le senseur. Le déplacement de l'angle de résonance est reporté en fonction du temps sur un sensogramme (Figure 38B).

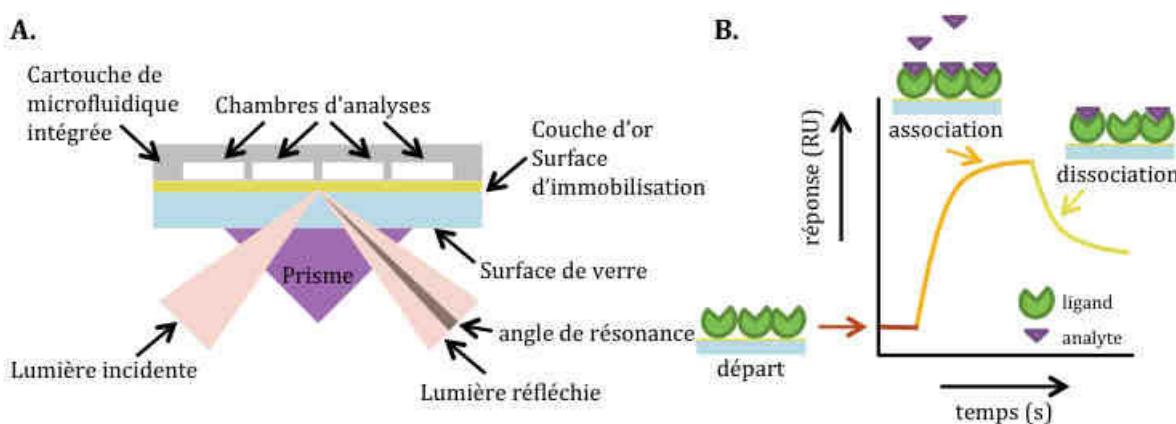


Figure 38 Schéma représentatif de la résonance plasmonique de surface du Biacore.

A. Schéma représentant la technologie de la résonance plasmonique de surface. B. Schéma représentant un sensogramme ainsi que les différentes étapes qui le compose.

Le signal est mesuré en unité de résonance (RU). Un changement de l'angle de résonance de  $0,1^\circ$  correspond à une réponse de 1000RU et à une quantité de protéine de  $1\text{ng}/\text{mm}^2$ . Cette technique permet de détecter en temps réel la présence d'une liaison entre le ligand et l'analyte en solution injecté dans le système microfluidique, mais aussi de mesurer l'affinité, la concentration ou encore les paramètres cinétiques de liaison et de détachement. L'Équation 2 permet de relier la réponse maximale attendue pour un

### III. Conception rationnelle d'antagonistes allostériques de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$

analyte donné à la masse moléculaire du ligand et de l'analyte ainsi que de la quantité de ligand fixé. Cette technique nous permettra donc de mesurer la liaison et l'affinité de nos composés directement sur la protéine immobilisée sans réaliser de marquage préalable.

$$R_{max} = \frac{M_a}{M_l} \times R_f \times S$$

$R_{max}$  réponse maximale de l'analyte (RU)       $M_a$  masse moléculaire de l'analyte (Da)

$R_f$  fixation du ligand (RU)       $M_l$  masse moléculaire du ligand (Da)

$S$  stœchiométrie de la liaison

**Équation 2** Équation permettant de prédire la réponse maximale d'un analyte.

#### III.C.2. Résonance plasmonique de surface avec l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ purifiée commerciale

La technologie Biacore (GE Healthcare) permet de travailler sur 4 chambres (appelées Flowcell : Fc) en parallèle ou indépendamment. L'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  purifiée (Millipore) entière est utilisée. Elle est solubilisée dans un tampon TRIS contenant 0,2% de Triton X-100 permettant la conservation de sa conformation native. Son utilisation lors de ces expériences est réalisée dans un tampon contenant également 0,2% de Triton X-100. La fixation de la protéine à la surface du senseur étant réalisée par couplage amino-acide, l'intégrine doit être dialysée dans un tampon HEPES pour supprimer toute trace de TRIS contenant des amines pouvant se lier à la surface du senseur.

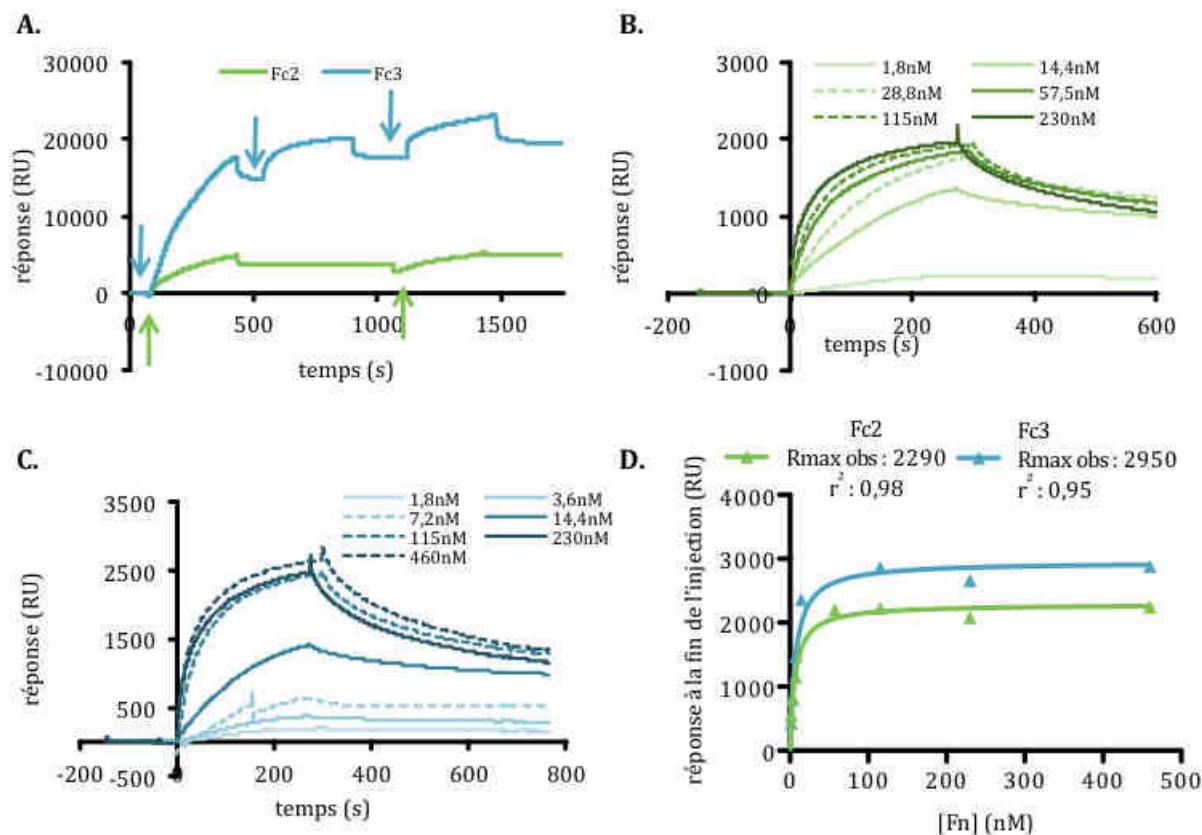
La protéine est fixée sur deux chambres différentes (Fc2 et Fc3) (Figure 39A). Le niveau d'immobilisation de l'intégrine sur les Fc2 et Fc3 est de 6700RU et 21000RU respectivement. Une estimation de la réponse maximale possible de différents analytes est réalisée (Tableau 8) à partir de l'Équation 2. On remarque que pour la mesure de la liaison de molécules de faible poids moléculaire (355g/mol), la réponse serait au maximum de 10 à 30 RU, cette valeur est faible.

Analyte	Masse (Da)	Rmax th (RU)		Rmax obs (RU)	
		Fc2	Fc3	Fc2	Fc3
Fibronectine	440 000	11 757	37 229	2 290	2 950
Anticorps	150 000	4 008	12 692		
Peptide	700	19	59		
Petites molécules	355	10	30		

**Tableau 8** Calculs théoriques des réponses maximales attendues et obtenues par les différents analytes.

Rmax th : réponses maximales théoriques obtenues à partir de l'équation 2, Rmax obs : réponses maximale obtenues lors de nos expériences. Les masses moléculaires sont approximées, celle de l'intégrine est de 250kDa.

Nous avons testé différentes concentrations de fibronectine afin d'évaluer la part active des intégrines liées à la surface (Figure 39B et C). Comme attendu, plus on augmente la concentration de la fibronectine et plus la réponse est forte. Cependant la réponse de la chambre 3, qui possède trois fois plus d'intégrines fixées, n'est pas beaucoup plus forte que celle de la chambre 2. Le graphique montrant la réponse idéalement obtenue à l'équilibre (RU) en fonction de la concentration en analyte permet la détermination de la réponse maximale à laquelle on peut s'attendre ( $R_{max\ obs}$ ) (Figure 39D, Tableau 8). Pour la chambre 2, la réponse maximale expérimentale ( $R_{max\ obs}$ ) est cinq fois plus faible que la théorique. Il se pourrait que seulement 19% de l'intégrine soit fixée dans une conformation active permettant la liaison de la fibronectine. Dans le cas de la chambre 3, seule 8% de l'intégrine fixée semble être active.



**Figure 39 Fixation de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  et liaison de la fibronectine mesurée par Biacore.**

**A.** Sensogramme représentant la fixation de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  commerciale purifiée sur les chambres (Fc) 2 et 3, les flèches représentent les injections successives. **B.** Sensogramme représentant la liaison de la fibronectine injectée à différentes concentrations sur la chambre 2 (Fc2). **C.** Sensogramme représentant la liaison de la fibronectine injectée à différentes concentrations sur la chambre 3 (Fc3). **D.** Graphique représentant les réponses obtenues en fonction de la concentration de fibronectine injectée dans les chambres 2 et 3 (Fc2, Fc3),  $r^2$  est le coefficient de corrélation calculé.

### *III. Conception rationnelle d'antagonistes allostériques de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$*

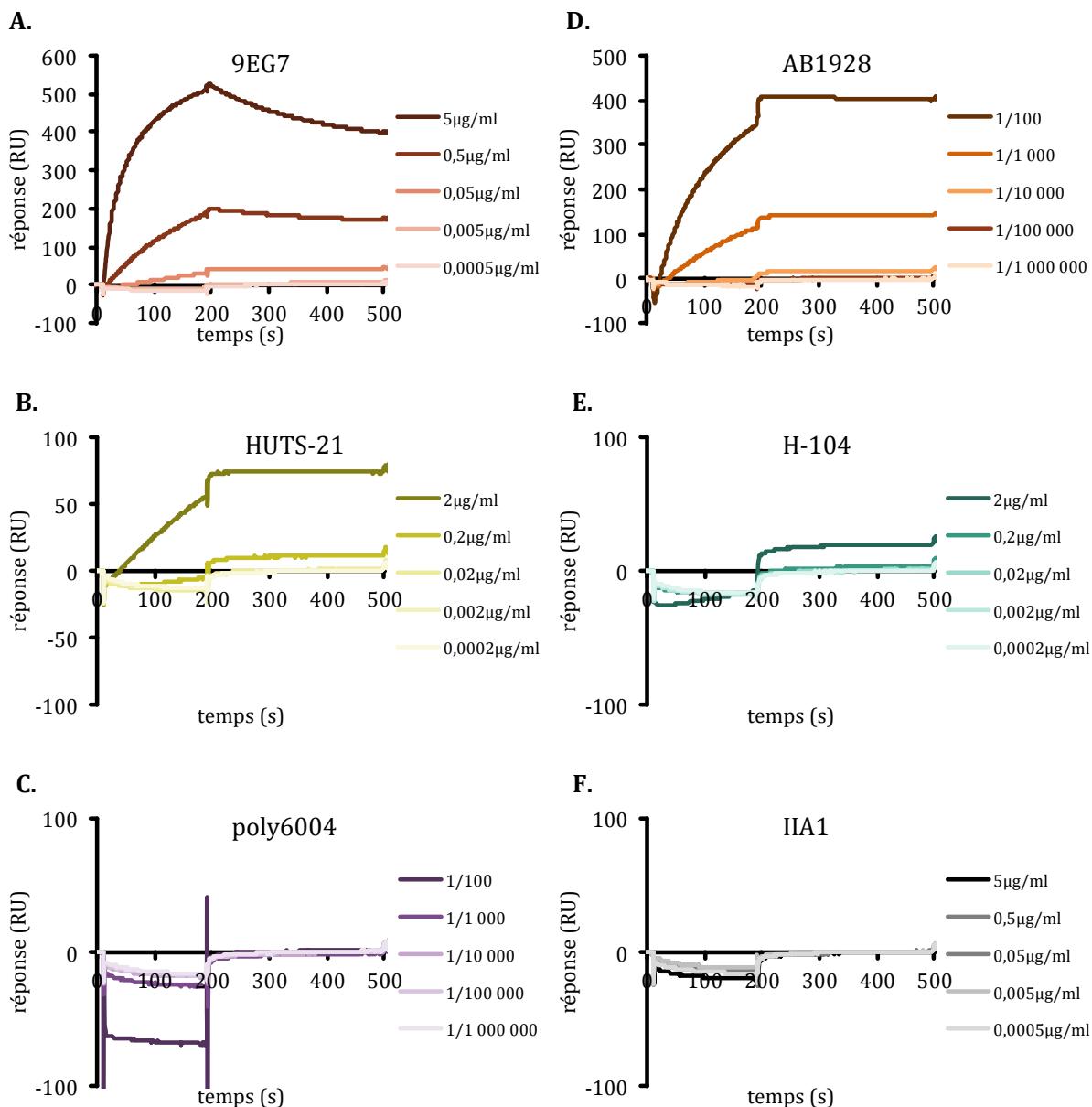
La fixation et la conformation de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  semblent aléatoires. En considérant que 20% de l'intégrine fixée est active, la réponse maximale que l'on peut attendre pour la liaison d'une molécule de faible poids moléculaire serait d'environ 2 RU pour une molécule de 355g/mol. Ces valeurs sont celles du seuil de détection de cette technique.

La fixation de la protéine par un couplage peptidique entre les amines libres de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  et les acides carboxyliques de la surface ne permet pas de prédire la conformation dans laquelle la protéine va être fixée. Pour parer ce problème, la fixation orientée de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  par l'intermédiaire d'un anticorps a été testée.

Au préalable, 6 anticorps ciblant la sous-unité  $\beta 1$  (9EG7, HUTS-21 et poly6004) ou la sous-unité  $\alpha 5$  (AB1928, H-104 et IIA1) ont été testés en tant qu'analyte sur l'intégrine immobilisée.

Dans le cas des anticorps reconnaissant la sous-unité  $\beta 1$ , on observe que l'anticorps 9EG7 est l'anticorps qui possède la plus forte réponse (Figure 40A). Une réponse plus faible est obtenue avec l'anticorps HUTS-21 (Figure 40B). Enfin l'anticorps poly6004 ne se fixe pas à l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  dans ce test. Il est donc écarté pour la suite de notre étude (Figure 40C). En ce qui concerne les anticorps qui reconnaissent la sous-unité  $\alpha 5$  de l'intégrine, seul l'anticorps AB1928 se lie fortement à l'intégrine immobilisée (Figure 40D) et semble pouvoir être utilisé dans la suite de l'étude. Les anticorps H-104 (Figure 40E) et IIA1 (Figure 40F) ne se lient pas à l'intégrine immobilisée.

Les anticorps 9EG7, HUTS-21 et AB1928 ont donc été testés comme intermédiaires pour immobiliser l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ .



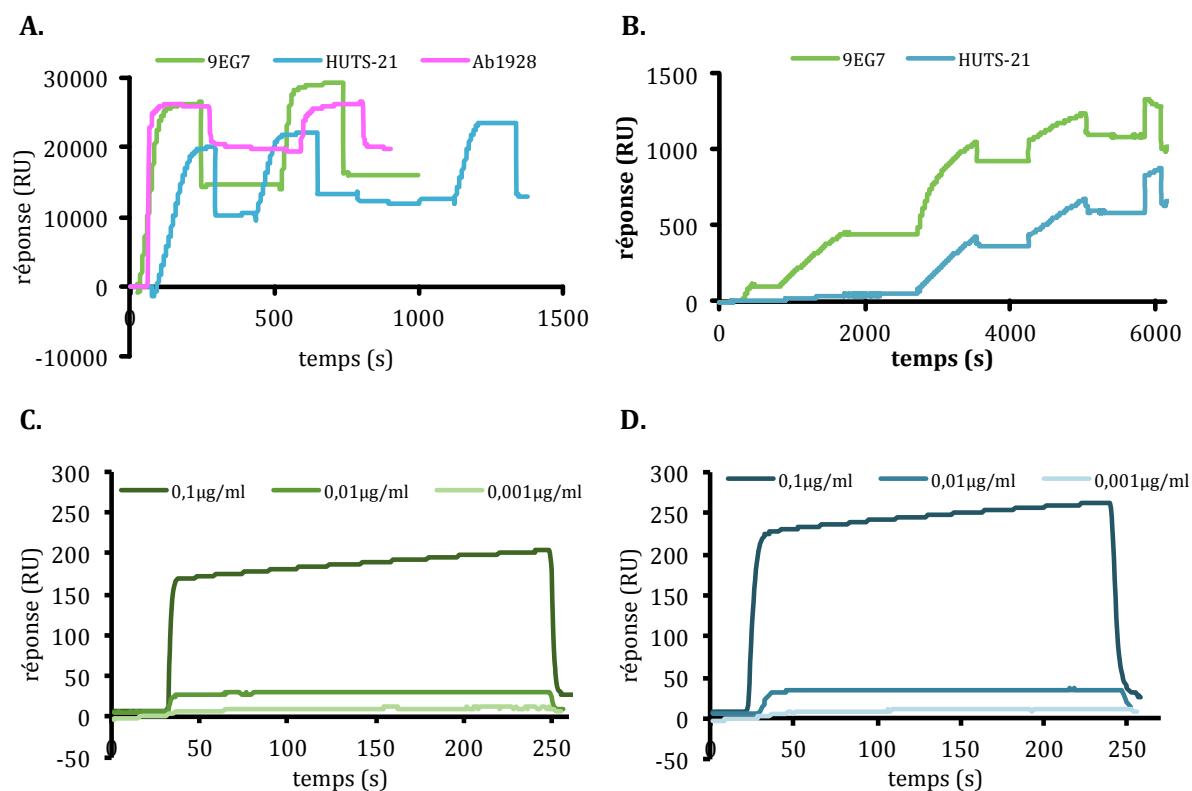
**Figure 40 Liaison des anticorps à l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  immobilisée par Biacore.**

**A.** Graphique représentant la réponse obtenue pour les différentes concentrations de l'anticorps 9EG7, reconnaissant la sous-unité  $\beta 1$ , en fonction du temps. **B.** Graphique représentant la réponse obtenue pour les différentes concentrations de l'anticorps HUTS-21, reconnaissant la sous-unité  $\beta 1$ , en fonction du temps. **C.** Graphique représentant la réponse obtenue pour les différentes concentrations de l'anticorps poly6004, reconnaissant la sous-unité  $\beta 1$ , injectées en fonction du temps. **D.** Graphique représentant la réponse obtenue pour les différentes concentrations de l'anticorps AB1928, reconnaissant la sous-unité  $\alpha 5$ , en fonction du temps. **E.** Graphique représentant la réponse obtenue pour les différentes concentrations de l'anticorps H-104, reconnaissant la sous-unité  $\alpha 5$ , en fonction du temps. **F.** Graphique représentant la réponse obtenue pour les différentes concentrations de l'anticorps IIA1, reconnaissant la sous-unité  $\alpha 5$ , en fonction du temps.

### III. Conception rationnelle d'antagonistes allostériques de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$

La liaison de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  par l'intermédiaire des anticorps 9EG7, HUTS-21 et 1928 a été réalisée (Figure 41). La liaison des anticorps 9EG7 (16 000 RU) et HUTS-21 (12 000 RU) est efficace et stable, ce qui n'est pas le cas de l'anticorps AB1928 (15 000 RU) pour lequel une perte légère mais constante de la réponse est observée (Figure 41A). L'anticorps AB1928 est utilisé sous la forme d'un antisérum à la différence des deux autres. N'étant pas sous forme purifiée, et même après dialyse, on ne peut pas savoir quelle est la composition du matériel fixé ni la raison de cette perte constante de réponse, et donc de matériel.

L'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  est ensuite injectée. Elle se lie faiblement aux anticorps 9EG7 (1 100 RU) et HUTS-21 (700 RU) (Figure 41B). Puis la fibronectine est injectée à différentes concentrations sur l'intégrine capturée. La réponse après l'injection ( $t = 250s$ ) est très faible, environ 50 RU pour l'intégrine liée par l'intermédiaire de l'anticorps 9EG7 et seulement 25 RU pour l'intégrine liée à l'anticorps HUTS-21 à l'équilibre pour la concentration de 0,1 $\mu$ g/ml (Figure 41C et D).



**Figure 41 Fixation de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  à l'aide d'un anticorps pour la SPR.**

**A.** Fixation des anticorps dans les différentes chambres, 9EG7 : vert, HUTS-21 : bleu et AB1928 : rose. **B.** Sensogramme représentant la réponse obtenue lors de la liaison de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  aux différents anticorps étudiés. **C.** Sensogramme représentant la réponse obtenue lors de la liaison de la fibronectine à l'intégrine elle-même liée à l'anticorps 9EG7. **D.** Sensogramme représentant la réponse obtenue lors de la liaison de la fibronectine à l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , elle-même liée par l'anticorps HUTS-21.

Quelque soit l'anticorps immobilisé, la réponse de la fibronectine sur l'intégrine capturée est encore plus faible que quand l'intégrine est directement immobilisée sur le senseur. Par exemple, on obtient une réponse de 25-50 RU quand l'intégrine est capturée par un anticorps contre 2 000-2 900 RU quand l'intégrine est directement fixée au senseur. Cette technique de capture ne pourrait pas nous permettre de mesurer la liaison de composés de faible poids moléculaire. Nous n'avons pas trouvé les conditions d'immobilisation suffisante de l'intégrine entière purifiée sur une surface sensor pour détecter la liaison de molécules de faible poids moléculaire.

### III.C.3. Résonance plasmonique de surface réalisée avec l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ chimérique

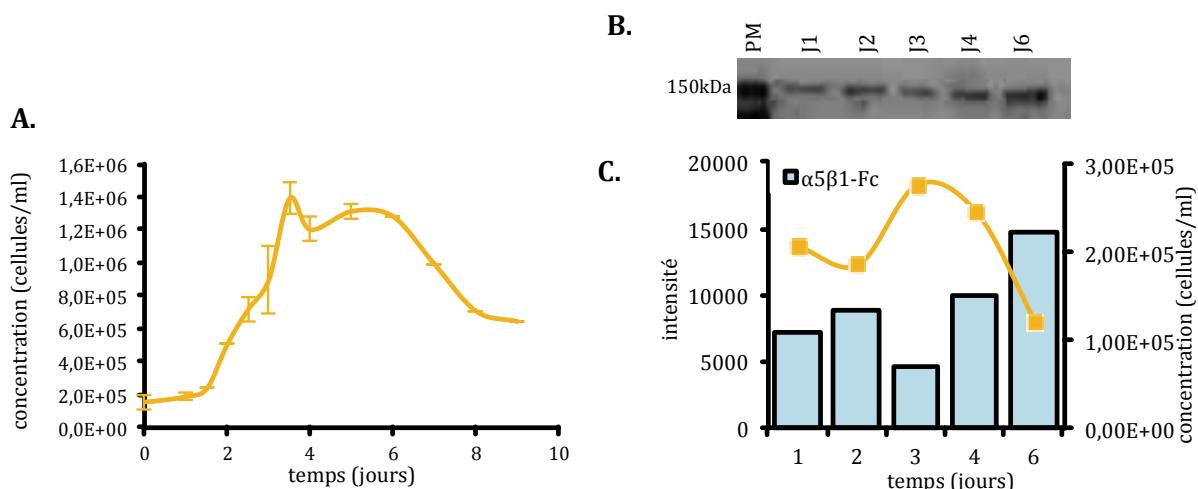
L'équipe du Pr Humphries (Manchester, Royaume Uni) a construit deux plasmides, l'un contenant le gène codant pour la partie extracellulaire de la sous-unité  $\alpha 5$ , l'autre celui de la sous-unité  $\beta 1$ , chacun relié au gène codant pour la partie constante d'un anticorps humain (Fc) (Coe et al., 2001). La transfection de ces deux plasmides dans des hybridomes NS0 permet la sécrétion de la protéine chimérique  $\alpha 5\beta 1$ -Fc stable et soluble dans le milieu de culture. Nous avons souhaité utiliser cette protéine pour la résonance plasmonique de surface afin de pallier au problème d'activité de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  entière purifiée. Suite au don de son clone par le Dr Humphries, nous avons réalisé la production et la purification de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ -Fc au laboratoire.

Les hybridomes NS0 sont maintenus en culture dans un milieu spécifique supplémenté à 10% de sérum fœtal de veau. Afin de simplifier la purification, la phase de production de la protéine  $\alpha 5\beta 1$ -Fc est réalisée dans des conditions sans sérum. Ainsi la présence d'anticorps ou d'autre protéines dans le milieu de culture est limitée. La cinétique de croissance des cellules cultivées en présence de sérum a été réalisée (Figure 42A) afin de connaître la densité maximale que peuvent atteindre les cellules. Les cellules sont ensemencées à environ  $1,5 \cdot 10^5$  cellules/ml. Durant les 6 premiers jours de culture en milieu enrichi en sérum, la croissance cellulaire est importante. Au bout de 6 jours de culture, la densité cellulaire a atteint son maximum avec  $1,5 \cdot 10^6$  cellules/ml en moyenne. Passée cette période, la viabilité cellulaire diminue fortement. Les cellules doivent donc être récoltées lorsque la concentration de  $1,5 \cdot 10^6$  cellules/ml afin d'avoir un maximum de cellules viables lors de la phase de production de la protéine  $\alpha 5\beta 1$ -Fc,

### III. Conception rationnelle d'antagonistes allostériques de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$

aucune croissance cellulaire n'étant observée lors de cette phase (Figure 42C, ligne jaune).

On étudie ensuite la cinétique de production de la protéine chimérique pour les cellules cultivées sans sérum (Figure 42B et C). On observe que la production de protéine augmente lorsque les cellules meurent. Il paraît donc judicieux de laisser les cellules mourir et d'effectuer la récolte et la purification de la protéine lorsque le pourcentage de cellules vivantes est inférieur à 10%, soit environ 6 jours après l'ensemencement des boîtes.

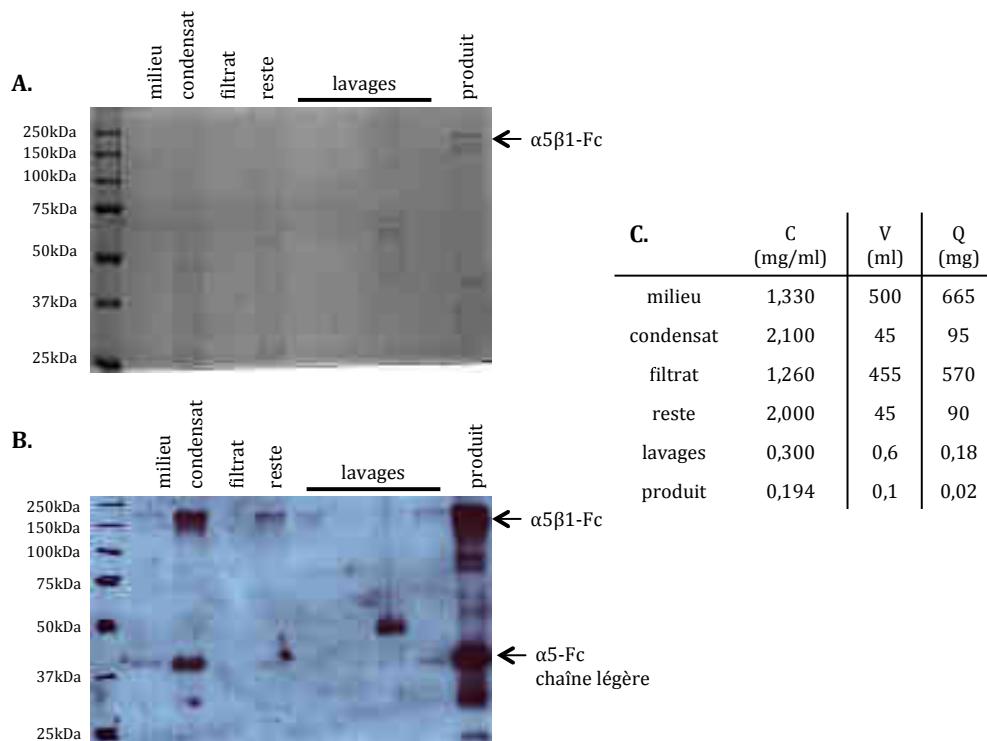


**Figure 42 Cinétiques de croissance des hybridomes NS0 et de production de la protéine  $\alpha 5\beta 1$ -Fc.**

**A.** Graphique représentant la concentration des cellules vivantes cultivées dans du milieu complémenté de 10% de sérum fœtal de bœuf en fonction du temps. **B.** Analyse par western blot de la production de la protéine  $\alpha 5\beta 1$ -Fc dans un milieu sans sérum révélée par un anticorps reconnaissant le fragment constant d'anticorps humain. **C.** Graphique représentant l'intensité des bandes révélées par le western blot (barres bleues, unité interne) ainsi que la concentration de cellules vivantes (ligne jaune) des échantillons testés en fonction du temps.

Après récolte, le milieu est concentré afin de limiter le volume avec lequel on travaille. L'utilisation d'un filtre à 50kDa nous permet également de supprimer toutes les protéines et débris cellulaires de faibles poids moléculaires. La purification de la protéine est effectuée par chromatographie d'affinité, avec des billes de sépharose sur lesquelles sont greffées des protéines A ayant une forte affinité pour les fragments constants des anticorps. L'élution des protéines est effectuée avec un tampon glycine à pH2,5 ensuite neutralisé avec un tampon TRIS. La présence de la protéine chimérique  $\alpha 5\beta 1$ -Fc est détectée par électrophorèse et par western blot (Figure 43). Les différents échantillons, correspondants aux différentes étapes de la purification sont analysés : le milieu de départ récolté (milieu), le milieu condensé (condensat) ainsi que le filtrat soustrait (reste), les différents tampons de lavages des billes de sépharose (lavage) et la

solution finale contenant normalement l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ -Fc pure (produit). La coloration au bleu de coomassie n'a pas permis de détecter de protéine pure, et celle à l'argent, plus sensible, montre l'apparition de bandes de faible intensité entre 250kDa et 150kDa dans l'échantillon « produit ». Le poids moléculaire de ces protéines correspond aux sous-unités  $\alpha 5$  et  $\beta 1$  couplées au fragment constant d'anticorps (Figure 43A). L'analyse par western blot permet l'identification de ces bandes comme comprenant bien le fragment constant d'un anticorps humain (Figure 43B). Par western blot, nous notons tout de même la présence de nombreuses autres bandes dans la fraction « produit ». D'après la publication d'origine (Coe et al., 2001), une bande semble correspondre à la chaîne légère de la sous-unité  $\alpha 5$  de l'intégrine couplée au fragment constant d'anticorps. Après purification nous obtenons donc bien la protéine  $\alpha 5\beta 1$ -Fc, mais peu pure et à une concentration très faible de 0,2 $\mu$ g/ml, soit environ 0,04mg de protéine pour 50ml de milieu purifié (Figure 43C). Ce rendement est très faible comparé à celui attendu de 7mg de protéine pour un litre de milieu purifié initial (donnée fournie par l'équipe du Pr Humphries). La purification est peu efficace, vu le nombre de bandes non identifiées. Il faut améliorer les étapes de production et de purification.



**Figure 43 Purification de la protéine chimérique  $\alpha 5\beta 1$ -Fc.**

**A.** Image d'un gel PAGE coloré à l'argent. Dans l'ordre le milieu de départ, le milieu condensé (condensat), le filtrat restant de la concentration, le reste après purification, les tampons de lavage et la solution finale (produit) ont été déposés à volume constant. **B.** Western Blot révélé avec l'anticorps reconnaissant la partie constante d'anticorps humain réalisé sur les mêmes fractions que celle de la figure A. **C.** Tableau comportant les résultats des dosages protéiques (C : concentration), les volumes initiaux (V) et les quantités de protéines (Q) pour chaque fraction testée.

### *III. Conception rationnelle d'antagonistes allostériques de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$*

Nous avons obtenu la protéine chimérique  $\alpha 5\beta 1$ -Fc à une concentration de 0,194 $\mu$ g/ml. Nous avons testé l'immobilisation de l'intégrine par SPR. Nous nous sommes servis d'un kit fournit par GE Healthcare qui contient un anticorps de souris reconnaissant la partie constante des anticorps humain (Fc), permettant de fixer la protéine de manière orientée, donc dans une conformation la plus active et libre possible. L'anticorps a donc été fixé sur le senseur, avec une forte efficacité, environ 20 000 RU sur les deux chambres testées. Hélas, lors de l'injection de la protéine  $\alpha 5\beta 1$ -Fc, aucun signal n'a été détecté, quelque soit sa concentration d'injection. La capacité de capture de l'anticorps de souris a été validée par l'injection d'un anticorps humain commercial. D'autre part, lors de la fixation directe de la protéine chimérique  $\alpha 5\beta 1$ -Fc sur une chambre, aucun signal n'est détecté. Il semblerait que la concentration de la protéine  $\alpha 5\beta 1$ -Fc que nous avons purifiée ne soit pas suffisante pour permettre la poursuite des expériences avec la technologie Biacore.

*La résonance plasmonique de surface n'a pas permis de tester la liaison de nos molécules à l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . La liaison directe de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  à la surface ne permet pas l'analyse de la liaison molécules de faible poids moléculaire car la proportion d'intégrine fixée dans une conformation active est trop faible. L'utilisation de la chimère  $\alpha 5\beta 1$ -Fc n'est pas possible non plus, la protéine n'ayant pas été produite en quantité suffisante pour permettre une liaison efficace sur la surface du senseur. L'optimisation de la production de cette protéine sera nécessaire avant la poursuite des expériences de SPR.*

*Une deuxième technique de biophysique a été utilisée pour tenter de détecter la liaison de nos composés avec l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . Le Pr Takagi (Osaka, Japon) a mis au point les outils permettant d'utiliser l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  sous une forme soluble dans un test de fluorimétrie différentielle à balayage. Plusieurs composés ont donc été soumis à ce test au Japon, par l'équipe du Pr Takagi.*

## III.D. Fluorimétrie différentielle à balayage

### III.D.1. Principe de la fluorimétrie différentielle à balayage

Grâce à une collaboration avec le Pr Takagi (Osaka, Japon), la liaison entre l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  purifiée et une partie de nos composés a été testée avec l'utilisation de la fluorimétrie différentielle à balayage (DSF) (Niesen et al., 2007; Pantoliano et al., 2001). La totalité de ces manipulations, résultats et analyses ont été réalisés au Japon par le laboratoire du Pr Takagi.

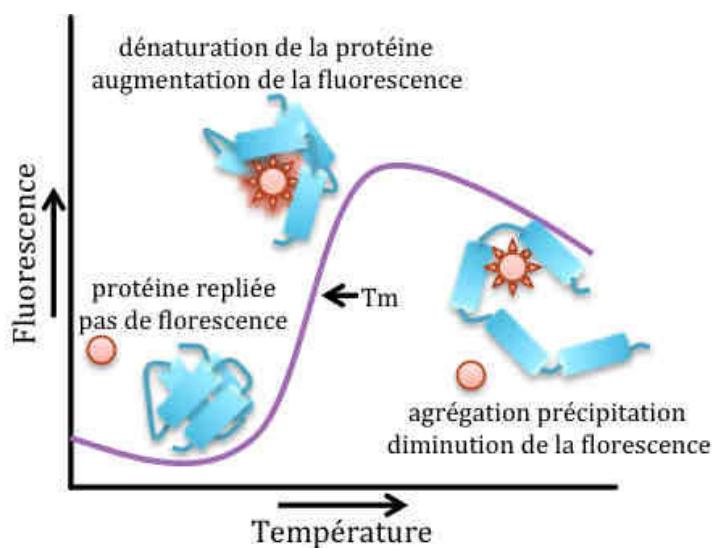


Figure 44 Schéma explicatif du graphique obtenu lors de la DSF.

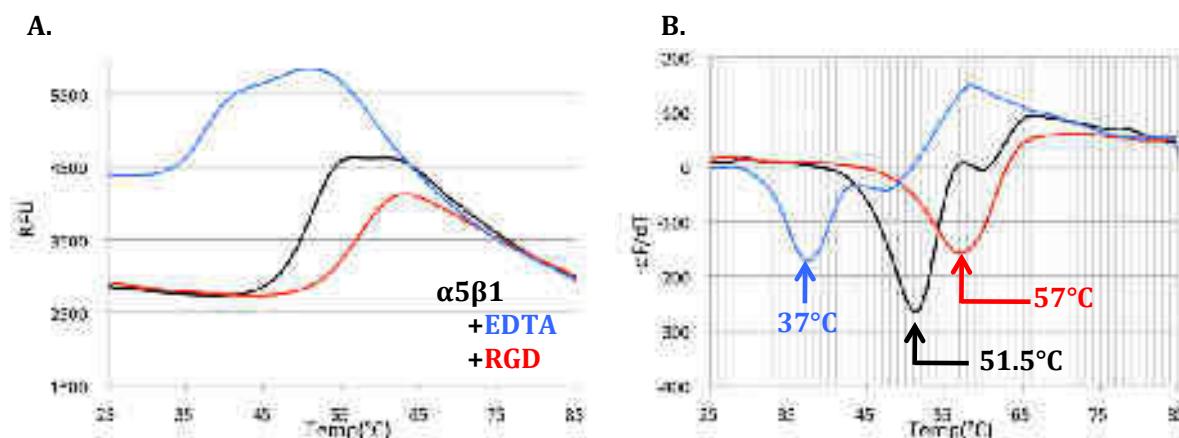
Ce test est basé sur la dénaturation thermique des protéines et la capacité des ligands à stabiliser la protéine et donc à augmenter l'énergie thermique nécessaire pour la dénaturation de la protéine. Dans notre cas, l'équipe du Pr Takagi a utilisé la sonde fluorescente « Sypro Orange » qui a la faculté d'émettre plus de fluorescence lorsqu'elle est dans un environnement non polaire telle que les parties hydrophobes d'une protéine que lorsqu'elle est en solution dans un milieu aqueux (Steinberg et al., 1996). Ainsi lors d'une augmentation constante de température, la protéine va perdre progressivement sa conformation, rendant accessible les parties hydrophobes qui la constituent. La sonde va ainsi s'y insérer et émettre progressivement de la fluorescence jusqu'à ce que la protéine commence à précipiter et s'agréger, la sonde se retrouvant progressivement en solution, la fluorescence va alors diminuer (Figure 44). L'enregistrement de l'intensité de fluorescence de la sonde en fonction de la température correspond à une courbe de

### III. Conception rationnelle d'antagonistes allostériques de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$

type sigmoïdale. Elle permet l'obtention de la température de dénaturation de 50% de la protéine (Tm). La liaison d'une molécule par une protéine est définie par la variation de cette température ( $\Delta T_m$ ). Cette technique est réalisée avec un appareillage à PCR quantitative et permet donc le criblage d'un nombre important de composés en un temps réduit.

#### III.D.2. Utilisation de la DSF avec l'intégrine $\alpha 5\beta 1$

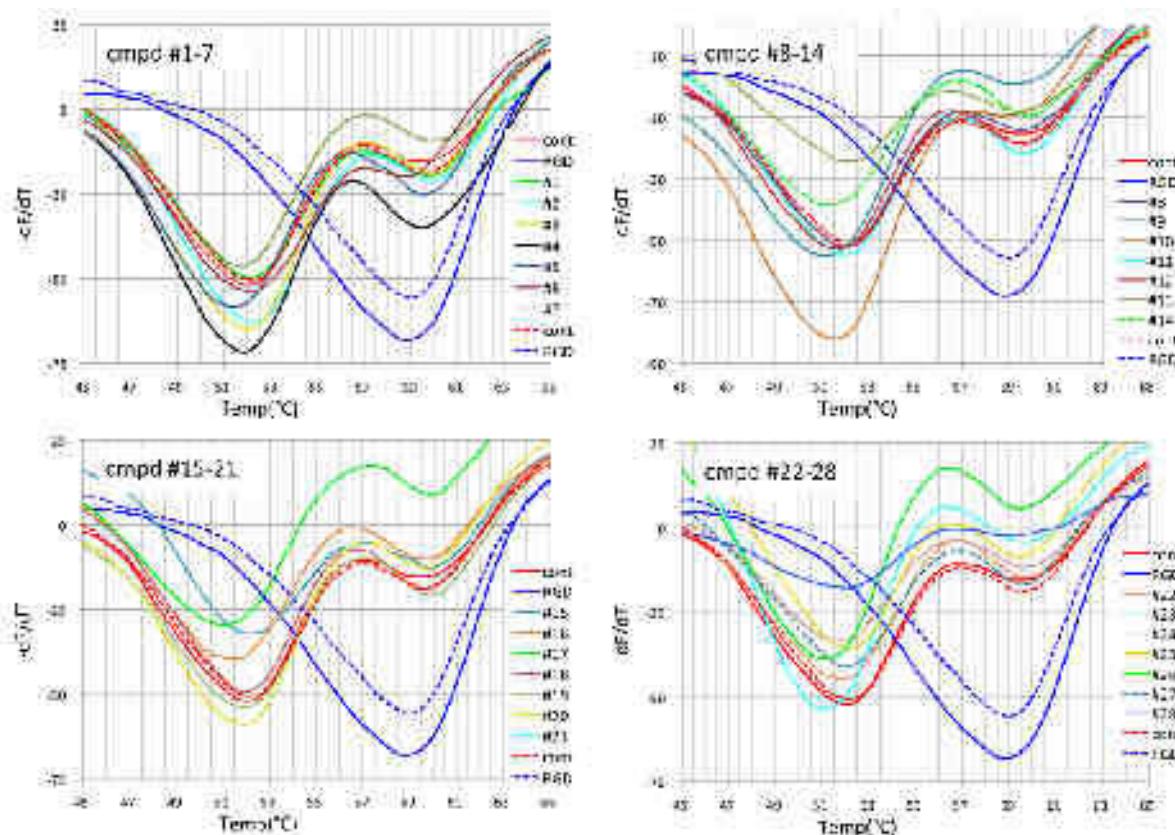
La protéine utilisée lors de ces tests n'est pas l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  entière mais une protéine recombinante soluble comprenant les deux domaines extracellulaires des sous-unité  $\alpha 5$  et  $\beta 1$  (résidus 1-623 pour  $\alpha 5$ , 1-445 pour  $\beta 1$ ) reliés par un pont disulfure séable mise au point par l'équipe du Pr Takagi (Nagae et al., 2012). Afin de mettre au point les conditions réactionnelles, l'effet de l'EDTA et d'un hexapeptide contenant le motif RGD, ligand de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , a été mesuré (Figure 45). L'EDTA déstabilise la protéine en chélatant les ions qui permettent le repliement de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  ( $\Delta T_m = -14,5^\circ\text{C}$ ) tandis que le peptide RGD utilisé à 1mM stabilise l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  ( $\Delta T_m = +5,5^\circ\text{C}$ ).



**Figure 45 Modulation de la température de dénaturation de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  par l'EDTA et le peptide RGD.**

**A.** Graphique représentant l'intensité de fluorescence en fonction de la température pour l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  seule (noir), en présence d'EDTA (bleu) ou du peptide RGD (1mM, rouge). **B.** Graphique représentant la dérivée de l'intensité de fluorescence sur la température en fonction de la température, pour l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  seule (noir), en présence d'EDTA (bleu) ou du peptide RGD (1mM, rouge), le minimum de la courbe correspond à la pente la plus forte dans le graphique A et peut être extrapolé comme la température nécessaire à la dénaturation de 50% de la protéine.

Une partie de nos composés a été envoyée au Pr Takagi afin de les tester dans ce modèle (Figure 46). La numérotation utilisée par l'équipe du Pr Takagi ne correspond pas à celle qui sera utilisée dans la suite de notre travail, le Tableau 9 permet la conversion entre les deux numérotations. Aucune des molécules testées ne déplace significativement la température nécessaire à la dénaturation de 50% de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . La concentration des composés est deux fois moins importante que celle du peptide RGD de référence, ce qui peut expliquer l'absence de variation significative. Il est également à noter que le peptide RGD est utilisé à une concentration (1mM) très largement supérieure à sa constante de dissociation (de l'ordre du nanomolaire).



**Figure 46 DSF de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  avec les différents composés criblés *in silico*.**

Chacun des graphiques représente la dérivé de l'intensité de fluorescence par la température en fonction de la température, enregistrée pour chaque composé testé (#) (0,5mM). Le contrôle, correspondant à la protéine avec 1% de DMSO, testé en dupliquat est représenté par une ligne rouge pleine et en pointillé. Les résultats obtenus avec le peptide RGD à une concentration de 1mM en dupliquat sont représentés par une ligne bleue pleine et en pointillé.

### III. Conception rationnelle d'antagonistes allostériques de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$

Nom Osaka	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Nom Strasbourg	8	9	10	12	59	48	29	50	16	17	47	14	62	58
Nom Osaka	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Nom Strasbourg	32	33	20	34	35	38	21	41	42	22	24	25	26	30

**Tableau 9 Conversion entre la numérotation des molécules à Osaka et celle de Strasbourg.**

*Tout comme la SPR, la DSF ne nous a pas permis d'observer une liaison entre nos composés et l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . La protéine chimérique mise au point par l'équipe du Pr Takagi permet la détection du peptide RGD, ligand de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , à forte concentration. Aucun de nos composés testés ne déplace la température de dénaturation de cette protéine.*

*Ces essais infructueux n'ont pas permis de réduire la liste des 67 composés sélectionnés *in silico* sur le critère de la liaison directe de l'intégrine.*

*Dans le Chapitre II (p79) nous avons mis au point un test de criblage *in vitro* basé sur la migration de cellules isolées de glioblastomes (U87MG). Dans ce modèle, la migration des cellules est dépendante de l'expression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , les antagonistes de cette intégrine testés (RGD mimétiques) inhibent sélectivement la migration des cellules exprimant l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ .*

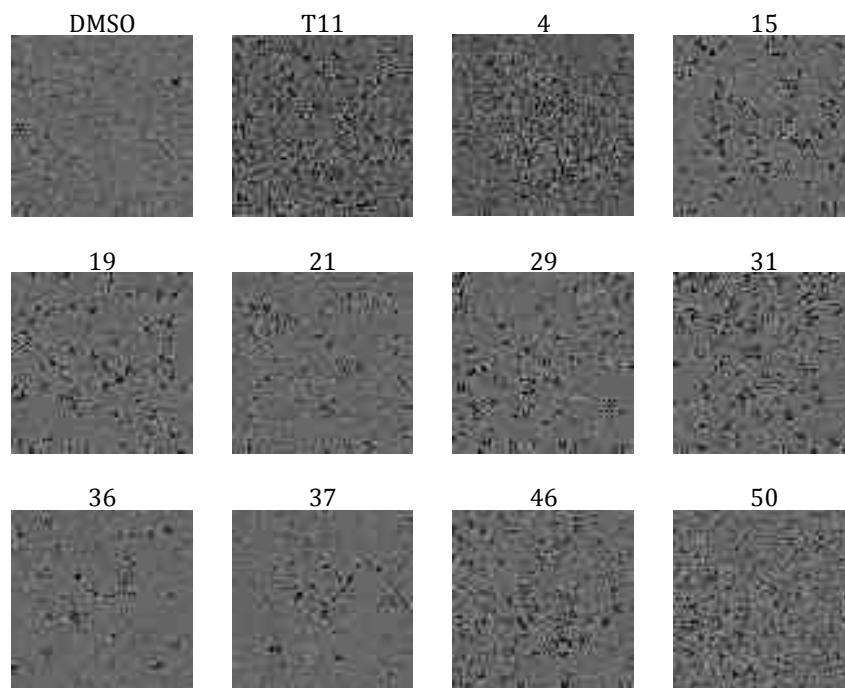
*Nous avons donc sélectionné, parmi les 67 composés, ceux qui étaient capables de bloquer la migration des cellules dépendante de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ .*

### III.E. Criblage fonctionnel *in vitro*

Afin de pouvoir sélectionner des composés dont l'action est majoritairement dépendante de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , les composés seront tout d'abord sélectionnés pour leur effet sur la migration isolée des cellules sur-exprimant notre cible, l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  (U87MG- $\alpha 5+$ ), puis une deuxième sélection sera réalisée sur les cellules qui l'expriment peu (U87MG- $\alpha 5-$ ). Ensuite leurs effets sur l'adhérence des cellules à la fibronectine et à la vitronectine ainsi que sur la migration collective et la prolifération des cellules seront également mesurés.

#### III.E.1. Toxicité et solubilité des composés

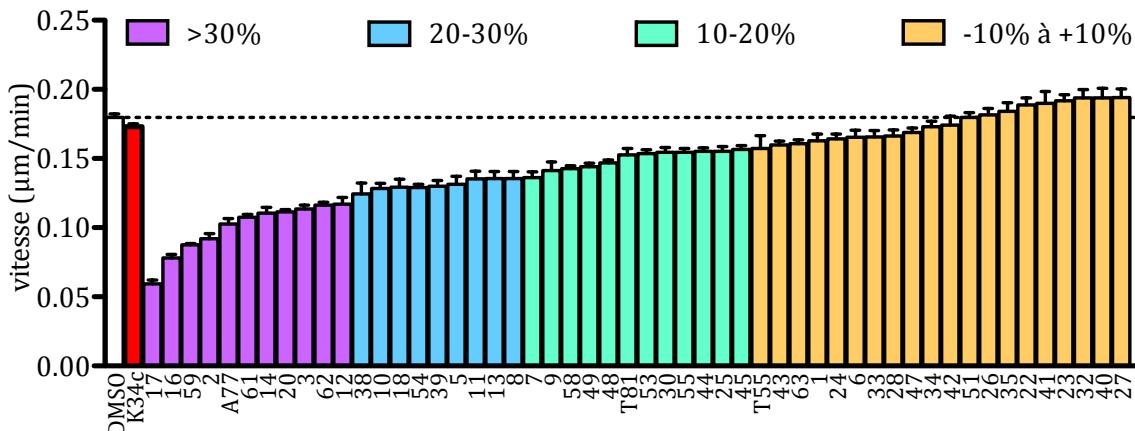
Afin d'écartier de l'étude les touches toxiques ou non solubles, les cellules U87MG- $\alpha 5+$  sont traitées avec chaque composé à la concentration que nous utiliserons pour le reste de l'étude (50 $\mu$ M). Au bout de 24h, les cellules sont observées au microscope. Quatre molécules précipitent dans le milieu (composés 52, 56, 57 et 60) et ont donc été écartées de la suite de l'étude. Onze autres molécules provoquent une mort cellulaire en moins de 24h et apparaissent ainsi toxiques (Figure 47) et sont également écartées de l'étude. Il reste 52 molécules dont l'étude se poursuit.



**Figure 47 Toxicité des composés observée après 24h sur un tapis cellulaire (U87MG- $\alpha 5+$ ).**  
Dans le cas des composés 15, 19, 21, 29, 31, 36 et 37 un grand nombre de cellules sont mortes et flottent au dessus du tapis cellulaire, pour les autres composés les cellules ont des morphologies atypiques précédant certainement une mort cellulaire.

### III.E.2. Criblage des composés sur les cellules U87MG- $\alpha 5+$

La totalité des composés restant est testée sur la migration des cellules U87MG- $\alpha 5+$  isolées (Figure 48).



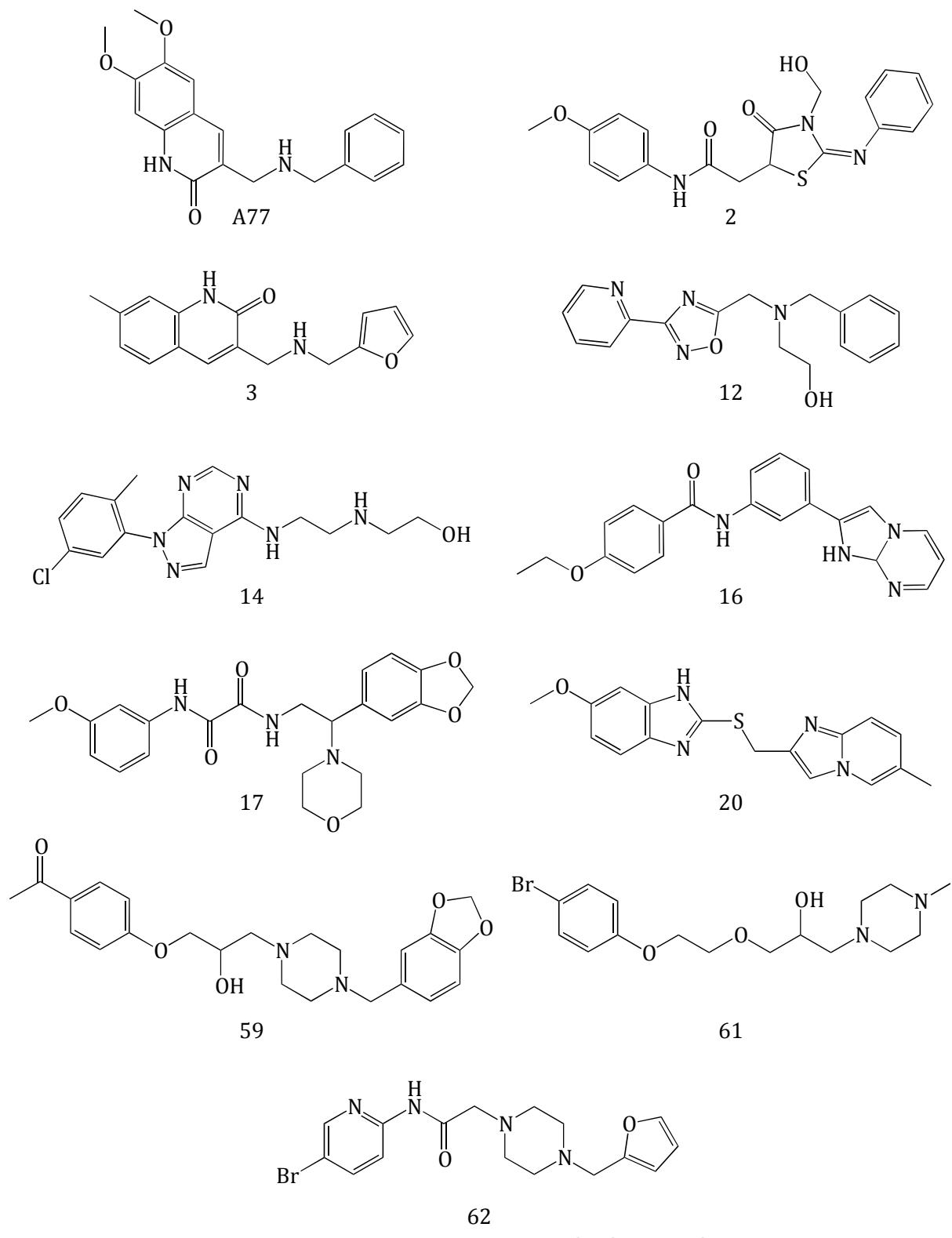
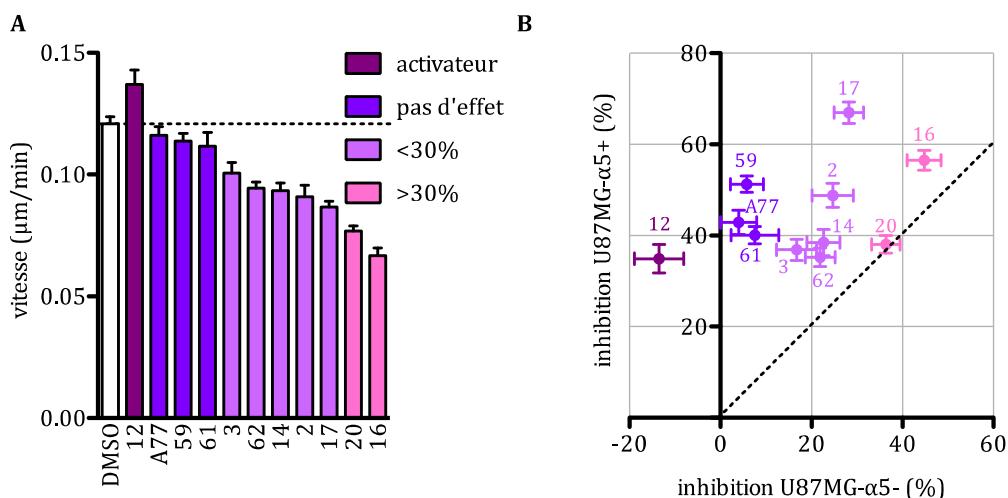


Figure 49 Structure des 11 composés sélectionnés.

