Etude du rôle des protéines G dans les gliomes de haut grade : implication dans la migration et le phénotype mésenchymateux

Kleouforo Paul Dembele

▶ **To cite this version:**

Kleouforo Paul Dembele. Etude du rôle des protéines G dans les gliomes de haut grade : implication dans la migration et le phénotype mésenchymateux. Cancer. Université Rouen Normandie, 2019. Français. NNT : . tel-02435413

HAL Id: tel-02435413

https://normandie-univ.hal.science/tel-02435413

Submitted on 10 Jan 2020

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

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

Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Préparée au sein de l'université de Rouen Normandie

Etude du rôle des protéines G dans les gliomes de haut grade : implication dans la migration et le phénotype mésenchymateux

Présentée et soutenue par
Kléouforo-Paul DEMBELE

Thèse soutenue publiquement le 18 décembre 2019 devant le jury composé de		
M. Laurent PREZEAU	Directeur de Recherche, Université de Montpellier	Rapporteur
M. Antoine GALMICHE	Professeur des Universités, Centre Hospitalier Universitaire Amiens-Picardie	Rapporteur
M. Vincent BEREZOWSKI	Professeur des Universités, Université de Lille-Université d'Artois	Examinateur
Mme Brigitte SOLA	Directrice de Recherche, Université de Caen Normandie	Examinateur
Mme Hélène CASTEL	Directrice de Recherche, Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse
M. Pierrick GANDOLFO	Professeur des Universités, Université de Rouen Normandie	Co-directeur de thèse

Thèse dirigée par le Dr Hélène Castel et le Pr Pierrick Gandolfo, Unité INSERM 1239, DC2N

UNIVERSITÉ DE ROUEN NORMANDIE

497 NBISE Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement

DC2N

Inserm La science pour la santé From science to health

*Le **Docteur Laurent Prézeau**, Directeur de Recherche CNRS à l'Université de Montpellier, me fait l'honneur d'être rapporteur de ce travail. Je tiens particulièrement à le remercier de m'avoir accueilli au sein de sa chaleureuse équipe de recherche, pour ses conseils et sa disponibilité au cours de mon stage. C'est pour moi un privilège que les travaux présentés dans ce manuscrit soient jugés par un spécialiste des protéines G et des récepteurs couplés aux protéines G. Je le remercie très sincèrement.*

*Le **Professeur Antoine GALMICHE**, Praticien Hospitalier et Professeur à l'Université d'Amiens-Picardie, a accepté d'être le rapporteur de ce travail, en tant qu'expert des tumeurs et des mécanismes caractéristiques de leur agressivité. Je tiens à le remercier de me faire cet honneur.*

*Le **Docteur Brigitte SOLA,** Directrice de Recherche au CNRS à l'Université de Caen Normandie, a également voulu, en tant qu'examinatrice de ce travail, apporter son regard d'experte des altérations génétiques dans les cancers hématologiques pour l'évaluation de ce travail. Je tiens à lui exprimer ma sincère reconnaissance.*

*Le **Professeur Vincent BEREZOWSKI**, Professeur à l'Université de Lille-l'Université d'Artois, me fait l'honneur d'être examinateur dans ce jury. Je tiens à le remercier sincèrement de m'avoir suivi tout au long de mes CSI, pour ses conseils très pertinents qui m'ont aidé dans la gestion de mes dernières années de thèse. C'est pour moi un privilège que les travaux présentés dans ce manuscrit soient examinés par un expert des accidents vasculaires cérébraux.*

*Au **Professeur Pierrick Gandolfo**, Professeur à l'Université de Rouen Normandie et co-directeur de cette thèse, je tiens à le remercier pour ses encouragements surtout au moment (en fin de thèse) où j'en avais le plus besoin, pour toutes les fois où il m'a soutenu dans mes démarches administratives, mais également, je ne saurais ignorer son soutien apporté indirectement à mon égard à travers ma directrice Hélène qui m'a consacré beaucoup de son temps. Je l'en remercie.*

Au ***Docteur Hélène Castel****, Directrice de Recherche à l'Inserm de l'Université de Rouen Normandie, ma directrice de thèse depuis maintenant 4 ans. Je tiens tout particulièrement à la remercier de m'avoir donné cette chance juste après mon Master, de m'avoir suivi et encadré avec beaucoup de rigueur scientifique et de patience. En effet, sa rigueur scientifique, sa persistance dans le travail, son esprit critique associés à sa disponibilité à nos sollicitudes multiples malgré un emploi du temps super chargé, forcent le respect et l'admiration. Je la remercie profondément pour son soutien, son dévouement non seulement dans la conception de ce manuscrit mais tout au long de cette thèse et lui suis très reconnaissant pour son sacrifice quotidien pour moi mais aussi pour toute l'équipe « des champions » qu'elle coach. Ces 4 années sous sa direction, m'ont permis de beaucoup m'améliorer dans la prise en charge d'un projet de recherche, en termes de présentation et valorisation des résultats mais surtout dans la rédaction d'un manuscrit. J'ai pu évoluer et acquérir sous ses ailes, des compétences qui me serviront certainement sur le plan scientifique. Aussi, je la remercie de m'avoir inculqué que "le talent sans travail n'est qu'une sale manie" et qu'il faut donc toujours aller plus loin dans la curiosité, toujours persister et se poser des questions scientifiquement pertinentes. Enfin, je lui présente toute ma sincère gratitude.*

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

Je tiens tout particulièrement à remercier le ***Laurence D.****, "la Maman" de l'équipe 3, pour sa gentillesse, sa disponibilité, sa bonne humeur et les multiples autres qualités que je ne saurais toutes mentionner. Nous avons tellement pris l'habitude de profiter de ses services qu'à son absence au labo, le vide et le besoin se font vite ressentir. Sans elle l'équipe ne serait certainement pas ce qu'elle est aujourd'hui, c'est ce que toute l'équipe dit de Laurence, en même temps c'est tellement vrai ! C'était admirable et appréciable de l'avoir au sein de l'équipe. Je la remercie également pour ses précieux conseils et son aide au quotidien, que ce soit en biologie moléculaire ou l'entretien de mes nombreuses*

lignées cellulaires. Son soutien fut constant tout au long de cette thèse et particulièrement en fin de thèse où elle a adorablement sacrifié des jours et des weekends pour m'aider à finaliser ce manuscrit. Je n'oublierai jamais toute son aide sans faille à mon égard et lui suis profondément reconnaissant.

A ***Fabrice M.****, je me rappelle encore de ses nombreuses et pertinentes questions sur mes résultats de qPCR sur l'UII/UT en début de thèse. C'était un réel plaisir d'échanger autour des résultats et tes encouragements lors de la préparation des communications orales. Je le remercie beaucoup pour son encadrement en début de thèse notamment sur la qPCR. Son aide et son soutien furent très précieux tout au long de mon projet.*

Je remercie ***Marie-Christine T.****, pour sa joie de vivre et ses petites attentions qui font plaisir au quotidien. Je remercie également* ***Oana C.*** *qui, toujours joviale et curieuse, apporte de la gaieté au sein de l'équipe.*

Un grand merci à ***Martine D.*** *pour toutes les fois où elle a adorablement accepté de s'occuper de mes souris, malgré son emploi du temps chargé au labo et à l'animalerie. Encore merci pour son temps, sa patience et son encadrement au Cryostat.*

Un grand merci aux « pingouins » ou du moins ce qui en reste car ils se sont métamorphosés depuis l'ancienne génération incluant ***Pierre-Olivier (POGy)****,* ***Jane*** *la chanteuse,* ***Pierre Michaël (PM)*** *le danseur, qui non seulement animaient bien le quotidien mais ont été des référents clés pour mon intégration au labo et pour mon initiation à de nombreuses techniques. A mon* ***POGy****, qui m'a pris sous ses ailes à mes débuts, je lui dis merci pour sa patience, sa simplicité et sa disponibilité et même après son départ. A* ***Jane****, j'espère que tu gardes encore ta chemise à carreau rouge identique à la mienne et qu'on aura l'occasion d'être en uniforme un de ces jours pour délirer en ville comme tu sais si bien le faire. A* ***PM****, un exemple de sérieux et de travail qualitatif, tu m'impressionneras toujours par ta gaieté, tes qualités. J'espère que t'as fini par nous rejoindre du « coté obscure » en abandonnant ton Nexus.*

Benjamin P. *et* ***Alexandre M.****, les derniers des « pingouins » originaux (avant la métamorphose). Mes amis au quotidien, au labo comme en dehors ; je me demande ce qu'auraient été mes journées au labo sans eux. Ils étaient toujours disponibles non seulement pour m'aider dans mes expériences les plus folles a pas d'heure mais aussi pour nos nombreuses soirées cinés ou chasse au Pokémons. Merci à eux, pour toutes les fois où ils ont été présents pour me soutenir. A* ***Benjamin P.****, sa gentillesse, sa bonne humeur et ses blagues ont rendu la vie au labo et en dehors tellement plus agréable. T'as enfin trouvé ta voie et je m'en réjouis car tu le mérites. A* ***Alexandre M.****, mention spéciale pour lui avec qui j'ai passé le plus de temps non seulement à discuter de nos expériences, à se soutenir mutuellement, à voyager pour nos nombreux congrès mais aussi nos nombreux centres d'intérêt partant des nouvelles technologies à notre passion pour les Marvels et DC, ont rendu nos échanges toujours plus intéressants et mon séjour au labo plus agréable. Cela me maquera beaucoup. Je ne saurais oublier de le remercier pour son aide généreusement apportée sur les analyses du TCGA qui ont rendu mon projet plus valorisant.*

Enfin, la métamorphose, les « pingouins » ont changé depuis en une toute nouvelle génération, tout aussi intéressante et représentant les jeunes présents au sein de l'équipe « des champions » et qui partagent l'esprit d'entraide et de solidarité régnante au sein de cette l'équipe 3. Ainsi, A mes super Stagiaires Italiens ***Céleste*** *et* ***Daniéle****, leur encadrement fut agréable par leur joie de vivre et leur détermination à m'accompagner même les weekends ou jours férié. En tant que collègues et amis ils ont apporté de précieuses aides à mon projet de recherche. A* ***Céleste****, une personne formidable et une battante ; je me rappellerai toujours de nos longues journée de qPCR et de Western blot, qui, non seulement ont contribué j'espère à ta formation mais ont certainement rendu mon projet plus valorisable. Je lui suis reconnaissant et aussi pour toutes l'aide apportée pour finaliser mon projet. Je voudrais également remercier tous les autres « champions » de l'équipe que sont* ***Martin*** *"Mystère :P",* ***Manu*** *LDM,* ***Renaud P.****, et* ***Quentin*** *L., soudés avec cet esprit d'entraide digne de vrais « pingouins », leur contribution en fin de thèse fut très bénéfique. Merci à vous et bonne continuation sur vos projets respectifs.*

Toujours disposée à aider, je tiens aussi à remercier ***Catherine B.*** *pour sa gentillesse et ses attentions à mon égard surtout dans les moments difficiles. Merci également à* ***Olivier W.*** *pour sa contribution mais aussi de m'avoir permis d'expérimenter l'enseignement et finaliser mes travaux de recherche. J'aimerai également remercier chaleureusement tous les titulaires de l'unité incluant* ***Anthony, Benjamin, Céline, Christophe, Christine, les David, Dorthe, Estelle, Isabelle, Jérôme, Julien, Loubna, Lucas, Magali, Maïté, Marie, Marjorie, Mickael, Nicolas, Saloua, Sylvie,*** *pour leur accueil au cours de ces années.*

Je souhaite remercier le Docteur ***Jean-Baptiste*** *L. et* ***Estelle D.*** *pour leur disponibilité et encadrement dans la mise au point de lignées stables. Mes remerciements concernent également* ***Arnaud A., Damien C., Julie M., Magalie B.*** *et* ***Marine D.****, qui étaient toujours disposés à m'apporter leur aide en cas de besoin sur Primacen ou à l'animalerie. Je voudrais aussi remercier tous les membres de l'équipe du Docteur* ***Laurent P.*** *et de la plateforme Arpège pour leur chaleureux accueil à Montpellier.*

Je tiens particulièrement à remercier tous les anciens comme nouveaux doctorants et postdoc/ingénieurs du DC2N, notamment ***Alexis, Amine, Audrey, Aurelien, Auriane, Cynthia, Emmanuelle, Fanny, Hugo, Houssein, Julie, Karima, Lisa, Margaux, Mahmoud, Maria, Marion, Mickael (Damilola), Mouna, Ophélie, Roxane, Sarah.*** *Votre présence et l'interaction avec les un(e)s que les autres m'ont aussi permis de ne pas me sentir seul face aux problèmes que seul un doctorant peut mieux comprendre. A* ***Sarah*** *et* ***Hugo****, nos débats entre foot et ciné me manqueront.*

Je voudrais également remercier les autres membres de l'ECODIV, en particulier ***Sékou*** *qui a été non seulement un véritable soutien, un collègue, mon meilleur ami à Rouen mais aussi un de mes coéquipiers clé de Foot. Nos parties de Foot avec tes collègues et amis* ***François, Édouard, Benoit, Marceau*** *et j'en passe, étaient de vrais moments de détente. On remet cela quand vous voulez avec* ***Hugo*** *qui n'attends que de pouvoir placer un bon petit tacle.*

Je ne s'aurait finir ces remerciements sans évoquer mes très précieux parents. Je dédie ce travail :

- *A mon père : **Kassoum Pierre DEMBELE** ou **Apa**, sans ton soutien et tes encouragements, tes conseils et l'attention permanente du vrai père que tu es, on n'en serait pas là.*
- *A ma mère : **Suzane DEMBELE** ou **TAh,** ma Maman préférée et « ma fille » je n'ai pas oublié comment tu as encadré nos premiers pas à l'école et tes sacrifices pour aider **Apa** dans tous les projets. J'ai été impressionné par ton courage, ta patience, et ta présence permanente avec chacun de nous.*

Vous avez été des modèles pour moi, sans votre rigueur, votre éducation et votre soutien sans faille, je n'en serais certainement pas là. Je ne pourrais jamais vous remercier assez ; soyez fière car ce travail est le vôtre.

*A mon grand frère **Samuel**, mon repère, ma référence. Oui, ton exemple m'a inspiré, trouve ici tout mon respect et mon affection. A mes adorables sœurs, mes "Bo-Bonne" : **Alice**, **Sabine**, **Jeannette** et **Gisèle,** Merci à vous toutes pour le soutien et l'amour que vous me témoignez malgré l'éloignement. Soyez honorées avec moi pour ce travail, car il est aussi le vôtre. Je remercie également **Bernard**, **Gisèle**, **Geneviève** et **Etienne** qu'**Apa** surnomme "des chevaliers des bonnes œuvres", je vous remercie beaucoup pour tout le soutien que vous m'avez apporté à Privas, Grenoble, ou même au Luxembourg.*

*La liste est encore longue pour pouvoir mentionner tout le monde. Je remercie énormément toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à ma réussite. J'adresse ma particulière reconnaissance à feu Monseigneur **Georges FONGHORO**, à la sœur **Catherine DEMBELE**, et à tous mes tontons, et amis de la **famille DEMBELE** à sévaré, koutiala et Bamako, à mes promotionnaires et anciens de la bourse d'excellence, ainsi qu'à tous mes **coéquipiers de foot.***

Enfin, Je rends Grâce à Dieu de m'avoir donné l'opportunité de poursuivre mes études en France, de m'avoir guidé, et assisté pour la réalisation de ce document.

Kléouforo Paul DEMBELE

Doctorant en Biologie Cellulaire
Spécialité Neurosciences
27 ans
12, Rue du Maréchal de Lattre de Tassigny
+33 6 43 29 75 18 | pauldembele22@gmail.com

CURSUS

2018 – 2019	**Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche**
2015 – 2018	**Doctorat** de Biologie Cellulaire spécialité Neurosciences, Université de Rouen. Titre : Étude du rôle de protéines G dans les gliomes de haut grade : implication dans la migration et le phénotype mésenchymateux. Laboratoire de Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine DC2N, Inserm U1239. Directeurs de Thèse : Dr H. Castel et Pr P. Gandolfo
2013 – 2015	**Master** Recherche**,** spécialité Biotechnologie et Ingénierie Diagnostiques et Thérapeutiques. Mention Assez Bien. Université Joseph Fourier, Grenoble, France.
2010 – 2013	**Licence** Biologie-Chimie, spécialité Chimie et Procédés. Mention Bien. Université Joseph Fourier, Grenoble, France
2009 - 2010	**Baccalauréat Scientifique.** Mention très Bien. Lycée Hammadoun Dicko de Sévaré, Mali.

EXPERIENCES PROFESSIONNELLES

2017 (2 mois)	**Stage collaboratif** à l'Institut de Génomique Fonctionnelle, sous la responsabilité du Dr Laurent Prézeau. Etude des couplages et voies de signalisation des récepteurs couplés aux protéines G par des techniques de BRET et FRET-HTRF.
Nov. 2018 - Août 2019	Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche
2015 – 2018	**Doctorant** titulaire d'une bourse Union Europeen-Région Haute-Normandie. **Projet :** Étude du rôle de protéines G dans les gliomes de haut grade : implication dans la migration et le phénotype mésenchymateux. Sous la codirection du Dr Hélène Castel et du Pr Pierrick Gandolfo. INSERM1239, Équipe "Astrocytes et Niche Vasculaire"
Jan. 2015-Juil. 2015	**Stage de recherche** au CEA/iRTSV/BCI, Grenoble, France. **Projet** : Etude de la "VE-cadhérine" en cancérologie. Sous la direction du Dr Isabelle Vilgrain.
Avr. 2014-Juil. 2014	**Stage de recherche** au Laboratoire d'Oncologie Cellulaire et Moléculaire (CRP-Santé), Luxembourg. **Projet** : Rôle de la "cysteine-rich protein (CRP2)" dans la progression du cancer du sein. Sous la direction du Dr Clément Thomas.
Jan. 2013-Fév. 2013	**Stage de recherche** au CERMAV/UPR 5301, Grenoble, France. **Projet :** Extraction, purification et mutagenèse dirigée de la Lectine RSL (Ralstonia solanacearum lectin). Sous la direction du Dr Anne Imberty.

Juil 2013.-Août. 2013	**Assistant** dans l'entreprise Dpointgroup, Barcelone, Espagne. **Projet** : Création de site internet et multimédia. Sous la direction de Daniel Bukin.

COMPETENCES

Biologie cellulaire	Cultures cellulaires 2D et 3D, immuno-histo/cyto-chimie, transfection cellulaire, production de particules lentivirales et infection cellulaire, mesure de la migration, prolifération, viabilité et apoptose cellulaires.
Biologie moléculaire	FRET/BRET, Western Blot, zymographie, mutagenèse dirigée, transformation bactérienne, extraction d'ADN/ARN et de protéines, design de primer, RT-qPCR.
Expérimentation animal	Acquisition de l'attestation d'expérimentation animale (formation R-59LILLE-F1-10, Lille 2016) et de chirurgie animale (I-38UGA-CHIR-16, Grenoble 2018), gestion de souris transgéniques. Chirurgie et Xénogreffe intrastriatale, prélèvement cerveau et organes.
Imagerie	Coupes au cryostat, microscopie confocale, Vidéo-microscopie, Microscopie conventionnelle.
Informatique	ImageJ, Image Lab, GraphPad Prism, Cinema4D, Adobe After Effects, Photoshop.
Langues	Français courant, Anglais professionnel.

FORMATION ET AUTRES ACTIVITES

Formations

- Chirurgie expérimentale sur rongeurs (29 mai au 2 juin 2017 à Grenoble).
- Biostatistiques (9 et 11 janvier 2017 à Rouen).
- Formation spécifique destinée aux personnes concevant les procédures expérimentales niveau I (18 au 26 janvier 2016 à Lille).
- Anglais Scientifique (7 octobre 2016 au 6 janvier 2017 à Rouen).
- Analyser et gérer le risque chimique (20 avril 2016 à Rouen).

Activités

- Membre actif du comité des jeunes chercheurs du réseau de recherche GDR GPCR3545 (2016-2018).
- Représentant doctorant de l'Ecole Doctorale Normande Biologie Intégrative, Santé, Environnement (EDnBISE) dans le comité de suivi de trois doctorants (2017 à 2019)
- Animation lors des visites annuelles du laboratoire Inserm U1239 par le Gefluc et le Crédit Agricole Normandie Seine (2016, 2017).
- Animation lors des visites annuelles du laboratoire Inserm U1239 par les étudiants de Licence et Master (2017, 2018).
- Membre de l'association des doctorants de Normandie (depuis 2015).

ACTIVITE D'ENSEIGNEMENT-ENCADREMENT

Nov. 2018 - Août 2019	Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche
Avr. 2019 - Juin. 2019	Encadrement de M[r] Sen Yan dans le cadre de stage de Master 1 « Tissue, Cell and Gene Biotherapies » (Université Paris-Sacley). Formation aux techniques de culture cellulaire en Neurosphère, Western blot, RT-PCR.
Fév. 2018 - Juil. 2018	Encadrement de M[elle] Celeste Nicola dans le cadre de stage de Master 2 Neurobiologie (Université de Turin, Italie). Formation aux techniques de culture cellulaire, migration cellulaire, Western blot, RT-PCR.
Avr. 2018 - Juin 2018	Encadrement de M[elle] Margaux Clomenil dans le cadre de son stage de Master 1 Neurosciences, Université de Rouen Normandie. Formation à la culture cellulaire, transfection cellulaire, Immunocytochimie, migration et prolifération cellulaires, Western blot.

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

Art.1 : Le Joncour, V., Guichet, P.O., **Dembélé, K.P.**, Mutel, A., Poret, B., Perzo, N., Desrues, L., Modzelevski, R., Bohn, P., Vera, P., Couraud, P.O., Honnorat, J., Laquerrière, A., Marguet, F., Ferracci, F.X.; Langlois, O., Morin, F., Gandolfo*, P. and Castel* H. Targeting the urotensin II/UT G protein-coupled receptor to counteract angiogenesis and mesenchymal hypoxia/necrosis in glioblastoma. (*Soumis)*

Art.2 : Kasapidou, P.M., **Démbélé, K.P.**, Desrues, L., Gubala, V. and Castel* H. Injectable hyaluronic acid-based hydrogels for attracting and trapping invasive glioma cells in vitro. (*En prépararion)*

Art.2 : **Dembélé, K.P.**, Mutel, A., Clatot, F., Gandolfo, P. and Castel* H. Analysis of expression a vasoactive UII/UT and a professional CXCl12/CXCR4 chemokine systems in a series of head and neck tumors : association with the nmetastasis process. (*En préparation)*.

Art.3 : **Dembélé, K.P.**, Mutel, A., Desrues, L., Nicola, C., Guichet, P.O., Bérard C., Mouchard L., Dupel, E., Latouche, J.B., Laquerrière, A., Marguet, F., Langlois, O., Morin, F., Gandolfo, P. and Castel* H. G proteins expression determines glioma subgroup signature: specific role of Gα15 in GBM mesenchymal phenotype. (*En préparation)*.

COMMUNICATIONS ORALES

Dembélé K.P., Mutel, A., Desrues, L., Nicola, C., Guichet, P.O., Bérard C., Mouchard L., Dupel, E., Latouche, J.B., Laquerrière, A., Marguet, F., Langlois, O., Morin, F., Gandolfo, P. and Castel, H.: Analysis of G protein expression level and functions in glioma development. 7th annual Meeting GDR3545, GPCR-Physio-Med. Strasbourg, France, October 29-31, 2018.

Dembélé K.P., Mutel, A., Desrues, L., Nicola, C., Guichet, P.O., Bérard C., Mouchard L., Dupel, E., Latouche, J.B., Laquerrière, A., Marguet, F., Langlois, O., Morin, F., Gandolfo, P. and Castel H.: G proteins as key regulators of GPCR-regulating survival and migration of high-grade gliomas. 20ème Journée de l'Ecole Doctorale Biologie Intégrative, Santé et Environnement (JED), Le Havre, France, March 16-17, 2017.

COMMUNICATIONS AFFICHEES *(ne sont listés que les communications en premier auteur)*

- **International**

Dembélé K.P., Guichet P.O., Mutel A., Dupel E., Laquerrière A., Marguet F., Ferracci F.X., Coly P.M., Langlois O., Latouche J.B., Prézeau L., Gandolfo P., Morin F. and Castel H.: G proteins as key regulators of chemokine peptide receptors regulating proliferation and migration of high-grade glioma cells. 22nd International Symposium on Regulatory Peptides, RegPep 2018, Acapulco, Mexico, September 22-25, 2018.

Dembélé K.P., Guichet P.O., Mutel A., Dupel E., Laquerrière A., Marguet F., Ferracci F.X., Coly P.M., Langlois O., Latouche J.B., Gandolfo P., Morin F. and Castel H.: Characterization of the expression of the urotensinergic system and associated G proteins in brain tumors. International Regulatory Peptide Society Congress, Rouen, France, July 11-15, 2016

- **National**

Dembélé K.P., Guichet P.O., Mutel A., Dupel E., Laquerrière A., Marguet F., Ferracci F.X., Coly P.M., Langlois O., Latouche J.B., Gandolfo P., Morin F. and Castel H.: G proteins as key regulators of glioma aggressiveness. La Journée Normande de Recherche Biomédicale, JNRB, Caen, France, November 14, 2017.

Dembélé K.P., Guichet P.O., Mutel A., Dupel E., Laquerrière A., Marguet F., Ferracci F.X., Coly P.M., Langlois O., Latouche J.B., Gandolfo P., Morin F. and Castel H.: G proteins as key regulators of brain tumor. 6th annual meeting of the GDR 3545 RCPG-PhysioMed 2017, Paris, France, November 22-24, 2017.

Dembélé K.P., Guichet P.O., Mutel A., Dupel E., Laquerrière A., Marguet F., Ferracci F.X., Coly P.M., Langlois O., Latouche J.B., Gandolfo P., Morin F. and Castel H.: G protein as key regulators of GPCR-regulating brain tumors cells signaling. 21st annual meeting of the LARC-Neuroscience, Lille, France, October 13, 2017.

Dembélé K.P., Guichet P.O., Mutel A., Dupel E., Laquerrière A., Marguet F., Ferracci F.X., Coly P.M., Langlois O., Latouche J.B., Gandolfo P., Morin F. and Castel H.: G proteins as key regulators of GPCR-regulating survival and migration of high-grade gliomas. Colloque de la Société des Neurosciences, NeuroFrance 2017, Bordeaux, France, May 17-19, 2017

Dembélé K.P., Guichet P.O., Mutel A., Dupel E., Laquerrière A., Marguet F., Ferracci F.X., Coly P.M., Langlois O., Latouche J.B., Gandolfo P., Morin F. and Castel H.: Niveaux de protéines G et impact sur la survie et la migration des gliomes de haut-grade. 10ème journées scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest. Deauville, France, May 10-12, 2017.

Dembélé K.P., Guichet P.O., Mutel A., Dupel E., Laquerrière A., Marguet F., Ferracci F.X., Coly P.M., Langlois O., Latouche J.B., Gandolfo P., Morin F. and Castel H.: Characterization of chemotactic GPCRs and G proteins in brain tumors. 5th annual meeting of the GDR 3545 RCPG-PhysioMed 2016, Tours, France, November 22-24, 2016.

Dembélé K.P., Guichet P.O., Mutel A., Dupel E., Laquerrière A., Marguet F., Ferracci F.X., Coly P.M., Langlois O., Latouche J.B., Gandolfo P., Morin F. and Castel H.: Characterization of the expression of the urotensinergic system and associated G proteins in brain tumors. 1ère Journée Normande de Recherche Biomédicale IRIB-ICORE, Rouen, France, September 16, 2016.

Dembélé K.P., Guichet P.O., Mutel A., Dupel E., Laquerrière A., Marguet F., Ferracci F.X., Coly P.M., Langlois O., Latouche J.B., Gandolfo P., Morin F. and Castel H.: Characterization of the urotensinergic angiogenic and chemokine system in brain tumors. 19ème Journée de l'Ecole Doctorale Biologie Intégrative, Santé et Environnement (JED), Caen, France, March 10-11, 2016.

Résumé

Représentant environ 45% de tous les gliomes, le GBM est la tumeur cérébrale la plus agressive chez l'adulte. Comme nous l'avons décrit dans l'introduction de ce manuscrit, le caractère très hétérogène du GBM associé aux signatures moléculaires et expressions géniques, mais également aux conditions microenvironnementales hypoxique et inflammatoire, contribuent à la récidive quasi-systématique après exérèse complète-radio/chimiothérapie, et expliquent les nombreux échecs thérapeutiques. Malgré l'arsenal thérapeutique potentiellement disponible, appliqué parfois de manière multimodale, la survie des patients atteints de GBM n'est pas significativement améliorée, les défis à relever pour améliorer cette survie et la qualité de vie des patients restent énormes. Ainsi, l'identification de facteurs exprimés de manière différentielle qui pourraient mieux définir le comportement agressif des cellules de GBM fournirait une base pour le développement de thérapies innovantes et peut-être plus efficaces.

Une des caractéristiques des GBMs est leur capacité très migratoire et invasive, relayées principalement par des facteurs chimiotactiques dans un microenvironnement tumoral hypoxique et inflammatoire. Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) et leurs ligands, particulièrement les RCPGs de chimiokines, surexprimés dans les GBMs et stimulant la migration chimiotactique, l'invasion et l'angiogenèse jouent un rôle majeur dans le développement des GBMs et l'acquisition d'un phénotype agressif. Dans ce contexte, notre équipe avait démontré que le récepteur UT de l'urotensine II (UII), une chimiokine peptidique pro-angiogénique et pro-inflammatoire, ainsi que le système chimiokine bien connu SDF-1α/CXCR4 semblent systématiquement co-exprimés dans les GBMs, plus spécifiquement dans les zones vasculaires et périnécrotiques, montrant une corrélation avec le grade des gliomes. *In vitro*, nous avions aussi établi que l'UII/UT stimule la migration chimiotactique des cellules de GBM *via* les couplages de type Gαi/PI3K et Gα13/Rho/ROCK, des couplages précédemment mis en évidence pour le système SDF-1α/CXCR4 et d'autres RCPGs chimiotactiques. De plus, une récente analyse de la base de données TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) en composante principale réalisée par Alexandre Mutel, étudiant en thèse dans l'équipe, a permis d'identifier la signature d'expression des RCPGs exprimés dans les gliomes et particulièrement dans les GBMs, qui révèle un nombre très important de RCPGs chimiotactiques. Dans l'ensemble, leur expression et activité signalisante redondantes fréquemment associées à la tumorigenèse, en particulier dans les GBMs, soulignent l'intérêt d'étudier les nœuds de signalisation communs à l'ensemble de ces RCPGs chimiokines. Ces nœuds sont principalement représentés par les

protéines G hétérotrimériques composées des sous-unité α, β et γ, qui couplent ces RCPGs et relayent les effecteurs secondaires intracellulaires, probablement essentiels à la régulation de l'agressivité des GBMs.

Ainsi, l'objectif de mon travail de thèse était d'identifier les principales protéines Gα, β et γ parmi les 31 protéines G exprimées chez l'Homme dans les gliomes et celles plus spécifiquement associées au degré de malignité, et à l'agressivité des GBMs puis à déterminer le rôle d'une de ces protéines G dans les mécanismes de prolifération et d'invasion de cellules de GBM.

Dans un premier temps, nous avons analysé l'expression des 31 sous-unités (15α, 5β et 11γ) de protéines G sur la base de données transcriptomiques du *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), et démontré que les niveaux d'ARNm codant pour les sous-unités Gαz, Gαi1, Gβ4, Gβ5 et Gγ3 sont relativement faibles dans les GBMs tandis que les sous-unités Gα12, Gα13, Gα15, Gαi2, Gαi3, Gβ2, Gγ5, Gγ11 et Gγ12 sont particulièrement surexprimées dans les GBMs et sont associées à un mauvais pronostic en termes de récidive et de survie du patient. Nous avons ensuite confirmé par qPCR que les protéines G identifiées sont bien exprimées dans des prélèvements de GBMs de patients obtenus en collaboration avec le service d'anatomopathologie du CHU de Rouen (Collaboration Pr A. Laquerrère) ainsi que dans 6 lignées cellulaires de gliome. Les analyses des données du TCGA associées aux informations cliniques des patients indiquent que ces sous-unités sont toutes associées à un mauvais pronostic de survie chez les patients atteints de gliome. Aussi, l'inhibition de l'expression des sous-unités Gα15, Gαi3 ou Gβ2 dans la lignée de GBM U87 entraîne une diminution de la prolifération/survie et des adhésions associées à la migration cellulaire. Ainsi, nous proposons que les protéines identifiées (Gα15, Gαi3, Gβ2, Gγ5, Gγ10, Gγ11 et Gγ12) représentent des marqueurs de malignité des GBMs ; et contribuent au phénotype agressif d'invasivité des GBMs. Parmi ces protéines Gα, β ou γ identifiées, nous nous sommes focalisés plus particulièrement sur Gα15, une sous-unité atypique non ubiquiste longtemps décrite comme spécifique aux cellules souches hématopoïétiques. Cette dernière semble également être exprimée *de novo* dans les gliomes de haut-grade, et plus particulièrement dans les GBMs neuraux et mésenchymateux. Ainsi, nous avons recherché si l'expression de cette sous-unité Gα15 dans des cellules de GBM, contrôle les mécanismes de prolifération et d'invasivité et constitue une potentielle cible thérapeutique.

Pour mieux analyser la fonction de Gα15, nous avons utilisé la technologie siRNA, shRNA ou CRISPR-Cas9 pour inhiber l'expression ou inactiver de manière stable le gène GNA15 (Gα15-KO) dans les lignées cellulaires de GBM U87 et 8MG. A partir de ces cellules, nous

avons démontré que la sous-expression de Gα15 ou son inactivation réduit significativement le nombre de cellules (comptage au *Nucleocounter*) ainsi que la viabilité des cellules de GBM (mesure de l'activité métabolique des cellules déterminée par le clivage WST-1). Ces résultats démontrent que Gα15 est une protéine G impliquée dans la survie des cellules de GBM, mais ne modifie pas le cycle cellulaire, et ce en l'absence d'activation d'un RCPG.

Le GBM se caractérise aussi par son comportement fortement invasif. Ce comportement est l'une des caractéristiques qui contribuent à la récurrence et au mauvais pronostic des GBMs. La migration et l'invasion des cellules tumorales est un processus coordonné en plusieurs étapes comprenant la réorganisation dynamique du cytosquelette d'actine, des protrusions membranaires comme les lamellipodes, la formation de complexes d'adhésion, la contraction du corps cellulaire et le détachement de la queue cellulaire pour la migration mésenchymateuse. Dans ce contexte nous avons démontré que la répression de l'expression de Gα15 diminue significativement la migration des cellules de GBM dans les tests de migration en transwell et de *wound healing*, alors que sa surexpression favorise la migration. En évaluant la motilité cellulaire par vidéomicroscopie, nous observons que les cellules contrôles U87 émettent des lamellipodes orientées pour migrer, alors que les cellules clonales Gα15-KO ne sont pas polarisées et montrent une diminution significative de la longueur des trajectoires parcourues associée à une vitesse moyenne de déplacement réduite par rapport aux cellules U87. Les études d'immunocytochimie révèlent que l'inactivation de Gα15 entraîne une réduction significative du nombre de complexes d'adhésion focal (FA) riches en Phospho-paxillin et en vinculine (deux protéines majeures des FA), et altère le remodelage du cytosquelette d'actine (polymérisation des fibres de stress d'actine) associé à une diminution significative de l'émission des lamellipodes. Au contraire, les cellules sur-exprimant Gα15 présentent une exacerbation de la concentration des protéines formant le complexe FA et du nombre de lamellipodes. Ces observations montrent que Gα15 joue un rôle majeur dans la régulation de la migration/invasion et la survie associées à la croissance des GBMs.

Afin d'identifier les principales voies de signalisation régulées par Gα15 pour stimuler ces processus, nous avons analysé par Western blot les voies de signalisation oncogénique et identifié que l'inactivation de Gα15 inhibe significativement la voie ERK1/2, réduit considérablement l'expression de STAT3, de Akt et de la β-caténine. De plus, l'analyse du niveau d'expression de l'ARNm codant trois effecteurs principaux de Gα15 (PLCβ1, PLCβ2 et TPR1) a révélé une diminution significative de l'expression de PLCβ2 dans les cellules U87 Gα15-KO, suggérant un mécanisme commun entre PLCβ2 et Gα15 dans les GBMs. Ces données permettent de proposer que Gα15 (1) stimule au moins l'activation de ERK1/2 et

STAT3 via la voie PLCβ2/PKC favorisant une haute survie/prolifération des cellules de GBM, (2) favorise la voie PI3K/Akt aboutissant à l'expression et/ou l'activation de NF-κB et de la β-caténine pour réguler l'expression de nombreux gènes pro-tumorigène, et (3) peut réguler la polymérisation d'actine dépendante de PLCβ2 et stimuler les voies de signalisation intracellulaires (ERK, Akt,…) associées aux protéines d'adhésions paxilline et vinculine.