### III.E.3. Sélection des composés sur les cellules U87MG- $\alpha 5$ -

Les 11 composés sélectionnés sont testés sur la migration des cellules U87MG- $\alpha 5$ - (Figure 50) qui n'expriment pratiquement plus l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . L'ensemble des inhibitions est reporté dans le Tableau 10. Le but de ce test est de sélectionner le ou les composés qui auront un maximum d'effet sur les cellules U87MG- $\alpha 5$ + et le moins d'effet possible sur les cellules U87MG- $\alpha 5$ -.

Les composés peuvent se classer en quatre catégories (Figure 50A). Le composé 12 active la migration des cellules U87MG- $\alpha 5$ - ( $13,5\% \pm 5,4$ ). Selon les résultats obtenus dans le Chapitre II, seul les antagonistes de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  activent la migration. Il est donc possible que le composé 12 agisse sur l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  lorsque les cellules n'expriment pas l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . Trois composés (A77, 59 et 61) inhibent moins de 10% de la migration de nos cellules. L'inhibition de la migration des cellules U87MG- $\alpha 5$ + est donc entièrement dépendante de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . Ce sont de bons candidats pour la suite de notre étude. Cinq composés inhibent la migration entre 10% et 30%. Ils inhibent moins la migration des cellules U87MG- $\alpha 5$ - que celle des cellules U87MG- $\alpha 5$ +. Leur effet est seulement en partie dépendant de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . Enfin les deux derniers composés (16 et 20) inhibent plus de 30% de la migration, c'est à dire autant que la migration des cellules U87MG- $\alpha 5$ + isolées. Ces composés ont donc un effet totalement indépendant de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . L'ensemble des résultats obtenus pour ces onze composés sur la migration des cellules U87MG- $\alpha 5$ + et U87MG- $\alpha 5$ - est schématisé dans la Figure 50B.



**Figure 50 Effets des composés sur la migration des cellules U87MG- $\alpha 5$ -.**

**A.** Histogramme représentant la vitesse des cellules U87MG- $\alpha 5$ - traitées avec le DMSO (0,5%) ou les différents composés (50 $\mu$ M) sélectionnés sur les cellules U87MG- $\alpha 5$ +. **B.** Nuage de point représentant l'inhibition (Moyenne et SEM) des composés sur les cellules U87MG- $\alpha 5$ + en fonction de leur inhibition sur les cellules U87MG- $\alpha 5$ -, le trait en pointillé représente la ligne de séparation de sélectivité.

	U87MG- $\alpha 5+$		U87MG- $\alpha 5-$		Ratio $\alpha 5+/\alpha 5-$
	Moyenne	SEM	Moyenne	SEM	
A77	42,9	2,7	4,0	3,9	10,7
59	51,2	1,8	5,8	3,6	8,8
61	40,1	1,9	7,5	5,2	5,3
17	66,9	2,4	28,2	3,2	2,4
2	48,8	2,6	24,7	4,5	2,0
3	36,9	2,3	16,7	4,4	2,2
14	38,5	2,9	22,7	3,6	1,7
62	35,2	2,0	21,9	3,3	1,6
16	56,5	2,2	44,8	3,7	1,3
20	38,0	1,9	36,4	3,2	1,0
12	34,9	3,1	113,5	5,4	0,25

Tableau 10 Inhibitions de la migration par les onze composés sur les cellules U87MG.

Seuls les composés A77, 59 et 61 semblent être des antagonistes de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . Cependant, par leur capacité à inhiber la migration des cellules de glioblastomes, les autres composés peuvent présenter un potentiel thérapeutique. Nous avons donc continué la suite de la caractérisation des molécules avec l'ensemble de ces composés.

### III.E.1. Etude de l'effet des composés sur la migration collective des cellules U87MG- $\alpha 5+$

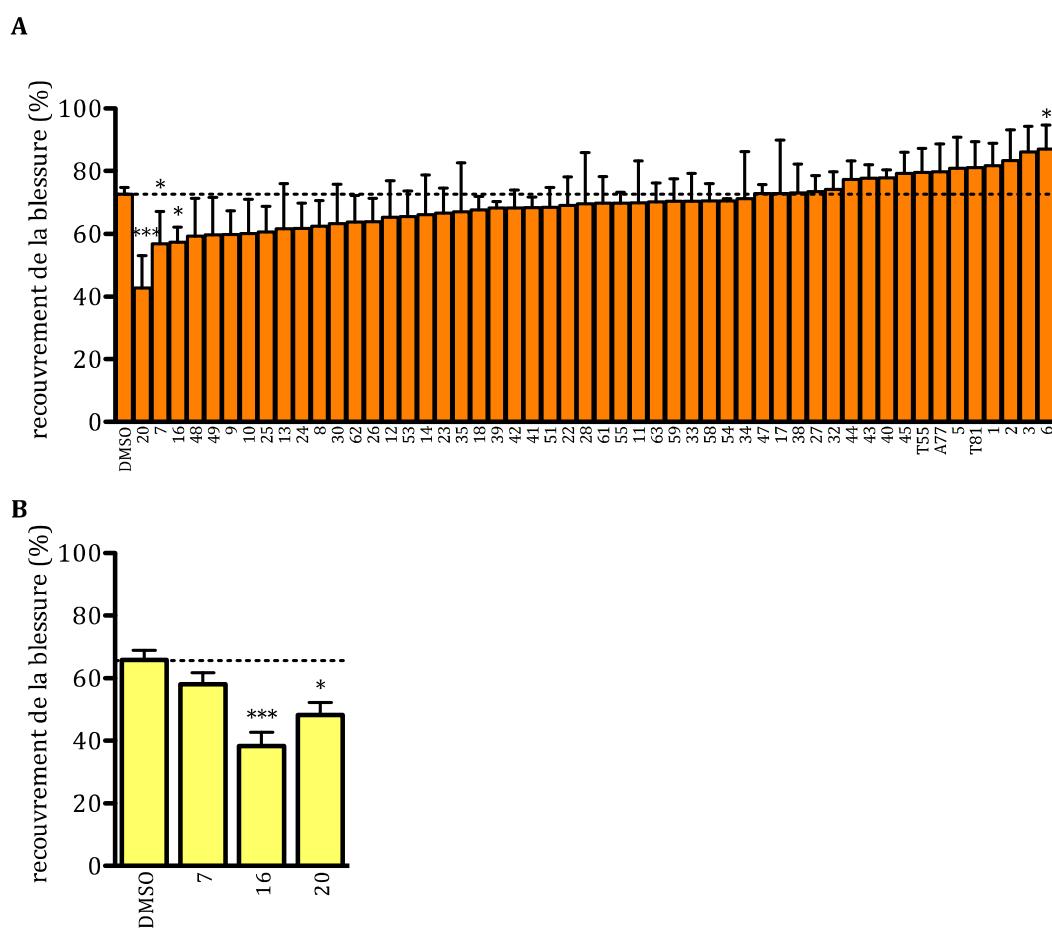
Comme décrit dans le Chapitre II, la migration collective des cellules U87MG n'est pas dépendante de l'expression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  mais peut être inhibée par des antagonistes de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  ou de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$ . L'utilisation conjointe d'antagonistes de ces deux intégrines a un effet synergique (Figure 24 p107). Afin d'étudier si il existe une corrélation entre l'effet des touches sur la migration isolée des cellules U87MG- $\alpha 5+$  et sur leur migration collective, nous avons évalué l'effet de nos 52 composés sur la migration collective des cellules U87MG- $\alpha 5+$  (Figure 51A).

Seuls les composés 7, 16 et 20 inhibent significativement le recouvrement de la blessure par les cellules U87MG- $\alpha 5+$ . Le composé 6 est le seul à activer la migration collective des cellules U87MG- $\alpha 5+$  ( $20\% \pm 11\%$ ). Les trois composés 7, 16 et 20 sont testés sur la migration collective des cellules U87MG- $\alpha 5-$ . Le composé 7 n'inhibe pas la migration collective de ces cellules. Son action sur la migration des cellules U87MG- $\alpha 5+$  est donc totalement dépendante de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . Il inhibe 24% de la migration des cellules isolées U87MG- $\alpha 5+$  (Figure 48). Ce composé pourrait donc être un antagoniste de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . Les composés 16 et 20 inhibent quand à eux la migration collective

### III. Conception rationnelle d'antagonistes allostériques de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$

des cellules U87MG- $\alpha 5-$ , leur action est donc indépendante de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  comme pour la migration isolée de ces cellules. Fait intéressant, les molécules 16 et 20 sont les deux seuls composés sélectionnés pour inhiber la migration isolée des cellules U87MG- $\alpha 5+$  qui ont un effet totalement indépendant de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ .

Comme nous l'avons montré dans le Chapitre II, il n'existe pas de corrélation claire entre l'effet des composés sur la migration isolée des cellules U87MG- $\alpha 5+$  et leur effet sur la migration collective de ces mêmes cellules. Il n'est donc pas étonnant que les composés A77, 59 et 61 n'inhibent pas la migration collective des cellules U87MG- $\alpha 5+$  alors qu'ils inhibent la migration isolée de cellules de manière totalement dépendante de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ .

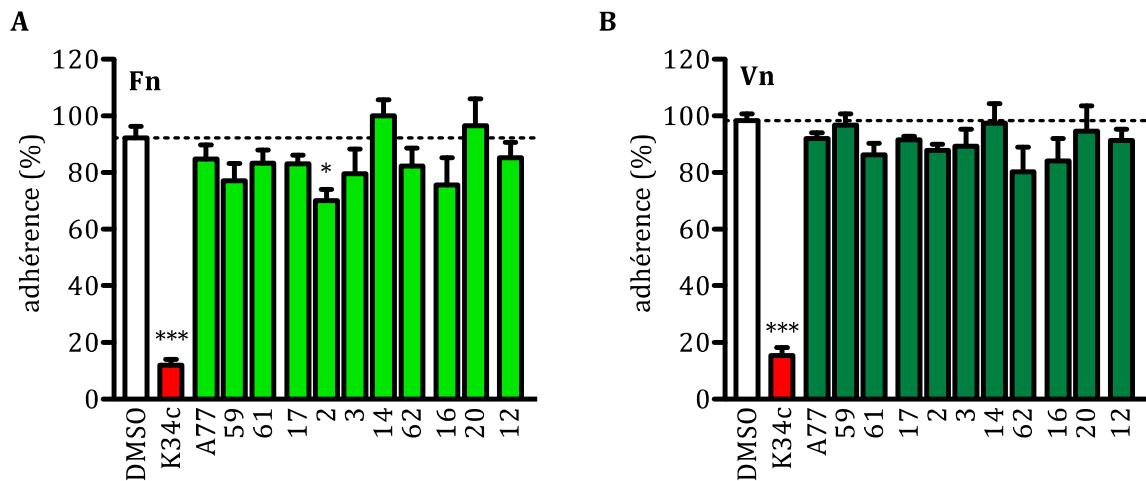


**Figure 51** Effet des composés criblés sur la migration collective des cellules U87MG.

Histogramme représentant le recouvrement de la blessure par les cellules U87MG- $\alpha 5+$  traitées avec le DMSO (0,5%) ou les différents composés (50 $\mu$ M). B. Histogramme représentant le recouvrement de la blessure par les cellules U87MG- $\alpha 5-$  traitées avec le DMSO (0,5%) ou le composé 7, 16 ou 20 (50 $\mu$ M).

### III.E.2. Adhésion cellulaire

Nous avons sélectionné nos composés sur leur capacité à inhiber la migration isolée de nos cellules. Nous souhaitons aussi connaître leur effet sur l'adhérence de ces mêmes cellules à la fibronectine ou à la vitronectine. Nous avons donc évalué l'adhérence des cellules U87MG- $\alpha$ 5+ sur la fibronectine et la vitronectine en présence des onze composés capables d'inhiber la migration de cellules sur-exprimant l'intégrine  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 (Figure 52).



**Figure 52 Effets des composés sélectionnés sur l'adhérence des cellules U87MG- $\alpha$ 5+.**

**A.** Histogramme représentant l'adhérence des cellules U87MG- $\alpha$ 5+ traitées avec le DMSO (0,5%) ou les composés sélectionnés (50 $\mu$ M) sur la fibronectine (1 $\mu$ g/ml). **B.** Histogramme représentant l'adhérence des cellules U87MG- $\alpha$ 5- traitées avec le DMSO (0,5%) ou les composés sélectionnés (50 $\mu$ M) sur la vitronectine (1 $\mu$ g/ml).

Nos composés n'ont aucun effet significatif sur l'adhérence des cellules U87MG- $\alpha$ 5+ à la fibronectine à l'exception du composé 2 qui inhibe 22% de l'adhérence (Figure 52A). En ce qui concerne l'adhérence de nos cellules à la vitronectine, aucun composé n'est capable de l'inhiber significativement (Figure 52B). Nos composés sont donc capables d'inhiber la migration des cellules U87MG- $\alpha$ 5+ mais pas l'adhérence à la fibronectine ou à la vitronectine de ces cellules, ce qui les différencie des antagonistes de référence des intégrines (mimes de la séquence RGD).

En ce qui concerne le composé 2, son effet est très faible sur l'adhérence à la fibronectine par rapport aux antagonistes de l'intégrine  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 mimant la séquence RGD étudiés dans le Chapitre II qui inhibent près de 100% de l'adhérence des cellules U87MG- $\alpha$ 5+ à la fibronectine à 20 $\mu$ M (Figure 16A p62). Le composé 2 n'a aucun effet sur l'adhérence des cellules à la vitronectine. Les antagonistes de référence de l'intégrine  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 inhibent une partie significative de l'adhérence des cellules U87MG- $\alpha$ 5+ à la

### *III. Conception rationnelle d'antagonistes allostériques de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$*

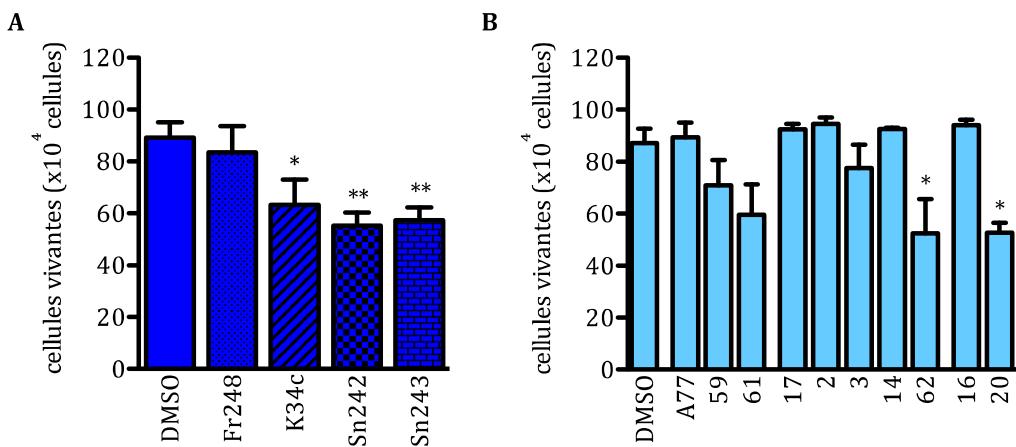
vitronectine (50% Figure 16B p62). L'effet des antagonistes RGD-mimétiques de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  ont est beaucoup plus faible sur l'adhérence des cellules à la vitronectine que sur celle à la fibronectine (lorsqu'ils sont utilisés à la concentration de 20 $\mu$ M). Ainsi si le composé 2 agit de la même manière. Il se pourrait que l'effet sur l'adhérence à la vitronectine soit tellement faible qu'il ne soit pas détectable. On ne peut cependant pas exclure que ce composé agisse sur une autre cible.

#### **III.E.3. Effet des composés sur la prolifération cellulaire**

La prolifération est mesurée par comptage des cellules U87MG- $\alpha 5+$  au bleu trypan au bout de 72h de traitement.

Nous avons tout d'abord testé quelques uns des antagonistes de référence de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  et  $\alpha V\beta 3$  utilisés dans le Chapitre II sur la prolifération des cellules U87MG- $\alpha 5+$  (Figure 53A). Le Fr248 et le K34c sont des antagonistes sélectifs de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , le Sn242 et Sn243 de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$ . Le Fr248 n'a pas d'effet sur la prolifération des cellules. Le K34c, le Sn243 et le Sn242 inhibent une partie de la prolifération des cellules (23%, 39% et 33% respectivement). Le K34c est un antagoniste de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  mais nous avons montré dans le Chapitre II précédent qu'il pouvait également inhiber l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  dans le test d'adhérence des cellules U87MG- $\alpha 5+$  sur la vitronectine (Figure 16 p62). La prolifération des cellules U87MG- $\alpha 5+$  semble donc être inhibée par les antagonistes qui vont agir sur l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  et non sur l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . Un test réalisé sur les cellules U87MG- $\alpha 5-$  devra cependant être réalisé afin de confirmer ou non l'implication de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  dans l'effet du K34c.

Nous avons ensuite testé nos composés issus du criblage *in silico* sur la prolifération des cellules U87MG- $\alpha 5+$  (Figure 53B). Seuls deux composés montrent une inhibition significative de la prolifération des cellules, le 20 et le 62 (40% d'inhibition tous les deux). Ces molécules ne sont pas sélectives de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  d'après les résultats obtenus sur la migration isolée des cellules U87MG (Figure 50B). Il semblerait donc qu'elles agissent sur une autre intégrine ou une autre protéine, différente des intégrines.



**Figure 53 Etude de la prolifération des cellules U87MG- $\alpha 5+$ .**

**A.** Histogramme représentant le nombre de cellules en fonction de leur traitement avec le DMSO (0,2%) ou les différentes molécules (20 $\mu$ M). **B.** Histogramme représentant le nombre de cellules en fonction de leur traitement avec DMSO (0,5%) ou avec les différentes molécules (50 $\mu$ M).

*A partir des 67 molécules identifiées *in silico*, nous avons sélectionné nos molécules avec un test de criblage basé sur la capacité des composés à inhiber la migration des cellules isolées de glioblastome. Trois composés (A77, 59 et 61) montrent une capacité à inhiber la migration de nos cellules en fonction de l'expression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  sans pour autant affecter la fonction d'adhérence de cette protéine sur la fibronectine. Ils n'affectent pas non plus la migration collective et la prolifération des cellules U87MG- $\alpha 5+$ .*

*Les molécules 16 et 20 inhibent la migration des cellules, qu'elle soit collective ou individuelle, indépendamment de l'expression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . Elles n'ont pas d'effet sur l'adhérence des cellules à la fibronectine ou à la vitronectine. Le composé 20 inhibe également la prolifération des cellules U87MG- $\alpha 5+$ . Agissant sur la prolifération et/ou sur la migration des cellules, elles possèdent un potentiel intéressant dans le traitement des glioblastomes, mais semblent agir sur une protéine autre que les intégrines  $\alpha 5\beta 1$  ou  $\alpha V\beta 3$ .*

*Nous allons poursuivre notre étude avec le composé 59, dont l'effet sur la migration isolée des cellules U87MG est totalement dépendante de l'expression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , ainsi qu'avec le composé 17 dont l'effet sur les cellules U87MG- $\alpha 5+$  est le plus fort observé mais seulement partiellement dépendant de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ .*

### III.F. Etude des analogues des composés 17 et 59

Par l'étude des analogues du composé 59, nous espérons trouver un ou plusieurs composés possédant le même châssis moléculaire que le composé 59, mais ayant un effet plus important sur la migration des cellules U87MG- $\alpha 5+$  tout en conservant une dépendance totale à l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ .

Dans le cas des analogues du composé 17, le but est de trouver un composé chimiquement similaire au composé 17 qui aura un effet totalement dépendant de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  et aussi fort sur la migration isolée des cellules U87MG- $\alpha 5+$  que le composé 17.

Pour cela nous avons sélectionné dans notre banque de composés Bioinfo DB, un certain nombre de molécules similaires aux deux composés 17 et 59.

#### III.F.1. Etude des analogues du composé 59 sur les cellules U87MG

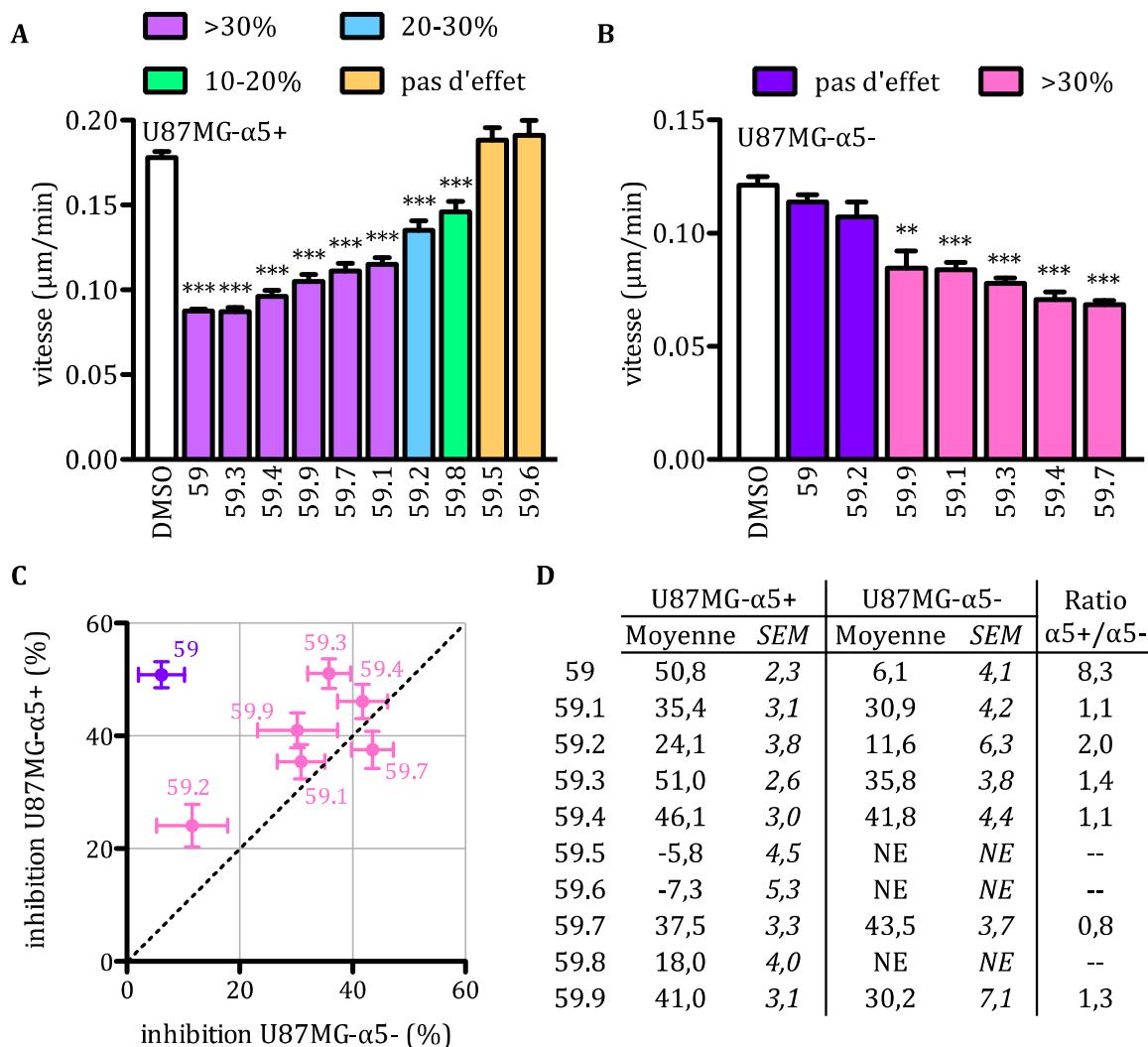
Nous avons trouvé neuf composés dont le châssis moléculaire correspond à celui du composé 59 (Figure 57). Tous ces composés sont solubles dans le DMSO, ne précipitent pas dans le milieu de culture et ne tuent pas les cellules en moins de 24h. Nous pouvons donc poursuivre notre étude avec ces neuf composés. Leur effet sur la migration des cellules U87MG a été mesuré (Figure 54).

En ce qui concerne les cellules U87MG- $\alpha 5+$  (Figure 54A, Figure 54D), deux composés n'ont pas d'effet (59.5 et 59.6). Un composé inhibe moins de 20% de la migration (59.8). Cinq composés inhibent fortement la migration mais moins que le composé 59 (50,8%  $\pm 2,3$ ). Seul le composé 59.3 inhibe la migration des cellules U87MG- $\alpha 5+$  (51,0%  $\pm 2,6$ ) autant que le 59.

Les analogues du 59 qui inhibent plus de 20% de la migration des cellules U87MG- $\alpha 5+$  isolées sont testés sur la migration des cellules U87MG- $\alpha 5-$  (résultats préliminaires), les composés 59.6, 59.7 et 59.8 sont donc exclus de l'étude (Figure 54B). Seule la molécule 59.2 n'inhibe pas la migration des cellules U87MG- $\alpha 5-$ . Toutes les autres molécules inhibent de 30% à 44% la migration de ces cellules (Figure 54D).

La plupart des composés ont perdu leur sélectivité pour l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  (Figure 54C). Aucun rapport entre l'inhibition de la migration des cellules isolées U87MG- $\alpha 5+$  avec celle des cellules U87MG- $\alpha 5-$  n'est supérieur à 2. Les composés semblent donc avoir une action qui est seulement en partie dépendante de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . Le composé

59.3 est la molécule qui inhibe le plus la migration des cellules U87MG- $\alpha$ 5+ (51,0%  $\pm$  2,6), mais elle inhibe également celle des cellules U87MG- $\alpha$ 5- (35,8%  $\pm$  3,8). Seule la molécule 59.2 reste légèrement sélective de l'intégrine  $\alpha$ 5 $\beta$ 1. Elle inhibe peu la migration des cellules U87MG- $\alpha$ 5- (11,6%  $\pm$  6,3), mais n'est pas très efficace sur les cellules U87MG- $\alpha$ 5+ (24,1%  $\pm$  3,8). Aucune des molécules testées n'est une meilleure candidate que la molécule 59 d'origine. Cependant le test de migration de cellules isolées U87MG- $\alpha$ 5- doit être reproduit pour assurer les résultats.

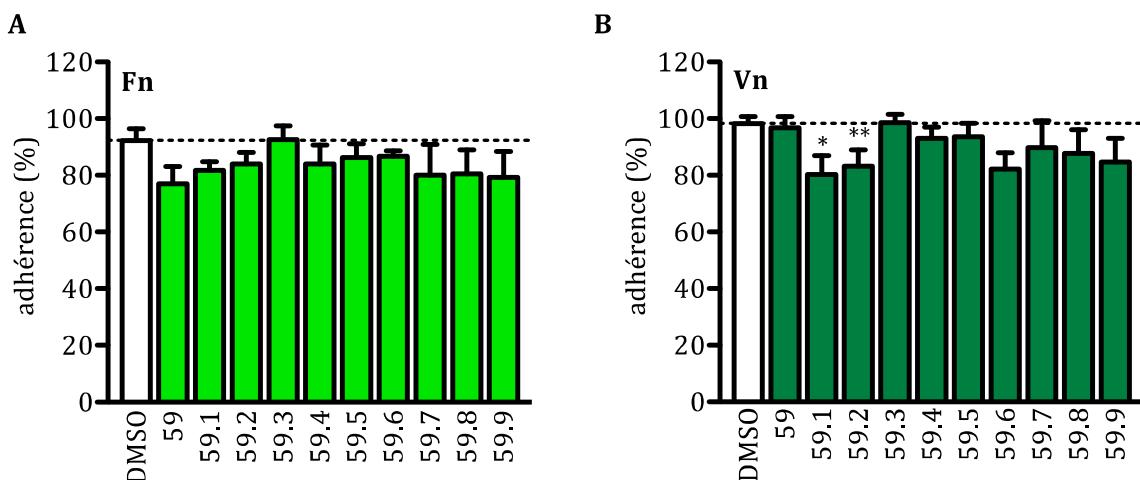


**Figure 54 Etude des analogues du 59 sur la migration des cellules U87MG.**

**A.** Histogramme représentant la vitesse des cellules U87MG- $\alpha$ 5+ traitées avec le DMSO (0,5%) ou les analogues du 59 (50 $\mu\text{M}$ ). **B.** Histogramme représentant la vitesse des cellules U87MG- $\alpha$ 5- traitées avec le DMSO (0,5%) ou les analogues du 59 (50 $\mu\text{M}$ ), résultats préliminaires. **C.** Nuage de point représentant l'inhibition (Moyenne et SEM) des composés sur les cellules U87MG- $\alpha$ 5+ en fonction de leur inhibition sur les cellules U87MG- $\alpha$ 5-. **D.** Tableau récapitulatifs des pourcentages d'inhibition des analogues du composé 59 sur la migration isolée des cellules U87MG- $\alpha$ 5+ et U87MG- $\alpha$ 5-, NE : non évalué

### III. Conception rationnelle d'antagonistes allostériques de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$

Nous avons également testé les analogues du composé 59 sur l'adhérence des cellules U87MG- $\alpha 5+$  à la fibronectine et à la vitronectine (Figure 55). Aucune molécule n'est capable d'inhiber la liaison des cellules à la fibronectine (Figure 55A). Dans le cas de l'adhérence des cellules à la vitronectine, deux molécules inhibent très faiblement la liaison, le 59.1 et le 59.2 (8% et 4% respectivement). Cette inhibition est vraiment très faible. En conclure qu'elle est due à l'inhibition de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  serait prématuré.

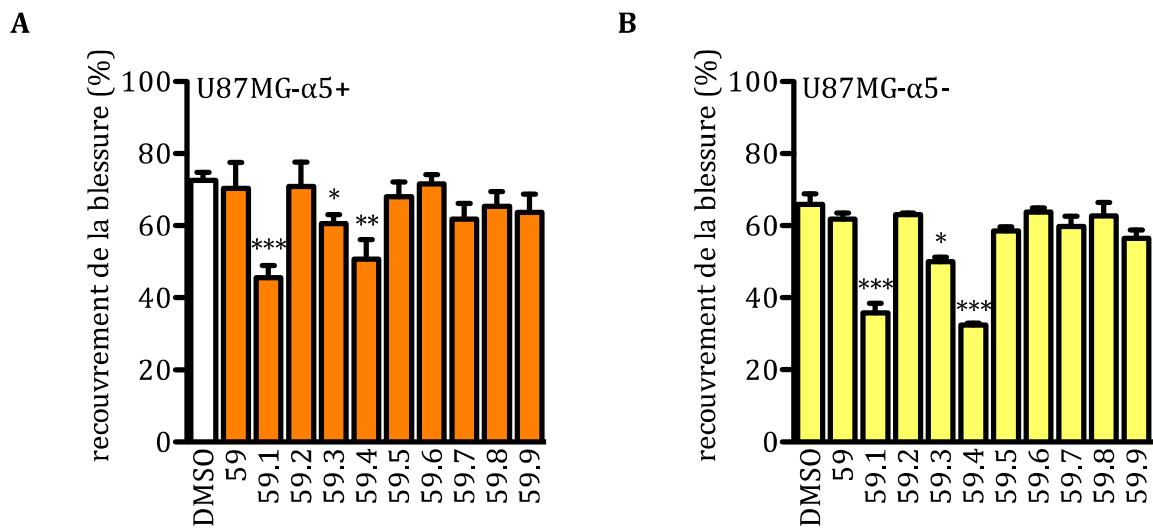


**Figure 55 Effets des analogues du composé 59 sur l'adhérence des cellules U87MG- $\alpha 5+$ .**

A. Histogramme représentant l'adhérence des cellules U87MG- $\alpha 5+$  traitées avec le DMSO (0,5%) ou les analogues du 59 (50 $\mu$ M) sur la fibronectine (1 $\mu$ g/ml). B. Histogramme représentant l'adhérence des cellules U87MG- $\alpha 5+$  traitées avec le DMSO (0,5%) ou les analogues du 59 (50 $\mu$ M) sur la vitronectine (1 $\mu$ g/ml).

Enfin, nous avons testé les différents analogues du 59 sur la migration collective des cellules U87MG- $\alpha 5+$  et U87MG- $\alpha 5-$  (Figure 56).

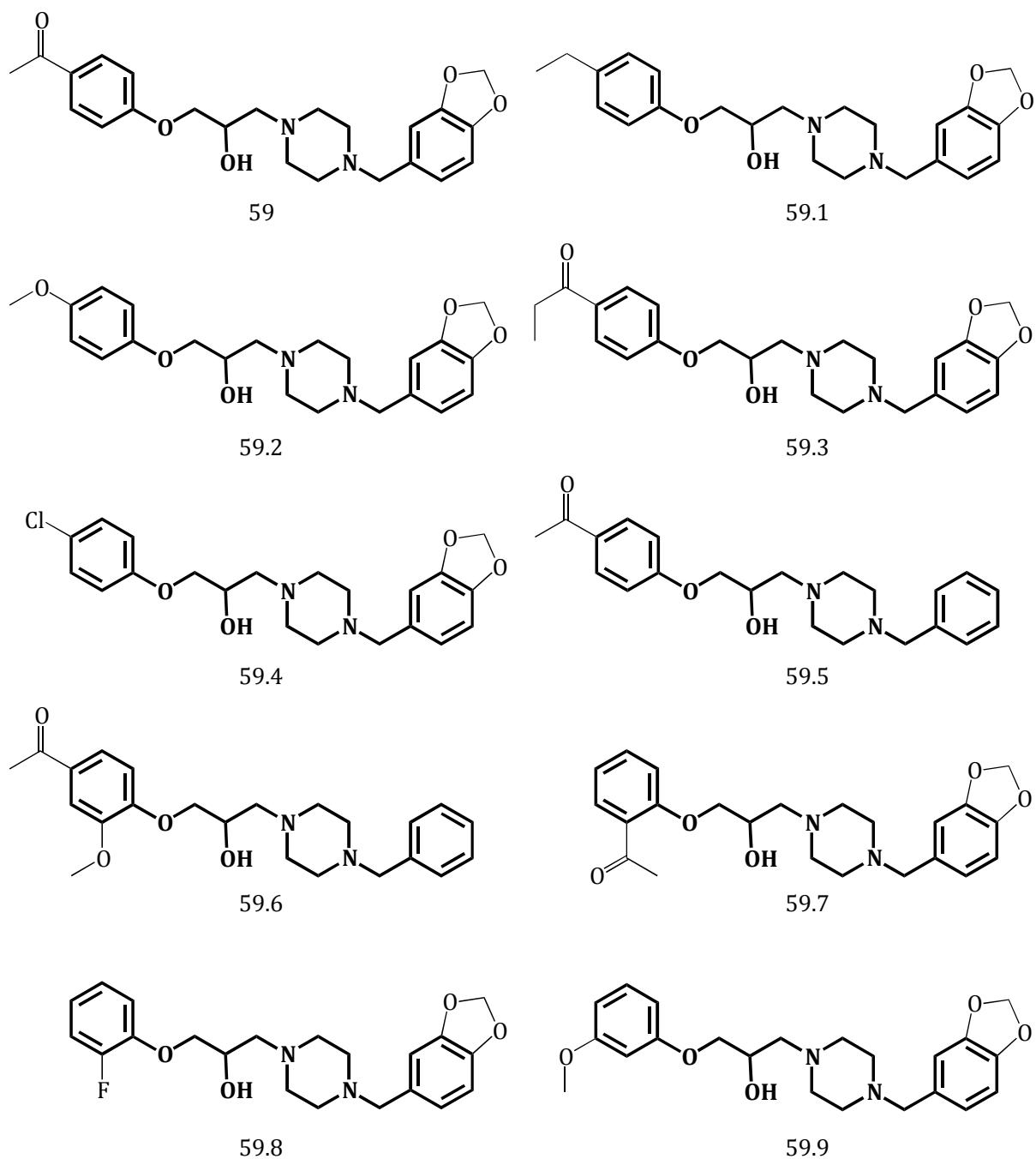
Les résultats sur les cellules U87MG- $\alpha 5+$  (Figure 56A) et U87MG- $\alpha 5-$  (Figure 56B) sont les mêmes, seuls les composés 59.1, 59.3 et 59.4 inhibent la migration collective des cellules. L'inhibition de la migration par ces composés est donc indépendante de l'expression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . Ces trois composés inhibent également la migration isolée des cellules indépendamment de l'expression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . On peut donc supposer qu'elles ont perdu toute sélectivité et agissent sur une autre protéine. Dans le cas de la molécule 59.1, son inhibition de l'adhérence des cellules à la vitronectine nous fait penser qu'elle peut agir sur une intégrine  $\alpha V$ , autre que  $\alpha V\beta 3$  puisque les antagonistes de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  activent la migration des cellules isolée U87MG. Mais pour les composés 59.3 et 59.4, leurs effets pourraient être dûs à une autre protéine, différente des intégrines  $\alpha 5\beta 1$  et  $\alpha V\beta 3$ .



**Figure 56 Effet des analogues du 59 sur la migration collective des cellules U87MG.**

**A.** Histogramme représentant le recouvrement de la blessure des cellules U87MG- $\alpha$ 5+ à 20h traitées avec le DMSO (0,5%) ou les analogues du 59 (50 $\mu$ M). **B.** Histogramme représentant le recouvrement de la blessure des cellules U87MG- $\alpha$ 5- à 20h traitées avec le DMSO (0,5%) ou les analogues du 59 (50 $\mu$ M).

III. Conception rationnelle d'antagonistes allostériques de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$



**Figure 57 Structure du composé 59 et de ses analogues.**

Structure des analogues du composé 59, les châssis moléculaires conservés est représentés en gras.

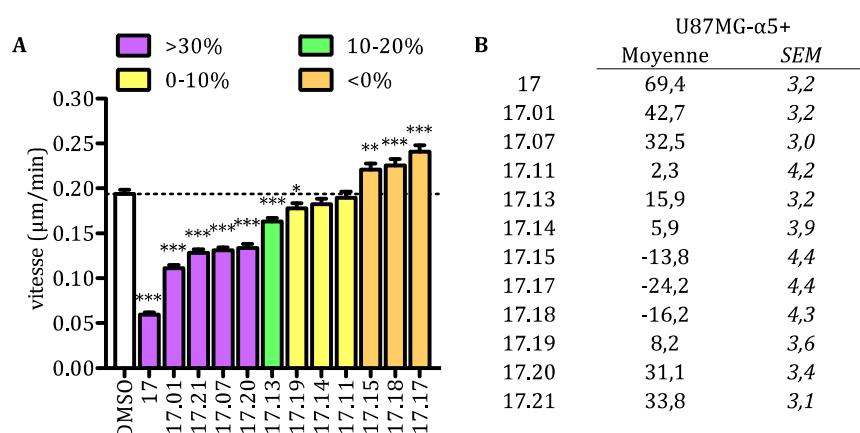
### III.F.2. Etude des analogues du composé 17

Nous avons trouvé 21 analogues partageant le châssis moléculaire du composé 17 (Figure 59 et Figure 60).

Nous avons tout d'abord testé la solubilité et la toxicité des composés. Deux composés ne sont pas solubles dans le DMSO (17.09 et 17.10). Les autres molécules sont mises en présence d'un tapis cellulaire durant 24h afin d'observer leur solubilité et leur toxicité. Neuf composés précipitent dans le milieu de culture : 17.02, 17.03, 17.04, 17.05, 17.06, 17.08, 17.12, 17.16, 17.22. Aucune autre molécule ne présente de toxicité pour les cellules après 24h de traitement. Nous allons donc continuer notre étude sur les onze molécules restantes (Figure 59).

Ces molécules sont testées sur la migration isolée des cellules U87MG- $\alpha$ 5+ (Figure 58A). L'ensemble des résultats est reporté dans le tableau de la Figure 58B. Trois composés ont une activité pro-migratoire sur les cellules U87MG- $\alpha$ 5+ (17.15, 17.17 et 17.18). Trois autres n'ont pas d'effet ou inhibent moins de 10% de la migration des cellules (17.11, 17.14 et 17.19). Les cinq composés restant inhibent entre 15% et 43% de la migration des cellules. Tout comme pour la molécule 59, on ne trouve pas d'analogues qui inhibent plus efficacement que le composé 17 la migration isolée des cellules U87MG- $\alpha$ 5+.

L'effet de ces composés sur la migration des cellules U87MG- $\alpha$ 5- et sur l'adhérence des cellules U87MG- $\alpha$ 5+ à la fibronectine et à la vitronectine n'a pas encore été évalué. Ce travail sera nécessaire pour évaluer la dépendance de l'effet de ces composés à l'intégrine  $\alpha$ 5 $\beta$ 1.



**Figure 58** Effet des analogues du composé 17 sur la migration des cellules U87MG- $\alpha$ 5+.

**A.** Histogramme représentant la vitesse de migration des cellules U87MG- $\alpha$ 5+ traitées avec le DMSO (0,5%) ou les différents analogues du composé 17 (50 $\mu$ M). **B.** Tableau contenant les inhibitions et les écarts à la moyenne des différents composés sur la migration des cellules isolées U87MG- $\alpha$ 5+.

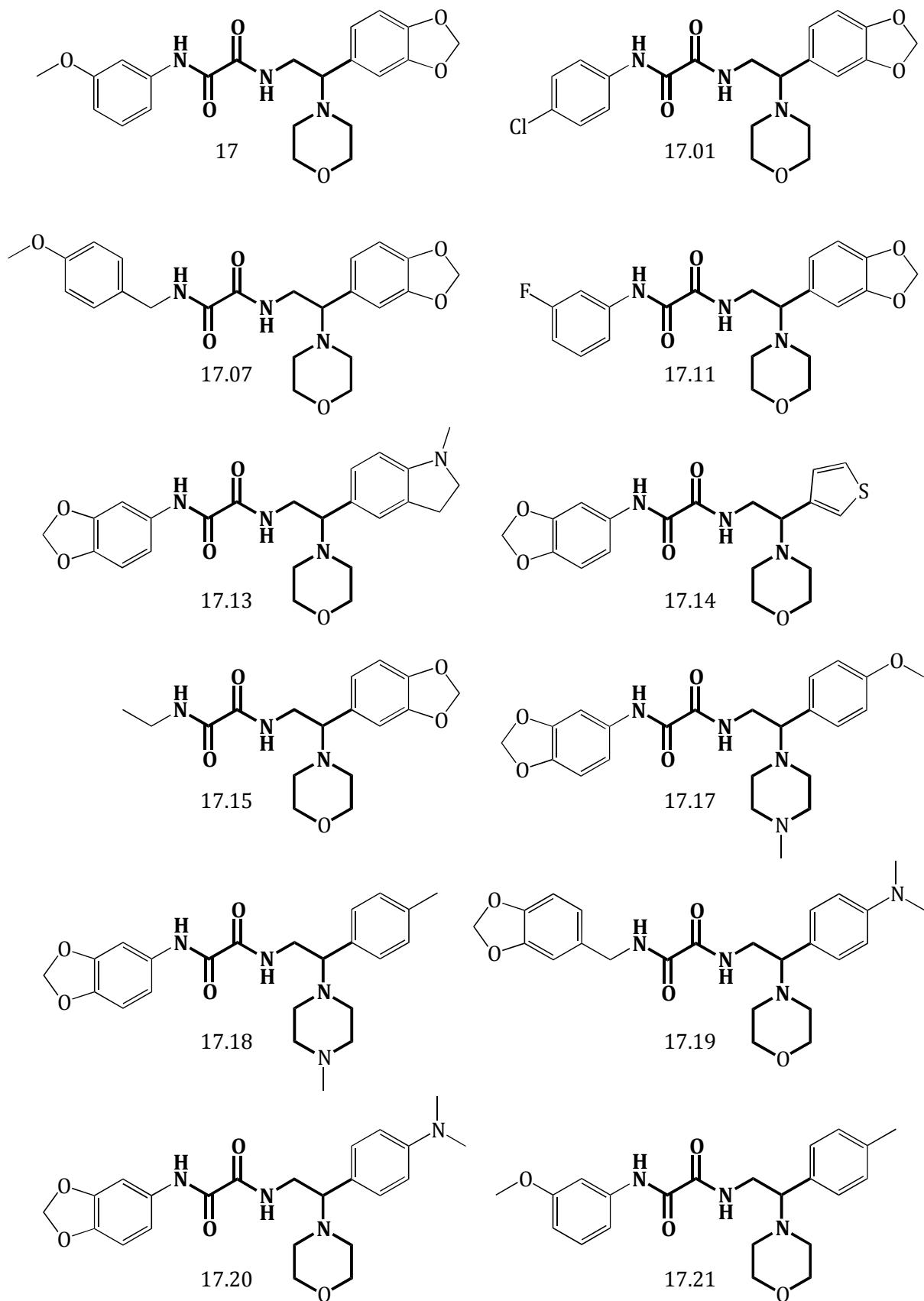


Figure 59 Structure des analogues du composé 17 utilisés dans l'étude.

Structure des analogues du composé 17, le châssis moléculaire conservé est représenté en gras.

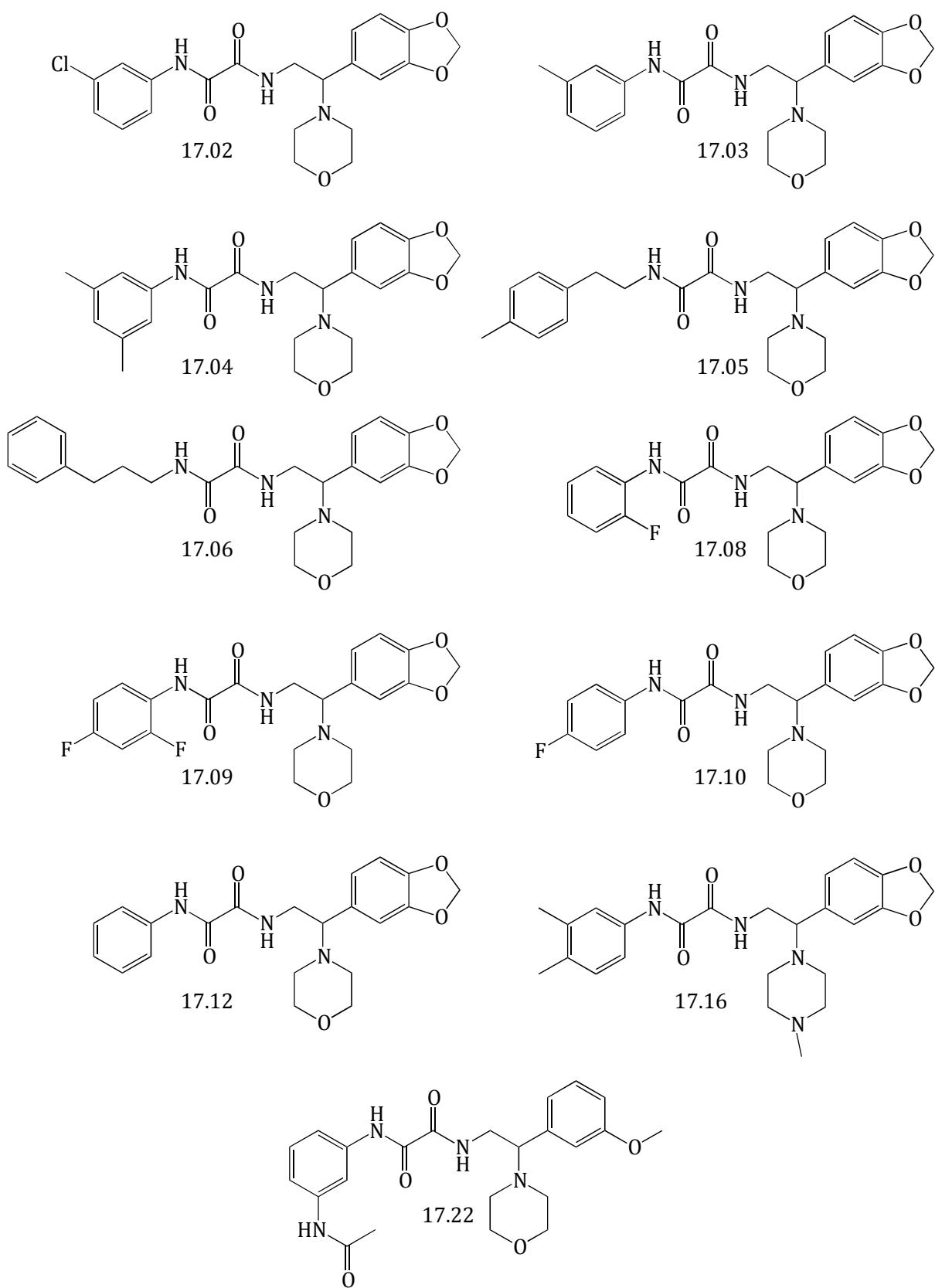


Figure 60 Structure des analogues du composé 17 non utilisés dans l'étude.

### *III. Conception rationnelle d'antagonistes allostériques de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$*

*Lors de l'étude des analogues du composé 59, on ne trouve aucune molécule qui inhibe la migration des cellules U87MG- $\alpha 5+$  autant que la molécule 59. Tous les analogues semblent avoir perdu la capacité du composé 59 à inhiber la migration de façon  $\alpha 5\beta 1$  dépendante. Trois d'entre elles semblent même agir sur une autre protéine, tout comme les composés 16 et 20.*

*Les premiers résultats obtenus pour les analogues du composé 17 sur la migration des cellules isolées U87MG- $\alpha 5+$  ne permettent pas non plus de proposer une molécule qui inhibe aussi fortement la migration que le composé 17. Des expériences complémentaires avec les cellules dépourvues de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  permettront de définir si ces analogues ont un effet anti-migratoire dépendant de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . Dans cette série, quelques analogues montrent clairement une capacité à augmenter la migration des cellules. D'après les résultats obtenus dans le Chapitre II ces composés pourraient agir sur l'intégrine  $\alpha V\beta 3$ .*

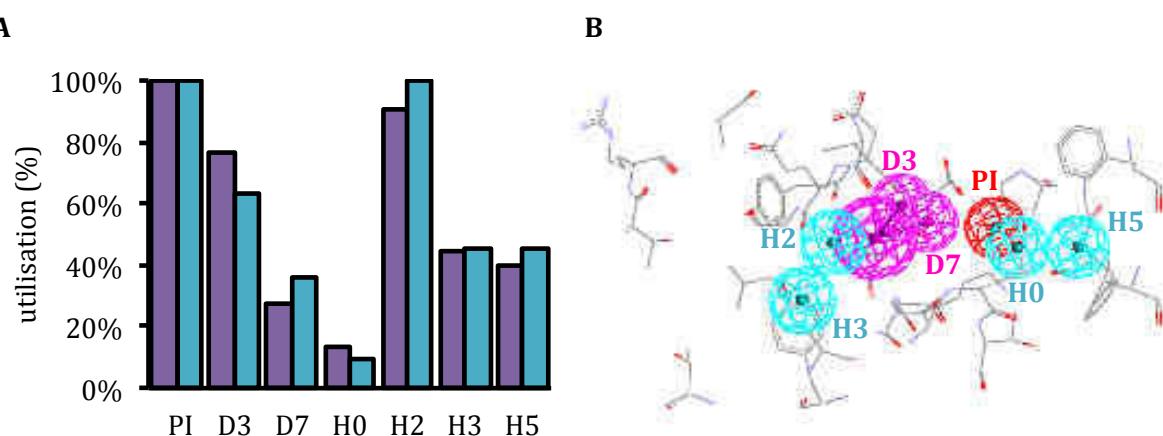
### III.G. Etude des relations structure activité

Nous souhaitons comprendre comment les composés se lient à la poche que nous avons sélectionnée. Pour cela nous allons comparer les poses des composés lors de leur sélection à partir du pharmacophore et de l'arrimage moléculaire avec leur activité biologique mesurée lors des tests de migration. Dans un deuxième temps, l'analyse de la conservation des résidus qui composent notre poche dans la famille des intégrines à RGD nous permettra de définir les résidus permettant la sélectivité des composés pour notre intégrine par rapport aux autres intégrines reconnaissant le tripeptide RGD.

#### III.G.1. Relation structure activité des composés sélectionnés

En comparant les résultats obtenus *in silico* à ceux *in vitro* pour les 11 composés sélectionnés pour leur activité sur la migration des cellules U87MG- $\alpha$ 5+, nous allons tenter d'analyser la relation entre la structure et l'activité biologique de nos composés.

La répartition des caractéristiques du pharmacophore validés par les 6247 composés à la sortie du criblage *in silico* et celle des onze composés obtenus durant le criblage *in vitro* sur les cellules U87MG- $\alpha$ 5+ ne présente aucune différence significative. Aucune caractéristique n'est enrichie. Les descriptifs utilisés pour la formation du pharmacophore sont donc pertinents, mais cette comparaison ne nous informe pas sur la relation structure activité de nos composés. Nous allons donc comparer les poses de nos composés dans le site pour obtenir ces informations.

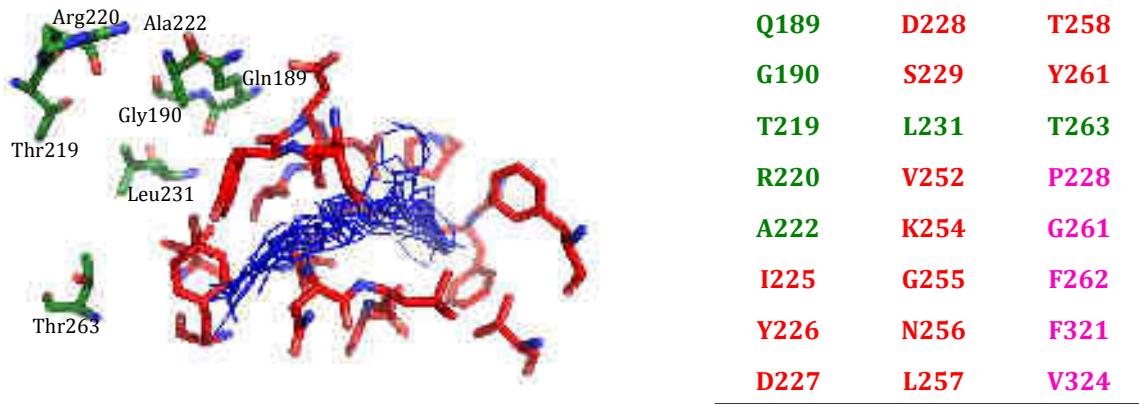


**Figure 61 Validation des critères du pharmacophore par les composés sélectionnés.**

**A.** Histogramme représentant le pourcentage relatif de la validation d'un critère du pharmacophore (PI : positif ionisable, D : donneur de liaison hydrogène, H : hydrophobe) à la fin du criblage *in silico* (violet) et à la fin du criblage sur la migration des cellules U87MG- $\alpha$ 5+ (bleu). **B.** Schéma des caractéristiques du pharmacophore pris en compte dans l'histogramme A, constitué de caractères hydrophobes (bleu), donneurs de liaison hydrogène (rose) et d'un positif ionisable (rouge), dans le site.

### III. Conception rationnelle d'antagonistes allostériques de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$

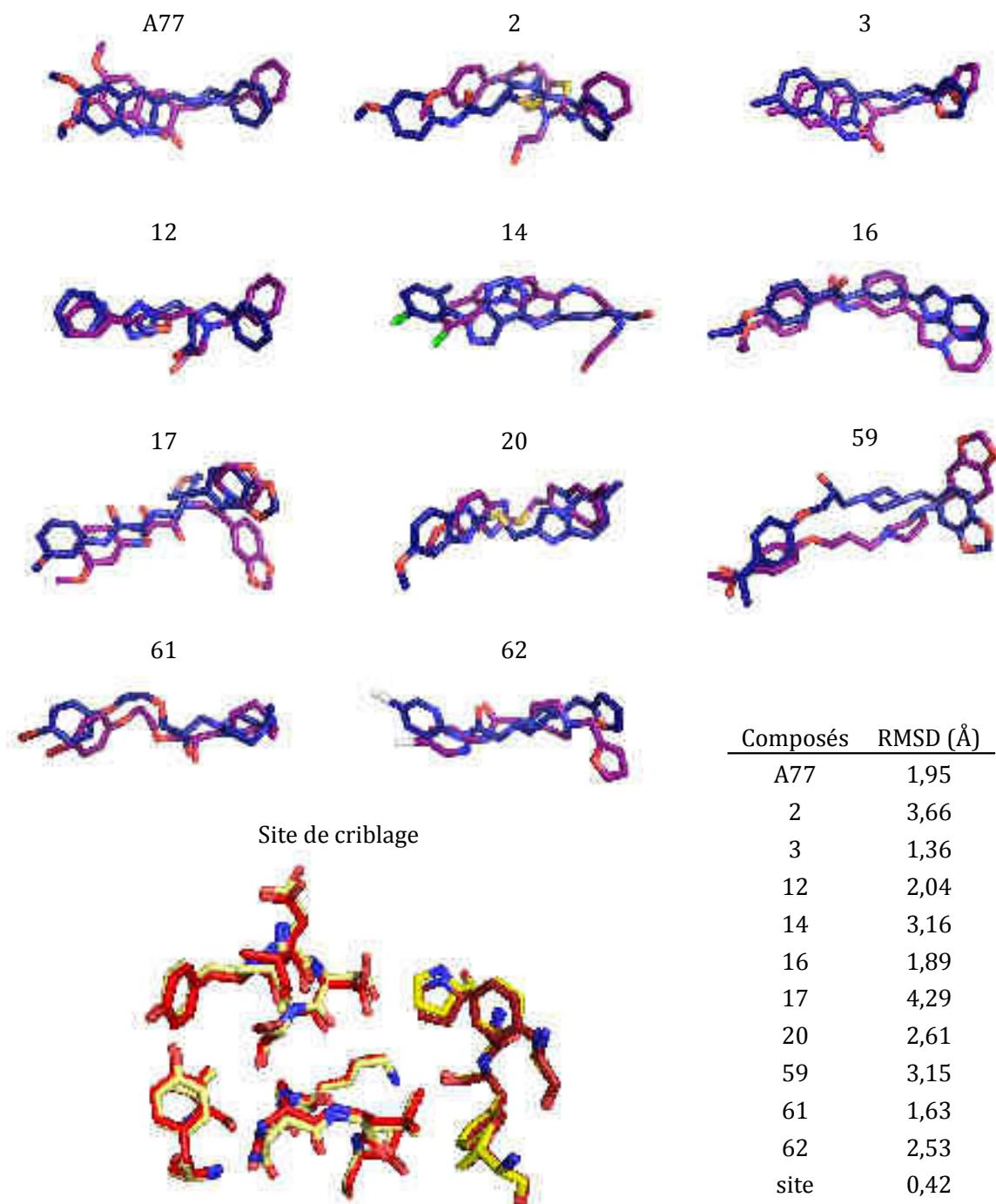
On observe que tous les éléments du pharmacophore sont regroupés sur la même partie du site (Figure 61B). Si on observe la pose de nos composés après arrimage moléculaire (Figure 62), on remarque qu'ils sont également de ce côté du site. Les résidus glutamine 189, glycine 190, thréonine 219, arginine 220, alanine 222, leucine 231 et la thréonine 263 de la sous-unité  $\alpha 5$  n'ont pas d'implication dans leur liaison. Ces résidus ne seront donc plus pris en compte.