Pour mieux comprendre si l'agressivité des gliomes favorisée par Gα15 est associée à la régulation de la transition mésenchymateuse, nos études de qPCR ou immunocytochimiques montrent que l'inactivation de Gα15 dans les cellules de GBM est suffisante pour diminuer de manière significative l'expression (1) des ARNm des facteurs de transcription (TFs) mésenchymateux incluant C/EBPβ, RUNX1, FOSL2, BHLHB2, ZEB1, et la translocation membranaire de N-cadhérine, (2) de marqueurs pro-angiogéniques (Angiogénine et VEGFA) et (3) de la SERPINA1 pro-inflammatoire et du TF KLF4 marqueur de cellules souches. En revanche, l'expression des ARNm de répresseurs tumoraux (DKK1, ZNF238) ainsi que du marqueur de cellules souches SOX2 activateurs de la voie DKK1, est significativement inhibée dans les cellules Gα15-KO. Ensemble, ces résultats mettent en évidence le rôle essentiel de Gα15 dans l'expression marqueurs oncogénique ainsi que dans l'acquisition du phénotype mésenchymateux des gliomes, permettant la mise en place d'un microenvironnement tumoral immunosuppresseur et angiogénique soutenant l'agressivité des GBMs.

Enfin, pour évaluer l'importance de Gα15 dans la croissance et l'invasivité des GBMs *in vivo*, des xénogreffes orthotopiques des U87 contrôles, de deux clones U87 Gα15-KO ainsi que des U87 sur-exprimant Gα15 ont été réalisés chez la souris *Nude,* dans le striatum. Nos résultats montrent une survie significativement améliorée des souris lorsque Gα15 est inactivée (survie médiane de 60 et 84 jours pour les clones KO 26-1 (p=0,0436) et KO 26-6 (p=0,0016) respectivement contre 44 jours pour les U87, et une survie réduite des souris *Nude* xénogreffées par les cellules sur-exprimant Gα15 (50 jours contre 61 jours pour le contrôle, p=0,0326). Ces résultats démontrent que la sous-unité Gα15 est une protéine impliquée dans l'agressivité des GBMs *in vivo.*

En conclusion, nos résultats montrent que l'expression de Gα15 est suffisante pour maintenir la survie et entraîner la migration des cellules de GBM, et favorise l'expression ou l'activation de facteurs impliqués dans la transition mésenchymateuse, l'angiogenèse, le statut souche et l'inflammation. Bien que des expériences complémentaires s'avèrent nécessaires pour confirmer les voies et mécanismes associés à Gα15, ces travaux originaux ouvrent des pistes et perspectives sur le potentiel diagnostique de Gα15 pour les GBM mésenchymateux et inflammatoire, et thérapeutique pour cibler les GBMs les plus invasifs et résistants.

Abstract

GBM is the most common (~45% of all gliomas) and aggressive primary malignant brain tumor in adults. As described in this document's introduction, GBM highly heterogeneous phonotype associated with molecular signatures and gene expressions, but also with hypoxic and inflammatory microenvironmental conditions, contribute to frequent recurrence after complete resection-radio/chemotherapy, and explain the multiple therapeutic failures. Most of the current treatment options for GBM, although sometimes multimodal, the survival of GBM patients is not significantly improved, and the challenges to improve patient survival and quality of life remain enormous. Thus, the identification of differentially expressed factors that could better define the biological behavior of GBM, would provide a basis for the development of novel therapies and may be more effective.

One of the characteristics of GBMs is their highly migratory and invasive properties, relayed mainly by chemotactic factors belonging to the hypoxic and inflammatory tumor microenvironment. G-protein coupled receptors (GPCRs) and their ligands, particularly the chemokines GPCRs, overexpressed in GBMs and stimulating migration, invasion and neoangiogenesis, play a key role in the development of GBM and the acquisition of an aggressive phenotype. In this context, our team demonstrated that UT, the receptor of urotensin II (UII), a pro-angiogenic and pro-inflammatory chemokine, as well as the well-known chemokine system SDF-1/CXCR4 are systematically co-expressed in GBMs particularly in vascular and perinecrotic areas and their expression are correlated with grade. We also demonstrated *in vitro* that UII/UT stimulate GBM cells chemotactic migration and invasion via activation of the pathways Gαi/PI3K and Gα13/Rho/ROCK, pathways that have previously been identified for the SDF-1α/CXCR4 system and other chemotactic GPCRs. In addition, a recent principal component analysis of TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) database performed by Alexandre Mutel, PhD student in the team, has identified the expression signature of GPCRs in gliomas and particularly those which are overexpressed in mesenchymal GBM, among which many chemotactic GPCRs are included. Taking together, their redundant expression and signaling activity frequently associated with tumorigenesis, particularly in GBMs, raises the issue of studying signaling nodes common to all these GPCRs. These nodes, are primarily represented by heterotrimeric G proteins, composed of α, β and γ subunits, that couple these GPCRs relaying many intracellular secondary effectors, probably essentials in the regulation of GBM aggressiveness.

In this context, the aim of my thesis work was to identify the main Gα, β and γ subunits among the 31 G proteins expressed in human gliomas and those more specifically associated with the malignant grade, and the aggressiveness of GBMs and then to determine the role of one of these specific G proteins in GBM cells proliferation and invasion mechanisms.

For that, we first analyzed the expression of the 31 subunits (15α, 5β and 11γ) of G proteins from the TCGA database and showed that the mRNA expression of Gαz, Gαi1, Gβ4, Gβ5 et Gγ3 are relatively low in GBMs while Gα12, Gα13, Gα15, Gαi2, Gαi3, Gβ2, Gγ5, Gγ11 and Gγ12 subunits, are particularly overexpressed in GBM and are associated with a poor prognosis in terms of recurrence and patient survival. We then confirmed by RT-qPCR the high expression of these interesting identified G proteins by analyzing their expression in 6 different glioma cell lines as well as in GBM patient biopsies obtained in collaboration with the pathology department of Rouen University Hospital (Collaboration Pr A. Laquerrère). TCGA database analysis associated with the clinical information of patients indicate that these subunits are all associated with a poor prognosis for glioma patient survival. Moreover, the downregulation of Gα15, Gαi3 or Gβ2 in U87 GBM cell lines significantly decrease the cells proliferation/survival, adhesion associated with migration. Thus, we propose these identified G proteins (Gα15, Gαi3, Gβ2, Gγ5, Gγ10, Gγ11 and Gγ12) as GBM malignancy biomarkers and they could contribute to the GBM aggressive phenotype. Among all the identified G proteins, we specifically focused on Gα15, an atypical and non-ubiquitous G protein long described to be specific to hematopoietic stem cell. The latter seems to be also expressed *de novo* in high-grade gliomas, more particularly in neural and mesenchymal GBMs. Thus, we investigated whether the expression of this Gα15 subunit in GBM cells, controls the mechanisms of proliferation/invasion and is a potential therapeutic target.

To better analyze the function of Gα15, we used siRNA, shRNA or Crispr-Cas9 technology to stably inactivate GNA15 (Gα15-KO) gene in U87 and 8MG cell lines. From these cells, we have demonstrated that Gα15 silencing or knockout significantly decreases the number (nucleocounter counting) and viability of GBM cells (measure of cells metabolic activity determined by WST-1 cleavage). These findings demonstrated that Gα15 is an important G protein implicated in cell survival, without affecting the cell cycle, in the absence of GPCR activation.

GBM is also characterized by its highly invasive behavior. This behavior in GBM is one of the hallmarks that contribute to tumor recurrence and poor prognosis of GBM. Tumor cell migration and invasion is a coordinated multi-step process including the dynamic reorganization of the actin cytoskeleton, membrane protrusions like lamellipodia, formation of

adhesion complexes, cell body contraction, and tail detachment for mesenchymal migration. In this context we have demonstrated that the repression of Gα15 expression significantly decreases the number of migrated GBM cells in transwell migration and wound healing assays, while its overexpression has opposite effects. Interestingly, using videomicroscopy for time-lapse recordings of cell motility, we observed that U87 control cells emits lamellipodia in the front of the cells to migrate whereas Gα15-KO clones failed to be polarized, exhibited a reduced trajectory length associated with average speed as well as cumulative distances significantly lowered compared with U87 control cells. Immunocytochemistry analysis revealed that the inactivation of Gα15 significantly reduces the number of focal adhesion complex (FA) rich in Phospho-paxillin and vinculin (two major proteins of FA), and impairs actin cytoskeleton remodeling (actin stress fibers polymerization) associated with a significant decrease of well-formed lamellipodia number. However, Gα15 overexpressing cells exhibit an exacerbation of both FA proteins and lamellipodia number. These observations show that Gα15 plays a major role in the regulation of migration/invasion and survival associated with GBMs growth.

In order to identify the main Gα15-regulated signaling pathways to stimulate these processes, we analyzed the oncogenic signaling pathways by western blot and identified that Gα15 inactivation significantly inhibits the activation of ERK1/2 pathway, critically reduces the expression of STAT3, Akt and β-catenin. In addition, analysis of mRNA expression level of three main effectors of Gα15 (PLCβ1, PLCβ2 and TPR1) revealed only a significant decreased expression of PLCβ2 in Gα15-KO cells, suggesting a common mechanism between PLCβ2 and Gα15 in GBMs. In agreement with these data we hypothesized that Gα15 (1) stimulates at least ERK and STAT3 activation via PLCβ2/PKC pathway promoting high proliferation/survival of GBM cells, (2) stimulates PI3K/Akt pathway resulting in the expression and/or activation of NF-κB and β-catenin to regulate numerous aggressive gene expression, (3) probably regulates the actin polymerization through PLCβ2 and stimulates intracellular signaling pathways (ERK, Akt…) associated with adhesion protein paxillin and vinculin.

To further understand whether gliomas aggressiveness regulated by Gα15 is associated to the regulation of mesenchymal transition, we analyzed by RT-qPCR or immunocytochemistry and demonstrated that Gα15 knockout in GBM cells is sufficient to significantly decrease (1) the mRNA expression of several mesenchymal transcription factors (TFs) including C/EBPβ, RUNX1, FOSL2, BHLHB2, ZEB1, N-cadherin membrane translocation, (2) pro-angiogenic markers (Angiogenin and VEGFA), (3) the expression of inflammatory marker SERPINA1 and a stemness TF KLF4. However, the mRNA expression of potential tumor repressors (DKK1,

ZNF238) as well as the stemness gene SOX2 which is a key activator of DKK1 pathway, were significantly decreased in Gα15-KO cells. Collectively, these results highlight the essential role of Gα15 in the expression of oncogenic markers as well as in the acquisition of glioma mesenchymal phenotype, promoting the establishment of immunosuppressive and angiogenic microenvironment supporting GBM aggressiveness.

Finally, to evaluate the importance of Gα15 in the growth and invasiveness of GBMs *in vivo*, orthotopic xenografts of U87 controls, two U87 Gα15-KO clones and U87 overexpressing Gα15 were performed in *Nude* mice, intrastrially. Our results show a significant improved survival of mice when Gα15 is knockout (prolongs the median survival to 60 and 84 days for KO 26-1 (p=0,0436) and 26-6 (p=0,0016) respectively vs 44 days for the control), and its overexpressing cells xenografted in *Nude* mice exhibit the poorest survival rates (50 days vs 61 days for the control, p = 0,0326). These results strongly suggest that Gα15 subunit is involved in GBM aggressiveness *in vivo*.

In conclusion, our results show that Gα15 expression is sufficient to maintain the survival, to stimulate the migration of GBM cells, and to promote the expression or activation of factors involved in the mesenchymal transition, angiogenesis, stemness and inflammation status. Although additional experiments are needed to confirm the pathways and mechanisms associated with Gα15, these original works open important perspectives on the diagnostic potential of Gα15 for mesenchymal and inflammatory GBMs, and therapeutics to target the most invasive and resistant GBMs.

Sommaire

Résumé ……

Abstract ……..

Sommaire 1

Liste des Abréviations 5

Liste des Figures 13

Liste des Tableaux 16

CHAPITRE 1 : LES TUMEURS CEREBRALES GLIALES 17

1. Généralités et épidémiologie 17

1.1. Épidémiologie et facteurs de risque 17

1.2. Diagnostic 18

2. Classification des gliomes 20

2.1. Les principales altérations moléculaires identifiées dans les gliomes 20

2.1.1. Mutations dans IDH1/2 20

2.1.2. Mutations de TP53/PTEN 21

2.1.3. Mutations de ATRX 22

2.1.4. Codélétion 1p/19q et mutations dans les gènes CIC et FUBP1 22

2.1.5. EGFR 23

2.2. Les altérations des principales voies de signalisation dans les GBMs 25

2.3. Sous-classes moléculaires des GBMs 27

2.3.1. GBM classique 27

2.3.2. GBM mésenchymateux 28

2.3.1. GBM proneural 28

2.3.2. GBM neural 29

3. Physiopathologie du GBM 30

3.1. Agressivité du GBM 30

3.1.1. Hétérogénéité du GBM 31

3.1.2. Caractéristiques cellulaires et moléculaires du microenvironnement des GBMs 33

3.1.2.1. Les composants cellulaires du microenvironnement tumoral (TME) 33

3.1.2.1.1. Hypoxie et cellules souches de GBM (CSG) 38

3.1.2.2. Les caractéristiques vasculaires des GBMs 40

3.1.2.3. Matrice extracellulaire du GBM (MEC) 41

4. Prise en charge thérapeutique 43

4.1. Stratégies thérapeutiques actuelles 43

4.1.1. La chirurgie 43

4.1.2. Radiothérapie / Chimiothérapie 44

4.1.3. Les thérapies combinées dans le traitement des GBMs 48

4.1.4. Autres Stratégies thérapeutiques innovantes 52

5. Agressivité des GBMs et transformation mésenchymateuse 54

5.1. Réarrangement du cytosquelette, des complexes d'adhésion, et protrusions cellulaires des GBMs 55

5.2. Les Rho GTPases dans la TM des GBMs 59

5.3. Régulation des voies de signalisation et des facteurs de transcription impliqués dans la TM des GBMs 60

6. Structure et classification des RCPGs 65

7. RCPGs et cancers 67

8. Implication des RCPGs dans l'agressivité des GBMs 69

CHAPITRE 2 : LES PROTEINES G HETEROTRIMERIQUES 75

1. Découverte des protéines 75

1.1. Phylogénie des sous-unités Gα 76

2. Structure des protéines G hétérotrimériques 82

2.1. Structure des sous-unités Gα 82

2.2. Structure des sous-unités Gβγ 87

3. Les sous-unités α des protéines G 89

3.1. La famille Gαs 92

3.2. La famille Gαi/o 93

3.3. La famille Gαq/11 94

3.4. La famille Gα12/13 96

4. Les sous-unités Gβ et Gγ des protéines G 96

5. Principe de la signalisation des protéines G hétérotrimériques 99

5.1. Le couplage des protéines G aux récepteurs 100

5.1.1. Les mécanismes d'activation des protéines G 106

5.1.1. Cycle des protéines G 108

5.1.1.1. Relargage du GDP de la sous-unité Gα 109

5.1.1.2. Liaison du GTP et dissociation du complexe trimérique 110

5.1.2. Les effecteurs des protéines G 112

5.1.2.1. Les effecteurs des sous-unités Gα 112

5.1.2.1.1. Les adénylyl-cyclases (AC) 112

5.1.2.1.2. Les phospholipases C (PLC) 114

5.1.2.1.2.1. Caractéristiques structurelles des PLCβs 114

5.1.2.1.2.2. Distribution tissulaire et régulation des PLCβs 116

5.1.2.1.2.3. Signalisation de la PLCβ dans le noyau 117

5.1.2.1.2.4. Rôle physiologique et physiopathologique des PLCβs 118

5.1.2.1.2.5. La signalisation du DAG / PKC 120

5.1.2.1.3. Les protéines RhoGEF 124

5.1.2.2. Les effecteurs des sous-unités Gβγ 125

5.2. Activation des protéines G indépendamment des RCPGs 127

5.2.1. Les NDPKs 127

5.2.2. Les AGS 128

5.2.3. Les régulateurs de la signalisation des protéines G (RGS) 132

6. Les modifications des protéines G 134

6.1. Régulation post-transcriptionnelle de l'expression des protéines G 134

6.1. Régulation des facteurs de transcription par les protéines G 135

6.1. Les modifications post-traductionnelles des protéines G 138

6.1.1. Modifications lipidiques des protéines G et leur trafic membranaire 138

6.1.2. Phosphorylation des protéines G 140

7. Rôle des protéines G dans la physiopathologie du cancer 143
7.1. Implication des protéines G dans la Survie/Prolifération/Invasion 143
7.2. Implication des protéines G dans l'adhésion/migration/métastases 145
7.3. Les protéines G en tant que régulateurs directs de l'agressivité tumorale 150
CHAPITRE 3 : LA SOUS-UNITE Gα15 159
1. Structure et modification de la sous-unité Gα15 159
2. Spécificité de l'expression de Gα15 161
3. Rôle physiologique et physiopathologique de la sous-unité Gα15 162
3.1. Promiscuité et fonction physiologique de Gα15 162
3.2. Implication de la sous-unité Gα15 dans la physiopathologie du cancer 165
Objectifs de thèse 169
Résultats 171
Discussion 267
1. Les RCPGs de chimiokines et protéines Gα, β ou γ dans les GBMs 268
2. La fonction pro-prolifération de Gα15 272
3. La migration mésenchymateuse dépendante de Gα15 dans les GBMs 278
4. La sous-unité Gα15, régulatrice du phénotype mésenchymateux des GBMs 285
5. Expression de Gα15 dans les cellules de gliome et le statut inflammatoire du GBM 289
Conclusion et perspectives 295
Références bibliographiques 303

Liste des Abréviations

α2AR : Récepteur α2-adrénergique
A2aR : Récepteur de l'adénosine A2a
A/Ala : Alanine
AC : Adénylyl-cyclase
Ach : Acétylcholine
ADAM : *A disintegrin and metalloproteinase*
ADM : Adrenomedulline
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADP : Adénosine disphophate
AGS : *Activators of G protein signaling*
AMOT : Angiomotine
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
AngII : Angiotensine II
AP-1 : Protéine activatrice 1
ARNm : Acide ribonucléique messager
Arp2/3 : *Actin-related protein 2/3*
AT1 : Récepteur de l'angiotensine de type 1
ATP : Adénosine triphosphate
ATRX : *X-linked gene of α-thalassemia and mental retardation syndrome*
β_2AR : Récepteur β-adrénergique de type 2
βARK : Kinase spécifique des récepteurs β-adrénergiques
B1R, B2R : Récepteur B1 ou B2 de la bradykinine
Bax : *B-cell lymphoma 2-associated X*
BBB : *Blood Brain Barrier*
Bcl-2 : *B-cell lymphoma-2*
BCL-x1 : *B-cell lymphoma-extra large*
BCNU : *1,3-bis (2-chloroéthyl)-1-nitrosourea*
BER : *Base excision repair*
BMDM : *Bone marrow-derived macrophages*
BHE : Barrière hémato-encéphalique
bHLHB2 : *Basic helix-loop-helix transcription factors B2*
C5aR : Récepteur du complément C5a
CaM-KII : Calmoduline-kinase II dépendante du Ca^{2+}
CCL2/7/22 : Chimiokine C-C de type 2/7/22
CCT : *Chaperonin-containing T-complex protein 1*
CD133 : *Prominin-1*
CD44, 109 : *Cluster of differenciation 44, 109*
CDC4 : *Cell division control protein 4*
CDK2NA : *Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*
CDK4 : *Cyclin-dependent kinase 4*
C/EBPβ : *CCAAT/enhancer-binding protein beta*
cGAMP : *Guanosine-Adenosine 2',3'-cyclic monophosphate*
CIC : *Capicua transcriptional repressor*
CL : GBM classique
CNS : *Central nervous system*
COSMIC : *Catalogue of somatic mutations in cancer*
COX2 : Cyclooxygénase 2

CpG : Cytosine-phosphate-guanine
CREB : *cAMP response element-binding protein*
CSG : Cellules souches de gliome
CSP : *J domain-containing cysteine string protein*
CT : Domaine C-terminal
CTD : Domaine C-terminal proximal
CTLA-4 : *Cytotoxic T-lymphocyte- associated antigen-4*
CTR : Récepteur de la calcitonine
CTX : Toxine cholérique
CX3CL1 : *C-3X-C motif chemokine ligand 1*
CXCL8/12 : *C-X-C motif chemokine ligand 8/12*
CXCR2 : *C-X-C Receptor 2*
CXCR4 : *C-X-C Receptor 4*, récepteur du SDF-1α
D/Asp : Acide aspartique
D2,3,4,5 : Récepteur dopaminergique de type 2,3,4 ou 5
DAG : Diacylglycérol
DAPI : 4',6'-diamidino-2-phenylindole
DARPP : *Dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein*
DC : Cellule dendritique
DHHC3,7 : *Motif Asp-His-His-Cys palmitoyl acyl-transferase 3,7*
DISC : *Death-inducing signaling complex*
DLL : *Delta-like ligand*
DMEM : *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DOCK180 : *Dedicator of cytokinesis 1*
DOR : *δ-opioid receptor*
DRiP78 : Protéine d'interaction du récepteur de la dopamine 78
DTM : Domaines transmembranaires
E/Glu : Acide glutamique
EGF : *Epidermal growth factor*
EGFR : Récepteur de l'*epidermal growth factor*
EGFRvIII : Variant III de l'EGFR
ELMO1 : *Engulfment and cell motility 1*
EMT : Transition épithélio-mésenchymateuse
EPR2 : Récepteur de la Prostaglandine E2
ERK : *Extracellular-signal-regulated kinase*
ET-1 : Endothéline 1
F/Phe : Phenylalanine
FA : *Focal adhesion*
FAK : *Focal adhesion kinase*
FDA : *Food and Drug Administration*
FGF : *Ftgfibroblast growth factor*
FGFR : *Fibroblast growth factor receptor*
FLAIR : *Fluid attenuated inversion recovery*
FOSL2 : *Fos-related antigen 2*
FRET : *Fluorescence resonance energy transfer*
FSK : Forskoline
FUBP1 : *Far upstream element binding protein 1*
Gα : Sous-unité α des protéines G
Gβγ : Sous-unités βγ des protéines G

G/Gly : Glycine
GABA : *Gamma aminobutyriric acid*
GAP : *GTPase-activating protein*
GBA : *Gα-binding and activating*
GBM : Glioblastome
GCB-DLBCL : *Germinal-Center B Cell-Diffuse large B-cell lymphoma*
G-CIMP : *Glioma CpG Island methylator phenotype*
GDP : Guanosine diphosphate
GEF : *Guanine-nucleotide exchange factor*
GEM : *Guanine-nucleotide exchange modulator*
GIRK : *G-protein-coupled inwardly-rectifying potassium cannels*
GIV : *Gα-interacting vesicle-associated protein*
GLI : *Glioma-associated oncogene*
GLP1R : Récepteur du *glucagon-like peptide* 1
GMPc : *Cyclic guanosine monophosphate*
GNA, GNB, GNG : Gène codant les protéines G α, β et γ respectivement
GPR : *G protein regulatory* ou motif GoLoco
GRAFS : *Glutamate, Rhodopsin, Adhesion, Frizzled/Taste, Secretine*
GRK : *G protein-coupled receptor kinase*
GRRR : *Gastrin-releasing peptide receptor*
GSC : *Glioblastoma stem cell*
GSK : *Glycogen synthase kinase*
GTP : Guanosine triphosphate
2-HG : 2-Hydroxyglutarate
H/His : Histamine
H_2O_2 : Péroxyde d'hydrogène
HA : Acide hyaluronique
HAX-1 : *HS-1-associated protein X-1*
HBSS : *Hanks'Balanced Salt Solution*
HDAC : *Histone deacetylase*
HEK293 : *Human embryonic kidney cell 293*
HGF/SF : *Hepatocyte growth factor/scatter factor*
HGG : *High grade glioma*
HIF-1α/β, 2α/β : *Hypoxia-induced transcription factor-1α/β, 2*α/β
$5HT_{1B}R$, $5HT_{2C}R$: Récepteurs de la sérotonine de type 1B ou 2C
HGF-SF *: Hepatic growth factor-scatter factor*
I/Ile : Isoleucine
ICL : *Intracellular loop*
IDH1/2 : *Isocitrate dehydrogenase 1/2*
IFN-α/γ : Interferon α/γ
IGF-1 : *Insulin-like growth factor-1*
IHC : Immunohistochimie
IKK : *IκB kinase*
IL-2/6/8/10 : Interleukine 2/6/8/10
IP_3 : Inositol triphosphate
IP_3R : Récepteur de l'inositol triphosphate
IRM : Imagerie par résonance magnétique
ITH : Hétérogénéité intratumorale
IUPHAR : Union Internationale de la Pharmacologie de Base et Clinique

JAK2/3 : *Janus kinase 2/3*
JNK : *c-Jun N-terminal kinase*
kDa : Kilo Dalton
K/Lys : Lysine
α-KG : α-cétoglutarate
KO : *Knockout*
KOR : *κ-opioid receptor*
L/Leu : Leucine
LAM : Cellule murine leucémique érythroblastique
LARG : *Leukemia-associated RhoGEF*
LATS : *Large tumor suppressor*
LCA : Dernier ancêtre commun
LGG : *Low grade glioma*
LPA : *Lysophosphatidic acid*
LPAR : *Lysophosphatidic acid receptor*
LPS : Lipopolysaccharide
M/Met : Méthionine
M1R, M3R : Récepteurs muscariniques de type 1 ou 3
MAPK : *Mitogen activated protein kinase*
MDM2/4 : *Murine double minute 2/4*
MEC : Matrice extracellulaire
MEK : *Mitogen-activated protein kinase/ERK kinase*
MES : GBM mésenchymateux
MG : Microglie
MGMT : *O-6-methylguanine-ADN methyltransferase*
mGluR2/5 : Récepteur métabotropique du glutamate de type 2/5
miARN : micro-ARN
MIF : *Macrophage Migration Inhibitory Factor*
MMP-2/9 : Métalloprotéases matricielles 2/9
MOB1 : *Mps one binder 1*
MT : *Mesenchymal transition*
mTOR : *Mammalian target of rapamycin*
N/Asn : Asparagine
NAD+ : Nicotinamide adénine dinucléotide
NCT : *National Clinical Trial*
NDP : *Nucleoside diphosphate*
NDPK : *Nucleoside diphosphate kinase*
NDS : *Normal donkey serum*
Nesp55 : Protéine neuroendocrine secrétoire de 55 kDa
NF1 : Neurofibromin 1
NF-κB : *Nuclear factor-kappa B*
NHERF1 : *Na^+/H^+ exchange regulatory factor 1*
NKCC1 : *Na-K-Cl cotransporter*
NL : GBM neural
NTP : *Nucleoside triphosphate*
NUCB1,2 : Nucleobindine 1,2
OCT-4 : *Octamer-binding transcription factor*
OLIG2 : *Oligodendrocyte transcription factor 2*
OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OS : *Overall survival*
P/Pro : Proline
$p21^{ras}$: *HRas, transforming protein 21*
p38 : MAPK de type p38
PAR-1 : *Protease-activated receptor-1*
PARP : *Poly(ADP-ribose) polymerase*
PCA : *Principal component analysis*
PD-1 : *Programmed cell death 1*
PDAC : *Pancreatic ductal adenocarcinoma*
PDB : *Protein Data Bank*
PDE : Phosphodiestérase
PDGF : *Platelet-derived growth factor*
PDGFRα/β : *Platelet-derived growth factor receptor α/β*
PDK1 : *Pyruvate deshydrogenase kinase 1*
PD-L1 : *Programmed death-ligand 1*
PDZ : *Post-synaptic density protein, Drosophila disc larg tumor suppressor and Zonula occludens-1 protein.*
PE : Ester de phorbol
PFA : Paraformaldéhyde
PGE2 : Prostaglandine E2
PHD : *Prolyl hydroxylase domain*
PhLP1 : *Phosducin-like protein 1*
PIP_2 : Phosphatidylinositol 4, 5-biphosphate
PI3K : Phosphatidylinositol 3 kinase
PKA : Protéine kinase AMPc-dépendante
PKB : Protein kinase B
PKC : Protéine kinase C
PKD : Protéine kinase D
PLC : Phospholipase C
PMT : Transition proneuro-mésenchymateuse
PN : GBM proneural
P-rex-1 : *PIP_3-dependent rac exchanger 1*
PS : Domaine pseudo-substrat
PTEN : *Phosphatase and tensin homolog*
pTERT : *Telomerase reverse transcriptase gene promoter*
PTX : Toxine pertussique
PVDF : *PolyVinyliDene Fluoride*
PYK2 : *Protein Tyrosine Kinase 2 Beta*
Q/Gln : Glutamine
2R WGD : Deux évênements de duplication du génome entier
R/Arg : Arginine
RAF : *Proto-oncogene Serine/Threonine-Protein Kinase*
RAMP2/3 : *Receptor activity modifying protein-2 and -3*
RAP1 : *Ras-related protein 1*
RAP1GAP : *RAP1 GTPase activating protein*
RAS : *Rat sarcoma GTPase*
RB : *Retinoblastoma*
RCPG : Récepteur couplé aux protéines G
RE : Reticulum endoplasmique
RGS : *Regulator of G-protein signaling*

RhoA : *Ras homolog gene family, membre A*
RhoGEF : *Guanine exchange factor for Rho*
Ric-8 : *Resistance to inhibitors of cholinesterase-8*
ROCK : *Rho-associated protein kinase*
ROS : *Reactive oxygen species*
RT : Radiothérapie
RTK : Récepteur tyrosine-kinase
RT-qPCR : *Quantitative reverse transcription Polymerase chain reaction*
RUNX1 : *Runt-related transcription factor 1*
S/Ser : Sérine
SDF-1 : *Stromal cell-derived factor 1, CXCL12*
SDS : Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE : *Sodium dodécyl sulfate- Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis*
Shh : *Sonic hedgehog*
shRNA : *Small hairpin ribonucleic acid*
siRNA : *Small interfering ribonucleic acid*
α-SNAP : *α-soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein*
SNC : Système nerveux central
SOX2 : *Sex determining region Y-box 2*
S1P : Sphingosine 1-phosphate
S1PR : *Sphingosine 1-phosphate receptor*
SSTR1/2 : Récepteur de la somatostatine de type 1/2
STAR : *Structured Transparent Accessible Reporting*
STAT1/3 : *Signal transducer and activator of transcription 1/3*
STE2,3 : *Receptor for alpha factor pheromone*
SVF : Sérum de veau foetal
T/Thr : Thréonine
TAMs : *Tumor-associated macrophages and microglia*
TAZ : *Tafazzin*
TCF/LEF : *T-cell factor/lymphoid enhancer binding factor*
TCGA : *The Cancer Genome Atlas*
TEAD : *Transcriptional-enhanced associated domains*
TFs : Facteurs de transcription
TGF-β : *Transforming growth factor β*
TIM : *Triose-phosphate isomérase*
TLR4 : *Toll-like receptor-4*
TM : Domaine transmembranaire
TM : Transition mésenchymateuse
TME : Microenvironnement tumoral
TMZ : Témozolomide
TNF-α : *Tumor necrosis factor α*
TP53 : *Tumor protein 53*
TPR1 : domaine tétratricopeptide-1
TRAIL : *Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand*
Treg : Lymphocyte régulateur
TRIO : Protéine à domaine triple fonctionnel
TRPM8 : *Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily M Member 8*,
TSHR : *Thyroid-stimulating hormone receptor*
UBC : *Ubiquitin C*

UII : Urotensine II
uPA : *Urokinase plasminogen activator*
UT : Récepteur de l'urotensine II
V/Val : Valine
$V_{1A}R$, V_2R : Récepteurs de la vasopressine de type 1A ou 2
VDCC : *Voltage-dependent calcium channel*
VEGF *: Vascular endothelial growth factor*
W/Trp : Tryptophane
WASP : *Wiskott-Aldrich syndrome protein*
WAVE 1-3 : *WASP-family verprolin-homologous protein* 1-3
WD40 : Motif WD40
WGD : *Whole genome duplication*
WHO : *World Health Organization*
Wnt : *Wingless-type MMTV integration site family*
XIAP : Protéine inhibitrice de l'apopotose lié au chromosome X
Y/Tyr : Tyrosine
YAP : *Yes-associated protein*
ZEB1/2 : *Zinc finger E-box-binding homeobox ½*
ZNF238 : *Zinc finger protein 238*

Liste des Figures

Figure 1. Répartition des tumeurs cérébrales primaires et des autres tumeurs du système nerveux central (SNC) diagnostiquées aux États-Unis en 2010-2014 ……..**17**

Figure 2. Représentation schématique des principales altérations histologiques et génétiques répertoriées dans la classification des gliomes par l'OMS (2007/2016) ……..**23**

Figure 3. La chronologie des principales étapes d'intégration des données de génomique et d'épigénomique qui ont directement ou indirectement révélé les phénotypes moléculaires et cliniques du gliome associés aux sous-ensembles de G-CIMP ……**24**

Figure 4. Les principales altérations génétiques observées dans les principales voies de signalisation dans les GBMs ……..…**27**

Figure 5. Classification des sous-types de glioblastomes d'après Verhaak et prévalence de chaque sous-type (NL, neural ; PN, proneural ; MES, mesenchymal ; CL, Classique) dans tous les gliomes malins ……**28**

Figure 6. La transition proneuro-mésenchymateuse (PMT) ……..**29**

Figure 7. Hétérogénéité du GBM ……..**32**

Figure 8. Les composants cellulaires du microenvironnement des GBMs ……**36**

Figure 9. Représentation des principaux mécanismes tumoraux régulés par l'hypoxie et les HIFs……**39**

Figure 10. Les changements spécifiques de la matrice extracellulaire (MEC) dans une tumeur cérébrale par rapport à la MEC du cerveau normal ……**42**

Figure 11. Protocole de Stupp ……**45**

Figure 12. Résumé des mécanismes de résistance au TMZ dans les GBMs ……**.47**

Figure 13. Principales voies de signalisation altérées dans le GBM et cibles thérapeutiques Identifiées ……...**48**

Figure 14. Chronologie des essais cliniques de phase III chez des patients de GBM nouvellement diagnostiqué ou récurrent ……**51**

Figure 15. Représentation schématique des mécanismes impliqués dans la migration mésenchymateuse de cellules de GBM ……..……**58**

Figure 16. La signature moleculaire mésenchymateuse des gliomes de haut grade (HGG) est contrôlée par six facteurs de transcription (TFs) ……**63**

Figure 17. Structure générale des RCPGs ……..**66**

Figure 18. Classification des RCPGs ……**66**

Figure 19. Représentation schématique des processus importants dans la progression tumorale impliquant les RCPGs……..**69**

Figure 20. Exemple non exhaustive de l'implication de quelques RCPGs dans le développement du GBM ……...**73**

Figure 21. Arbre phylogénétique et alignement des exons des sous-unités Gα ……**78**

Figure 22. Évolution et alignement des cinq familles de sous-unités Gα …….. **80**

Figure 23. Modèle évolutif proposé pour l'expansion des familles de gènes des protéines G hétérotrimériques au début de la tétraploïdisation des vertébrés …… **82**

Figure 24. Schéma de la structure tertiaire de $p21^{ras}$ (A) et modèle proposé pour la structure tertiaire de Gα ……...……..**82**

Figure 25. Représentation de la structure modélisée des sous-unités Gα et Gβγ des protéines G……..**84**

Figure 26. Régions de la sous-unité Gα qui interagissent avec les RCPGs ……**86**

Figure 27. Structure cristallographique des sous-unités Gβγ et régions conservées interagissant avec les RCPGs …….. **88**

Figure 28. Alignement des différentes sous-unités Gα mettant en évidence les positions invariables et distinctes …….. **91**

Figure 29. Représentation schématique du locus GNAS ……..**93**

Figure 30. Relation phylogénétique des sous-unités Gβ et Gγ chez l'Homme ……..**99**

Figure 31. Sélectivité de la signalisation protéine G-RCPG ……**102**

Figure 32. Propriétés de couplage des protéines G aux RCPGs ……...**103**

Figure 33. Résidus clés des RCPGs impliqués dans la sélectivité du couplage des protéines G ……**105**

Figure 34. Les deux versions du cycle d'activation des protéines G hétérotrimériques ……...**111**

Figure 35. Structure des isozymes de PLCβ et des variantes d'épissage ……..**115**

Figure 36. Diversité des rôles des AGS et des protéines associées ……..**129**

Figure 37. Représentation schématique de l'activation des protéines G hétérotrimérique dépendante et indépendante des RCPGs ……..**131**

Figure 38. Régulation des protéines G par les chaperons ……**136**

Figure 39. Modèle de modification lipidique et trafic membranaire des protéines G Hétérotrimériques ……**140**

Figure 40. Les facteurs impliqués dans la modulation de la signalisation des protéines G hétérotrimériques ……...**142**

Figure 41. Exemples schématiques de l'implication des protéines G dans la survie, la prolifération ou l'invasion après l'activation par un RCPG ……..**145**

Figure 42. Exemples schématiques de l'implication des protéines G dans l'adhésion, la migration et les métastases après l'activation par un RCPG ……**148**

Figure 43. Implication des sous-unités Gβγ dans la migration des cellules de cancers métastatiques...**149**

Figure 44. Résumé schématique de l'implication directe des sous-unités Gα dans la survie, la prolifération et l'invasion tumorale ……...**153**

Figure 45. Résumé schématique de l'implication directe du dimère Gβγ dans la survie, la prolifération et l'invasion tumorale ……..**155**

Figure 46. Structure secondaire de la sous-unité Gα15 avec les modifications covalentes et régions interagissant avec les récepteurs ……...**160**

Figure 47. Expression de la sous-unité Gα15 ……..**162**

Figure 48. Les voies de signalisation régulées par Gα15 ……..**166**

Figure 49. Schéma hypothétique de la croissance des cellules de GBM induite par Gα15 ……**277**

Figure 50. Gα15 régule la migration des cellules de GBM par stimulation de la formation de complexes d'adhésion focale et par remodelage du cytosquelette d'actine ……**283**

Figure 51. Schéma hypothétique résumant les potentielles voies de signalisation régulées par Gα15 pour favoriser l'agressivité des GBMs ……**292**

Figure 52. Gα15 favorise la formation des complexes d'adhésion focale (FA) riches en paxilline stimulée par l'UII ou SDF-1α ……..**298**

Figure 53. Effet de la surexpression de Gα15 sur l'activation de protéines G par l'UII ……**299**

Figure 54. Gα15 semble favoriser le phénotype souche des GBMs en stimulant la croissance en gliomasphères ……**300**

Liste des Tableaux

Tableau 1. Les différentes sous-unités Gα et leurs expressions ……... **90**

Tableau 2. Les différentes sous-unités Gβ et Gγ et leurs fonctions …….. **98**

Tableau 3. Distribution et régulation des AC ……..**113**

Tableau 4. Mécanismes d'activation des isoformes de PKC et leur rôle dans la tumorigenèse ……**121**

Tableau 5. Régulation de l'activité transcriptionnelle par les protéines G ……...**137**

Tableau 6. Les phosphosites des protéines G et les fonctions connues dans la signalisation ……**142**

Tableau 7. Revue non exhaustive des protéines G comme modulateur de l'agressivité tumorale ….**157**

Tableau 8. Différents récepteurs couplés à Gα15 induisant l'activation de la PLCβ et une mobilisation intracellulaire rapide de Ca^{2+} ……..**164**

CHAPITRE 1 : LES TUMEURS CEREBRALES GLIALES

1. Généralités et épidémiologie

1.1. Épidémiologie et facteurs de risque

Les gliomes représentent environ 27% de toutes les tumeurs cérébrales et environ 80% des tumeurs malignes (Figure 1) avec un taux d'incidence annuel de 2 à 3 cas pour 100 000 habitants aux États-Unis (Amirian et al., 2016; Ostrom et al., 2017). Selon les critères histopathologiques de l'organisation mondiale de la santé (OMS 2007, Louis et al., 2007)), ces tumeurs peuvent être subdivisées en plusieurs types spécifiques et en 4 degrés de malignité. Les tumeurs les plus courantes sont plutôt de type oligodendrogliale (grades II à III) ou astrocytaire (grades I à IV), dont le plus haut grade (IV), correspond classiquement au glioblastome dit multiforme (GBM).