**Figure 62 Représentation des molécules arrimées dans le site de criblage.**

Figure représentant le site lié aux touches sélectionnées (bleu), composé des résidus pouvant être impliqués dans la liaison (rouge) et ceux qui ne le sont pas (vert). Tableau rappelant la composition du site sélectionné (rouge les résidus de la sous-unité  $\alpha 5$ , magenta les résidus de la sous-unité  $\beta 1$ , vert les résidus de la sous-unité  $\alpha 5$  qui ne sont plus pris en compte).

Une comparaison visuelle ainsi que le calcul de la déviation des coordonnées atomiques (RMSD) est effectuée entre les poses de nos composés sur le pharmacophore et celles de l'arrimage moléculaire (Figure 63). Tout d'abord, il est à noter que le site sélectionné qui a permis la définition du pharmacophore et celui qui a permis l'arrimage se superposent parfaitement avec un RMSD de 0,17 $\text{\AA}$ . Les poses des composés sont très similaires, pour la plupart d'entre eux. Leur orientation dans l'espace est similaire. Mais quatre composés ont cependant un RMSD supérieur à 3,0 $\text{\AA}$  : le 2, le 14, le 17 et le 59. Pour les composés 2 et 14, la différence entre les deux poses tient principalement d'une translation de la molécule ainsi que d'une modification de la position de la fonction hydroxyle. Dans le cas du composé 17, c'est l'orientation du cycle morpholine et du benzodioxole qui est différente. Enfin pour le composé 59, la différence entre les deux poses vient de l'orientation de l'hydroxyle et du benzodioxole. Toutes ces fonctions ont un potentiel d'interaction très important. Il faut donc suivre ces modifications avec intérêt.

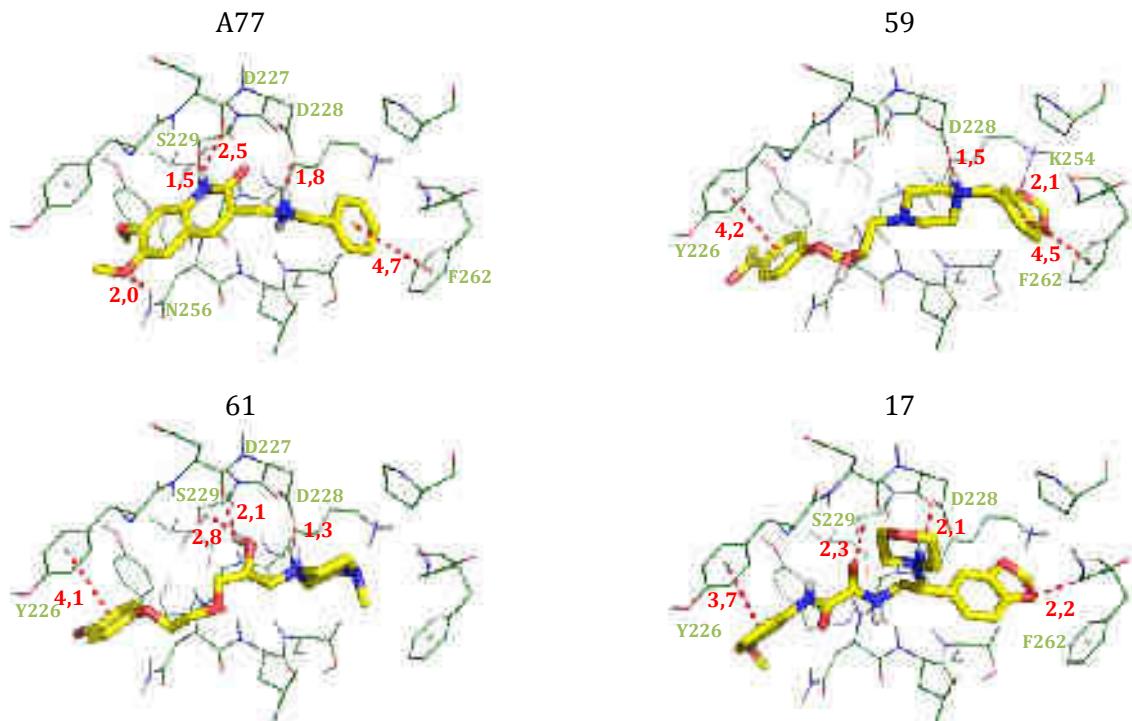


**Figure 63 Comparaison des poses de nos composés sur le pharmacophore et à l'arrimage moléculaire.**

Figure présentant la superposition des poses des composés lors du criblage sur le pharmacophore (violet) à celle de l'arrimage moléculaire (bleu), et la superposition du site sur lequel le pharmacophore a été réalisé (jaune) à celui de l'arrimage moléculaire (rouge), ainsi que le tableau des RMSD correspondants à ces superpositions.

### III. Conception rationnelle d'antagonistes allostériques de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$

Pour l'analyse de la relation structure activité, nous allons principalement nous baser sur les trois composés les plus efficaces selon le test de migration sur cellules isolées. Il s'agit des composés A77, 59 et 61 (Figure 50B). Les autres composés se liant potentiellement à d'autres protéines, les conclusions que nous tirerions pourraient être faussées (Figure 64). L'analyse des interactions présentes pour le composé 17, en comparaison de celles des composés A77, 59 et 61 nous permettra d'essayer d'améliorer son châssis pour que son effet soit entièrement dépendant de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ .



**Figure 64 Interactions des composés A77, 59, 61 et 17 avec les résidus du site de liaison.**  
Schéma représentant les interactions (rouge) détectables entre les résidus (jaune) dans leur pose et le site (vert) produit lors de l'arrimage moléculaire, la distance d'interaction est indiquée en angströms, les résidus I225, F321 et V324 ne sont pas représentés pour permettre une meilleure visibilité.

Comme attendu, les trois composés forment évidemment une liaison hydrogène avec l'aspartate 228 de la sous-unité  $\alpha 5$  de l'intégrine, ce critère faisant partie des contraintes du criblage *in silico*.

Le composé 61 possède deux liaisons hydrogène, une entre l'aspartate 228 ( $\alpha 5$ ) et un azote du cycle piperazine, une autre entre la fonction alcool du composé et le squelette de l'aspartate 227 ( $\alpha 5$ ) ou l'alcool de la sérine 229 ( $\alpha 5$ ). Il possède également une interaction aromatique entre la tyrosine 226 de la sous-unité  $\alpha 5$  et le groupement phényle de la molécule.

Dans le cas du composé A77, on dénombre 4 liaisons hydrogène et une interaction aromatique. L'azote de la quinolone crée deux liaisons hydrogène avec l'alcool de la

sérine 229 ( $\alpha 5$ ) et carbonyle du châssis principal de l'aspartate 227 ( $\alpha 5$ ). L'aspartate 228 ( $\alpha 5$ ) est liée à l'amine de la molécule et l'asparagine 256 ( $\alpha 5$ ) à un éther. Une interaction aromatique est présente entre le benzyle de la molécule et la phénylalanine 262 de la sous-unité  $\beta 1$  de l'intégrine.

Enfin le composé 59 possède deux interactions aromatiques, avec la tyrosine 226 ( $\alpha 5$ ) et la phénylalanine 262 ( $\beta 1$ ). Deux liaisons hydrogène sont également présentes entre l'azote du cycle pipérazine et l'aspartate 228 ( $\alpha 5$ ), et entre un oxygène du benzodioxole et la lysine 254 ( $\alpha 5$ ).

Le composé 17 semble se lier à la poche de notre intégrine par trois liaisons hydrogène et une interaction aromatique. Les liaisons sont présentes entre un oxygène de l'oxamide et la sérine 229 ( $\alpha 5$ ), entre l'azote du cycle morpholine et l'aspartate 228 ( $\alpha 5$ ) et entre un oxygène du cycle dioxole et l'amide du squelette de la phénylalanine 262 ( $\beta 1$ ). L'interaction aromatique semble présente avec la tyrosine 226 ( $\alpha 5$ ).

Le composé 59 est la molécule qui inhibe le plus sélectivement la migration des cellules U87MG- $\alpha 5+$ . Il est également le seul à posséder deux interactions aromatiques, une sur chaque sous-unité  $\alpha 5$  et  $\beta 1$ , à chaque extrémité du site. Ces deux interactions semblent donc importantes pour la liaison du composé. La liaison hydrogène avec la lysine 254 ( $\alpha 5$ ), peut améliorer l'affinité et donc l'activité du composé. Les liaisons à la sérine 229 ( $\alpha 5$ ) et à l'aspartate 227 ( $\alpha 5$ ) ne semblent quand à elles pas être décisives pour l'activité des composés, puisqu'absente dans le cas du composé 59.

L'étude de l'activité *in vitro* des analogues du 59 ainsi que les premiers résultats obtenus avec les analogues du composé 17, nous permet d'affiner nos conclusions.

Les analogues du 59 dont le groupement dioxolane est absent (liant la lysine 254 de la sous-unité  $\alpha 5$ ) n'ont plus d'activité (59.5, 59.6). Dans le cas du composé 17, l'interaction du cycle dioxolane est présente avec la phénylalanine 262 ( $\beta 1$ ) et non la lysine 254 ( $\alpha 5$ ). Parmi les analogues du composé 17, à l'exception des molécules 17.20 et 17.21, les 4 composés 17.13, 17.14, 17.17 et 17.18 qui ne possèdent pas ce cycle dioxolane n'ont plus ou peu d'activité sur la migration des cellules. La présence du cycle dioxolane permettant la liaison avec la lysine 254 de la sous-unité  $\alpha 5$  et une bonne complémentarité stérique avec la phénylalanine 262 de la sous-unité  $\beta 1$  est donc essentielle à l'activité du composé.

### *III. Conception rationnelle d'antagonistes allostériques de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$*

Pour les autres analogues du 59, c'est la substitution de benzène qui varie, partie non liante proche de la tyrosine 226 ( $\alpha 5$ ). Ces analogues semblent agir sur l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  mais également une autre protéine. La suppression du benzène, à ce même endroit, dans le composé 17.15 rend également la molécule inefficace. Il semblerait que la modification de cette partie fasse perdre la sélectivité des composés pour l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , ainsi qu'une partie de leur effet sur l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . L'interaction aromatique avec la tyrosine 226 ( $\alpha 5$ ) semble donc importante. Cependant la perte de la sélectivité du composé 59.3 qui n'est différent de la molécule 59 que par l'allongement de la chaîne carbonée d'un carbone, est difficilement explicable, cette modification ne devrait pas avoir un grand impact sur l'encombrement stérique de cette partie de la molécule.

On peut remarquer que les composés A77 et 3 ont des structures très proches. Comme pour le composé 17, l'inhibition de la migration isolée des cellules U87MG par le composé 3 est seulement en partie dépendante de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . Il peut être caractérisé comme analogue du composé A77. La seule différence présente est l'absence des deux éthers substituant la quinolone. Un de ces éthers créant une liaison avec l'asparagine 256 ( $\alpha 5$ ), la diminution de l'activité et de la sélectivité provient certainement d'un ancrage moins fort avec le site de liaison dû à l'absence de cette liaison.

Trois grands points d'ancrage de la molécule seraient donc certainement nécessaires à la liaison et à l'efficacité de nos composés : 1) une interaction aromatique avec la partie du site sur la sous-unité  $\beta$  (F262), alliée à une liaison hydrogène (avec le squelette de F262 de la sous-unité  $\beta 1$  ou avec K254 de la sous-unité  $\alpha 5$ ), 2) une liaison hydrogène avec l'aspartate 228 ( $\alpha 5$ ), et enfin 3) une interaction aromatique avec la tyrosine 226 ( $\alpha 5$ ), qui peut être alliée à une liaison hydrogène avec l'asparagine 256 ( $\alpha 5$ ).

La faible sélectivité du composé 17 pour l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  pourrait peut-être être améliorée par l'augmentation de la distance entre le cycle morpholine et le benzodioxole, ce qui pourrait permettre l'interaction de ce dernier avec la phénylalanine 262 ( $\beta 1$ ).

Quand au composé 59, l'augmentation de son efficacité sur les cellules U87MG- $\alpha$ 5+ passe certainement par la rigidification de son squelette, en substituant par exemple la chaîne carbonée reliant le benzène à la pipérazine par une chaîne oxalamide comme pour le composé 17.

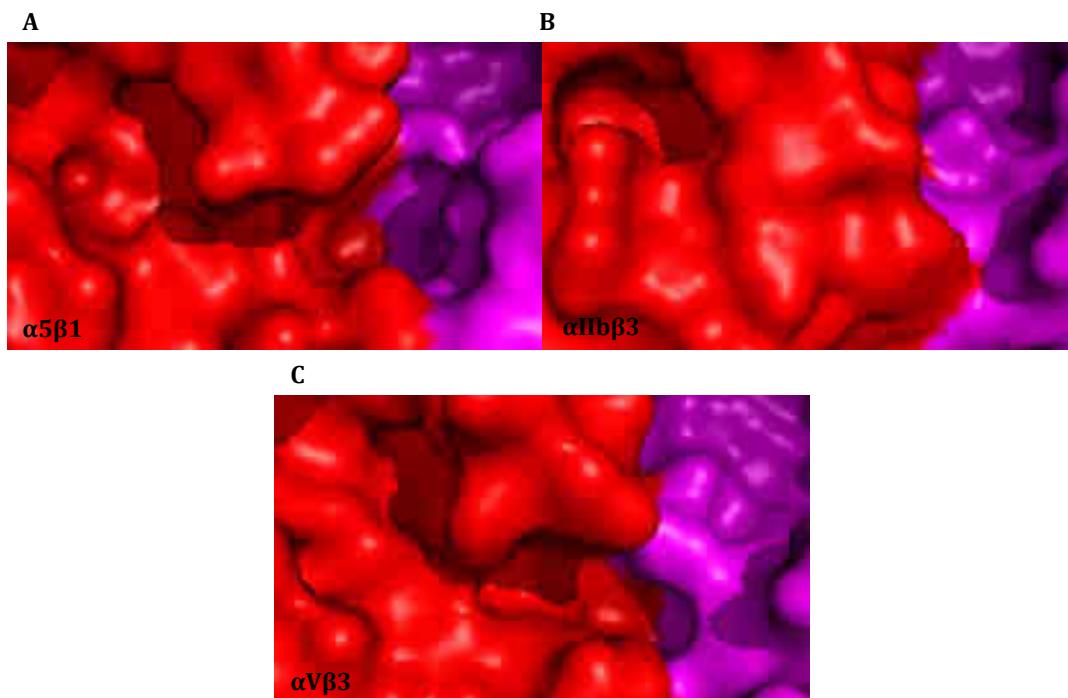
Pour optimiser la structure de nos composés et leur activité, il faudra évidemment augmenter leur affinité pour notre intégrine, afin que leur effet soit entièrement dépendant de l'intégrine  $\alpha$ 5 $\beta$ 1. La suite de notre étude vise donc à étudier notre site ainsi que sa présence potentielle dans les structures des autres intégrines à RGD.

### **III.G.2. Etude du site criblé de l'intégrine $\alpha$ 5 $\beta$ 1**

Les structures cristallographiques de l'intégrine  $\alpha$ V $\beta$ 3,  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 et de l'intégrine  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 sont actuellement disponibles (Dong et al., 2012; Nagae et al., 2012; Springer et al., 2008). Nous pouvons donc comparer la présence et la composition de notre site dans les trois intégrines. Pour cela la partie des trois intégrines qui contient notre site est extraite des structures cristallographiques (PDB code,  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 : 3VI4,  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 : 2VDM,  $\alpha$ V $\beta$ 3 : 4G1M). Les trois structures se superposent très bien (RMSD inférieur à 0,9 $\text{\AA}$  pour tous les carbones de la chaîne principale).

Pour l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, le site ne semble plus présent, ou beaucoup moins accessible que celui de l'intégrine  $\alpha$ 5 $\beta$ 1. Le volume de la cavité de l'intégrine  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 est de 742 $\text{\AA}^3$  tandis que celle de l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 mesure 496 $\text{\AA}^3$ . En effet, l'hélice comprenant le glutamate 229 est décalée et beaucoup plus avancée dans le site que pour l'intégrine  $\alpha$ 5 $\beta$ 1. On observe également que deux résidus à fort encombrement sont présents dans ce site : le tryptophane 262 de la sous-unité  $\alpha$ IIb à la place de la leucine 257 de la sous-unité  $\alpha$ 5, et la lysine 253 de la sous-unité  $\beta$ 3 à la place de la thréonine 254 de la sous-unité  $\beta$ 1 (Figure 65).

### III. Conception rationnelle d'antagonistes allostériques de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$



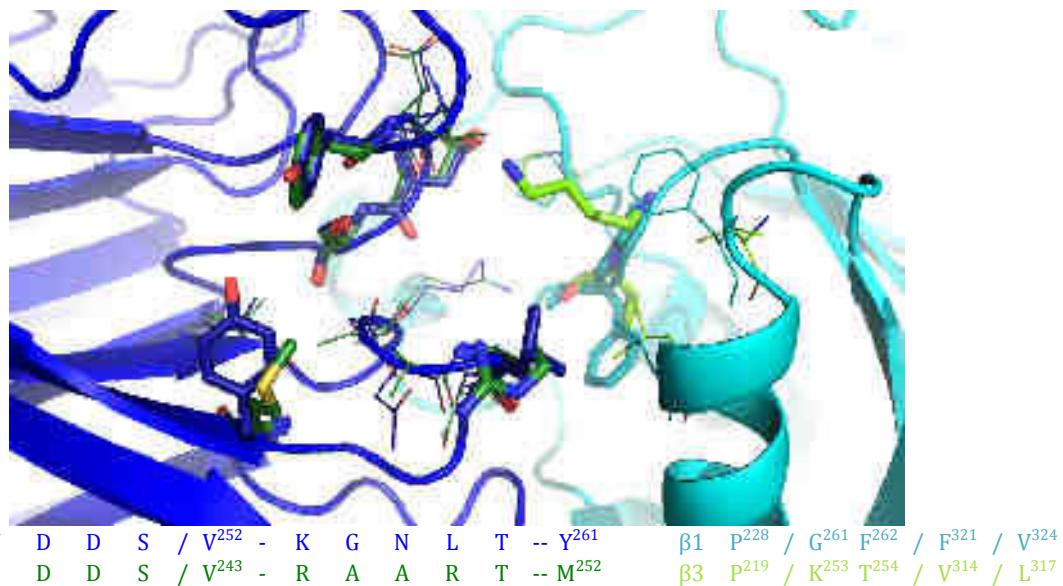
**Figure 65 Comparaison des sites de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha V\beta 3$  et  $\alpha IIb\beta 3$ .**

**A.** Figure représentant la surface du site de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  ( $\alpha 5$  en rouge et  $\beta 1$  en magenta). **B.** Figure représentant la surface du site de l'intégrine  $\alpha IIb\beta 3$  ( $\alpha IIb$  en rouge et  $\beta 3$  en magenta). **C.** Figure représentant la surface du site de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  ( $\alpha V$  en rouge et  $\beta 3$  en magenta).

Par contre, on retrouve dans la structure de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  le site sélectionné dans l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  (Figure 65C). Le volume de cette poche est de  $826\text{\AA}^3$ . Leurs compositions en acides aminés sont assez similaires (Figure 66). Quelques différences apparaissent cependant. Ainsi, l'aspartate 228 et la sérine 229 qui lient une grande partie de nos molécules, sont conservées dans l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  (D219, S220). La liaison à l'aspartate 228 ne permettra donc pas de jouer sur la sélectivité de nos molécules pour l'une ou l'autre des intégrines. On remarque sept acides aminés qui ne sont pas conservés entre la sous-unité  $\alpha 5$  et la sous-unité  $\alpha V$ ; trois sont principalement importants pour la liaison de nos composés. La tyrosine 226, qui permet régulièrement une interaction aromatique avec nos composés, correspond à une phénylalanine (F217) dans la structure de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$ . La phénylalanine ne contient pas la fonction hydroxyle de la tyrosine permettant une certaine hydrophilie et la formation de liaison hydrogène intramoléculaire. La différence entre la lysine 254 de la sous-unité  $\alpha 5$  et l'arginine 248 de la sous-unité  $\alpha V$  est du même ordre. Ces deux résidus ont un encombrement similaire. Ce sont tous les deux des acides aminés chargés positivement. Mais la fonction guanidine de l'arginine peut créer beaucoup plus d'interactions que l'amine de la lysine. Enfin la tyrosine 261 de la sous-unité  $\alpha 5$  de l'intégrine correspond à

la méthionine 252 de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$ . La méthionine est un résidu moins encombrant que la tyrosine, uniquement capable de contacts apolaires.

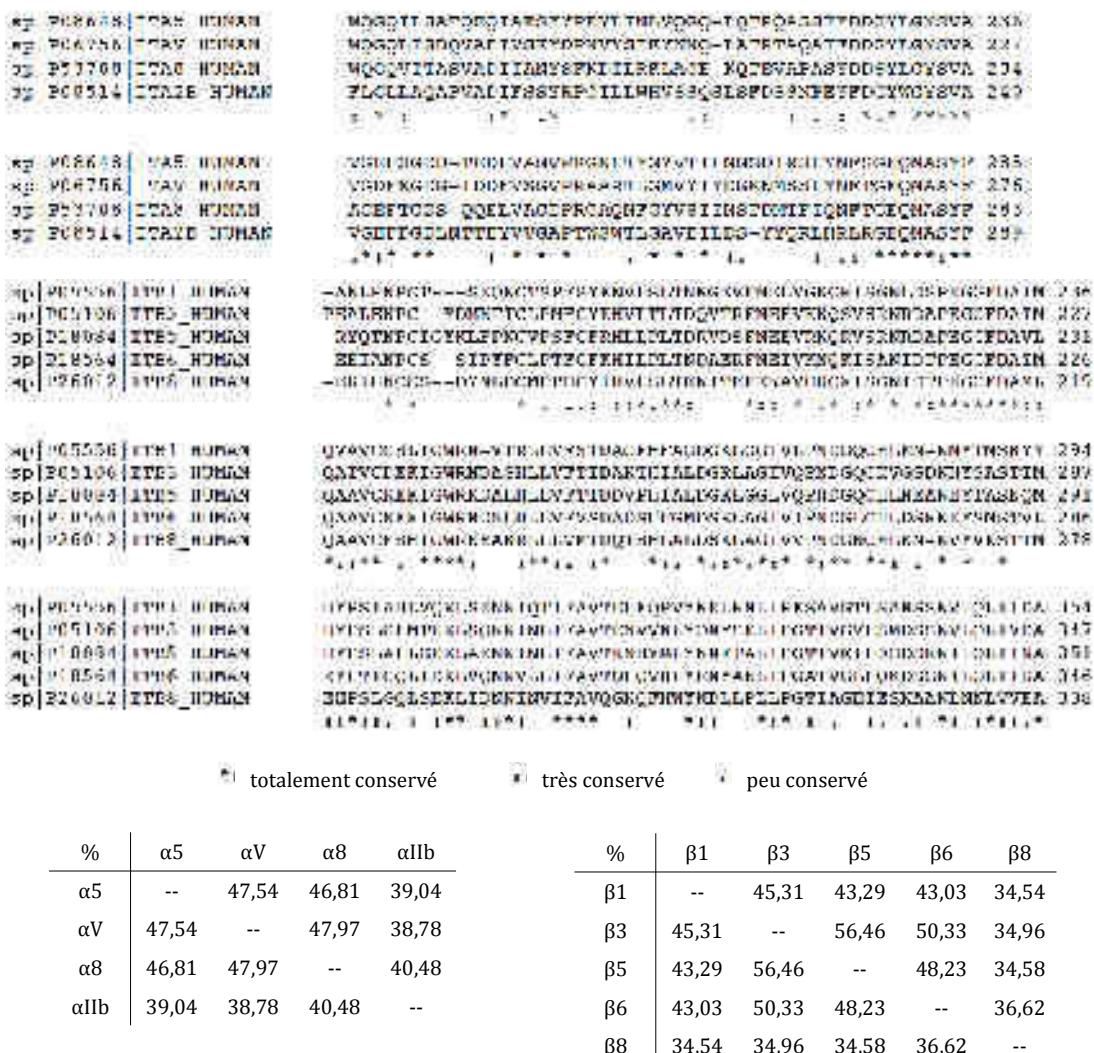
Du côté des sous-unités  $\beta$ , quatre des cinq acides aminés qui composent le site varient. Deux modifications sont à souligner. La glycine 261 de la sous-unité  $\beta 1$  correspond à la lysine 253 pour la sous-unité  $\beta 3$ . Elle ne permet pas une obstruction totale du site dans le cas de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$ , mais crée une réelle différence en encombrant la poche. De plus la charge positive due à l'amine de la lysine modifie la charge de cet endroit du site. La phénylalanine 262 de la sous-unité  $\beta 1$  impliquée dans une liaison aromatique avec nos composés A77 et 59 correspond à la thréonine 254 de la sous-unité  $\beta 3$ , perdant ainsi toute aromaticité et potentiel d'interaction avec nos composés. L'hydroxyle de la thréonine peut cependant créer des liaisons hydrogènes, avec les dioxanes par exemple.



Nous avons donc cinq modifications qui semblent importantes pour la sélectivité de nos composés pour l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  par rapport à l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  (Y226, L257, Y261 pour la sous-unité  $\alpha 5$  et G261, F262 pour la sous-unité  $\beta$ ). Cependant les intégrines  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha V\beta 3$  et  $\alpha IIb\beta 3$  ne sont pas les seules intégrines qui reconnaissent le tripeptide RGD de leur ligand. Dans la famille des intégrines, on dénombre sept intégrines qui reconnaissent le motif RGD de leur ligand principal, elles sont composées de quatre sous-unité  $\alpha$  ( $\alpha 5$ ,  $\alpha 8$ ,  $\alpha V$  et  $\alpha IIb$ ) et de cinq sous-unité  $\beta$  ( $\beta 1$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 5$ ,  $\beta 6$  et  $\beta 8$ ). L'alignement des séquences des ces sous-unités permet de mesurer leur similarité et

### III. Conception rationnelle d'antagonistes allostériques de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$

d'observer la conservation des résidus qui composent notre site et qui nous semble intéressant pour la liaison des composés. L'alignement de la partie qui contient le site que nous avons ciblé est présenté dans la Figure 67. L'alignement complet des sous-unité  $\alpha$  est présent dans l'annexe 2 et celui des sous-unité  $\beta$  dans l'annexe 3. On remarque que la tyrosine 226, l'aspartate 228 et la sérine 229 sont des résidus très conservés dans cette famille. Par contre, la leucine 257 et la tyrosine 261 ne le sont pas du tout et varient d'une sous-unité à l'autre, tout comme la glycine 261 et la phénylalanine 262 de la sous-unité  $\beta 1$ . Les structures cristallographiques de ces autres intégrines n'étant pas disponibles, il est difficile d'évaluer l'implication de ces modifications, les résidus pouvant être décalés et ne pas être impliqués dans le site sélectionné.



**Figure 67 Alignement des séquences des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de la sous famille des intégrines reconnaissant le tripeptide RGD de leur ligand et matrice de similarité.**

La figure présente seulement la partie de l'alignement qui contient les résidus qui composent notre site (jaune), les résidus importants sont surlignés en rouge, ainsi que la matrice de similarité des sous-unités dans leur ensemble.

Pour vérifier l'implication des résidus que nous avons décrit, la mutagénèse dirigée des plasmides des sous-unités  $\alpha 5$  et  $\beta 1$  est en cours. Les mutations choisies sont pour  $\alpha 5$  : Y226F, D228A, S229A, L257R et Y261M, et pour la sous-unité  $\beta 1$  : G261K et F262A. La mutation des résidus aspartate 228, sérine 229, tyrosine 261 et phénylalanine 262 ( $\beta 1$ ) nous permettra de vérifier l'implication de ces résidus dans la liaison de nos composés. Les mutations de la tyrosine 226, de la leucine 257, de la tyrosine 261 ( $\alpha 5$ ) et de la glycine 261 ( $\beta 1$ ) nous permettront de comprendre l'importance de ces résidus dans la sélectivité de nos composés pour l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  par rapport à l'intégrine  $\alpha V\beta 3$ . La construction de l'ensemble de ces mutants nous permettra évidemment d'étudier l'implication de ces résidus dans la structure, l'adressage et la fonction de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ .

*Grâce à cette étude, nous avons pu mettre en relief les éléments de nos composés et de notre site qui semblent être importants dans leur liaison à l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ .*

*Notre composé idéal semblerait se former de deux cycles aromatiques à chacune de ses extrémités, permettant la liaison avec la tyrosine 226 ( $\alpha 5$ ) et avec la phénylalanine 262 ( $\beta 1$ ). Un groupement hydrophobe peut être intéressant du côté de la sous-unité  $\beta$ , cette partie du site étant encombrée par des résidus sur les autres intégrines. Enfin des groupements permettant de créer des liaisons avec l'aspartate 228 ( $\alpha 5$ ), la sérine 229 ( $\alpha 5$ ) et la lysine 254 ( $\alpha 5$ ) finissent l'ébauche de cette structure idéale.*

*Afin de pouvoir vérifier toutes les hypothèses qui permettent d'imaginer ce composé idéal, le travail sur les analogues du composé 17 doit être terminé ainsi que l'expression des mutants de notre intégrine. Nous aurons ainsi les résultats nécessaires pour rationaliser la recherche et la synthèse d'analogues plus efficaces.*

### III.H. Conclusion et discussion

Peu de ligands ont été décrits pour l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , ce sont en grande majorité des mimes de la séquence de liaison de la fibronectine, qui possèdent donc un mode d'action unique (Spiegel et al., 2012; Stragies et al., 2007; Tolomelli et al., 2011). La conception de régulateurs allostériques de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  a pu être effectuée par l'utilisation conjointe de technologies *in silico* et *in vitro*. C'est par l'avancée des connaissances à la fois dans le mode de fonctionnement des intégrines et l'optimisation d'algorithmes de calcul de plus en plus performants que ces antagonistes peuvent être proposés. Nous avons obtenus trois composés dont les premiers résultats *in vitro* sont prometteurs et donc les propriétés thérapeutiques devront être identifiées *in vivo*.

Le criblage de nos composés a été réalisé sur un modèle par homologie de la tête (domaine tonneau de la sous-unité  $\alpha$  et  $\beta A$  de la sous-unité  $\beta$ ) de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  obtenu à partir de la structure cristallographique de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$ . La structure cristallographique de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  a été résolue entre temps (Nagae et al., 2012). Elle nous permet de valider notre modèle et d'explorer dans le détail la composition du site sélectionné.

Notre modèle se superpose parfaitement à la structure cristallographique de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  avec un RMSD de 0,9 Å, pour les carbones  $\alpha$  qui le composent.

Notre modèle a été réalisé à partir de la structure de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  liant le ligand RGD. La conformation des intégrines est très importante dans leur mode de fonctionnement. Les structures cristallographiques des intégrines  $\alpha IIb\beta 3$ ,  $\alpha V\beta 3$  et  $\alpha 5\beta 1$  (Nagae et al., 2012; Springer et al., 2008; Xiong et al., 2002) ont été résolues pour l'intégrine seule et liant le ligand RGD. Parmi les modifications conformationnelles observées entre les structures libres et liant le peptide pour les intégrines  $\alpha IIb\beta 3$  et  $\alpha V\beta 3$ , une seule modification est observée au niveau de la tête de l'intégrine, seule partie composant notre modèle. Elle se situe au niveau hélices des  $\alpha 1$  et  $\alpha 7$  du domaine  $\beta A$  de la sous-unité  $\beta 3$ . Cette modification n'est pas observée pour la structure de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . A la différence des intégrines  $\alpha IIb\beta 3$  et  $\alpha V\beta 3$ , la structure cristallographique de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  a été résolue à l'aide d'un anticorps contraignant les mouvements de l'intégrine. D'après les auteurs, l'absence du réarrangement des hélices  $\alpha 1$  et  $\alpha 7$  peut être un artefact de l'anticorps utilisé. L'absence totale d'un déplacement des hélices  $\alpha 1$

et  $\alpha 7$  lors de la liaison de la fibronectine à l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  ne peut donc pas être totalement écartée. Ce réarrangement n'affecterait cependant que peu notre site, les résidus de la sous-unité  $\beta 1$  le composant ne se situant pas sur cette hélice.

L'observation des résidus de notre site dans les deux structures cristallographiques de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  seule ou liant le peptide RGD ne montre aucune variation de position ou de conformation. A l'exception de l'aspartate 228, tous les résidus composant le site sélectionné dans notre modèle tridimensionnel se situent dans une conformation très proche de celle des structures cristallographiques. Dès les premières étapes de la simulation par dynamique moléculaire, on observe une réorientation de la fonction carboxylique en direction de notre site et non de l'interface des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ . Il est donc possible que cet acide aminé ne soit pas dans une conformation permettant la liaison avec nos composés dans la structure native de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ .

Enfin, dans la structure cristallographique de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , l'aspartate 227 se lie à l'arginine du peptide RGD. Cette liaison est également présente dans la structure du complexe  $\alpha V\beta 3$ -RGD mais est absente de celui de  $\alpha IIb\beta 3$ -RGD. Il est donc possible que nos composés puissent déstabiliser la liaison de la fibronectine en monopolisant la liaison de l'aspartate 228. Mais si ils agissent sur l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  ils pourraient également avoir un impact sur la liaison de la vitronectine. Les résultats obtenus lors des tests d'adhérence des cellules U87MG- $\alpha 5+$  ne semblent pas montrer de déstabilisation de la liaison de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  à la fibronectine ou de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  à la vitronectine.

La mise en place d'un test de liaison de nos composés avec l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  purifiée par SPR n'a pu être réalisée. Or l'utilisation de la résonance plasmonique de surface a précédemment été utilisée avec différentes intégrines pour détecter leur liaison avec des ligands de différentes natures. Régulièrement les intégrines sont utilisées comme analyte afin de vérifier leur liaison aux protéines de la matrice extracellulaire (Luo et al., 2004; Takagi et al., 2001), à d'autres intégrines (Sriramara et al., 1993), à un anticorps (Bhaskar et al., 2007), ou à des molécules de faible poids moléculaire fonctionnalisées (Klim et al., 2012). Inversement, les intégrines sont plus rarement utilisées comme ligands pour analyser la liaison à une protéine de la matrice extracellulaire (Knoll et al., 2007) ou à des peptides cycliques (Liu et al., 2010). Généralement, les partenaires de l'intégrine testés possèdent de hauts poids moléculaires, ce qui facilite la détection de la liaison dans cette technique. Dans le cas du travail de Liu (Liu et al., 2010) les

### *III. Conception rationnelle d'antagonistes allostériques de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$*

antagonistes testés, des peptides cycliques mimes de la séquence RGD, ont des poids moléculaires légèrement plus élevés que nos composés (de 450 à 650g/mol, contre 250 à 450g/mol pour nos molécules). Il semblerait donc possible d'utiliser cette technique pour cribler nos touches. Pour cela nous devrons réussir à stabiliser la conformation de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  fixée, qui selon nos résultats, est très variable. La liaison obtenue avec les anticorps HUTS-21 et 9EG7 est encourageante. Ces anticorps sont décrits comme se liant à la sous-unité  $\beta 1$  de l'intégrine dans sa conformation active (Lenter et al., 1993; Luque et al., 1996). Inversement, la liaison de l'anticorps AB1928, qui reconnaît la partie cytoplasmique de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , prouve qu'une partie des protéines immobilisées n'est pas forcément dans une présentation optimale pour permettre la liaison de composés avec la partie extracellulaire.

La DSF ne nous a pas permis d'observer la liaison des composés sélectionnés *in silico* avec l'ectodomaine de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . D'après les résultats précédents du Pr Takagi, l'hexapeptide contenant la séquence RGD utilisé dans ce test inhibe 50% de la liaison entre l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  et la fibronectine à une concentration de 300nM, et la totalité de la liaison à 1 $\mu$ M (mesurée par résonance plasmonique de surface) (Takagi et al., 2003). Son utilisation à 1mM dans le test de DSF devrait saturer tous les sites de liaison de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . Cependant la variation de température observée n'est que de 5,5°C. Il est donc fortement probable que la liaison de nos composés ne soit pas visible si leur affinité pour l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  est inférieure à celle du peptide RGD. Les deux modèles mathématiques reliant les constantes d'association et la variation thermique obtenue pour un ligand montrent que cette technique peut sous-estimer la liaison d'un composé mais ne peut pas la surestimer (Cimperman et al., 2008; Lo et al., 2004). En d'autres termes, il est possible que des composés qui se lient faiblement à la cible étudiée ne soient pas détectables par cette technique. Mais il n'est pas possible qu'un composé qui modifie la stabilité de la protéine ne se lie pas à la protéine étudiée. Il est également mis en avant que l'affinité est fonction à la fois de la variation thermique observée et de l'enthalpie de la liaison. Ainsi en fonction de la structure et du mode de liaison d'un composé, la corrélation entre la variation thermique et l'affinité sera différente. Une étude récente sur des ligands des protéines PARP (Wahlberg et al., 2012) compare les affinités mesurées par résonance plasmonique de surface avec celles obtenues par DSF. Elle conclut de la même manière que la DSF ne crée pas de faux positifs, ligands positifs

par DSF mais négatifs par Biacore, mais peut ne pas détecter de variation thermique significative pour des ligands ayant une affinité faible mesurable en Biacore ( $10^{-3}$  à  $10^{-5}$ M). Cette technique aurait donc pu nous permettre de détecter des ligands pour l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , mais l'absence de réponse ne signifie pas que nos composés ne se lient pas à l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . Il est possible que leur affinité soit trop faible.

Le criblage effectué sur la migration des cellules U87MG- $\alpha 5+$  nous a permis d'identifier onze composés capables d'inhiber plus de 30% de la migration des cellules. Seuls trois d'entre eux ont un effet totalement dépendant de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . La poursuite de l'étude de la totalité de ces onze composés permet de les classer dans quatre familles chacune ayant potentiellement un intérêt thérapeutique. L'ensemble des résultats obtenu pour ces onze composés est présenté dans la Figure 68.

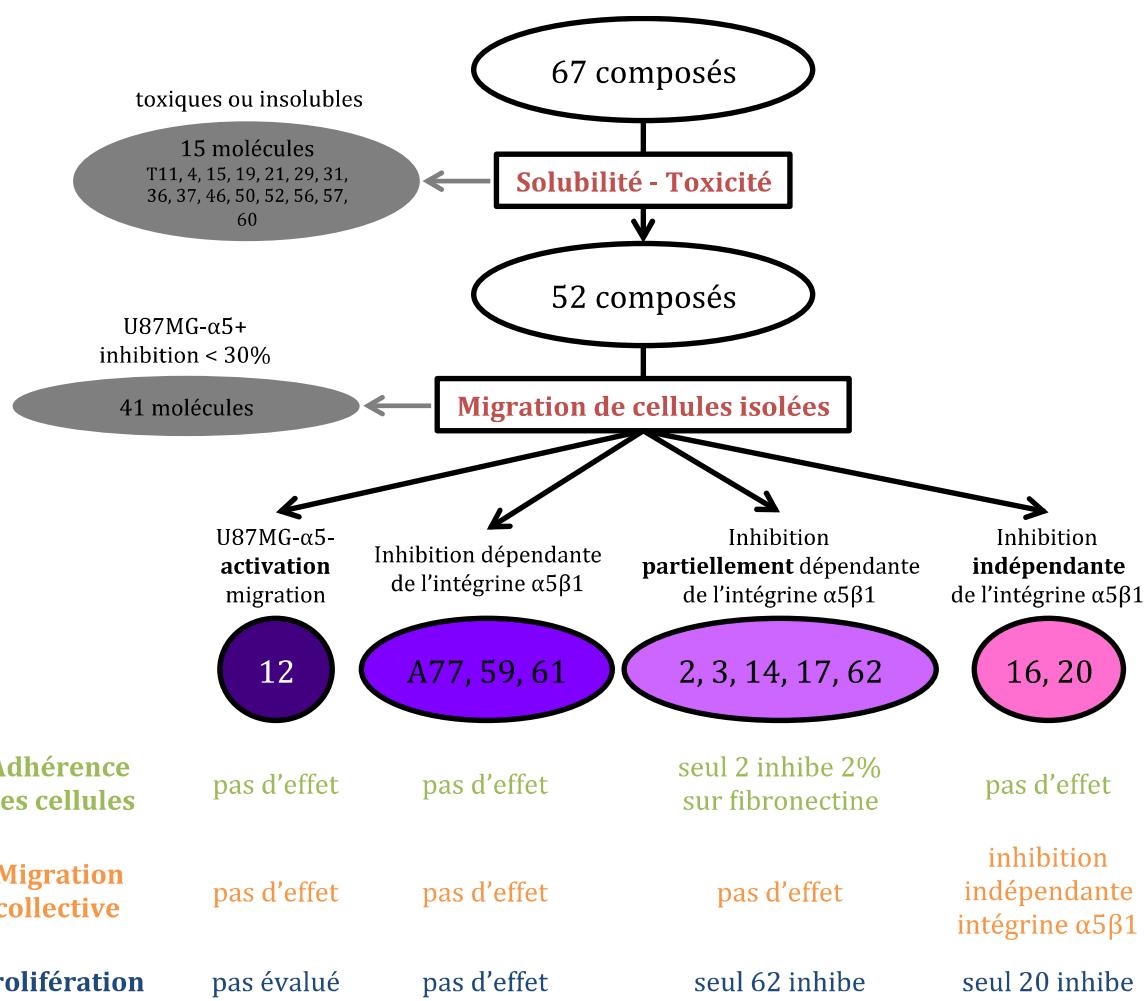


Figure 68 Schéma récapitulatif des résultats obtenus pour les 67 molécules sélectionnées *in silico*.

### *III. Conception rationnelle d'antagonistes allostériques de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$*

Le composé 12 inhibe la migration des cellules sur-exprimant l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  mais active la migration isolée de cellules qui expriment peu cette intégrine. D'après les résultats obtenus dans le Chapitre II, il est possible que ce composé agisse sur l'intégrine  $\alpha V\beta 3$ , dont les antagonistes augmentent la vitesse de migration des cellules dans le test utilisé. Il semblerait que, comme les antagonistes mimant la séquence RGD, ce composé ait une faible sélectivité pour l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  par rapport à l'intégrine  $\alpha V\beta 3$ . L'étude des effets de ce composé sur des cellules dont l'expression de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  serait inhibée permettrait de vérifier cette hypothèse. L'inhibition de l'expression de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  passera par la répression de l'expression de la sous-unité  $\beta 3$ , la sous-unité  $\alpha V$  étant impliquée dans la formation d'autres intégrines ( $\alpha V\beta 5$ ,  $\alpha V\beta 6$ ,  $\alpha V\beta 8$ ). La sous-unité  $\beta 3$  est également impliquée dans la formation de l'intégrine  $\alpha IIb\beta 3$ , mais cette intégrine est principalement présente dans les cellules plaquettaires.

Pour le deuxième groupe, composé des molécules A77, 59 et 61, les molécules ont un effet entièrement dépendant de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . Ces composés inhibent la migration des cellules U87MG surexprimant l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . Ils n'ont pas d'effet 1) sur la migration des cellules exprimant peu l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , 2) sur l'adhérence des cellules à la fibronectine et à la vitronectine, 3) sur la migration collective des cellules ou 4) sur la prolifération. Ces molécules sont des inhibiteurs sélectifs des fonctions de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , elles présentent le plus fort potentiel comme antagonistes allostériques de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ .

Le troisième groupe, constitué des composés 2, 3, 14, 17 et 62, a un effet qui n'est qu'en partie dépendant de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . En effet, ces composés inhibent la migration isolée des cellules qui expriment peu l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  mais dans une proportion beaucoup plus faible que celle des cellules qui l'expriment fortement. Ces molécules n'ont d'effet ni sur la migration collective des cellules, ni sur l'adhérence à la fibronectine ou à la vitronectine à l'exception du composé 2 qui inhibe faiblement l'adhérence des cellules à la fibronectine. Ces composés semblent posséder au moins deux cibles protéiques, l'une étant l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  et l'autre restant non définie. L'effet de ces composés sur une protéine autre que l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  peut s'expliquer par l'utilisation de ces composés sous leur forme racémique et à forte concentration (50 $\mu$ M). Deux perspectives sont possibles, 1) la recherche de leur cible potentielle par des techniques *in silico* mis au point au laboratoire (Meslamani et al., 2012) ou *in vitro* (Schenone et al., 2013) ou 2) la modification de leur structure, comme pour le composé

17, afin d'essayer d'améliorer leur sélectivité pour l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . Ce dernier point sera appuyé par l'étude *in silico* de leur pose dans le site de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . Etant des inhibiteurs de la migration des cellules cancéreuses, ces molécules restent très intéressantes comme inhibiteurs de la dissémination ou de la métastase des cancers.

Enfin, les molécules 16 et 20 composent le dernier groupe. Ces molécules inhibent la migration isolée des cellules quelque soit le taux d'expression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , leur effet est donc indépendant de cette protéine. Elles inhibent également la migration collective des cellules quelque soit le taux d'expression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . La molécule 20 inhibe également la prolifération des cellules. Il semble très peu probable que ces composés soit des antagonistes de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . Cependant leurs actions sur la migration des cellules, l'adhérence ou la prolifération, leur confèrent un potentiel anticancéreux intéressant. Leur cible protéique devra cependant être définie comme pour le groupe précédent.

Les analogues du composés 59 peuvent également être incorporés dans ces catégories. Les résultats sur la migration isolée des cellules U87MG- $\alpha 5-$  étant préliminaires, ces conclusions sont soumises à l'attente de résultats définitifs. Les composés 59.5, 59.6 et 59.8 ne rentrent pas dans nos groupes puisqu'ils n'inhibent peu ou pas la migration isolée des cellules U87MG- $\alpha 5+$ . Aucun analogue n'augmente la migration des cellules U87MG- $\alpha 5-$  isolées, aucun n'inhibe non plus la migration isolée des cellules U87MG de manière totalement dépendante de l'expression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . Aucun analogue n'appartient donc au premier ou au deuxième groupe. Le composé 59.2 semblent inhiber la migration isolée des cellules U87MG- $\alpha 5-$  moins efficacement que la migration isolée des cellules U87MG- $\alpha 5+$ , il n'inhibe pas la migration collective des cellules ni l'adhérence à la fibronectine, il ferait donc partie du troisième groupe. Cependant il inhibe légèrement l'adhérence des cellules à la vitronectine. Les composés 59.1, 59.3 et 59.4 semblent inhiber la migration isolée et collective des cellules indépendamment de l'expression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , ils feraient ainsi partie du groupe 4 (molécules 16 et 20). Les composés 59.7 et 59.9 semblent inhiber la migration des cellules isolées indépendamment de l'expression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , mais n'ont pas d'effet sur la migration collective des cellules U87MG, l'attribution d'un groupe est donc impossible, ils présentent des caractéristiques à la fois du groupe 3 (pas d'inhibition de la migration collective) et du groupe 4 (inhibition de la migration isolée des cellule indépendante de l'expression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ ). Il faut finaliser les résultats sur la

### III. Conception rationnelle d'antagonistes allostériques de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$

migration isolée des cellules U87MG- $\alpha 5$ - pour leur attribuer un groupe ou pour en définir un nouveau.

Les composés du deuxième groupe (molécules A77, 59 et 61), antagonistes sélectifs de la migration induite par l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , présentent une activité surprenante en inhibant la migration isolée des cellules en fonction du taux d'expression de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  sans pour autant affecter l'adhérence des cellules à la fibronectine. Jusqu'à présent seul l'ATN-161, antagoniste peptidique de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , est décrit comme inhibiteur de la migration de cellules cancéreuses et non de l'adhérence (Livant et al., 2000; Stoeltzing et al., 2003). Ce composé est le seul exemple que l'on peut trouver dans la littérature qui en se liant à la partie extracellulaire de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  est capable d'influencer une fonction de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  sans inhiber ou activer l'adhérence. Cette dichotomie des fonctions des intégrines est peu décrite dans la littérature. L'ATN-161 mime la séquence PSHRN, dite séquence synergique de la fibronectine. Cette séquence de la fibronectine est décrite pour son implication dans sa liaison à l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  (Aota et al., 1994). L'ATN-161 est régulièrement décrit comme anti-migratoire et anti-métastatique (Khalili et al., 2006; Nam et al., 2010). Il n'a pas d'effet sur la prolifération des cellules tumorales *in vitro*, mais inhibe la croissance tumorale *in vivo*, hypothétiquement grâce à un effet anti-angiogénique. Il est donc possible que nos composés qui n'inhibent pas la prolifération des cellules U87MG aient un impact sur la croissance des tumeurs de glioblastomes. Il est donc important de transposer nos résultats *in vitro* sur des tests *in vivo*. L'étude des effets de nos composés sur des xénogreffes dans des modèles murins nous permettra de connaître plus en détail leur effet sur la croissance et la migration tumorale. L'étude de xénogreffes hétérotopiques pourra dans un premier temps nous permettre d'évaluer les effets sur la croissance tumorale. Pour les effets sur la dissémination, un modèle orthotopique devra être utilisé. Avant de pouvoir réaliser ces tests, les caractéristiques d'absorption, de distribution, de métabolisation et d'élimination (ADME) des composés intéressants devront être étudiées. Les antagonistes de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  ayant des propriétés anti-angiogéniques, l'effet de nos composés sur les cellules endothéliales dans des modèles d'angiogenèse devra également être étudié.

D'autres exemples d'antagonistes dits allostériques sont décrits dans la littérature, ciblant l' $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (RUC-1 et RUC2) (Blue et al., 2008; Zhu et al., 2012). Les antagonistes de cette intégrine utilisés en clinique inhibent l'agrégation plaquettaire. Des effets secondaires de leur utilisation sont décrits, principalement dus à l'activation de la conformation liante de l'intégrine (Armstrong & Peter, 2012). La particularité du RUC-1 et du RUC-2 est d'induire la conformation inactive de l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 tout en inhibant la liaison du fibrinogène. Ils inhibent ainsi la signalisation induite par la conformation active de l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 montré du doigt. Ils sont définis comme allostériques car ils ne se fixent que sur la partie de la sous-unité  $\alpha$ IIb du site de liaison de la séquence RGD et n'interagissent pas avec le magnésium du site MIDAS (Metal Ion Dependant Adhesion Site), mais sont sélectionnés pour leur capacité à inhiber l'adhérence plaquettaire dépendante de l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. Ces antagonistes sont donc capables, par l'absence de liaison avec le métal du site MIDAS, d'induire une conformation inactive de l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, alors que l'Eptifibatide, ligand peptidique de l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 mimant la séquence RGD utilisé en clinique, induit une conformation active. La conformation de l'intégrine a une importance primordiale dans son fonctionnement et dans le signal qu'elle va transmettre (Hynes, 2002). En ce qui concerne nos antagonistes de l'intégrine  $\alpha$ 5 $\beta$ 1, l'étude par cytométrie en flux de la conformation de l'intégrine peut être réalisée grâce à l'utilisation d'anticorps reconnaissant des conformations actives ( $\alpha$ 5 : SNAKA51 (Clark et al., 2005),  $\beta$ 1 : 9EG7 ou TS2/16 (Bazzoni et al., 1995; Hemler et al., 1984) par exemple) ou inactives ( $\alpha$ 5 : IIA1 (Ramakrishnan et al., 2006),  $\beta$ 1 mAb13 (Akiyama et al., 1989) par exemple) de l'intégrine  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 sur des cellules fixées, comme elle l'a été lors de la conception des composés RUC. Ainsi nous pourrons connaître l'impact de nos composés sur l'équilibre allostérique de la conformation de notre intégrine. N'étant pas des mimes de la séquence RGD de la fibronectine nous pouvons espérer qu'ils ne permettront pas l'ouverture de l'intégrine en conformation active et n'engendreront pas une signalisation outside-in. On pourra ainsi éviter que nos composés, antagonistes de la migration des cellules, ne soient des agonistes d'autres fonctions de l'intégrine.

Grâce à l'alliance des techniques *in vitro* et *in silico*, nous avons pu déterminer les grandes lignes de la relation entre la structure de nos composés et leur activité.

Ces résultats vont permettre de guider l'optimisation future des molécules A77, 59 et 61, mais également la sélectivité des composés du troisième groupe, en particulier le

### *III. Conception rationnelle d'antagonistes allostériques de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$*

composé 17 qui présente la plus forte inhibition de la migration des cellules U87MG- $\alpha 5+$ . La conclusion de la relation structure activité a permis la description d'un pharmacophore théorique basé cette fois sur les ligands et leur activité et non sur la structure du site de liaison. L'alliance de ces deux pharmacophores peut permettre une recherche plus originale d'analogues basée sur les fonctions chimiques des composés et leur importance et non plus sur leur ressemblance structurale effectuée jusque ici. Ainsi par exemple pour le composé 59, nous avons recherché des analogues pour lesquels la chaîne aliphatique centrale était constante, nous pourrons désormais sélectionner des composés dont cette chaîne sera plus rigide et plus originale.

L'étude de la relation structure activité nous a également permis d'identifier les acides aminés de la poche potentiellement importants pour la liaison des différents composés. L'étude des mutants de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  pour ces résidus permettra de valider à la fois l'importance de ces résidus dans l'activité de l'intégrine et dans la liaison des composés. N'ayant pu définir directement la liaison des composés sélectionnés avec l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  par des techniques de biophysique, ces résultats pourront lever l'incertitude relative à la liaison directe de ces composés avec l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ .

## III.I. Matériel et méthodes

### III.I.1. Dynamique moléculaire

La minimisation de l'énergie, l'équilibration et la dynamique moléculaire sont réalisées à l'aide du logiciel AMBER9 (Case et al., 2012) (module Sander) utilisant le champs de force ff03 avec un modèle de solvant explicite (24502 molécules d'eau de type TIP3P sont ajoutés, soit une boîte d'une dimension de 112,7x102,3x87,7Å).

La minimisation de l'énergie est réalisée en 2500 étapes (1000 étapes utilisant l'algorithme de plus forte pente et 1500 étapes l'algorithme du gradient conjugué). Les données énergétiques sont rapportées toutes les 1000 étapes de calcul.

L'équilibration de la protéine s'effectue en 250ps (125 000 étapes de 0,002ps) à pression constante. Seules les coordonnées atomiques sont récupérées de la minimisation précédente. Elle consiste en une dynamique moléculaire avec une contrainte de 50kcal/mol/Å<sup>2</sup> sur les carbones  $\alpha$  de la protéine. Les liaisons impliquant des hydrogènes sont contraintes avec l'algorithme SHAKE. Les informations sur l'énergie, la température du système ainsi que les coordonnées atomiques et vélocités sont récupérées toutes les 500 étapes.

Trois dynamiques de 1ns (500 000 étapes de 0,02ps) chacune sont réalisées à la suite de l'équilibration. Chacune débute avec les coordonnées et les vélocités de l'étape précédente. Elles sont réalisées dans les mêmes conditions que l'équilibration à l'exception de la durée et de l'absence de contraintes sur les atomes de la protéine.

Le module ptraj (faisant partie de la suite AMBER9) sert à analyser la trajectoire de la dynamique. La fonction cluster de ptraj est utilisée pour former 10 clusters. Seule 1 structure sur 10 est utilisée pour former les clusters, les 500 premières structures de la première dynamique sont exclues. L'algorithme « means » est utilisé pour la formation des clusters. La similarité des structures est mesurée grâce au RMSD des atomes du squelette de la protéine (CA, C et N). Ce module est également utilisé pour le calcul des écarts de position des atomes (RMSD) du squelette de la protéine ( $C\alpha$ , C et N) ainsi que la fluctuation de ces mêmes atomes pour les résidus de notre poche (RMSF).

### **III.I.2. Criblage *in silico* sur le pharmacophore**

Les atomes ayant un potentiel d'interaction avec un ligand sont recherchés avec le logiciel HSPHARM (Barillari et al., 2008) puis sélectionnés manuellement. A partir d'eux, un fichier d'interaction LUDI est créé, permettant la formation du pharmacophore par le protocole mis au point au laboratoire (données non publiées).

Seuls les composés possédant un azote chargé positivement, deux cycles aromatiques, une solubilité prédictive (-logS) supérieur à  $10^{-5}M$  et un accepteur ou un donneur de liaison hydrogène sont sélectionnés. Les structures tridimensionnelles sont générées avec le protocole « Build 3D database » de Discovery Studio (Accelrys) avec un maximum de 100 conformations par molécules en mode rapide.

L'ensemble des composés est criblé sur le pharmacophore généré avec le protocole « Screening Library » de Discovery Studio, sur un minimum de 3 points et un maximum de 4, une contrainte sur le caractère positif ionisable, avec une distance maximale entre les points de 1 $\text{\AA}$ , un maximum de 10 000 pharmacophores et une méthode d'ajustement rigide. Le traitement des résultats est effectué avec PipelinePilot (Accelrys).

### **III.I.3. Arrimage moléculaire**

La structure choisie pour l'étude de l'arrimage moléculaire est tout d'abord minimisée, comme précédemment. Les structures tridimensionnelles ainsi que les stéréo-isomères des ligands sélectionnés précédemment sont générées par Corina (Molecular Network), les hydrogènes manquant sont ajoutés, deux centres stéréo-isomères sont pris en compte et 4 stéréo-isomères générés au maximum par molécule. L'arrimage moléculaire est réalisé avec le programme GOLD (CCDC). Pour chaque ligand, le logiciel applique le nombre optimal d'opérations. Le site de liaison est défini par une sphère avec un rayon de 9  $\text{\AA}$  centrée sur le centre de masse des résidus composant notre poche. Seuls les résidus composant une surface concave et accessible au solvant sont considérés comme appartenant à la poche. Les paramètres par défauts sont utilisés. Pour être considérée comme une interaction, la distance maximale entre un donneur et un accepteur de liaison hydrogène doit être inférieure à 4  $\text{\AA}$ , et de 6  $\text{\AA}$  pour les atomes impliqués dans des interactions de Van der Waals. La terminaison est anticipée dès qu'une itération donne le même résultat que le précédent ou que les trois meilleures poses ont un RMSD inférieur à 1,5  $\text{\AA}$ . Les poses des ligands sont classées par score

(Goldscore par défaut), seuls les poses pour lesquelles de score est supérieur à 25 sont conservées.

Pour les poses restantes, une sélection est réalisée par recherche de similarité par empreinte d'interaction (Marcou & Rognan, 2007). La première empreinte calculée prend en compte ASP228 et SER229, la deuxième empreinte calculée est constituée des résidus TYR226, ASP228, SER229, VAL252, LEU257, THR258, TYR261, PHE262 et PHE232. Pour chaque empreinte d'interaction, les empreintes des différentes poses sont comparées à l'emprunte idéale par un score de Tanimoto compris entre 0 et 1 à l'aide de Pipeline Pilot. On ne conserve que la pose qui possède un score supérieur ou égal à 0,5 et seulement la pose qui possède le meilleur score de Tanimoto.

Une sélection finale est réalisée à l'aide d'un protocole Pipeline Pilot, permettant de concaténer les résultats du criblage sur le pharmacophore et de l'arrimage moléculaire, de regrouper les molécules à l'aide du protocole LibMCS de ChemAxon implémenté dans Pipeline Pilot, avec une taille minimale de sous structure de 5 atomes exactement, cycles compris.

#### III.I.4. Analyse *in silico*

L'ensemble des alignements de séquences est obtenu au moyen de ClustalW2, en appliquant les paramètres par défaut. Les différentes séquences protéiques proviennent de la base de données UniProtKB. Les calculs de RMSD sont réalisés avec Pymol. Les interactions entre les composés et les résidus de la poches sont recherchées avec le protocole « Interaction Protein-Ligand» de Discovery Studio (Accelrys) ainsi que par une inspection visuelle en trois dimensions sous Amber (Tripos). L'ensemble des figures est réalisé avec Discovery Studio (Accelrys) ou Pymol. Le volume des cavités est mesuré avec SiteVol (Desaphy et al., 2012).

#### III.I.5. Résonance plasmonique de surface

Nos expériences de SPR ont été réalisées sur les appareils Biacore 2000 et T100 (GE Healthcare). Elles sont conduites selon les recommandations du fournisseur.

##### Fixation directe de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ purifiée :

L'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  (Milipore, CC1055, 0.54mg/ml) est immobilisée sur une chip CM5 (GE Healthcare) par la méthode du couplage d'amine. La surface de dextran est activée

### *III. Conception rationnelle d'antagonistes allostériques de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$*

par l'injection du mélange EDC/NHS (0.4M de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride avec 0.1M N-hydroxylsuccinimide, GE Healthcare) pendant 10min. L'intégrine est injectée dans un tampon formate pH4.5 sur la surface activée jusqu'à saturation de la réponse. Enfin la partie de la surface qui n'a pas réagi est désactivée par une injection d'éthanolamine pendant 10min. Toutes les expériences de liaison sont réalisées à 25°C en flux continu dans un tampon salin HEPES (10mM HEPES, pH7.4, 150mM NaCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM MnCl<sub>2</sub> et Triton 0,2%). Les expériences de liaison de la fibronectine (BD Bioscience, 356008, 1mg/ml) sont réalisées à 1,8 ; 3,6 ; 7,2 ; 14,4 ; 28,8 ; 57,5 ; 115 ; 230 et 460nM. Pour le test de liaison, les anticorps sont utilisés à 1/100, 1/1000, 1/10 000, 1/100 000 et 1/1 000 000. La liste des anticorps est : AB1928 (Millipore, AB1980, antisérum, 0,05% d'azide de sodium), HUTS-21 (BD Bioscience, 556048, 0,5mg/ml tampon aqueux, <0,09% azide de sodium), Poly6004 (BioLegend, 600401, PBS pH7.2, 0,09% azide de sodium, 50%glycérol), 9EG7 (BD Bioscience, 553715, 0,5mg/ml dans du tampon aqueux à 0,09% d'azide de sodium), H-104 (Santa Cruz, sc-10729, 0,2mg/ml, PBS <0,1%azide de sodium et 0,1% de gélatine) et IIA1 (BD Pharmingen, 555615, 0,5mg/ml, tampon aqueux, < 0,09% azide de sodium). Durant les essais, le signal de réponse à la liaison en RU (unité de résonance) est enregistré en continu sur un graphique en fonction du temps. Les données sont exportées vers Excel pour être analysées.

#### Fixation de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ par l'intermédiaire d'anticorps :

L'activation et la désactivation de la surface de dextran de la chip CM5 sont réalisées comme précédemment. Les anticorps 9EG7, 1928 et HUTS-21 sont dialysés dans le tampon salin HEPES (10mM HEPES, 150mM NaCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM MnCl<sub>2</sub>, 1mM CaCl<sub>2</sub>, Triton X100 0,01%) et utilisés à 50 $\mu$ g/ml ou 1/10. La régénération est effectuée avec un tampon Glycine 10mM pH2.2. Les conditions expérimentales ainsi que les analyses sont identiques à celles réalisées précédemment.

#### Fixation de la protéine chimérique $\alpha 5\beta 1$ -Fc :

Dans le cas de l'utilisation de la protéine chimérique  $\alpha 5\beta 1$ -Fc, nous utilisons le kit et le protocole « Human antibody Capture Kit » (BR-100839, Biacore, GE Healthcare). Comme précédemment, la surface de dextran de la chip CM5 est activée par l'injection durant 10min de EDC/NHS, l'anticorps reconnaissant la partie constante des anticorps humain comprise dans le kit est ajouté durant 10min. Enfin, la surface est inactivée avec de l'éthanolamine durant 5min. L'ensemble des expériences est réalisé dans un tampon

salin HEPES (10mM HEPES, 150mM NaCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM MnCl<sub>2</sub>). La protéine chimérique  $\alpha 5\beta 1$ -Fc est dialysée dans ce dernier avant son utilisation. Les conditions expérimentales et les analyses sont réalisées comme précédemment.

### **III.I.6. Culture des cellules NS0**

Les cellules NS0 obtenues du Pr Humphries (Manchester, Royaume Uni) sont maintenues en culture dans du milieu EX-Cell™ (Sigma, A4650C) complémenté avec 8mM de L-glutamine (Lonza, 17-605E) et optionnellement de sérum fœtal de veau (Lonza, DE14-801F), dans un incubateur sous atmosphère humide à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>.

La concentration cellulaire est mesurée par l'utilisation du compteur de cellule (TC10, Biorad) en présence de bleu Trypan (Biorad, 145-0022).

### **III.I.7. Electrophorèse et Western Blot de la protéine $\alpha 5\beta 1$ -Fc**

Le milieu cellulaire est récupéré, les cellules éliminées par centrifugation. Les échantillons de milieu sont dilués au demi avec du tampon Laemmli (BioRad, 161-0737) 5% 2-mercaptopropanoïlique. Les protéines sont séparées sur un gel SDS-PAGE (Biorad) précoulé.

La coloration à l'argent est effectuée avec le kit « Color Silver Stain kit » (ThermoScientific, 24597). Selon le mode opératoire fournit, le gel est laissé 2h dans la solution de fixation (50% éthanol, 5% acide acétique), rincé à l'eau ultrapure quatre fois 45min. Le gel est incubé 1h dans la solution d'argent fournie (diluée au 15<sup>ème</sup>) à température ambiante, rincé 30s dans l'eau, incubé 10min dans la solution de réduction (mélange ex tempore des solutions d'aldéhyde et de base à 1:1, dilué 7,5 fois), rincé 30s dans l'eau et enfin incubé 1h dans la solution de stabilisation (diluée 50 fois).

Dans le cas du Western Blot, les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF (GE Healthcare). Après blocage dans une solution de PBS/BSA5%, les membranes sont incubées avec l'anticorps reconnaissant la partie constante des anticorps IgG humains couplé à la HRP (Jackson ImmunoResearch, 109-035-008). Les protéines sont visualisées avec la technique « enhanced chemiluminescence » (Clarity Western ECL, Biorad, 1705061), et les analyses effectuées avec le logiciel ImageJ.

### **III.I.8. Purification de la protéine**

Le milieu de culture est récupéré, les cellules éliminées par centrifugation. La concentration du milieu est réalisée à 4°C avec une cassette Vivaflow200 de 50kDa (Sartorius) jusqu'à obtention du 10<sup>ème</sup> du volume initial. Le milieu obtenu (condensat) est centrifugé pour éliminer toutes impuretés. La récupération de la protéine est effectuée par chromatographie d'affinité à la protéine A fixée sur des billes de sépharose (Invitrogen, 101042). La fixation a lieu sous agitation à 4°C pendant une nuit. Les billes sont récupérées par centrifugation, lavées à plusieurs reprises au PBS (Lonza). La protéine est récupérée dans un tampon glycine 1mM pH2.5 après 20min d'incubation, le pH est tamponné avec une solution de TRIS 1M pH8,2.

Le dosage protéique des échantillons est réalisé à l'aide du kit « DC Protein Assay » (Biorad, 500-0116) basé sur la technique de Lowry, une gamme étalon est réalisée avec le kit « Quick Start Bovine Serum Albumin Standard Set » (Biorad, 500-0207). La densité optique est lue à 595nm. Les résultats sont analysés à l'aide du logiciel Excel.

### **III.I.9. Fluorimétrie différentielle à balayage**

D'après les données fournies par l'équipe du Pr Takagi (Osaka, Japon), la stabilité thermique des protéines est analysée par l'utilisation d'un système de détection RTpcr CFX96 (Biorad). Le déploiement de la protéine est suivi entre 25°C et 85°C par étapes de 0,5°C pour 30s par la mesure de la fluorescence de la sonde sensible à l'environnement SYPRO Orange (Molecular Probes). La concentration finale de la protéine est de 25 $\mu$ g/ml, la concentration des molécules de 0,5mM et la concentration de l'hexapeptide GRGDNP de 1mM. Le volume total des échantillons est de 20 $\mu$ l.

### **III.I.10. Culture des cellules de gliobastomes**

Les lignées de cellules de glioblastome humain U87MG (ATCC) et U373MG (ECACC) sont maintenues dans du milieu EMEM (Lonza) supplémenté à 10% de sérum de veau foetal (FBS) (Lonza), 200IU/ml de peniciline/streptomycine (Lonza) et 0,6mg/ml de glutamine (Lonza), dans un incubateur sous atmosphère humide à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>.

Les cellules ont été transfectées de manière stable pour sur-exprimer (par transfection avec un plasmide pcDNA3.1 contenant le gène de l'intégrine  $\alpha 5$  humain, donné par le Dr Ruoshlati, Université de Californie, Santa Barbara) ou sous-exprimer

### III.I. Matériel et méthodes

(par transfection d'un plasmide pSM2 codant pour un shRNA ciblant l'ARNm de l'intégrine  $\alpha 5$ , OpenBiosystems) la sous-unité  $\alpha 5$  de l'intégrine en utilisant jetPRIME (Polyplus transfection) selon les instructions du fabricant.

#### III.I.11. Test de l'adhérence cellulaire

Les cellules sont collectées à l'aide de l'EDTA/PBS (2mM). Elles (4 500cellules/puits) sont ensuite incubées avec les antagonistes (50 $\mu$ M) ou du solvant (DMSO 0,5%) dans du milieu EMEM/HEPES (Lonza) supplémenté avec 0,2% BSA durant 30min, puis ensemencées (4 500cellules/puits) dans une plaque 96 puits coatée la veille avec de la fibronectine (Pr Carreira, Cergy-Pontoise, France) ou de la vitronectine (Pr Luis, Marseille, France) et bloquée (PBS/BSA 0,2%) pendant 1h. Chaque condition est réalisée en triplicat. L'adhérence cellulaire est mesurée après rinçage, fixation (PBS/glutaraldéhyde 0,1%) et coloration au crystal violet (0,25% éthanol, w/v, rincée et dilué dans une solution de SDS à 0,5%) par absorbance à 595nm. Le coating à la poly-L-lysine (10 $\mu$ g/ml, Sigma) est utilisé pour mesurer 100% de l'adhérence des cellules, celui à la BSA pour définir le bruit de fond.

#### III.I.12. Migration de cellules isolées

Après collecte à l'aide de trypsine/EDTA (Lonza), les cellules sont ensemencées à très faible densité (500 cellules/puits) avec 1 $\mu$ g/ml de Hoechst33423 (Sigma) dans un plaque noire 96 puits  $\mu$ Clear (Dutscher, France) dans du milieu L-15 (Sigma) supplémenté avec 10% de FBS. Après 24h, le milieu est retiré, et du milieu contenant le hoechst ainsi que les antagonistes ou le solvant est ajouté. La migration des cellules est suivie par un microscope à fluorescence (In Cell Analyzer 1000, GE Healthcare) pendant 8h. Les analyses sont réalisées seulement sur les cellules que l'on a suivie sur la totalité du temps de l'expérience. La vitesse et les trajectoires sont exploitées avec Excel à partir du fichier contenant la position de chaque cellule et à chaque temps. Expériences réalisées avec la plateforme TCA (Illkirch).

#### III.I.13. Migration collective des cellules par blessure/cicatrisation

Après leur collecte à l'aide de la trypside/EDTA (Lonza), les cellules (25 000cellules/ml, 0,5mL/puits) sont ensemencées dans des plaques 24puits ImageLock<sup>TM</sup> (Essen Bioscience). Après 24h d'incubation, une blessure est réalisée au milieu de la

### *III. Conception rationnelle d'antagonistes allostériques de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$*

monocouche confluente de cellules avec le wound-maker<sup>TM</sup>, cet outil permet d'obtenir une blessure précise et reproductible sur l'ensemble des puits. Les débris cellulaires sont lavés au PBS et les cellules incubées dans du milieu neuf complémenté à 10% de FBS avec le solvant ou les antagonistes aux concentrations indiquées dans chaque test. Chaque condition est réalisée en duplicate. Le logiciel Incucyte<sup>TM</sup> Scratch Wound est utilisé pour la capture et l'analyse des images pendant 24h (3 images par puits et par heure). La fermeture de la blessure est automatiquement calculée en utilisant la densité cellulaire relative. Expériences réalisées avec la plateforme PCBIS (Illkirch).

#### **III.I.14. Analyses statistiques**

Les résultats sont représentés par la moyenne  $\pm$  SEM. Les valeurs sont obtenues à partir de 2 expériences indépendantes (sauf mention contraire). Les analyses statistiques sont réalisés par test t de Student avec le logiciel GraphPad Prism pour lequel  $p<0,05$  est considéré comme significatif.

### III.J. Bibliographie

- Akiyama, S. K., Yamada, S. S., Chen, W. T., & Yamada, K. M. (1989) Analysis of fibronectin receptor function with monoclonal antibodies: roles in cell adhesion, migration, matrix assembly, and cytoskeletal organization *J Cell Biol* 109, 863-75.
- Aota, S., Nomizu, M., & Yamada, K. M. (1994) The short amino acid sequence Pro-His-Ser-Arg-Asn in human fibronectin enhances cell-adhesive function. *J Biol Chem* 269, 24756-24761.
- Armstrong, P. C. & Peter, K. (2012) GPIIb/IIIa inhibitors: from bench to bedside and back to bench again. *Thromb Haemost* 107, 808-814.
- Barillari, C., Marcou, G., & Rognan, D. (2008) Hot-spots-guided receptor-based pharmacophores (HS-Pharm): a knowledge-based approach to identify ligand-anchoring atoms in protein cavities and prioritize structure-based pharmacophores. *J Chem Inf Model* 48, 1396-1410.
- Bazzoni, G., Shih, D. T., Buck, C. a., & Hemler, M. E. (1995) {Monoclonal antibody 9EG7 defines a novel  $\beta$  1 integrin epitope induced by soluble ligand and manganese, but inhibited by calcium.} *J Biol Chem* 270, 25570-7.
- Bhaskar, V., Zhang, D., Fox, M., Seto, P., Wong, M. H. L., Wales, P. E., Powers, D., Chao, D. T., Dubridge, R. B., & Ramakrishnan, V. (2007) A function blocking anti-mouse integrin  $\alpha 5\beta 1$  antibody inhibits angiogenesis and impedes tumor growth in vivo. *J Transl Med* 5, 61.
- Blue, R., Murcia, M., Karan, C., Jirousková, M., & Coller, B. S. (2008) Application of high-throughput screening to identify a novel  $\alpha IIb$ -specific small- molecule inhibitor of  $\alpha IIb\beta 3$ -mediated platelet interaction with fibrinogen *Blood* 111, 1248-56.
- Case, D. A., Darden, T. A., Cheatham, T. E., III, Simmerling, C. L., Wang, J., Duke, R. E., Luo, R., Walker, R. C., Zhang, W., Merz, K. M., Roberts, B., Hayik, S., Roitberg, A., Seabra, G., Swails, J., Goetz, A. W., Kolossváry, I., Wong, K. F., Paesani, F., Vanicek, J., Wolf, R. M., Liu, J., Wu, X., Brozell, S. R., Steinbrecher, T., Gohlke, H., Cai, Q., Ye, X., Wang, J., Hsieh, M.-J., Cui, G., Roe, D. R., Mathews, D. H., Seetin, M. G., Salomon-Ferrer, R., Sagui, C., Babin, V., Luchko, T., Gusalov, S., Kovalenko, A., & Kollman, P. A. (2012) AMBER 12 *University of California, Floride* ,.
- Cimperman, P., Baranauskienė, L., Jachimovičiūtė, S., Jachno, J., Torresan, J., Michailovienė, V., Matulienė, J., Sereikaitė, J., Bumelis, V., & Matulis, D. (2008) A Quantitative Model of Thermal Stabilization and Destabilization of Proteins by Ligands *Biophysical Journal* 95, 3222 - 3231.
- Clark, K., Pankov, R., Travis, M. A., Askari, J. A., Mould, A. P., Craig, S. E., Newham, P., Yamada, K. M., & Humphries, M. J. (2005) A specific  $\alpha 5\beta 1$ -integrin conformation promotes directional integrin translocation and fibronectin matrix formation *J Cell Sci* 118, 291-300.
- Coe, A. P., Askari, J. A., Kline, A. D., Robinson, M. K., Kirby, H., Stephens, P. E., & Humphries, M. J. (2001) Generation of a minimal  $\alpha 5\beta 1$  integrin-Fc fragment *J Biol Chem* 276, 35854-66.

### III. Conception rationnelle d'antagonistes allostériques de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$

- Desaphy, J., Azdimousa, K., Kellenberger, E., & Rognan, D. (2012) Comparison and druggability prediction of protein-ligand binding sites from pharmacophore-annotated cavity shapes. *J Chem Inf Model* 52, 2287-2299.
- Dong, X., Mi, L.-Z., Zhu, J., Wang, W., Hu, P., Luo, B.-H., & Springer, T. A. (2012)  $\alpha(V)\beta(3)$  integrin crystal structures and their functional implications. *Biochemistry* 51, 8814-8828.
- Hemler, M. E., Sanchez-Madrid, F., Flotte, T. J., Krensky, A. M., Burakoff, S. J., Bhan, A. K., Springer, T. A., & Strominger, J. L. (1984) Glycoproteins of 210,000 and 130,000 m.w. on activated T cells: cell distribution and antigenic relation to components on resting cells and T cell lines. *J Immunol* 132, 3011-8.
- Hynes, R. O. (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110, 673-687.
- Jones, G., Willett, P., & Glen, R. C. (1995) Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation. *Journal of Molecular Biology* 245, 43 - 53.
- Jones, G., Willett, P., Glen, R. C., Leach, A. R., & Taylor, R. (1997) Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *Journal of Molecular Biology* 267, 727 - 748.
- Khalili, P., Arakelian, A., Chen, G., Plunkett, M. L., Beck, I., Parry, G. C., Donate, F., Shaw, D. E., Mazar, A. P., & Rabbani, S. A. (2006) A non-RGD-based integrin binding peptide (ATN-161) blocks breast cancer growth and metastasis in vivo. *Mol Cancer Ther* 5, 2271-2280.
- Klim, J. R., Fowler, A. J., Courtney, A. H., Wrighton, P. J., Sheridan, R. T. C., Wong, M. L., & Kiessling, L. L. (2012) Small-molecule-modified surfaces engage cells through the  $\alpha v\beta 3$  integrin. *ACS Chem Biol* 7, 518-525.
- Knoll, R., Postel, R., Wang, J., Kratzner, R., Hennecke, G., Vacaru, A. M., Vakeel, P., Schubert, C., Murthy, K., Rana, B. K., Kube, D., Knoll, G., Schafer, K., Hayashi, T., Holm, T., Kimura, A., Schork, N., Toliat, M. R., Nurnberg, P., Schultheiss, H.-P., Schaper, W., Schaper, J., Bos, E., Den Hertog, J., van Eeden, F. J. M., Peters, P. J., Hasenfuss, G., Chien, K. R., & Bakkers, J. (2007) Laminin- $\alpha 4$  and integrin-linked kinase mutations cause human cardiomyopathy via simultaneous defects in cardiomyocytes and endothelial cells. *Circulation* 116, 515-525.
- Lenter, M., Uhlig, H., Hamann, A., Jeno, P., Imhof, B., & Vestweber, D. (1993) A monoclonal antibody against an activation epitope on mouse integrin chain  $\beta 1$  blocks adhesion of lymphocytes to the endothelial integrin  $\alpha 6\beta 1$ . *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 9051-9055.
- Liu, Y., Pan, Y., & Xu, Y. (2010) Binding investigation of integrin  $\alpha v\beta 3$  with its inhibitors by SPR technology and molecular docking simulation. *J Biomol Screen* 15, 131-137.
- Livant, D. L., Brabec, R. K., Pienta, K. J., Allen, D. L., Kurachi, K., Markwart, S., & Upadhyaya, A. (2000) Anti-invasive, antitumorigenic, and antimetastatic activities of the PHSCN sequence in prostate carcinoma. *Cancer Res* 60, 309-20.

- Lo, M.-C., Aulabaugh, A., Jin, G., Cowling, R., Bard, J., Malamas, M., & Ellestad, G. (2004) Evaluation of fluorescence-based thermal shift assays for hit identification in drug discovery *Anal Biochem* 332, 153-9.
- Luo, B.-H., Strokovich, K., Walz, T., Springer, T. A., & Takagi, J. (2004) Allosteric  $\beta 1$  integrin antibodies that stabilize the low affinity state by preventing the swing-out of the hybrid domain. *J Biol Chem* 279, 27466-27471.
- Luque, A., Gomez, M., Puzon, W., Takada, Y., Sanchez-Madrid, F., & Cabanas, C. (1996) Activated conformations of very late activation integrins detected by a group of antibodies (HUTS) specific for a novel regulatory region (355-425) of the common  $\beta 1$  chain. *J Biol Chem* 271, 11067-11075.
- Marcou, G. & Rognan, D. (2007) Optimizing fragment and scaffold docking by use of molecular interaction fingerprints. *J Chem Inf Model* 47, 195-207.
- Marinelli, L., Meyer, A., Heckmann, D., Lavecchia, A., Novellino, E., & Kessler, H. (2005) Ligand binding analysis for human  $\alpha 5\beta 1$  integrin: strategies for designing new  $\alpha 5\beta 1$  integrin antagonists. *J Med Chem* 48, 4204-4207.
- Meslamani, J., Li, J., Sutter, J., Stevens, A., Bertrand, H., & Rognan, D. (2012) Protein-Ligand-Based Pharmacophores: Generation and Utility Assessment in Computational Ligand Profiling. *J Chem Inf Model* ,
- Nagae, M., Re, S., Mihara, E., Nogi, T., Sugita, Y., & Takagi, J. (2012) Crystal structure of  $\alpha 5\beta 1$  integrin ectodomain: atomic details of the fibronectin receptor. *J Cell Biol* 197, 131-140.
- Nam, J.-M., Onodera, Y., Bissell, M. J., & Park, C. C. (2010) Breast cancer cells in three-dimensional culture display an enhanced radioresponse after coordinate targeting of integrin  $\alpha 5\beta 1$  and fibronectin. *Cancer Res* 70, 5238-5248.
- Niesen, F. H., Berglund, H., & Vedadi, M. (2007) The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nat Protoc* 2, 2212-2221.
- Pantoliano, M. W., Petrella, E. C., Kwasnoski, J. D., Lobanov, V. S., Myslik, J., Graf, E., Carver, T., Asel, E., Springer, B. A., Lane, P., & Salemme, F. R. (2001) High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery *J Biomol Screen* 6, 429-40.
- Ramakrishnan, V., Bhaskar, V., Law, D. A., Wong, M. H. L., DuBridge, R. B., Breinberg, D., O'Hara, C., Powers, D. B., Liu, G., Grove, J., Hevezi, P., Cass, K. M., Watson, S., Evangelista, F., Powers, R. A., Finck, B., Wills, M., Caras, I., Fang, Y., McDonald, D., Johnson, D., Murray, R., & Jeffry, U. (2006) Preclinical evaluation of an anti- $\alpha 5\beta 1$  integrin antibody as a novel anti-angiogenic agent. *J Exp Ther Oncol* 5, 273-286.
- Schenone, M., Dančík, V., Wagner, B. K., & Clemons, P. A. (2013) Target identification and mechanism of action in chemical biology and drug discovery *Nat Chem Biol* 9, 232-40.
- Shao, J., Tanner, S. W., Thompson, N., & Cheatham, T. E. (2007) Clustering Molecular Dynamics Trajectories: 1. Characterizing the Performance of Different Clustering Algorithms *Journal of Chemical Theory and Computation* 3, 2312-2334.

### III. Conception rationnelle d'antagonistes allostériques de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$

- Spiegel, J., Mas-Moruno, C., Kessler, H., & Lubell, W. (2012) Cyclic aza-peptide integrin ligand synthesis and biological activity. *J Org Chem* , .
- Springer, T. A., Zhu, J., & Xiao, T. (2008) Structural basis for distinctive recognition of fibrinogen gammaC peptide by the platelet integrin  $\alpha IIb\beta 3$ . *J Cell Biol* 182, 791-800.
- Sriramarao, P., Steffner, P., & Gehlsen, K. R. (1993) Biochemical evidence for a homophilic interaction of the  $\alpha 3\beta 1$  integrin. *J Biol Chem* 268, 22036-22041.
- Steinberg, T. H., Jones, L. J., Haugland, R. P., & Singer, V. L. (1996) SYPRO orange and SYPRO red protein gel stains: one-step fluorescent staining of denaturing gels for detection of nanogram levels of protein. *Anal Biochem* 239, 223-37.
- Stoeltzing, O., W., L., N., R., Fan, F., Parry, G. C., Parikh, A. A., McCarty, M. F., Bucana, C. D., Mazar, A. P., & Ellis, L. M. (2003) Inhibition of integrin  $\alpha 5\beta 1$  function with a small peptide (ATN-161) plus continuous 5-fu infusion reduces colorectal liver metastases and improves survival in mice. *International Journal of Cancer* 104, 496-503.
- Stragies, R., Osterkamp, F., Zischinsky, G., Vossmeyer, D., Kalkhof, H., Reimer, U., & Zahn, G. (2007) Design and synthesis of a new class of selective integrin  $\alpha 5\beta 1$  antagonists. *J Med Chem* 50, 3786-3794.
- Takagi, J., Erickson, H. P., & Springer, T. A. (2001) C-terminal opening mimics 'inside-out' activation of integrin  $\alpha 5\beta 1$ . *Nat Struct Biol* 8, 412-416.
- Takagi, J., Strokovich, K., Springer, T. A., & Walz, T. (2003) Structure of integrin  $\alpha 5\beta 1$  in complex with fibronectin. *EMBO J* 22, 4607-4615.
- Tolomelli, A., Gentilucci, L., Mosconi, E., Viola, A., Dattoli, S. D., Baiula, M., Spampinato, S., Belvisi, L., & Civera, M. (2011) Development of isoxazoline-containing peptidomimetics as dual  $\alpha v\beta 3$  and  $\alpha 5\beta 1$  integrin ligands. *ChemMedChem* 6, 2264-2272.
- Verdonk, M. L., Cole, J. C., Hartshorn, M. J., Murray, C. W., & Taylor, R. D. (2003) Improved protein-ligand docking using GOLD. *Proteins* 52, 609-23.
- Wahlberg, E., Karlberg, T., Kouznetsova, E., Markova, N., Macchiarulo, A., Thorsell, A.-G., Pol, E., Frostell, Å., Ekblad, T., Öncü, D., Kull, B., Robertson, G. M., Pellicciari, R., Schüler, H., & Weigelt, J. (2012) Family-wide chemical profiling and structural analysis of PARP and tankyrase inhibitors. *Nat Biotechnol* 30, 283-8.
- Xiong, J. P., Stehle, T., Diefenbach, B., Zhang, R., Dunker, R., Scott, D. L., Joachimiak, A., Goodman, S. L., & Arnaout, M. A. (2001) Crystal structure of the extracellular segment of integrin  $\alpha V\beta 3$ . *Science* 294, 339-345.
- Xiong, J.-P., Stehle, T., Zhang, R., Joachimiak, A., Frech, M., Goodman, S. L., & Arnaout, M. A. (2002) Crystal structure of the extracellular segment of integrin  $\alpha V\beta 3$  in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science* 296, 151-155.
- Zhu, J., Choi, W.-S., McCoy, J. G., Negri, A., Zhu, J., Naini, S., Li, J., Shen, M., Huang, W., Bougie, D., Rasmussen, M., Aster, R., Thomas, C. J., Filizola, M., Springer, T. A., & Coller, B. S. (2012) Structure-guided design of a high-affinity platelet integrin  $\alpha IIb\beta 3$  receptor antagonist that disrupts  $Mg(2)(+)$  binding to the MIDAS. *Sci Transl Med* 4, 125ra32.

**Annexe 1 : Tableau des vitesses et inhibitions de la migration des cellules isolée mesurée pour les 63 composés testés**

	DMSO	vitesse (μm/min)		Inhibition (%)		vitesse (μm/min)		Inhibition (%)	
		moyenne	SEM	moyenne	SEM	moyenne	SEM	moyenne	SEM
1	<b>0,163</b>	<b>0,005</b>	0,003	0,0	9,3	<b>3,1</b>	33	0,166	0,005
2	0,092	0,004	48,8	2,6	34	0,173	0,004	7,8	3,7
3	0,113	0,003	36,9	2,3	35	0,184	0,006	2,7	-2,4
5	0,131	0,006	26,9	3,5	38	0,124	0,008	30,7	4,6
6	0,165	0,005	8,0	3,3	39	0,130	0,004	27,7	2,8
7	0,136	0,004	24,2	2,8	40	0,194	0,007	-8,0	4,1
8	<b>0,136</b>	<b>0,005</b>	<b>24,5</b>	<b>3,2</b>	41	0,190	0,009	-5,7	5,0
9	0,141	0,006	21,3	3,7	42	0,174	0,007	3,0	4,0
10	0,128	0,004	28,6	2,6	43	0,160	0,003	11,1	2,3
11	0,135	0,006	24,7	3,5	44	0,155	0,003	13,7	2,1
12	0,117	0,005	34,9	3,1	45	0,157	0,003	12,9	2,2
13	0,136	0,005	24,6	3,3	47	0,169	0,003	6,0	2,3
14	0,111	0,004	38,5	2,9	48	0,147	0,002	18,3	2,0
16	0,078	0,002	56,5	2,2	49	0,144	0,002	19,8	2,0
17	0,059	0,003	66,9	2,4	51	0,180	0,004	0,0	0,0
18	0,129	0,006	28,1	3,6	53	0,154	0,003	14,5	2,2
20	0,111	0,002	38,0	1,9	54	0,129	0,002	28,1	2,0
22	0,189	0,005	-5,1	3,2	55	0,155	0,003	14,0	2,2
23	0,192	0,004	-6,8	2,9	58	0,143	0,002	20,7	2,0
24	0,164	0,003	8,5	2,4	59	0,088	0,001	51,2	1,8
25	0,155	0,003	13,5	2,4	61	0,108	0,002	40,1	1,9
26	0,182	0,005	-1,1	2,9	62	0,116	0,002	35,2	2,0
27	0,194	0,006	-8,1	3,8	63	0,161	0,003	10,5	2,2
28	0,166	0,004	7,4	2,9	A77	0,103	0,004	42,9	2,7
30	0,154	0,004	14,0	2,5	T55	0,157	0,009	12,5	5,5
32	0,194	0,006	-7,9	3,6	T81	0,153	0,005	15,0	3,0

### III. Conception rationnelle d'antagonistes allostériques de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$

## Annexe 2 Alignement de la totalité des sous-unité α des intégrines qui reconnaissent le tripeptide RGD



### III. Conception rationnelle d'antagonistes allostériques de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$

### **Annexe 3 Alignement de la totalité des sous-unités $\beta$ des intégrines qui reconnaissent le tripeptide RGD**





## **Chapitre IV. Conclusion générale**

#### *IV. Conclusion générale*

Depuis leur identification en 1987, les intégrines sont de plus en plus décrites comme des éléments clefs de la physiologie de la cellule ainsi que comme des cibles thérapeutiques dans de nombreuses maladies parmi lesquelles différents cancers. Notre étude se focalise sur l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  et le glioblastome.

Dans un premier temps, nous nous sommes servi d'antagonistes RGD-mimétiques des intégrines  $\alpha 5\beta 1$  et  $\alpha V\beta 3$  afin de comprendre le rôle de chacune de ces intégrines dans l'adhérence et la migration de deux lignées de glioblastomes. Les lignées cellulaires utilisées montrent un comportement très différent quand à l'implication de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  dans l'adhérence ou la migration. Nous avons donc deux modèles distincts dont l'un présente une forte dépendance à l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  et l'autre non. Ces modèles correspondent aux données cliniques publiées ces dernières années faisant état de sous-populations de patients qui seraient répondeurs à une thérapie ciblant l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ . L'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  apparaît donc comme un bio-marqueur important, son inclusion dans les caractéristiques moléculaires recherchées lors de la découverte d'un glioblastome semble la prochaine étape.

Parmi les tests étudiés, seul le test sur la migration des cellules isolées permet de discriminer les antagonistes de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  de ceux de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$ . Les antagonistes utilisés sont des mimes de la séquence RGD. Cette séquence étant reconnue par l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  mais également plusieurs autres intégrines, la sélectivité de ces composés est toujours relative. Leur utilisation sur des cellules qui expriment différentes intégrines interconnectées, exprimées à différents taux ne permet pas un ciblage sélectif par ces antagonistes. Le problème de la sélectivité est posé par plusieurs données bibliographiques. Le manque de sélectivité du Natalizumab, par exemple, anticorps ciblant les intégrines  $\alpha 4$ , est montré du doigt comme un facteur potentiel de l'apparition de maladies opportunistes. La nécessité de proposer des antagonistes d'intégrines les plus sélectifs possible est donc un impératif, or mimer la séquence RGD ne semble pas permettre une sélectivité suffisante entre toutes les intégrines capables de le reconnaître. Il faut trouver des éléments plus discriminatoires.

L'émergence de stratégies novatrices dans la recherche d'antagonistes qui ne sont plus des mimes du ligand extracellulaire de l'intégrine mais des antagonistes fonctionnels est permise par l'avancée des connaissances sur les intégrines. Durant la

décennie passée, de nouvelles stratégies de conception d'antagonistes d'intégrines sont apparues. Dans notre cas, la problématique est de concevoir des antagonistes ciblant un autre site que le site de liaison de la séquence RGD et permettant d'avoir un effet thérapeutique pertinent sur les cellules de glioblastomes. Plutôt qu'une stratégie empirique de criblage à haut débit de chimiothèques les plus exhaustives possibles, nous avons choisi une stratégie rationnelle alliant des techniques *in vitro* et *in silico*.

La modélisation d'une partie extracellulaire de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , la recherche d'un site allostérique et le criblage *in silico* ont permis de réduire la taille de la chimiothèque testée, mais également de l'enrichir en composés possédant un fort potentiel de liaison avec le site sélectionné. La détection d'une liaison directe de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  avec les composés de la chimiothèque s'est avérée infructueuse. Les composés ont donc été sélectionnés pour leur caractère anti-migratoire *in vitro* grâce au test mis au point dans la première partie du travail. Ce procédé de sélection permet d'obtenir directement des antagonistes fonctionnels. Grâce à cette stratégie, nous avons obtenu trois composés qui sont des inhibiteurs sélectifs de la migration induite par l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ .

La caractérisation de leurs effets sur l'adhérence, la migration et la prolifération des cellules de glioblastomes appuie leur caractère novateur. Ces antagonistes ont la capacité d'inhiber la migration des cellules sans modifier l'adhérence des cellules à la fibronectine ou à la vitronectine. De tels composés n'auraient pu être obtenu avec le protocole classiquement utilisé qui se sert d'un test d'adhérence pour sélectionner les antagonistes d'intégrines. Une étude *in vitro* plus poussée de la conformation de l'intégrine ainsi que des voies de signalisation affectées lors de l'utilisation de ces composés permettra de mieux comprendre leur mode de fonctionnement ainsi que celui de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ .

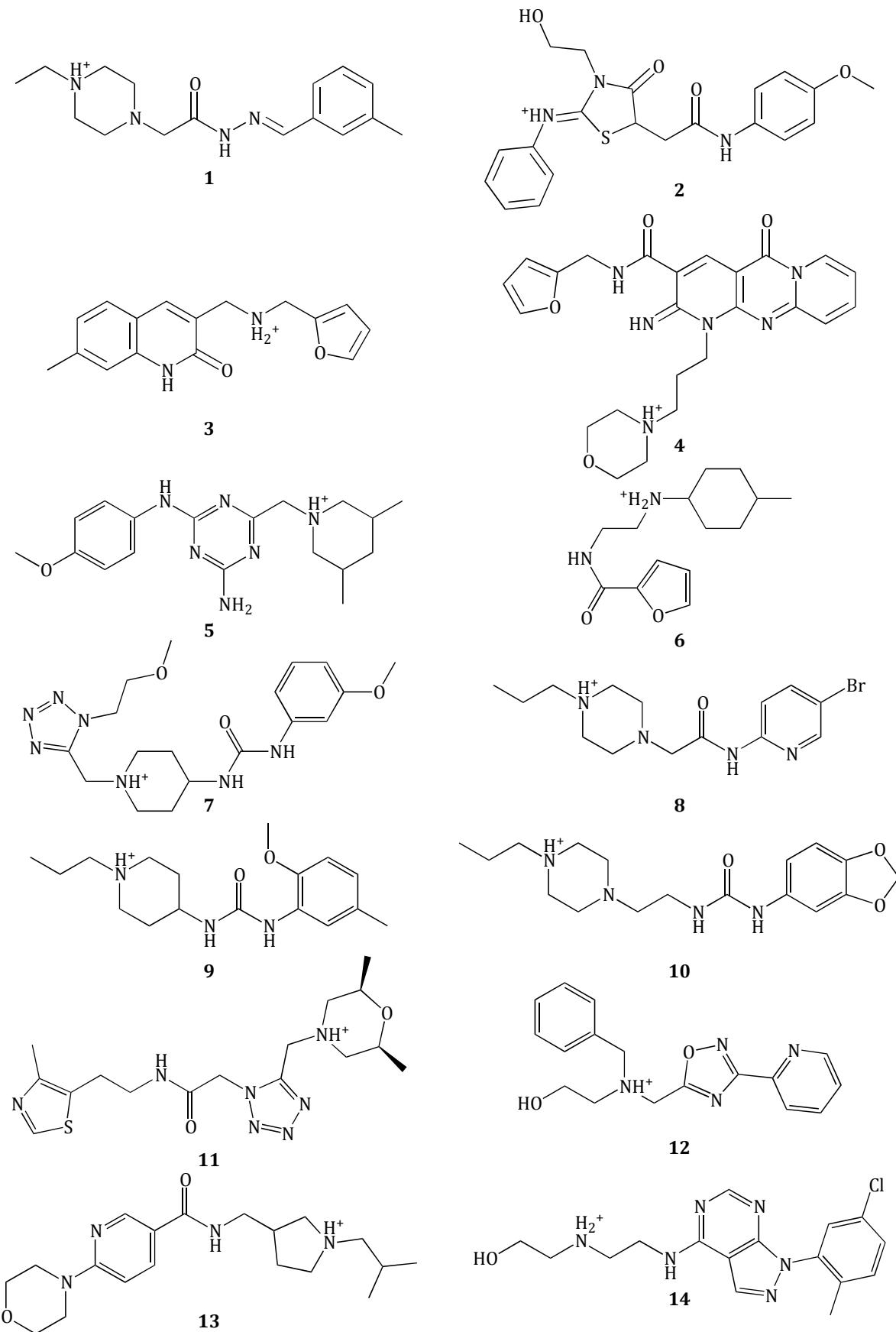
En plus d'être des outils de recherche fondamentale pertinents, ces composés ont un fort potentiel thérapeutique. Les glioblastomes sont les cancers cérébraux les plus agressifs. Les thérapies actuelles ne permettent pas de placer la médiane de survie au delà de 15 mois. Leur agressivité est en partie due à leur forte invasivité. Les traitements anti-migratoires sont donc recherchés. L'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  étant également un acteur de l'angiogenèse tumorale, ces composés pourraient être des agents anti-angiogéniques intéressants. Pour valider l'ensemble de ces hypothèses, un travail *in vivo* doit dorénavant être mis en œuvre.

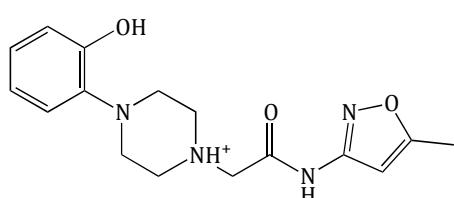
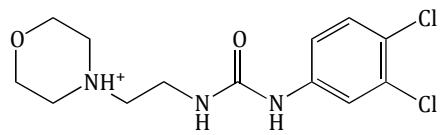
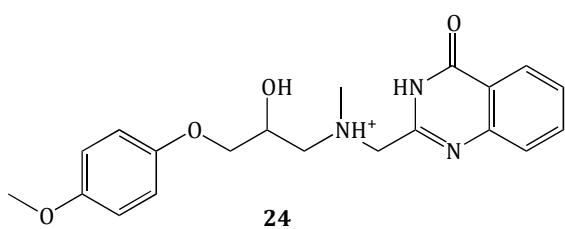
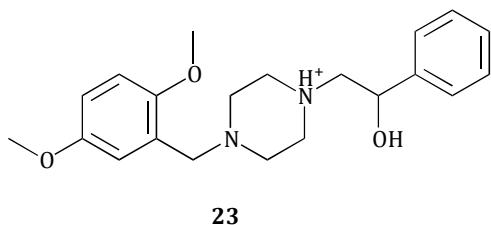
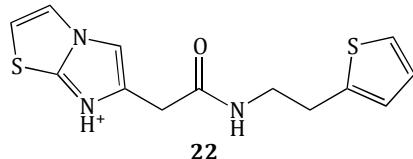
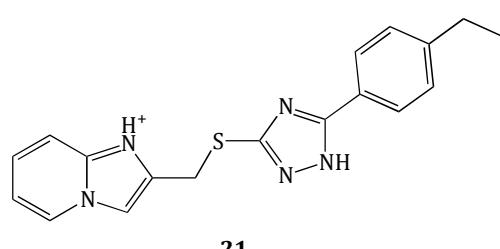
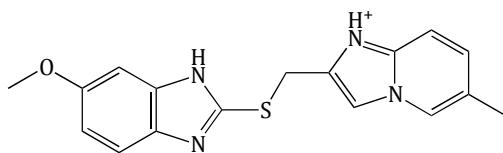
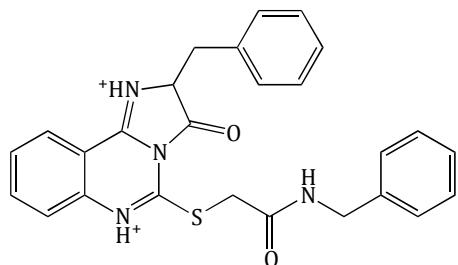
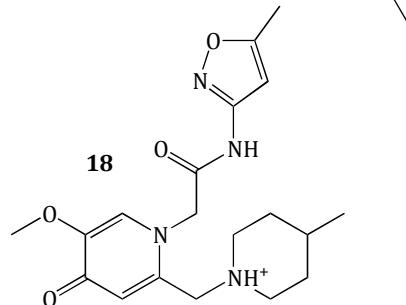
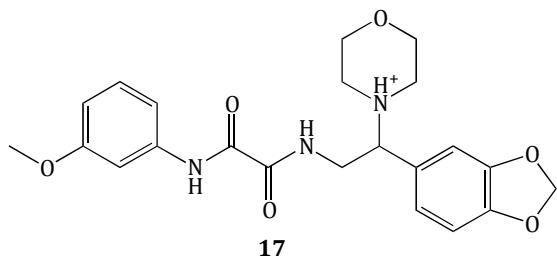
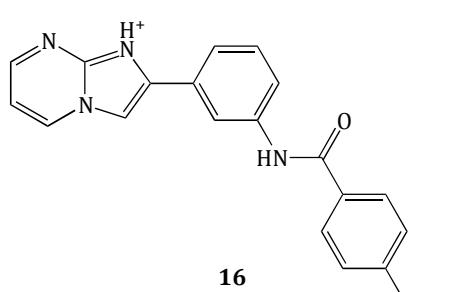
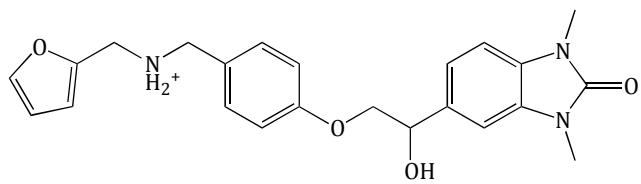
#### *IV. Conclusion générale*

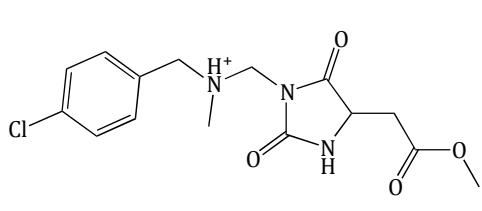
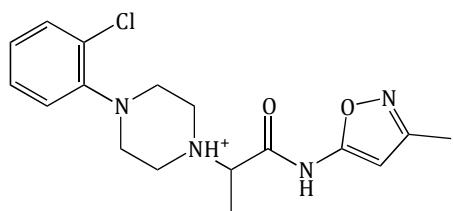
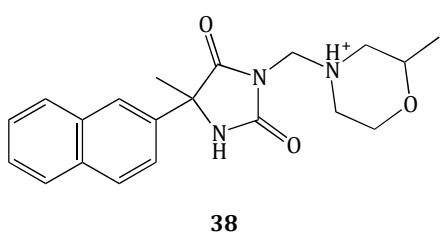
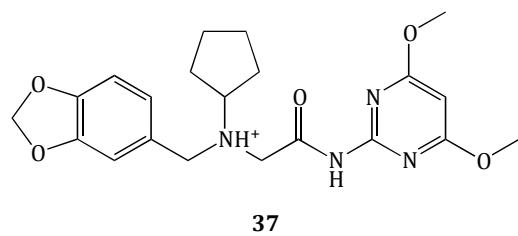
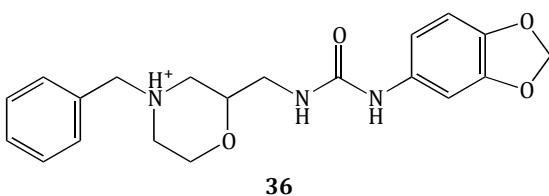
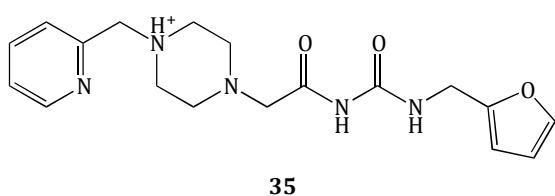
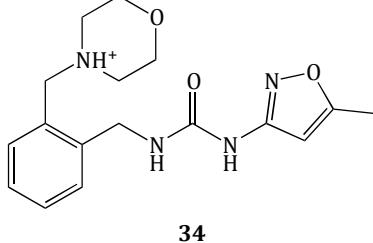
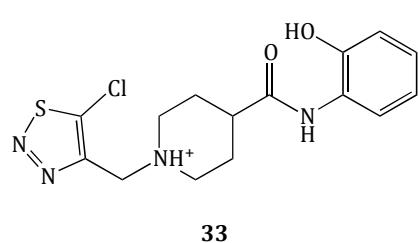
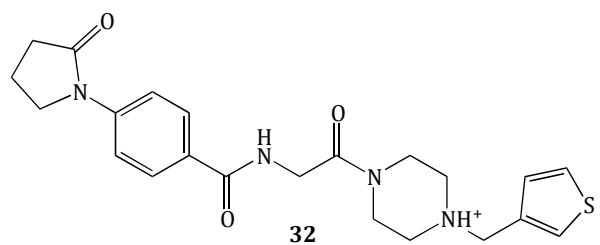
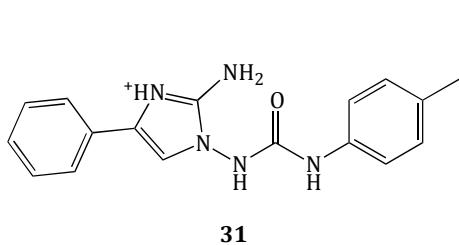
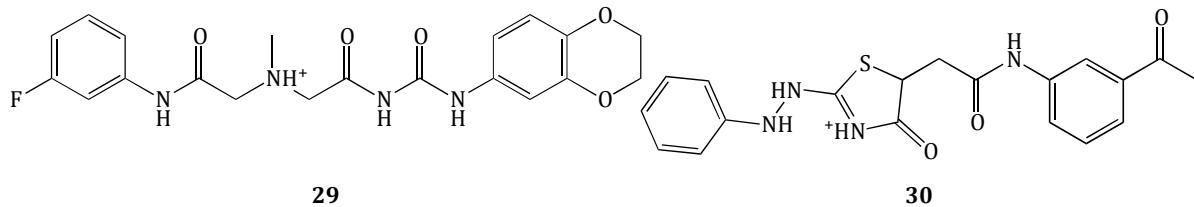
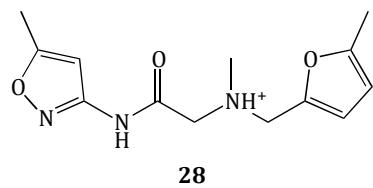
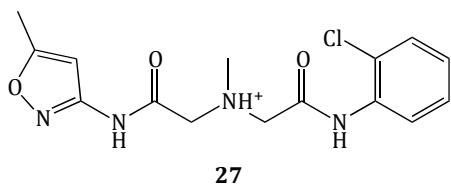
Malgré les difficultés et l'apprentissage qu'il demande, ce projet ambitieux à l'interface des sciences aussi différentes que l'informatique, la chimie et la biologie se clôture pour ma part sur la découverte de trois molécules innovantes possédant un fort potentiel thérapeutique. Ces molécules remettent en cause le dogme qui décrit l'inhibition de l'adhérence comme un critère obligatoire pour un antagoniste d'intégrine. Comme tout projet de recherche, il s'ouvre sur beaucoup de questions et de perspectives toutes plus intéressantes les unes que les autres.