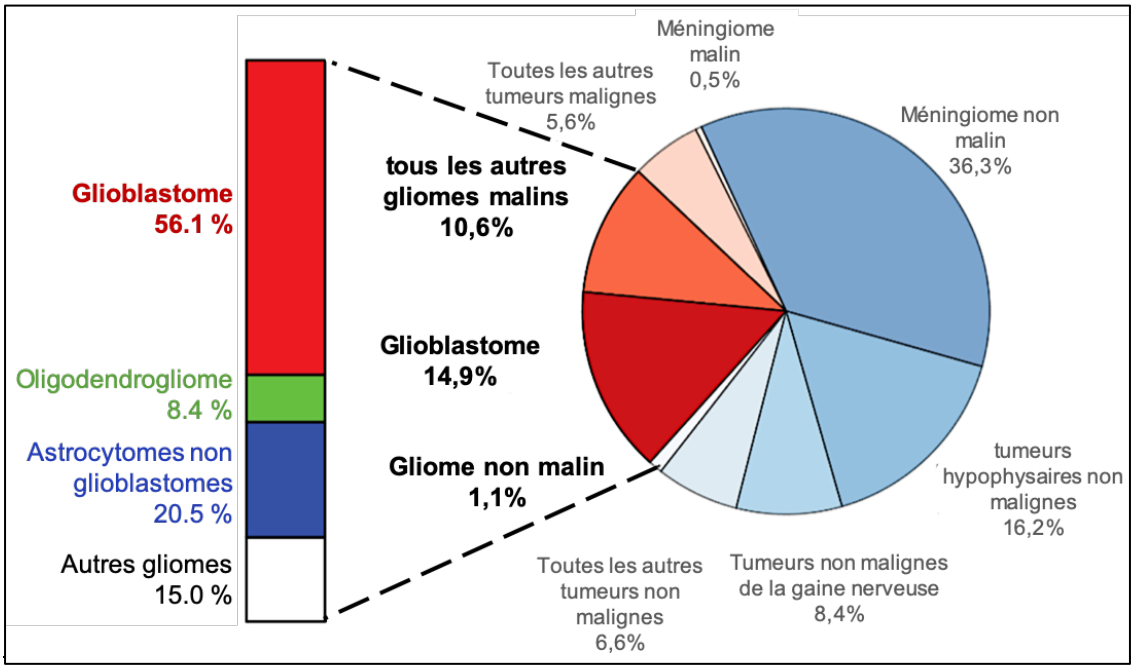


Figure 1. Répartition des tumeurs cérébrales primaires et des autres tumeurs du système nerveux central (SNC) diagnostiquées aux États-Unis en 2010-2014. (D'après Ostrom et al., 2017).

L'incidence des gliomes varie considérablement en fonction du type histopathologique, de l'âge, au diagnostic, du sexe, de l'ethnicité et de la localisation géographique. En général, ces tumeurs sont plus fréquentes avec l'âge, le sexe masculin, ou dans la population blanche (Ostrom et al., 2014; Ostrom et al., 2018). En effet, plus fréquents chez les hommes (3,95 à 4,03 pour 100 000) que chez les femmes (2,49 à 2,56 pour 100 000) pour le GBM, la proportion d'astrocytome anaplasique (grade III de l'OMS 2007) et de GBM nouvellement diagnostiqués est plus importante chez les âgés de 75 à 84 ans alors que les oligodendrogliomes sont plus fréquents chez les personnes jeunes âgées de 35 à 44 ans (Ostrom et al., 2018). On peut ajouter que l'incidence annuelle des gliomes dans la population pédiatrique (0-14 ans) aux États-Unis

(2007-2011) était de 2,8 pour 100 000 personnes (Ostrom et al., 2015), une incidence qui place le gliome parmi les tumeurs les plus fréquentes chez l'enfant.

L'incidence du cancer du cerveau, dont le gliome représente la plus grande proportion, est la plus élevée en Europe, où son taux annuel normalisé selon l'âge est de 5,5 pour 100 000 habitants, suivie par l'Amérique du Nord (5,3 sur 100 000 personnes), l'Australie/Nouvelle-Zélande (5,3 pour 100 000 personnes), l'Asie Occidentale (5,2 sur 100 000 personnes) et l'Afrique du Nord (5,0 sur 100 000 personnes) (Ferlay et al., 2015). Elle est faible en Asie centrale et du sud (1,8 pour 100 000 personnes), en Afrique subsaharienne (0,8 pour 100 000 personnes), et en Océanie au-delà de l'Australie et de la Nouvelle-Zélande (0,5 pour 100 000 personnes). Les vraies raisons de ces différences régionales ne sont actuellement pas connues, il est difficile de déterminer si ces différences sont liées à des différences environnementale ou génétique, ou si elles sont causées par une variation de la technique de collecte de données et/ou des méthodes de surveillance (Ostrom et al., 2018).

De nombreux facteurs de risque environnementaux et génétiques ont été étudiés, peu ont été identifiés et ils correspondent majoritairement à des prédispositions héréditaires dans certaines maladies génétiques rares telles que le syndrome de Li-Fraumeni (conséquences de mutations du gène TP53 ou gènes associés), la polypose adénomateuse familiale (mutations du gène *adenomatous polyposis coli,* APC), ou à l'exposition à des radiations thérapeutiques induisant des mutations secondaires (Cohen et al., 2009; Ostrom et al., 2018). D'un point de vue environnementale, une étude a suggéré un risque accru de gliome chez les grands utilisateurs de téléphone (Hardell et al., 2013). Cependant d'autres études contradictoires ne soutiennent pas l'association entre l'utilisation de téléphone et le développement des gliomes (Baan et al., 2011; Benson et al., 2013) mais proposent néanmoins, la nécessité d'une surveillance et un examen continus, car les risques potentiels liés à l'utilisation à long terme ne sont pas compris. Récemment, l'utilisation d'insecticides a été montrée comme associée à un risque accru de gliome (Louis et al., 2017), suggérant l'existence de risques environnementaux. De manière intéressante, des allergies respiratoires, l'asthme ou l'eczéma, pourraient protéger de la survenue de gliomes (Turner et al., 2013), un effet qui pourrait être associé à une surveillance accrue par le système immunitaire inné chez les personnes allergiques.

1.2. Diagnostic

Les principaux symptômes présentés par les patients atteints de gliome sont associés à une augmentation de la pression intracrânienne et à des déficits, *i.e.* des maux de tête, et des changements de démarche/équilibre, changements de l'humeur ou de la personnalité, des

déficits neurologiques focaux tels qu'une hémiparésie, et/ou des déficits sensoriels ou une aphasie. Ces signes sont intensifiés et persistants chez les patients atteints de gliome de haut grade (HGG) comparé à ceux porteurs de bas grade (LGG, non-GBMs) et les symptômes évoluent plus rapidement chez les patients HGG en raison de la progression tumorale rapide (Diwanji et al., 2017). L'imagerie par résonance magnétique (IRM) améliorée par l'agent de contraste gadolinium est actuellement la méthode de routine pour la détection, puis c'est l'histopathologie et les analyses moléculaires qui permettront le diagnostic. Toutefois, les LGG montrent une faible intensité de signal sur les séquences pondérées en T1 après injection de gadolinium et hyper-intense en pondération T2 et en séquences FLAIR (*Fluid Attenuated Inversion Recovery*) (Diwanji et al., 2017). L'augmentation du contraste est un différenciateur entre les GBMs et les LGG et peut évoquer une progression tumorale vers les HGG (Upadhyay and Waldman, 2011; Diwanji et al., 2017). Les gliomes de grade I sont généralement bien circonscrits et présentent une prise de contraste homogène avec le gadolinium. Les gliomes de grade II, astrocytomes diffus, peuvent être moins circonscrits avec peu de prise de contraste, alors que les oligodendrogliomes peuvent présenter une prise de contraste et être associés à des calcifications (Upadhyay and Waldman, 2011). Dans le cas des HGG, une augmentation de prise de contraste est souvent observée, mais pas de manière corrélée avec le grade ou l'agressivité de la tumeur (Diwanji et al., 2017).

La chirurgie constitue la première étape de traitement du gliome lorsque cela est réalisable, une résection totale permet de réduire l'effet de masse, et éliminer les cellules tumorales. A l'heure actuelle, même si le diagnostic moléculaire prend part à la méthodologie diagnostique (Louis et al., 2016), les critères anatomocytopathologiques demeurent. Les gliomes de grade II, tels que les astrocytomes diffus sont caractérisés par la présence d'atypies nucléaires, de faibles taux de mitose (<5%) et l'absence de prolifération vasculaire ou de nécrose palissadique tandis que les tumeurs oligodendrogliales présentent des cellules monomorphes avec des noyaux ronds uniformes, des halos périnucléaires, des microcalcifications et des réseaux de capillaires (Louis et al., 2007). Parmi les HGG, les astrocytomes anaplasiques sont des tumeurs infiltrantes diffuses avec une cellularité accrue, des atypies nucléaires distinctes et une activité mitotique importante (~5%). Les GBMs ont aussi des pourcentages de mitoses >5%, de nombreuses atypies nucléaires mais présentent une prolifération vasculaire et une angiogenèse atypique, des microhémorragies et des zones hypoxiques associées à une forte nécrose.

En raison de l'hétérogénéité potentielle de ces tumeurs, la biopsie stéréotaxique à elle-seule peut ne pas refléter le grade le plus élevé pour le diagnostic, les taux d'exactitude rapportés allant de 51% à 83% (Pouratian et al., 2007). Ainsi, les classifications moléculaires sont

maintenant des variables diagnostics et pronostics aussi importantes que les facteurs cliniques à prendre en compte.

2. Classification des gliomes

Les gliomes forment un groupe hétérogène de tumeurs du SNC classés par l'OMS sur des bases histologiques et le degré de malignité (Louis et al., 2007). En 2007 selon ces critères, l'OMS avait classifié la malignité croissante des astrocytomes en 4 grades (I-IV) et des oligodendrogliomes en 2 (II-III) (Louis et al., 2007). Mais, d'un point de vue clinique, pour la plupart des LGG ou HHG, leur nature diffuse entraîne une infiltration importante dans le parenchyme cérébral (Louis et al., 2016). Les GBMs primaires (dont le diagnostic est établi dès la première biopsie) et GBMs secondaires (évolution d'un gliome de bas grade) correspondent au plus haut grade (IV) et les plus fréquents (environ 56% de tous les gliomes), et les patients atteints présentent un très mauvais pronostic avec seulement 5% des patients encore en vie après 5 ans (Ostrom et al., 2014; Ostrom et al., 2017). Mais les résultats hétérogènes en termes d'évolution et de réponses aux traitements ont révélé l'importance des données moléculaires. L'OMS a donc mis place en 2016 une nouvelle classification des gliomes (Figure 2) pour intégrer des paramètres phénotypiques et génotypiques dans la classification des tumeurs du SNC, ce qui apporte des niveaux d'objectivité qui manquaient à certains aspects des processus de diagnostic précédents, et permettra de stratifier les patients dans des protocoles de thérapies ciblées (Louis et al., 2016).

2.1. Les principales altérations moléculaires identifiées dans les gliomes

Les altérations des gènes tels que IDH (Isocitrate déshydrogénase), TP53 (*Tumor protein 53*) et ATRX (*X-linked gene of α-thalassemia and mental retardation syndrome*), EGFR (*Epidermal growth factor receptor*), MGMT (O-6- methylguanine-ADN methyltransférase) et la codélétion des bras chromosomiques 1p et 19q (codélétion 1p/19q) sont des marqueurs cliniquement pertinents des gliomes (van der Vlis et al., 2017).

2.1.1. Mutations dans IDH1/2

Rapportés pour la première fois par Parsons et ses collègues en 2008 (Parsons et al., 2008), plusieurs études récentes ont depuis confirmé des mutations somatiques récurrentes dans les gènes IDH1 et IDH2 (R132H et R172K, des mutations respectivement) chez de nombreux patients atteints de gliomes. La découverte de cette mutation dans les gliomes a fourni une nouvelle vision de la gliomagenèse et a initié la classification moléculaire des gliomes par mutation somatique (Park et al., 2017). Ainsi, les patients de gliome avec une mutation IDH

(IDHmut) présentent des caractéristiques distinctes de celles des patients atteints d'un gliome avec un IDH de type sauvage (IDHwt). IDH catalyse la décarboxylation oxydative de l'isocitrate pour produire de l'α-cétoglutarate (α-KG), du NADPH et du CO_2, mais la mutation de IDH1/2 entraîne une affinité préférentielle de IDH pour α-KG au lieu de l'isocitrate en dehors du cycle de l'acide citrique conduisant ainsi à la production et à l'accumulation de l'oncométabolite 2-hydroxyglutarate (2HG) qui favorise la tumorigenèse en agissant en tant qu'antagoniste de l'α-KG pour inhiber de manière compétitive plusieurs dioxygénases dépendantes de l'α-KG, incluant la méthylation de l'ADN ainsi qu'une réponse adaptative à l'hypoxie. Par exemple, en normoxie et/ou IDHwt, les prolyl hydroxylases (PHD) activées par l'α-KG utilise l'oxygène en tant que co-substrat et hydroxyle les résidus de la proline sur HIF-1α, amorçant sa dégradation par le protéasome. Cependant, l'accumulation du 2HG suite à IDHmut, inhibe l'action des PHD favorisant ainsi l'induction par HIF-1α de la transcription de ses gènes cible comme le VEGFA (Dang et al., 2010; Yang et al., 2012; Dimitrov et al., 2015).

Les mutations IDH1/2 sont communes dans 70% à 80% des gliomes infiltrant de grades II et III et se retrouvent dans 100% des oligodendrogliomes et GBM IDHmut (Appin and Brat, 2015). En outre, ces mutations sont plutôt prédictives de la réponse du gliome aux stratégies de traitement multimodal (van der Vlis et al., 2017). Actuellement, les mutations IDH1/2 sont acceptées comme un marqueur décisif dans le diagnostic des GBMs secondaires devant les autres critères clinique ou pathologique (Mansouri et al., 2017).

2.1.2. Mutations de TP53/PTEN

TP53 est un gène suppresseur de tumeur typique situé à l'emplacement 17p13.1 et code pour la protéine nucléaire p53. La mutation du gène TP53 ou la surexpression anormale de la protéine p53, qui a une demi-vie plus longue que la p53 de type sauvage, sont associées à de nombreux cancers incluant certains gliomes (Park et al., 2017). Selon l'OMS, les astrocytomes de grade II et III présentent des taux élevés de mutations TP53 (94%) souvent corrélés avec la surexpression de p53. Cependant, ces altérations sont rares dans les oligodendrogliomes, les astrocytomes pilocytiques et les astrocytomes à cellules géantes (Cancer Genome Atlas Research Network et al., 2015).

Le gène PTEN (*Phosphatase and Tensin homolog*) est le deuxième suppresseur de tumeur le plus fréquemment muté dans tous les cancers après p53 (Stokoe, 2001), et sa mutation est retrouvée dans environ 40% des GBMs, principalement les GBMs primaires (Mansouri et al., 2017). Une des fonctions de PTEN est la déphosphorylation de la PI3K, bloquant ainsi l'activation de la voie Akt/mTOR (LoPiccolo et al., 2008). PTEN joue ainsi un rôle central dans

l'inhibition de la prolifération cellulaire et la régulation de la capacité des cellules à migrer et à envahir le tissu adjacent.

2.1.3. Mutations de ATRX

ATRX, un gène situé sur le chromosome Xq21.1, code pour une protéine nucléaire de 280 kDa et s'est révélé impliqué dans de nombreuses fonctions cellulaires, telles que la recombinaison, la réparation et la transcription de l'ADN (Clynes et al., 2013). Des mutations fonctionnelles de ce gène sont associées à des amas et défauts de chromatides sœurs, à une méthylation anormale de l'ADN et au maintien des télomères indépendants de la télomérase, ce qui entraîne un allongement alternatif des télomères (Park et al., 2017). La mutation et la diminution de l'expression nucléaire de ATRX sont observées dans les astrocytomes de grade II et III incluant les gliomes IDHmut et les GBMs secondaires IDHmut (Figure 2), (Cancer Genome Atlas Research Network et al., 2015; Takano et al., 2016).

2.1.4. Codélétion 1p/19q et mutations dans les gènes CIC et FUBP1

La suppression simultanée du chromosome 1p/19q est un événement génétique précoce et caractéristique des tumeurs oligodendrogliales (grade II et III). Les gliomes présentant cette codélétion ont un meilleur pronostic et c'est aussi un marqueur de sensibilité aux chimiothérapies de type procarbazine, lomustine et vincristine (Buckner et al., 2017; Park et al., 2017). Parmi les tumeurs avec délétion précoce de 1p, 80% restent des oligodendrogliomes au cours de la progression, alors que 75% des gliomes avec le 1p intact, se transforme en phénotype astrocytaire (Lavon et al., 2007).

Des mutations récurrentes dans les gènes CIC (*homolog of Drosophila capicua*) et FUBP1 (*far upstream element binding protein 1*) sont retrouvées dans 46% à 53% et 15% à 24% des oligodendrogliomes, respectivement, en plus d'une codélétion dans 1p/19q associées à la mutation IDH1/2 (Figure 2) (Jiao et al., 2012; Sahm et al., 2012). Des altérations de la fonction normale de CIC et FUBP1 peuvent être soit comme un proto-oncogène, soit comme un gène suppresseur de tumeur, en fonction du type de tumeur (Park et al., 2017). La coexistence des mutations IDH1 avec CIC ou FUBP1 peut expliquer en partie le ralentissement de la croissance tumorale et de la longévité des patients atteints d'oligodendrogliomes, IDH1mut et codélétés 1p/19q par rapport aux autres gliomes diffus (Chittaranjan et al., 2014).

2.1.5. EGFR

L'EGFR est situé sur le chromosome 7q12 et agit comme un récepteur de la famille des tyrosines kinases ErbB (Park et al., 2017). La mutation de l'EGFR se trouve principalement dans les GBMs primaires (Figure 2). La variante III de l'EGFR (EGFRvIII) est la plus couramment mutée (44%) dans le GBM et sa surexpression est fortement associée à un mauvais pronostic (Shinojima et al., 2003; Lombardi and Assem, 2017; Ghosh et al., 2018). Les cellules tumorales EGFRvIII-positives montrent des niveaux particulièrement élevés de kinase mTOR et présentent un phénotype très prolifératif et très agressif, une signature des GBMs (*Cf* partie 2.2 Altération des voies de signalisation). Le statut génétique et la surexpression du gène EGFR sont un indicateur pronostique chez les patients plus jeunes (Shinojima et al., 2003).

Ainsi, la Figure 3 résume les principales étapes de l'intégration des données de génomique et épigénomique afin de mettre à jour les phénotypes moléculaires et cliniques pour mieux classer les gliomes, et la Figure 2 récapitule les principales altérations moléculaires actuellement associées à la classification des gliomes.

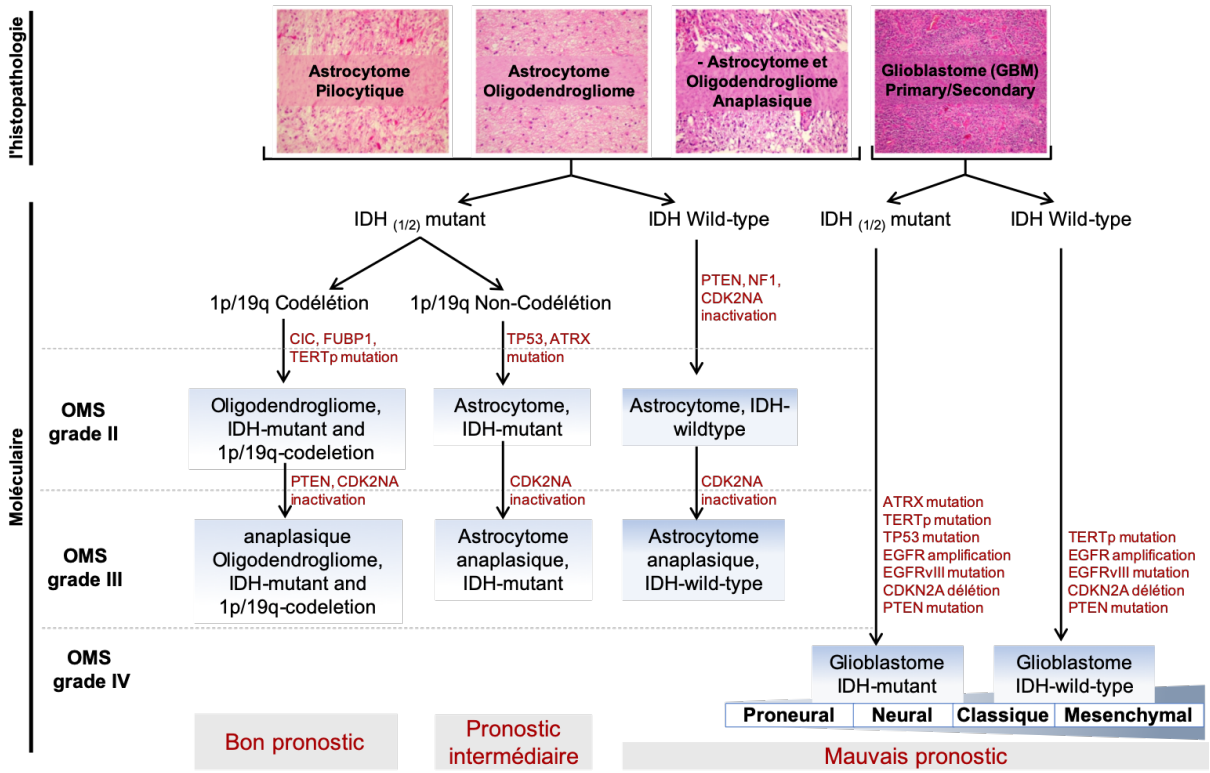


Figure 2. Représentation schématique des principales altérations histologiques et génétiques répertoriées dans la classification des gliomes par l'OMS (2007/2016). (Adaptée de van der Vlis et al., 2017; Park et al., 2017; Louis et al., 2016; 2007). ATRX : *Alpha Thalassemia/ mental retardation syndrome X-linked* ; CDK2NA : *Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 2A*; CIC: *Capicua transcriptional repressor* ; EGFR : *Epidermal growth factor receptor* ; EGFRvIII : *Epidermal growth factor receptor variant III* ; FUBP1: *Far upstream Element Binding Protein 1* ; IDH : Isocitrate déshydrogénase ; NF1

: *Neurofibromin 1*; PTEN : *Phosphatase and tensin homolog* ; pTERT : *Telomerase reverse transcriptase gene promoter* ; TP53 : *Tumor Protein P53.*

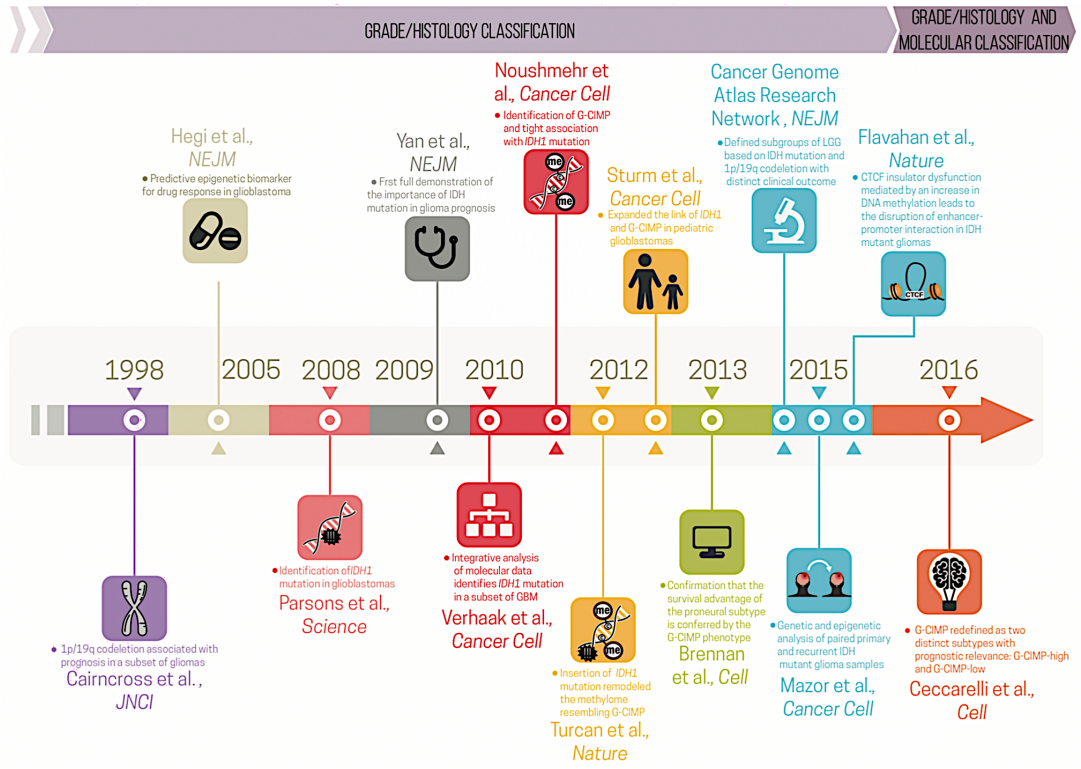


Figure 3. La chronologie des principales étapes d'intégration des données de génomique et d'épigénomique qui ont directement ou indirectement révélé les phénotypes moléculaires et cliniques du gliome associés aux sous-ensembles de G-CIMP. Chaque jalon indique les articles de référence ayant établi les principaux résultats moléculaires avec des implications cliniques. (D'après Malta et al., 2018).

Principalement, la mutation IDH1 associée à la codélétion 1p/19q est un marqueur prédictif de la réponse à la chimiothérapie (Stancheva et al., 2014), une caractéristique des oligodendrogliomes de grade II ou III. Les astrocytomes de grade II et III peuvent aussi présenter la mutation IDH1 sans codélétion 1p/19q associée à la mutation ATXR et/ou TP53, avec de possibles accumulations d'autres d'altérations génétiques, telles que l'amplification ou la mutation de l'EGFR, aboutissant à la formation de GBMs secondaires IDHmut (Park et al., 2017; van der Vlis et al., 2017). Ces GBMs secondaires porteurs d'une mutation IDH sont tous issus de la progression d'astrocytome de bas grade (Mansouri et al., 2017). À l'inverse, la grande majorité des GBMs avec IDHwt est considérée comme des GBMs biologiquement primaires, très souvent porteurs de mutations PTEN avec amplification de l'EGFR. De plus, les mutations de PTEN sont plutôt de mauvais pronostic en terme de survie globale et entrent dans la catégorie des GBMs, la tumeur cérébrale maligne primitive la plus fréquente et la plus agressive chez l'adulte (Stupp et al., 2005; Teo et al., 2014).

Au cours des années, d'autres altérations moléculaires sont apparues pertinentes, telle que la méthylation de l'ADN. En plus du statut mutationnel de IDH1/2 et des altérations précédemment mentionnées, certains gliomes possèdent un phénotype d'hyperméthylation cytosine-phosphate-guanine (G-CIMP). Notamment, l'identification récente d'un grand nombre cliniquement pertinent de tumeurs G-CIMP+/- (G-CIMP-*high*/*low*) permet d'affiner la classification des gliomes indépendamment du grade et de l'histologie (Figure 3, 2016) (Malta et al., 2018). En effet, le promoteur du gène de la MGMT (O-6-methylguanine-ADN methyltransférase) est riche en dinucléotide cytosine-phosphate-guanine (CpG), dont la méthylation, fréquemment observé dans les GBMs, entraîne une diminution de son expression, l'empêchant d'exercer son rôle protecteur des dommages de l'ADN. Ce gène est impliqué dans la réparation des dommages de l'ADN causés par des agents alkylants, tels que le témozolomide (TMZ), utilisés pour traiter les patients atteints de GBM. MGMT joue ainsi un rôle clé dans la résistance des GBMs à l'effet cytotoxique des agents alkylants (von Deimling et al., 2011). La méthylation du promoteur de MGMT est associée à la mutation IDH et au statut G-CIMP, quel que soit le grade du gliome (Malta et al., 2018) avec cependant une fréquence plus élevée dans les GBMs secondaires (75%) que dans les GBMs primaires (36%) (Nakamura et al., 2001).

Plusieurs études ont rapporté que le statut G-CIMP+ est plutôt de bon pronostic dans les LGG et les GBMs (Turcan et al., 2012; Ceccarelli et al., 2016). Notamment, les patients GBMs IDHmut et G-CIMP+ ont une survie favorable avec des similitudes vis-à-vis des LGG. Par ailleurs, les groupes LGG IDHwt G-CIMP- présente un comportement moléculaire et clinique similaire à celui des GBMs (Malta et al., 2018). Malta et ses collègues ont récemment découvert que les échantillons de gliome G-CIMP- présentent une plus faible méthylation du promoteur MGMT par rapport aux échantillons G-CIMP+. Ils ont ainsi suggéré que le statut G-CIMP *(-low ou -high*), ainsi que la mutation IDH1/2, doivent être pris en compte lors de la détermination de la signification prédictive de la méthylation du promoteur MGMT dans les gliomes pour révéler l'intérêt d'une chimiothérapie alkylante (Malta et al., 2018).

2.2. Les altérations des principales voies de signalisation dans les GBMs

Les nombreuses altérations génétiques et moléculaires précédemment mentionnées présentes dans les tumeurs cérébrales entraînent la modification de plusieurs voies de signalisation majeures qui contrôlent la croissance et la progression des GBMs (Crespo et al., 2015). Parmi ces voies majoritairement modifiées il y a :

- La voie des récepteurs à tyrosine kinase (RTK), la plus fréquemment modifiée. L'activation de ces récepteurs par les facteurs de croissances déclenche des cascades de signalisation

intracellulaire, notamment la voie des RAS (*Rat sarcoma GTPase*), la voie PI3K/AKT, associée à la production de VEGFA (*Vascular endothelial growth factor*) (Figure 4A) (Crespo et al., 2015). La combinaison de ces altérations peut coexister dans la même tumeur (Lombardi and Assem, 2017) induisant ainsi la diminution de l'apoptose, la stimulation de la prolifération, de la migration et de l'invasion ainsi que la néo-vascularisation tumorale.

- La voie du rétinoblastome (RB), joue un rôle clé dans le cycle cellulaire. En condition normale, RB est hypo-phosphorylé et se lie activement au facteur de transcription E2F (*or Retinoblastoma-associated protein*) pour bloquer le cycle cellulaire en phase G1/S empêchant ainsi la croissance aberrante des cellules. Dans les GBMs, la stimulation par les facteurs de croissance recrute la formation de la cycline D1 et l'activation du complexe cycline/kinase dépendante de la cycline (CDK) qui assure la phosphorylation de RB et prévient ainsi sa fonction inhibitrice des facteurs de transcription nécessaires à la mitose (Figure 4B) (Furnari et al., 2007; Lombardi and Assem, 2017). Les régulateurs négatifs de la voie du RB incluent la famille de protéines Ink4 (CDKN2A-p16^{INK4a}, CDKN2B-p15^{INK4b}, CDKN2C-p18^{INK4c}), des inhibiteurs de CDK qui antagonisent la liaison des cyclines D avec CDK4/6, empêchant la phosphorylation de RB (Crespo et al., 2015).
- La voie TP53 qui contrôle également le cycle cellulaire, la réponse aux dommages de l'ADN, la mort cellulaire et la différenciation. Le stress cellulaire dû à un dommage de l'ADN entraîne l'activation de la voie TP53 de réparation de l'ADN en augmentant la transcription de p21, une protéine inhibitrice de kinases dépendantes des cyclines (CDKN) pour bloquer la progression à la phase G1 du cycle cellulaire (Van Meir et al., 2010). D'ailleurs, les voies TP53 et RB interagissent *via* p21 (Crespo et al., 2015). S'il y a plus de dommages que ce qui peut être réparé rapidement, TP53 induit la mort cellulaire pour empêcher la division des cellules dont l'ADN est muté ou endommagé (Lombardi and Assem, 2017). Le stress présent au sein des GBMs stimule l'activation de MDM2 et MDM4 (*murine double minute*), des régulateurs négatifs de TP53, dont la transcription est induite par TP53, générant une boucle de rétroaction négative qui régule l'activité de TP53 et l'expression de MDM2 (Shangary and Wang, 2009). Pour maintenir l'activité de TP53, le CDKN2A-p14^{ARF} inactive le MDM2 par dégradation (Crespo et al., 2015; Lombardi and Assem, 2017). La délétion de CDKN2A-p14^{ARF} est fréquemment observée dans les GBMs alors que les proto-oncogènes MDM2 et MDM4 sont plutôt amplifiés (Figure 4C).