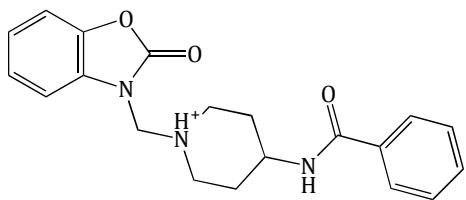
## **Chapitre V. Annexes**

**V.A. Molécules sélectionnées *in silico***

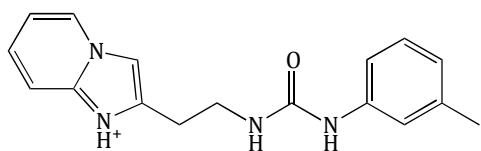




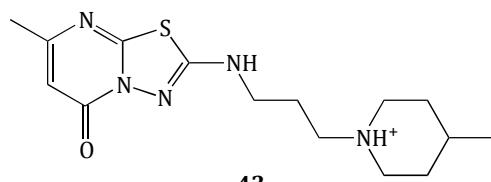




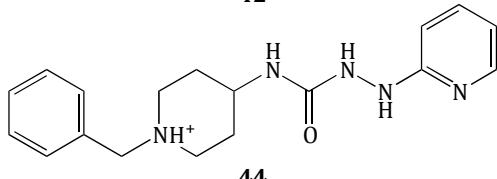
41



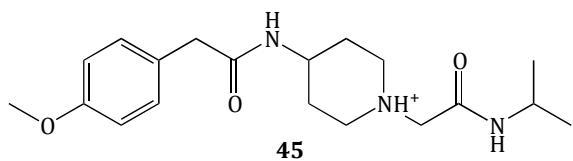
42



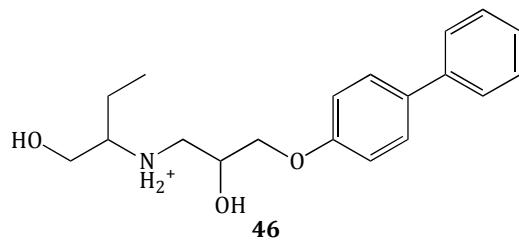
43



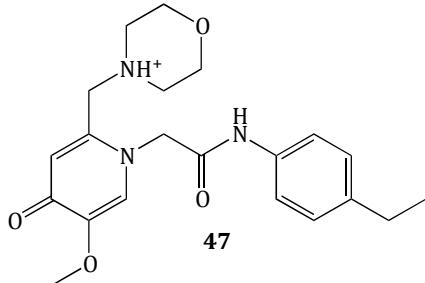
44



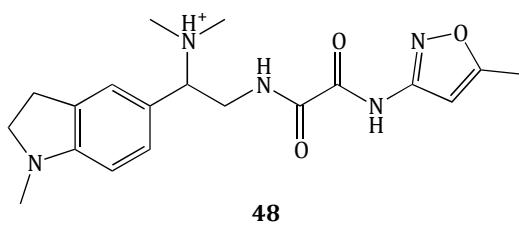
45



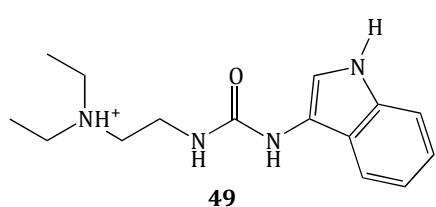
46



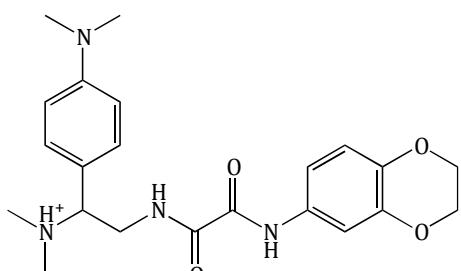
47



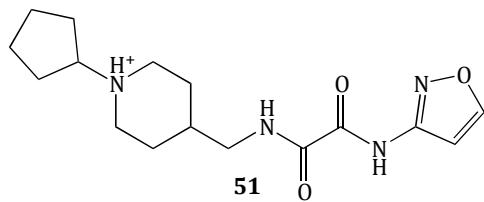
48



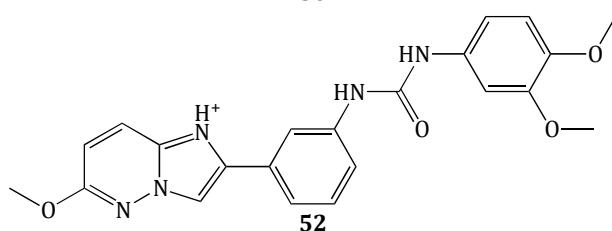
49



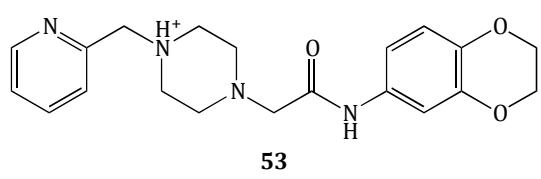
50



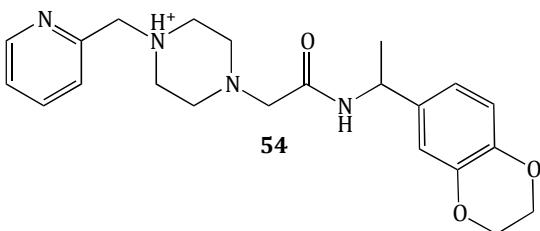
51

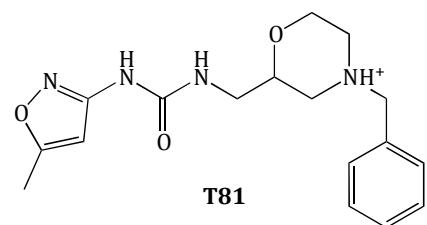
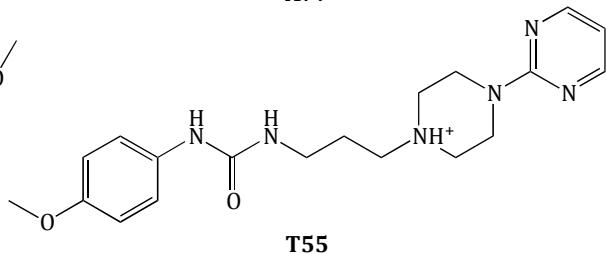
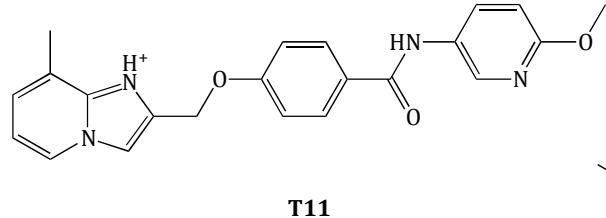
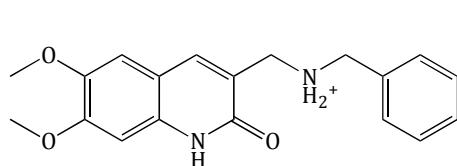
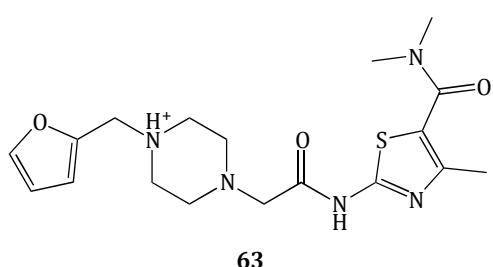
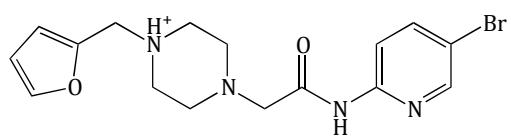
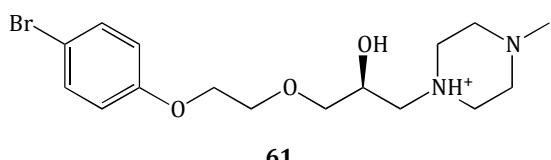
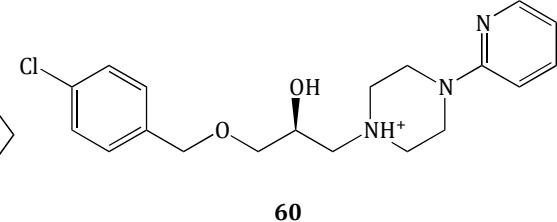
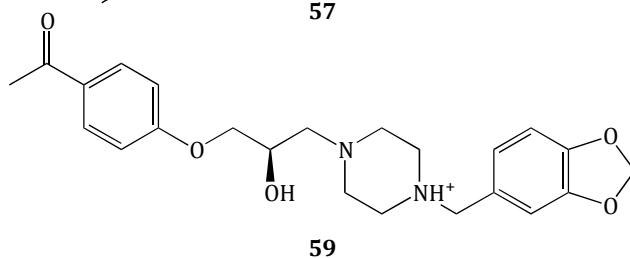
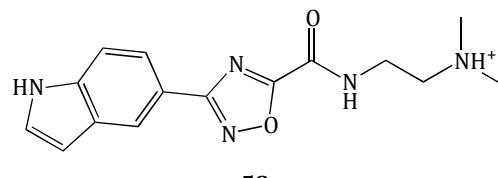
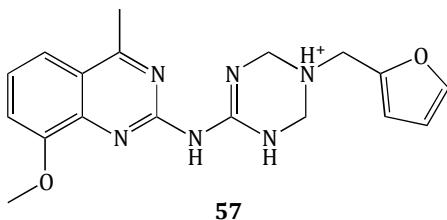
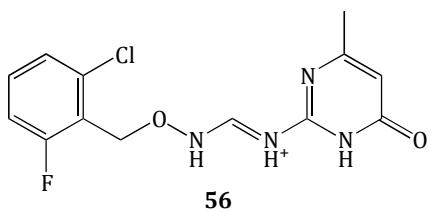
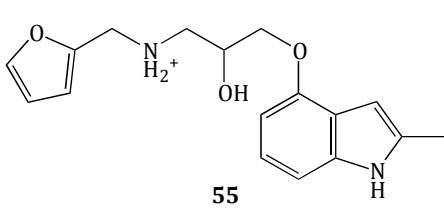


52



53





## V.B. Manuscripts

### **V.B.1. Integrin $\alpha 5\beta 1$ , the Fibronectin Receptor, as a Pertinent Therapeutic Target in Solid Tumors**

Revue bibliographie décrivant le rôle de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  dans différents cancers et les données connues des antagonistes de cette intégrine.

### **V.B.2. Activation of p53 pathway by Nutlin-3a inhibits the expression of the therapeutic target alpha5 integrin in colon cancer cells.**

Publication obtenue lors d'un travail collaboratif, montrant que l'utilisation d'un antagoniste de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  mimant la séquence RGD (K34c) diminue la survie des cellules de cancer du côlon.

### **V.B.3. Single cell tracking assay as a tool to characterize selective small non peptidic antagonists of $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha v\beta 3$ integrins in U87MG glioma cells.**

Manuscrit soumis à Cancer Letters issu des résultats obtenus dans le Chapitre II de ce travail.



Review

## Integrin $\alpha 5\beta 1$ , the Fibronectin Receptor, as a Pertinent Therapeutic Target in Solid Tumors

Florence Schaffner, Anne Marie Ray and Monique Dontenwill \*

UMR 7213 CNRS, Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, Tumoral Signaling and Therapeutic Targets, Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, 67401 Illkirch, France; E-Mails: florence.schaffner@unistra.fr (F.S.); amray@unistra.fr (A.M.R.)

\* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: monique.dontenwill@unistra.fr; Tel.: +33-3688-54267; Fax: +33-3688-54313.

Received: 5 December 2012; in revised form: 9 January 2013 / Accepted: 11 January 2013 /

Published: 15 January 2013

**Abstract:** Integrins are transmembrane heterodimeric proteins sensing the cell microenvironment and modulating numerous signalling pathways. Changes in integrin expression between normal and tumoral cells support involvement of specific integrins in tumor progression and aggressiveness. This review highlights the current knowledge about  $\alpha 5\beta 1$  integrin, also called the fibronectin receptor, in solid tumors. We summarize data showing that  $\alpha 5\beta 1$  integrin is a pertinent therapeutic target expressed by tumoral neovessels and tumoral cells. Although mainly evaluated in preclinical models,  $\alpha 5\beta 1$  integrin merits interest in particular in colon, breast, ovarian, lung and brain tumors where its overexpression is associated with a poor prognosis for patients. Specific  $\alpha 5\beta 1$  integrin antagonists will be listed that may represent new potential therapeutic agents to fight defined subpopulations of particularly aggressive tumors.

**Keywords:**  $\alpha 5\beta 1$ ; integrin; fibronectin receptor; solid tumors; angiogenesis; antagonists

### 1. Introduction

In recent years, integrins have attracted increasing interest for their potential to act as tumor therapeutic targets [1,2]. First recognized as cell adhesion molecules and receptors for the extracellular matrix (ECM), it is now widely acknowledged that integrins act as true receptors regulating intracellular signaling and cellular responses including migration, proliferation and differentiation [3].

Integrins are  $\alpha\beta$  protein heterodimers whose non covalent association defines the specificity of adhesion to particular components of the ECM or other proteins (immunoglobulin superfamily molecules, plasma proteins, VCAM1, *etc.*). In mammals, 18  $\alpha$  subunits and eight  $\beta$  subunits form a large family of about 24  $\alpha\beta$  integrins, which bind to tissue and organ specific ligands. Regulating the crosstalk between cells and their surrounding microenvironment, integrins are particularly relevant in different key aspects of tumor progression. Depending on the tumor types, the expression of specific integrins differs between tumoral tissues and their corresponding healthy tissues. Integrins are overexpressed in cancer cells impacting proliferation, survival, resistance to therapies and tumor recurrence. In addition, an important role in tumor angiogenesis has been highlighted for several integrins including  $\alpha 5\beta 1$  and  $\alpha v\beta 3/\beta 5$ . Their overexpression on neo-vessels during the tumor angiogenic switch led to the suggestion of new anti-angiogenic therapies [4]. Cilengitide, a specific antagonist for  $\alpha v\beta 3/\beta 5$  integrins is currently in clinical trials for the treatment of different tumors as for example the highly vascularized brain tumor glioblastoma [5]. Different recent reviews have already summarized the current knowledge about integrin structure, activation and signaling as well as integrin implication as therapeutic targets in cancer and/or angiogenesis [2–4,6–9]. The goal of this review is to focus on  $\alpha 5\beta 1$  integrin, also called the fibronectin receptor, as an emerging therapeutic target in different solid tumors. The role of  $\alpha 5\beta 1$  integrin in cancer has been somewhat controversial with data suggesting tumor suppressive effects while others are in favor of a protumoral behavior. In the last decade, the relationship between  $\alpha 5\beta 1$  integrin expression on tumors and patient survival has become increasingly recognized in several cancers. In this article we provide an overview of the implication of  $\alpha 5\beta 1$  integrin in tumor angiogenesis, and solid tumor aggressiveness and we list the currently available  $\alpha 5\beta 1$  integrin antagonists.

## 2. Generalities on $\alpha 5\beta 1$ Integrin

Integrins are composed of an extracellular domain, a transmembrane domain and a short cytoplasmic tail. The  $\alpha$  subunit extracellular domain has a 7-bladed  $\beta$  propeller connected to a thigh and two calf domains. In addition nine of the  $\alpha$  subunits have an I domain that contains the metal ion-dependent adherent site (MIDAS), crucial for ligand binding [10]. The  $\alpha$  subunit is responsible for the high specificity of  $\alpha 5\beta 1$  integrin for fibronectin. The combination of a primary interaction with the RGD site with a secondary interaction with the synergy site of fibronectin ensures both high affinity and specificity of  $\alpha 5\beta 1$  integrin for fibronectin [11,12]. A recent crystallography structure of  $\alpha 5\beta 1$  integrin in complex with a RGD-peptide has indicated that interaction of this integrin with the synergy site comes from the residue Asp 154 in the  $\alpha 5$  subunit and also that  $\text{Ca}^{2+}$  is an important cation for fibronectin binding [13]. The  $\beta$  subunit extracellular part is composed of a hybrid domain, a betal domain (with a MIDAS structure), a plexin/semaphorin/integrin domain and four EGF like domains [14].

Crystal structures have revealed that  $\beta 3$  integrins occur in three possible states: low, intermediate and high affinity for its ligand [15,16]. Activation of integrin either by binding to its ligand (outside-in signaling) or by binding of an activator protein like talin to its cytoplasmic tail (inside-out signaling) result in a change in conformation from a bent (low affinity) to an extended (high affinity). At the proximal site of the transmembrane domain GFFKR, residues, extremely conserved in the  $\alpha$  subunit, and hydrophobic membrane-proximal residues in the  $\beta$  subunit, are involved in releasing the integrin

from an inactive to an active conformation, with unbound cytoplasmic tails available for signal transduction [7,17]. Integrins do not have enzymatic activity therefore signal transduction is performed by proteins recruited to the cytoplasmic tail such as FAK, src, and talin [1,7]. Length and intensity of the signal is regulated in part by specific negative regulators proteins such as ICAP1 or sharpin [18]. Integrin  $\alpha 5\beta 1$  has specific regulator such as nischarin [19] and GIPC1 [20]. In addition to the recruitment of signaling inhibitors, integrin trafficking can regulate signaling [21]. After activation,  $\alpha 5\beta 1$  integrin can either be ubiquitinated and degraded in lysosome or get recycled rapidly to the plasma membrane via the early endosome pathway [21]. Ubiquitination and degradation in lysosome of  $\alpha 5\beta 1$  integrin is important for proper fibroblast migration on fibronectin [22]. Integrins can also be internalized via clathrin dependent or independent pathway [21]. Caveolar internalization of  $\alpha 5\beta 1$  integrin and fibronectin promotes matrix turnover [23]. Interestingly, it seems that caveolin-1 is capable of internalizing  $\alpha 5\beta 1$  integrin without fibronectin, thereby regulating the amount of the fibronectin receptor available on the cell surface. This type of regulation was also shown on endothelial cell with internalization of active or inactive  $\alpha 5\beta 1$  integrin by two different pathways [20]. Rapid recycling of  $\beta 1$  integrin to the plasma membrane through early endosome is regulated by Rab5-related GTPase Rab21 binding to a region close to the GFFKR motif [24]. Other small GTPase protein regulates  $\alpha 5\beta 1$  integrin like Rab25 that promotes invasion in cancer cells [25–27]. Recent data also point to a role of  $\alpha 5\beta 1$  integrin in mechanosensing [28,29]. In response to mechanical forces,  $\alpha 5\beta 1$  integrin switches between relaxed and tensioned states which allow strong adhesion and downstream signals [30,31]. The synergy site in fibronectin is required to form the tensioned bonds although the relaxed bonds only involve the RGD site [31]. Mechanical stimulation of  $\alpha 5\beta 1$  integrin enhances cancer cell invasion [32,33]. In summary, integrin bidirectional signaling regulates several processes such as migration, invasion, proliferation and survival specific to each cell types and is a major regulator of cancer progression which will be discussed next [1,6,8].

### 3. Integrin $\alpha 5\beta 1$ and Angiogenesis

Angiogenesis is a key physiological and pathological process that is regulated in part by integrins. Integrins are expressed by endothelial cells, smooth muscle cells and cellular components of the blood such as platelets, monocytes, lymphocytes *etc.* for example [4]. Among the large integrin family,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha v$  or  $\beta 1$  integrin subunits were shown to be required for vasculo- and angiogenesis during development [34–36]. Yet, each of these integrins have specific function:  $\alpha 4$  knock out mice display an abnormal retention of hematopoietic stem cells in the bone marrow niche and cardiac defect,  $\alpha v$  knock out mice show predominantly hemorrhage in the brain and intestine resulting in death from mid-gestation to perinatal, and  $\beta 1$  knock out specifically in endothelial cells resulting in the most severe phenotype with vascular remodeling defects caused by adhesion and migration alteration and reduced survival of endothelial cells. Homozygous deletion of  $\alpha 5$  integrin subunit results in embryonic death at around E 10.5 due to defects in posterior trunk development (defects in neural tube and somites), and angiogenesis [37,38]. The  $\alpha 5$  null embryos and the extraembryonic vessels display defects resulting in leakage of blood cells. Angiogenesis abnormalities are also observed in mice deficient in fibronectin, the major ligand for  $\alpha 5\beta 1$  integrin, although lethality occurs earlier at E9.5 [39]. To further understand the mechanism regulated by  $\alpha 5$  integrin subunit in angiogenesis, conditional

knock out were designed where  $\alpha 5^{\text{flox/flox}}$  mice were crossed with Tie2-Cre mice. The resulting mice do not express  $\alpha 5$  integrin subunit on endothelial and hematopoietic cells. Surprisingly the embryos developed normally and do not harbor angiogenesis defects [40]. Analysis of adhesion of  $\alpha 5$  null endothelial cells shows that  $\alpha v$  is present to focal adhesion points and therefore compensates for the lack of  $\alpha 5$ . Double knock out of  $\alpha 5$  and  $\alpha v$  in endothelial cells results in abnormal vessel remodeling and heart defects in most of the embryos by E14.5. These results highlight the importance of specific integrins in developmental angiogenesis but also that compensation mechanisms by other integrins exist in order to complete angiogenesis. These mechanisms are not only observed during development but also for example in adult hypoxic brain endothelial cells [41]. The compensation mechanisms may play crucial role and should be taken into consideration when analyzing the results of integrin targeting therapy.

In addition to its direct role in angiogenesis, integrin  $\alpha 5\beta 1$  also regulates angiogenic signals by binding with different partner such as endostatin [42], VEGFR-1 [43], Angiopoietin-2 and Tie-2 [44]. Interestingly, mature vessels present very low level of  $\alpha 5$  integrin subunit (with the exception of hepatic sinusoid and high-endothelial venules in lymph nodes) whereas tumor vasculature or neovessels in the cornea express high level of  $\alpha 5$  [45–48]. Injection of a specific monoclonal anti- $\alpha 5$  antibody in several murine cancer models shows that  $\alpha 5$  integrin subunits expressed on the luminal side of the tumor vasculature and thereby directly accessible for potential anti- $\alpha 5$  agents [49]. Integrin subunit  $\alpha 5$  expression in endothelial cells is regulated by several angiogenic factors such as FGF, TNF $\alpha$  or IL8, but not VEGF [45]. In turn, activation of  $\alpha 5\beta 1$  on endothelial cells by attachment to fibronectin results in the transcription of a gene repertoire related to angiogenesis (HB-EGF, IL8, CXCL1), adhesion (VCAM, E-selectin), signal transduction (RICK, NF $\kappa$ b) and coagulation (TF) [50]. Once expressed,  $\alpha 5$  integrin subunit promotes survival signals in angiogenic endothelial cells and blocks apoptotic signals independently of attachment to matrix *in vitro* and *in vivo* [51]. Therefore, blocking  $\alpha 5$  integrin subunit with a small peptide or an antibody results in anti-angiogenic effects and reduced tumor growth by integrin-mediated death pathway [45,52,53]. Due to its unambiguous role in angiogenesis,  $\alpha 5\beta 1$  integrin has become a target for anti-angiogenesis therapy.

#### 4. Integrin $\alpha 5\beta 1$ in Solid Tumors

##### 4.1. Colon Tumors

The controversy about  $\alpha 5\beta 1$  integrin as a tumor suppressor rather than a protumoral integrin mainly arose from data obtained in a colon cancer cell line, HT29. Studies showed that *de novo* expression of  $\alpha 5$  integrin subunit in HT29 cells results in cell growth arrest *in vitro* and decreased tumorigenicity *in vivo*. Cell growth arrest was reversed by ligation of  $\alpha 5\beta 1$  integrin to fibronectin [54]. Interestingly,  $\alpha 5\beta 1$ -expressing HT29 cells were shown to resist to serum deprivation-induced apoptosis [55]. The tumor suppressive function of  $\alpha 5\beta 1$  integrin in HT29 cells was confirmed in another study [56] and a strong inhibitory action of this integrin on lung colonization and metastasis was also reported [57]. These results were challenged when subgroups of colon cancer cell lines were examined according to their differentiation status [58]. It was shown that integrin  $\alpha 5\beta 1$  level was increased in the poorly differentiated group in relationship with an increased capacity to form tumors in nude mice [59]. In

accordance with these results, three well-established colon cancer cell lines, KM20, KM12C and KML4A, treated with an anti- $\alpha 5$  integrin inhibitory antibody, increased their apoptosis rate [60]. It was recently found that 19% of colon carcinoma, over 94 tumors examined, expressed  $\alpha 5\beta 1$  integrin at the protein level and in these tumors the labeling concerned only a fraction of neoplastic epithelial cells [61]. Interestingly, acquisition of  $\alpha 5\beta 1$  integrin was correlated with ADAM-15 down-regulation and poor prognosis [61]. In line with this, hypoxia was shown to increase  $\alpha 5$  integrin subunit at the mRNA level and this increase was more prominent in Duke stage C and D patients than in Duke stage A and B patients suggesting that the transcription increases along with the progression of colon cancer [62]. Upregulation of  $\alpha 5$  integrin subunit gene transcription in colon cancer cells is under the control of PTHrP [63] or ZEB2 [64] and leads to an upregulation of cell invasion during epithelial-mesenchymal transition. Activation of  $\alpha 5\beta 1$  integrin and corresponding signaling pathways by P-selectin and the human carcinoembryonic antigen (CEA) was also reported in colon carcinoma cells [65,66]. Suppression of  $\alpha 5\beta 1$  integrin activity by lunasin, a peptide isolated from soybean and having an RGD motif, potentiates the effect of oxaliplatin thus preventing outgrowth of colon cancer metastasis [67].

#### 4.2. Ovarian Tumors

Peritoneal dissemination is an important step in ovarian cancer progression to invasion and metastasis. It was first reported that fibronectin secreted by peritoneal tissue activates  $\alpha 5\beta 1$  integrin on ovarian cancer cells to stimulate their invasiveness through an increase of MMP-9 activity [68].  $\alpha 5\beta 1$  integrin regulates the formation of ovarian carcinoma multicellular spheroids, an *in vitro* model of micrometastasis [69], and partially mediates adhesion to mesothelial cell monolayer of patient-derived ascites spheroids [70]. Many human ovarian cancer cell lines express  $\alpha 5\beta 1$  integrin and their binding to mouse peritoneal wall preparation was impaired specifically by anti  $\alpha 5\beta 1$  integrin antibodies or endostatin which is a ligand for  $\alpha 5\beta 1$  integrin [71,72]. Kallikrein-related peptidases (KLK) are serine proteases often upregulated in ovarian carcinoma. KLK7 overexpression correlates with formation of large compact spheroids, chemoresistance and poor outcome in clinical settings. Interestingly enhanced expression of KLK7 in ovarian cancer cell lines and clinical samples was associated with enhanced expression of  $\alpha 5\beta 1$  integrin [73] suggesting that  $\alpha 5\beta 1$  integrin participates to the poor outcome of patients. The hypothesis of  $\alpha 5\beta 1$  integrin as a prognostic marker in ovarian tumors is confirmed by other data including large cohorts of patients [74,75]. In one of this study [74],  $\alpha 5\beta 1$  integrin expression was inversely correlated with E-cadherin expression and was shown to be implicated in adhesion of tumor cells to the peritoneal cavity and metastasis. Inhibition of  $\alpha 5\beta 1$  integrin by specific antibodies led to the suppression of intra-peritoneal tumor spread and increased survival in two xenograft models of ovarian cancer. In fact fibronectin/ $\alpha 5\beta 1$  integrin interaction on ovarian cancer cells activates the oncogene cMet and provides key mitogenic-signalling pathways to the cells [76]. Adrenomedullin also upregulates  $\alpha 5\beta 1$  integrin in ovarian tumors and patients with high adrenomedullin expression showed a higher incidence of metastasis and poor outcomes, indirectly further suggesting a role of  $\alpha 5\beta 1$  integrin in the aggressiveness of ovarian tumors [77]. An overview of integrin inhibitors as therapeutic agents for ovarian cancer has been published very recently [78].

#### 4.3. Breast Tumors

Similarly to what was shown in colon cancer cells, the first data concerning  $\alpha 5\beta 1$  integrin in breast tumor cells were in favor of its tumor suppressive effect. It was reported that treatment of the highly invasive breast carcinoma cell line MDA-MB-435 (which has been further classified as a melanoma cell line) with Maspin suppressed their invasive phenotype through an increased expression of  $\alpha 5\beta 1$  integrin at the mRNA and protein level [79]. Subsequent data however challenged this view as they demonstrated a proinvasive role of  $\alpha 5\beta 1$  integrin in breast cancer cells [80–82]. The oncogene ERBB2, strongly associated with metastatic disease and poor prognosis, drives the transcriptional upregulation of  $\alpha 5\beta 1$  integrin in mammary adenocarcinoma promoting tumor cell survival under adverse conditions and invasive capacity [80,83]. In a subset of breast cancers, overexpression of Steroid Receptor Coactivator-1 (SRC-1) was associated with an upregulation of  $\alpha 5\beta 1$  integrin and promotion of  $\alpha 5\beta 1$  integrin-dependent cell adhesion and migration [84]. Inverse relationship between  $\alpha 5\beta 1$  integrin expression and tumor suppressors expression such as nischarin [85], metastasis suppressors such as Nm23 [86] or epithelial cell-cell adhesion marker such as E-cadherin [87] were reported and associated with impact on breast cell tumorigenic potential. Loss of E-cadherin was also achieved through stimulation of breast cancer cells by angiopoietin-2 which stimulated cell migration through an  $\alpha 5\beta 1$  integrin-dependent way [88]. Data also showed that  $\alpha 5\beta 1$  integrin controls invasion of breast cancer cells by modulation of MMP-1 [81] and MMP-2 collagenase activity [89].  $\alpha 5$  integrin subunit mRNA was weakly expressed in normal tissues and more strongly expressed in breast cancer specimens [90] and elevated  $\alpha 5$  integrin subunit gene expression was associated with decreased long term survival in one cohort of patients with breast cancer [91] but not in two other cohorts [92]. Interestingly, while  $\alpha 5$  integrin subunit was proposed to be positively involved in lung metastasis of breast tumors in humans [85], the opposite effect was described for mouse breast tumor cells [93]. Finally, radiotherapy was shown to increase  $\alpha 5\beta 1$  integrin expression level in 3D culture breast tumor cells and combined cell treatment with ionizing radiation and antagonists of  $\alpha 5\beta 1$  integrin triggered apoptosis [91].

#### 4.4. Lung Tumors

Tobacco is the major risk factor for lung tumors. The main tobacco alkaloid nicotine stimulates lung cancer cell proliferation by the induction of fibronectin that led to activation of the  $\alpha 5\beta 1$  integrin. In non small cell lung cancer,  $\alpha 5\beta 1$  integrin overexpression at the mRNA [94,95] or protein [96,97] level was negatively associated with patient survival. Interestingly,  $\alpha 5\beta 1$  integrin expression could differentiate between adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung [94].  $\alpha 5\beta 1$  integrin expression was more frequent in tumors with lymph node metastasis than in those without metastasis [96]. Fibronectin- $\alpha 5\beta 1$  integrin signaling has been studied and implicated in lung cancer progression [98–100] and reviewed in [101]. The PI3K/AKT/mTOR pathway is a key mediator of fibronectin-integrin effects on proliferation [99]. Extracellular matrix proteins including fibronectin were shown to protect lung cancer cells from apoptosis through  $\beta 1$  integrin activation [102–105] thus explaining drug resistance of lung cancer cells.

#### 4.5. Glioma

The  $\alpha 5\beta 1$  integrin is expressed at significantly higher level in glioblastoma (the most aggressive glioma) than in adjacent normal brain tissue suggesting that it might play a role in the development or the progression of glioma [106].  $\alpha 5\beta 1$  integrin is commonly expressed in a perinecrotic or perivascular pattern in glioblastoma [107].  $\alpha 5$  integrin subunit mRNA level is under the control of the transcription factor ETS-1 and its expression is related to the grade of glioma, with the highest expression in glioblastoma [108]. We [109,110] and others [111] confirmed recently these data in larger cohorts of patients and showed that a high expression of  $\alpha 5\beta 1$  integrin is associated to a worse prognostic for patients with glioma. We also demonstrated that  $\alpha 5\beta 1$  integrin expression is under the negative control of caveolin-1 and positive control of TGF $\beta$ R in a subset of glioma tumors [110,112]. By the use of specific non peptidic antagonists of  $\alpha 5\beta 1$  integrin, its role in proliferation, migration, invasion and resistance to chemotherapy was highlighted in different glioma cell lines [109,113,114]. Interaction of MMP-2 with  $\alpha 5\beta 1$  integrin was shown to regulate the IL-6/STAT3 survival signaling in glioma [115]. The expression of the DNA repair protein, O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase (MGMT), was inversely related to invasion capacity of glioma and to  $\alpha 5\beta 1$  integrin expression [116].

#### 4.6. Melanoma

Malignant melanoma has a high metastatic potential. A role of  $\alpha 5\beta 1$  integrin in promoting melanoma metastasis through an increase in cell adhesion to fibronectin and protection against apoptosis was reported [117]. Recently, evidence that  $\alpha 5\beta 1$  integrin has a crucial role in melanoma metastasis confirmed this hypothesis. It was shown that  $\alpha 5$  integrin subunit up-regulation was under the control of survivin [118] or controlled by the interaction between caveolin 1 and Rho-GTPases [119]. Curiously, the specific uveal melanoma seems to be one of the cases where  $\alpha 5\beta 1$  integrin expression negatively impacts on tumorigenicity. High aggressiveness of uveal melanoma cells is dependent on the loss of  $\alpha 5\beta 1$  integrin at the cell surface [120–122]. However, restoration of  $\alpha 5\beta 1$  integrin expression in high tumorigenic cells increased the cell resistance to stress *in vitro* and growth properties *in vivo* [121] which appears somewhat paradoxical. It has been proposed that the effect of  $\alpha 5\beta 1$  integrin on cell tumorigenicity depends on the endogenous expression of fibronectin by the tumoral cells.

### 5. Integrin $\alpha 5\beta 1$ Antagonists

The search for specific  $\alpha 5\beta 1$  integrin antagonists has increased these last years. They are developed to understand the integrin pathophysiological behaviour in preclinical studies on endothelial and tumoral cells but also as therapeutic agents in the clinic [2]. As  $\alpha 5\beta 1$  integrin has been largely described as an unambiguous pro-angiogenic integrin, these antagonists are generally presented as potential anti-angiogenic agents. Three main classes of antagonists are described at the time, specific antibodies, small peptides or small non peptidic RGD-like molecules.

### 5.1. Antibodies

An  $\alpha 5\beta 1$  function-blocking murine antibody, IIA1, was used in preclinical studies [74,91]. It was able to inhibit *in vitro* invasion of ovarian tumor cells into Matrigel and tumor cell adhesion to mesothelial cells; it decreased the number and the size of intra-abdominal metastases and increased the survival of mice [74]. This inhibitory antibody also induced apoptosis of breast cancer cells in 3D culture conditions [91]. A chimeric humanised version of IIA1 antibody was generated, named volociximab (developed first by PDL Biopharma, Fremont, CA, USA), with similar affinity for  $\alpha 5\beta 1$  integrin and similar activity for blocking integrin adhesion to fibronectin than IIA1 [123]. Volociximab is a potent inhibitor of *in vitro* model of angiogenesis by inducing apoptosis of actively proliferating but not resting endothelial cells. It reduced vessel density and tumor growth in carcinoma xenografted in rabbits [123,124]. Results of volociximab in clinical assays have been reviewed recently in [125]. Volociximab has been shown to be safe and tolerable in phase I studies [126,127] in patients with different solid tumors. Reported adverse effects included constitutional symptoms, gastrointestinal symptoms, headache, edema and hypertension. Although  $\alpha 5\beta 1$  integrin is expressed on normal blood monocytes, no clinically apparent infectious complications were observed. A phase II clinical trial has shown that in patients with platinum-resistant advanced epithelial ovarian or primary peritoneal cancer, weekly monotherapy with volociximab was well tolerated but without efficacy on these particular population of patients [128]. In patients with refractory or relapsed metastatic clear cell renal carcinoma, volociximab led to stable disease in 80% of patients [129].

A dual functional monoclonal antibody, PF-04605412, has been developed by Pfizer. This antibody targets  $\alpha 5\beta 1$  integrin and was engineered to elicit potent antibody-dependent cellular toxicity [130]. Preclinical studies showed that PF-04605412 potently inhibited  $\alpha 5\beta 1$  integrin mediated intracellular signalling, cell adhesion, migration and angiogenesis. In animal studies, it displayed robust anti-tumor efficacy correlated with  $\alpha 5$  integrin subunit expression, macrophages and natural killer cells infiltration [130]. A clinical trial phase I is currently underway in solid tumors refractory to available therapies.

### 5.2. RGD-like Molecules

The RGD motif of fibronectin is recognised by at least three main integrins:  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 3$  and  $\alpha IIb\beta 3$ . The challenge of these last ten years has been to design antagonists with enhanced selectivity for each of these integrins.

The first selective non peptidic antagonist for  $\alpha 5\beta 1$  integrin was SJ749 (compound 20 in [131]). SJ749 blocked efficiently  $\alpha 5$  integrin-expressing HT29 cell adhesion to fibronectin and not to other ECM ligand. It also blocked  $\alpha 5\beta 1$  integrin function in chick embryo and murine models of angiogenesis acting as a potent inhibitor of tumor growth and tumor-induced angiogenesis [45]. We described that SJ749 potently inhibited the proliferation of glioma cell lines dependently of  $\alpha 5\beta 1$  integrin expression level [112,114] and that SJ749 sensitized glioma cells to chemotherapy by modulating the p53 pathway [113].

SJ749 was used in docking experiments to build a 3D model of the  $\alpha 5\beta 1$  integrin with the  $\alpha v\beta 3$  integrin crystal structure as a model [132]. Based on the characteristics of SJ749 binding site and SAR

analysis, analogs of SJ749 [132] or original compounds [133–135] were designed by the group of H. Kessler (München, Germany) and tested for their integrin affinities. Compounds with high affinity and selectivity for  $\alpha 5\beta 1$  integrin were found by these strategies. Few data concerning the biological activities of such compounds are available to date. We evaluated the effects of one of these compounds, K34c, on glioma cell lines. We demonstrated that K34c affected the survival of glioma cells as well as their resistance to chemotherapies [110,113].

New selective small non peptidic  $\alpha 5\beta 1$  integrin antagonists were described by Jerini AG (Berlin, Germany) [136]. Compounds were mainly tested in pathological models of neovascularization where  $\alpha 5\beta 1$  integrin plays a crucial role [137–141]. One of them, JSM6427, was shown to attenuate glioma growth [141]. Interestingly, new orally available  $\alpha 5\beta 1$  integrin antagonists were described recently by this pharmaceutical group [142,143]. Other small non peptidic molecules were synthesized by AstraZeneca and showed some selectivity for  $\alpha 5\beta 1$  integrin compared to  $\alpha v\beta 3$  integrin [144,145].

### 5.3. Non RGD-like Peptides

Sequences outside of the RGD site are required to allow full adhesion of  $\alpha 5\beta 1$  integrin to fibronectin. Of particular interest is the sequence Pro-His-Ser-Arg-Asn (PHSRN) in the 9th type III repeat of fibronectin also called the “synergy site”. PHSRN peptide induced invasion of prostate tumor cells by inducing MMP-1 [146,147] and stimulation of angiogenesis [148] which was inhibited by the competitive inhibitor PHSCN peptide. The acetylated amidated PHSCN peptide was even more potent than PHSCN peptide [146], and was developed by Attenuon LLC (San Diego, CA, USA) under the name ATN-161. ATN-161 treatment blocks prostate tumor recurrence, metastasis and micrometastasis [149], reduces colorectal liver metastasis and improves survival when given in addition with chemotherapy [150], and blocks breast cancer growth and metastasis [151] in preclinical mouse models. Targeting  $\alpha 5\beta 1$  integrin with ATN-161 in combination with radiotherapy enhanced apoptosis of breast cancer cells grown in 3D culture [91]. ATN-161 proved also efficient to block choroidal neovascularisation [152]. Phase I trial of ATN-161 indicated that it was well tolerated in patients with solid tumors and that one third of patients manifested prolonged stable disease. No side effects emerged or became worse with continued chronic dosing of ATN-161 [153]. Recently, PHSCN dendrimers were synthesized and shown to be more potent than the initial peptide for inhibiting  $\alpha 5\beta 1$  integrin-mediated MMP-1 secretion *in vitro* and for inhibiting human prostate cancer cell invasion, extravasation and lung metastasis *in vivo* [154]. Similar results were reported on human breast cancer cells [155].

## 6. Conclusions

The critical role of  $\alpha 5\beta 1$  integrin in physiological angiogenesis and development has been recognized for over two decades. More recent are the data implicating  $\alpha 5\beta 1$  integrin in pathophysiological/tumoral neoangiogenesis. Even more recently, its role as a prognostic and diagnostic marker has been highlighted in several solid tumors. The relationship between high expression of  $\alpha 5\beta 1$  integrin in subpopulation of patients with solid tumor and a poor prognosis for these patients suggest its implication in resistance to conventional therapies. As shown above,  $\alpha 5\beta 1$  integrin is implicated in different aspects of tumor progression and appears particularly overexpressed in the most aggressive tumor grades. Ways to modulate positively the  $\alpha 5\beta 1$  integrin expression also

appear multiple and certainly tissue dependent. Its participation in tumor angiogenesis and tumoral cell migration and adhesion to metastasis niches as well as its effects on therapy resistance make it a pertinent therapeutic target for the future. Several antagonists are being tested with some already reaching the clinic. Targeting  $\alpha 5\beta 1$  integrin appeared safe for the patients in the few clinical trials reported so far. To date, efforts have not focused on  $\alpha 5\beta 1$  integrin antagonists but data summarized here support the notion that they will play an increasing role in human therapy. The recent elucidation of the crystal structure of  $\alpha 5\beta 1$  integrin ectodomain will certainly help to define more potent and specific antagonists. The goal for the future will be to define clear molecular biomarkers to support the proposition of subpopulations of patients potentially sensitive to a targeted therapy against  $\alpha 5\beta 1$  integrin.

### Acknowledgements

Work in the author's laboratory is supported by the CNRS, the University of Strasbourg, the Ligue Contre le Cancer (Comité du Grand Est), Alsace contre le Cancer, the Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer. F. Schaffner is a recipient of a postdoctoral fellow from the Ligue Nationale contre le Cancer. AM Ray is a recipient of a predoctoral fellow from the Ministère de la Recherche (France) and from the Ligue Nationale contre le Cancer.

### Conflict of Interests

The authors declare no conflict of interest.

### References

1. Desgrosellier, J.S.; Cheresh, D.A. Integrins in cancer: Biological implications and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 9–22.
2. Goodman, S.L.; Picard, M. Integrins as therapeutic targets. *Trends Pharmacol. Sci.* **2012**, *33*, 405–412.
3. Aoudjit, F.; Vuori, K. Integrin signaling in cancer cell survival and chemoresistance. *Chemother. Res. Pract.* **2012**, *2012*, 283181.
4. Avraamides, C.J.; Garmy-Susini, B.; Varner, J.A. Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 604–617.
5. Chamberlain, M.C.; Cloughsey, T.; Reardon, D.A.; Wen, P.Y. A novel treatment for glioblastoma: Integrin inhibition. *Expert Rev. Neurother.* **2012**, *12*, 421–435.
6. Campbell, I.D.; Humphries, M.J. Integrin structure, activation, and interactions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2011**, doi:10.1101/cshperspect.a004994.
7. Kim, C.; Ye, F.; Ginsberg, M.H. Regulation of integrin activation. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **2011**, *27*, 321–345.
8. Hu, P.; Luo, B.H. Integrin bi-directional signaling across the plasma membrane. *J. Cell. Physiol.* **2013**, *228*, 306–312.
9. Cox, D.; Brennan, M.; Moran, N. Integrins as therapeutic targets: Lessons and opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 804–820.

10. Lee, J.O.; Bankston, L.A.; Arnaout, M.A.; Liddington, R.C. Two conformations of the integrin A-domain (I-domain): A pathway for activation? *Structure* **1995**, *3*, 1333–1340.
11. Aota, S.; Nomizu, M.; Yamada, K.M. The short amino acid sequence Pro-His-Ser-Arg-Asn in human fibronectin enhances cell-adhesive function. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 24756–24761.
12. Obara, M.; Kang, M.S.; Yamada, K.M. Site-directed mutagenesis of the cell-binding domain of human fibronectin: Separable, synergistic sites mediate adhesive function. *Cell* **1988**, *53*, 649–657.
13. Nagae, M.; Re, S.; Mihara, E.; Nogi, T.; Sugita, Y.; Takagi, J. Crystal structure of alpha5beta1 integrin ectodomain: Atomic details of the fibronectin receptor. *J. Cell Biol.* **2012**, *197*, 131–140.
14. Barczyk, M.; Carracedo, S.; Gullberg, D. Integrins. *Cell Tissue Res.* **2010**, *339*, 269–280.
15. Xiong, J.P.; Stehle, T.; Diefenbach, B.; Zhang, R.; Dunker, R.; Scott, D.L.; Joachimiak, A.; Goodman, S.L.; Arnaout, M.A. Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3. *Science* **2001**, *294*, 339–345.
16. Lau, T.L.; Kim, C.; Ginsberg, M.H.; Ulmer, T.S. The structure of the integrin alphaIIbbeta3 transmembrane complex explains integrin transmembrane signalling. *EMBO J.* **2009**, *28*, 1351–1361.
17. Shattil, S.J.; Kim, C.; Ginsberg, M.H. The final steps of integrin activation: The end game. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 288–300.
18. Pouwels, J.; Nevo, J.; Pellinen, T.; Ylanne, J.; Ivaska, J. Negative regulators of integrin activity. *J. Cell. Sci.* **2012**, *125*, 3271–3280.
19. Alahari, S.K.; Nasrallah, H. A membrane proximal region of the integrin alpha5 subunit is important for its interaction with nischarin. *Biochem. J.* **2004**, *377*, 449–457.
20. Valdembri, D.; Caswell, P.T.; Anderson, K.I.; Schwarz, J.P.; Konig, I.; Astanina, E.; Caccavari, F.; Norman, J.C.; Humphries, M.J.; Bussolino, F.; *et al.* Neuropilin-1/GIPC1 signaling regulates alpha5beta1 integrin traffic and function in endothelial cells. *PLoS Biol.* **2009**, *7*, e25.
21. Margadant, C.; Monsuur, H.N.; Norman, J.C.; Sonnenberg, A. Mechanisms of integrin activation and trafficking. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2011**, *23*, 607–614.
22. Lobert, V.H.; Brech, A.; Pedersen, N.M.; Wesche, J.; Oppelt, A.; Maledod, L.; Stenmark, H. Ubiquitination of alpha 5 beta 1 integrin controls fibroblast migration through lysosomal degradation of fibronectin-integrin complexes. *Dev. Cell* **2010**, *19*, 148–159.
23. Shi, F.; Sottile, J. Caveolin-1-dependent beta1 integrin endocytosis is a critical regulator of fibronectin turnover. *J. Cell. Sci.* **2008**, *121*, 2360–2371.
24. Pellinen, T.; Arjonen, A.; Vuoriluoto, K.; Kallio, K.; Fransen, J.A.; Ivaska, J. Small GTPase Rab21 regulates cell adhesion and controls endosomal traffic of beta1-integrins. *J. Cell Biol.* **2006**, *173*, 767–780.
25. Caswell, P.T.; Chan, M.; Lindsay, A.J.; McCaffrey, M.W.; Boettiger, D.; Norman, J.C. Rab-coupling protein coordinates recycling of alpha5beta1 integrin and EGFR1 to promote cell migration in 3D microenvironments. *J. Cell Biol.* **2008**, *183*, 143–155.
26. Bridgewater, R.E.; Norman, J.C.; Caswell, P.T. Integrin trafficking at a glance. *J. Cell. Sci.* **2012**, *125*, 3695–3701.
27. Caswell, P.T.; Spence, H.J.; Parsons, M.; White, D.P.; Clark, K.; Cheng, K.W.; Mills, G.B.; Humphries, M.J.; Messent, A.J.; Anderson, K.I.; *et al.* Rab25 associates with alpha5beta1 integrin to promote invasive migration in 3D microenvironments. *Dev. Cell* **2007**, *13*, 496–510.

28. Schwartz, M.A. Integrins and extracellular matrix in mechanotransduction. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2010**, *2*, a005066.
29. Roca-Cusachs, P.; Iskratsch, T.; Sheetz, M.P. Finding the weakest link: Exploring integrin-mediated mechanical molecular pathways. *J. Cell. Sci.* **2012**, *125*, 3025–3038.
30. Roca-Cusachs, P.; Gauthier, N.C.; Del Rio, A.; Sheetz, M.P. Clustering of alpha(5)beta(1) integrins determines adhesion strength whereas alpha(v)beta(3) and talin enable mechanotransduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 16245–16250.
31. Friedland, J.C.; Lee, M.H.; Boettiger, D. Mechanically activated integrin switch controls alpha5beta1 function. *Science* **2009**, *323*, 642–644.
32. Mierke, C.T.; Frey, B.; Fellner, M.; Herrmann, M.; Fabry, B. Integrin alpha5beta1 facilitates cancer cell invasion through enhanced contractile forces. *J. Cell. Sci.* **2011**, *124*, 369–383.
33. Menon, S.; Beningo, K.A. Cancer cell invasion is enhanced by applied mechanical stimulation. *PLoS One* **2011**, *6*, e17277.
34. Yang, J.T.; Rayburn, H.; Hynes, R.O. Cell adhesion events mediated by alpha 4 integrins are essential in placental and cardiac development. *Development* **1995**, *121*, 549–560.
35. Bader, B.L.; Rayburn, H.; Crowley, D.; Hynes, R.O. Extensive vasculogenesis, angiogenesis, and organogenesis precede lethality in mice lacking all alpha v integrins. *Cell* **1998**, *95*, 507–519.
36. Carlson, T.R.; Hu, H.; Braren, R.; Kim, Y.H.; Wang, R.A. Cell-autonomous requirement for beta1 integrin in endothelial cell adhesion, migration and survival during angiogenesis in mice. *Development* **2008**, *135*, 2193–2202.
37. Yang, J.T.; Rayburn, H.; Hynes, R.O. Embryonic mesodermal defects in alpha 5 integrin-deficient mice. *Development* **1993**, *119*, 1093–1105.
38. Goh, K.L.; Yang, J.T.; Hynes, R.O. Mesodermal defects and cranial neural crest apoptosis in alpha5 integrin-null embryos. *Development* **1997**, *124*, 4309–4319.
39. George, E.L.; Georges-Labouesse, E.N.; Patel-King, R.S.; Rayburn, H.; Hynes, R.O. Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development* **1993**, *119*, 1079–1091.
40. Van der Flier, A.; Badu-Nkansah, K.; Whittaker, C.A.; Crowley, D.; Bronson, R.T.; Lacy-Hulbert, A.; Hynes, R.O. Endothelial alpha5 and alphav integrins cooperate in remodeling of the vasculature during development. *Development* **2010**, *137*, 2439–2449.
41. Li, L.; Welser-Alves, J.; van der Flier, A.; Boroujerdi, A.; Hynes, R.O.; Milner, R. An angiogenic role for the alpha5beta1 integrin in promoting endothelial cell proliferation during cerebral hypoxia. *Exp. Neurol.* **2012**, *237*, 46–54.
42. Sudhakar, A.; Sugimoto, H.; Yang, C.; Lively, J.; Zeisberg, M.; Kalluri, R. Human tumstatin and human endostatin exhibit distinct antiangiogenic activities mediated by alpha v beta 3 and alpha 5 beta 1 integrins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 4766–4771.
43. Orecchia, A.; Lacal, P.M.; Schietroma, C.; Morea, V.; Zambruno, G.; Failla, C.M. Vascular endothelial growth factor receptor-1 is deposited in the extracellular matrix by endothelial cells and is a ligand for the alpha 5 beta 1 integrin. *J. Cell. Sci.* **2003**, *116*, 3479–3489.
44. Felcht, M.; Luck, R.; Schering, A.; Seidel, P.; Srivastava, K.; Hu, J.; Bartol, A.; Kienast, Y.; Vettel, C.; Loos, E.K.; *et al.* Angiopoietin-2 differentially regulates angiogenesis through TIE2 and integrin signaling. *J. Clin. Invest.* **2012**, *122*, 1991–2005.

45. Kim, S.; Bell, K.; Mousa, S.A.; Varner, J.A. Regulation of angiogenesis *in vivo* by ligation of integrin alpha5beta1 with the central cell-binding domain of fibronectin. *Am. J. Pathol.* **2000**, *156*, 1345–1362.
46. Magnussen, A.; Kasman, I.M.; Norberg, S.; Baluk, P.; Murray, R.; McDonald, D.M. Rapid access of antibodies to alpha5beta1 integrin overexpressed on the luminal surface of tumor blood vessels. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 2712–2721.
47. Zhang, H.; Li, C.; Baciu, P.C. Expression of integrins and MMPs during alkaline-burn-induced corneal angiogenesis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2002**, *43*, 955–962.
48. Bussolati, B.; Deambrosi, I.; Russo, S.; Deregibus, M.C.; Camussi, G. Altered angiogenesis and survival in human tumor-derived endothelial cells. *FASEB J.* **2003**, *17*, 1159–1161.
49. Parsons-Wingerter, P.; Kasman, I.M.; Norberg, S.; Magnussen, A.; Zanivan, S.; Rissone, A.; Baluk, P.; Favre, C.J.; Jeffry, U.; Murray, R.; *et al.* Uniform overexpression and rapid accessibility of alpha5beta1 integrin on blood vessels in tumors. *Am. J. Pathol.* **2005**, *167*, 193–211.
50. Klein, S.; de Fougerolles, A.R.; Blaikie, P.; Khan, L.; Pepe, A.; Green, C.D.; Koteliansky, V.; Giancotti, F.G. Alpha 5 beta 1 integrin activates an NF-kappa B-dependent program of gene expression important for angiogenesis and inflammation. *Mol. Cell. Biol.* **2002**, *22*, 5912–5922.
51. Kim, S.; Bakre, M.; Yin, H.; Varner, J.A. Inhibition of endothelial cell survival and angiogenesis by protein kinase A. *J. Clin. Invest.* **2002**, *110*, 933–941.
52. Stupack, D.G.; Puente, X.S.; Boutsaboualoy, S.; Storgard, C.M.; Cheresh, D.A. Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins. *J. Cell. Biol.* **2001**, *155*, 459–470.
53. Bhaskar, V.; Zhang, D.; Fox, M.; Seto, P.; Wong, M.H.; Wales, P.E.; Powers, D.; Chao, D.T.; Dubridge, R.B.; Ramakrishnan, V. A function blocking anti-mouse integrin alpha5beta1 antibody inhibits angiogenesis and impedes tumor growth *in vivo*. *J. Transl. Med.* **2007**, *5*, 61.
54. Varner, J.A.; Emerson, D.A.; Juliano, R.L. Integrin alpha 5 beta 1 expression negatively regulates cell growth: Reversal by attachment to fibronectin. *Mol. Biol. Cell.* **1995**, *6*, 725–740.
55. O'Brien, V.; Frisch, S.M.; Juliano, R.L. Expression of the integrin alpha 5 subunit in HT29 colon carcinoma cells suppresses apoptosis triggered by serum deprivation. *Exp. Cell. Res.* **1996**, *224*, 208–213.
56. Schmidt, R.; Streit, M.; Kaiser, R.; Herzberg, F.; Schirner, M.; Schramm, K.; Kaufmann, C.; Henneken, M.; Schafer-Korting, M.; Thiel, E.; *et al.* *De novo* expression of the alpha5beta1-fibronectin receptor in HT29 colon-cancer cells reduces activity of C-SRC. Increase of C-SRC activity by attachment on fibronectin. *Int. J. Cancer* **1998**, *76*, 91–98.
57. Schirner, M.; Herzberg, F.; Schmidt, R.; Streit, M.; Schonning, M.; Hummel, M.; Kaufmann, C.; Thiel, E.; Kreuser, E.D. Integrin alpha5beta1: A potent inhibitor of experimental lung metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* **1998**, *16*, 427–435.
58. Chantret, I.; Barbat, A.; Dussaulx, E.; Brattain, M.G.; Zweibaum, A. Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: A survey of twenty cell lines. *Cancer Res.* **1988**, *48*, 1936–1942.
59. Gong, J.; Wang, D.; Sun, L.; Zborowska, E.; Willson, J.K.; Brattain, M.G. Role of alpha 5 beta 1 integrin in determining malignant properties of colon carcinoma cells. *Cell Growth Differ.* **1997**, *8*, 83–90.

60. Murillo, C.A.; Rychahou, P.G.; Evers, B.M. Inhibition of alpha5 integrin decreases PI3K activation and cell adhesion of human colon cancers. *Surgery* **2004**, *136*, 143–149.
61. Toquet, C.; Colson, A.; Jarry, A.; Bezieau, S.; Volteau, C.; Boisseau, P.; Merlin, D.; Laboisse, C.L.; Mosnier, J.F. ADAM15 to alpha5beta1 integrin switch in colon carcinoma cells: A late event in cancer progression associated with tumor dedifferentiation and poor prognosis. *Int. J. Cancer* **2012**, *130*, 278–287.
62. Koike, T.; Kimura, N.; Miyazaki, K.; Yabuta, T.; Kumamoto, K.; Takenoshita, S.; Chen, J.; Kobayashi, M.; Hosokawa, M.; Taniguchi, A.; *et al.* Hypoxia induces adhesion molecules on cancer cells: A missing link between Warburg effect and induction of selectin-ligand carbohydrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 8132–8137.
63. Anderson, J.A.; Grabowska, A.M.; Watson, S.A. PTHrP increases transcriptional activity of the integrin subunit alpha5. *Br. J. Cancer* **2007**, *96*, 1394–1403.
64. Nam, E.H.; Lee, Y.; Park, Y.K.; Lee, J.W.; Kim, S. ZEB2 upregulates integrin alpha5 expression through cooperation with Sp1 to induce invasion during epithelial-mesenchymal transition of human cancer cells. *Carcinogenesis* **2012**, *33*, 563–571.
65. Reyes-Reyes, M.E.; George, M.D.; Roberts, J.D.; Akiyama, S.K. P-selectin activates integrin-mediated colon carcinoma cell adhesion to fibronectin. *Exp. Cell. Res.* **2006**, *312*, 4056–4069.
66. Camacho-Leal, P.; Zhai, A.B.; Stanners, C.P. A co-clustering model involving alpha5beta1 integrin for the biological effects of GPI-anchored human carcinoembryonic antigen (CEA). *J. Cell. Physiol.* **2007**, *211*, 791–802.
67. Dia, V.P.; Mejia, E.G. Lunasin promotes apoptosis in human colon cancer cells by mitochondrial pathway activation and induction of nuclear clusterin expression. *Cancer Lett.* **2011**, *295*, 44–53.
68. Shibata, K.; Kikkawa, F.; Nawa, A.; Suganuma, N.; Hamaguchi, M. Fibronectin secretion from human peritoneal tissue induces Mr 92,000 type IV collagenase expression and invasion in ovarian cancer cell lines. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 5416–5420.
69. Casey, R.C.; Burleson, K.M.; Skubitz, K.M.; Pambuccian, S.E.; Oegema, T.R., Jr.; Ruff, L.E.; Skubitz, A.P. Beta 1-integrins regulate the formation and adhesion of ovarian carcinoma multicellular spheroids. *Am. J. Pathol.* **2001**, *159*, 2071–2080.
70. Burleson, K.M.; Casey, R.C.; Skubitz, K.M.; Pambuccian, S.E.; Oegema, T.R., Jr.; Skubitz, A.P. Ovarian carcinoma ascites spheroids adhere to extracellular matrix components and mesothelial cell monolayers. *Gynecol. Oncol.* **2004**, *93*, 170–181.
71. Yokoyama, Y.; Ramakrishnan, S. Binding of endostatin to human ovarian cancer cells inhibits cell attachment. *Int. J. Cancer* **2007**, *121*, 2402–2409.
72. Yokoyama, Y.; Sedgewick, G.; Ramakrishnan, S. Endostatin binding to ovarian cancer cells inhibits peritoneal attachment and dissemination. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 10813–10822.
73. Dong, Y.; Tan, O.L.; Loessner, D.; Stephens, C.; Walpole, C.; Boyle, G.M.; Parsons, P.G.; Clements, J.A. Kallikrein-related peptidase 7 promotes multicellular aggregation via the alpha(5)beta(1) integrin pathway and paclitaxel chemoresistance in serous epithelial ovarian carcinoma. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 2624–2633.

74. Sawada, K.; Mitra, A.K.; Radjabi, A.R.; Bhaskar, V.; Kistner, E.O.; Tretiakova, M.; Jagadeeswaran, S.; Montag, A.; Becker, A.; Kenny, H.A.; *et al.* Loss of E-cadherin promotes ovarian cancer metastasis via alpha 5-integrin, which is a therapeutic target. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 2329–2339.
75. Li, Q.; Liu, S.; Lin, B.; Yan, L.; Wang, Y.; Wang, C.; Zhang, S. Expression and correlation of Lewis y antigen and integrins alpha5 and beta1 in ovarian serous and mucinous carcinoma. *Int. J. Gynecol. Cancer* **2010**, *20*, 1482–1489.
76. Mitra, A.K.; Sawada, K.; Tiwari, P.; Mui, K.; Gwin, K.; Lengyel, E. Ligand-independent activation of c-Met by fibronectin and alpha(5)beta(1)-integrin regulates ovarian cancer invasion and metastasis. *Oncogene* **2011**, *30*, 1566–1576.
77. Deng, B.; Zhang, S.; Miao, Y.; Han, Z.; Zhang, X.; Wen, F.; Zhang, Y. Adrenomedullin expression in epithelial ovarian cancers and promotes HO8910 cell migration associated with upregulating integrin alpha5beta1 and phosphorylating FAK and paxillin. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2012**, *31*, 19.
78. Sawada, K.; Ohyagi-Hara, C.; Kimura, T.; Morishige, K. Integrin inhibitors as a therapeutic agent for ovarian cancer. *J. Oncol.* **2012**, *2012*, 915140.
79. Seftor, R.E.; Seftor, E.A.; Sheng, S.; Pemberton, P.A.; Sager, R.; Hendrix, M.J. Maspin suppresses the invasive phenotype of human breast carcinoma. *Cancer Res.* **1998**, *58*, 5681–5685.
80. Ignatoski, K.M.; Maehama, T.; Markwart, S.M.; Dixon, J.E.; Livant, D.L.; Ethier, S.P. ERBB-2 overexpression confers PI 3' kinase-dependent invasion capacity on human mammary epithelial cells. *Br. J. Cancer* **2000**, *82*, 666–674.
81. Jia, Y.; Zeng, Z.Z.; Markwart, S.M.; Rockwood, K.F.; Ignatoski, K.M.; Ethier, S.P.; Livant, D.L. Integrin fibronectin receptors in matrix metalloproteinase-1-dependent invasion by breast cancer and mammary epithelial cells. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 8674–8681.
82. Maschler, S.; Wirl, G.; Spring, H.; Bredow, D.V.; Sordat, I.; Beug, H.; Reichmann, E. Tumor cell invasiveness correlates with changes in integrin expression and localization. *Oncogene* **2005**, *24*, 2032–2041.
83. Spangenberg, C.; Lausch, E.U.; Trost, T.M.; Prawitt, D.; May, A.; Keppler, R.; Fees, S.A.; Reutzel, D.; Bell, C.; Schmitt, S.; *et al.* ERBB2-mediated transcriptional up-regulation of the alpha5beta1 integrin fibronectin receptor promotes tumor cell survival under adverse conditions. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 3715–3725.
84. Qin, L.; Chen, X.; Wu, Y.; Feng, Z.; He, T.; Wang, L.; Liao, L.; Xu, J. Steroid receptor coactivator-1 upregulates integrin alpha(5) expression to promote breast cancer cell adhesion and migration. *Cancer Res.* **2011**, *71*, 1742–1751.
85. Baranwal, S.; Wang, Y.; Rathinam, R.; Lee, J.; Jin, L.; McGoey, R.; Pylayeva, Y.; Giancotti, F.; Blobe, G.C.; Alahari, S.K. Molecular characterization of the tumor-suppressive function of nischarin in breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **2011**, *103*, 1513–1528.
86. Wong, A.W.; Paulson, Q.X.; Hong, J.; Stubbins, R.E.; Poh, K.; Schrader, E.; Nunez, N.P. Alcohol promotes breast cancer cell invasion by regulating the Nm23-ITGA5 pathway. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2011**, *30*, 75.

87. Wu, H.; Liang, Y.L.; Li, Z.; Jin, J.; Zhang, W.; Duan, L.; Zha, X. Positive expression of E-cadherin suppresses cell adhesion to fibronectin via reduction of alpha5beta1 integrin in human breast carcinoma cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2006**, *132*, 795–803.
88. Imanishi, Y.; Hu, B.; Jarzynka, M.J.; Guo, P.; Elishaev, E.; Bar-Joseph, I.; Cheng, S.Y. Angiopoietin-2 stimulates breast cancer metastasis through the alpha(5)beta(1) integrin-mediated pathway. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 4254–4263.
89. Morozovich, G.; Kozlova, N.; Cheglakov, I.; Ushakova, N.; Berman, A. Integrin alpha5beta1 controls invasion of human breast carcinoma cells by direct and indirect modulation of MMP-2 collagenase activity. *Cell Cycle* **2009**, *8*, 2219–2225.
90. Baranwal, S.; Wang, Y.; Rathinam, R.; Lee, J.; Jin, L.; McGahey, R.; Pylayeva, Y.; Giancotti, F.; Blobe, G.C.; Alahari, S.K. Molecular characterization of the tumor-suppressive function of nischarin in breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **2011**, *103*, 1513–1528.
91. Nam, J.M.; Onodera, Y.; Bissell, M.J.; Park, C.C. Breast cancer cells in three-dimensional culture display an enhanced radioresponse after coordinate targeting of integrin alpha5beta1 and fibronectin. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 5238–5248.
92. Mythreye, K.; Knelson, E.H.; Gatzka, C.E.; Gatzka, M.L.; Blobe, G.C. TbetaRIII/beta-arrestin2 regulates integrin alpha5beta1 trafficking, function, and localization in epithelial cells. *Oncogene* **2012**, doi:10.1038/onc.2012.157.
93. Wang, Y.; Shenouda, S.; Baranwal, S.; Rathinam, R.; Jain, P.; Bao, L.; Hazari, S.; Dash, S.; Alahari, S.K. Integrin subunits alpha5 and alpha6 regulate cell cycle by modulating the chk1 and Rb/E2F pathways to affect breast cancer metastasis. *Mol. Cancer* **2011**, *10*, 84.
94. Dingemans, A.M.; van den Boogaart, V.; Vosse, B.A.; van Suylen, R.J.; Griffioen, A.W.; Thijssen, V.L. Integrin expression profiling identifies integrin alpha5 and beta1 as prognostic factors in early stage non-small cell lung cancer. *Mol. Cancer* **2010**, *9*, 152.
95. Adachi, M.; Taki, T.; Higashiyama, M.; Kohno, N.; Inufusa, H.; Miyake, M. Significance of integrin alpha5 gene expression as a prognostic factor in node-negative non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6*, 96–101.
96. Han, J.Y.; Kim, H.S.; Lee, S.H.; Park, W.S.; Lee, J.Y.; Yoo, N.J. Immunohistochemical expression of integrins and extracellular matrix proteins in non-small cell lung cancer: Correlation with lymph node metastasis. *Lung Cancer* **2003**, *41*, 65–70.
97. Lawson, M.H.; Cummings, N.M.; Rassl, D.M.; Vowler, S.L.; Wickens, M.; Howat, W.J.; Brenton, J.D.; Murphy, G.; Rintoul, R.C. Bcl-2 and beta1-integrin predict survival in a tissue microarray of small cell lung cancer. *Br. J. Cancer* **2010**, *103*, 1710–1715.
98. Roman, J.; Ritzenhaler, J.D.; Roser-Page, S.; Sun, X.; Han, S. alpha5beta1-integrin expression is essential for tumor progression in experimental lung cancer. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2010**, *43*, 684–691.
99. Han, S.; Khuri, F.R.; Roman, J. Fibronectin stimulates non-small cell lung carcinoma cell growth through activation of Akt/mammalian target of rapamycin/S6 kinase and inactivation of LKB1/AMP-activated protein kinase signal pathways. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 315–323.
100. Ritzenhaler, J.D.; Han, S.; Roman, J. Stimulation of lung carcinoma cell growth by fibronectin-integrin signalling. *Mol. Biosyst.* **2008**, *4*, 1160–1169.

101. Caccavari, F.; Valdembri, D.; Sandri, C.; Bussolino, F.; Serini, G. Integrin signaling and lung cancer. *Cell Adh. Migr.* **2009**, *4*, 124–129.
102. Sethi, T.; Rintoul, R.C.; Moore, S.M.; MacKinnon, A.C.; Salter, D.; Choo, C.; Chilvers, E.R.; Dransfield, I.; Donnelly, S.C.; Strieter, R.; Haslett, C. Extracellular matrix proteins protect small cell lung cancer cells against apoptosis: A mechanism for small cell lung cancer growth and drug resistance *in vivo*. *Nat. Med.* **1999**, *5*, 662–628.
103. Rintoul, R.C.; Sethi, T. Extracellular matrix regulation of drug resistance in small-cell lung cancer. *Clin. Sci. (Lond.)* **2002**, *102*, 417–424.
104. Buttery, R.C.; Rintoul, R.C.; Sethi, T. Small cell lung cancer: The importance of the extracellular matrix. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2004**, *36*, 1154–1160.
105. Hodkinson, P.S.; Elliott, T.; Wong, W.S.; Rintoul, R.C.; Mackinnon, A.C.; Haslett, C.; Sethi, T. ECM overrides DNA damage-induced cell cycle arrest and apoptosis in small-cell lung cancer cells through beta1 integrin-dependent activation of PI3-kinase. *Cell Death Differ.* **2006**, *13*, 1776–1788.
106. Gingras, M.C.; Roussel, E.; Bruner, J.M.; Branch, C.D.; Moser, R.P. Comparison of cell adhesion molecule expression between glioblastoma multiforme and autologous normal brain tissue. *J. Neuroimmunol.* **1995**, *57*, 143–153.
107. Riemenschneider, M.J.; Mueller, W.; Betensky, R.A.; Mohapatra, G.; Louis, D.N. *In situ* analysis of integrin and growth factor receptor signaling pathways in human glioblastomas suggests overlapping relationships with focal adhesion kinase activation. *Am. J. Pathol.* **2005**, *167*, 1379–1387.
108. Kita, D.; Takino, T.; Nakada, M.; Takahashi, T.; Yamashita, J.; Sato, H. Expression of dominant-negative form of Ets-1 suppresses fibronectin-stimulated cell adhesion and migration through down-regulation of integrin alpha5 expression in U251 glioma cell line. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 7985–7991.
109. Janouskova, H.; Maglott, A.; Leger, D.Y.; Bossert, C.; Noulet, F.; Guerin, E.; Guenot, D.; Pinel, S.; Chastagner, P.; Plenat, F.; *et al.* Integrin alpha5beta1 plays a critical role in resistance to temozolomide by interfering with the p53 pathway in high-grade glioma. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 3463–3470.
110. Cosset, E.C.; Godet, J.; Entz-Werle, N.; Guerin, E.; Guenot, D.; Froelich, S.; Bonnet, D.; Pinel, S.; Plenat, F.; Chastagner, P.; *et al.* Involvement of the TGFbeta pathway in the regulation of alpha5 beta1 integrins by caveolin-1 in human glioblastoma. *Int. J. Cancer* **2012**, *131*, 601–611.
111. Holmes, K.M.; Annala, M.; Chua, C.Y.; Dunlap, S.M.; Liu, Y.; Hugen, N.; Moore, L.M.; Cogdell, D.; Hu, L.; Nykter, M.; *et al.* Insulin-like growth factor-binding protein 2-driven glioma progression is prevented by blocking a clinically significant integrin, integrin-linked kinase, and NF-kappaB network. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 3475–3480.
112. Martin, S.; Cosset, E.C.; Terrand, J.; Maglott, A.; Takeda, K.; Dontenwill, M. Caveolin-1 regulates glioblastoma aggressiveness through the control of alpha(5)beta(1) integrin expression and modulates glioblastoma responsiveness to SJ749, an alpha(5)beta(1) integrin antagonist. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1793*, 354–367.

113. Martinkova, E.; Maglott, A.; Leger, D.Y.; Bonnet, D.; Stiborova, M.; Takeda, K.; Martin, S.; Dontenwill, M. alpha5beta1 integrin antagonists reduce chemotherapy-induced premature senescence and facilitate apoptosis in human glioblastoma cells. *Int. J. Cancer* **2010**, *127*, 1240–1248.
114. Maglott, A.; Bartik, P.; Cosgun, S.; Klotz, P.; Ronde, P.; Fuhrmann, G.; Takeda, K.; Martin, S.; Dontenwill, M. The small alpha5beta1 integrin antagonist, SJ749, reduces proliferation and clonogenicity of human astrocytoma cells. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 6002–6007.
115. Kesanakurti, D.; Chetty, C.; Dinh, D.H.; Gujrati, M.; Rao, J.S. Role of MMP-2 in the regulation of IL-6/Stat3 survival signaling via interaction with alpha5beta1 integrin in glioma. *Oncogene* **2012**, doi:10.1038/onc.2012.52.
116. Chahal, M.; Abdulkarim, B.; Xu, Y.; Guiot, M.C.; Easaw, J.C.; Stifani, N.; Sabri, S. O(6)-Methylguanine-DNA Methyltransferase Is a Novel Negative Effector of Invasion in Glioblastoma Multiforme. *Mol. Cancer Ther.* **2012**, *11*, 2440–2450.
117. Qian, F.; Zhang, Z.C.; Wu, X.F.; Li, Y.P.; Xu, Q. Interaction between integrin alpha(5) and fibronectin is required for metastasis of B16F10 melanoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *333*, 1269–1275.
118. McKenzie, J.A.; Liu, T.; Goodson, A.G.; Grossman, D. Survivin enhances motility of melanoma cells by supporting Akt activation and {alpha}5 integrin upregulation. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 7927–7937.
119. Arpaia, E.; Blaser, H.; Quintela-Fandino, M.; Duncan, G.; Leong, H.S.; Ablack, A.; Nambiar, S.C.; Lind, E.F.; Silvester, J.; Fleming, C.K.; *et al.* The interaction between caveolin-1 and Rho-GTPases promotes metastasis by controlling the expression of alpha5-integrin and the activation of Src, Ras and Erk. *Oncogene* **2012**, *31*, 884–896.
120. Beliveau, A.; Berube, M.; Rousseau, A.; Pelletier, G.; Guerin, S.L. Expression of integrin alpha5beta1 and MMPs associated with epithelioid morphology and malignancy of uveal melanoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2000**, *41*, 2363–2372.
121. Beliveau, A.; Berube, M.; Carrier, P.; Mercier, C.; Guerin, S.L. Tumorigenicity of the mixed spindle-epithelioid SP6.5 and epithelioid TP17 uveal melanoma cell lines is differentially related to alpha5beta1 integrin expression. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2001**, *42*, 3058–3065.
122. Landreville, S.; Vigneault, F.; Bergeron, M.A.; Leclerc, S.; Gaudreault, M.; Morcos, M.; Mouriaux, F.; Salesse, C.; Guerin, S.L. Suppression of alpha5 gene expression is closely related to the tumorigenic properties of uveal melanoma cell lines. *Pigment. Cell Melanoma Res.* **2011**, *24*, 643–655.
123. Ramakrishnan, V.; Bhaskar, V.; Law, D.A.; Wong, M.H.; DuBridge, R.B.; Breinberg, D.; O'Hara, C.; Powers, D.B.; Liu, G.; Grove, J.; *et al.* Preclinical evaluation of an anti-alpha5beta1 integrin antibody as a novel anti-angiogenic agent. *J. Exp. Ther. Oncol.* **2006**, *5*, 273–286.
124. Bhaskar, V.; Fox, M.; Breinberg, D.; Wong, M.H.; Wales, P.E.; Rhodes, S.; DuBridge, R.B.; Ramakrishnan, V. Volociximab, a chimeric integrin alpha5beta1 antibody, inhibits the growth of VX2 tumors in rabbits. *Invest. New Drugs* **2008**, *26*, 7–12.
125. Almokadem, S.; Belani, C.P. Volociximab in cancer. *Expert Opin. Biol. Ther.* **2011**, *12*, 251–257.

126. Besse, B.; Tsao, L.C.; Chao, D.T.; Fang, Y.; Soria, J.C.; Almokadem, S.; Belani, C.P. Phase Ib safety and pharmacokinetic study of volociximab, an anti-alpha5beta1 integrin antibody, in combination with carboplatin and paclitaxel in advanced non-small-cell lung cancer. *Ann. Oncol.* **2012**, doi:10.1093/annonc/mds281.
127. Ricart, A.D.; Tolcher, A.W.; Liu, G.; Holen, K.; Schwartz, G.; Albertini, M.; Weiss, G.; Yazji, S.; Ng, C.; Wilding, G. Volociximab, a chimeric monoclonal antibody that specifically binds alpha5beta1 integrin: A phase I, pharmacokinetic, and biological correlative study. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 7924–7929.
128. Bell-McGuinn, K.M.; Matthews, C.M.; Ho, S.N.; Barve, M.; Gilbert, L.; Penson, R.T.; Lengyel, E.; Palaparthi, R.; Gilder, K.; Vassos, A.; *et al.* A phase II, single-arm study of the anti-alpha5beta1 integrin antibody volociximab as monotherapy in patients with platinum-resistant advanced epithelial ovarian or primary peritoneal cancer. *Gynecol. Oncol.* **2011**, *121*, 273–279.
129. Yazji, S.; Bukowski, R.; Kondagunta, V.; Figlin R. Final results from phase II study of volociximab, an  $\alpha 5\beta 1$  anti-integrin antibody, in refractory or relapsed metastatic clear cell renal cell carcinoma (mCCRCC). *J. Clin. Oncol.* **2007**, *25*, Abstract 5094.
130. Li, G.; Zhang, L.; Chen, E.; Wang, J.; Jiang, X.; Chen, J.H.; Wickman, G.; Amundson, K.; Bergqvist, S.; Zobel, J.; *et al.* Dual functional monoclonal antibody PF-04605412 targets integrin alpha5beta1 and elicits potent antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 10243–10254.
131. Smallheer, J.M.; Weigelt, C.A.; Woerner, F.J.; Wells, J.S.; Daneker, W.F.; Mousa, S.A.; Wexler, R.R.; Jadhav, P.K. Synthesis and biological evaluation of nonpeptide integrin antagonists containing spirocyclic scaffolds. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 383–387.
132. Marinelli, L.; Meyer, A.; Heckmann, D.; Lavecchia, A.; Novellino, E.; Kessler, H. Ligand binding analysis for human alpha5beta1 integrin: Strategies for designing new alpha5beta1 integrin antagonists. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4204–4207.
133. Heckmann, D.; Meyer, A.; Marinelli, L.; Zahn, G.; Stragies, R.; Kessler, H. Probing integrin selectivity: Rational design of highly active and selective ligands for the alpha5beta1 and alphavbeta3 integrin receptor. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2007**, *46*, 3571–3574.
134. Heckmann, D.; Meyer, A.; Laufer, B.; Zahn, G.; Stragies, R.; Kessler, H. Rational design of highly active and selective ligands for the alpha5beta1 integrin receptor. *Chembiochem* **2008**, *9*, 1397–1407.
135. Meyer, A.; Auernheimer, J.; Modlinger, A.; Kessler, H. Targeting RGD recognizing integrins: Drug development, biomaterial research, tumor imaging and targeting. *Curr. Pharm. Des.* **2006**, *12*, 2723–2747.
136. Stragies, R.; Osterkamp, F.; Zischinsky, G.; Vossmeyer, D.; Kalkhof, H.; Reimer, U.; Zahn, G. Design and synthesis of a new class of selective integrin alpha5beta1 antagonists. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 3786–3794.
137. Umeda, N.; Kachi, S.; Akiyama, H.; Zahn, G.; Vossmeyer, D.; Stragies, R.; Campochiaro, P.A. Suppression and regression of choroidal neovascularization by systemic administration of an alpha5beta1 integrin antagonist. *Mol. Pharmacol.* **2006**, *69*, 1820–1828.

138. Muether, P.S.; Dell, S.; Kociok, N.; Zahn, G.; Stragies, R.; Vossmeyer, D.; Joussen, A.M. The role of integrin alpha5beta1 in the regulation of corneal neovascularization. *Exp. Eye Res.* **2007**, *85*, 356–365.
139. Zahn, G.; Vossmeyer, D.; Stragies, R.; Wills, M.; Wong, C.G.; Loffler, K.U.; Adamis, A.P.; Knolle, J. Preclinical evaluation of the novel small-molecule integrin alpha5beta1 inhibitor JSM6427 in monkey and rabbit models of choroidal neovascularization. *Arch. Ophthalmol.* **2009**, *127*, 1329–1335.
140. Zahn, G.; Volk, K.; Lewis, G.P.; Vossmeyer, D.; Stragies, R.; Heier, J.S.; Daniel, P.E., Jr.; Adamis, A.P.; Chapin, E.A.; Fisher, S.K.; *et al.* Assessment of the integrin alpha5beta1 antagonist JSM6427 in proliferative vitreoretinopathy using *in vitro* assays and a rabbit model of retinal detachment. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2010**, *51*, 1028–1035.
141. Okazaki, T.; Ni, A.; Ayeni, O.A.; Baluk, P.; Yao, L.C.; Vossmeyer, D.; Zischinsky, G.; Zahn, G.; Knolle, J.; Christner, C.; McDonald, D.M. alpha5beta1 Integrin blockade inhibits lymphangiogenesis in airway inflammation. *Am. J. Pathol.* **2009**, *174*, 2378–2387.
142. Zischinsky, G.; Osterkamp, F.; Vossmeyer, D.; Zahn, G.; Scharn, D.; Zwintscher, A.; Stragies, R. SAR of *N*-phenyl piperidine based oral integrin alpha5beta1 antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 65–68.
143. Zischinsky, G.; Osterkamp, F.; Vossmeyer, D.; Zahn, G.; Scharn, D.; Zwintscher, A.; Stragies, R. Discovery of orally available integrin alpha5beta1 antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 380–382.
144. Delouvrie, B.; Al-Kadhimi, K.; Arnould, J.C.; Barry, S.T.; Cross, D.A.; Didelot, M.; Gavine, P.R.; Germain, H.; Harris, C.S.; Hughes, A.M.; *et al.* Structure-activity relationship of a series of non peptidic RGD integrin antagonists targeting alpha5beta1: Part 1. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 4111–4116.
145. Delouvrie, B.; Al-Kadhimi, K.; Arnould, J.C.; Barry, S.T.; Cross, D.A.; Didelot, M.; Gavine, P.R.; Germain, H.; Harris, C.S.; Hughes, A.M.; *et al.* Structure-activity relationship of a series of non peptidic RGD integrin antagonists targeting alpha5beta1: Part 2. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 4117–4121.
146. Livant, D.L.; Brabec, R.K.; Pienta, K.J.; Allen, D.L.; Kurachi, K.; Markwart, S.; Upadhyaya, A. Anti-invasive, antitumorigenic, and antimetastatic activities of the PHSCN sequence in prostate carcinoma. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 309–320.
147. Livant, D.L.; Brabec, R.K.; Kurachi, K.; Allen, D.L.; Wu, Y.; Haaseth, R.; Andrews, P.; Ethier, S.P.; Markwart, S. The PHSRN sequence induces extracellular matrix invasion and accelerates wound healing in obese diabetic mice. *J. Clin. Invest.* **2000**, *105*, 1537–1545.
148. Zeng, Z.Z.; Yao, H.; Staszewski, E.D.; Rockwood, K.F.; Markwart, S.M.; Fay, K.S.; Spalding, A.C.; Livant, D.L. alpha(5)beta(1) Integrin Ligand PHSRN Induces Invasion and alpha(5) mRNA in Endothelial Cells to Stimulate Angiogenesis. *Transl. Oncol.* **2009**, *2*, 8–20.
149. Van Golen, K.L.; Bao, L.; Brewer, G.J.; Pienta, K.J.; Kamradt, J.M.; Livant, D.L.; Merajver, S.D. Suppression of tumor recurrence and metastasis by a combination of the PHSCN sequence and the antiangiogenic compound tetrathiomolybdate in prostate carcinoma. *Neoplasia* **2002**, *4*, 373–379.

150. Stoeltzing, O.; Liu, W.; Reinmuth, N.; Fan, F.; Parry, G.C.; Parikh, A.A.; McCarty, M.F.; Bucana, C.D.; Mazar, A.P.; Ellis, L.M. Inhibition of integrin alpha5beta1 function with a small peptide (ATN-161) plus continuous 5-FU infusion reduces colorectal liver metastases and improves survival in mice. *Int. J. Cancer* **2003**, *104*, 496–503.
151. Khalili, P.; Arakelian, A.; Chen, G.; Plunkett, M.L.; Beck, I.; Parry, G.C.; Donate, F.; Shaw, D.E.; Mazar, A.P.; Rabbani, S.A. A non-RGD-based integrin binding peptide (ATN-161) blocks breast cancer growth and metastasis *in vivo*. *Mol. Cancer Ther.* **2006**, *5*, 2271–2280.
152. Wang, W.; Wang, F.; Lu, F.; Xu, S.; Hu, W.; Huang, J.; Gu, Q.; Sun, X. The antiangiogenic effects of integrin alpha5beta1 inhibitor (ATN-161) *in vitro* and *in vivo*. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2011**, *52*, 7213–7220.
153. Cianfrocca, M.E.; Kimmel, K.A.; Gallo, J.; Cardoso, T.; Brown, M.M.; Hudes, G.; Lewis, N.; Weiner, L.; Lam, G.N.; Brown, S.C.; *et al.* Phase 1 trial of the antiangiogenic peptide ATN-161 (Ac-PHSCN-NH(2)), a beta integrin antagonist, in patients with solid tumours. *Br. J. Cancer* **2006**, *94*, 1621–1626.
154. Yao, H.; Veine, D.M.; Zeng, Z.Z.; Fay, K.S.; Staszewski, E.D.; Livant, D.L. Increased potency of the PHSCN dendrimer as an inhibitor of human prostate cancer cell invasion, extravasation, and lung colony formation. *Clin. Exp. Metastasis* **2010**, *27*, 173–184.
155. Yao, H.; Veine, D.M.; Fay, K.S.; Staszewski, E.D.; Zeng, Z.Z.; Livant, D.L. The PHSCN dendrimer as a more potent inhibitor of human breast cancer cell invasion, extravasation, and lung colony formation. *Breast Cancer Res. Treat.* **2011**, *125*, 363–175.

© 2013 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).





## Activation of p53 pathway by Nutlin-3a inhibits the expression of the therapeutic target $\alpha 5$ integrin in colon cancer cells



Hana Janouskova <sup>a,b</sup>, Anne-Marie Ray <sup>a</sup>, Fanny Noulet <sup>a</sup>, Isabelle Lelong-Rebel <sup>a</sup>, Laurence Choulier <sup>a</sup>, Florence Schaffner <sup>a</sup>, Maxime Lehmann <sup>a</sup>, Sophie Martin <sup>a</sup>, Jan Teisinger <sup>b</sup>, Monique Dontenwill <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> UMR7213 CNRS, Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, Illkirch, France

<sup>b</sup> Institute of Physiology, Academy of Sciences, Prague, Czech Republic

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 5 November 2012

Received in revised form 1 March 2013

Accepted 15 March 2013

#### Keywords:

Colon cancer

Integrin  $\alpha 5\beta 1$

p53

Nutlin-3a

RITA

### ABSTRACT

Integrins emerge nowadays as crucial actors of tumor aggressiveness and resistance to therapies. Integrin  $\alpha 5\beta 1$ , the fibronectin receptor, determines malignant properties of colon carcinoma which is one of the most important causes of cancer-related deaths in the world. Here we show that inhibition of  $\alpha 5$  integrin subunit expression by siRNA or  $\alpha 5\beta 1$  integrin function by specific antagonist affects the survival of HCT116 colon cancer cells. We also evidence that pharmacological reactivation of the tumor suppressor p53 by Nutlin-3a inhibits specifically the expression of the  $\alpha 5$  integrin subunit both at the transcriptional and protein level. Inversely repression of  $\alpha 5$  integrin modulates p53 activity. A clear relationship between p53 activation by Nutlin-3a,  $\alpha 5$  repression and cell survival is shown. No such effects are obtained in cells lacking p53 or when another non-genotoxic activator of p53, RITA, is used. Our results emphasize the crucial role of  $\alpha 5\beta 1$  integrin in colon tumors. Data also suggest that interfering with the integrin  $\alpha 5\beta 1$  through the reactivation of p53 by Nutlin-3a may be of valuable interest as a new therapeutic option for colon tumors expressing high level of the integrin and a wild type p53.

© 2013 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Colorectal cancer is the third and second most common cancer in males and females, respectively. This progressive disease arises from genetic/epigenetic changes in adenoma considered as premalignant lesion. Most deaths by colon cancer are due to their systemic dissemination and metastasis to lung and liver rather than from the primary tumor which may be eradicated by surgery and standard chemotherapy including 5-FU and oxaliplatin [1]. Cell adherence, migration and motility are key characteristics of metastatic cancer and involve families of proteins such as integrins.

Integrins are transmembrane  $\alpha\beta$  heterodimeric proteins regulating fundamental processes often dysregulated in tumoral processes. They link cells to the surrounding extracellular matrix (ECM) and modulate numerous signaling pathways implicated in proliferation/survival, migration, invasion and differentiation [2]. Integrins are also involved in tumor resistance to therapies [2]. In colon tumor cells, altered expression of ECM-binding integrins during tumor progression has been observed since several years [3,4]. In particular,  $\alpha 5\beta 1$  integrin, the fibronectin receptor,

determines malignant properties of colon carcinoma cells. Highly invasive colon cell lines (such as HCT116 cells) were shown to express higher levels of  $\alpha 5\beta 1$  integrin mRNA and protein compared to poorly invasive cells [5]. Recently, it was shown that transcription of  $\alpha 5\beta 1$  integrin increased during colon tumor progression either in association with a loss of ADAM15 [6] or under hypoxic conditions [7]. Transcriptional upregulation of  $\alpha 5\beta 1$  integrin can also be triggered by PTHrP [8] or ZEB2 through cooperation with SP1 [9]. Increase in  $\alpha 5\beta 1$  integrin expression enhances cell adhesion to fibronectin expressed by stromal elements which in turn participates to cell dissemination and metastasis.

Blockade of cell surface  $\alpha 5$  integrin by specific antibodies lead to a decrease in  $\alpha 5$  expression and colon cancer cell adhesion, to PI3K/AKT pathway downregulation and to apoptosis induction [10]. Inhibition of  $\alpha 5\beta 1$  integrin function with a small peptide (ATN161) sensitized colon tumors to 5-FU while reducing liver metastases and improving mice survival [11]. Lunasin, a naturally occurring peptide isolated from soybean, inhibits human colon cancer liver metastasis by direct binding to  $\alpha 5\beta 1$  integrin and impairment of integrin signaling. Lunasin also potentiates the effect of oxaliplatin in preventing the outgrowth of metastasis [12]. Taken together, these findings suggest that  $\alpha 5\beta 1$  integrin can be considered as a therapeutic target in colon cancer. Therefore blocking  $\alpha 5\beta 1$  integrin expression and functions may be an

\* Corresponding author. Address: UMR7213 CNRS, LBP, Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, 67401 Illkirch, France. Tel.: +33 368854267; fax: +33 368854313.

E-mail address: [monique.dontenwill@unistra.fr](mailto:monique.dontenwill@unistra.fr) (M. Dontenwill).

interesting adjuvant treatment to enhance chemotherapeutic agent effects.

The TP53 tumor suppressor gene encodes the transcription factor p53, which is activated by several cellular stresses including DNA damage. Activated p53 participates in a program that includes cell cycle arrest, DNA repair, apoptosis, senescence, or autophagy [13]. Loss of p53 function is a critical event in tumorigenesis and resistance to therapies. Inactivating TP53 mutations are found in about 29% of colorectal cancers but were not associated with poor survival in colon cancer [14] to the exception of patients with Dukes' stage D tumors [15]. Functional wild type p53 is often inactivated by altered upstream pathways [16]. The pharmacological reactivation of p53 appeared these last years as an effective therapeutic strategy in different tumors [17,18]. Mdm2 is the main regulator of p53 by binding and targeting p53 to ubiquitin-dependent proteolysis. Modulating p53 by mdm2 inhibitors, such as Nutlin-3a, has been successfully used to promote growth arrest in mouse colon tumors and human colon cancer cells [19]. Nutlin-3a enhances TRAIL-induced apoptosis through upregulation of death receptor DR5 in human colon cancer cell HCT116 [20].

We have previously reported that Nutlin-3a decreases  $\alpha 5\beta 1$  integrin expression in glioma cell lines through p53 activation [21]. In this work, we extend these findings to a colon cancer cell line and we show that (1)  $\alpha 5\beta 1$  integrin is a survival factor independently of p53 status and (2) that reactivation of a functional p53 by Nutlin-3a modulates selectively the expression of the  $\alpha 5$  subunit. These results may have therapeutic implications in the management of colon cancer.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents

Nutlin-3a (4-[4,5-bis-(4-chlorophenyl)-2-(2-isopropoxy-4-methoxy-phenyl)-4,5-dihydro-imidazole-1-carbonyl]-piperazin-2-one) and RITA (5,5'-(2,5-furandiyi)bis-2-thiophenemethanol) were from Cayman chemical company (Interchim, France). The compound K34c (2-(S)-2,6 dimethylbenzamido)-3-[4-(3-pyridin-2-ylaminoproxy)-phenyl]propionic acid was synthesized in our laboratory according to the procedure described by Heckmann et al. [22]. Purified human fibronectin was a kind gift from Dr. F. Carreiras (Cergy-Pontoise, France).

Nutlin-3a and RITA were prepared as 10 mM stock solution in ethanol and were kept at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use. K34c was prepared as 10 mM stock solution in DMSO and kept at  $4^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2. Cell lines and culture conditions

HCT116 p53 $^{+/+}$  (p53 wild type) and HCT116 p53 $^{-/-}$  (p53 null) cells were a kind gift from Pr. Vogelstein (Baltimore, USA). Cell lines were routinely grown in Eagle's MEM supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 0.6 mg/ml, glutamine and 200 IU/ml penicillin/streptomycin. Cell cultures were maintained in a water saturated atmosphere at  $37^{\circ}\text{C}$  under 5%  $\text{CO}_2$ /95% air. All experiments were performed in 2% FBS containing EMEM medium unless specified.

### 2.3. Cell transfections

Specific siRNA for human  $\alpha 5$  and  $\beta 1$  integrin subunits, p53 and non targeting siRNA were obtained from Dharmacon (Thermo Scientific) and the transfection reagent jetPRIME™ was purchased from Polyplus Transfection. Manufacturer's instructions were followed to transiently inhibit the expression of the different proteins in HCT116 p53 $^{+/+}$  and HCT116 p53 $^{-/-}$  cells. The transfection efficacy was verified by immunoblotting. HCT116 p53 $^{-/-}$  cells were similarly transiently transfected with empty pcDNA3.1 plasmid or p53wt gene-containing pcDNA3.1. The pcDNA3.1-p53 vector was a kind gift from Dr. C. Blattner (Karlsruhe, Germany).

### 2.4. Clonogenic assay

Cells were plated (500 cells/well) into six-well culture plates either uncoated or coated with human fibronectin (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and treated for 72 h with specific drugs or solvents in 2% FBS containing medium. Medium was thereafter renewed with fresh 10% FBS containing medium and cells allowed to grow further for 7 days. Colonies were fixed and stained with crystal violet/ethanol (0.1%, w/v) and counted. The surviving fraction was determined by the ratio of cells surviving to a specific drug treatment relative to their solvent-treated counterparts.

### 2.5. Western blotting

Cells were lysed with Laemmli sample buffer (Biorad) on ice and lysates were heated at  $90^{\circ}\text{C}$  for 10 min. Samples were loaded and run on precast 10% SDS PAGE gels (Biorad) and transferred to PVDF membranes (GE Healthcare). After blocking for 1 h at room temperature, the blots were incubated overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  with specific primary antibodies. Primary antibodies used were anti- $\alpha 5$  integrin H104 1/1000 (Santa Cruz), anti- $\beta 1$  integrin Ab1952 1/1000 (Millipore), anti-p53 1/1000 (BD Biosciences) and anti-GAPDH 1/50,000 (Millipore). Membranes were subsequently incubated with a secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase 1/10,000 (Promega) and developed using a chemiluminescent (ECL) detection system followed by exposure to CL-Xposure films (Kodak). Quantification was done using ImageJ software. GAPDH was used as housekeeping protein to serve as the loading control for cell lysate samples.

### 2.6. Real-time quantitative PCR

RNA was extracted with RNeasy minikit from Qiagen according to manufacturer's instructions and was transcribed into cDNA using high capacity cDNA kit (Applied Biosystems). Real-time quantitative PCR were performed using the ABI7000 SYBRGreen PCR detector with the following probes (Invitrogen):

```

cyclophilin forward 5'-CAGGTCTGGCATCTTGCC-3'
and reverse 5'-TTGCTGCTTGGCATCTTCT-3'
p21 forward 5'GGCACCCAGCATGACAGATT3' and reverse
5'GTGGGGGATTAGGGCT3';
mdm2 forward 5'AGACCTGGTTAGACAA3' and reverse
5'TGCCCAAGATAAAAAGAACCTCT3';
fas forward 5'CCTCTTACCTCTGGTTCTTACAG3' and reverse
5'ACTCTCTCAATTCAATCCCT3';
 $\alpha 5$  forward 5'TGCTGACTCCATTGGTTACAG3' and reverse
5'TCTCTCTGCAATCTCTGAGC3';
 $\alpha 5$  forward 5'AGGTGCTTACGAAGCTGAGC3' and reverse
5'AAGGCTCATTGTTGGACA3';
 $\beta 1$  forward 5'TGTAACCAACCGTAGCAAAGGA3' and reverse
5'CCCTGATCTTAAATCGCAAAC3'.

```

Relative levels of mRNA gene expression were calculated using the  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  method.

### 2.7. Immunofluorescence

Cells (20,000/dish) were seeded onto IBIDI µ-dishes coated with 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of poly-L-lysine and treated with nutlin-3a or solvent for 24 h. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min and incubated with a blocking solution (5% BSA in PBS) for 1 h at room temperature. The cells were thereafter incubated with anti- $\alpha 5$  IIAI antibody 1/300 (BD Biosciences) for 1 h at room temperature, rinsed twice with PBS and exposed to Alexa Fluor-488 labeled goat anti-mouse secondary antibody 1/300 (Jackson ImmunoResearch Laboratories) for 1 h at room temperature followed by two washes with PBS. Cells were visualized with a fluorescent microscope (Biorad 1024) equipped with a water immersion 60 $\times$  objective. Images were acquired using the Laser-Sharp 2000 software.

### 2.8. Flow cytometry

Cells were detached with PBS/EDTA (0.53 mM) and centrifuged for 5 min at 2000 rpm. Cells (200,000) were washed (5% BSA, 0.1% Na3, TBS) and centrifuged for 5 min at 2000 rpm. The cell pellet was then incubated with a specific primary antibody at  $4^{\circ}\text{C}$  for 30 min. Primary antibodies used were 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  anti- $\alpha 5$  IIAI (BD Biosciences), and 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  anti- $\beta 1$  TS2/16 (Santa Cruz), mAB13 (BD Biosciences) and 9EG7 (BD Biosciences) respectively. The cells were rinsed three times in washing buffer and exposed to either Alexa Fluor 488 labeled goat anti-mouse 1/200 or FITC labeled goat anti-rat 1/50 secondary antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories) at  $4^{\circ}\text{C}$  for 30 min. After washing, cells were resuspended in 100  $\mu\text{l}$  of washing buffer and 200  $\mu\text{l}$  of TBS. A total of 20,000 cells were analyzed using a FACS Calibur flow cytometer (Becton–Dickinson, San Diego, CA). The mean fluorescence intensity characterizing surface expression of integrins was measured using the Cell Quest software.

### 2.9. Statistical analysis

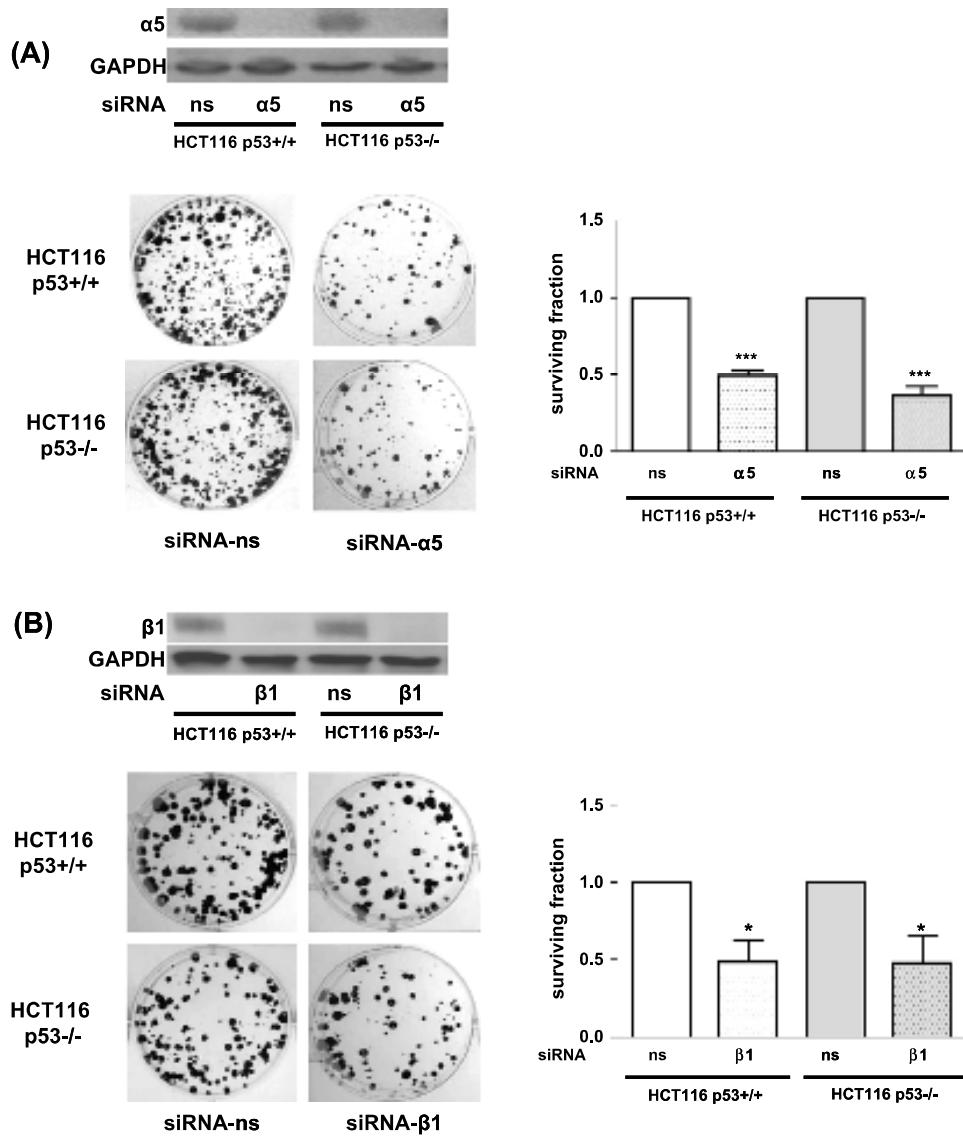
Data are represented as mean  $\pm$  SE. The values were obtained in at least three independent experiments ( $n$ ). Statistical analyses were done by the Student's  $t$  test with the GraphPad Prism program where  $p < 0.05$  was considered significant.

### 3. Results

#### 3.1. Integrin $\alpha 5\beta 1$ is involved in colon cancer cell survival

We used HCT116 colon cancer cells expressing p53 wild type protein or their isogenic counterparts with no p53 expression (respectively named HCT116 p53 $^{+/+}$  and p53 $^{-/-}$  cells). These two cell lines express similar level of  $\alpha 5$  integrin (Fig. 1A). To determine the implication of integrin  $\alpha 5\beta 1$  in colon cancer cell survival, expression of the  $\alpha 5$  subunit was decreased in HCT116 cells by using specific siRNA. 72 h after siRNA transfection,  $\alpha 5$  protein expression was decreased by about 81% with the  $\alpha 5$ -targeting

siRNA compared to the non-silencing siRNA (Fig. 1A). Long term survival assays showed that loss of  $\alpha 5$  expression led to a decrease in the number of colonies formed either by HCT116 p53 $^{+/+}$  or HCT116 p53 $^{-/-}$  cells (Fig. 1A). Similar results were obtained when  $\beta 1$  integrin subunit expression was decreased with specific siRNA (Fig. 1B). In order to confirm the impact of  $\alpha 5\beta 1$  integrin on HCT116 cell survival, we treated the cells with a specific non-peptidic small antagonist of  $\alpha 5\beta 1$  integrin, K34c [23]. K34c dose-dependently inhibited clonogenic survival at similar levels in HCT116 p53 $^{+/+}$  and p53 $^{-/-}$  cells (Fig. 1C). Data show that clonogenic potential of HCT116 cells was altered either when integrin functions were blocked by K34c or when integrin expression was



**Fig. 1.**  $\alpha 5\beta 1$  integrin promotes the cell survival of HCT116 colon carcinoma cells. (A) Upper panel: HCT116 p53 $^{+/+}$  and HCT116 p53 $^{-/-}$  cells were transfected with non-silencing siRNA (siRNA-ns) or specific siRNA targeting  $\alpha 5$  integrin (siRNA- $\alpha 5$ ). The repression of the  $\alpha 5$  subunit was verified by Western blot. GAPDH was used as the loading control. Lower panel: clonogenic survival assays were performed with transfected cells. Histograms display the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. (B) Upper panel: HCT116 p53 $^{+/+}$  and HCT116 p53 $^{-/-}$  cells were transfected with non-silencing siRNAs (siRNA-ns) or specific siRNA targeting  $\beta 1$  integrin (siRNA- $\beta 1$ ). The repression of the  $\beta 1$  subunit was verified by Western blot. GAPDH was used as the loading control. Lower panel: clonogenic survival assays were performed with transfected cells. Histograms display the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. (C) The clonogenic survival of HCT116 p53 $^{+/+}$  and HCT116 p53 $^{-/-}$  cells treated with increasing concentrations of an antagonist of  $\alpha 5\beta 1$  integrin, K34c. Histograms represent the mean  $\pm$  SEM of treated versus non-treated cells ( $n = 4$ ). \* $p < 0.05$  and \*\*\* $p < 0.005$ .

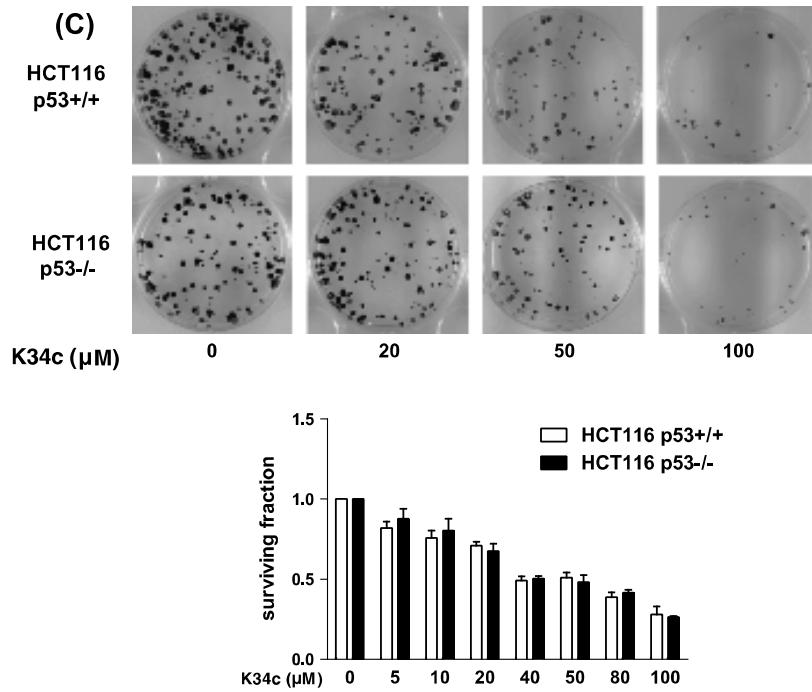


Fig. 1. (continued)

inhibited by siRNA interference. It appears that inhibition of cell survival by depletion of  $\alpha 5$  and  $\beta 1$  integrin subunits or by functional inhibition of the integrin by K34c is independent of p53 expression suggesting some p53 independent survival pathways triggered by the integrin. These results confirm that  $\alpha 5\beta 1$  integrin is a therapeutic target in colon cancer cells and suggest that treatments capable of affecting the integrin expression/function may prove to be a valuable strategy for colon carcinoma eradication.

### 3.2. Nutlin-3a, a non-genotoxic drug, represses $\alpha 5\beta 1$ integrin expression in a p53-dependent way

Nutlin-3a is known to inhibit the mdm2-p53 regulatory loop by binding to mdm2 thus impairing mdm2-dependent p53 degradation and leading to direct p53 activation. We have recently shown that activation of p53 by Nutlin-3a decreases  $\alpha 5$  integrin expression in glioma cells [21]. To investigate if activation of p53 modulates the expression of  $\alpha 5\beta 1$  integrin in colon tumor cells, we treated the HCT116 cells with Nutlin-3a. Nutlin-3a activated p53 as shown by an increased level of p53 target genes (Fig. 2A) and stabilized p53 protein (Fig. 2B) in HCT116 p53+/+ cells but not, as expected, in HCT116 p53-/- cells. Treatment of HCT116 p53+/+ cells by Nutlin-3a decreased the expression level of  $\alpha 5$  integrin subunit in a dose dependent manner, but not in p53 negative counterparts as shown by Western blot analysis of total protein extracts (Fig. 2B). Importantly, Nutlin-3a had no impact on  $\alpha 5$  in p53 null cells. This effect was specific to  $\alpha 5$  integrin since treatment with Nutlin-3a resulted in no significant effect on the  $\beta 1$  subunit protein expression (Fig. 2C).

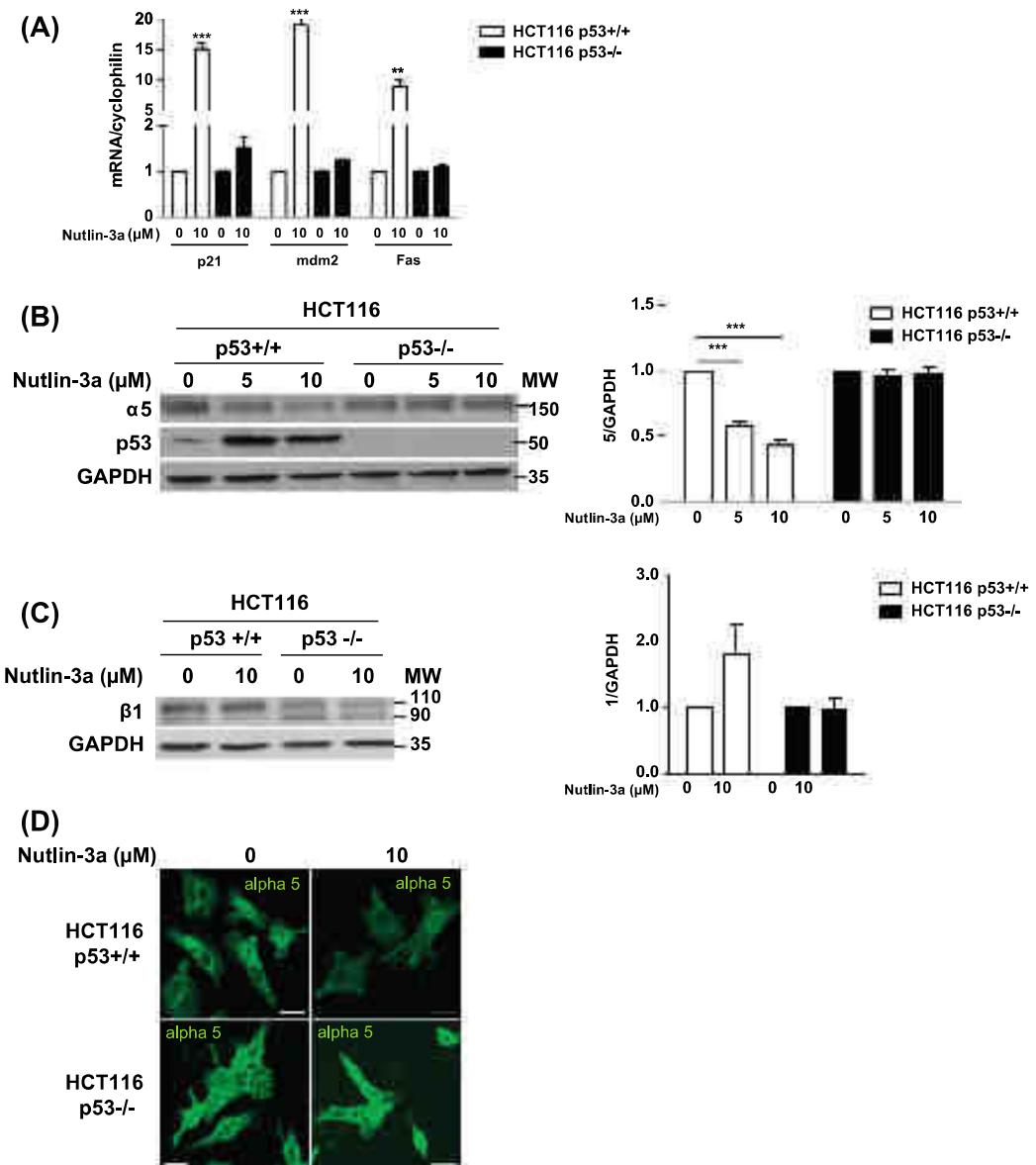
Immunofluorescence analysis of Nutlin-treated cells with specific anti- $\alpha 5$  integrin antibodies confirmed the previous Western blot data. A clear decrease of the specific labeling was observed after Nutlin-3a treatment in HCT116 p53+/+ but not in HCT116

p53-/- (Fig. 2D). To determine if functional integrin level may be affected, we analyzed the expression of  $\alpha 5\beta 1$  integrin at the cell surface by FACS analysis. As reported in Fig. 2E, cell surface expression of  $\alpha 5$  subunit was decreased after 10 μM Nutlin-3a treatment at about 55% of the control non-treated cell (MFI value) in HCT116 p53+/+ but not in HCT116 p53-/- cells. No effect on  $\beta 1$  subunit cell surface expression (recorded by TS2/16 antibodies) was observed (Fig. 2E) confirming the Western blot results. We also confirmed using different integrin conformation specific antibodies (mAb13, inactive  $\beta 1$  and 9EG7, active  $\beta 1$ ) by FACS analysis that active or inactive conformations of  $\beta 1$  subunit were insensitive to Nutlin-3A treatment in both HCT116 cell lines (Table 1).

We next investigated if Nutlin-3a affects  $\alpha 5$  subunit expression at the transcriptional level. Integrin  $\alpha 5$  mRNA was decreased in HCT116 p53+/+ cells after Nutlin-3a treatment (Fig. 2F). This effect was specific for the  $\alpha 5$  integrin subunit since neither  $\beta 1$  nor  $\alpha v$  integrin subunit mRNAs were affected by Nutlin-3a in HCT116 p53+/+ cells (Fig. 2F). Interestingly,  $\alpha 5$  and  $\beta 1$  mRNA levels were significantly increased in HCT116 p53-/- cells compared to HCT116 p53+/+ cells suggesting that p53 may exert a negative control at the transcriptional level on the two genes which does not translate to an increase in the protein levels (Fig. 2B and C). Curiously, both  $\alpha 5$  and  $\beta 1$  mRNA levels were significantly further increased after Nutlin-3a treatment in HCT116 p53-/- cells suggesting a p53-independent effect of Nutlin-3a in these cells (Fig. 2F). Taken together, these results show that a non-genotoxic p53 activator induces the down regulation at the mRNA and protein level of endogenous pro-survival  $\alpha 5$  integrin in a p53 dependent manner in colon cancer cells.