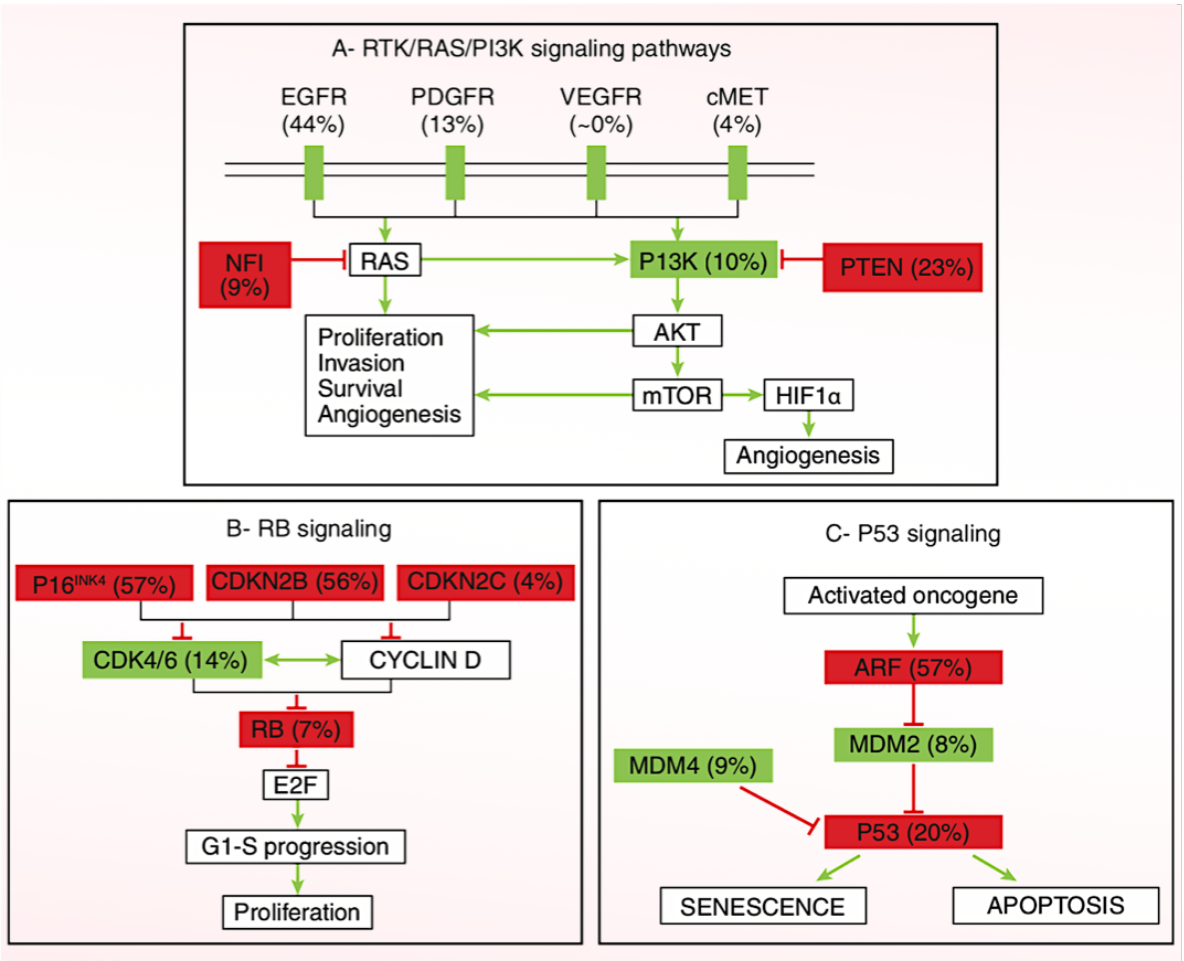


Figure 4. Les principales altérations génétiques observées dans les principales voies de signalisation dans les GBMs. Les mutations, délétions et amplifications dans les voies de signalisation (**A**) RTK/RAS/PI3K, (**B**) la voie du rétinoblastome (RB) et (**C**) p53 sont présentées. Les cases vertes indiquent une mutation et des amplifications activantes. Les cases rouges indiquent les altérations inactivantes telles que les mutations et les délétions. La fréquence des altérations est indiquée dans chaque case. (D'après Lombardi et Assem 2017). ARF : ou CDKN2A (*cyclin dependent kinase inhibitor 2A*) ; CDK : kinase dépendante de la cycline ; E2F : *Retinoblastoma-associated protein*, un facteur de transcription ; MDM2 : *murine double minute 2 ;* mTOR *: mammalian target of rapamycin.*

2.3. Sous-classes moléculaires des GBMs

En 2010, Verhaak et al., ont analysé les mutations somatiques, les modifications du nombre de copies d'ADN et les profils d'expression génique afin de regrouper les GBMs en catégories distinctes (Verhaak et al., 2010). Grâce à ces travaux, quatre sous-types de GBM pertinents sur le plan clinique ont été établis, à savoir les GBMs dits Classique, Mésenchymateux, Proneural et Neural (Figure 5).

2.3.1. GBM classique

Le sous-type classique (CL) est associé à l'amplification du chromosome 7, à la perte du chromosome 10 dans 100% des cas et à l'amplification de l'EGFR dans 97% des cas (Olar and Aldape, 2014). En effet, bien que les altérations de l'EGFR soient importantes dans de

nombreux GBMs, ce sous-type classique démontre une prédilection ciblée pour l'altération du gène de l'EGFR. La surexpression de marqueurs de cellules souches, la mutation de PTEN, l'activation de la voie Notch (NOTCH3, JAG1, LFNG) et Sonic hedgehog (SMO, GAS1, GLI2) sont aussi observées dans ce sous-type (Verhaak et al., 2010).

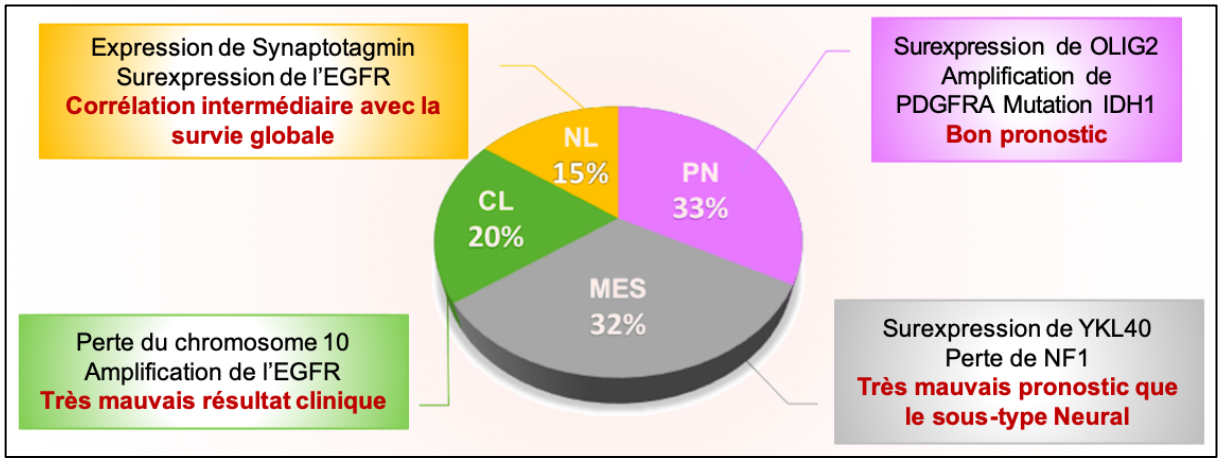


Figure 5. Classification des sous-types de glioblastomes d'après Verhaak et prévalence de chaque sous-type (NL, neural ; PN, proneural ; MES, mesenchymal ; CL, Classique) **dans tous les gliomes malins.** Certaines des caractéristiques moléculaires et cliniques spécifiques sont indiquées. (D'après Fedele et al., 2019). EGFR : *Epidermal growth factor* ; IDH1 : *Isocitrate Dehydrogenase (NADP(+)) 1* ; NF1 : *Neurofibromin 1* ; OLIG2 : *Oligodendrocyte Transcription Factor 2* ; OS : *Overall survival* ; PDGFRα : *Platelet Derived Growth Factor Receptor Alpha ;* YKL40 : *Chitinase 3 Like 1 (*CHI3L1).

2.3.2. GBM mésenchymateux

Ce sous-type est associé à la mutation ou suppression de la neurofibromine 1 (NF1), la mutation de TP53 et de PTEN, à la surexpression de gènes de la superfamille du facteur de nécrose tumorale (TNF) et la voie NF-κB (*nuclear factor-kappa B*) (Verhaak et al., 2010), potentiellement en raison d'une nécrose globale plus élevée et d'infiltrats inflammatoires associés à ce sous-type. D'autres altérations de marqueurs mésenchymateux ou d'inflammation tels que CHI3L1 (*Chitinase-3-like protein 1*), le proto-oncogène cMET (*hepatocyte growth factor receptor, an RTK*) ou CD44 (*Cluster of Differenciation 44* ou *homing cell adhesion molecule*) sont aussi observées (Phillips et al., 2006; Agnihotri et al., 2013).

2.3.1. GBM proneural

Le moins agressif des 4, le sous-type proneural (PN) est plutôt associé à l'amplification du PDGFRα (*platelet-derived growth factor receptor alpha*), à des mutations comme celle d'IDH1, de TP53 ou de PTEN. De manière intéressante, 90% des mutations IDH1 dans les GBMs se trouvent dans le sous-type PN (Verhaak et al., 2010). Plusieurs gènes impliqués dans le développement (SOX, OLIG2, DCX, DLL3, ASCL1, TCF4) sont surexprimés dans ce sous-type (Phillips et al., 2006). Il a été constaté dans de nombreuses études que le statut G-CIMP

permet de distinguer deux types de GBM PN (Ozawa et al., 2014; Malta et al., 2018). Les GBMs PN fortement G-CIMP+ sont surtout observés chez les jeunes patients et sont associés à de bons pronostics, contrairement aux tumeurs G-CIMP-. De manière intéressante, Ozawa et ses collègues ont suggéré que la plupart des GBMs mésenchymateux G-CIMP- dérivent d'un précurseur de type proneural. Ils ont aussi montré que le PDGFα est suffisant pour induire le phénotype PN aux gliomes et que la perte supplémentaire de NF1 transforme le PN en sous-type mésenchymateux (MES) (Ozawa et al., 2014). De nombreux autres facteurs font partie des causes d'une transition (PMT) du GBM PN en MES (Figure 6), tels que l'altération des facteurs de transcription (STAT3 : *Signal transducer and activator of transcription 3*), NF-κB, C/EBPβ (*CCAAT/enhancer binding protein beta*), TAZ (*Tafazzin*) impliqués dans la transition mésenchymateuse des GBMs, ainsi que les radiothérapies et chimiothérapies (Fedele et al., 2019).

2.3.2. GBM neural

Le GBM neural présente une forte composition de gènes tels que NEFL (*Neurofilament light polypeptide*), GABRA1 (*Gamma-aminobutyric acid type A receptor alpha1*), SYT1 (*Synaptotagmin-1*), SLC12A5 (*Solute carrier family 12 member 5*), impliqués dans le développement et le fonctionnement du système nerveux (Phillips et al., 2006). L'histologie de ce sous-type correspond à une combinaison de caractéristiques oligodendrogliales, astrocytaires et neuronales (Mansouri et al., 2017; Ghosh et al., 2018).

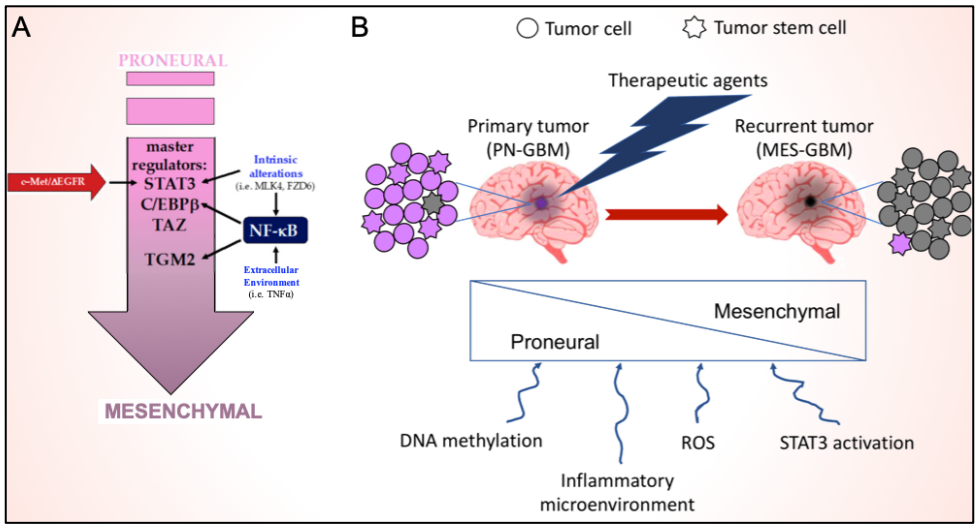


Figure 6. **La transition proneuro-mésenchymateuse (PMT).** (**A**) Les principaux gènes impliqués dans la PMT. STAT3, C/EBPβ et TAZ sont les régulateurs principaux de la PMT et en amont, NF-κB et d'autres facteurs, à la fois intrinsèques et issus de l'environnement extracellulaire, peuvent conduire à l'activation de ces régulateurs. D'autres voies de signalisation (flèche rouges) participent aussi à la mise en place de cette plasticité phénotypique. (**B**) PMT lors du traitement radio- et chimiothérapeutique du GBM. Un seul GBM contient des cellules souches de gliome de phénotype proneural (PN) et

mésenchymal (MES). Lors du traitement, la plupart d'entre elles passent du phénotype PN au MES en raison de différents événements liés au traitement, dont certains sont présentés. (D'après Fedele et al., 2019). c-Met : *hepatocyte growth factor receptor ;* CEBP/β : *CCAAT Enhancer binding protein beta ;* FZD6 : *Frizzled class receptor 6* ; MLK4 : *Mixed lineage kinase 4 ;* NF-κB : *Nuclear factor kappa B* ; STAT3 : *Signal transducer and activator of transcription 3* ; TAZ *: Tafazzin* ; TGM2 : *Transglutaminase 2* ; TNFα : *Tumor necrosis factor.*

L'existence de ces quatre sous-types distincts de GBM mis en place dans les analyses de classification des données de *The Cancer Genome Altas* (TCGA) par Verhaak et ses collègues (Verhaak et al., 2010) a très récemment été mis à jour. Les récentes analyses de Wang et ces collègues ont suggéré que le sous-type neural est non spécifique à la tumeur et résultait d'une contamination par des cellules neuronales normales, raffinant ainsi les sous-types moléculaires en trois (classique, mésenchymal et proneural) au lieu de quatre (Q Wang et al., 2017).

3. Physiopathologie du GBM

Le GBM est la tumeur cérébrale maligne primaire la plus agressive, avec une survie médiane d'environ 14,6 mois après le diagnostic, classée au grade IV par OMS 2007 (Louis et al., 2007). Pour le cerveau primitif et le SNC, il représente environ 15% des tumeurs totales, 45,2% des tumeurs malignes et 56% de tous les gliomes (Ostrom et al., 2017) (Figure 1). Les GBMs sont classés en deux types : le GBM primaire, qui est le sous-type prédominant (80% des cas) et se manifeste à un âge plus avancé (âge moyen de 62 ans), tandis que le GBM secondaire progresse à partir d'un astrocytome ou d'un oligodendrogliome de grade inférieur et est plus spécifique des patients jeunes (âge moyen 45 ans) (Watanabe et al., 2009; Ghosh et al., 2018).

3.1. Agressivité du GBM

Contrairement à la plupart des tumeurs malignes agressives et métastatiques, les cellules de gliome ou de GBM semblent préférentiellement croître dans le microenvironnement cérébral, avec parfois un échappement *via* les espaces sous-pials ou le liquide céphalorachidien pour récidiver à distance (dans les espaces péri-ventriculaires ou la moëlle épinière). Les cellules individualisées de gliome diffus ou de GBM ont une capacité remarquable d'invasion des aires cérébrales environnantes, en altérant de manière locale les tissus, la barrière hémato-encéphalique (BHE) et les fonctions cérébrales. Ces mécanismes, associés à l'hétérogénéité intrinsèque et extrinsèque de la tumeur et de son environnement, fait du GBM l'un des cancers les plus difficiles à traiter (De Vleeschouwer and Bergers, 2017).

Les analyses RNAseq et transcriptomiques ont permis de mettre à jour des caractéristiques moléculaires qui s'ajoutent aux critères anatomocytopathologiques dans la classification des gliomes favorisant, ainsi un meilleur diagnostic des patients atteints de gliome, même si encore

actuellement, la survie des patients atteints de GBM est peu améliorée par rapport à la lourdeur de la prise en charge et de ses conséquences (Dieudonné et al., 2016). Les facteurs décrits souvent comme cause d'échecs thérapeutiques incluent l'hétérogénéité intratumorale (ITH) dont les travaux de Verhaak tenaient bien compte, et particulièrement la diversité et plasticité du microenvironnement tumoral (TME) (Lombardi and Assem, 2017; Qazi et al., 2017; Perrin et al., 2019).

3.1.1. Hétérogénéité du GBM

Environ 61% des GBMs sont initialement issus des régions corticales, avec une incidence plus élevée dans les lobes frontaux (Figure 7A) (Davis, 2016), et avec des taux d'incidence égaux dans les hémisphères gauche et droit (Perrin et al., 2019). Actuellement, 25 à 43% des tumeurs sont plutôt localisées dans le lobe frontal, contre 19 à 28% dans le lobe temporal, 12 à 15% dans le lobe pariétal et 3% dans les régions occipitales (Davis, 2016; Perrin et al., 2019). Il a aussi été rapporté que 13 à 45% des GBMs sont multifocaux (Davis, 2016) et 80% de toutes les récidives sont observées en bordure de la cavité de résection de la tumeur primaire. Il est difficile de déterminer comment cette hétérogénéité impacte l'efficacité thérapeutique, *i.e.* est-ce qu'un gliome du cortex pariétal est plus difficile à traiter qu'un gliome du cortex frontal. De plus, une hétérogénéité des sites d'invasion a pu être notée grâce à des études précliniques montrant par exemple que la substance blanche et le pont de Varole (ou protubérance annulaire) sont particulièrement attractives alors que l'hippocampe est relativement épargné par l'invasion de cellules de GBM (Mughal et al., 2018).

L'ITH est définie par la présence de plusieurs sous-populations cellulaires tumorales ou non, différentes, dans une même tumeur d'un même patient, permettant à la tumeur de réagir à certaines pressions de l'environnement, contribuant à la croissance, l'agressivité et l'échec thérapeutique (Lombardi and Assem, 2017). La classification des GBMs en sous-groupes moléculaires avait laissé penser que l'hétérogénéité des GBMs pouvait orienter un choix thérapeutique personnalisé (ciblé). Mais de récentes études montrent que les sous-groupes de GBM sont évolutifs et varient dans l'espace et dans le temps au sein d'une même tumeur (Qazi et al., 2017). En effet, les études génomiques précédentes reposaient sur une seule biopsie régionale pour classer un patient (Qazi et al., 2017), et la notion d'hétérogénéité spatiale complexifie le diagnostic moléculaire des GBMs. Récemment, par prélèvement de fragments de régions géographiquement distinctes dans de mêmes tumeurs, Sottoriva et ses collègues ont montré l'ITH du GBM sur la base des niveaux d'expression des gènes analysés à partir des fragments tumoraux d'un même patient (Figure 7B) (Sottoriva et al., 2013). Ces travaux ont été

confirmés par analyse RNAseq sur cellule unique isolée de fragments de GBM (AP Patel et al., 2014). Ainsi une exérèse de GBM est en réalité constituée de zones hétérogènes récapitulant les sous-groupes de GBM. En examinant les GBMs classés PN, il fut montré que des marqueurs d'autres sous-types peuvent être aussi détectés, et que les niveaux relatifs de ces marqueurs est associé à une survie plus faible dans le groupe de patients PN (AP Patel et al., 2014), suggérant que cette ITH correspond à l'identité de la tumeur et est un indice de la résistance aux traitements.

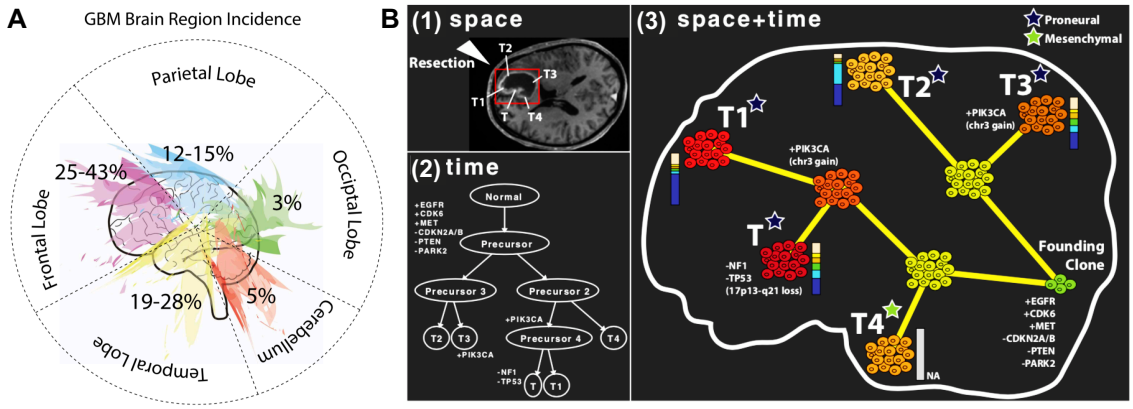


Figure 7. **Hétérogénéité du GBM. A.** Hétérogénéité de la localisation du GBM. L'incidence du GBM par sous-régions cérébrales (D'après Perrin et al., 2019). **B.** Hétérogénéité intra-tumorale du GBM. Les positions anatomiques (**1**) des cinq fragments de tumeur collectés chez le même patient associées à l'évolution reconstruite de la masse tumorale. Un fragment prélevé au sein de la masse tumorale (T), les autres fragments de tumeur ont été étiquetés dans l'ordre de résection, avec des fragments superficiels prélevés au cours des premiers stades de la réduction de la masse tumorale (T1, T2), suivis de fragments plus profonds (T3, T4) récupérés plus tard au cours de l'opération. (**2**) Reconstruction de la phylogénie de la tumeur en fonction du nombre de copie ou d'expression de gènes. (**3**) Reconstruction temporelle et spatiale de l'ontogénie des tumeurs grâce aux profils d'expression de gènes et des données moléculaires au cours du temps. (D'après Sottoriva et al., 2013).

Deux mécanismes sont actuellement proposés pour expliquer le développement de l'ITH, d'une part, les cellules souches tumorales qui peuvent posséder différents caractères souches, la capacité d'auto-renouvèlement et de différenciation en différents types de cellules tumorales, d'autre part, l'évolution clonale qui peut augmenter la diversité génétique au sein de tissus affectés (Gerlinger et al., 2012; Stieber et al., 2014; Lombardi and Assem, 2017). Il faut savoir que l'ITH est définie spatialement du cœur de la tumeur vers la périphérie, qui a d'ailleurs été décrite comme zone favorite de récurrence (Lemée et al., 2015). Le cœur du GBM est une zone de forte prolifération et d'inflammation, constituée d'une zone nécrotique bordée par une zone pseudo-palissadique péri-nécrotique puis de masse tumorale. Par ailleurs, les altérations des facteurs de transcription des voies anti-apoptotiques et/ou de survie seront différentes entre ces zones (Demuth et al., 2008; Roos et al., 2017). A l'interface entre le tissu tumoral et le

parenchyme cérébral, la densité des cellules tumorales diminue progressivement (Lombard et al., 2015) avec des infiltrats isolés clonaux liés à l'invasion par les cellules de GBM (Aubry et al., 2015), cause de récidive. De manière intéressante, l'analyse d'échantillons de patients avant et après récurrence a montré que le profil transcriptomique restait stable après la récurrence dans 65% des sous-types MES tandis que les sous-types CL (51%) et PN (41%) sont moins stables au cours du temps. En particulier, les prélèvements des GBMs récurrents montrent que la fréquence des GBMs PN et MES augmente après récidive, contrairement au sous-type CL, le moins fréquemment retrouvé (Wang et al., 2017). Ces données montrent ainsi que l'ITH est aussi temporelle car liée à l'hypoxie et à l'inflammation, et modulée par les thérapies responsables de sous-populations cellulaires hétérogènes qui récidivent localement ou à distance du site de résection (Kim et al., 2015).

3.1.2. Caractéristiques cellulaires et moléculaires du microenvironnement des GBMs

Comme dans la plupart des tumeurs solides, le microenvironnement du GBM contient d'autres types de cellules en plus des cellules tumorales néoplasiques, la matrice extracellulaire (MEC), les cellules de type astrocyte, microglie et macrophage qui sécrètent des molécules de signalisation de nature inflammatoire, remodèlent la MEC et modifient les conditions biochimiques et biomécaniques à proximité de la tumeur (Perrin et al., 2019).

3.1.2.1. Les composants cellulaires du microenvironnement tumoral (TME)

Le TME contient de nombreux types de cellules non cancéreuses en plus des cellules cancéreuses, notamment les cellules endothéliales, les astrocytes, les péricytes, les fibroblastes et les cellules immunitaires (Figure 8).

Les astrocytes, qui régulent l'homéostasie ainsi que le débit sanguin cérébral, interagissent avec les cellules endothéliales et les péricytes grâce à leurs pieds astrocytaires recouvrant plus de 99% de la surface cérébrovasculaire (Perrin et al., 2019). Au cours de la gliomagénèse, les cellules d'astrocytome déplacent les astrocytes normaux des vaisseaux, perturbant ainsi l'interaction astrocytes-vaisseaux et la régulation du tonus vasculaire, tout en altérant la BHE (Watkins et al., 2014). De plus, les astrocytes entourant le GBM sont réactifs comme observés lors d'une lésion du SNC, et deviennent ainsi prolifératifs et capables de migrer en produisant des facteurs de croissance et des cytokines tels que CTGF (*connective tissue growth factor*), TGF-β (*transforming growth factor beta*), IL-10 (interleukine 10), SDF-1 (*Stromal cell-Derived Factor 1*) ainsi que des métabolites (glutamine, glucose/lactate), qui favorisent la

gliomagénèse (De Vleeschouwer and Bergers, 2017; Maus and Peters, 2017; Gronseth et al., 2018; Heiland et al., 2019). Plusieurs interactions paracrines ont été décrites entre astrocytes et cellules de gliome ; par exemple *via* les jonctions gap, les cellules de GBM reprogramment les astrocytes grâce au second messager cGAMP (*Guanosine-Adenosine 2',3'-cyclic monophosphate*), pour induire un programme pro-inflammatoire caractérisé par la production de diverses cytokines dont l'interferon-α (INFα) et le *tumor-necrosis facteur α* (TNFα). Ces cytokines favorisent ensuite l'excroissance des métastases en activant les voies de signalisation STAT1 et NF-κB dans les cellules de gliome (Figure 8E) (Quail and Joyce, 2017).

Les cellules dendritiques (DC) sont issues des organes lymphoïdes et sont de très puissantes cellules présentatrices d'antigène qui stimulent les réponses des lymphocytes T (Figure 8B) (Quail and Joyce, 2017). La vaccination thérapeutique à base de DC est actuellement utilisée comme stratégie alternative pour stimuler les réponses des lymphocytes T anti-tumorales. D'ailleurs, les premiers essais cliniques de ces vaccins ont amélioré de 31,4 mois la médiane de survie de patients atteints de GBM (Prins et al., 2011) contrairement aux 14,6 mois avec le traitement standard combinant la radiothérapie et la chimiothérapie témozolomide (Stupp et al., 2007).

Il a été démontré qu'en plus des TAMs (*tumor-associated macrophages and microglia*), des cellules immunitaires innées infiltrantes comme les neutrophiles facilitent la résistance aux traitements antiangiogéniques, en rendant les tumeurs non sensibles au blocage du VEGFA (Rivera and Bergers, 2015). Bien qu'il ait été démontré qu'un nombre élevé de neutrophiles périphériques avant le traitement des GBMs est corrélé à une réponse initiale positive au bevacizumab, un anticorps anti-VEGFA (Bertaut et al., 2016), une infiltration accrue des neutrophiles dans le tissu tumoral contribue à la résistance et à l'agressivité du GBM en soutenant l'expansion des cellules souches de gliome (CSG) par surexpression des protéines S100 *Calcium-Binding Protein*, spécialement S100A4 (Liang et al., 2014). En effet, les cellules de gliome attirent les neutrophiles en produisant les chimioattractants comme CXCL8 et MIF (*Macrophage Migration Inhibitory Factor*). Ces neutrophiles associés aux tumeurs exercent ensuite leur rôle pro-tumoral en exprimant l'élastase qui favorise l'infiltration du gliome et le S100A4 augmentant le taux de prolifération et d'auto-renouvellement des CSG (Chow et al., 2017; Massara et al., 2017). D'autre part, les chimiokines inflammatoires S100A8 et S100A9, sont surexprimées dans les zones pré-métastatiques du cerveau, ce qui favorisent aussi le recrutement des neutrophiles important pour la formation des métastases ultérieures (Liu et al., 2013c; Quail and Joyce, 2017) (Figure 8C).

Bien que les neurones n'aient pas été considérés comme contribuant activement à la propagation de la tumeur ou à la défense de l'organisme, les cellules tumorales migrent aussi le long des trajectoires axonales et des espaces périvasculaires (De Vleeschouwer and Bergers, 2017). Au niveau moléculaire, le niveau d'expression élevé de PD-L1 (*Programmed death-ligand 1*), sur les neurones dans la zone péritumorale semble être de meilleur pronostic pour les patients. Au contraire, un niveau d'expression plus élevée de PDL-1 dans la tumeur est signe de mauvais pronostic (Liu et al., 2013b). En effet cette surexpression de PD-L1 par les cellules de gliome est la principale cause des points de contrôle immunitaires (*Immune checkpoints*) en condition pathologique, qui consistent à inhiber l'activation et la prolifération des lymphocytes T par fixation de PD-L1 (présente sur les cellules de gliome) sur son récepteur PD-1 (*programmed cell death 1*) porté par les lymphocytes, empêchant ainsi ces dernières à s'attaquer aux cellules tumorales (Heiland et al., 2017; Chen and Hambardzumyan, 2018). Ce mécanisme d'inhibition des lymphocytes T est d'ailleurs une des fonctions des TAMs pour contribuer au développement des GBMs. Tout comme PD-1, CTLA-4 (*Cytotoxic T-lymphocyte- associated antigen-4*) est aussi un des éléments clefs de ce point de contrôle (Chen and Hambardzumyan, 2018; Lynes et al., 2019). Récemment, les inhibiteurs de points de contrôle tels que les anticorps anti-CTLA-4 (Ipilimumab) et anti-PD-1 (Nivolumab ou Pembrolizumab) ont été approuvés par la FDA (*Food and Drug Administration*) pour le traitement du mélanome non résécable ou métastatique et ont donné de bons résultats. Cependant, la monothérapie avec l'anti-PD-1 ou une thérapie combinant des anticorps anti-PD-1 et anti-CTLA-4 pour le traitement de GBM récurrent a récemment échoué lors d'un essai clinique de phase III, suggérant que le simple blocage des points de contrôle immunitaires peut ne pas restaurer les fonctions tumoricides des lymphocytes T sur les GBMs (Filley et al., 2017).

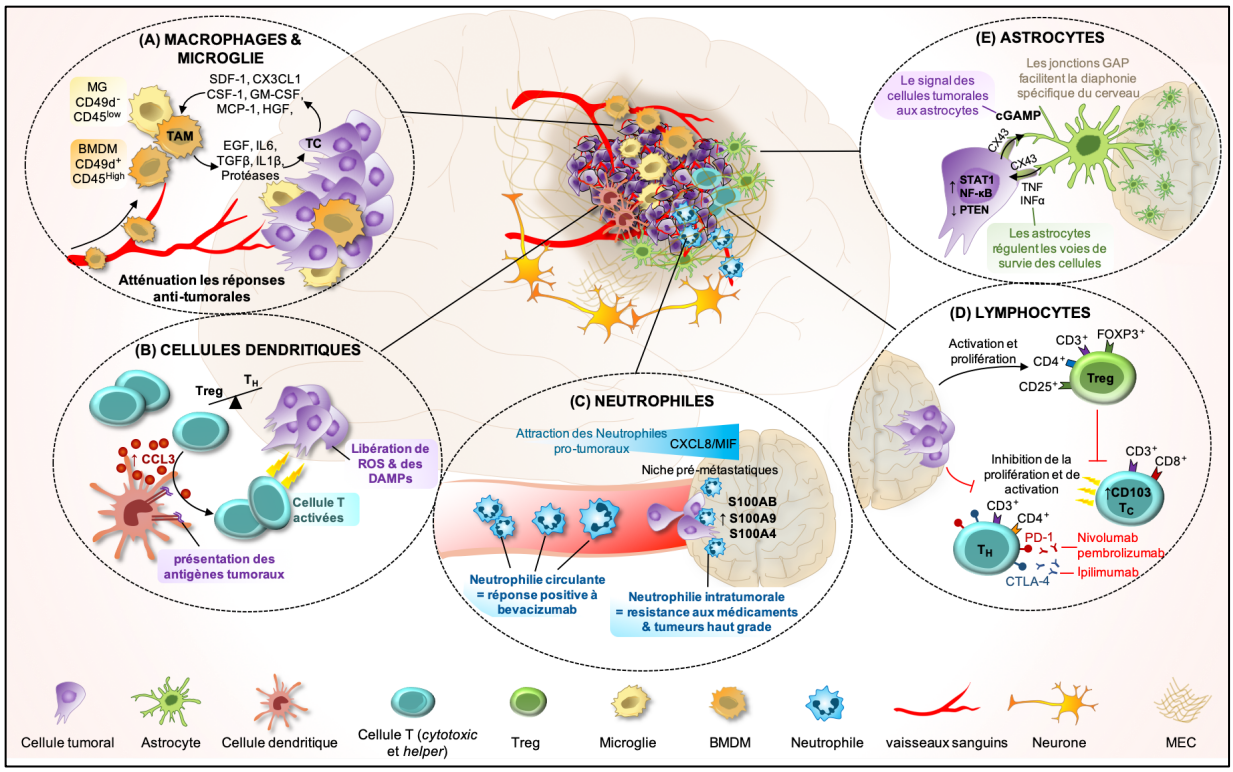


Figure 8. Les composants cellulaires du microenvironnement des GBMs. De nombreux types cellulaires contribuent à la biologie des tumeurs cérébrales. (**A**) Les TAMs (*Tumor-associated macrophages and microglia*), composés de macrophages dérivés de la moelle osseuse (BMDM) ou de la microglie (MG), s'engagent dans une diaphonie avec les cellules gliomales. Ces dernières libérant des cytokines et des agents chimioattractants pour recruter des TAMs, qui fournissent à leur tour des facteurs pro-tumorigènes et pro-survie. (**B**) Les cellules dendritiques peuvent présenter l'antigène de la tumeur aux cellules T pour déclencher une réponse immunitaire anti-tumorale. Ces réponses peuvent être encore améliorées par des facteurs libérés dans le microenvironnement par les cellules tumorales, tels que les espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou les DAMPs (*danger-associated molecular patterns*). (**C**) Dans la circulation, un nombre élevé de neutrophiles est associé à une réponse positive au traitement anti-VEGFA (bevacizumab) alors que leur présence dans le tissu tumoral cérébral est associée au développement d'une résistance bevacizumab et à un gliome de haut grade. (**D**) Les lymphocytes T régulateurs (*Treg*) sont aussi recrutés par les cellules de gliome pour inhiber les cellules T cytotoxiques, conduisant à un microenvironnement immunosuppresseur qui favorise la croissance de la tumeur. Les cellules T peuvent être activées *via* plusieurs inhibiteurs de points de contrôle immunitaires, tels que les anticorps anti-CTLA-4 (*Ipilimumab*) ou anti-PD-1 (*nivolumab, pembrolizumab*). (**E**) *Via* les jonctions gap, les cellules de GBM reprogramment les astrocytes grâce au second messager cGAMP (*Guanosine-Adenosine 2',3'-cyclic monophosphate*) pour induire un programme pro-inflammatoire, caractérisé par la production de diverses cytokines (l'IFNα et le TNFα) qui peuvent ensuite stimuler l'activation des voies de signalisation STAT1 et NF-κB favorisant l'agressivité tumorale. CD49d : *Integrin subunit alpha 4* ; CCL3 : *CC motif chemokine ligand 3* ; CD (3, 4, 8, 25, 45): cluster de différenciation ; CTLA-4 : *Cytotoxic T-lymphocyte- associated antigen-4* ; CXCL8 : *CXC motif chemokine ligand 8* ; CX3CL1 : *CX3C chemokine ligand 1* ; CX43 : *Connexin 43* ; EGF : *Epidermal growth factor* ; IL-6/1β : Interleukine 6/1β ; MIF : *Macrophage Migration Inhibitory Factor* ; NF-κB : *Nuclear Factor-kappa B* ; PD1 : *programmed cell death 1* ; STAT3 : Signal Transducer and Activator of Transcription 3 ; S100 : *Calcium-Binding Protein* ; TGF-β : *transforming growth factor beta.* (Adapté de Quail et Joyce 2017).

Les cellules de la lignée myéloïde, y compris les cellules microgliales résidentes du cerveau et les macrophages infiltrants (Figure 8A, B, C, D), jouent un rôle de signalisation essentiel entre le microenvironnement cellulaire et les cellules tumorales (Glass and Synowitz, 2014;

Lisi et al., 2017; Quail and Joyce, 2017). Il a été rapporté que les TAMs constituaient 30 à 50% de la masse tumorale du GBM (Hambardzumyan et al., 2016). Une analyse de cytométrie en flux d'extrait de tissus tumoraux humains a estimé qu'environ 40% de ces cellules sont des macrophages infiltrant (BMDM, *bone marrow-derived macrophages*), 20% sont correspondent à de la microglie (MG) résidant dans le cerveau et les 40% restants sont des cellules myéloïdes à action immuno-suppressive (Gabrusiewicz et al., 2016). Nombreuses études suggèrent de multiples mécanismes par lesquels ces TAMs peuvent favoriser la croissance et l'invasion du GBM (Gabrusiewicz et al., 2016; Hambardzumyan et al., 2016). Pendant que la population de macrophages de type M1 ont un rôle pro-inflammatoire et anti-tumoral, l'autre population de macrophages avec un phénotype M2, appartenant aux TAMs, jouent un rôle cytoprotecteur et immunosuppresseur (réparation tissulaire et anti-inflammatoire), (Boussiotis and Charest, 2018; Wang et al., 2019). En effet, les cellules de GBM sécrètent des cytokines immunomodulatrices et d'autres facteurs tels que CSF1 (*colony-stimulating factor 1*), chimiokines à motif CXC (SDF-1α ou CXCL12, CX3CL1), chimiokine de motif C-C (CCL2, CCL7, CCL22), GDNF (*glial cell-derived neurotrophic factor*), qui polarisent les TAMs vers un phénotype immunosuppresseur de type M2 mettant ainsi en place un réseau de signalisation paracrine (entre les cellules de GBM et TAM) conduisant à l'attraction locale des cellules myéloïdes et des lymphocytes T régulateurs (Tregs) dans le TME (Chang et al., 2016; Chen and Hambardzumyan, 2018; Wang et al., 2019). Cet ensemble cellulaire constitue les cellules immunosuppressives qui, à leur tour, sécrètent diverses molécules (IL-6, IL-10, CCL2, PD-L1, EGF, VEGFA et MMP9) afin de supprimer la fonction des lymphocytes T cytotoxiques CD8+ et favoriser la progression des gliomes. De plus, les Treg régulent négativement la production d'IL-2, inhibent la production d'IFN-γ afin d'inhiber la fonction des lymphocytes T (Figure 8D) (Wang et al., 2019). Les lymphocytes infiltrés dans les tumeurs constituent la part immunitaire adaptative présente dans le microenvironnement du GBM, bien qu'à des fréquences plus basses que celles des TAMs (Hussain et al., 2006). Les patients atteints de GBM présentent une diminution du nombre absolu de lymphocytes T auxiliaires CD4+ circulantes (Th, *T helper*), qui aident les lymphocytes B à fabriquer des anticorps. Cependant, il y a une proportion accrue de Treg immunosuppresseurs dans le pool de cellules CD4+ sanguines, avec une importante population de Treg infiltrants dans les tissus tumoraux (Hussain et al., 2006; Quail and Joyce, 2017).

3.1.2.1.1. Hypoxie et cellules souches de GBM (CSG)

La formation de vaisseaux sanguins non fonctionnels dans les tissus néoplasiques, en particulier dans les tumeurs à croissance rapide comme les GBMs, provoque un faible débit sanguin et une distribution irrégulière d'oxygène dans la tumeur. Cette oxygénation insuffisante, ou hypoxie, contribue à l'agressivité de la tumeur et a un important impact sur les résultats cliniques chez les patients porteurs de ces tumeurs (Karsy et al., 2016; Wigerup et al., 2016). Une des conséquences est le développement de régions locales d'hypoxie qui peuvent se transformer en nécrose avec des berges hypoxiques pseudo-palissantes qui hébergent les cellules CSG. La réponse cellulaire à l'hypoxie est principalement relayée par la famille de facteurs de transcription induits par l'hypoxie (HIF-1 et HIF-2), qui régulent l'expression de multiples gènes impliqués dans des processus conduisant à l'adaptation et à l'agressivité des tumeurs (Wigerup et al., 2016). Constituées de sous-unités α et β, les HIFs (HIF-1α ou β et HIF-2α ou β) sont des protéines stabilisées en condition hypoxique, et régulant la vascularisation et la réponse inflammatoire de la tumeur, l'état des CSG, la survie, les métastases ainsi que la résistance aux traitements (Figure 9).

De nombreuses études ont démontré que l'hypoxie et les HIFs régulent la prolifération et la différenciation des CSG (Hambardzumyan et al., 2016; Wigerup et al., 2016; Woo et al., 2019). Bien que la présence de véritables cellules souches de cancer dans les tumeurs solides reste à prouver définitivement, des preuves suggèrent qu'une sous-population de cellules de GBM possède des propriétés communes aux cellules souches neurales telles que la capacité d'auto-renouvellement, de prolifération ainsi que la multipotence (Wigerup et al., 2016). Ces preuves ont notamment été confirmées par la capacité des CSG à exprimer des biomarqueurs moléculaires typiques des cellules souches tels que CD133 (*prominin-1*), OLIG2 (*Oligodendrocyte transcription factor*), SOX2 (*Sex determining region Y-box 2*), OCT-4 (*Octamer-binding Transcription factor 4*), NOTCH-1 (*Notch transmembrane receptor 1*), Nestin et KLF4 (*Kruppel Like Factor 4*), par leur capacité à former des neurosphères dans des conditions sans sérum et à développer des tumeurs dans des modèles animaux de xénogreffe orthotopique (Woo et al., 2019). Plusieurs études ont démontré que les niches tumorales hypoxiques, notamment les régions périnécrotiques, sont l'une des zones d'hébergement et de maintien des CSG (Seidel et al., 2010; Hambardzumyan and Bergers, 2015). Autour de ces zones, les HIFs sont en effet surexprimés pour réguler le statut CSG ainsi que différents aspects de l'agressivité tumorale tels que la stimulation de l'angiogenèse, des métastases et la résistance au traitement (Figure 9).

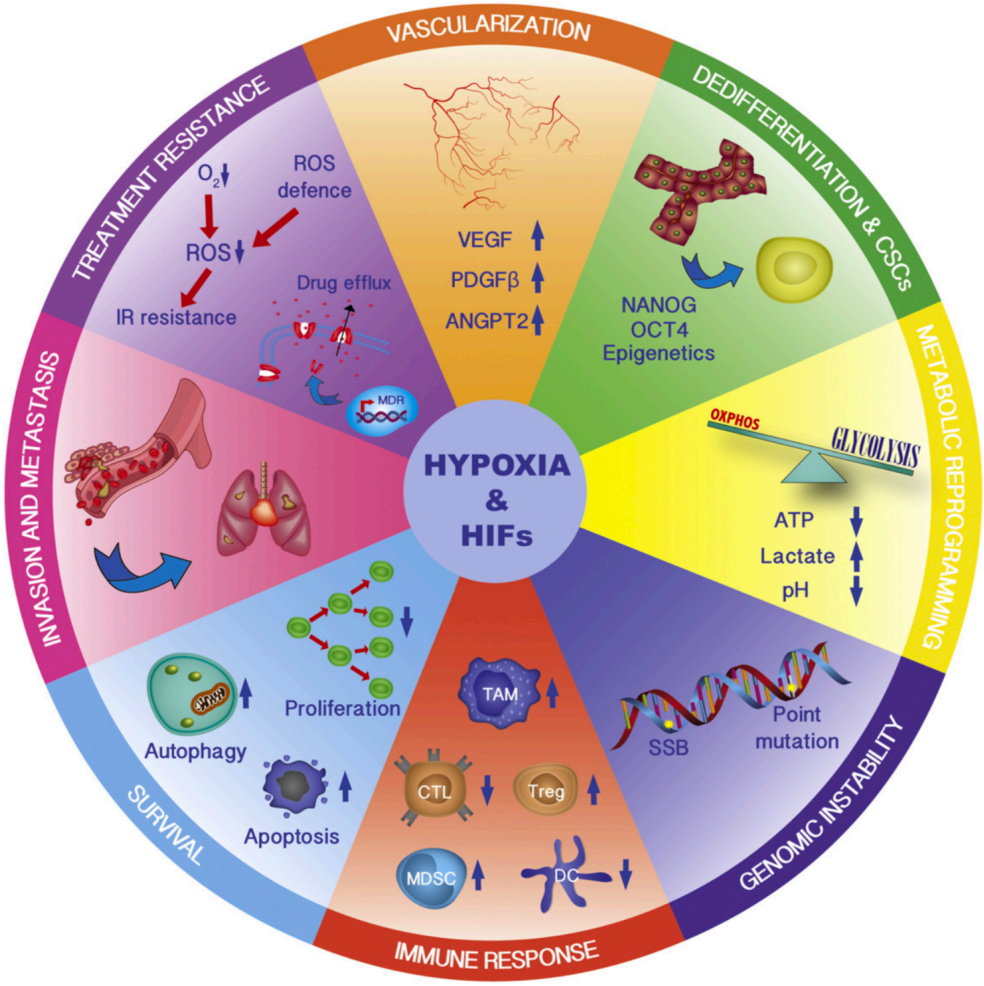


Figure 9. Représentation des principaux mécanismes tumoraux régulés par l'hypoxie et les HIFs. (D'après Wigerup et al., 2016). ANGPT2 : angiopoïétine 2 ; CTL : *Cytotoxic T-lymphocyte* ; DC : *Dendritic cell* ; IR : rayonnement ionisant ; MDR : multirésistance aux médicaments ; MDMC : *Myeloid-derived suppressor cell* ; OCT-4 : *Octamer-binding transcription factor 4* ; Oxphos, phosphorylation oxidative ; PDGF-β : *platelet-derived growth factor-β* ; ROS : les espèces réactives de l'oxygène ; SSB : coupure simple brin ; TAM : *Tumor-associated macrophages and microglia ;* Treg : lymphocytes T régulateurs.

Actuellement, de nombreuses preuves supportent l'idée que les CSG sont les principales causes de la résistance aux traitements. Bien qu'il existe des signatures moléculaires dérégulées dans ces cellules au sein du TME comme précédemment mentionné, aucun biomarqueur unique et spécifique n'a été identifié (Woo et al., 2019). La plasticité dynamique des cellules de GBM à réacquérir un phénotype de cellules souches et leurs interactions complexes avec les différentes niches (périvasculaire, hypoxique et invasive) de leur microenvironnement, sont sources de discussions dans les études (Beier et al., 2011). Cette plasticité caractérisée par la capacité d'alterner entre différents états cellulaires perturbés par certaines altérations a été récemment suggérée (Friedmann-Morvinski, 2014; Neftel et al., 2019). Par exemple, les travaux de Neftel et al., ont en effet montré que les cellules malignes de GBM existent dans

quatre états cellulaires principaux, des précurseurs de type neural, de type oligodendrocyte, de type astrocyte et de type mésenchymateux (Neftel et al., 2019). Ces états présentent une plasticité qui est influencée par les amplifications du nombre de copies CDK4, EGFR et PDGFRα et par des mutations du locus NF1. Ils ont aussi montré que chaque échantillon de GBM analysé contient des cellules dans plusieurs états et que la fréquence relative de chaque état varie entre les tumeurs, suggérant ainsi l'hétérogénéité tumorale.

3.1.2.2. Les caractéristiques vasculaires des GBMs

Les GBMs sont l'une des tumeurs les plus vascularisées caractérisées par une angiogenèse profuse et un système vasculaire anormal composé de vaisseaux hyperdilatés et fuitants, ainsi que des structures glomérulaires vasculaires dans lesquelles des cellules endothéliales et des péricytes sont anormalement organisées (De Vleeschouwer and Bergers, 2017). Cette vascularisation anormale dans les GBMs est une conséquence de la stimulation d'expression de facteurs angiogéniques comme le VEGFA, le facteur de croissance des fibroblastes (FGF-2) et PDGF. Une augmentation de l'activité du VEGFA provoque la formation de nouveaux vaisseaux sanguins dans la tumeur *via* l'angiogenèse et la prolifération associée des cellules endothéliales (Hambardzumyan and Bergers, 2015; De Vleeschouwer and Bergers, 2017; Perrin et al., 2019). Les réseaux vasculaires résultants présentent une perméabilité accrue des vaisseaux et une taille de vaisseaux élargie entraînant une fuite de plasma dans le tissu tumoral et une perturbation de la BHE. Ensemble, ces anomalies induisent un œdème cérébral, une augmentation de la pression interstitielle et une réaction inflammatoire (Quail and Joyce, 2017). Cette vascularisation anormale est responsable d'un débit sanguin lent et à une distribution irrégulière d'oxygène dans le GBM, aboutissant au développement de zones hypoxiques locales qui peuvent se transformer en nécrose pseudo-palissadique (De Vleeschouwer and Bergers, 2017). Ces conditions attirent donc des cellules immunitaires innées, telles que les TAMs qui exacerbent les propriétés angiogéniques et immunosuppressives en sécrétant des facteurs tels que le VEGFA, le TGF-β, l'EGF, l'IL-6, l'IL-10, le CCL2, la MMP2 et la MMP9 (Hambardzumyan et al., 2016; Wang et al., 2019). La prolifération de cellules endothéliales existantes dans les vaisseaux tumoraux et la contribution des progéniteurs vasculaires dérivés de la moelle osseuse peut également favoriser la néovascularisation (Du et al., 2008; De Vleeschouwer and Bergers, 2017). Plus récemment, les CSG ont aussi été proposées comme source supplémentaire de constituants vasculaires par leur capacité à se transdifférencier en cellules endothéliales ou en péricytes tumoraux, dans des modèles précliniques de gliomes

humains (Wang et al., 2010; Soda et al., 2011), mais ces données sont remises en cause car non confirmées sur les coupes de gliome humain.

La nature hétérogène du système vasculaire dans les GBMs modifie également l'adhésion cellulaire et la diapédèse des cellules immunitaires. Dans ce contexte, il est important de noter que l'élévation du VEGFA, en plus de provoquer un système vasculaire anormal et angiogénique, empêche également l'extravasation des lymphocytes T réactifs en réduisant l'expression des molécules d'adhésion intercellulaire ICAM1 (*intercellular adhesion molecule 1*) et vasculaire VCAM1 (*vascular cell adhesion molecule 1*) dans les vaisseaux angiogéniques (Motz and Coukos, 2013). Ceci contribue collectivement à la nature extrêmement immunosuppressive des GBMs et à la faible infiltration par les lymphocytes T cytotoxiques (Du et al., 2008; De Vleeschouwer and Bergers, 2017).

3.1.2.3. Matrice extracellulaire du GBM (MEC)

Un des composants essentiels du TME est la MEC. Elle constitue le composant non cellulaire du microenvironnement présent dans tous les tissus et fonctionne à la fois comme un échafaudage physique et une source de signaux biochimiques qui sont essentiels pour la morphogenèse, la migration, la différenciation et l'homéostasie des tissus. (De Vleeschouwer and Bergers, 2017; Oksdath et al., 2018). La MEC est essentiellement constituée de glycosaminoglycanes incluant l'acide hyaluronique (HA), de protéoglycanes (par exemple, lecticanes) et de glycoprotéines comme les ténascines (Figure 10) (Barnes et al., 2017; de Gooijer et al., 2018). En raison de leurs propriétés cérébrales uniques, les différents types de cellules neurales et cérébrales contribuent à la production, à la maturation et à la structure de la MEC (De Vleeschouwer and Bergers, 2017). Les interactions entre les cellules de GBM et la MEC jouent un rôle crucial dans l'invasion et la malignité. Au cours de la progression du gliome, la MEC subit un dépôt et un remodelage qui changent sa composition et son architecture, en partie en raison de la production accrue et altérée de certains composants de la MEC contenus dans les gliomes, tels que la ténascine-C et l'HA. De manière intéressante, une étude récente a révélé que les gliomes de bas grade et les GBMs sont progressivement plus rigides que les tissus cérébraux normaux et que l'agressivité des gliomes et le pronostic du patient sont corrélés aux niveaux de HIF-1α et à la rigidité de la MEC enrichie en ténascine-C (Miroshnikova et al., 2016). De plus, la MEC entourant la tumeur présente la même composition en collagène IV, fibronectine et laminine que le tissu cérébral sain, cependant les niveaux d'expression peuvent varier. On observe notamment des niveaux accrus d'HA en

raison de taux élevés d'hyaluronane synthases 1, 2 et 3 dans les gliomes (Koh et al., 2018; Perrin et al., 2019).

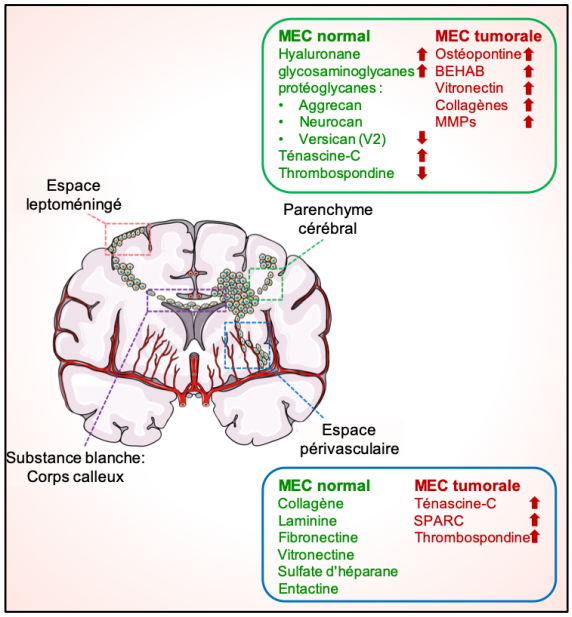


Figure 10. Les changements spécifiques de la matrice extracellulaire (MEC) dans une tumeur cérébrale par rapport à la MEC du cerveau normal. (D'après de Gooijer et al., 2018). BEHAB : *Brain-Enriched Hyaluronan-Binding Protein* ; MMPs : Matrix metalloproteinases ; SPARC : *Secreted Protein Acidic And Cysteine Rich*.

Dans ce contexte, les cellules de GBMs interagissent avec plusieurs de ces composants de la MEC *via* la sécrétion d'enzymes comme les hyaluronidases ou les métalloprotéinases matricielles (MMPs). Ces mécanismes ont un impact direct sur le remodelage de la MEC et sont essentiels pour la migration et l'invasion par les cellules de gliome (Payne and Huang, 2013; Perrin et al., 2019).

Au sein du TME, on retrouve aussi de nombreux facteurs solubles, sécrétés par des cellules tumorales ou stromales, ou extravasés à partir des compartiments intravasculaires. Ces facteurs construisent un compartiment fluide interstitiel dynamique dans lequel les cellules et la MEC baignent. Les métabolites comme le lactate résultant de l'effet typique de Warburg dans le métabolisme des tumeurs et l'adénosine accumulée dans les zones hypoxiques, ont aussi un impact important sur les cellules tumorales ainsi que les cellules immunitaires (Liberti and Locasale, 2016; De Vleeschouwer and Bergers, 2017). En effet, ces métabolites exercent principalement des effets suppressifs sur les cellules immunitaires alors qu'ils stimulent la néo-angiogenèse et la progression tumorale. Les galectines par exemple sont des lectines solubles avec une spécificité pour le β-galactoside, ce qui leur permet de se lier aux protéoglycanes et aux glycoprotéines de la MEC du cerveau (Strik et al., 2012). Dans les gliomes malins, les

galectine-1, -3 et -8 sont surexprimées et favorisent la migration et l'invasion de cellules U87 et U373 de GBM en stimulant le remodelage du cytosquelette d'actine (Debray et al., 2004; Toussaint et al., 2012; Metz et al., 2016). De plus Thijssen et al., (Thijssen et al., 2010) ont démontré que la prolifération et la migration des cellules endothéliales tumorales reposent sur la présence de galectine-1 dans le TME en favorisant l'activation de la voie ERK (*Extracellular signal-regulated kinases*) et que la sous-expression de l'expression de galactine-1 à l'aide de petits ARN interférents (siRNA) dans des cellules Hs683 de GBM entraîne une diminution de la sécrétion de VEGFA dans le milieu de culture (Le Mercier et al., 2008).

Dans l'ensemble, les composants non tumoraux du TME sont importants dans la prolifération et l'invasion des cellules tumorales, et offrent également des opportunités thérapeutiques.

4. Prise en charge thérapeutique

4.1. Stratégies thérapeutiques actuelles

La thérapie des gliomes implique des approches multidisciplinaires associant le diagnostic, le traitement et le suivi de l'agressivité par imagerie. Pour ce qui concerne les tumeurs de bas grade, la récidive éventuelle est surveillée par imagerie et dans les tumeurs de haut grade, la récidive mais aussi les altérations cérébrales induites par le traitement, notamment la radionécrose, font aussi partie du suivi thérapeutique. Les tumeurs de taille supérieure à 1 cm nécessitent un examen IRM tous les 6 mois. Les techniques de neuroimagerie sont utilisées pour diagnostiquer et examiner le site, l'étendue et l'activité biologique de la tumeur, avant et après traitement (Rajesh et al., 2017). Actuellement, le traitement standard pour les GBMs nouvellement diagnostiqués repose sur une résection chirurgicale associée à la radiothérapie (RT) et la chimiothérapie concomitante (protocole de Stupp).

4.1.1. La chirurgie

La chirurgie est la première approche thérapeutique du GBM et reste une intervention essentielle dans le traitement des tumeurs malignes du cerveau. La décision de procéder à l'exérèse chirurgical d'un gliome repose sur les critères suivants : nature de la lésion, état neurologique du patient évalué par l'indice de Karnofsky qui juge l'état fonctionnel du patient, localisation tumorale avec pour objectif de contrecarrer la croissance tumorale et arrêter la transformation maligne (Rajesh et al., 2017). L'intervention chirurgicale consiste en la résection maximale en toute sécurité ainsi qu'une biopsie de la tumeur (localisation fonctionnelle délicate) permettant *i*) le diagnostic anatomocytopathologique et moléculaire, *ii*)

l'aide à l'efficacité du traitement, iii) le retard de l'aggravation clinique tout en améliorant la qualité de vie du patient (Fernandes et al., 2017). Une résection plus étendue de 78% à 98% est associée à une survie plus longue chez les patients qui subissent une résection totale, suivis d'une RT et de la chimiothérapie au TMZ (Lacroix et al., 2001; Sanai and Berger, 2010; Wolbers, 2014). D'un point de vue impact lésionnel, il n'a pas été démontré des déficits neurologiques post-opératoires quand les marges de résection sont supérieures à 2 cm du cortex éloquent, alors que des déficits sont mesurés dans 33% des cas lorsque les marges sont comprises entre 1 et 2 cm, et dans 50% des cas lorsque les marges sont inférieures à 1 cm (Mueller et al., 1996; Pallud et al., 2017). Ces données suggèrent globalement que l'exérèse chirurgicale est essentielle tant sur le plan thérapeutique que clinique pour les patients atteints de GBM. L'IRM postopératoire permet d'évaluer l'étendue de la résection dans les 72 heures suivant l'intervention, même si l'appréciation reste difficile en raison de modifications postopératoires inflammatoires (Fernandes et al., 2017).

4.1.2. Radiothérapie / Chimiothérapie

Actuellement, l'association de la RT (60 Gy en 30 fractions) au TMZ (75 mg/m^2/jour pendant 6 semaines) suivi de six cycles en maintenant la dose de TMZ (150 à 200 mg/m^2/ jour pendant les 5 premiers jours d'un cycle de 28 jours) correspond au traitement standard actuel après résection chirurgicale (Protocole de Stupp) (Stupp et al., 2005; Gilbert et al., 2013). Cette méthode représente la première avancée majeure dans le traitement du GBM depuis environ une décennie, car cette combinaison améliore significativement la médiane de survie du patient de 14,6 *vs* 12,1 mois par rapport à la RT seule (Figure 11). D'autres récents essais cliniques ont pu confirmer depuis ces résultats (Szczepanek et al., 2013; Feng et al., 2017)

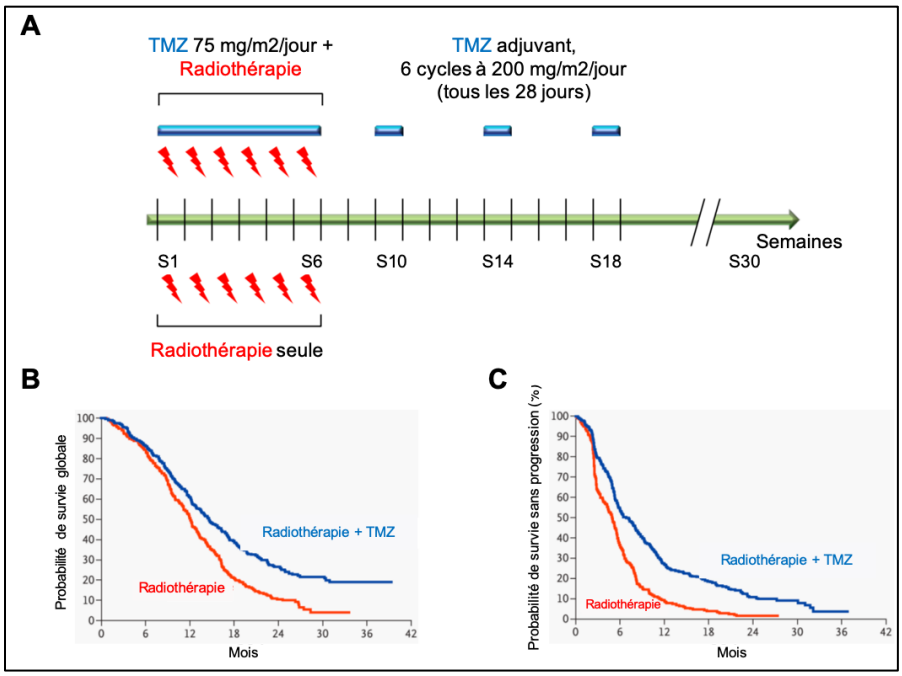


Figure 11. Protocole de Stupp. A. Illustration du protocole initialement éprouvé en phase clinique. Après exérèse chirurgicale, deux cohortes de patients ont été traitées par radiothérapie seule (rouge) ou par radio- et chimiothérapie à l'aide de témozolomide (TMZ, bleu). Le TMZ est administré per os en six doses de 75 mg/m2/jour pendant les six semaines suivant l'opération, puis après quatre semaines de récupération, en six cycles de traitement adjuvant à hauteur de 200 mg/m^2/jour tous les 28 jours. **B**. Les courbes de Kaplan-Meier illustrant la survie moyenne des patients traités par radiothérapie seule (courbe rouge) ou en combinaison avec le TMZ (courbe bleue). Globalement, la chimiothérapie concomitante permet d'élever le taux de survie à deux ans de 10,4 à 26,5%. **C**. Survie moyenne prenant en compte l'absence de progression tumorale qui se traduit classiquement par une augmentation de plus de 25% de la taille de la tumeur ou l'apparition de nouvelles lésions conjointes à un besoin accru en corticostéroïdes prescrits pour traiter l'œdème cérébral. (D'après Stupp et al., 2005).

Le TMZ est une chimiothérapie orale avec une pharmacocinétique linéaire présentant une excellente biodisponibilité, qui peut franchir la BHE en raison de sa nature lipophile (Koukourakis et al., 2009; Woo et al., 2019). Une fois en contact avec le pH physiologique légèrement basique du sang, il subit une hydrolyse spontanée pour devenir du 5-(3-methyltriazen-1-yl)-imidazole-4- carboxiamide (MTIC), le métabolite actif. Le MTIC se dégrade rapidement pour former du 4-amino-5-imidazole-carboxamide et du méthyldiazonium, un cation très réactif (Wick et al., 2009; von Deimling et al., 2011). C'est ce cation qui provoque une alkylation de la guanine en position O^6 et une alkylation supplémentaire en position N^7 (Lopes et al., 2013; Woo et al., 2019) responsables de dommages de l'ADN. Mais les cellules peuvent corriger les altérations induites par la chimiothérapie grâce à divers mécanismes de réparation de l'ADN. La MGMT ou AGT (*O6-Alkylguanine-DNA Alkyltransferase*), est une enzyme de réparation qui répare les alkylations de l'ADN au niveau de la guanine dans la position O^6. La méthylation du promoteur de la MGMT (résidus cytosine des îlots CpG de la région 5' du promoteur), entraîne une altération de la structure de l'hétérochromatine

responsable de l'inhibition de liaison des facteurs de transcription, et donc de la transcription. La méthylation du promoteur MGMT touche de 30 à 50% des patients atteints de GBM et pourrait à la fois être un facteur pronostic et un critère d'indication d'une chimiothérapie adjuvante. Une étude de phase III, intégrant une large cohorte européenne et canadienne, a montré la méthylation du promoteur MGMT comme facteur prédictif d'une amélioration de la survie à 2 ans (10 à 26%) en réponse au TMZ associé à la RT (Stupp et al., 2005).

De plus, les études suggèrent que la chimiothérapie par TMZ est associée à peu d'effets indésirables avec toutefois le risque de complications hématologiques, de fatigue et d'infections augmentés suite à son utilisation (Hart et al., 2013). Le principal problème est en réalité lié aux mécanismes de résistance au TMZ (Figure 12) (Jain, 2018; Woo et al., 2019). Une stratégie a consisté à traiter, après la période de traitement RT-TMZ concomitants, avec des doses importantes de TMZ (75-100 mg/m^2 pendant 21 jours d'un cycle de 28 jours avec un total de 6 à 12 cycles) pour réduire les niveaux de MGMT dans la tumeur en particulier dans une cohorte de patients présentant un promoteur MGMT non méthylé (Le Rhun et al., 2015; Fernandes et al., 2017). La survie moyenne ainsi que la survie sans progression du groupe traité avec ces doses de TMZ n'étaient pas significativement différentes du groupe traité par la dose standard de TMZ (150-200 mg/m^2/ jour pendant les 5 premiers jours d'un cycle de 28 jours avec un total de 6 cycles). Il y avait au contraire plus de toxicité chez les patients traités avec une forte dose de TMZ (53% contre 34% ; p <0,001), ainsi qu'une détérioration plus importante des fonctions cérébrales et de la qualité de vie des patients (Gilbert et al., 2013).

L'inhibition de l'expression de MGMT constitue l'un des puissants facteurs pronostiques/prédictifs de la survie globale (Hegi et al., 2005). La chimiorésistance au TMZ est relayée par d'autres événements moléculaires indépendants de l'expression de MGMT (Figure 12), notamment *i*) le système de réparation par excision de base (BER) qui permet d'enlever des bases simples endommagées avant la réplication, *ii*) la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes par les microARN (miR-16, miR-21) surexprimés en réponse à l'exposition au TMZ, entrainant par exemple l'inhibition de protéines pro-apoptotiques de type Bax (*B-cell lymphoma 2-associated X*) ou les caspases et à l'inverse, une augmentation des protéines anti-apoptotiques du type Bcl-2, *iii*) l'activité des jonctions gap enrichies en connexines (connexine 43) dont le niveau d'expression est inversement proportionnel à la résistance au TMZ dans le contexte du TME, ainsi que *iv*) le statut hypoxique puisque TMZ favorise la surexpression de facteur de transcription HIF-1α . Ce dernier, comme déjà précisé, favorise la prolifération, l'invasion ainsi que l'angiogenèse tumorale (Woo et al., 2019). C'est ainsi que des thérapies plus ciblées touchant spécifiquement certaines de ces molécules ont été

testées avec jusqu'à présent une amélioration modérée de la survie et de la qualité de vie des patients.

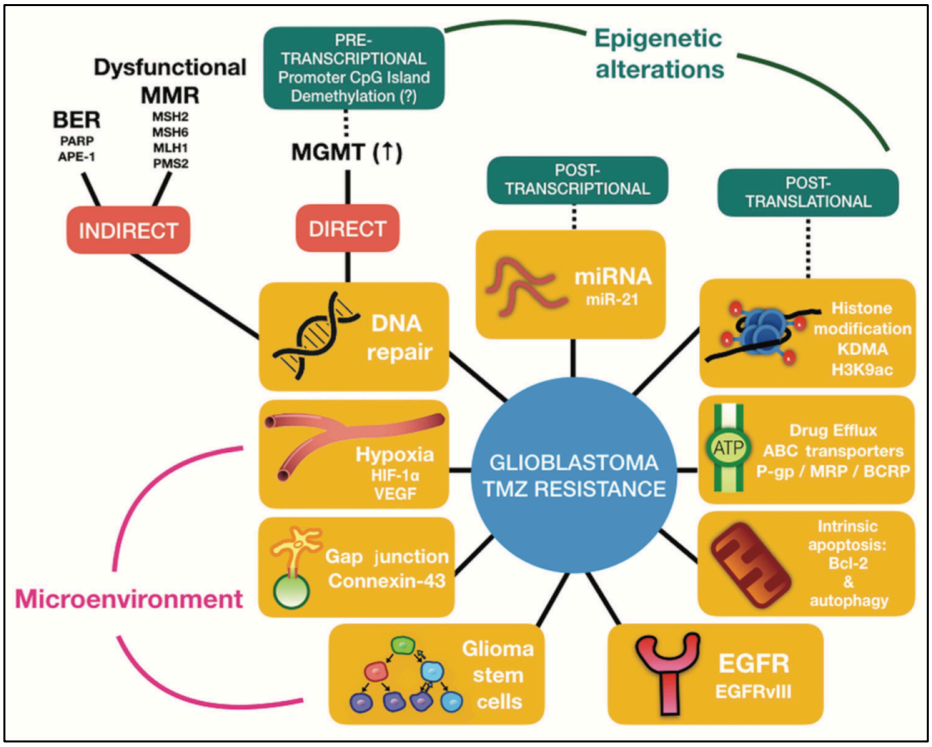


Figure 12. Résumé des mécanismes de résistance au TMZ dans les GBMs. Ces mécanismes sont classés en trois grandes catégories : épigénétiques, cellulaires et ceux liés au microenvironnement tumorale. Les mécanismes épigénétiques peuvent être catégorisés en processus associés à la réparation de l'ADN (pré-transcriptionnel), microARN (post-transcriptionnel) ou des modifications des histones (post-trasductionnel). Les mécanismes cellulaires sont liés à l'expression des protéines transmembranaires et sont donc de nature extrinsèque, comme l'efflux de médicaments ou de facteurs de croissance. Alternativement, l'activité intrinsèque des voies apoptotiques et autophagiques peut être modifiée en réponse à l'exposition à la TMZ. Les mécanismes liés au microenvironnement représentent les facteurs extracellulaires (comme l'hypoxie ou les interactions intercellulaires) qui peuvent influencer la sensibilité au TMZ. ABC : *ATP-binding cassette* ; APE-1 : *Apurinic/apyrimidinic endonuclease)*; Bcl-2 : *(B cell lymphoma-2 protein) ;* BCRP : *Breast cancer resistance resistance protein ;* BER : *Base excision repair*; EGFR : *Epidermal growth factor* ; HIF-1α : *Hypoxia-inducible factor-1α* ; IGF1R : *Insulin-like growth factor-1 receptor* ; MGMT : *Méthylguanine methyltransferase* ; miRNA : MicroARN ; MMR : *Mismatch repair* ; MRP : *Multidrug resistance-associated protein* ; MSH : *MutS protein homolog* ; P-gp: P-glycoprotein ; PARP : *Poly(ADP-ribose) polymerase ;* RTK : *Receptor tyrosine kinase* ; TMZ : Témozolomide ; VEGF : *Vascular endothelial growth factor.* (D'après Woo et al., 2019).

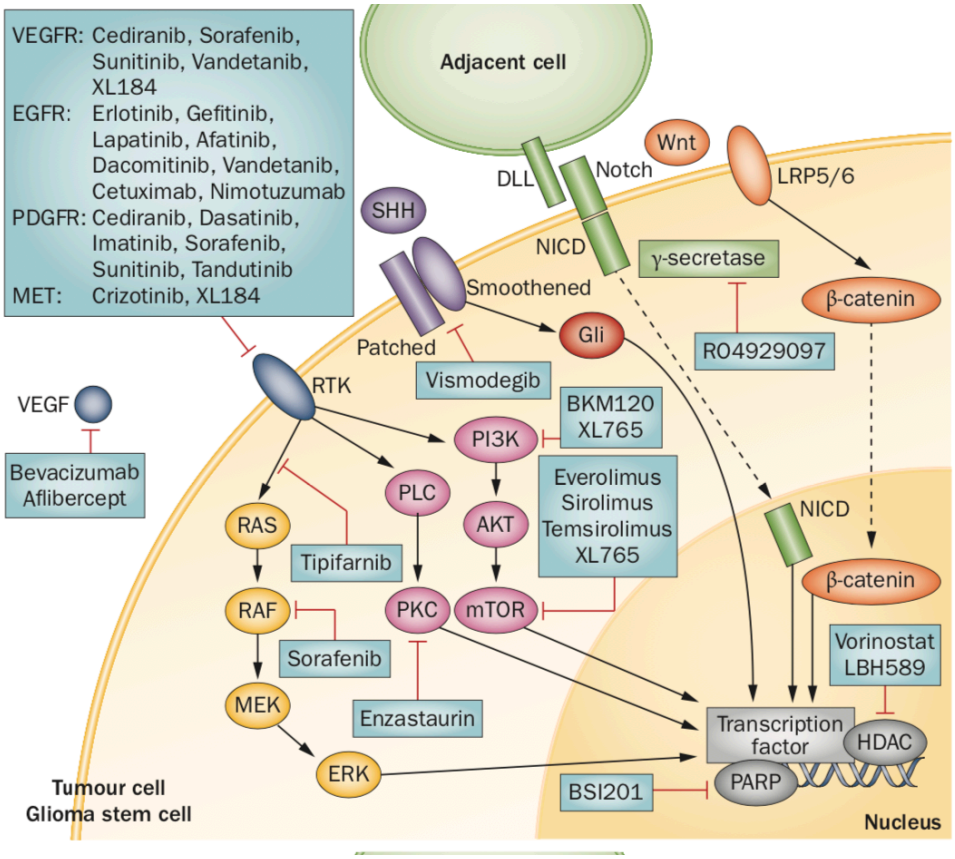


Figure 13. Principales voies de signalisation altérées dans le GBM et cibles thérapeutiques identifiées. AKT : *Protein Kinase B* ; DLL *: delta-like ligand* ; EGFR : *Epidermal growth factor receptor* ; ERK : *Extracellular signal- regulated kinase* ; Gli : *Glioma-associated oncogene homolog 1* ; HDAC : *Histone deacetylase* ; LRP : *lipoprotein receptor-related protein* ; MAPK : *Mitogen-activated protein kinase* ; MEK : *Mitogen-activated protein kinase* ; mTOR : *Mammalian target of rapamycin* ; NICD : *Notch intracellular domain* ; PARP : *poly(ADP-ribose) polymerase* ; PDGFR: *Platelet-derived growth factor receptor* ; PI3K : *phosphatidylinositol 3-kinase* ; PKC : *Protein kinase C* ; PLC : Phospholipase C ; RAF : *Proto-oncogene Serine/Threonine-Protein Kinase* ; RAS : *Proto-Oncogene, GTPase*; RTK : Receptor tyrosine kinase; SHH : *Sonic hedgehog* ; VEGF : *Vascular endothelial growth factor*. Wnt : *Wingless-related integration site*. (D'après Tanaka et al., 2013).