### 3.3. An inverse relationship exists between p53 and $\alpha 5$ integrin

We transfected HCT116 p53-/- cells with a plasmid containing the p53 gene to provide clearer evidences that p53 and  $\alpha 5$  integrin



**Fig. 2.** Nutlin-3a activates the expression of p53 target genes and affects the  $\alpha 5$  integrin expression in HCT116 only if p53 is functional. (A) qPCR analysis of p53 target genes p21, mdm2 and Fas in HCT116 p53+/+ and HCT116 p53-/- cells after 10  $\mu$ M of Nutlin-3a treatment for 24 h. (B) Western blot analysis of  $\alpha 5$  and p53 protein expression in HCT116 p53+/+ and HCT116 p53-/- cells after 5  $\mu$ M and 10  $\mu$ M Nutlin-3a treatment for 24 h. Histograms show the fold increase in the protein expression normalized to GAPDH levels (mean  $\pm$  SEM of 3–4 independent experiments). (C) Western blot analysis of  $\beta 1$  protein expression in HCT116 p53+/+ and HCT116 p53-/- cells treated with 10  $\mu$ M Nutlin-3a for 24 h. Histograms show the fold increase in the protein expression normalized to GAPDH levels (mean  $\pm$  SEM of three independent experiments). The anti- $\beta 1$  antibody (AB1952, Chemicon) detects two bands corresponding to the premature (90 kDa) and mature (110 kDa) proteins. Only the 110 kDa band was considered in the histograms. (D) Representative fluorescence confocal microscopy images of the  $\alpha 5$  subunit expression in the HCT116 p53+/+ and HCT116 p53-/- cells after 10  $\mu$ M of Nutlin-3a treatment for 24 h. Scale bars: 20  $\mu$ m. (E) Flow cytometry analysis of the  $\alpha 5$  (IIA1 antibody) and  $\beta 1$  (TS2/16 antibody) subunit expression at the cell membrane in HCT116 p53+/+ and HCT116 p53-/- cells after 10  $\mu$ M of Nutlin-3a treatment for 24 h. A representative experiment is shown in the figure and mean values are shown in Table 1. (F) qPCR analysis of the  $\alpha 5$ ,  $\beta 1$  and  $\alpha v$  subunits mRNA in HCT116 p53+/+ and HCT116 p53-/- cells after 10  $\mu$ M of Nutlin-3a treatment for 24 h. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, and \*\*\*p < 0.001.

expressions were linked. Expression of p53 activated the p53 target genes (Table 2) and clearly decreased the  $\alpha 5$  integrin protein level (Fig. 3A). Inversely, repression of  $\alpha 5$  integrin expression by specific siRNA, increased p53 protein level (Fig. 3B, upper panel) and activity (Fig. 3B, lower panel) in HCT116 p53+/+ cells. However, when p53 expression was decreased by specific siRNA in HCT116 p53+/+ cells, no effect on  $\alpha 5$  integrin expression was observed (Fig. 3C). These data, summarized in Table 2, suggested that expression and activation of p53 either by transfection or by Nutlin

actually affects  $\alpha 5$  integrin expression but also that knocking down p53 expression had no effect on  $\alpha 5$  integrin in our experimental conditions.

#### 3.4. Nutlin-3a dose-dependently inhibits the clonogenic survival of HCT116 cells in relation with a decrease in $\alpha 5$ integrin expression

We next investigated if the decrease in  $\alpha 5$  integrin expression observed after p53 activation by Nutlin-3a may impact cell

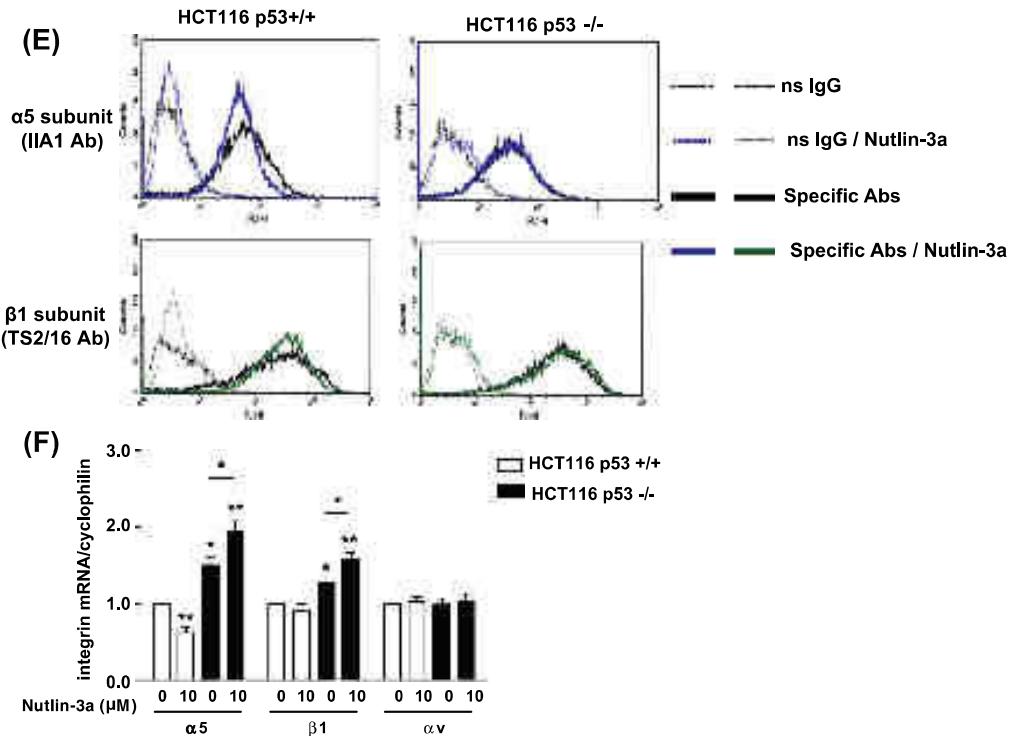


Fig. 2. (continued)

Table 1

The mean of fluorescence intensities of the  $\alpha 5$  and  $\beta 1$  integrin subunit expression at the cell membrane of HCT116 cells. Cells were treated with solvent or Nutlin-3a (10  $\mu$ M, 24 h), and processed for flow cytometry analysis with specific antibody labeling. Data report the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \* indicates a statistically significant difference between the cells treated with Nutlin-3a and the cells treated with the solvent.

Abs cells	Ig control (mouse)	Ig control (rat)	$\alpha 5$ (IIA1)	$\beta 1$ (9EG7)	$\beta 1$ (TS2/16)	$\beta 1$ (mAb13)
HCT116 p53 <sup>+/+</sup>	4.4 $\pm$ 0.6	4.2 $\pm$ 0.3	68 $\pm$ 9	47 $\pm$ 9	614 $\pm$ 206	246 $\pm$ 47
+Nutlin-3a	4.2 $\pm$ 0.5	4.1 $\pm$ 0.1	38 $\pm$ 7* ( $p = 0.05$ )	51 $\pm$ 7	631 $\pm$ 206	252 $\pm$ 53
HCT116 p53 <sup>-/-</sup>	4.4 $\pm$ 0.2	4.4 $\pm$ 0.3	60 $\pm$ 9	32 $\pm$ 2	561 $\pm$ 129	250 $\pm$ 36
+Nutlin-3a	4.8 $\pm$ 0.3	4.7 $\pm$ 0.2	64 $\pm$ 11	38 $\pm$ 5	625 $\pm$ 145	272 $\pm$ 32

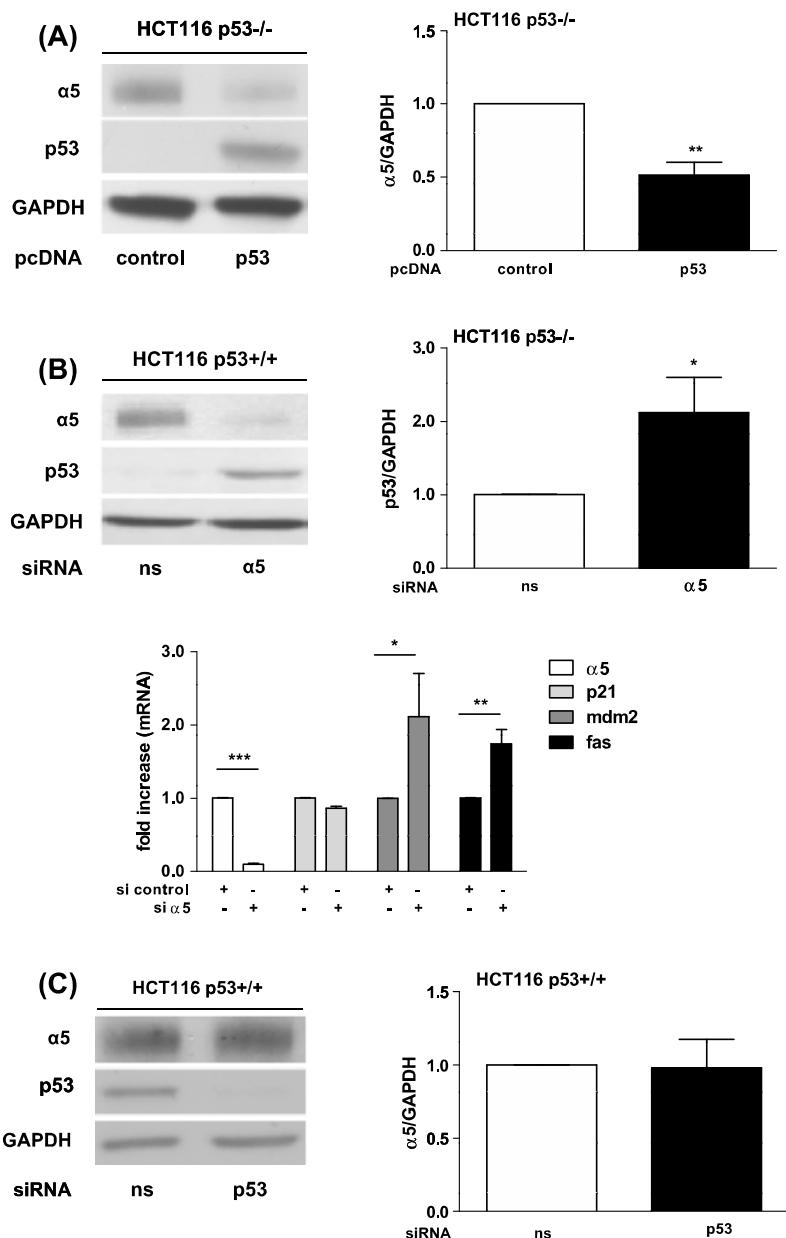
Table 2

Summary of p53 activation in the different experimental settings and effects on  $\alpha 5$  integrin mRNA and protein levels. The activity of p53 is reported as the increase in p53-target gene mRNA level (determined by qPCR). Effects on  $\alpha 5$  integrin expression were recorded in each condition at the transcriptional level (by qPCR) and at the protein level (by Western blot). Data are shown as mean SEM of three independent experiments.

p53	p53 targets				
	p21 (mRNA)	Mdm2 (mRNA)	Fas (mRNA)	$\alpha 5$ (mRNA)	$\alpha 5$ (protein)
<i>Increase</i>					
p53 <sup>-/-</sup> with p53	2.5 $\pm$ 0.3	2.1 $\pm$ 0.2	2.2 $\pm$ 0.5	0.58 $\pm$ 0.03	0.51 $\pm$ 0.08
p53 <sup>+/+</sup> with Nutlin-3a (10 $\mu$ M)	15 $\pm$ 0.8	19 $\pm$ 1.4	8.9 $\pm$ 1.2	0.62 $\pm$ 0.06	0.42 $\pm$ 0.04
p53 <sup>+/+</sup> with RITA (0.5 $\mu$ M)	2.7 $\pm$ 0.3	1.9 $\pm$ 0.4	2.8 $\pm$ 0.3	1.07 $\pm$ 0.06	0.48 $\pm$ 0.09
<i>Decrease</i>					
p53 <sup>+/+</sup> with sip53	0.36 $\pm$ 0.04	0.69 $\pm$ 0.01	0.62 $\pm$ 0.08	1.09 $\pm$ 0.04	0.97 $\pm$ 0.19
p53 <sup>-/-</sup> vs p53 <sup>+/+</sup>	0.31 $\pm$ 0.002	0.92 $\pm$ 0.04	0.47 $\pm$ 0.02	1.5 $\pm$ 0.11	1.2 $\pm$ 0.02

survival. Cells were treated with increasing concentrations of Nutlin-3a (0–10  $\mu$ M) and clonogenic survival as well as  $\alpha 5$  integrin expression were analyzed (Fig. 4). In the long term growth assay, HCT116 p53<sup>+/+</sup> cells were more sensitive to Nutlin-3a (at all concentrations used) than HCT116 p53<sup>-/-</sup> cells, as expected (Fig. 4A). For example, at the highest dose of 10  $\mu$ M, HCT116 p53<sup>+/+</sup> cell survival was decreased to 1% of the control cells whereas HCT116

p53<sup>-/-</sup> cells showed a 56% reduction of cell survival (Fig. 4A). Comitantly,  $\alpha 5$  integrin expression at the protein level was dose dependently inhibited by Nutlin-3a in HCT116 p53<sup>+/+</sup> and not in HCT116 p53<sup>-/-</sup> (Fig. 4B) suggesting a correlation between survival potential and  $\alpha 5$  expression. This is in agreement with data from Fig. 1 showing that repression of  $\alpha 5$  by siRNA decreased HCT116 cell survival. In addition, Nutlin-3a-dependent survival

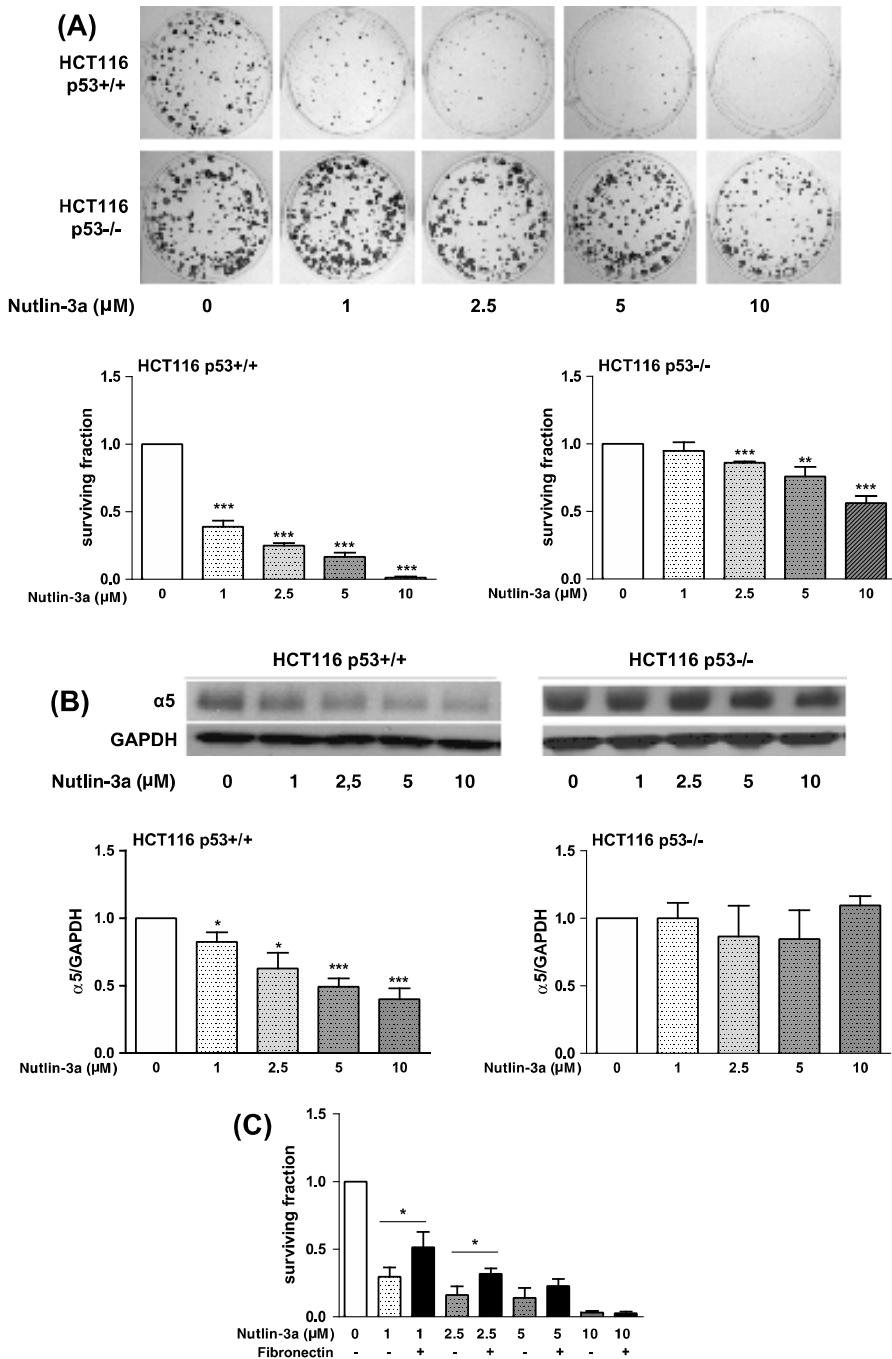


**Fig. 3.** p53 and  $\alpha 5$  integrin expressions are inversely related. (A) Western blot analysis of  $\alpha 5$  integrin and p53 proteins in HCT116 p53-/- cells transfected with empty control- (pcDNA-control) or p53 gene-containing (pcDNA-p53) vectors. GAPDH was used as the loading control. Histograms represent the fold increase in  $\alpha 5$  expression in pcDNA-p53 transfected cells compared to pcDNA-control cells ( $n = 3$ ). (B) (top) Western blot analysis of  $\alpha 5$  and p53 proteins in HCT116 p53+/+ cells transfected with non-silencing siRNA (siRNA-ns) or specific siRNA targeting  $\alpha 5$  integrin (siRNA- $\alpha 5$ ). GAPDH was used as the loading control. Histograms represent the fold increase in p53 expression in siRNA- $\alpha 5$  transfected cells compared to siRNA-ns cells. (bottom) qPCR analysis of  $\alpha 5$ , p21, mdm2, fas gene mRNA in HCT116 p53+/+ transfected with non-silencing siRNA (siRNA-ns) or specific siRNA targeting  $\alpha 5$  integrin (siRNA- $\alpha 5$ ) ( $n = 3$ ). (C) Western blot analysis of  $\alpha 5$  integrin and p53 proteins in HCT116 p53+/+ cells transfected with non-silencing siRNA (siRNA-ns) or specific siRNA targeting p53 (siRNA-p53). Histograms represent the fold increase in  $\alpha 5$  expression in siRNA-p53 transfected cells compared to siRNA-ns cells ( $n = 3$ ).

inhibition in HCT116 p53+/+ cells was decreased when  $\alpha 5\beta 1$  integrins were activated by their specific ligand fibronectin (Fig. 4C). Together, these data support that  $\alpha 5$  inhibition may be involved in the Nutlin-3a-dependent p53-mediated biological response in colon cancer cells.

### 3.5. Activation of p53 by RITA inhibits clonogenic survival but does not inhibit $\alpha 5$ expression at low concentrations

As shown previously in glioma cells [21], activation of p53 by Nutlin-3a appeared as the key event for the modulation of the  $\alpha 5$



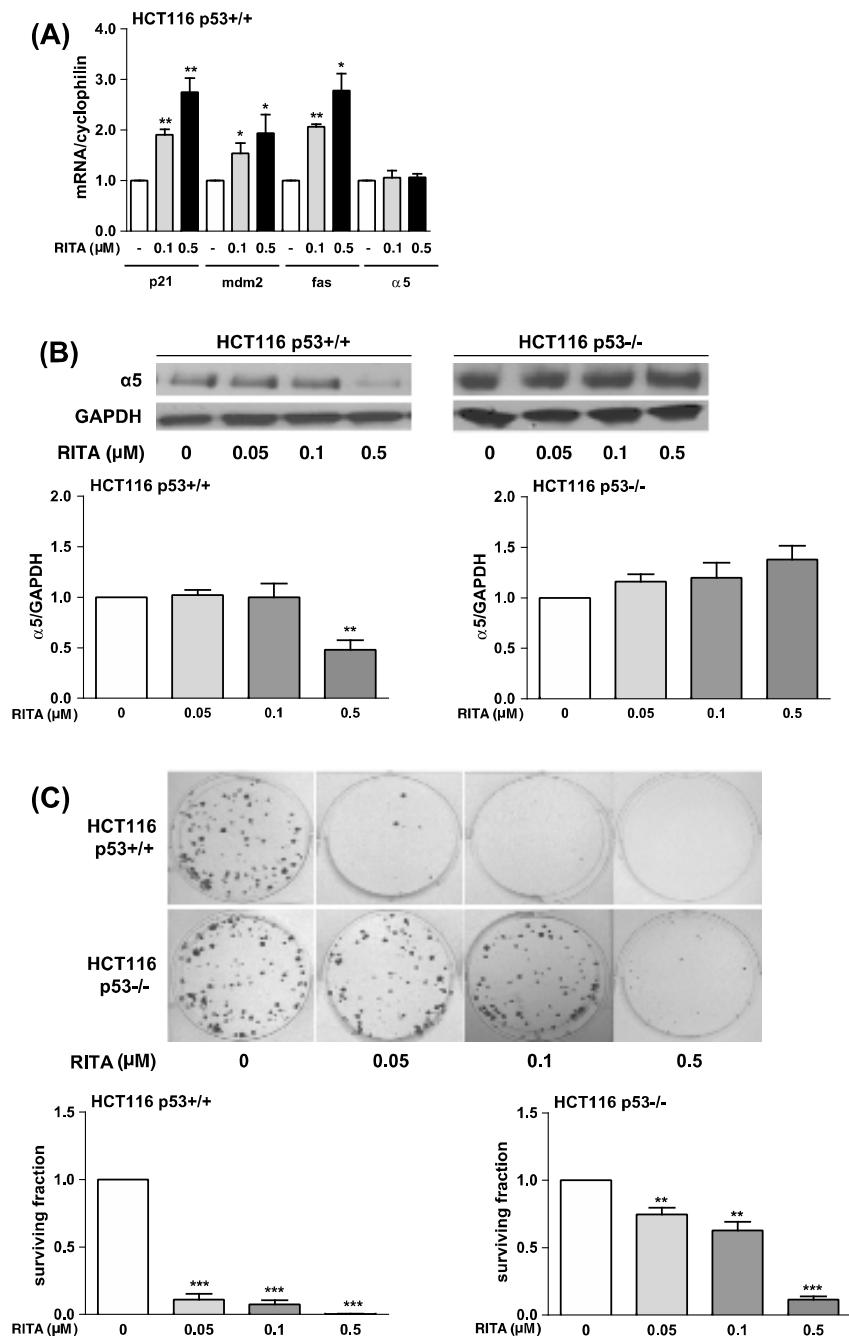
**Fig. 4.** Nutlin-3a decreases the  $\alpha 5$  subunit and reduces survival of HCT116 p53<sup>+/+</sup> cells. (A) Clonogenic survival of HCT116 p53<sup>+/+</sup> and HCT116 p53<sup>-/-</sup> cells treated with 1, 2.5, 5 and 10  $\mu$ M Nutlin-3a. Histograms represent the mean  $\pm$  SEM of four independent experiments. (B) Western blot analysis of the  $\alpha 5$  protein in HCT116 p53<sup>+/+</sup> (left) and HCT116 p53<sup>-/-</sup> (right) cells treated with 1, 2.5, 5 and 10  $\mu$ M Nutlin-3a for 24 h. Histograms show the fold decrease in the  $\alpha 5$  protein expression normalized to GAPDH levels (mean  $\pm$  SEM of four independent experiments). (C) Clonogenic survival of HCT116 p53<sup>+/+</sup> cells treated by increasing concentrations of Nutlin-3a plated either on fibronectin-coated wells or on non-coated wells. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.005$ .

integrin expression. Other p53 reactivating drugs have been described. For example, RITA, another non-genotoxic activator, binds to p53, impairs the mdm2-p53 interaction leading to p53 stabilization and activation [24]. It was already shown that p53 rescue either by Nutlin-3a or by RITA differentially affects the

transcriptional program of p53 in HCT116 cells. Nutlin-3a induced a greater fraction of p53 target genes involved in cell cycle arrest whereas induction of pro-apoptotic p53 target genes is a hallmark of RITA [25]. In order to compare Nutlin-3a and RITA on  $\alpha 5$  integrin expression level, we treated HCT116 cells with RITA. RITA, dose

dependently activated the p53 pathway in HCT116 p53<sup>+/+</sup> cells as shown by the increase in p53 target genes but without affecting the mRNA level of  $\alpha 5$  integrin (Fig. 5A). In addition, no effect on  $\alpha 5$  integrin expression was observed in either cell lines unless when the highest concentration of RITA (0.5  $\mu$ M) was used in

HCT116 p53<sup>+/+</sup> cells (Fig. 5B). Data confirm that p53 activation is required to affect  $\alpha 5$  integrin expression. However, RITA strongly inhibited the formation of HCT116 p53<sup>+/+</sup> cell colonies at all concentrations tested but was less efficient in HCT116 p53<sup>-/-</sup> cells (Fig. 5C).



**Fig. 5.** RITA activates p53 and inhibits clonogenic survival regardless of the  $\alpha 5$  expression. (A) qPCR analysis of p53 target genes (p21, mdm2 and Fas) and  $\alpha 5$  integrin in HCT116 p53<sup>+/+</sup> cells after RITA treatment (0.1 or 0.5  $\mu$ M) for 24 h. Data are shown as mean  $\pm$  SEM of three experiments. (B)  $\alpha 5$  protein expression in HCT116 p53<sup>+/+</sup> (left) and HCT116 p53<sup>-/-</sup> (right) cells after 0.05, 0.1 and 0.5  $\mu$ M RITA treatment for 24 h ( $n = 4$ ). Histograms represent  $\alpha 5$ /GAPDH fold increase in RITA treated HCT116 p53<sup>+/+</sup> (left) and HCT116 p53<sup>-/-</sup> (right) cells. (C) Clonogenic assay of HCT116 p53<sup>+/+</sup> and HCT116 p53<sup>-/-</sup> cells treated with 0.05, 0.1 and 0.5  $\mu$ M RITA ( $n = 4$ ). Histograms represent the mean  $\pm$  SEM of HCT116 p53<sup>+/+</sup> (left) and HCT116 p53<sup>-/-</sup> cell (right) surviving fraction of cells treated with RITA versus cells treated with solvent ( $n = 4$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.005$ .

We compared the respective effect of Nutlin-3a and RITA on p53 expression in HCT116 p53<sup>+/+</sup> cells. Nutlin-3a was clearly more efficient than RITA to increase the p53 expression at all concentrations tested (Fig. 6A) as well as to activate p53 target genes (Fig. 5A in comparison with Fig. 2A) in HCT116 p53<sup>+/+</sup> cells suggesting that an activation of p53 above a threshold is needed to affect  $\alpha 5$  integrin expression. To confirm this hypothesis, we evaluated the relationship between p53 (Fig. 6A) and  $\alpha 5$  integrin (Fig. 4B for Nutlin-3a and Fig. 5B for RITA) expressions. A significant inverse correlation was obtained as shown in Fig. 6B. RITA thus behaves differently than Nutlin-3a as RITA-dependent clonogenic inhibition seems unrelated to  $\alpha 5$  integrin repression at the mRNA and protein levels.

#### 4. Discussion

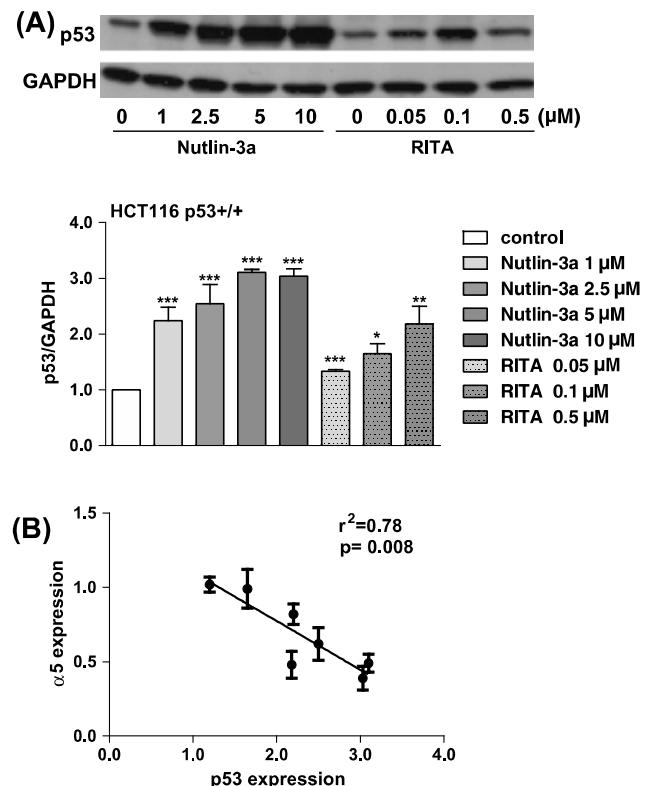
Integrins have a role in regulating proliferation, differentiation, migration, invasion, metastasis and neo-angiogenesis in tumor [2]. Due to their participation in different aspects of tumor progression, integrins appear as pertinent targets in new therapeutic schedules [26,27]. Among integrins, the fibronectin receptor, integrin  $\alpha 5\beta 1$ , is moving in the forefront of research for anticancer drugs. Its implication in tumorigenesis and resistance to treatment is increasingly recognized in various solid tumors including lung [28], ovarian [29], high grade glioma [21] and, as confirmed in this work, in colon cancer. The  $\alpha 5$  integrin subunit only dimerizes with the  $\beta 1$  subunit to form the  $\alpha 5\beta 1$  fibronectin receptor. Modulation of the  $\alpha 5$  subunit expression thus directly affects the heterodimer function.

#### 4.1. Integrin $\alpha 5\beta 1$ impacts on HCT116 cell survival

Our results show for the first time that repression of the  $\alpha 5$  subunit expression in the HCT116 cell line impacted cell survival. Functional inhibition of integrin  $\alpha 5\beta 1$  by a small non-peptidic antagonist, K34c, confirmed these data. Our results are in line with those described by Murillo et al. [10] in which blockade of  $\alpha 5$  integrin by specific antibodies decreased PI3Kinase activation and increased cell apoptosis in three colon cancer cell lines. Preferential adhesion of colon carcinoma cells to lung cells was shown to be blocked either by anti-fibronectin or by anti- $\alpha 5$  subunit specific antibodies [3]. We propose that the  $\alpha 5\beta 1$  integrin may be a pertinent therapeutic target for colon tumors and that specific integrin antagonist may control both survival and ability to form metastases of colon cancer cells. We found that direct inhibition of  $\alpha 5$  expression or function decreased cell survival independently of p53 status. These data are in line with the fact that  $\alpha 5$  integrin protects cells from apoptosis by activating the PI3K/AKT pathway even in colon cells with a non-functional p53 [30–32]. As p53-independent pathways are also implicated in the survival effect of the integrin, specific antagonists may be useful in p53wt colon tumors as well as in those expressing non-functional p53.

#### 4.2. Selective repression of $\alpha 5$ integrin subunit by Nutlin-3a-induced p53 activation

Targeted therapies have got disappointing results in the human clinic despite encouraging pre-clinical investigations.



**Fig. 6.** Comparison of p53 activation by Nutlin-3a and RITA in HCT116 p53<sup>+/+</sup> cells. (A) Representative Western blot of p53 stabilization in HCT116 p53<sup>+/+</sup> cells after Nutlin-3a and RITA treatment (increasing concentrations – 24 h). GAPDH was used as the loading control. Histograms represent the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. (B) Values of p53 expression (A) were plotted versus values of  $\alpha 5$  protein expression (from Figs. 4B and 5B), both determined by Western blot analysis. Plot shows the reverse correlation obtained between the two proteins of interest. a.u.: arbitrary units (densitometric data normalized to GAPDH levels). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.005$ .

Therapy-induced elimination of key drivers of tumor aggressiveness may be another way to eradicate tumors. Our results suggest that agents able to selectively target  $\alpha 5$  integrin subunit expression may provide novel therapeutic options for selected colon cancers. We showed recently that reactivation of p53 by non-genotoxic drugs such as Nutlin-3a affected  $\alpha 5\beta 1$  integrin expression in glioma cells [21]. We unravelled an original negative crosstalk between the integrin and p53 as we demonstrated that high level of  $\alpha 5$  subunit impaired the p53 activation [21] and conversely that integrin antagonists restored glioma cell sensitivity to chemotherapeutic drugs [23]. We extended these findings in colon cancer cells and took advantage of the availability of HCT116 cell lines expressing or not a wild type p53. Within these cells, effects directly related to p53 could be investigated in an isogenic background. As described here, Nutlin-3a treatment decreased selectively, only in HCT116 p53<sup>+/+</sup> cells, the  $\alpha 5$  subunit expression at the mRNA and protein levels without affecting the  $\beta 1$  subunit. This selective effect is reminiscent of data showing that PI3K inhibitors affected  $\alpha 5$  and not  $\beta 1$  expression in human colon cancers [10]. A direct effect of p53 on the transcription of  $\alpha 5$  gene seems unlikely as  $\alpha 5$  gene promoter lack consensus p53 response elements. However, p53 is known to interfere with the binding of other transcription factors into DNA such as Sp1 [33]. Binding of different transcription factors to the promoter of the  $\alpha 5$  gene is implicated to its transcriptional activity; Sp1, AP-1, NFI transcription factors belong to this list as well as coactivators SRC-1 and zeb2 [9,34,35]. Whether Nutlin-3a-dependent p53 activation has an impact on expression or function of these factors remains to be determined. Remarkably, repression of  $\alpha 5$  integrin subunit alone was sufficient to impact on cell survival and apoptosis (this work and [10]) and as suggested in our study this repression can be triggered in some way by p53 activation. Our results suggest that  $\alpha 5$  integrin down-regulation may be dependent on p53 activation and this decrease in turn sustains p53 activation as shown in Fig. 3B thus enhancing the Nutlin-3a effects. Thus, we demonstrate here the existence of an integrin/p53 negative loop in the HCT116 colon cancer cells; by the way, we extend this new concept from glioma [21] to other solid tumors.

#### 4.3. Differences between p53 reactivation by Nutlin-3a and RITA

In contrast to Nutlin-3a, RITA did not decrease  $\alpha 5$  expression at low concentrations but did at the highest concentration tested. This effect was only obtained in p53-expressing cells thus confirming a role of p53 in the regulation of  $\alpha 5$  expression. Intriguingly, RITA did not affect the mRNA level of  $\alpha 5$  integrin in our conditions, suggesting that transcriptional and non transcriptional mechanisms may be involved. Additionally, a less efficient induction of p53 was observed with RITA compared to Nutlin-3a even at concentrations that inhibited cell clonogenic potential. Our data suggest that p53 activation below a threshold value, as obtained with RITA, is not sufficient to affect  $\alpha 5$  integrin expression. Such a threshold mechanism has recently been proposed for p53-mediated growth arrest or apoptosis [36]. Nutlin-3a binds to mdm2 and RITA to p53 and both drugs increase p53 activity by inhibiting the mdm2-p53 axis. However, different outcomes on p53 target gene induction/repression and cell survival have been described for the two drugs. Nutlin-3a is more prone to induce cell cycle arrest whereas RITA preferentially induces apoptosis [25]. It remains to be determined whether differences in p53 induction and/or transcriptional target gene activation are implicated in the differential effects of Nutlin-3a and RITA on  $\alpha 5$  integrin repression. In line with this, although both drugs are able to repress oncogene expression, only high doses of RITA achieve oncogene repression and efficient apoptosis [37]. In our experimental conditions, Nutlin-3a and RITA at high concentrations were shown to affect the survival of cells

lacking p53. In fact, increasing amount of data point to a p53-independent role of these agents including the initiation of DNA damage response or activation of p73 and E2F1 instead of p53 by Nutlin [38,39] or enhancement of mdm2-dependent oncogene degradation by RITA [40]. In addition, it was recently shown that Nutlin-3a interacts with multiple anti-apoptotic Bcl2-family proteins which may be important for p53-independent effects of the drug [41].

#### 5. Conclusions

In conclusions, our data add new evidences supporting that  $\alpha 5\beta 1$  integrins have a crucial role in colon cancer cell survival. Targeted therapies aiming to block their function or to repress their expression may be useful to sensitize these tumors to conventional chemotherapeutic drugs as suggested by our previous data [23]. The characterization of a negative crosstalk between  $\alpha 5\beta 1$  integrin and p53 in colon cancer cells might help to guide development of more efficient drug combinations for a selected subpopulation of patients bearing tumors with a p53wt and a high expression of  $\alpha 5\beta 1$  integrin.

#### Conflict of interest

None of the authors have any conflict of interest to be disclosed regarding this study.

#### Acknowledgements

The authors thank Pr. B. Vogelstein (Baltimore, USA) for the HCT116 cell lines, Dr. C. Blattner (Karlsruhe, Germany) for the p53wt-containing plasmid and Dr. F. Carreiras (Cergy-Pontoise, France) for human fibronectin. Work is supported by the University of Strasbourg, the Ligue Contre le Cancer (Comité du Grand Est), by Alsace contre le Cancer, by the Fondation ARC pour le Recherche sur le Cancer. H. Janouskova is a predoctoral fellow from the French Ministère des Affaires Etrangères and from the Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer. A.M. Ray is a predoctoral fellow from the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and from the Ligue contre le Cancer. F. Schaffner is a postdoctorant supported by the Ligue contre le Cancer.

#### References

- [1] S.S. Kanwar, A. Poolla, A.P. Majumdar, Regulation of colon cancer recurrence and development of therapeutic strategies, *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* 3 (2012) 1–9.
- [2] J.S. Desgrange, D.A. Cheresh, Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities, *Nat. Rev. Cancer* 10 (2010) 9–22.
- [3] S. Karmakar, R. Mukherjee, Integrin receptors and ECM proteins involved in preferential adhesion of colon carcinoma cells to lung cells, *Cancer Lett.* 196 (2003) 217–227.
- [4] S. Fujita, M. Watanabe, T. Kubota, T. Teramoto, M. Kitajima, Alteration of expression in integrin beta 1-subunit correlates with invasion and metastasis in colorectal cancer, *Cancer Lett.* 91 (1995) 145–149.
- [5] J. Gong, D. Wang, L. Sun, E. Zborowska, J.K. Willson, M.G. Brattain, Role of  $\alpha 5\beta 1$  integrin in determining malignant properties of colon carcinoma cells, *Cell Growth Differ.* 8 (1997) 83–90.
- [6] C. Toquet, A. Colson, A. Jarry, S. Bezieau, C. Volteau, P. Boisseau, D. Merlin, C.L. Labrosse, J.F. Mosnier, ADAM15 to  $\alpha 5\beta 1$  integrin switch in colon carcinoma cells: a late event in cancer progression associated with tumor dedifferentiation and poor prognosis, *Int. J. Cancer* 130 (2012) 278–287.
- [7] T. Koike, N. Kimura, K. Miyazaki, T. Yabuta, K. Kumamoto, S. Takenoshita, J. Chen, M. Kobayashi, M. Hosokawa, A. Taniguchi, T. Kojima, N. Ishida, M. Kawakita, H. Yamamoto, H. Takematsu, A. Suzuki, Y. Kozutsumi, R. Kannagi, Hypoxia induces adhesion molecules on cancer cells: a missing link between Warburg effect and induction of selectin-ligand carbohydrates, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 8132–8137.
- [8] J.A. Anderson, A.M. Grabowska, S.A. Watson, PTHrP increases transcriptional activity of the integrin subunit  $\alpha 5$ , *Br. J. Cancer* 96 (2007) 1394–1403.
- [9] E.H. Nam, Y. Lee, Y.K. Park, J.W. Lee, S. Kim, ZEB2 upregulates integrin  $\alpha 5$  expression through cooperation with Sp1 to induce invasion during

- epithelial–mesenchymal transition of human cancer cells, *Carcinogenesis* 33 (2012) 563–571.
- [10] C.A. Murillo, P.G. Rychahou, B.M. Evers, Inhibition of  $\alpha 5$  integrin decreases PI3K activation and cell adhesion of human colon cancers, *Surgery* 136 (2004) 143–149.
- [11] O. Stoeltzing, W. Liu, N. Reinmuth, F. Fan, G.C. Parry, A.A. Parikh, M.F. McCarty, C.D. Bucana, A.P. Mazar, L.M. Ellis, Inhibition of integrin  $\alpha 5\beta 1$  function with a small peptide (ATN-161) plus continuous 5-FU infusion reduces colorectal liver metastases and improves survival in mice, *Int. J. Cancer* 104 (2003) 496–503.
- [12] V.P. Dia, E. Gonzalez de Mejia, Lunasin potentiates the effect of oxaliplatin preventing outgrowth of colon cancer metastasis, binds to  $\alpha 5\beta 1$  integrin and suppresses FAK/ERK/NF- $\kappa$ B signaling, *Cancer Lett.* 313 (2011) 167–180.
- [13] A.J. Levine, M. Oren, The first 30 years of p53: growing ever more complex, *Nat. Rev. Cancer* 9 (2009) 749–758.
- [14] A.I. Robles, C.C. Harris, Clinical outcomes and correlates of TP53 mutations and cancer, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2 (2010) a001016.
- [15] B. Iacopetta, A. Russo, V. Bazan, G. Dardanoni, N. Gebbia, T. Soussi, D. Kerr, H. Elsahle, R. Soong, D. Kandioler, E. Janschek, S. Kappel, M. Lung, C.S. Leung, J.M. Ko, S. Yuen, J. Ho, S.Y. Leung, E. Crapez, J. Duffour, M. Ychou, D.T. Leahy, D.P. O'Donoghue, V. Agnese, S. Cascio, G. Di Fede, L. Chieco-Bianchi, R. Bertorelle, C. Bellucco, W. Giretti, P. Castagnola, E. Ricevuto, C. Ficarella, S. Bosari, C.D. Arizzi, M. Miyaki, M. Onda, E. Kampman, B. Diergaardde, J. Royds, R.A. Lotte, C.B. Diep, G.I. Meling, J. Ostrowski, L. Trzeciak, K. Guzinska-Ustymowicz, B. Zalewski, G.M. Capella, V. Moreno, M.A. Peinado, C. Lonnroth, K. Lundholm, X.F. Sun, A. Jansson, H. Bouzourene, L.L. Hsieh, R. Tang, D.R. Smith, T.G. Allen-Mersh, Z.A. Khan, A.J. Shorthouse, M.L. Silverman, S. Kato, C. Ishioka, Functional categories of TP53 mutation in colorectal cancer: results of an International Collaborative Study, *Ann. Oncol.* 17 (2006) 842–847.
- [16] The Cancer Genome Atlas Research Network (Collaboration), Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways, *Nature* 455 (2008) 1061–1068.
- [17] A. Ventura, D.G. Kirsch, M.E. McLaughlin, D.A. Tuveson, J. Grimm, L. Lintault, J. Newman, E.E. Rezek, R. Weissleder, T. Jacks, Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo, *Nature* 445 (2007) 661–665.
- [18] W. Xue, L. Zender, C. Miethling, R.A. Dickins, E. Hernando, V. Krizhanovsky, C. Cordon-Cardo, S.W. Lowe, Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas, *Nature* 445 (2007) 656–660.
- [19] M.J. Rigatti, R. Verma, G.S. Belinsky, D.W. Rosenberg, C. Giardina, Pharmacological inhibition of mdm2 triggers growth arrest and promotes DNA breakage in mouse colon tumors and human colon cancer cells, *Mol. Carcinog.* 51 (2011) 363–378.
- [20] T. Hori, T. Kondo, M. Kanamori, Y. Tabuchi, R. Ogawa, Q.L. Zhao, K. Ahmed, T. Yasuda, S. Seki, K. Suzuki, T. Kimura, Nutlin-3 enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis through up-regulation of death receptor 5 (DR5) in human sarcoma HOS cells and human colon cancer HCT116 cells, *Cancer Lett.* 287 (2010) 98–108.
- [21] H. Janouskova, A. Maglott, D.Y. Leger, C. Bossert, F. Noulet, E. Guerin, D. Guenot, S. Pinel, P. Chastagner, F. Plenat, N. Entz-Werle, J. Lehmann-Che, J. Godet, S. Martin, J. Teisinger, M. Dontenwill, Integrin  $\alpha 5\beta 1$  plays a critical role in resistance to temozolomide by interfering with the p53 pathway in high-grade glioma, *Cancer Res.* 72 (2012) 3463–3470.
- [22] D. Heckmann, A. Meyer, B. Laufer, G. Zahn, R. Stragies, H. Kessler, Rational design of highly active and selective ligands for the  $\alpha 5\beta 1$  integrin receptor, *ChemBioChem* 9 (2008) 1397–1407.
- [23] E. Martinkova, A. Maglott, D.Y. Leger, D. Bonnet, M. Stiborova, K. Takeda, S. Martin, M. Dontenwill,  $\alpha 5\beta 1$  integrin antagonists reduce chemotherapy-induced premature senescence and facilitate apoptosis in human glioblastoma cells, *Int. J. Cancer* 127 (2010) 1240–1248.
- [24] N. Issaeva, P. Bozko, M. Enge, M. Protopopova, I.G. Verhoef, M. Masucci, A. Pramanik, G. Selivanova, Small molecule RITA binds to p53, blocks p53–HDM2 interaction and activates p53 function in tumors, *Nat. Med.* 10 (2004) 1321–1328.
- [25] M. Enge, W. Bao, E. Hedstrom, S.P. Jackson, A. Moumen, G. Selivanova, MDM2-dependent downregulation of p21 and hnRNP K provides a switch between apoptosis and growth arrest induced by pharmacologically activated p53, *Cancer Cell* 15 (2009) 171–183.
- [26] S.L. Goodman, M. Picard, Integrins as therapeutic targets, *Trends Pharmacol. Sci.* 33 (2012) 405–412.
- [27] R. Stupp, C. Ruegg, Integrin inhibitors reaching the clinic, *J. Clin. Oncol.* 25 (2007) 1637–1638.
- [28] M. Adachi, T. Taki, M. Higashiyama, N. Kohno, H. Inufusa, M. Miyake, Significance of integrin  $\alpha 5$  gene expression as a prognostic factor in node-negative non-small cell lung cancer, *Clin. Cancer Res.* 6 (2000) 96–101.
- [29] A.K. Mitra, K. Sawada, P. Tiwari, K. Mui, K. Gwin, E. Lengyel, Ligand-independent activation of c-Met by fibronectin and  $\alpha(5)\beta(1)$ -integrin regulates ovarian cancer invasion and metastasis, *Oncogene* 30 (2011) 1566–1576.
- [30] V. O'Brien, S.M. Frisch, R.L. Juliano, Expression of the integrin  $\alpha 5$  subunit in HT29 colon carcinoma cells suppresses apoptosis triggered by serum deprivation, *Exp. Cell Res.* 224 (1996) 208–213.
- [31] J.W. Lee, R.L. Juliano,  $\alpha 5\beta 1$  integrin protects intestinal epithelial cells from apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B-dependent pathway, *Mol. Biol. Cell* 11 (2000) 1973–1987.
- [32] R. Ravizza, M.B. Gariboldi, L. Passarelli, E. Monti, Role of the p53/p21 system in the response of human colon carcinoma cells to Doxorubicin, *BMC Cancer* 4 (2004) 92.
- [33] M. Pietrzak, M. Puzianowska-Kuznicka, P53-dependent repression of the human MCL-1 gene encoding an anti-apoptotic member of the BCL-2 family: the role of Sp1 and of basic transcription factor binding sites in the MCL-1 promoter, *Biol. Chem.* 389 (2008) 383–393.
- [34] L. Qin, X. Chen, Y. Wu, Z. Feng, T. He, L. Wang, L. Liao, J. Xu, Steroid receptor coactivator-1 upregulates integrin  $\alpha(5)$  expression to promote breast cancer cell adhesion and migration, *Cancer Res.* 71 (2011) 1742–1751.
- [35] M.E. Gingras, B. Masson-Gadais, K. Zaniolo, S. Leclerc, R. Drouin, L. Germain, S.L. Guérin, Differential binding of the transcription factors Sp1, AP-1, and NFI to the promoter of the human  $\alpha 5$  integrin gene dictates its transcriptional activity, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50 (2009) 57–67.
- [36] M. Kracikova, G. Akiri, A. George, R. Sachidanandam, S.A. Aaronson, A threshold mechanism mediates p53 cell fate decision between growth arrest and apoptosis, *Cell Death Differ.* (2013).
- [37] V.V. Grinkevich, F. Nikulenkov, Y. Shi, M. Enge, W. Bao, A. Maljukova, A. Gluch, A. Kel, O. Sangfelt, G. Selivanova, Ablation of key oncogenic pathways by RITA-reactivated p53 is required for efficient apoptosis, *Cancer Cell* 15 (2009) 441–453.
- [38] R.M. Ray, S. Bhattacharya, L.R. Johnson, Mdm2 inhibition induces apoptosis in p53 deficient human colon cancer cells by activating p73- and E2F1-mediated expression of PUMA and Siva-1, *Apoptosis* 16 (2011) 35–44.
- [39] J.M. Valentine, S. Kumar, A. Moumen, A p53-independent role for the MDM2 antagonist Nutlin-3 in DNA damage response initiation, *BMC Cancer* 11 (2011) 79.
- [40] G. Di Conza, M. Buttarelli, O. Monti, M. Pellegrino, F. Mancini, A. Pontecorvi, K. Scotlandi, F. Moretti, IGF-1R/MDM2 relationship confers enhanced sensitivity to RITA in Ewing sarcoma cells, *Mol. Cancer Ther.* 11 (2012) 1247–1256.
- [41] J.S. Shin, J.H. Ha, F. He, Y. Muto, K.S. Ryu, H.S. Yoon, S. Kang, S.G. Park, B.C. Park, S.U. Choi, S.W. Chi, Structural insights into the dual-targeting mechanism of Nutlin-3, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 420 (2012) 48–53.

## **Single cell tracking assay as a tool to characterize selective small non peptidic antagonists of $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha v\beta 3$ integrins in U87MG glioma cells.**

Anne-Marie RAY<sup>a</sup>, Florence SCHAFFNER<sup>a</sup>, Hana JANOUSKOVA<sup>a</sup>, Fanny NOULET<sup>a</sup>, Didier ROGNAN<sup>b</sup>, Isabelle LELONG-REBEL<sup>a</sup>, Laurence CHOULIER<sup>a</sup>, Anne-Florence BLANDIN<sup>a</sup>, Maxime LEHMANN<sup>a</sup>, Sophie MARTIN<sup>a</sup>, Stefanie NEUBAUER<sup>c</sup>, Florian RECHENMACHER<sup>c</sup>, Horst KESSLER<sup>c,d</sup> and Monique DONTENWILL<sup>a</sup>.

<sup>a</sup> CNRS UMR 7213, Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, 74 route du Rhin, 67401 Illkirch, France

<sup>b</sup> CNRS UMR 7200, Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, 74 route du Rhin, 67401 Illkirch, France

<sup>c</sup> Institute for Advanced Study Technische Universität München, Department Chemie, Lichtenbergerstrasse 4, Garching, Germany.

<sup>d</sup> Chemistry Department, Faculty of Science, King Abdulaziz University, P.O. Box 80203, Jeddah 21589, Saudi Arabia

**\*Corresponding author:** Dr Monique DONTENWILL, UMR 7213 CNRS, LBP, Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, 67401 Illkirch, France. Tel. 0033368854267 ; Fax 0033368854313; Email: [monique.dontenwill@unistra.fr](mailto:monique.dontenwill@unistra.fr)

## Abstract

Integrins are extracellular matrix receptors emerging as promising anticancer targets. Numerous studies aim to characterize efficient specific antagonists of integrins. Despite homologies between RGD-binding  $\alpha 5\beta 1$  and  $\alpha v\beta 3$  integrins, specific and selective small antagonists have been designed and tested against purified integrins. Herein, we evaluated the effects of such small antagonists in a cellular context, the U87MG glioma cell line, which express both integrins. The aim of the study was to determine if antagonist selectivity was preserved in cell –based assays such as cell adhesion and migration. Migration assays included wound healing recovery and single cell tracking experiments. U87MG cells manipulated for the expression of  $\alpha 5$  integrin subunit were used to explore the impact of  $\alpha 5\beta 1$  integrin in these biological assays. Interestingly, we demonstrated that U87MG single cell migration, but not wound healing migration, is inhibited selectively by  $\alpha 5\beta 1$  integrin antagonists but is increased by  $\alpha v\beta 3$  integrin antagonists. This original cell-based assay may help to characterize true functional antagonists that block  $\alpha 5\beta 1$  integrin-dependent glioma cell migration.

Key words:  $\alpha 5\beta 1$  integrin,  $\alpha v\beta 3$  integrin, small antagonists, adhesion, migration, glioblastoma

## 1. Introduction

Glioblastoma multiforme (GBM) remains a challenge for oncologists. These aggressive brain tumors are currently treated with a standard therapy regimen including surgery and radiotherapy with concomitant and adjuvant chemotherapy with temozolomide (TMZ) [1]. Despite multimodality therapy, outcomes for patients remain poor with overall survival rates of one year for all treatment options. Improvement of the outcome of GBM will urgently require new therapies based on increased knowledge of the underlying biology of these tumors. Invasion of the normal brain parenchyma has proven a hallmark of glioma cells and may represent a target for therapy [2]. As a consequence, surgical resection of glioma is usually followed by tumor recurrence beyond the resection margin. Gene expression profiling of high-grade glioma associated with gene ontology classification revealed that a class of genes consisting of extracellular matrix components and their regulators is often affected in the patient groups that have the worst survival prognostic. As such, fibronectin which is overexpressed in glioblastoma versus normal brain [3] belongs to the cluster of genes associated with a more malignant phenotype. The  $\alpha v\beta 3$  and  $\alpha 5\beta 1$  integrins are among the integrins that bind fibronectin through its RGD motif; they belong to the large family of adhesion receptors which play key roles in a variety of physiological processes (proliferation, migration, angiogenesis) that are often deregulated in cancer [4] and thus integrins have potential to act as tumor therapeutic targets [5]. The proposed role for  $\alpha v\beta 3$  integrin in tumoral neo-angiogenesis led to the development of new anti-angiogenic targeted therapies with cilengitide, a specific antagonist for  $\alpha v\beta 3/\beta 5$  integrins [6; 7]. Recently, the  $\alpha 5\beta 1$  integrin was shown to have an important role in tumor progression and/or resistance to therapies in colon, lung, ovarian and breast cancer [8; 9]. Through the use of specific, non-peptidic  $\alpha 5\beta 1$  integrin antagonists and glioblastoma cell lines, we previously demonstrated that  $\alpha 5\beta 1$  integrin may be an effective therapeutic target for GBM [10] and that  $\alpha 5\beta 1$  integrin antagonists sensitize p53wt glioma cells to chemotherapeutic drugs [11]. Importantly, it has been shown that elevated levels of  $\alpha 5\beta 1$  integrin positively correlate with metastasis in different tumoral settings and inhibition of  $\alpha 5$  expression or functions, by RNA interference or by specific inhibitors respectively, impairs metastatic behavior of tumoral cells [8]. Integrins are also up-regulated after radiotherapy in relationship with an enhanced migratory phenotype of resistant cells [12]. Blocking the function of integrin  $\alpha 5\beta 1$  by antibodies (IIA1, Volociximab) or by small peptides (ATN161) resulted in a significant enhancement of the radiation therapy response in breast tumoral cells [13]. In that context, specific antagonists of the  $\alpha 5\beta 1$  integrin provide a promising strategy for inhibiting invasion of GBM cells into the brain prior and after treatments. Our previous results [14; 15] already

suggested that small non peptidic integrin antagonists may be useful to block GBM cell migration and/or invasion. Integrins were first described as adhesion molecules and primary tests to screen for antagonists are currently always based on this function. Non peptidic small RGD-like integrin antagonist affinities and selectivity have been characterized this way [16; 17; 18; 19]. Few data concerning their effects in a complex cellular context have been described.

In this study, we aimed to check if these fibronectin-binding integrin antagonists are able to selectively block the integrin-dependent glioma cell adhesion and migration. For this purpose, we used the U87MG glioma cell line, at first to examine cell adhesion to fibronectin (ligand for  $\alpha 5\beta 1$  and  $\alpha v\beta 3$  integrins) and vitronectin (ligand for  $\alpha v\beta 3$  integrin) and then, to examine cell migratory properties in absence or presence of antagonists in relationship with the expression level of  $\alpha 5$  integrin.

## 2. Material and methods

### 2.1. Drugs and Cell Lines

Compounds used in the study are described elsewhere and their structures and characteristics are given in the Table 1. The compounds 1 and 2 are selective for  $\alpha 5\beta 1$  integrin; compounds 3, 4 and cilengitide are selective for  $\alpha v\beta 3$  integrin and compound 5 has similar affinities for both integrins. Human glioblastoma cell line U87MG was maintained in EMEM (Lonza) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS), 200IU/mL penicillin/streptomycin and 0,6mg/ml glutamine, in a 37°C humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub>.