4.1.3. Les thérapies combinées dans le traitement des GBMs

Une approche potentielle dans le traitement de première intention du GBM pourrait consister à explorer des combinaisons thérapeutiques plus efficaces. Des preuves récentes de cette approche, également appelée thérapie combinée, montre des effets synergiques en terme d'efficacité du médicament et semble actuellement constituer le moyen le plus efficace, en tout cas dans des modèles précliniques, pour contrôler des tumeurs agressives telles que les GBMs (Ghosh et al., 2018). Par exemple, l'administration concomitante du sulforaphane (SNF), un inhibiteur du facteur de transcription NF-κB en combinaison avec le TMZ dans des lignées de GBM résistantes au TMZ (U87 et U373) rend ces cellules plus sensibles à la chimiothérapie, moins prolifératives et induit une mort cellulaire accrue dans les xénogreffes chez des souris *Nude* (Lan et al., 2016).

La carmustine (1,3-bis (2-chloroéthyl)-1-nitrosourea, BCNU), un composé nitrosourée utilisé comme agent d'alkylation qui, testé en monothérapie après RT permet une médiane de survie globale de 22 semaines (Reithmeier et al., 2010), mais dont la toxicité peut être importante de sorte que l'administration d'autres thérapies en cas de progression ultérieure de la tumeur peut être délicate. Deux études ont cependant montré que le BCNU en combinaison avec d'autres agents, tels que l'irinotécan (seconde ligne de traitement) ou l'erlotinib semble actif mais peu efficace dans l'amélioration de la survie globale des patients (Brandes et al., 2004; Prados et al., 2004). La délivrance locale de chimiothérapie comme le BCNU sous forme de pastilles de Gliadel®, tapissant les parois de la cavité de résection, s'est montrée être une possibilité de complément thérapeutique avec une voie d'accès plus efficace. Cependant, l'augmentation modeste et relative de la survie des patients (Engelhard, 2000) semble liée à la faible diffusion du Gliadel® dans le parenchyme cérébral, limitée à quelques millimètres du fait de son passage *via* la BHE vers la circulation sanguine. Cela est expliqué par le faible poids moléculaire du BCNU et la nature lipophile de la molécule (Wang et al., 1999), indiquant que même une chimiothérapie locale n'est pour l'instant pas associée à une amélioration significative de la survie.

Comme illustré sur la Figure 13 d'autres approches thérapeutiques utilisant notamment des inhibiteurs des voies de signalisation associées aux facteurs de croissance ou l'immunothérapie ont été mises en place pour spécifiquement cibler des voies de signalisation impliquées dans la gliomagenèse. De nombreux facteurs de croissance jouent un rôle essentiel dans le développement des GBMs tel que l'EGF. L'EGFR surexprimé ou muté dans les GBMs a été le premier à pouvoir être ciblé par l'erlotinib et le gefitinib, les premières générations de thérapie ciblée utilisées dans le traitement de gliomes récurrents, soit en monothérapie, soit en association avec d'autres agents cytotoxiques, mais sans bénéfice thérapeutique significatif (Tanaka et al., 2013). En effet, par exemple, l'EGFRvIII, la forme fréquemment mutée de l'EGFR dans les GBMs, confère une résistance thérapeutique et une croissance tumorale (Ghosh et al., 2018). Le nimotuzumab, un anticorps anti-EGFR qui en se fixant entraîne une réduction de la phosphorylation de l'EGFRvIII et de Akt (protéine kinase B, PKB) dans des lignées de GBM (U87MG, LNZ308), renforce l'activité antitumorale du TMZ *via* l'inhibition de la croissance tumorale et l'amélioration de la survie de souris *Nude* porteuses d'une lignée de GBM exprimant EGFRvIII xénogreffée en sous-cutanée ou au niveau intracérébral (Nitta et al., 2016).

Le pronostic sombre est lié en partie au potentiel proliférant et migratoire de néo-vaisseaux intra-tumoraux, et au caractère invasif des cellules tumorales gliales qui mettent en jeu des

étapes essentielles de l'invasion dans le cerveau, impliquant l'adhésion par les intégrines à la MEC et la dégradation de cette MEC par les métalloprotéinases (MMPs). Par conséquent, des thérapies anti-invasives et anti-angiogéniques pour traiter les GBMs ont été proposées et récemment testées. C'est le cas d'un anti-intégrine αvβ3 et β5, le Cilengitide, ou bien d'inhibiteurs de MMPs, tels que le Marimastat, ayant un effet répresseur de la croissance tumorale *in vitro*, mais sans résultat clinique convaincant chez l'Homme (Soda et al., 2013). A l'heure actuelle, le principal traitement anti-angiogénique des GBMs récidivants est le Bevacizumab (Avastin®), un anticorps humanisé dirigé contre le VEGFA, qui permet de normaliser la néo-vascularisation tumorale. L'Avastin® est donnée parfois seul ou en combinaison, mais aucune étude n'a pu démontrer un réel effet bénéfique du traitement, sur la survie des patients atteints de gliomes malins (Reardon et al., 2012; Chinot et al., 2014; Gilbert et al., 2014), permettant toutefois une augmentation de la survie sans progression d'environ 2 mois. L'évaluation des rechutes des patients a permis de mettre en évidence une modification comportementale des tumeurs gliales qui favorise une invasion large du parenchyme cérébral au profit de la néo-angiogenèse. Plusieurs molécules ou thérapies ciblées au fort potentiel thérapeutique dans d'autres types de cancers, n'ont pas démontré d'effet sur la survie en étude clinique chez les patients GBM (Chang et al., 2014, Reardon et al., 2005, Uhm et al., 2011). Ainsi les progrès thérapeutiques chez les patients atteints de GBM, sont encore rares.

Une intéressante étude a montré qu'un régime « RIST » combinant la rapamycine (un inhibiteur de mTOR), l'irinotécan (un inhibiteur de topoisomérase-I), le sunitinib (un anti-angiogénique ciblant le VEGFAR) et le TMZ ou un variant aRIST (l'alternative de la rapamycine, le GDC-0941 (un inhibiteur puissant des PI3Kα/δ)) inhibe la croissance de cultures primaires de GBM fraichement isolées. Les mécanismes qui entrent en jeu dans le mécanisme thérapeutique sont l'inhibition de protéines anti-apoptotiques (XIAP, *X-Linked Inhibitor Of Apoptosis Protein ;* BCL-2) et l'activation simultanée de protéines pro-apoptotiques (p53 et BAX) (Nonnenmacher et al., 2015). L'effet de ces composants individuels est partiel, mais leur combinaison, même à de faibles doses pour réduire la toxicité et d'autres effets indésirables, entraîne une inhibition significative de la viabilité cellulaire (Nonnenmacher et al., 2015).

Bien que de nombreuses combinaisons thérapeutiques utilisées dans des modèles précliniques pour le traitement par GBM aient révélé des résultats prometteurs, la réelle efficacité de ces thérapies combinées est plutôt rare voire inexistante (Figure 14). Par exemple, trois essais randomisés de phases II-III ont comparé la lomustine (un antinéoplasique cytostatique alkylant), en monothérapie ou en combinaision avec des agents en phase experimentale, l'enzastaurine (inhibiteur de PKC), le cediranib (inhibiteur de RTKs) ou le

galunisertib (inhibiteur de TGF-β) (Wick et al., 2010; Batchelor et al., 2013; Brandes et al., 2016). Dans les trois essais, les résultats se sont montrés comparables avec une médiane de survie globale de 6,6 à 9,8 mois, similaire entre les groupes, traités avec un seul agent ou en combinaison avec la lomustine (Fernandes et al., 2017).

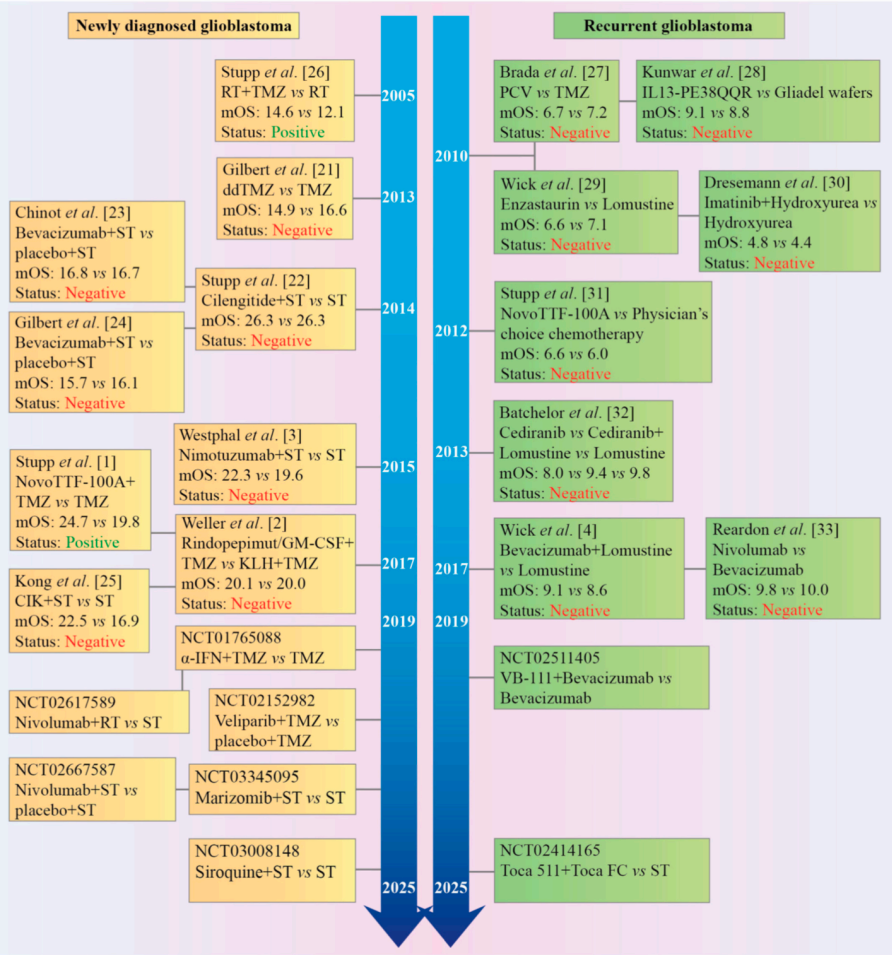


Figure 14. Chronologie des essais cliniques de phase III chez des patients de GBM nouvellement diagnostiqué ou récurrent. Les nombreux échecs dans ces essais cliniques sont indiqués en rouge (*Negative*) ainsi que les médianes de survie globale (mOS) avec ou sans les numéros NCT (*National Clinical Trial*). α-IFN : *Interferon-alpha* ; Bevacizumab : antibody anti-*vascular endothelial growth factor* (VEGF) ; Cediranib: Inhibiteur du récepteur de VEGF ; CIK: *autologous cytokine-induced killer cells*; Enzastaurin: inhibiteur de la protéine kinase Cβ (PKCβ) ; IL13-PE38QQR : Une cytotoxine chimérique recombinante composée d'interleukine 13 humaine (IL-13) fusionnée à une forme tronquée et mutée de *Pseudomonas aeruginosa exotoxine A* (PE38QQR) ; Marizomib : Inhibiteur irréversible du protéasome ; Nimotuzumab : Anticorps anti-*epidermal growth factor receptor* (EGFR) ; Nivolumab : Anticorp anti-*programmed cell death protein 1* (PD-1) ; PCV : Procarbazine, Lomustine, et vincristine ; Rapamycin : Inhibiteur de *Mammalian Target Of Rapamycin* (mTOR) ; RT : Radiothérapie ; Siroquine : *Sirolimus (rapamycin) plus hydroxychloroquine sulfate* ; ST : *standard therapy*; TMZ/ddTMZ : *temozolomide/dose dense temozolomide* ; Toca 511 : Vecteur de réplication gamma-rétroviral codant pour la cytosine désaminase qui convertit la 5-fluorocytosine (FC), un antifongique, en 5-fluorouracil (FU), un médicament antinéoplasique ; VB-111 : *A non-replicating adenovirus 5 carrying a proapoptotic Fas-chimera transgene under the control of an endothelial cell-specific promoter* ; Veliparib: *A poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) 1 and 2 inhibitor.* (D'après Stepanenko et Chekhonin 2018a).

Malgré de nombreuses thérapies multimodales agressives (chirurgie, radiothérapie, TMZ, lomustine, bevacizumab, ré-irradiation, etc), la survie des patients adultes présentant un GBM nouvellement diagnostiqué et récurrent est généralement inférieure à 18-20 mois (Stupp et al., 2017; Weller et al., 2017) et à 8 à 12 mois, respectivement (Seystahl et al., 2016; Wick et al., 2017). Au cours de la dernière décennie, malgré les progrès très important dans le domaine des thérapies ciblées, à ce jour, aucune d'entre elles, *i.e*. médicaments/anticorps ou combinaison d'inhibiteurs de petites molécules, n'a été démontrée comme étant plus efficace que le TMZ ou capable d'augmenter l'efficacité du traitement standard chez les patients atteints de GBM primaire ou récurrent (Stepanenko and Chekhonin, 2018a). Un taux élevé d'échecs dans ces essais cliniques (Figure 14) et un manque de thérapie ciblée efficace ont favorisé le développement d'approches thérapeutiques conceptuellement distinctes telles que l'immunothérapie cellulaire/peptidique et la virothérapie oncolytique. En effet, les immunothérapies de nouvelle génération et les virus oncolytiques modifiés génétiquement et compétents ont démontré une efficacité élevée dans les modèles précliniques (Mitchell et al., 2015; Garg et al., 2016; Stepanenko and Chekhonin, 2018b).

4.1.4. Autres Stratégies thérapeutiques innovantes

De nombreuses nouvelles stratégies thérapeutiques sont en cours de développement.

- **Vaccination visant à éliminer le GBM**

Environ 90 essais cliniques de vaccins contre le GBM étaient répertoriés en 2018 (Jain, 2018). Grâce à de nouvelles biotechnologies, des vaccins plus spécifiques et plus « efficaces » contre le GBM ont été proposés. DCVax, un vaccin personnalisé à base de cellules dendritiques (DC) autologues stimulées par des antigènes purifiés spécifiques de la tumeur, ou des extraits de cellules tumorales dérivées du GBM au moment de la résection, a été approuvé en Suisse pour le traitement du GBM. Ce vaccin a été testé en phase I aux Etats-Unis (*National Clinical Trial* (NCT) 02146066) (Jain, 2018). Le niveau d'expression des antigènes tumoraux incluant HER2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*), TRP-2 (*tyrosinase-related protein-2*), gp100 (*Premelanosome protein*), IL13Rα2 (*Interleukin 13 Receptor Subunit Alpha 2*), HLA-A1 (*Human Leukocyte Antigen A1*) ou l'importance de la population de CSG semblent corrélés à une survie globale prolongée (Phuphanich et al., 2013).

D'autres essais de phase II (NCT02808364) et III (NCT00045968) sont actuellement en cours. Le dernier évalue les effets à long terme de la combinaison du vaccin DCVax autologue avec TMZ après chirurgie et chimio-radiothérapie standard. Ce traitement améliore les taux de

survie de certains patients et les études portent actuellement sur les plus longs survivants (survie globale médiane de 40,5 mois) (Liau et al., 2018). Globalement, les effets indésirables liés à DCVax sont comparables au traitement standard seul.

Des vaccins à base de protéines de choc thermique (HSP, *Heat-shock proteins*) ont aussi été développés et sont en cours d'essai (NCT01814813) en monothérapie ou en combinaison avec l'anti-angiogénique bevacizumab. Ces HSP sont utilisées pour vectoriser divers antigènes tumoraux jusqu'aux cellules présentatrices d'antigènes pour stimuler le système immunitaire (Jain, 2018).

- **Poliovirus recombinant**

Le polio-rhinovirus chimère non pathogène recombinant (PVSRIPO, *Recombinant nonpathogenic polio-rhinovirus chimera*) cible le récepteur du poliovirus neurotrope CD155, qui est surexprimé par les cellules de GBM. L'action de ce PVSRIPO est d'utiliser le récepteur CD155 comme voie d'entrée dans les cellules pour provoquer la lyse et la libération d'antigènes tumoraux ainsi que des molécules reconnues par les cellules de la réponse immunitaire innée (Longo and Baden, 2018). Un essai clinique de phase II a montré que l'administration intratumorale de PVSRIPO à l'aide d'un cathéter chez des patients atteints de GBM récurrent entraîne chez les patients traités, une survie passant de 24 à 36 mois supérieure à celle des patients témoins, sans observation de neurovirulence ou neurotoxicité (Desjardins et al., 2018).

- **Les nanobiotechnologies pour une administration ciblée du traitement**

Les nanotechnologies pour la vectorisation des médicaments anticancéreux permettent une distribution ciblée et efficace dans la tumeur à travers la BHE, pour améliorer la spécificité et sélectivité, permettant de réduire la dose de l'anticancéreux par rapport aux formulations classiques, et donc la toxicité (Jain, 2018). Dans une étude expérimentale sur un modèle murin xénogreffé de GBM, l'administration de micelles sensibles au pH, fonctionnalisés en surface par le PDGF pour le ciblage et le fluorophore Dyelight 680 pour la détection, a permis la livraison et l'accumulation spécifiques de TMZ dans les tumeurs avec une destruction accrue des cellules tumorales et réduction de la toxicité par rapport aux animaux contrôles (Miller et al., 2016). Ainsi, des nanotransporteurs comme les micelles, mais aussi les nanoparticules constituées de polybutylcyanoacrylate (PBCA) ou *polylactic-co-glycolic acid* (PLGA) coatées par du polysorbate 80 ou du poloxamère 188, peuvent être utilisées comme vecteurs pour améliorer l'administration de médicaments anticancéreux au cœur du GBM. Ce sont de nouvelles stratégies prometteuses qui feront probablement l'objet d'essais cliniques.

- **Traitement de la tumeur par champ magnétique alternatif (TTF)**

Le TTF (*TTfields*) est une technologie portable non invasive qui repose sur des champs électriques alternatifs de faible intensité, qui perturbent la mitose et inhibent la croissance tumorale. Cette technologie est approuvée pour les GBMs aux Etats-Unis par la FDA (Jain, 2018). Des études précliniques et des essais cliniques du TTF ont montré que le TTF était aussi efficace que la chimiothérapie contre les GBMs, mais la combinaison des deux prolonge la survie globale, la survie sans progression du GBM et est sans effet indésirable (Stupp et al., 2015 ; Zhu and Zhu, 2017). Les combinaisons des TTF avec la radiothérapie, la chimiothérapie ciblée ainsi que l'immunothérapie restent à explorer.

Les défis majeurs actuels pour tenter de considérablement améliorer les durées de vie des patients atteints de GBM sont en partie (1) l'intégration de plusieurs disciplines de recherche sur les gliomes, de la neurobiologie fondamentale aux essais cliniques (Aldape et al., 2019), (2) mieux comprendre les propriétés et les fonctions du TME dans la biologie et le traitement des GBMs (Quail and Joyce, 2017), (3) développer des modèles précliniques plus prédictifs de GBMs récurrents par la mise au point de modèles de souris génétiquement modifiés et des xénogreffes dérivées de patients (*patient-derived xenografts ou PDX*) pour mieux reproduire les spécificités des GBMs par rapport aux modèles existants (Aldape et al., 2019), (4) adresser plus spécifiquement les thérapies au cœur de la tumeur, dans un TME hétérogène, en analysant par des études de « *single cell* » l'évolution des données génomiques avant, pendant et après le traitement et proposer des traitements adaptés (Patel et al., 2014a) car ces tumeurs restent à ce jour très agressives.

5. Agressivité des GBMs et transformation mésenchymateuse

La progression tumorale implique plusieurs étapes d'évolution phénotypique et de transformations moléculaires qui conduisent à l'invasion locale et à la dissémination de cellules de gliome (Pala et al., 2013; Iwadate, 2016). Au cours de la progression tumorale, certaines cellules acquièrent un phénotype agressif qui consiste principalement à leur capacité à établir des métastases, facilitées par la transition épithéliale-mésenchymateuse (EMT) (Kalluri and Weinberg, 2009; Dongre and Weinberg, 2019), un processus qui participe aux différents stades du développement embryonnaire (Thiery, 2002). Au cours de ce processus, les cellules épithéliales polarisées montrent une diminution de l'adhésion cellule-cellule, de la polarité apicale-basolatérale et de l'expression des marqueurs épithéliaux (Figure 15), qui les transforment en cellules mésenchymateuses avec une capacité migratoire accrue et une résistance élevée aux traitements (Iwadate, 2016; Colella et al., 2019). Ce processus dynamique

et agressif est relayé par l'expression de marqueurs mésenchymateux associée à un phénotype des cellules tumorales permettant la dégradation et le remodelage de la MEC, la réorganisation du cytosquelette et la migration pour pouvoir d'une part, envahir les tissus environnants et d'autre part, accéder à la circulation sanguine pour ensuite établir des métastases (Figure 15) (Pala et al., 2013; Dongre and Weinberg, 2019). Concernant les gliomes, il sera ici plutôt question d'une transition mésenchymateuse (TM).

5.1. Réarrangement du cytosquelette, des complexes d'adhésion, et protrusions cellulaires des GBMs

Une des principales caractéristiques de la TM est la capacité migratoire accrue des cellules. En effet, la migration des cellules de gliome est un processus coordonné à plusieurs étapes initié par la liaison de molécules chimioattractantes ou chimiokines telles que les ligands SDF-1, TGF-β aux récepteurs membranaires tels que CXCR4 (*C-X-C receptor 4*), RTK ou d'autres facteurs pro-migratoires (HIF-1, EGF), suivie de l'activation ou de la désactivation de diverses petites GTPases (RhoA, Rac, Cdc42) et des changements rapides dans la dynamique des filaments d'actine ainsi que la formation et le désassemblage des complexes d'adhésion focale qui s'attachent à la MEC (Mitra et al., 2005; Armento et al., 2017). L'interaction complexe entre le cytosquelette d'actine et les adhésions focales conduit à la génération de protrusions membranaires appelées filopodes, lamellipodes et invadopodes nécessaires à la migration et à l'invasion. Le renouvellement de la formation du site d'adhésion à l'avant des cellules et la perturbation à l'arrière sont essentiels au mouvement des cellules lors de la TM (Yamaguchi and Condeelis, 2007; Armento et al., 2017). Les lamellipodes sont des extensions membranaires larges et plates, riches en réseaux ramifiés de filaments d'actine, qui favorisent la migration cellulaire en se fixant au substrat et en générant une force motrice à l'avant de la cellule. Les filopodes sont de fines projections en forme de doigt qui s'étendent au-delà du bord des lamellipodes, composées de longs filaments d'actine réticulés en faisceaux, non ramifiés et sont supposés détecter les signaux externes afin de définir la direction de la migration cellulaire. Quant aux invadopodes, ce sont des protrusions de la membrane ventrale responsables de la dégradation de la MEC par libération locale de MMPs (Yamaguchi and Condeelis, 2007).

La formation des protrusions et la polymérisation d'actine nécessitent, en plus de l'actine, les complexes *actin related protein 2/3* (Arp2/3) composés d'une association de 7 sous-unités dont deux (Arp2 et Arp3) qui servent de point de nucléation d'où émergent les nouveaux filaments d'actine ramifiés (Swaney and Li, 2016; Mair et al., 2018). L'activation du complexe Arp2/3 est régulée par les protéines de la famille *Wiskott-Aldrich syndrome protein* (WASP, N-WASP),

homolog-associated protein with actin, membranes, and microtubules (WHAMM), les *WASP-family verprolin-homologous protein* 1-3 (WAVE 1-3), *Wiskott- Aldrich syndrome protein and scar homolog* (WASH) (Zhong et al., 2010; Ridley, 2011; Tyler et al., 2016). Le maintien des lamellipodes se fait d'une part, grâce à l'action de la cofiline, dont l'expression est régulée par Rac1/WAVE2/Arp2/3, et la cortactine (Ridley, 2011; Zhou et al., 2016). La cofiline, protéine impliquée dans la dépolymérisation et polymérisation de filaments d'actine, sélectionne les filaments d'actine pour créer de nouvelles extrémités dans lesquelles le complexe Arp2/3 pourra se fixer et amorcer la formation de nouvelles ramifications (van Rheenen et al., 2009; Bravo-Cordero et al., 2013), alors que la cortactine stabilise le complexe Arp2/3 en se liant spécifiquement à ce dernier ainsi qu'à l'actine (Lai et al., 2009; Yin et al., 2017). Les WASP/N-WASP induisent la formation des invadopodes tandis que les WAVE sont les principaux régulateurs des lamellipodes et aucun complexe Arp2/3 ou cofiline n'est présent dans les filopodes (Armento et al., 2017). De manière intéressante, de nombreuses études ont rapporté par immunohistochimie (IHC), Western blot ou RT-qPCR que les complexes Arp2/3, WAVE2 ainsi que la cofiline et la cortactine sont surexprimés dans les gliomes et l'utilisation de siRNA ou d'inhibiteurs spécifiques permit de démontrer que ces protéines favorisent la migration et l'invasion des cellules de GBM (Liu et al., 2013d; Wang et al., 2015; Swaney and Li, 2016; Zhou et al., 2016).

Au cours de la migration cellulaire, des complexes d'adhésion focale ou *focal adhesions* (FA) se forment pour connecter le cytosquelette d'actine à la MEC (Figure 15). Le regroupement des intégrines est la première étape de la formation des FA et le transport d'intégrines de l'arrière vers l'avant de la cellule pendant la migration, maintient ainsi le recyclage des protéines d'adhésion vers de nouveaux complexes de FA, processus appelé *turnover*, essentiels à la migration mésenchymateuse (Zhong et al., 2010; Armento et al., 2017). En effet, les principaux composants de ce complexe de FA sont les intégrines, liées du coté intracellulaire à la paxilline phosphorylée et à la taline, qui recrutent ensuite la kinase d'adhésion focale (FAK) et la vinculine. FAK phosphoryle ensuite l'α-actinine d'une part, ce qui conduit à des interconnexions entre les filaments d'actine, et d'autre part, sert d'échafaudage pour la protéine Src, qui en phosphorylant la paxilline stimule la migration cellulaire (Mitra et al., 2005; Atherton et al., 2015; Armento et al., 2017). Les structures résultantes entraînent des modifications de la morphologie cellulaire et génèrent la force de traction nécessaire pour le déplacement de la cellule de manière directionnelle. De nombreuses études indiquent que les protéines du complexe FA sont impliquées dans l'agressivité des gliomes. Par exemple, l'inhibition de l'activité de la protéine Lck (*lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*) qui est

surexprimée dans les GBMs par un inhibiteur, le A770041, bloque significativement la phosphorylation de la paxilline ainsi que la formation des lamellipodes associée à la diminution de la migration des cellules de GBM isolées à partir de patients (Zepecki et al., 2019). La paxilline porte de nombreux sites de phosphorylation (López-Colomé et al., 2017) dont la serine 178 préférentiellement phosphorylée par *c-Jun terminal kinase* (JNK). De manière intéressante, l'inhibition de JNK par des siRNA ou l'inhibiteur SP600125, ou la surexpression de la paxilline par transfection (vecteur pEGFP-C1-PaxS178A) portant la mutation de la sérine 178 en alanine dans les cellules (U343) de gliome résistantes au TMZ, entraîne la diminution de l'interaction paxilline-JNK ainsi que leur phosphorylation, et bloque la formation des invadopodes (Ueno et al., 2015). Le cas de la paxilline est un exemple parmi de nombreuses autres études soulignant le rôle promoteur des protéines du complexe FA dans l'invasion des gliomes (Zhong et al., 2010; Sen et al., 2012; Rubashkin et al., 2014; Malric et al., 2017).

D'autres facteurs sont aussi importants lors de la migration des cellules de gliome, en particulier les flux liquides et ioniques. En effet, les cellules de gliome migrent à travers l'espace extracellulaire du cerveau. Pour faciliter cette migration, elles réduisent de plus de 30% leur volume en libérant de l'eau cytoplasmique (Watkins and Sontheimer, 2011). Pour cela, les cellules de gliome exploitent des canaux ioniques qui fonctionnent normalement comme des régulateurs du potentiel membranaire (Figure 15). Contrairement aux neurones adultes, les cellules de gliome présentent une concentration élevée de Cl^- intracellulaire, dûe à l'expression constitutive et à l'activité prolongée du cotransporteur de $Na^+/K^+/Cl^-$ (NKCC1, *Na-K-Cl cotransporter*) dont l'expression est corrélée avec le grade du gliome (Habela et al., 2009; Garzon-Muvdi et al., 2012; Ma et al., 2019). La sortie des ions Cl^-, lors de l'ouverture des canaux, s'accompagne d'un flux d'eau à travers les aquaporines en lien avec la force osmotique, ce qui entraîne un rétrécissement du volume cellulaire. Le récepteur B2 de la bradykinine (B2R) est également exprimé à l'avant des cellules de gliome en migration. C'est un des attracteurs essentiels de ces cellules vers le système vasculaire et un activateur des canaux ioniques (Cuddapah et al., 2013). En effet, il a été démontré que la stimulation du B2R par la bradykinine dans les cellules de GBM de type D54, U87, U251 entraîne l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire, ce qui induit l'efflux de Cl^-, de K^+ et d'eau, participant à la formation des protrusions (Cuddapah et al., 2013; Seifert and Sontheimer, 2014). En conséquence, les cellules de gliome se contractent, ce qui leur permet de migrer à travers les espaces contrits du cerveau.

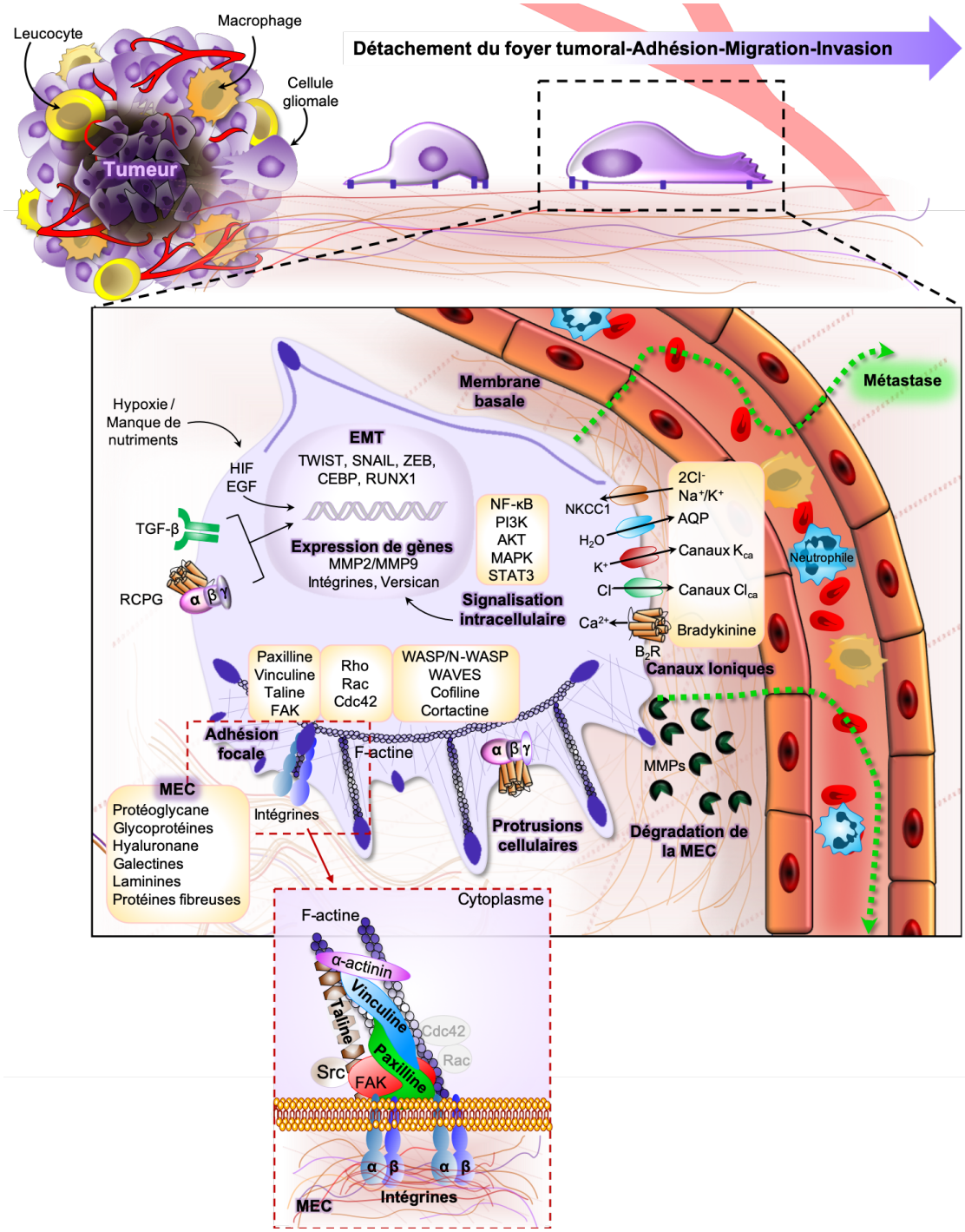


Figure 15. Représentation schématique des mécanismes impliqués dans la migration mésenchymateuse de cellules de GBM. Le phénotype migratoire et invasif des cellules de GBM est régulé par une interaction complexe de différents facteurs, des cascades de signalisation, ainsi que des caractéristiques cellulaires et du TME. En réponse à des stimuli du TME incluant des molécules chimioattractantes (TGF-β, EGF) ou l'hypoxie, la cellule tumorale initie tout un programme d'expression de gènes mésenchymateux lui permettant de réorganiser son cytosquelette d'actine pour se détacher de la masse tumorale, adhérer à la MEC, migrer pour établir des métastases. Au cours de ces processus, la mise en place de complexes d'adhésion focaux composés de protéines spécifiques (telles que la paxilline, la vimentine, les intégrines) sont nécessaires et servent de lien entre les composants clé de la MEC (Hyaluronane, galectines, laminines) et le cytosquelette de la cellule. Akt : *Protein kinase B* ; AQP : aquaporines ; B2R : récepteur B2 de la bradykinine ; CEBP/β : *CCAAT Enhancer Binding Protein* ; EGF : *Epidermal growth factor* ; FAK : *Focal adhesion kinase* ; FOSL2 : *FOS Like 2, AP-1*

Transcription Factor Subunit ; MMP2/9: *Matrix metalloProteinases-2/9*; NF-κB : *Nuclear factor-kappa B* ; PI3K : Phosphoinositide 3-kinase ; Rac1 : *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1* ; Raf-1 : *V-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1* ; Rho : *Ras homolog gene family* ; RUNX1 : *Runt-Related Transcription Factor 1* ; STAT3 : *Signal transducer and activator of transcription 3* ; SNAIL : *Zinc Finger Protein SNAI* ; TGF-β : *Transforming growth factor beta* ; Twist : *Twist-related proteins* ; WASP : *Wiskott-Aldrich syndrome protein* ; WAVE : *WASP-family verprolin-homęlogous protein* ; ZEB : *Zinc-finger E-box-binding homeobox*.

5.2. Les Rho GTPases dans la TM des GBMs

La force motrice du mouvement cellulaire provient principalement de l'assemblage et du désassemblage coordonnés des filaments d'actine. Les régulateurs centraux de ce remodelage du cytosquelette sont les petites GTPases de la famille Rho, RhoA, Rac1 et Cdc42 (Sadok and Marshall, 2014; Lawson and Ridley, 2018). RhoA est responsable de la coordination de la contractilité au niveau du corps et de l'arrière de la cellule, Rac1 régule la formation de lamellipodes à l'avant de la cellule en contrôlant la polymérisation de l'actine. La protéine Cdc42 stimule quant à elle les petits complexes focaux à la pointe des filopodes qui contiennent des filaments parallèles d'actine modulant ainsi la polarité cellulaire (Fortin Ensign et al., 2013; Armento et al., 2017). Les trois GTPases peuvent cependant être activées à l'avant des cellules en migration, une localisation dans laquelle RhoA initierait les premiers événements de protrusion, alors que Rac1 et Cdc42 participent au renforcement, à la stabilisation et à l'élargissement de protrusions nouvellement formées (Mayor and Carmona-Fontaine, 2010). Ensemble, ces enzymes régulent l'organisation des filaments d'actine et coopèrent pour contrôler la polarité, la protrusion et l'adhésion lors de la migration cellulaire.

L'activation des Rho GTPases est relayée par plusieurs récepteurs et effecteurs. Dans les GBMs, l'EGFRvIII, mutant de l'EGFR fréquemment surexprimé dans les GBMs, et le PDGFRα activent Rac1 pour induire la migration de nombreuses lignées de GBM (incluant les U87, U251, SNB19, LNZ308) en chambre de Boyden *via* la phosphorylation de DOCK180 (*dedicator of cytokinesis 1*) dépendante de la tyrosine kinase Src (Feng et al., 2011; Feng et al., 2012). Il a également été démontré que Rac1 régule la formation d'invadopodes, la sous-expression à l'aide de siRNA de Rac1 ou de la synaptojanine 2, un effecteur de Rac1 également abondant au niveau des invadopodes, diminue considérablement la formation d'invadopodes et l'invasion des cellules de GBM SNB19 et U87MG (Chuang et al., 2004). Quant à RhoA, son activation est aussi corrélée à la migration accrue des cellules de gliome (Armento et al., 2017). En effet, RhoA active ROCK pour coordonner la formation de fibres de stress et les complexes de FA, exacerbant ainsi la migration et l'invasion tumorale (Fortin Ensign et al., 2013). De manière intéressante, une très récente étude a démontré que NKCC1, surexprimé dans les

GBMs mésenchymateux, régule positivement le caractère mésenchymateux des GBMs par activation de RhoA et Rac1 (Ma et al., 2019). En effet, l'inhibition (Bumetanide) et l'inactivation (shRNA) de NKCC1 diminuent l'expression des marqueurs mésenchymateux (N-cadhérine, vimentine, Snail) associée à l'atténuation de l'activation de Rac1 et RhoA dont les inhibitions pharmacologiques (NSC25766 et Y27632, respectivement) altèrent également la capacité migratoire et invasive des cellules de GBM (U87, SNB19). De même, il a récemment été démontré que la sous-expression à l'aide de siRNA de Cdc42 dans différentes lignées de GBM (incluant U87, U251, A172, U118MG) inhibe significativement la migration cellulaire et altère la morphologie et la formation des filopodes. Au contraire, l'expression du mutant constitutivement actif de Cdc42 dans les mêmes lignées cellulaires augmente significativement la migration et l'invasion des cellules de GBM associées à l'augmentation du nombre de filopodes et des complexes de FA co-localisés avec FAK (Okura et al., 2016). De plus, les xénogreffes de ces cellules chez des souris NOD-SCID entraînent une croissance tumorale rapide associée à une réduction considérable de la survie des souris comparée aux souris contrôles (de 97 *vs* 56 jours pour U251 ; P <0,0001). Aussi, Cdc42 semble être nécessaire pour l'activation de Rac1 aboutissant à la migration et l'invasion des cellules de GBM (Fortin et al., 2012). D'autres études similaires ont effectivement suggéré que RhoA et Cdc42 agissent en amont de Rac1 dans la régulation de plusieurs fonctions biologiques, notamment la polarité et la migration cellulaires (Nishimura et al., 2005; Katoh et al., 2006; Kwiatkowska et al., 2012; Fortin Ensign et al., 2013).

5.3. Régulation des voies de signalisation et des facteurs de transcription impliqués dans la TM des GBMs

La TM est le pilote principal de l'invasion et des métastases. Même si les gliomes sont des tumeurs non épithéliales, des processus similaires à EMT (ou *EMT-like*) ont été décrits, et les facteurs associés au TME inflammatoire et hypoxique, notamment les facteurs de croissances (TGF-β, EGF, PDGF), les cytokines (TNF-α, IL-6) et l'hypoxie (HIF-1α) sont les principaux signaux l'induisant dans les gliomes (Iwadate, 2016; Colella et al., 2019). Les voies de signalisation résultantes, notamment les voies Wnt/β-caténine et NOTCH, régulent l'activation de nombreux facteurs de transcription (TFs) tels que Snail, Slug, ZEB1/2 (*zinc-finger E-box-binding homeobox*) ainsi que Twist. Ces TFs initient l'expression de marqueurs spécifiques des cellules mésenchymateuses, tels que la N-cadhérine, la vimentine et la fibronectine et au contraire, inhibent l'expression des marqueurs épithéliaux E-cadhérine, claudines, occludines et cytokératines (Colella et al., 2019). La perte d'E-cadhérine, à son tour, favorise la

signalisation Wnt et l'accumulation de la β-caténine dans le noyau, où elle active la transcription des gènes favorisant la prolifération et la migration dépendante du Tcf/LEF (*T-cell factor/lymphoid enhancer-binding factor*) (McCrea and Gottardi, 2016). Kahlert et al., ont découvert, par immunohistochimie sur des échantillons de GBM mésenchymateux, que la voie Wnt/β-caténine est principalement activée dans les cellules situées dans les régions péritumorales invasives (Kahlert et al., 2013). Aussi, la surexpression de Wnt/β-caténine dans les GBMs est corrélée à de courtes durées de survie des patients (Iwadate, 2016). *In vitro*, il a été démontré que la modulation de la voie Wnt par activation constitutive de la β-caténine, *via* la mutation (S33Y) du site de phosphorylation lié à son ubiquitination, entraîne la migration et l'invasion accrue de U87 ou de cultures primaires de GBM, associées à l'expression de la N-cadhérine, de CD133 ainsi que des TFs ZEB1, Twist1 et Snail. Des effets contraires sont observés suite à la sous-expression de la β-caténine à l'aide de shRNA dans les mêmes types cellulaires confirmant le rôle majeur de la voie Wnt dans la MT des GBMs (Kahlert et al., 2012; Kahlert et al., 2013).

Ces TFs orchestrent principalement l'agressivité des GBMs. Par exemple, la sous-expression de Snail1 à l'aide de siRNA réduit significativement l'invasion, la migration ainsi que la prolifération des U87, U373 et des lignées dérivées de patients (Han et al., 2011; Myung et al., 2014). Des effets similaires sont observés avec Slug dont l'expression est corrélée au grade du gliome (Yang et al., 2010; Iwadate, 2016; Velásquez et al., 2019). De plus, il a récemment été démontré par immunohistochimie que Snail est surexprimé chez les patients atteints de GBM récurrents ayant reçu un traitement par TMZ. Le rôle de Snail a été confirmé *in vitro* par surexpression ou sous-expression dans des lignées cellulaires de GBM (U87, A172P) dans leurs capacités migratoire et invasive après traitement au TMZ, suggérant ainsi la contribution de Snail dans la résistance au TMZ (Liang et al., 2019). De même, l'expression de ZEB1/2 est corrélée aux caractères invasifs et à la survie des patients atteints de GBM (Suzuki et al., 2018; Colella et al., 2019). Malgré son implication incontestée dans l'agressivité de nombreux cancers, la fonction exacte de ZEB1 dans les gliomes est très controversée (Euskirchen et al., 2017). Par exemple, sur des xénogreffes de cellules dérivées de patients atteints de GBM, des niveaux d'expression très élevés de ZEB1 sont détectés par immunohistochimie dans le front d'invasion, associés à la surexpression de MGMT. Ces cellules de GBM sous-exprimants ZEB1 (à l'aide de shRNA) forment des masses moins invasives et sont plus sensibles au TMZ dans les tests de viabilité (MTT) *in vitro* et lorsqu'elles sont inoculées dans le cerveau de souris *in vivo* (Siebzehnrubl et al., 2013). De plus, l'analyse par Western blot montre que cette sous-expression de ZEB1 inhibe l'expression de marqueurs de cellules souches gliomales SOX2,

OLIG2 et CD133 associée à une faible formation des neurosphères, tandis que la surexpression de ZEB1, à l'aide de plasmides d'expression, a des effets opposés. De manière surprenante, des travaux récents ont rapporté des effets différents. A partir d'échantillons de GBM de patients, il a été montré que la perte de l'expression de ZEB1 entraîne l'expression de ces marqueurs de cellules souches (SOX2, OLIG2 et CD133), résultats confirmés *in vitro* par la sous-expression de ZEB1 (shRNA) dans des cellules souches de GBM isolées de prélèvements de patients (Edwards et al., 2017). De nombreux facteurs liés à l'hétérogénéité intra/inter-tumorale sont susceptibles de contribuer à cette variabilité d'expression et de fonction de ZEB1 (Euskirchen et al., 2017).

En ce qui concerne Twist1, son expression est associée à l'agressivité tumorale car (1) sa surexpression dans les cellules de GBMs (SF767, SNB19, T98G) stimule la migration et l'invasion associées à l'expression de marqueurs cruciaux liés à l'EMT tels que la métalloprotéinase 2 (MMP2), la phospho-FAK (pFAK), F-actin, Snail (Mikheeva et al., 2010), (2) l'inactivation de Twist1 (par CRISPR/Cas9 ou shRNA) inhibe l'activation de la voie PI3K/AKT (diminution de la phosphorylation de l'AKT) dans les cellules U87, associée à un prolongement significatif de la survie des souris xénogreffées avec ces cellules (Mikheev et al., 2018).

Par ailleurs, les études transcriptomiques du groupe de recherche de Iavarone (Carro et al., 2010), dans une tentative pionnière d'identifier les principaux gènes régulateurs de la signature mésenchymateuse des gliomes de haut grade, ont abouti à l'identification de six TFs nécessaires et indispensables (Figure 16A) qui sont les activateurs STAT3, C/EBPβ, bHLHB2 (*Basic helix-loop-helix transcription factors B2*), RUNX1 (*Runt-related transcription factor 1*), FOSL2 (*Fos-related antigen 2*) et un potentiel répresseur de tumeur ZNF238 (*Zinc Finger Protein 238 ou ZBTB18*). Parmi eux, C/EBPβ et STAT3 sont les initiateurs et régulateurs principaux, nécessaires et suffisant pour maintenir 70% de la signature mésenchymateuse des gliomes de haut grade. Par exemple, la sous-expression spécifique de C/EBPβ et STAT3 dans les cellules de gliome SNB19 à l'aide de shRNA entraîne une réduction considérable du niveau d'expression d'ARNm de bHLHB2, FOSL2 et RUNX1. Leur analyse par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) a permis d'établir la hiérarchie de cette régulation, *i*) C/EBPβ et STAT3 interagissent avec leur propre promoteur, *ii*) C/EBPβ interagit avec les promoteurs de STAT3, FOSL2, bHLHB2, *iii*) STAT3 interagit avec ceux de FOSL2 et RUNX1, *iv*) FOSL2 avec ceux de RUNX1 et *v*) bHLHB2 et bHLHB2 avec le promoteur RUNX1. Ainsi, C/EBPβ et STAT3 sont au sommet de cette régulation hiérarchique (Figure 16B). Les patients présentant des GBMs doublement positifs pour C/EBPβ et STAT3 ont une survie plus courte (P = 0,0002) par

rapport aux patients à tumeur simple ou doublement négative (C/EBPβ, P = 0,0022; STAT3, P = 0,0017) (Carro et al., 2010). Globalement, leurs travaux ont démontré que C/EBPβ et STAT3 (1) orchestrent la signature d'expression génique mésenchymateuse, (2) sont capables de reprogrammer des cellules souches neuronales vers un phénotype mésenchymateux, (3) sont responsables du caractère agressif des cellules de gliome (récidive, résistance aux traitements).

Le rôle de ces régulateurs majeurs a été décrit dans d'autres études. L'inactivation ou l'inhibition de l'expression de STAT3 dans les lignées cellulaires de GBM (telles que les U87, U251, U373 ou A172) entraîne une diminution significative de la prolifération cellulaire et de la croissance tumorale dans un modèle murin (Li et al., 2009; Xu et al., 2012; Luwor et al., 2013; Chang et al., 2017). STAT3 est aussi un acteur important dans le processus de la PMT induite par les radiothérapies. En effet, son activation (par phosphorylation) stimulée par la radiothérapie est suffisante pour induire de manière durable la PMT (Lau et al., 2015; Fedele et al., 2019). Le point le plus intéressant est qu'en inhibant JAK2 (*Janus kinase 2*), un activateur de STAT3, par l'AZD1480 ou le ruxolitinib en combinaison avec une irradiation, on observe une inhibition de la phosphorylation de STAT3 dans des cellules de GBM proneural qui empêche ainsi la PMT associée à l'inhibition l'agressivité cellulaire (Lau et al., 2015).

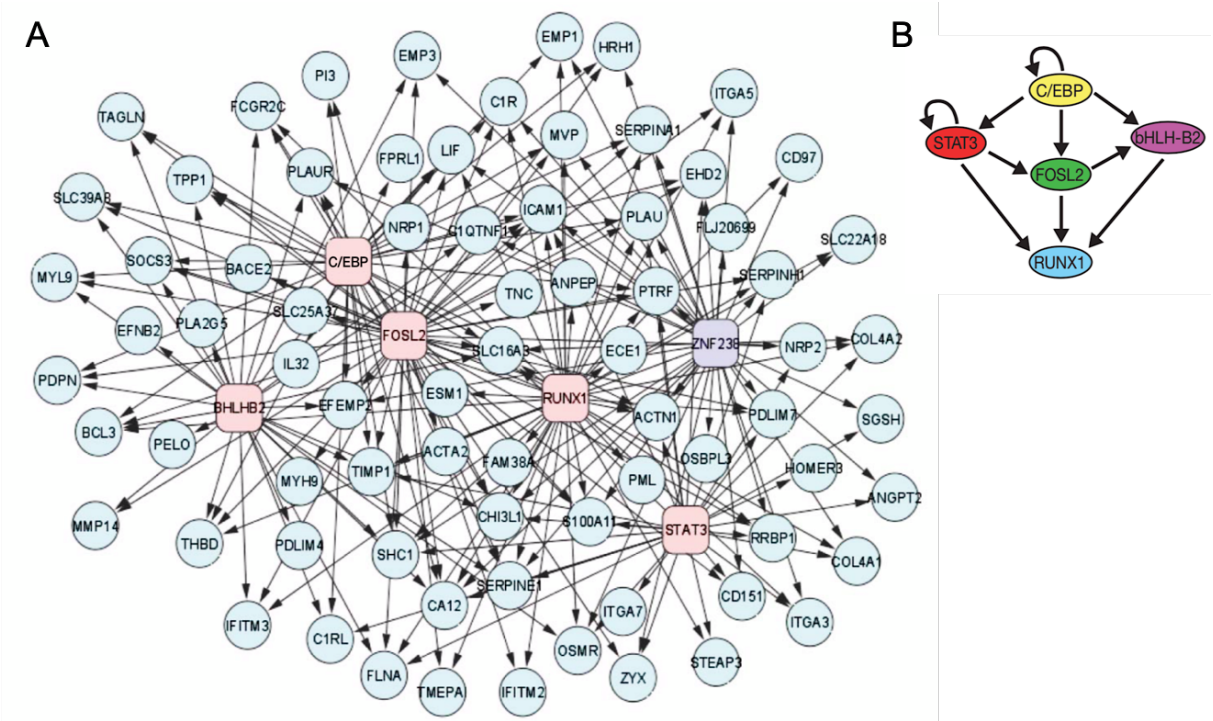


Figure 16. La signature moleculaire mésenchymateuse des gliomes de haut grade (HGG) est contrôlée par six facteurs de transcription (TFs). A. Les principaux TFs impliqués dans l'activation des gènes de la signature mésenchymateuse (cyan) sont indiqués en rouge clair, celui impliqué dans la répression est en violet. Ces six TFs contrôlent 74 % des gènes de la signature mésenchymateuse des HGG. **B.** Organisation hiérarchique des six TFs. (D'après Carro et al., 2010). bHLH-B2 : *Class B Basic*

Helix-Loop-Helix Protein 2 ; CEBP/β : *CCAAT Enhancer Binding Protein* ; FOSL2 : *FOS Like 2, AP-1 Transcription Factor Subunit* ; RUNX1 : *Runt-Related Transcription Factor 1* ; STAT3 : *Signal transducer and activator of transcription 3*.

L'activation de STAT3 entraîne sa dimérisation et sa translocation nucléaire pour réguler l'expression de nombreux gènes (MMP-2, MMP-9, fascin-1, FAK, HIF-1, VEGFA, IL-8, BCL-2) d'intérêt dans la gliomagenèse (Chang et al., 2017). Différent signaux activateurs de STAT3 ont été décrits, notamment les facteurs de croissance tels que l'EGF ainsi que les cytokines de types IL-6 (Wendt et al., 2014), des ligands spécifiquement retrouvés dans le TME inflammatoire et hypoxique des GBMs (Hambardzumyan and Bergers, 2015; Quail and Joyce, 2017). De manière intéressante, il a été montré dans les cellules de mélanome et de cancer de la prostate, que STAT3 est le TF principal responsable de l'activation constitutive de NF-κB (Lee et al., 2009a) dont le rôle stimulateur de l'expression de nombreux facteurs de transcription impliqués dans la TM des GBMs, notamment Snail, Twist1, ZEB1, TAZ, C/EBPβ est maintenant démontré (Bhat et al., 2013; Yamini, 2018). Or l'activation de NF-κB joue un rôle majeur dans la production d'IL-6 qui, comme précédemment évoqué, entraîne l'activation de STAT3 et complète ainsi une boucle de signalisation STAT3→NF-κB →IL-6 dans le développement tumoral (Wendt et al., 2014). Dans ce contexte, il a été démontré que C/EBPβ stimule l'angiogenèse en se fixant sur le promoteur d'IL-6 pour induire son expression dans les lignées U87 surexprimant EGFRvIII (Liu et al., 2015). Sa sous-expression à l'aide de shRNA entraîne une diminution significative de la sécrétion d'IL-6 dans les mêmes cellules. De plus, Bhat et al., ont démontré que la PMT des GBMs résultant de la radiothérapie était aussi liée à l'activation de NF-κB et à la présence de macrophages/microglie dans les GBMs (Bhat et al., 2013). Plus récemment, le même groupe a rapporté que cette réponse pro-inflammatoire régule de manière transcriptionnelle CD109 (Cluster de différentiation 109) *via* C/EBPβ pour stimuler la voie de signalisation YAP (*Yes Associated Protein*)/TAZ qui confère une capacité clonogénique accrue et la résistance aux traitements (Minata et al., 2019). Ensemble, ces données suggèrent une coopération des facteurs de transcription STAT3, NF-κB, C/EBPβ dans la progression des GBMs mésenchymateux et résistants aux traitements. Ainsi, d'autres acteurs responsables de l'activation de ces voies constituent des cibles thérapeutiques potentielles, et parmi eux, les RCPGs chimiotactiques représentent des cibles encore peu explorées dans le contexte des gliomes.

6. Structure et classification des RCPGs

Les RCPGs, également reconnus historiquement comme des récepteurs à sept domaines transmembranaires (DTM), constituent la plus grande famille de protéines de surface cellulaire codées par plus de 800 gènes, soit environ 2% du génome humain (Dorsam and Gutkind, 2007; Nieto Gutierrez and McDonald, 2018). Au cours des dernières décennies, la découverte et l'étude des RCPGs ont dévoilé de nouveaux mécanismes moléculaires par lesquels les signaux extracellulaires tels que les photons et les ions, et surtout les neurotransmetteurs, les peptides, les hormones ou les phospholipides, régulent les modifications des fonctions cellulaires.

Tous les RCPGs sont caractérisés par une structure générale qui comprend de manière obligatoire une extrémité N-terminale extracellulaire, une région C-terminale cytosolique et 7 DTM hydrophobes (DTM1 à DTM7) organisés en hélices α et reliés entre eux par des *random coils* que l'on retrouve au niveau intracellulaire (boucles ICL1 à ICL3) et extracellulaire (boucles ECL1 à ECL3) (Figure 17) (Rasmussen et al., 2011; Latorraca et al., 2017; Hilger et al., 2018). Une 8ème hélice α cytosolique consécutive au DTM7 est souvent citée, et généralement ancrée à la membrane plasmique par l'association de palmitates aux cystéines très conservées qu'elle comprend (Sensoy and Weinstein, 2015).

Actuellement, les RCPGs sont principalement classés en fonction de leur origine phylogénétique et de leurs homologies de séquence (Figure 18). La première classification proposée était d'ordre structural et reposait sur l'analyse des séquences protéiques des DTM des RCPGs répertoriés chez les vertébrés et invertébrés, conduisant à l'identification d'empreintes appelées «*fingerprint*» conservées au sein de certains groupes de RCPG (Attwood and Findlay, 1994). Ainsi, six classes (A à F) ont ainsi été proposées : La classe A dont le prototype est la Rhodopsine (A), la classe B incluant les récepteurs de la sécrétine, de peptides et d'hormones (B), la classe C regroupant les récepteurs métabotropiques glutamatergique ou GABAergique (C), la classe D de conjugaison fongique de récepteur de phéromone (D), récepteur d'adénosine monophosphate cyclique ou AMPc de *discoideum de Dictyostelium* (E) et la classe F type *Frizzled smoothened* (F). Les membres RCPGs d'une même classe, partagent des homologies de séquence, de structure et de mode de liaison du ligand (Pierce et al., 2002). Chez les vertébrés, les classes A (85,5% soit plus de 700 RCPGs), B (7%) et C (3,81%) sont majoritaires (De Francesco et al., 2017). Cette première classification n'est basée que sur l'analyse des 7 DTM, et n'est pas spécifique des RCPGs humains. Il faut noter que des structures présentant 7 DTM avec un domaine cytosolique N-terminal et une région extracellulaire C-terminale sont aussi décrites, de nature enzymatique, suggérant que cette classification n'est pas la plus adaptée.

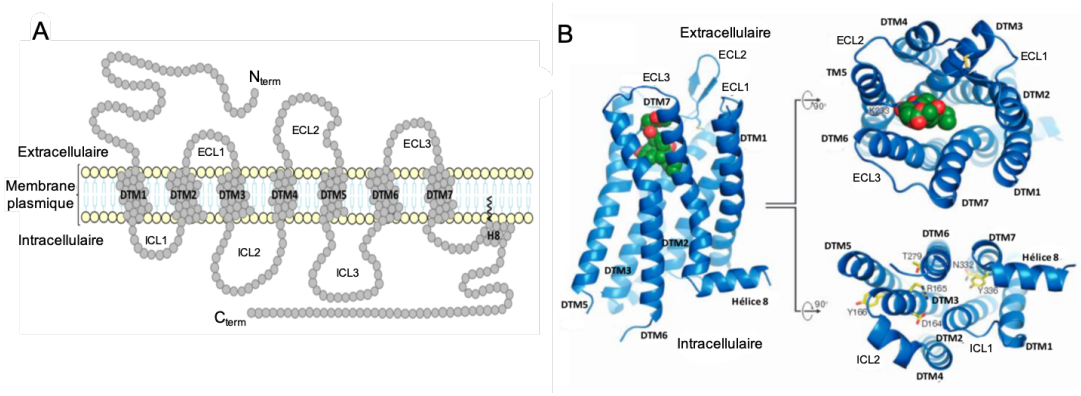


Figure 17. Structure générale des RCPGs. **A.** Représentation schématique des 7 DTM (DTM1 à DTM7), de la partie N-terminale (N_{term}), des boucles extracellulaires (ECL1 à ECL3) et intracellulaires (ICL1 à ICL3), de la 8ème hélice α (H8) ancrée à la membrane grâce à une palmitoylation (vvvv), et de la queue C-terminale (C_{term}). **B.** Structure cristallographique du récepteur opioïdergique *μ* de Rat. Vue depuis le plan membranaire, les domaines extracellulaire et intracellulaire du récepteur μ liés à un antagoniste irréversible, le β-funaltrexamine, (β-FNA) en vert/rouge. DTM : domaine transmembranaire ; ECL : boucle extracellulaire ; ICL : boucle intracellulaire. (D'après Manglik et al., 2012).

A

Classification des RCPGs

Basée sur l'homologie de séquence	Basée sur origine phylogénétique
Classe A ou Rhodopsine (85,5%)	G Glutamate (22 RCPGs)
Classe B ou Sécrétine (7%)	R Rhodopsine (701 RCPGs)
Classe C ou Métabotropique glutamate (3,81%)	A Adhésion (33 RCPGs)
Classe D ou *Fungal pheromon* (0,45%)	F Frizzled/taste 2 (11 RCPGs)
Classe E ou récepteur d'AMPc (0,38%)	S Sécrétine (15 RCPGs)
Classe F ou *Frizzled smoothened* (2,84%)	

B

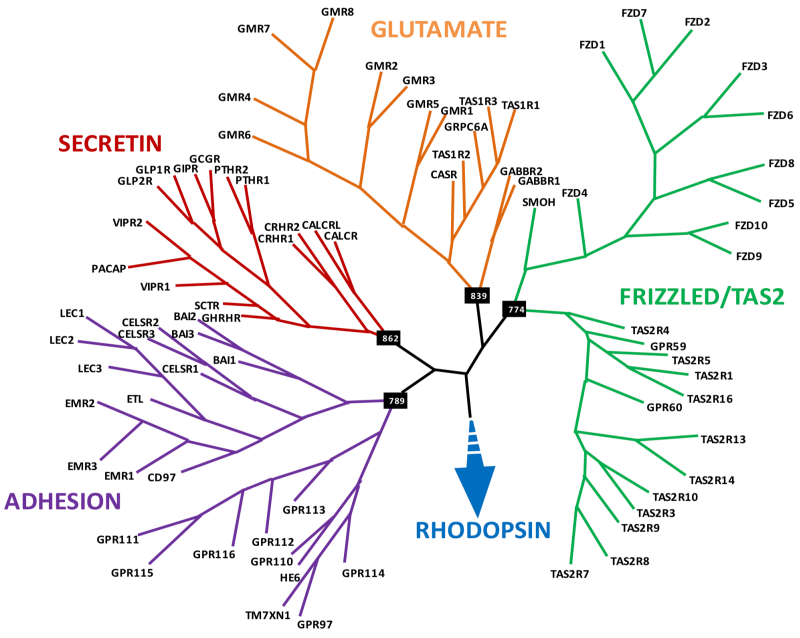


Figure 18. **Classification des RCPGs. A.** La classification basée sur l'homologie de séquence (colonne de gauche) s'applique à la fois aux vertébrés et aux invertébrés (les classes D et E sont uniques aux invertébrés). Le système GRAFS (colonne de droite) s'applique spécifiquement aux vertébrés. D'après

l'Union internationale de pharmacologie fondamentale et clinique (IUPHAR) (De Francesco et al., 2017). **B.** Relations phylogénétiques entre les RCPGs humains de la classification GRAFS. L'arbre a été obtenu en utilisant la méthode de maximum de parcimonie. La position de la famille Rhodopsine a été déterminée en analysant 20 RCPGs lui appartenant, choisis de manière aléatoire. Ces branches ont été retirées de la Figure et remplacées par une flèche (D'après Fredriksson et al., 2003).

Une classification plus récente des RCPGs répertoriés uniquement dans le génome humain a ainsi été proposée par Fredriksson et al., dénommée classification GRAFS (Fredriksson et al., 2003) en référence à la première lettre du nom de chaque famille : *Glutamate* (G, 22 RCPGs, qui correspondent à la classe C), *Rhodopsine* (R, 701 RCPGs dont 241 non-actifs, qui correspondent à la classe A), *Adhésion* (A, 33 RCPGs, qui équivalent à la classe B), *Frizzled/taste2* (F, 11 RCPGs) et *Sécrétine* (S, 15 RCPGs, qui appartiennent à la classe B) (Figure 18A) (De Francesco et al., 2017). Cette classification phylogénique des RCPGs humains intègre aussi l'ancienne nomenclature.

Ces RCPGs partagent la propriété de s'associer aux protéines G hétérotrimériques qui sont composées d'une sous-unité Gα et d'un dimère composé des sous-unités Gβ et Gγ (Gβγ). Lors de leur activation par liaison du ligand dans des domaines intra-récepteurs et/ou extracellulaires, le RCPG subit des changements de conformation lui permettant d'activer la protéine G hétérotrimérique correspondante (Gilman, 1987; Oldham and Hamm, 2008). Les protéines G, composées des familles Gαs, Gαi/o, Gαq et Gα12/13 ainsi que les Gβ et Gγ, régulent les effecteurs clés (tels que l'adénylate cyclase (AC), la phospholipase C (PKC)) pour générer les messagers secondaires tels que l'AMPc ou l'inositol triphosphate (IP3) qui déclenchent à leur tour des cascades de signalisation distinctes, mécanismes qui seront décrits dans le chapitre 2.

7. RCPGs et cancers

L'activation des RCPGs élabore un ensemble de voies de signalisation, incluant principalement les protéines G, les GEF (*guanine-nucleotide exchange factor*), les GTPases Ras et Rho, des MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) et leurs nombreuses cibles cytosoliques et nucléaires en aval. Ces voies de signalisation contribuent aux fonctions normales de la croissance, de la survie, de la différenciation et de la migration cellulaire. Cependant, les cellules cancéreuses exploitent ces voies en exprimant et en régulant de manière aberrante les RCPGs et leurs ligands ainsi que les protéines G pour stimuler la croissance tumorale, favoriser l'angiogenèse, créer des métastases sur des sites distants et échapper au système immunitaire (Figure 19) (Epstein, 2004; Dorsam and Gutkind, 2007; Lappano and Maggiolini, 2011; J Wu et al., 2012; Cherry and Stella, 2014; Federico et al., 2014; Franco et al., 2017; Basheer et al., 2018).

La prolifération et la survie des cellules tumorales sont régulées par de nombreux neuropeptides et leurs RCPGs (Figure 19) tels que les récepteurs de la thrombine (PAR-1), de l'angiotensine II (AngII) (AT1), des bradykinines (B1R), de l'endothéline (ET-1) (ET-A et ET-B) et de l'acide lysophosphatidique (LPA/LPAR), qui partagent la capacité d'activer RhoA *via* des protéines de type Gαq et/ou Gα12/13, conduisant notamment à stimuler la croissance des cellules cancéreuses de la prostate (Dorsam and Gutkind, 2007). La plupart de ces RCPGs ont été décrits comme régulant positivement la croissance de nombreux autres cancers incluant les cancers du sein, du poumon et du pancréas (Liu et al., 2017; Tekin et al., 2018), de l'ovaire (Ha et al., 2014; Ha et al., 2018) mais aussi de la tête et du cou (McKenzie et al., 2014). La contribution à la progression tumorale de la prostaglandine E2 (PGE2) et la signalisation *via* les RCPGs de types EP1-4, a aussi été évaluée dans de nombreux cancers (Dorsam and Gutkind, 2007; O'Hayre et al., 2014). EP1 est un RCPG couplé à Gαq, alors que EP2 et EP4 sont couplés à Gαs et stimulent l'accumulation d'AMPc et l'activation de la β-caténine, favorisant la prolifération, l'inflammation et les métastases du cancer du côlon (Hull et al., 2004; Ma et al., 2015; Aoki and Narumiya, 2017). La PGE2 produite par de nombreuses cellules tumorales et stromales, peut activer EP2 exprimé sur les cellules cancéreuses pour favoriser la prolifération cellulaire (effets auto/paracrines) ainsi que la dégradation de la MEC par surexpression de MMP2 et/ou MMP9; mécanisme qui est identique pour la thrombine et le SDF-1α (ou CXCL12) (Dorsam and Gutkind, 2007; Bu et al., 2011; O'Hayre et al., 2014).

La chimiokine SDF-1α et son récepteur CXCR4 représentent l'un des systèmes les mieux caractérisés dans le contexte de la migration, les processus métastatiques et l'invasion chimiotactique dans de nombreux cancers. Les cellules tumorales présentent fréquemment une expression aberrante de SDF-1α/CXCR4, en partie responsable de prolifération accrue, de capacités migratoires et d'évènements métastasiques, souvent associés à l'hypoxie et la TM comme précédemment discuté (O'Hayre et al., 2014; Meng et al., 2018). La progression de nombreuses tumeurs solides dépend des RCPGs tels que PAR-1 (*protease-activated receptor-1*), EP1-4, les RCPGs de la sphingosine 1-phosphate (S1PR), ainsi que les RCPGs des chimiokines CXCR2 (pour l'interleukine-8, IL-8) et CXCR4, pour stimuler l'angiogenèse, soit en agissant directement sur les composantes endothéliales ou stromales, soit en régulant la libération ou l'activité d'autres médiateurs angiogéniques, tels que le VEGFA ou le FGF-2, par des cellules stromales et immunitaires (Figure 19) (Epstein, 2004; Dorsam and Gutkind, 2007; Lappano et al., 2016; Nieto Gutierrez and McDonald, 2018). Par exemple, les cellules de cancers de l'ovaire, du sein, de la prostate, du col utérin ou des gliomes, produisent les chimiokines à motif CC et CXC telles que CCL2, CCL5, IL-8 et SDF-1α pour recruter des

leucocytes et des macrophages sur le site tumoral, puis coopèrent avec ces cellules immunitaires qui constituent une grande fraction de la masse tumorale dans ces cancers, pour libérer le VEGFA et d'autres facteurs angiogéniques favorisant ainsi la croissance des vaisseaux sanguins anormaux et pro-tumorigènes (Rollins, 2006; Ribatti, 2017; Albini et al., 2018). Ces exemples d'implication des RCPGs dans le cancer ne sont que quelques-uns parmi de nombreuses autres fonctions des RCPGs dans l'agressivité tumorale (Figure 19).

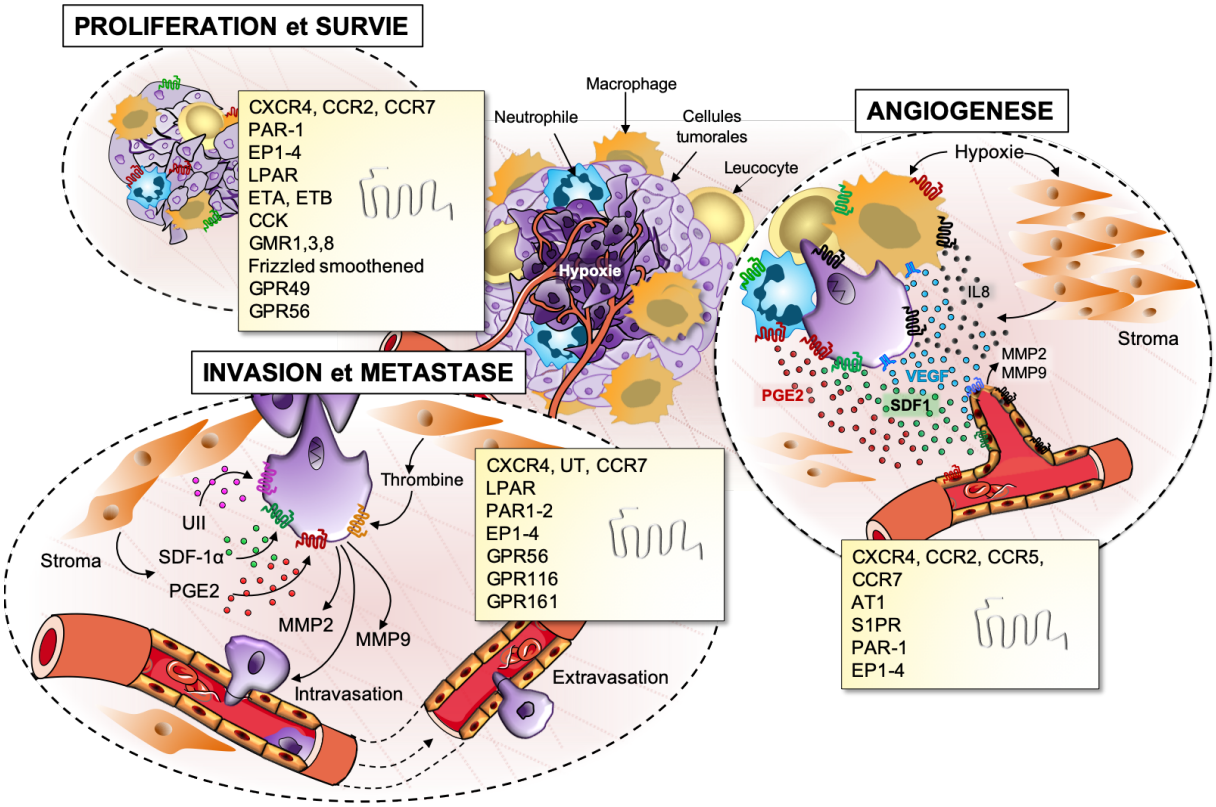


Figure 19. Représentation schématique des processus importants dans la progression tumorale impliquant les RCPGs. Les RCPGs jouent des rôles capitaux dans la prolifération, l'angiogenèse tumorale, l'invasion et l'établissement des métastases ainsi que la tolérance immunitaire au sein du microenvironnement tumoral. Les courtes listes mettent en évidence quelques RCPGs impliqués dans ces différents processus. (Adaptée de Gutierrez et McDonald 2018; Cherry et Stella 2014; Dorsam et Gutkind 2007). IL-8 : interleukine-8 ; MMP-2,9 : métalloprotéase matricielle de type 2 ou 9 ; SDF-1 : *stromal cell-derived factor-1* ; VEGFA : *vascular endothelial growth factor*.

8. Implication des RCPGs dans l'agressivité des GBMs

Nombreuses sont les études émergentes sur le potentiel oncogénique des RCPGs dans les gliomes. En plus de leur surexpression aberrante dans les GBMs pour la plupart, les RCPGs sont impliqués dans leur agressivité (Cherry and Stella, 2014; Fève et al., 2014).Par exemple, le GPR56 (TM7XN1) potentiellement couplé aux protéines Gα12/13 et Gαq/11 (Iguchi et al., 2008; Luo et al., 2011) et le GPR133 (ADGRD1) couplé à la protéine Gαs, sont deux RCPGs d'adhésion décrits récemment comme étant surexprimés et nécessaires à la régulation de

l'agressivité des GBMs (Shashidhar et al., 2005; Bayin et al., 2016). Par IHC sur des échantillons de GBM de patients, le GPR133 semble exprimé de manière sélective dans les CSG au niveau des zones périnécrotiques hypoxiques et son ARNm est surexprimé en corrélation avec HIF-1α dans des cellules primaires de GBM cultivées en condition hypoxique (1% O_2, 5% CO_2) (Bayin et al., 2016). De plus, la sous-expression de GPR133 à l'aide de shRNA réduit significativement la prolifération de ces cellules *in vitro* et *in vivo* dans des xénogreffes orthotopiques chez des souris *Nude* immunodéprimées (NOD.SCID) suggérant ce RCPG comme un médiateur protumorigène important dans le GBM.