### 2.2. Flow cytometry

Cells were collected with PBS/EDTA (0,53mM). They were incubated with anti-alpha5 IIA1 antibody (1:100, BD Bioscience) for 30min at 4°C and exposed to Alexa Fluor 488 labeled goat anti-mouse (1:500, JacksonimmunooResearch Laboratories) at 4°C for 30min. A total of 20 000 cells were analysed using FACS Calibur flow cytometer (Bectom-Dikinson, San Diego, USA). The mean fluorescence intensity characterizing surface expression of integrin was measured using the FlowJo Software.

### 2.3. Cell adhesion assay

Cells (4 500 cells/well) were plated in the presence of drugs or controls (DMSO 0,2%) on purified fibronectin (gift from Pr Carreira, Cergy Pontoise, France) or vitronectin (gift from Pr

Luis, Marseille, France) coated 96-well plates and incubated for 1 hour. Adhesion was measured after coloration with crystal violet (0,2% ethanol, w/v) by absorbance recording at 595 nm. Polylysine (Sigma) coated wells were used to measure 100% of adhesion, BSA to define the background. Specific anti- $\alpha$ 5 antibody IIA1 (BD Biosciences, France) and anti- $\alpha$ v antibody 69.6.5. [20] were used at 10  $\mu$ g/ml.

#### 2.4. Wound Healing assay

Cells (25 000 cells/ml) (1 mL/well) were plated into 24-well ImageLock<sup>TM</sup> plate (Essen Bioscience). After 24-hour incubation, confluent cell monolayer was scratched with a wound maker<sup>TM</sup> tool. This system allows having a very precise and repeated imaging within the wound area. Floating cells were washed and cells were incubated in fresh medium containing 10%FBS either with solvent or with drugs, each treatment performed in duplicate wells. The Incucyte<sup>TM</sup> Scratch Wound Software was used to capture and analyse wound closure pictures during 20 hours (3 images per well and per hour). Wound closure is automatically monitored using relative wound density (% wound closure).

#### 2.5. Single Cell Tracking

Cells were seeded at low density (500 cells/well) with 1 $\mu$ g/ml Hoechst33423 (Sigma) in  $\mu$ Clear 96well black plate (Dutscher, France) in L-15 medium (Sigma) supplemented with 10%FBS. After 24 hours, medium was removed and fresh medium containing drugs or solvent was added. Migration of cells was followed by fluorescent microscopy (IN Cell Analyzer 1000, GE Healthcare) during 6 hours. Analyses were performed only on cells tracked during the entire assay. Speed, persistence and trajectories were computed with Excel software.

#### 2.6. Western Blot Analyses

Cells were lysed with Laemmli sample Buffer (Biorad) on ice and lysate were heated at 90°C for 10min. Samples were loaded and run on precast 10%SDS PAGE gels (Biorad) and transferred of PVDF membranes (GE Healthcare). After blocking for 1h at room temperature, the blots were incubated overnight at 4°C with specific primary antibody. Primary antibodies used were anti- $\alpha$ 5 integrin 1928 1/1000 (Millipore), anti- $\alpha$ V integrin 1930 1/1000 (Millipore), or anti-GAPDH 1/50 000 (Millipore). Membranes were subsequently incubated with a secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase 1/10 000 (Promega) and developed to CL-exposure films (Kodak). GAPDH were used as housekeeping protein to serve as the loading control for cell lysate sample.

## 2.7. Statistical analysis

Data are represented as mean  $\pm$  SEM. The values were obtained in at least three independent experiments (n). Statistical analyses were done by Student's t test with GraphPad Prism program where  $p < 0.05$  was considered significant.

## 3. Results

### 3.1. Characterisation of U87MG adhesion on fibronectin and vitronectin in relation with $\alpha 5$ integrin expression level.

U87MG cells express  $\alpha 5\beta 1$  integrin endogenously and were manipulated to increase or decrease the expression of the  $\alpha 5$  integrin subunit ( $\alpha 5+$  and  $\alpha 5-$  cells respectively) as confirmed by total protein extract western blot analysis (Figure 1A, left) or by flow cytometry analysis of membrane-localised integrin (Figure 1A, right). We also screened the cells for  $\alpha v$  integrin and showed that expression level was not changed upon  $\alpha 5$  integrin expression manipulation of the cells (Figure 1A, left). The  $\beta 1$  and  $\beta 3$  integrin subunits are also expressed in both cell lines and manipulation of  $\alpha 5$  subunit expression did not alter their expressions (data not shown). Adhesion of cells to fibronectin (known to be recognised both by  $\alpha 5\beta 1$  and  $\alpha v\beta 3$  integrins) was first investigated. On 1  $\mu$ g/mL fibronectin-coated wells, U87MG cells binding to fibronectin was strongly dependent of the  $\alpha 5\beta 1$  integrin expression level (Figure 1B, left). U87MG-( $\alpha 5-$ ) cells showed decreased adhesion compared to the  $\alpha 5$  expressing cells with 20% adhesion versus 60% adhesion for U87MG-mock and 100% adhesion for U87MG-( $\alpha 5+$ ) respectively. Adhesion was completely inhibited by the  $\alpha 5\beta 1$  integrin specific antibody IIA1 (10  $\mu$ g/mL) in the two  $\alpha 5\beta 1$  integrin expressing cell lines. Conversely, no inhibition of adhesion was denoted in the presence of 69.6.5 antibody (10  $\mu$ g/mL) which is specific for  $\alpha v$  integrin [20]. Similar results were obtained when adhesion of U87MG cells to 3  $\mu$ g/mL fibronectin-coated wells was examined (Figure 1B, right) suggesting that  $\alpha v\beta 3$  integrins were not implicated in fibronectin binding of these cells. However, U87MG cells were able to adhere to vitronectin (1  $\mu$ g/mL), the specific ligand of  $\alpha v\beta 3$  integrin, regardless to their content in  $\alpha 5\beta 1$  integrin (Figure 1C) and this adhesion was inhibited by 69.6.5  $\alpha v$ -antibody but not by IIA1  $\alpha 5$ -antibody confirming that cell binding to vitronectin used  $\alpha v$  integrins. These data

show that U87MG cell binding to fibronectin is predominantly mediated by  $\alpha 5\beta 1$  integrins, whereas binding to vitronectin favors  $\alpha v$  integrins involvement. These cells thus appear useful to investigate effects of integrin antagonists with known selectivity for each integrin.

### 3.2. Effects of integrin antagonists on cell adhesion.

We selected several molecules of our series of integrin antagonists to study their effects on glioma cell adhesion. Their affinities for  $\alpha 5\beta 1$  and  $\alpha v\beta 3$  integrins (extrapolated from their  $IC_{50}$  inhibitory values calculated from adhesion assays of soluble pure integrin to selected ECM ligands [21] are shown in table 1. Two compounds, 1 and 2, highly selective for  $\alpha 5\beta 1$  integrin versus  $\alpha v\beta 3$  integrin were compared to compounds 3, 4 and cilengitide selective for  $\alpha v\beta 3$  over  $\alpha 5\beta 1$  integrin and compound 5 having no selectivity. The  $\alpha 5\beta 1$  integrin-dependent binding of U87MG cells to fibronectin was clearly affected by compounds 1 and 2 but not by compounds 3, 4, 5 and cilengitide and this inhibition was dependent of  $\alpha 5$  integrin expression (Figure 2A) as expected from the precedent results. Binding of U87MG on vitronectin was almost totally abrogated by  $\alpha v\beta 3$  selective ligands (cilengitide and compounds 3 and 4) and compound 5 whatever the level of  $\alpha 5\beta 1$  integrin (Figure 2B). Unexpectedly, compound 1 and 2 also affected cell binding to vitronectin (but less than the other compounds) with no relationship with  $\alpha 5$  expression level, suggesting that they may also affect  $\alpha v$  integrin when used at high concentrations (20  $\mu M$ ). These data revealed that compounds 1 and 2, at high concentration, may not only affect the  $\alpha 5\beta 1$  integrin but also other integrins. Although exhibiting similar affinities for both integrins, compound 5 is more efficient to displace cells from vitronectin suggesting that integrin binding to vitronectin is less strong than binding to fibronectin.

In order to nevertheless confirm the respective selectivity of the drugs either for  $\alpha 5\beta 1$  or for  $\alpha v\beta 3$  integrins, we performed dose-response assays with compound 1 and 3 on U87MG- $\alpha 5+$  cells. Results were in accordance with previous data showing that compound 1 and compound 3 respectively were more potent for inhibiting cell binding either to fibronectin or to vitronectin (Figure 2C).

### 3.3. Effect of integrin antagonists on cell migration (wound-healing assays).

We next investigated whether these integrin antagonists may affect selectively the migration of U87MG glioma cells into a wound generated by scratching a cell monolayer. Wound healing was quantified at different time points after the scratch. After 20 hours, the area of the wound recovered by migrating cells was equivalent for all U87MG cells independently of their level of  $\alpha 5\beta 1$  integrin expression (Figure 3A). Data also showed that, at a concentration of 10  $\mu\text{M}$ , only cilengitide was able to inhibit wound recovery of U87MG cells expressing the  $\alpha 5\beta 1$  integrin although at higher concentration compounds 2, 3, 4 and 5 also affected cell migration (Figure 3B, left). Effect of compound 2 on migration was  $\alpha 5$  dependent and effect of compound 3 was  $\alpha 5$  independent (Figure 3B, right). Results suggested that both  $\alpha 5\beta 1$  and  $\alpha v\beta 3$  integrins may be involved in wound recovery. To confirm this hypothesis, we compared wound recovery in the presence of either compound 1 or compound 3 at 10  $\mu\text{M}$  (which were shown to be inactive at this concentration- Figure 3B) to the wound recovery obtained in the presence of both drugs. Treating the cells with both compounds together led to a significant inhibition of wound recovery (Figure 3C). Data suggest that cell migration involved in the recovery of the wound is dependent on  $\alpha 5\beta 1$  and  $\alpha v\beta 3$  integrins and that simultaneous inhibition of the two integrins is required to get an effect. Our data indicate thus that this migration assay did not allow the discrimination between  $\alpha 5\beta 1$  and  $\alpha v\beta 3$  integrin implications.

### 3.4. Effect of integrin antagonists on single cell migration.

It is already known that single cell migration behave differently than cell migration into a wound. In this respect the random mobility of U87MG cells was addressed by analysing cell migration at low cell density and quantifying the speed of migration of individual cells over 6 hours in absence and presence of the antagonists. Diagrams of migratory trajectories of representative cells are shown either in absence or in presence of the integrin antagonists (Figure 4A, B and C, right). Quantitative analysis revealed that speed of migration was dependent on  $\alpha 5\beta 1$  integrin expression level in U87MG cells (Figure 4A, left). Compounds 1 and 2 were able to decrease U87MG-( $\alpha 5+$ ) cell speed and these effects were abolished in U87MG-( $\alpha 5-$ ) cells. Similar results were obtained with IIA1 antibodies, further confirming the implication of  $\alpha 5\beta 1$  integrin in this process (Figure 4B, left). Intriguingly, in similar experiments, both

cilengitide and compounds 3, 4 and 5 rather increased the speed of migration independently of  $\alpha 5\beta 1$  integrin expression level (Figure 4C, left). This effect appeared  $\alpha v$  integrin dependent as 69.6.5. antibody also enhanced cell speed. We plotted the affinities of the different compounds for  $\alpha v$  integrin against the U87MG- $\alpha 5+$  cell speed and we found that a significant correlation exist between these two parameters (Figure 4D). Even a better correlation was obtained in U87MG- $\alpha 5-$  cells (Figure 4D) favoring the hypothesis that  $\alpha 5\beta 1$  integrin exerts an opposite effect compared to  $\alpha v\beta 3$  integrin in this assay. Interestingly, persistence of cell migration (ratio of the vectorial distance to the total distance length travelled by the cell) was clearly decreased only by the  $\alpha v$  integrin antagonists (Figure 5A) independently of the expression level of  $\alpha 5\beta 1$  integrin (Figure 5B).

Data show that U87MG single cell migration is highly related to  $\alpha 5\beta 1$  integrin expression, blocked by specific  $\alpha 5\beta 1$  integrin antagonists and increased by  $\alpha v\beta 3$  integrin antagonists. In these assays, selectivity of the antagonists determined in adhesion tests was clearly preserved.

#### 4. Discussion

Cell migration is essential for cancer cell dissemination in surrounding normal tissues and/or metastasis in different organs. Integrins are cell surface receptors largely implicated in migration processes [22] [23] and currently explored as pertinent therapeutic targets for cancer [5; 24; 25]. We addressed in this work the impact on U87MG cell adhesion and migration of the functional inhibition of  $\alpha 5\beta 1$  and  $\alpha v\beta 3$  RGD-dependent integrins by selective antagonists. We demonstrated that the expression level of the  $\alpha 5\beta 1$  integrin determine U87MG cell adhesion and migration. Data showed that the relationships between adhesion tests and functional assays are highly dependent of the tests used. Two different modes of glioma cell migration were investigated reflecting partially what may happen *in vivo*. Glioblastoma disseminate through the brain either along blood vessels or as individual cells in the brain parenchyma [26; 27] each mode being under the control of different molecular pathways. The wound healing assay is widely used to decipher the cell migration parameters. In this setting, cells are allowed to generate a confluent cell monolayer with the possibility to secrete their own matrix. In our experimental conditions, the U87MG cell migration in the wound healing assay was not affected by the expression

level of  $\alpha 5$  integrin but similarly affected by  $\alpha 5\beta 1$  and  $\alpha v\beta 3$  integrin antagonists. Respective contributions of the two integrins in this setting would not be easy to delineate and will not only depend on relative integrin expressions and antagonist selectivities but presumably also on the matrix secretion. By contrast, single cell tracking analysis revealed the U87MG cell line as a clear  $\alpha 5\beta 1$  integrin-dependent model in which opposite effects of  $\alpha 5\beta 1$  and  $\alpha v\beta 3$  integrin antagonists have been recorded. We therefore propose that U87MG single cell tracking experiments may be considered as a function-based assay useful to characterise new selective integrin antagonists.

Integrins have been first considered as proteins only implicated in cell adhesion to extracellular matrix components and the search of antagonists has been built on this characteristic. Hence, the antagonistic affinities for a specific integrin were extrapolated from adhesion inhibition experiments. Indeed, binding affinities were calculated from experiments using either adhesion of purified solubilised integrins on their specific ECM ligands [18; 21; 28], or adhesion of cells expressing only the integrin of interest [18; 29] or alternatively adhesion of cells expressing two integrins with one of them blocked with an antagonist [30; 31]. In this study, we used the U87MG glioma cell line expressing both  $\alpha 5\beta 1$  and  $\alpha v\beta 3$  integrins in which only the expression of  $\alpha 5\beta 1$  integrin was manipulated. Exploration of integrin antagonist properties in this cellular model may better reflect what could happen in tumoral tissues expressing several integrins concomitantly. The experiments indicated that U87MG cells are primarily  $\alpha 5\beta 1$  integrin-dependent for adhesion to fibronectin and for migration as confirmed by their relationship to integrin levels and also by their sensitivity to specific antibodies and antagonists.

Respective implication of  $\alpha 5\beta 1$  and  $\alpha v\beta 3$  integrins in cell migration has been the subject of numerous studies. Alterations in the expression of fibronectin-binding integrins can strongly affect parameters of cell migration. In the past, collaborative interactions between  $\alpha 5\beta 1$  and  $\alpha v\beta 3$  integrins have been suggested for cell motility [32]. More recent studies point to distinct functions in cell adhesion [33; 34], spreading [35] and migration [36; 37] through activation of different molecular mechanisms [38; 39]. Moreover, it has been shown for  $\alpha v\beta 3$  integrin that its deletion [40] or its blockade with cilengitide [41; 42] increased cell speed through activation of the recycling loop of  $\alpha 5\beta 1$  integrin. Accordingly, our data also show that U87MG single cell migration speed was increased in the presence of  $\alpha v\beta 3$  integrin

antagonists but decreased with  $\alpha 5\beta 1$  integrin antagonists. In addition, persistence of cell migration was decreased when  $\alpha v\beta 3$  integrin was blocked, which confirmed other works [36; 40; 41]. Although the observed increase in speed was more evident when  $\alpha 5$  integrin was repressed, the decrease in persistence by these antagonists did not appear to be related to  $\alpha 5\beta 1$  integrin expression in our models. The molecular mechanisms underlying the differential effects of the  $\alpha 5\beta 1$  and  $\alpha v\beta 3$  integrin antagonists deserve further studies.

To characterize the respective roles of  $\alpha 5\beta 1$  and  $\alpha v\beta 3$  integrins in tumoral settings, the use of specific and selective antagonists is crucial. The human  $\alpha 5\beta 1$  and  $\alpha v\beta 3$  integrins are highly homologous (69% and 63% similarity between  $\alpha$  and  $\beta$  subunit headpieces respectively) and overall shape or domain organisation is very similar [43; 44; 45; 46; 47]. It is thus challenging to propose highly selective  $\alpha 5\beta 1$  or  $\alpha v\beta 3$  integrin small antagonists. We nevertheless achieved this goal with the design of compounds able to selectively recognise distinct integrin subtypes. They are powerful tools to characterize integrin subtype-dependent fundamental processes as shown recently [17; 19; 48]. In the current work, we extended our investigations on their biological effects in cells expressing both  $\alpha 5\beta 1$  and  $\alpha v\beta 3$  integrins. Our data provide a rationale for testing new integrin ligands in a cell-based assay (single cell migration assay) to characterize more directly their potential anti-tumoral effects that may be exploited in translational research. In particular,  $\alpha 5\beta 1$  integrin antagonists would be of great interest in therapeutic intervention for the subpopulation of patients with high  $\alpha 5$ -expressing tumors [8].

## 6. Acknowledgements

The authors thank Pr F. Carreiras (Cergy-Pontoise, France) for purified human fibronectin and Pr J. Luis (Marseille, France) for purified human vitronectin. We also thank Dr D. Bonnet (UMR CNRS 7200, Illkirch, France), Dr L. Brino (IGBMC, Illkirch, France) and Dr P. Villa (UMS3286 CNRS, Illkirch, France) for their help in drug synthesis and migration assays. Work was supported by the University of Strasbourg, the Ligue Contre le Cancer (Comité du Grand Est), by Alsace contre le Cancer, by the Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer. AM Ray is a predoctoral fellow from the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and from the Ligue contre le Cancer. H Janouskova is a predoctoral fellow from the French Ministère des Affaires Etrangères and from the Fondation ARC pour la Recherche

sur le Cancer. F Schaffner is a postdoctorant supported by the Ligue contre le Cancer. We gratefully thank for the technical and financial support from King Abdulaziz University KAU (grant No. HiCi/25-3-1432).

**Conflict of interest statement:** None of the authors have any conflict of interest to be disclosed regarding this study.

## 7. References

- [1] R. Stupp, W. P. Mason, M. J. van den Bent, M. Weller, B. Fisher, M. J. Taphoorn, K. Belanger, A. A. Brandes, C. Marosi, U. Bogdahn, J. Curschmann, R. C. Janzer, S. K. Ludwin, T. Gorlia, A. Allgeier, D. Lacombe, J. G. Cairncross, E. Eisenhauer, and R. O. Mirimanoff, Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma, *N Engl J Med.* 352 (2005) 987-96.
- [2] A. Vehlow, and N. Cordes, Invasion as target for therapy of glioblastoma multiforme, *Biochim Biophys Acta.* 1836 (2013) 236-244.
- [3] C. Colin, N. Baeza, C. Bartoli, F. Fina, N. Eudes, I. Nanni, P. M. Martin, L. Ouafik, and D. Figarella-Branger, Identification of genes differentially expressed in glioblastoma versus pilocytic astrocytoma using Suppression Subtractive Hybridization, *Oncogene.* 25 (2006) 2818-26.
- [4] F. Aoudjit, and K. Vuori, Integrin signaling in cancer cell survival and chemoresistance, *Chemother Res Pract.* 2012 (2012) 283181.
- [5] S. L. Goodman, and M. Picard, Integrins as therapeutic targets, *Trends Pharmacol Sci.* 33 (2012) 405-12.
- [6] C. Mas-Moruno, F. Rechenmacher, and H. Kessler, Cilengitide: the first anti-angiogenic small molecule drug candidate design, synthesis and clinical evaluation, *Anticancer Agents Med Chem.* 10 (2010) 753-68.
- [7] M. A. Dechantsreiter, E. Planker, B. Matha, E. Lohof, G. Holzemann, A. Jonczyk, S. L. Goodman, and H. Kessler, N-Methylated cyclic RGD peptides as highly active and selective alpha(V)beta(3) integrin antagonists, *J Med Chem.* 42 (1999) 3033-40.
- [8] F. Schaffner, A. Ray, and M. Dontenwill, Integrin  $\alpha 5\beta 1$ , the Fibronectin Receptor, as a Pertinent Therapeutic Target in Solid Tumors, *Cancers.* 5 (2013) 27-47.
- [9] H. Janouskova, A. M. Ray, F. Noulet, I. Lelong-Rebel, L. Choulier, F. Schaffner, M. Lehmann, S. Martin, J. Teisinger, and M. Dontenwill, Activation of p53 pathway by Nutlin-3a inhibits the expression of the therapeutic target alpha5 integrin in colon cancer cells, *Cancer Lett.* 336 (2013) 307-18.
- [10] H. Janouskova, A. Maglott, D. Y. Leger, C. Bossert, F. Noulet, E. Guerin, D. Guenot, S. Pinel, P. Chastagner, F. Plenat, N. Entz-Werle, J. Lehmann-Che, J. Godet, S. Martin, J. Teisinger, and M. Dontenwill, Integrin alpha5beta1

- plays a critical role in resistance to temozolomide by interfering with the p53 pathway in high-grade glioma, *Cancer Res.* 72 (2012) 3463-70.
- [11] E. Martinkova, A. Maglott, D. Y. Leger, D. Bonnet, M. Stiborova, K. Takeda, S. Martin, and M. Dontenwill, alpha5beta1 integrin antagonists reduce chemotherapy-induced premature senescence and facilitate apoptosis in human glioblastoma cells, *Int J Cancer.* 127 (2010) 1240-8.
- [12] H. Yao, Z. Z. Zeng, K. S. Fay, D. M. Veine, E. D. Staszewski, M. Morgan, K. Wilder-Romans, T. M. Williams, A. C. Spalding, E. Ben-Josef, and D. L. Livant, Role of alpha(5)beta(1) Integrin Up-regulation in Radiation-Induced Invasion by Human Pancreatic Cancer Cells, *Transl Oncol.* 4 (2011) 282-92.
- [13] J. M. Nam, Y. Onodera, M. J. Bissell, and C. C. Park, Breast cancer cells in three-dimensional culture display an enhanced radioresponse after coordinate targeting of integrin alpha5beta1 and fibronectin, *Cancer Res.* 70 (2010) 5238-48.
- [14] S. Martin, E. C. Cosset, J. Terrand, A. Maglott, K. Takeda, and M. Dontenwill, Caveolin-1 regulates glioblastoma aggressiveness through the control of alpha(5)beta(1) integrin expression and modulates glioblastoma responsiveness to SJ749, an alpha(5)beta(1) integrin antagonist, *Biochim Biophys Acta.* 1793 (2009) 354-67.
- [15] A. Maglott, P. Bartik, S. Cosgun, P. Klotz, P. Ronde, G. Fuhrmann, K. Takeda, S. Martin, and M. Dontenwill, The small alpha5beta1 integrin antagonist, SJ749, reduces proliferation and clonogenicity of human astrocytoma cells, *Cancer Res.* 66 (2006) 6002-7.
- [16] D. Heckmann, and H. Kessler, Design and chemical synthesis of integrin ligands, *Methods Enzymol.* 426 (2007) 463-503.
- [17] F. Rechenmacher, S. Neubauer, J. Polleux, C. Mas-Moruno, M. De Simone, E. A. Cavalcanti-Adam, J. P. Spatz, R. Fassler, and H. Kessler, Functionalizing alphavbeta3- or alpha5beta1-selective integrin antagonists for surface coating: a method to discriminate integrin subtypes in vitro, *Angew Chem Int Ed Engl.* 52 (2013) 1572-5.
- [18] A. O. Frank, E. Otto, C. Mas-Moruno, H. B. Schiller, L. Marinelli, S. Cosconati, A. Bochen, D. Vossmeyer, G. Zahn, R. Stragies, E. Novellino, and H. Kessler, Conformational control of integrin-subtype selectivity in isoDGR peptide motifs: a biological switch, *Angew Chem Int Ed Engl.* 49 (2010) 9278-81.
- [19] F. Rechenmacher, S. Neubauer, C. Mas-Moruno, P. M. Dorfner, J. Polleux, J. Guasch, B. Conings, H. G. Boyen, A. Bochen, T. R. Sobahi, R. Burgkart, J. P. Spatz, R. Fassler, and H. Kessler, A molecular toolkit for the functionalization of titanium-based biomaterials that selectively control integrin-mediated cell adhesion, *Chemistry.* 19 (2013) 9218-23.
- [20] M. Lehmann, C. Rabenandrasana, R. Tamura, J. C. Lissitzky, V. Quaranta, J. Pichon, and J. Marvaldi, A monoclonal antibody inhibits adhesion to fibronectin and vitronectin of a colon carcinoma cell line and recognizes the integrins alpha v beta 3, alpha v beta 5, and alpha v beta 6, *Cancer Res.* 54 (1994) 2102-7.
- [21] D. Heckmann, A. Meyer, B. Laufer, G. Zahn, R. Stragies, and H. Kessler, Rational design of highly active and selective ligands for the alpha5beta1 integrin receptor, *ChemBioChem.* 9 (2008) 1397-407.
- [22] A. Huttenlocher, and A. R. Horwitz, Integrins in cell migration, *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3 (2011) a005074.

- [23] G. M. D'Abaco, and A. H. Kaye, Integrins: molecular determinants of glioma invasion, *J Clin Neurosci.* 14 (2007) 1041-8.
- [24] D. Cox, M. Brennan, and N. Moran, Integrins as therapeutic targets: lessons and opportunities, *Nat Rev Drug Discov.* 9 (2010) 804-20.
- [25] J. S. Desgrosellier, and D. A. Cheresh, Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities, *Nat Rev Cancer.* 10 (2010) 9-22.
- [26] F. Winkler, Y. Kienast, M. Fuhrmann, L. Von Baumgarten, S. Burgold, G. Mitteregger, H. Kretzschmar, and J. Herms, Imaging glioma cell invasion in vivo reveals mechanisms of dissemination and peritumoral angiogenesis, *Glia.* 57 (2009) 1306-15.
- [27] E. Hirata, H. Yukinaga, Y. Kamioka, Y. Arakawa, S. Miyamoto, T. Okada, E. Sahai, and M. Matsuda, In vivo fluorescence resonance energy transfer imaging reveals differential activation of Rho-family GTPases in glioblastoma cell invasion, *J Cell Sci.* 125 (2012) 858-68.
- [28] R. Stragies, F. Osterkamp, G. Zischinsky, D. Vossmeyer, H. Kalkhof, U. Reimer, and G. Zahn, Design and synthesis of a new class of selective integrin alpha5beta1 antagonists, *J Med Chem.* 50 (2007) 3786-94.
- [29] A. Tolomelli, L. Gentilucci, E. Mosconi, A. Viola, S. D. Dattoli, M. Baiula, S. Spampinato, L. Belvisi, and M. Civera, Development of isoxazoline-containing peptidomimetics as dual alphavbeta3 and alpha5beta1 integrin ligands, *ChemMedChem.* 6 (2011) 2264-72.
- [30] B. Delouvie, K. Al-Kadhim, J. C. Arnould, S. T. Barry, D. A. Cross, M. Didelot, P. R. Gavine, H. Germain, C. S. Harris, A. M. Hughes, D. A. Jude, J. Kendrew, C. Lambert-van der Brempt, J. J. Lohmann, M. Menard, A. A. Mortlock, M. Pass, C. Rooney, M. Vautier, J. L. Vincent, and N. Warin, Structure-activity relationship of a series of non peptidic RGD integrin antagonists targeting alpha5beta1: part 1, *Bioorg Med Chem Lett.* 22 (2012) 4111-6.
- [31] B. Delouvie, K. Al-Kadhim, J. C. Arnould, S. T. Barry, D. A. Cross, M. Didelot, P. R. Gavine, H. Germain, C. S. Harris, A. M. Hughes, D. A. Jude, J. Kendrew, C. Lambert-van der Brempt, J. J. Lohmann, M. Menard, A. A. Mortlock, M. Pass, C. Rooney, M. Vautier, J. L. Vincent, and N. Warin, Structure-activity relationship of a series of non peptidic RGD integrin antagonists targeting alpha5beta1: part 2, *Bioorg Med Chem Lett.* 22 (2012) 4117-21.
- [32] J. S. Bauer, C. L. Schreiner, F. G. Giancotti, E. Ruoslahti, and R. L. Juliano, Motility of fibronectin receptor-deficient cells on fibronectin and vitronectin: collaborative interactions among integrins, *J Cell Biol.* 116 (1992) 477-87.
- [33] P. Roca-Cusachs, N. C. Gauthier, A. Del Rio, and M. P. Sheetz, Clustering of alpha(5)beta(1) integrins determines adhesion strength whereas alpha(v)beta(3) and talin enable mechanotransduction, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106 (2009) 16245-50.
- [34] O. Rossier, V. Octeau, J. B. Sibarita, C. Leduc, B. Tessier, D. Nair, V. Gatterdam, O. Destaing, C. Albiges-Rizo, R. Tampe, L. Cognet, D. Choquet, B. Lounis, and G. Giannone, Integrins beta1 and beta3 exhibit distinct dynamic nanoscale organizations inside focal adhesions, *Nat Cell Biol.* 14 (2012) 1057-67.
- [35] A. Stachurska, J. Elbanowski, and H. M. Kowalczynska, Role of alpha5beta1 and alphavbeta3 integrins in relation to adhesion and spreading dynamics of prostate cancer cells interacting with fibronectin under in vitro conditions, *Cell Biol Int.* 36 (2012) 883-92.

- [36] D. P. White, P. T. Caswell, and J. C. Norman, alpha v beta3 and alpha5beta1 integrin recycling pathways dictate downstream Rho kinase signaling to regulate persistent cell migration, *J Cell Biol.* 177 (2007) 515-25.
- [37] A. I. Jeanes, P. Wang, P. Moreno-Layseca, N. Paul, J. Cheung, R. Tsang, N. Akhtar, F. M. Foster, K. Brennan, and C. H. Streuli, Specific beta-containing integrins exert differential control on proliferation and two-dimensional collective cell migration in mammary epithelial cells, *J Biol Chem.* 287 (2012) 24103-12.
- [38] C. Margadant, H. N. Monsuur, J. C. Norman, and A. Sonnenberg, Mechanisms of integrin activation and trafficking, *Curr Opin Cell Biol.* 23 (2011) 607-14.
- [39] C. Margadant, M. Kretz, D. J. de Groot, J. C. Norman, and A. Sonnenberg, Distinct roles of talin and kindlin in regulating integrin alpha5beta1 function and trafficking, *Curr Biol.* 22 (2012) 1554-63.
- [40] D. C. Worth, K. Hodivala-Dilke, S. D. Robinson, S. J. King, P. E. Morton, F. B. Gertler, M. J. Humphries, and M. Parsons, Alpha v beta3 integrin spatially regulates VASP and RIAM to control adhesion dynamics and migration, *J Cell Biol.* 189 (2010) 369-83.
- [41] P. T. Caswell, M. Chan, A. J. Lindsay, M. W. McCaffrey, D. Boettiger, and J. C. Norman, Rab-coupling protein coordinates recycling of alpha5beta1 integrin and EGFR1 to promote cell migration in 3D microenvironments, *J Cell Biol.* 183 (2008) 143-55.
- [42] P. T. Caswell, S. Vadrevu, and J. C. Norman, Integrins: masters and slaves of endocytic transport, *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10 (2009) 843-53.
- [43] J. P. Xiong, T. Stehle, R. Zhang, A. Joachimiak, M. Frech, S. L. Goodman, and M. A. Arnalout, Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand, *Science.* 296 (2002) 151-5.
- [44] A. P. Mould, E. J. Symonds, P. A. Buckley, J. G. Grossmann, P. A. McEwan, S. J. Barton, J. A. Askari, S. E. Craig, J. Bella, and M. J. Humphries, Structure of an integrin-ligand complex deduced from solution x-ray scattering and site-directed mutagenesis, *J Biol Chem.* 278 (2003) 39993-9.
- [45] J. Takagi, K. Strokovich, T. A. Springer, and T. Walz, Structure of integrin alpha5beta1 in complex with fibronectin, *Embo J.* 22 (2003) 4607-15.
- [46] M. Nagae, S. Re, E. Mihara, T. Nogi, Y. Sugita, and J. Takagi, Crystal structure of alpha5beta1 integrin ectodomain: atomic details of the fibronectin receptor, *J Cell Biol.* 197 (2012) 131-40.
- [47] L. Marinelli, A. Meyer, D. Heckmann, A. Lavecchia, E. Novellino, and H. Kessler, Ligand binding analysis for human alpha5beta1 integrin: strategies for designing new alpha5beta1 integrin antagonists, *J Med Chem.* 48 (2005) 4204-7.
- [48] H. B. Schiller, M. R. Hermann, J. Polleux, T. Vignaud, S. Zanivan, C. C. Friedel, Z. Sun, A. Raducanu, K. E. Gottschalk, M. Thery, M. Mann, and R. Fassler, beta1- and alphav-class integrins cooperate to regulate myosin II during rigidity sensing of fibronectin-based microenvironments, *Nat Cell Biol.* 15 (2013) 625-36.

Figure legends.

**Figure 1. Respective contributions of  $\alpha 5\beta 1$  and  $\alpha v\beta 3$  integrins in U87MG cell adhesion to fibronectin and vitronectin.**

(A) U87MG cell line was manipulated to overexpress or repress the  $\alpha 5$  integrin subunit. Verification of the  $\alpha 5$  and  $\alpha v$  integrin subunit expression by western blot (left) and  $\alpha 5$  integrin subunit expression by flow cytometry (right) in the manipulated cells. GAPDH was used as the loading control for western blot analysis. For flow cytometry studies mean  $\pm$  SEM of 4 independent experiments are shown. (B) Adhesion of U87MG cells to fibronectin (left: 1 $\mu$ g/ml; right : 3 $\mu$ g/ml) in the absence or presence of inhibitory anti- $\alpha 5$  or anti- $\alpha v$  antibodies (C) Adhesion of U87MG cells to vitronectin (1 $\mu$ g/ml) in the presence of inhibitory anti- $\alpha 5$  or anti- $\alpha v$  antibodies. Mean  $\pm$  SEM of 3-4 experiments in triplicate.

**Figure 2. Inhibition of cell adhesion to fibronectin or vitronectin by integrin antagonists**

(A) Adhesion of U87MG cells on fibronectin (1 $\mu$ g/ml) in the absence or presence of small antagonists (20 $\mu$ M). (B) Adhesion of U87MG cells on vitronectin (1 $\mu$ g/ml) in the absence or presence of small antagonists (20 $\mu$ M). Mean  $\pm$  SEM of 3-4 experiments in triplicate. (C) Dose-response curves of compound 1 ( $\alpha 5\beta 1$  integrin selective) and compound 3 ( $\alpha v\beta 3$  integrin selective) for the inhibition of U87MG- $\alpha 5+$  cell adhesion on fibronectin (solid lines) or vitronectin (dashed lines).

**Figure 3. Effects of integrin antagonists on U87MG cells wound recovery.**

(A) Representative pictures of U87MG- $\alpha 5+$  (left) and U87MG- $\alpha 5-$  (right) cell wound closure at 0h (top) and 20h (middle) and schematic representation of the recovered surface (20h) (bottom). (B) left. U87MG- $\alpha 5+$  cells were treated either by the solvent or by the different integrin antagonists at 10 or 50  $\mu$ M. Histograms represent wound closure after 20h of migration as a percent of wounded area at 0h. (mean  $\pm$  SEM of 3-4 independent experiments). (B) right. Inhibition of wound recovery by compound 2 and compound 3 (50  $\mu$ M) in U87MG- $\alpha 5+$  or U87MG- $\alpha 5-$  cells. (C). U87MG- $\alpha 5+$  cells were treated by compound 1 or compound 3 or both at 10  $\mu$ M (mean  $\pm$  SEM of 3-4 independent experiments).

**Figure 4. Effects of integrin antagonists on U87MG single cell migration. .**

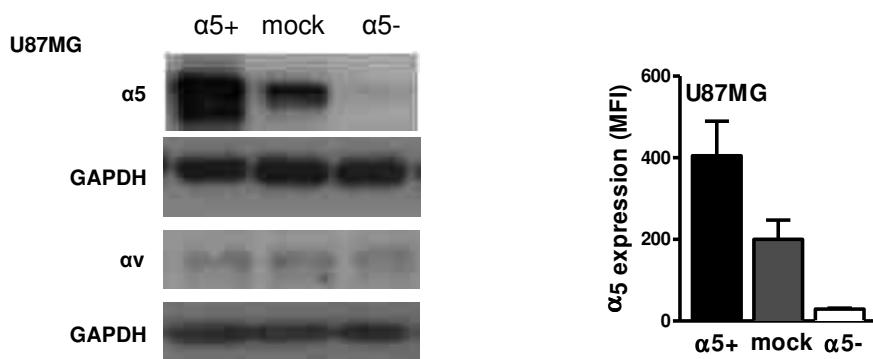
(A) (left) Speed of U87MG cells recorded during 6h in relation with  $\alpha 5$  integrin expression level. Histograms represent the mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments with 100 to 400 cells included per experiment. (right) Diagrams representing the migrating trajectories covered in 6 hours of ten representative U87MG cells. (B) (left) Analysis of U87MG- $\alpha 5+$  or U87MG- $\alpha 5-$  single cell migration treated by compounds 1 or 2 selective for  $\alpha 5\beta 1$  integrin (50  $\mu$ M). Histograms represent the ratio of antagonist-treated cell speed / solvent-treated cell speed. As control, inhibitory antibodies specific for  $\alpha 5\beta 1$  integrin (IIA1) were also included. (mean  $\pm$  SEM of 3-4 independent experiments with 100 to 400 cells included per experiment). (right) Diagrams representing the migrating trajectories covered in 6 hours of ten representative cells.(C) (left) Analysis of U87MG- $\alpha 5+$  or U87MG- $\alpha 5-$ single cell migration treated by compounds 3, 4 and cilengitide, selective for  $\alpha v\beta 3$  integrin or compound 5, non selective (50  $\mu$ M). Histograms represent the ratio of antagonist-treated cell speed / solvent-treated cell speed. As control, inhibitory antibodies specific for  $\alpha v$  integrins (69-6-5) were also included (mean  $\pm$  SEM of 3-4 independent experiments with 100 to 400 cells included per experiment). (right) Diagrams representing the migrating trajectories covered in 6 hours of ten representative cells. (D). Linear regression analysis of the cell speed plotted versus the affinities for  $\alpha v\beta 3$  integrin of the different compounds in U87MG- $\alpha 5+$  cells (solid line) or U87MG- $\alpha 5-$  cells (dashed line).

**Figure 5. Effects of integrin antagonists on U87MG cell trajectory persistence.**

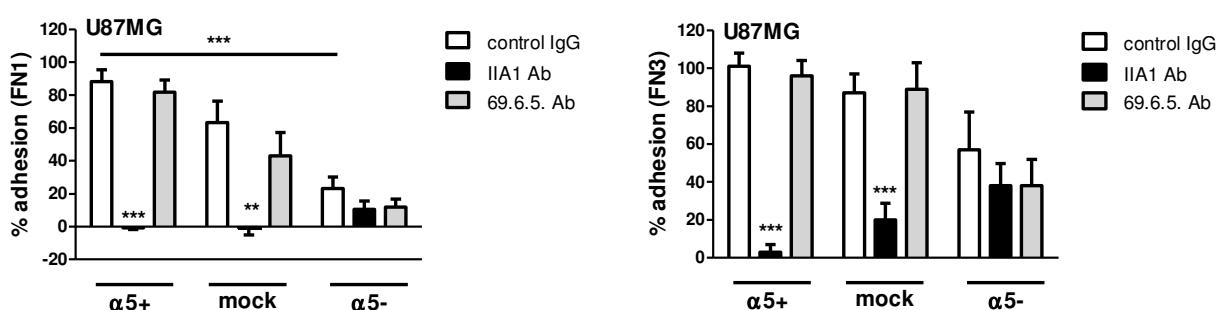
Persistence of U87MG cell migration represents the ratio of the vectorial distance to the total distance length travelled by the cells during 6 hours. Persistence of U87MG- $\alpha 5+$  (A) or U87MG- $\alpha 5-$  (B) cell migration is shown in the presence of solvent or integrin antagonists (mean  $\pm$  SEM of 3-4 independent experiments with 100 to 400 cells included per experiment).

A.

Figure 1



B.



C.

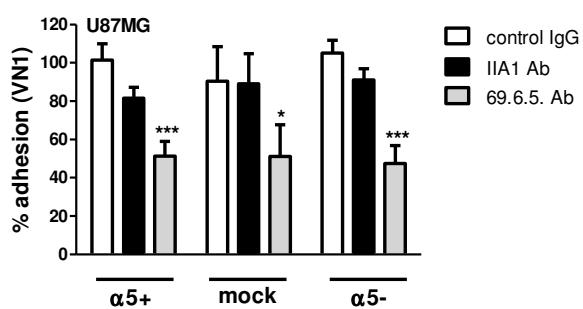
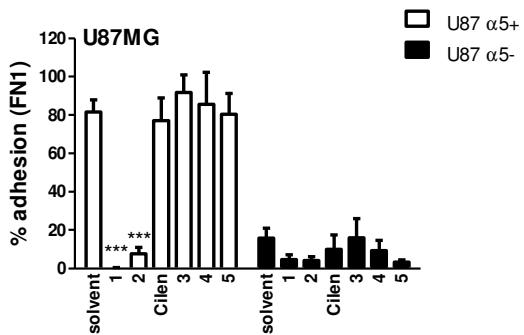
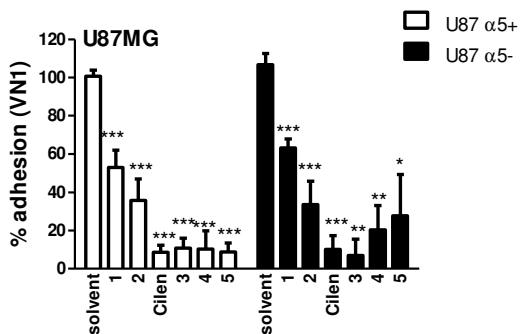


Figure 2

A.



B.



C.

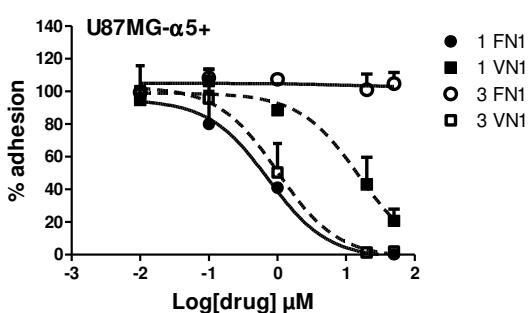
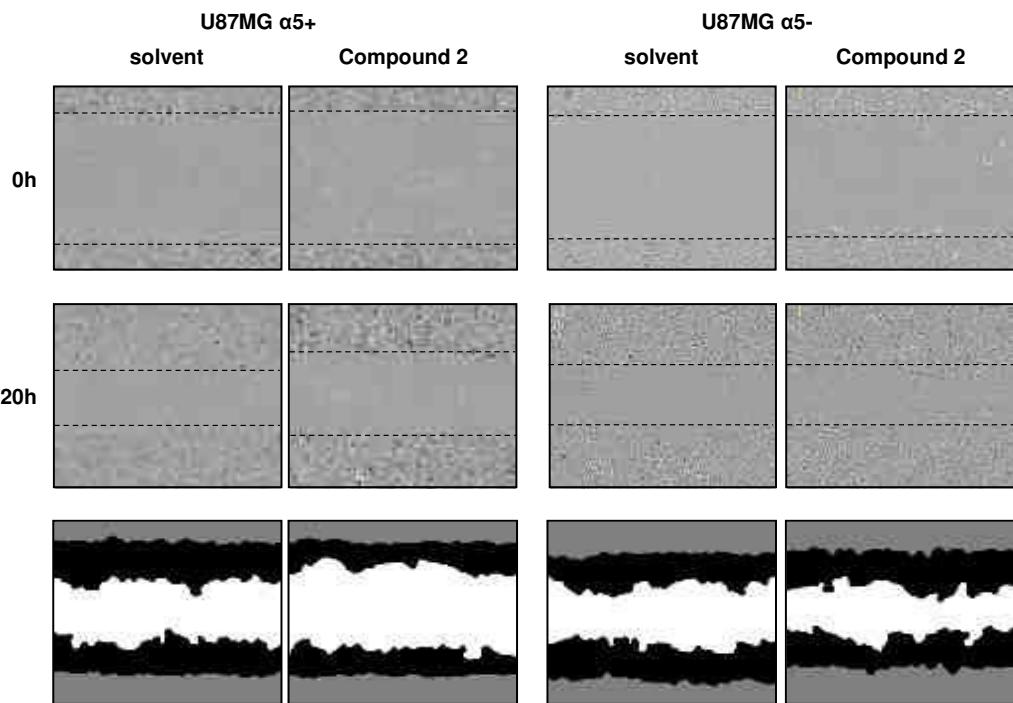
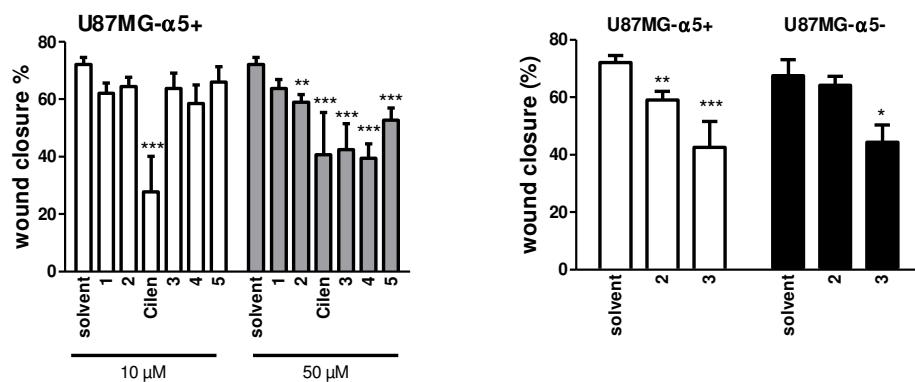


Figure 3

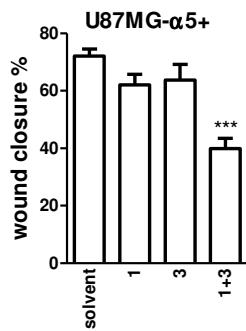
A.#



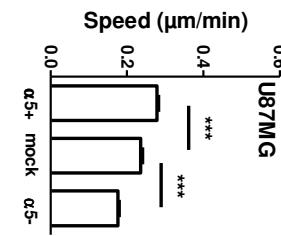
B.#



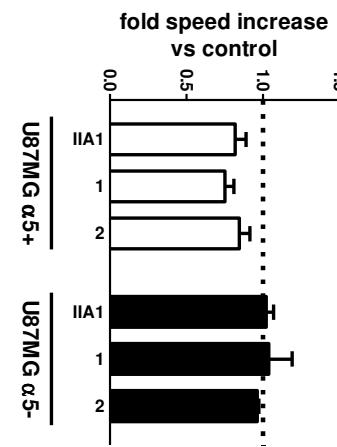
C.#



A.



B.



C.

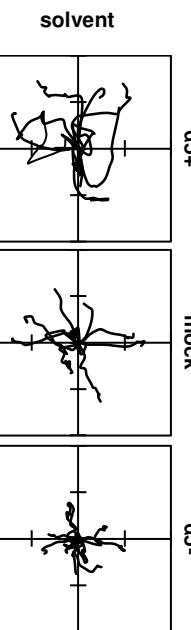
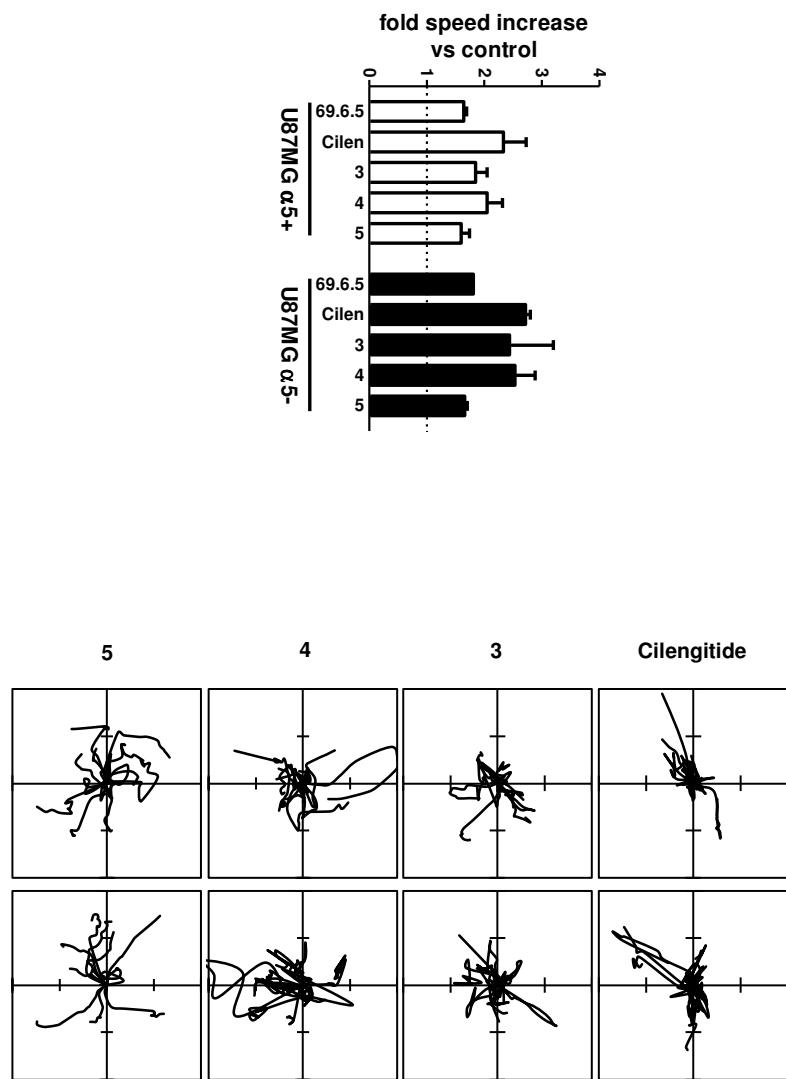


Figure 4

Figure 4

D.

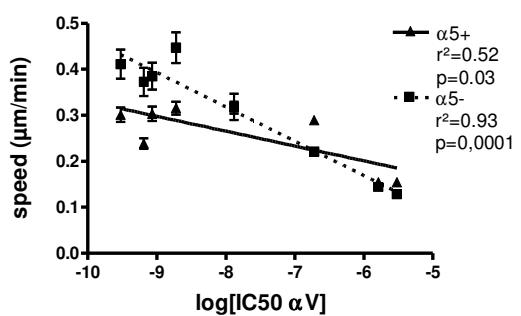
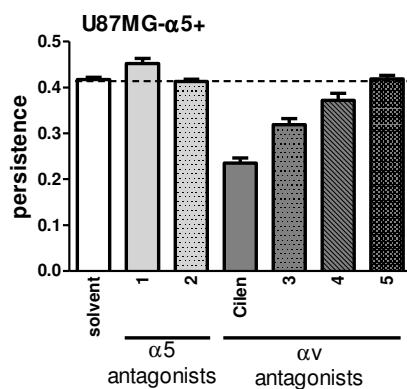
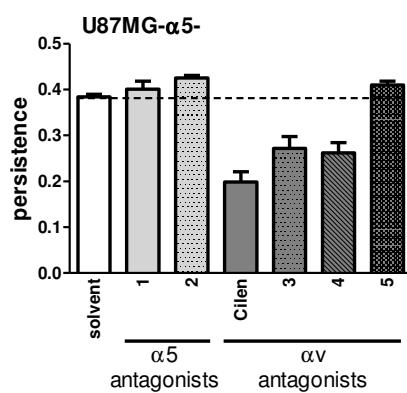


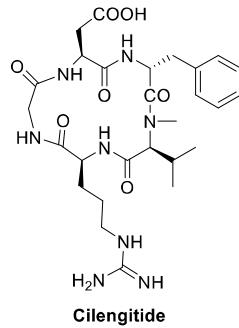
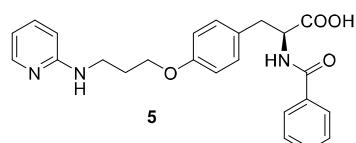
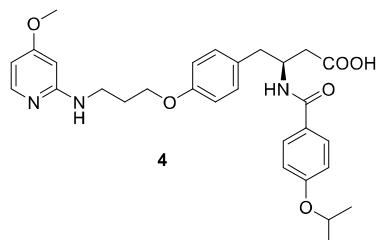
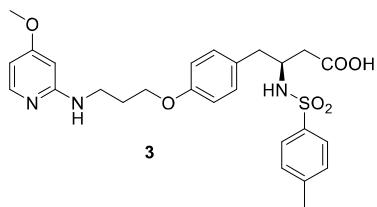
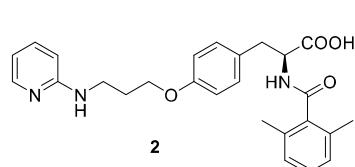
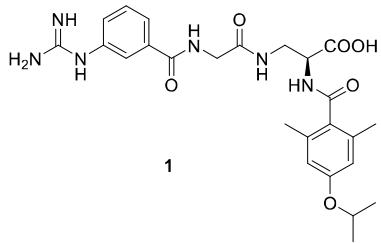
Figure 5

A.



B.





Compound	IC50 [nM] $\alpha 5\beta 1$	IC50 [nM] $\alpha v\beta 3$	References (ref., Compound name)
1	2,3	3000	Heckmann, 2008, 44b Rechenmacher 2013, 1
2	3,1	1624	Heckmann 2008, 34c
3	108	0,65	
4	127	0,86	Rechenmacher 2013, 2
5	243	190	Heckmann 2008, 34a
cilengitide	11	0,2	Rechenmacher 2013 Mas-Moruno 2011

Table 1. Structures and respective affinities of the different compounds for  $\alpha 5\beta 1$  and  $\alpha v\beta 3$  integrins.



# Conception et caractérisation d'antagonistes allostériques de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ pour le traitement des glioblastomes

## Résumé

Les intégrines, protéines transmembranaires hétérodimériques de type  $\alpha\beta$ , sont impliquées dans un grand nombre de phénomènes physiologiques et pathologiques. L'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  est considérée à l'heure actuelle comme une cible thérapeutique pertinente en oncologie, en particulier pour le traitement des glioblastomes. Ces tumeurs cérébrales très agressives résistent aux traitements actuels, en partie par leur capacité à envahir le tissu cérébral sain. Nos résultats mettent en évidence, *in vitro*, le rôle de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  dans la migration de cellules de glioblastome. Ils ont permis également de caractériser les effets inhibiteurs de la migration d'antagonistes sélectifs de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  non reproduits par des antagonistes de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$ . Pour caractériser des antagonistes originaux de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , nous avons combiné des techniques *in silico* et un test fonctionnel de migration *in vitro*. Cette démarche a permis la sélection de 3 molécules intéressantes, antagonistes allostériques de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , se démarquant des antagonistes de référence par leur capacité à inhiber la migration cellulaire sans affecter la liaison du ligand endogène de l'intégrine, la fibronectine.

Integrine  $\alpha 5\beta 1$ , antagoniste allostérique, migration, glioblastome

## Résumé en anglais

Integrins are  $\alpha\beta$  heterodimeric transmembrane proteins implicated in various physiological and pathological processes. Currently,  $\alpha 5\beta 1$  integrin is considered as a relevant therapeutic target in oncology, particularly for the treatment of glioblastomas. These highly aggressive brain tumours are resistant to current therapies, notably by their ability to invade healthy brain tissues. Our results highlight the role of the  $\alpha 5\beta 1$  integrin in the *in vitro* migration of glioblastoma cells. We characterized the inhibitory effects of selective  $\alpha 5\beta 1$  integrin antagonists in cell migration, which are not reproduced by  $\alpha V\beta 3$  integrin antagonists. To identify original and selective  $\alpha 5\beta 1$  integrin antagonists, we combined *in silico* screening and *in vitro* functional cell migration assays. This allowed the selection of 3 interesting molecules, behaving as allosteric  $\alpha 5\beta 1$  integrin antagonists. Contrarily to known  $\alpha 5\beta 1$  antagonists, our three hits inhibit cell migration without interfering with the binding of fibronectin, the endogenous ligand of this integrin.

$\alpha 5\beta 1$  integrin, allosteric antagonist, migration, glioblastoma