L'adrénomédulline (ADM), un vasodilatateur peptidique multifonctionnel dont les effets sont relayés par les RCPGs *calcitonin receptor-like receptor*/*receptor activity modifying protein-2 and -3* (CLR/RAMP2-3), dont l'expression est corrélée au grade de gliome, est surexprimée dans les GBMs où elle est plus particulièrement localisée et co-exprimée avec le VEGFA dans de vastes zones périnécrotiques (Metellus et al., 2011; Ostrovskaya et al., 2019). Il a été démontré que sa neutralisation avec les anticorps anti-ADM diminue significativement la croissance *in vitro* et *in vivo* des cellules U87 de GBM présentant un taux élevé d'ADM endogène, associée à une baisse drastique de néovascularisation intratumorale (Ouafik et al., 2002; Nikitenko et al., 2006; Kaafarani et al., 2009).

Parmi les RCPGs, les récepteurs de chimiokines ou de molécules vasoactives, sécrétées par les cellules cérébrales normales et les gliomes sont d'un intérêt essentiel pour le développement des gliomes et l'acquisition d'un phénotype agressif. Comme précédemment mentionné, SDF-1α/CXCR4 reste l'un des mieux connus pour son rôle dans le contrôle de la réponse chimiotactique dans les GBMs. Surexprimés dans de nombreuses lignées de GBM ainsi que dans les tissus de GBM de patients comparés au parenchyme cérébral sein, plusieurs études ont rapporté l'implication de SDF-1α/CXCR4 dans la prolifération, la migration, l'angiogenèse et les métastases dans les GBMs (Rubin et al., 2003; Bajetto et al., 2006; Che Liu et al., 2013; Würth et al., 2014; Yadav et al., 2016; De Francesco et al., 2017). Par exemple, la sous-expression (shRNA) de CXCR4 dans les cellules de GBM dérivées de souris (GL26) réduit significativement d'une part, leur capacité migratoire vers les cellules endothéliales testées en transwell,et d'autre part, l'invasion de ces cellules tumorales le long des vaisseaux sanguins *in vivo* chez les souris (C57BL/6J ou immunodéprimées) xénogreffées (Yadav et al., 2016). De plus, ces cellules déficientes en CXCR4 sont plus sensibles à la mort cellulaire induite par l'irradiation détectée par la surexpression de la forme clivée de la caspase-3 dans ces cellules irradiées, suggérant CXCR4 comme essentiel pour l'invasion périvasculaire des cellules de GBM, le ciblage de ce RCPG pouvant rendre les tumeurs moins invasives et plus sensibles à la

radiothérapie. Par ailleurs, des études d'invasion *in vitro* sur du matrigel et des xénogreffes de cellules de GBM (LN827 and U373) *in vivo* ont montré que la liaison SDF-1α/CXCR4 active les MT2-MMPs (*membrane-type 2 matrix metalloproteinase*) qui contribuent à la dégradation de la MEC associée à l'infiltration des cellules de GBMs dans le parenchyme cérébral (Zhang et al., 2005). Des fonctions similaires de CXCR4 ont été démontrées dans de nombreux autres cancers incluant les cancers du sein, du pancréas, de la tête et du cou (Samara et al., 2004; Ehtesham et al., 2013; Würth et al., 2014; Meng et al., 2018; Zhang et al., 2018) où l'activation aberrante de CXCR4 peut déclencher les voies de signalisation liées aux protéines G telles que les voies PI3K/Akt, PLC/IP3, ERK1/2 et la mobilisation de $[Ca^{2+}]c$ régulant ainsi la survie, la prolifération, la migration chimiotactique et l'invasion (Figure 20).

L'hypoxie favorise l'angiogenèse des GBMs, et de manière intéressante, Würth et al., ont rapporté que dans ces cellules, l'action de l'hypoxie se fait non seulement *via* HIF-1α qui induit directement la transcription du VEGFA et des cytokines (comme le TNF-α), mais régule également l'expression de CXCR4 dans les zones pseudopalissadiques qui sont hypoxiques et nécrotiques, caractéristiques typiques des GBMs (Würth et al., 2014). Ainsi, SDF-1α/CXCR4 gouvernent l'angiogenèse favorisant la croissance tumorale, la migration et l'invasion des cellules de GBMs loin des zones pseudopalissadiques hypoxiques.

Aussi, il a été démontré que le lipide bioactif S1P (*sphingosine-1-phosphate*) stimule le caractère invasif *in vitro* (dans un environnement tridimensionnel enrichi en Matrigel) des cellules de GBMs (U118 MG et A172) et que le niveau d'expression élevé de l'enzyme de synthèse de S1P, la SphK1 (*sphingosine kinase-1*) est corrélé à une plus courte durée de survie des patients atteints de GBM (Young et al., 2009). En effet, Young et al., ont montré que la surexpression du récepteur de S1P, S1PR1 (*Sphingosine-1-phosphate receptor 1*) conduit à la stimulation drastique de l'activité du système uPA (*urokinase plasminogen activator*), connu pour stimuler l'invasion des cellules de GBM. La neutralisation par des anticorps dirigés contre l'uPA diminue significativement le caractère invasif des cellules de GBM stimulées par S1P, suggérant l'importance de la voie de signalisation de ce lipide bioactif dans l'invasion des GBMs. De manière intéressante, le couplage de S1P à ses récepteurs S1PR1 à 3, stimule la voie Gαi pour activer au moins la voie MAPK-ERK1/2 conduisant à la prolifération des cellules U373 de GBM (Mahajan-Thakur et al., 2017), et la surexpression de ces RCPGs (S1PR1 à 3) entraîne l'activation de ERK associée à la croissance des cellules U373. Cependant, l'expression de S1PR5 bloque la prolifération de ces lignées cellulaires de GBM en inhibant la voie ERK (Young and Van Brocklyn, 2007). Aussi, pendant que S1PR1 et S1PR3 stimulent la migration des cellules de GBM *via* Gαi/PI3K/Akt, S1PR2 atténue au contraire la migration cellulaire *via*

l'inhibition de la voie Gα12/13-Rac1 (Malchinkhuu et al., 2008; Takuwa et al., 2011; Mahajan-Thakur et al., 2017), suggérant de possible régulations différentielles des processus cellulaires par ces RCPGs dans la gliomagenèse.

En accord avec ces études, les travaux plus récents de l'équipe (Le Joncour *et al*., *article en préparation*) portant sur le récepteur UT de l'urotensine II (UII), une chimiokine pro-angiogénique et pro-inflammatoire (Castel et al., 2017), ont montré par IHC et RT-PCR que UII/UT (ainsi que SDF-1α/CXCR4) sont surexprimées dans des GBMs IDHwt par rapport aux oligodendrogliomes IDHmut issus de prélèvements de patients (CHU de Rouen, Pr A. Laquerrière), et co-localise préférentiellement dans les péricytes et les zones hypoxiques, suggérant une expression exacerbée de ces RCPGs dans les compartiments vasculaires et pseudopalissadiques. De plus, l'injection intratumorale d'UII chez des souris *Nude* xénogreffées avec des U87, favorise la croissance du GBM et réduit significativement la survie des souris. *In vitro* principalement par immunocytochimie, transwell et videomicroscopie, l'équipe a démontré que les cascades de signalisation relayées par le système UII/UT stimulent l'adhésion et la migration chimiotactique des cellules de gliome (U87, SW1088) par augmentation de la polymérisation d'actine *via* l'UT/Gα13/Rho/ROCK, la formation des lamellipodes principalement *via* l'UT/Gαi/PI3K et des points de FA riches en vinculine en partie *via* UT/Gαi/o (Lecointre et al., 2015; Coly et al., 2016). Ceci est en accord avec les données de la littérature qui montrent que l'UT régule positivement la croissance tumorale et la migration chimiotactique dans de nombreux cancers incluant les cancers de la prostate, du colon, d'adénocarcinome pulmonaire ou les GBMs (Castel et al., 2017; Federico et al., 2017).

Notre récente analyse de la base de données TCGA a permis d'identifier la signature d'expression des RCPGs dans les gliomes et particulièrement ceux qui sont surexprimés dans les GBMs mésenchymateux IDHwt, parmi lesquels on retrouve notamment de nombreux RCPGs chimiotactiques. Cette redondance d'expression de RCPGs chimiotactiques retrouvés dans de nombreux cancers et en particulier dans les GBMs, souligne l'intérêt d'étudier les nœuds de signalisation communs à l'ensemble de ces RCPGs. Ces nœuds qui sont principalement représentés par les protéines G qui couplent ces RCPGs et relayent les effecteurs secondaires, joueraient un rôle central dans la régulation du développement des gliomes.

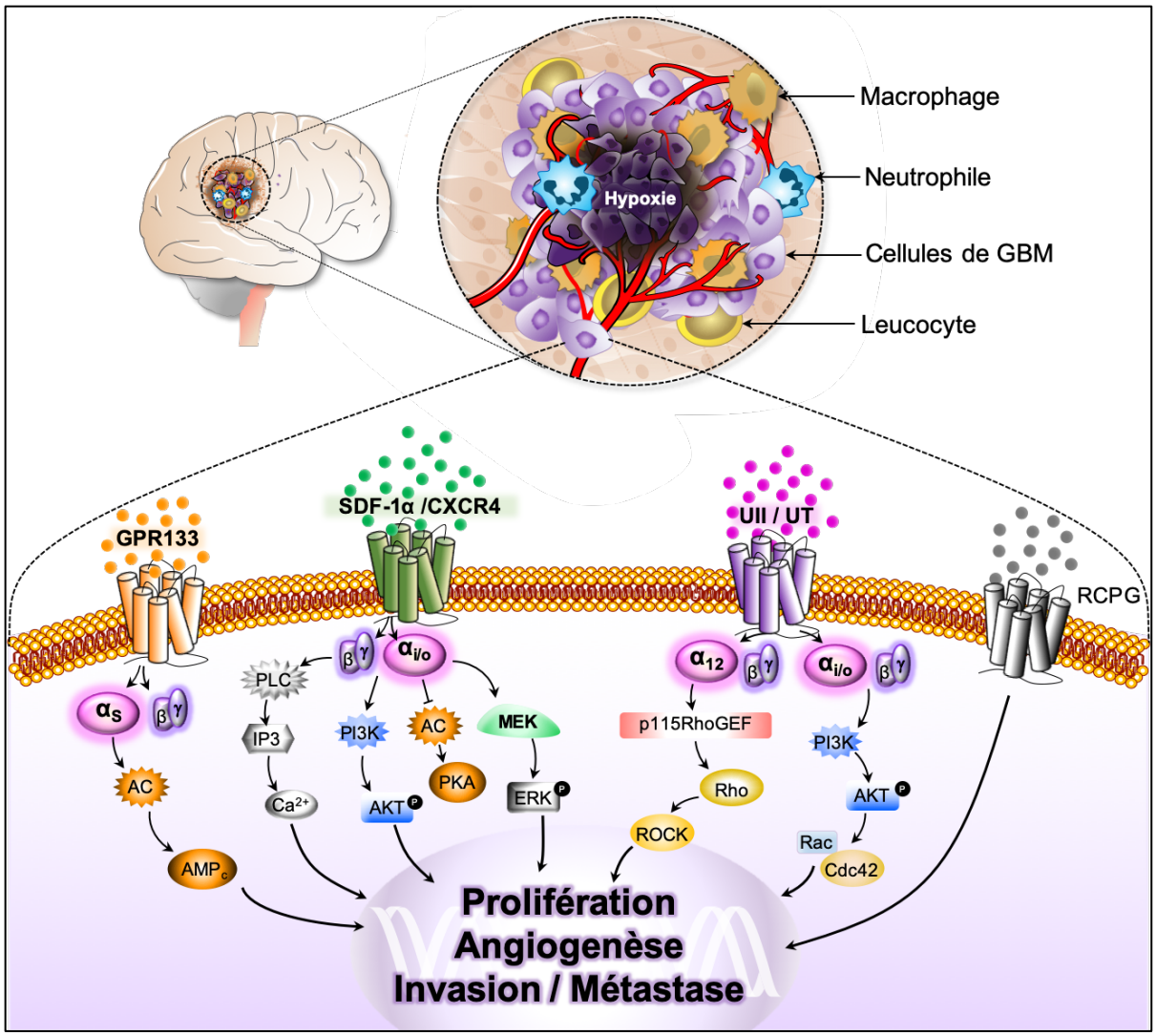


Figure 20. Exemple non exhaustive de l'implication de quelques RCPGs dans le développement du GBM. Le microenvironnement du GBM est composé d'une population cellulaire hétérogène qui comprend essentiellement les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, les cellules tumorales et immunitaires ainsi que les composants de la MEC. La sécrétion de chimiokines telles que le SDF-1α ou l'UII par ces cellules génère des effets autocrines et paracrines déclenchant des signalisations intracellulaires (tels que PI3K/Akt, Ras/MEK/ERK, Rho/ROCK) qui contribuent à la prolifération, la survie, la migration et l'invasion. AC : adénylyl-cyclase ; AKT (ou PKB) : protéine kinase B ; AMPc : adénosine monophosphate cyclique ; Cdc42 : *cell division cycle 42* ; IP3 : inositol triphosphate ; MEK : MAP kinase kinase ; PI3K : phosphoinositide 3 kinase ; PLC : phospholipase C ; PKA : protéine kinase A ; p115RhoGEF : *Rho guanine nucleotide exchange factor 1* ; ROCK : protéine kinase associée à Rho.

CHAPITRE 2 : LES PROTEINES G HETEROTRIMERIQUES

1. Découverte des protéines

Les protéines hétérotrimériques de type GTPase liant les guanosines tri- et di-phosphates (GTP et GDP), ou protéines G, sont des transducteurs de signaux considérés comme des interrupteurs moléculaires responsables de la réponse intracellulaire consécutive à l'activation de RCPG appartenant au moins aux trois premières classes, Glutamate, Rhodposine et Adhesion de la classification GRAFS (*cf.* Chapitre 1-6). Chaque trimère est composé d'une sous-unité α (Gα) et d'un dimère comprenant les sous-unités β et γ (Gβγ) indissociables en conditions non dénaturantes (Gilman, 1987; Wall et al., 1995), l'ensemble constituant un complexe non obligatoire et transitoire. Comme déjà précédemment discuté, la liaison d'un agoniste à un RCPG provoque un réarrangement conformationnel du récepteur qui favorise alors la dissociation du GDP porté par la sous-unité Gα.

C'est seulement vers les années 1970 que l'importance des protéines G a été suggérée. En effet en 1971, Rodbell et al., ont tout d'abord montré que le GTP était nécessaire à l'activation de l'adénylyl-cyclase (AC) par le glucagon, suggérant ainsi l'implication des protéines de type GTPase ou protéines G dans la signalisation transmembranaire (Rodbell et al., 1971). Gill et Meren (1978) ont montré que l'addition de la toxine cholérique (CTX), une exotoxine produite par la bactérie *Vibrio cholerae* responsable du choléra, à des lysats d'erythrocytes d'oiseau induisait la production et le maintien du niveau élevé d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) en catalysant une réaction d'ADP (adénosine diphosphate)-ribosylation. Un travail pionnier mené sur la lignée cellulaire S49 issue d'un lymphome de souris (Harris, 1970) a montré que l'administration de glucocorticoïdes induit une augmentation d'AMPc conduisant à la mort de ces cellules suite à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (Horibata and Harris, 1970). La génération d'une lignée cellulaire de lymphome mutée (S49cyc$^-$) (Coffino et al., 1975), incapable de produire de l'AMPc en réponse à l'isoprénaline ou à d'autres agonistes du récepteur β2-adrénergique (β2AR), et ne produisent pas (ou très peu) la protéine kinase, a montré que le traitement des membranes des S49 sauvages avec la CTX activée et le [^{32}P] NAD$^+$ entraîne l'incorporation de la radioactivité dans un polypeptide de 45 kDa, une incorporation absente lorsque les membranes de cellules S49cyc- sont utilisées (Milligan and Kostenis, 2006). Ces résultats ont permis d'initier les recherches sur la caractérisation du substrat de la CTX. C'est ainsi que Northup et al., (Northup et al., 1980) ont purifié par chromatographie à partir d'extraits membranaire de foie de lapin, un polypeptide de 45 kDa correspondant au substrat de la CTX mais aussi de la transducine, ainsi que deux polypeptides

de 35 kDa et 8 à 10 kDa, ce dernier ne soulevant dans un premier temps que peu d'intérêt en raison de sa mobilité rapide au cours de l'électrophorèse en SDS–PAGE (Milligan and Kostenis, 2006). La protéine de 45 kDa, considérée à l'origine comme étant la protéine régulatrice de liaison au nucléotide guanine a ensuite été définie comme la sous-unité α de la protéine G, et les polypeptides de 35 kDa et 8-10 kDa, comme les sous-unités Gβ et Gγ respectivement, l'ensemble constituant la protéine G hétérotrimérique fonctionnelle. Suite aux travaux de Rodbell en 1971, c'est seulement après quelques années que Gilman confirme l'existence d'une protéine intermédiaire qui régulerait les guanosines phosphates avant de la nommer protéine Gαs. Il démontre que les protéines G fonctionnent comme intermédiaires essentiels entre les récepteurs (tels que les récepteurs β-adrénergiques, α2-adrénergiques, muscariniques, rhodopsines) et les effecteurs (tels que AC, phosphodiestérases (PDE)) et que leurs fonctions sont régulées cycliquement par association du GTP à la sous-unité Gα (Ross and Gilman, 1977; Gilman, 1987). Ainsi, le prix Nobel de physiologie et de médecine a été conjointement attribué en 1994 à Gilman et Rodbell pour leur découverte des protéines G et du rôle de ces protéines dans la transduction du signal dans les cellules hépatiques ainsi que d'autres études clés sur la fonction et la structure des protéines G hétérotrimériques.

Le mécanisme répandu de transduction du signal par les protéines G au cours de l'activation d'un RCPG repose sur l'échange du GDP porté par la sous-unité α en GTP. La sous-unité Gα-GTP, alors incapable d'interagir avec le complexe Gβγ, et le complexe Gβγ peuvent activer une large gamme de protéines partenaires impliquées dans différentes voies de signalisation et engendrer une réponse cellulaire adaptée. Cette signalisation prend fin lorsque le GTP porté par Gα est hydrolysé en GDP grâce à une activité ATPasique intrinsèque, permettant alors la réassociation des sous-unités Gα et Gβγ en complexe tri-partite (Oldham and Hamm, 2006; Oldham and Hamm, 2008).

Plusieurs isoformes de chacune des sous-unités des protéines G ont été identifiées : 21 sous-unités α, 6 sous-unités β et 12 sous-unités γ, encodées par 16, 5 et 12 gènes respectivement (Hurowitz et al., 2000).

1.1. Phylogénie des sous-unités Gα

Avec seulement 16 paralogues chez l'homme pour la sous-unité Gα, comparés aux 800 gènes codant les RCPGs, l'évolution des protéines G hétérotrimériques a retenu moins l'attention que celle de ses partenaires protéiques à 7 domaines transmembranaires (Hurowitz et al., 2000; Birnbaumer, 2007; Syrovatkina et al., 2016; Lokits et al., 2018). L'analyse phylogénétique des protéines G permet toutefois la compréhension de l'évolution des cascades de signalisation

moléculaire des protéines G incluant notamment les AC, les phospholipases C (PLC) ou de facteurs d'échange de la guanine ou *guanine-nucleotide exchange factor* (GEF) incluant la p115RhoGEF.

Après leur découverte initiale et leur séquençage chez plusieurs espèces de mammifères, les sous-unités Gα se sont révélées être des protéines de ménage hautement conservée (Wilkie et al., 1992). Ainsi, des traces de gènes codant les sous-unités α des protéines G (GNA) ont été découvertes dans presque toutes les grandes branches d'eucaryotes (Krishnan et al., 2015; Lokits et al., 2018). On a longtemps émis l'hypothèse que la complexité croissante et la taille du génome des vertébrés résultaient de deux événements (2R) de duplication du génome entier (WGD) dont la dernière s'est produite il y a environ 300 millions d'années, bien avant la divergence de la lignée menant à l'homme et à la souris (Wilkie et al., 1992; Dehal and Boore, 2005; Oka et al., 2009; Lokits et al., 2018). Ces événements ont permis une augmentation du nombre de gènes et de la diversité des séquences de protéines Gα. En utilisant uniquement les séquences de gènes des protéines Gα de mammifères, la première théorie de l'évolution suggérait l'évolution de quatre des cinq familles Gα (GNAI, GNAQ, GNAS, GNA12 codant respectivement Gαi, Gαq, Gαs et Gα12), ainsi que Gαv (GNAV) qui n'est pas encore identifiée chez l'Homme (Lokits et al., 2018). En effet, cette cinquième classe Gαv, est présente chez les poissons dont le gène GNAV est perdu chez les tétrapodes (Oka et al., 2009). Plus récemment, Lokits et al., ont démontré la présence ou l'absence du gène de chaque Gα (GNA-) dans toutes les branches principales des deutérostomiens et ont évalué la conservation des structures exon-intron sous-jacentes au sein de ces groupes phylogénétiques (Lokits et al., 2018). Ainsi, en reconstruisant un arbre phylogénétique basé sur les séquences peptidiques en acides aminés, nucléotides et en utilisant la conservation de la structure exon-intron, ils ont mis en évidence la relation évolutive des différentes familles des sous-unités Gα (Figure 21).

GNAV partage avec GNAI et GNAQ six extrémités sur certains exons (Krishnan et al., 2015; Lokits et al., 2018) suggérant une origine commune entre ces trois familles. En 1992, Wilkie et al., avaient émis l'hypothèse qu'un même gène « progéniteur » des gènes GNAI et GNAQ (préGNAI/Q) avait subi une duplication en tandem (préGNAI/Q'-préGNAI/Q"), puis une duplication chromosomique ou régionale plus importante qui a finalement conduit aux arrangements de paires de gènes préGNAI'-préGNAI" et préGNAQ'-préGNAQ" (Wilkie et al., 1992) (Figure 22B1).

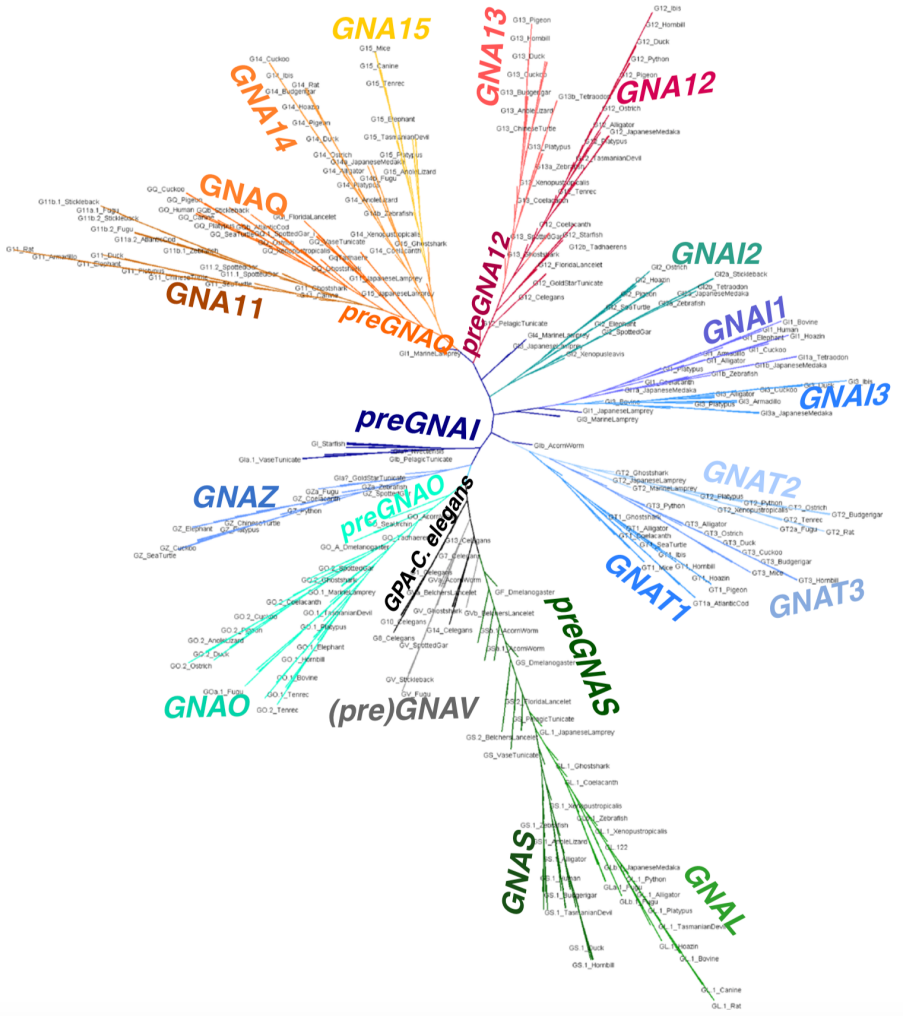


Figure 21. **Arbre phylogénétique et alignement des exons des sous-unités Gα. A.** L'arbre est construit par la méthode du maximum de vraisemblance, une méthode statistique probabiliste capable de coupler l'inférence des modalités évolutives des séquences moléculaires avec la reconstruction de la phylogénie, des gènes (pré)GNA- avec des intervalles de confiance rapportés à plus de 90% chez de nombreux organismes. (D'après Lokits et al., 2018).

Récemment en 2018, Lokits et al., ont rejeté l'hypothèse de Wilkie et al., sur la duplication en tandem survenant avant la duplication et la divergence de préGNAI et de préGNAQ en gènes séparés. Ils proposent que les préGNAI et préGNAQ auraient subi des duplications en tandem indépendantes avant les deux évènements de duplication du génome entier (2R WGD) des vertébrés (Lokits et al., 2018). Ceux-ci auraient donné naissance aux paires de paralogues préGNAI'-préGNAI" et préGNAQ'-préGNAQ" conservant leur orientation en tandem chez les métazoaires. Aucune duplication confirmée en tandem de préGNAQ n'a été constatée chez les espèces étudiées avant le 2R WGD des vertébrés, ce qui laisse supposer que le préGNAQ a été dupliqué en tandem en paire préGNAQ'-préGNAQ'' avant le 2R WGD (Figure 22B2). Cette paire progénitrice a ensuite été dupliquée deux fois, lors du 2R WGD survenue chez les métazoaires, tout en maintenant les deux paires de gènes GNAQ-GNA14 et GNA11-GNA15

chez les vertébrés. Ils ont ainsi montré que (pré) GNAV et (pré) GNAI forment un groupe monophylétique (descendants d'un ancêtre commun le plus récent) alors que les groupes (pré) GNAS sont en dehors de cette branche sur l'arbre phylogénétique des sous-unités Gα chez différents organismes. Au cours de la 2R WGD, les préGNAS ont été dupliqués en GNAS et GNAL (Gαolf) (Wilkie et al., 1992; Nordström et al., 2004). Aussi, le gène GNA12 ne partage aucune extrémité d'exon ou de codon entre les exons avec aucun des autres membres de la famille Gα (Figure 22A) mais présente plutôt une structure exon-intron suggérant que préGNA12 est issu d'une rétro-transposition de préGNAQ (Figure 22B2), c'est à dire d'une transcription inverse de transcrits de préGNAQ en ADN complémentaire préGNA12 qui s'est ensuite intégré dans le génome, bien que l'origine précise de préGNA12 ne soit pas encore certaine (Lokits et al., 2018). En effet, l'arbre phylogénétique (Figure 21) suggère que préGNA12 pourrait provenir de séquence préGNAQ.

La famille Gαi s'est élargie chez les vertébrés pour inclure les gènes GNAI1–4, GNAT1–4 et GNAZ, en plus de GNAO avec cependant une suppression rapide de GNAT4 et GNAI4. La famille Gαq est l'une des quatre familles (avant la découverte de Gαv) les plus connues. Les gènes GNA11 et GNA15 descendants de cette famille sont situés proches l'un de l'autre sur le chromosome 19p et leurs gènes les plus étroitement apparentés, GNAQ et GNA14, forment une paire sur le chromosome 9q (Nordström et al., 2004). Les études de Lokits et al., ont aussi permis de valider la présence des doublons préGNAQ (GNAQ, 14, 11 et 15) chez tous les vertébrés. La disposition tête-à-queue des paires de gènes GNAQ-GNA14 et GNA11-GNA15 comme schématisée sur la figure 22B, est conservée chez toutes les espèces (Lokits et al., 2018). On peut ainsi voir sur l'arbre phylogénétique que GNAQ et GNA11, qui semblent être exprimés de manière ubiquiste, sont très étroitement liés alors que GNA14 et GNA15, qui se regroupent sur l'arbre (Figure 21A), sont divergents non seulement par leur séquence, mais aussi par leurs spécificités d'expression tissulaire.

Malgré ces données récemment actualisées sur les sous-unités Gα, notre compréhension de l'émergence et de l'évolution des protéines G sur la base d'analyses phylogénétiques reste incomplète, notamment concernant les sous unités β et γ. En effet, dans la plupart des génomes de mammifère, cinq gènes Gβ ont été identifiés et classés en GNB1 à GNB4 (des paralogues hautement conservés) et GNB5, différent, partage seulement 50% de séquences similaires aux autres sous-unités Gβ, et principalement exprimée dans le cerveau alors que les autres sont largement distribuées (Khan et al., 2013; Syrovatkina et al., 2016).

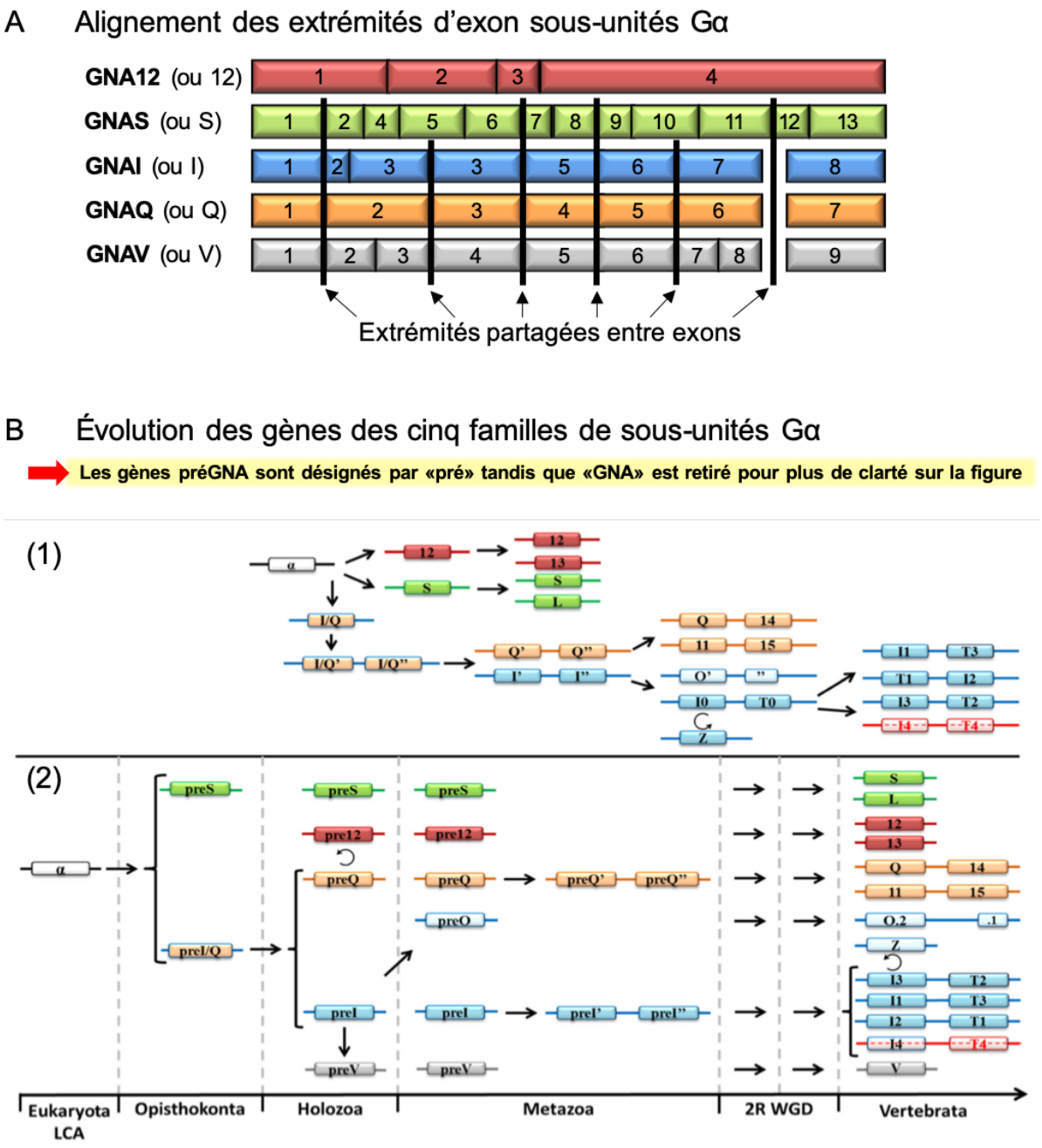


Figure 22. Évolution et alignement des cinq familles de sous-unités Gα. **A.** Alignement des extrémités représentatives des exons codant les sous-unités Gα des cinq grandes familles connues chez les vertébrés. Tous les exons conservés sont représentés sous forme de cases dont la taille est proportionnelle à la taille moyenne des exons (les introns ne sont pas représentés). GNAI et GNAQ partagent de nombreuses extrémités d'exon (lignes noires) suggérant une relation évolutive plus étroite. GNAI, GNAQ ainsi que GNAV partagent quatre extrémités d'exon avec GNAS tandis que GNA12 ne partage aucune extrémité avec les autres familles suggérant que GNA12 pourrait être issue de la rétro-transposition d'un autre gène. **B.** Évolution des sous-unités Gα. Les gènes préGNA sont désignés par «pré» tandis que «GNA» est retiré pour plus de clarté sur la figure. **B(1)** Ancienne théorie sur l'évolution des protéines Gα sans chronologie (Wilkie et al., 1992; Nordström et al., 2004). Un gène ancestral GNA (α, blanc) aurait subi une série de duplications avant de diverger en trois familles de progéniteurs primaires. Le progéniteur GNAI/Q aurait été dupliqué en tandem avant de subir une duplication régionale ou chromosomique plus importante. Ces paires de gènes auraient divergé en GNAQ (orange) et GNAI (bleu). Les gènes GNA12 (rouge), GNAS (vert), GNAQ'-GNAQ" (orange) et GNAI'-GNAI" (bleu) se seraient dupliqués pour donner deux copies de chaque parent. GNAI'-GNAI" se serait dupliqué

en GNAO'-O" (blanc) et GNAI0-GNAT0 (bleu), puis il y aurait eu deux autres duplications de ce dernier. GNAZ, le rétro-gène (flèche courbée) de GNAIO, a été réinséré dans le génome avant les duplications de GNAIO-GNATO. **B(2)** Nouvelle théorie de l'évolution des familles Gα établie par Lokits et al., incluant une chronologie dont la durée exacte des événements n'est pas prise en compte. Un seul progéniteur putatif ancestral préGNA (α-blanc) s'est dupliqué en progéniteur préGNAS (vert) et préGNAI/Q (orange). PréGNAI/Q est ensuite dupliqué en deux gènes distincts qui ont divergé en préGNAQ (orange) et préGNAI (bleu). PréGNAV (blanc) est issu d'une duplication de préGNAI alors que préGNA12 (rouge) est un rétro-gène, possiblement issu de préGNAQ. PréGNAI a été dupliqué pour générer préGNAO (blanc). Les préGNAI et préGNAQ ont toutes deux subi des événements de duplication en tandem indépendants avant la 2R WGD. GNAS, GNA12 et GNAQ'-GNAQ" ont tous conservé deux copies, tandis que GNAI'-GNAI" a conservé trois copies après la 2R WGD. GNAO a gagné deux transcrits (GNAO2-O1) issus de l'épissage alternatif de sa paire d'exons 7 et 8 après les 2R WGD et le rétro-gène GNAZ est apparu dans la lignée des vertébrés à partir de GNAI. LCA= dernier ancêtre commun. (D'après Lokits et al., 2018).

Les sous-unités Gγ sont les plus petites et les plus variables des sous-unités de protéines G (Yang and Hildebrandt, 2006). Chez les vertébrés, les membres des sous-unités Gγ sont constitués de la famille des transducines gamma (GNGT1, GNG11 et GNGT2), les sous-unités GNG2 à 5, GNG7–8, GNG10, GNG12 et GNG13 (Krishnan et al., 2015). Il faut rappeler que les premières études portaient surtout sur l'évolution des familles de protéines G telles que GNAI/GNAT et les paralogues GNB1–4 chez les vertébrés (Wilkie et al., 1992; Downes and Gautam, 1999; Hurowitz et al., 2000). L'étude récente de Krishnan et al., (Krishnan et al., 2015) a permis d'élargir le scénario évolutif pour l'extension à d'autres familles de protéines G comme illustré dans la Figure 23, classification qui permettra de mieux comprendre la signalisation intracellulaire des groupes de protéines G chez les organismes multicellulaires. En effet, les gènes GNB1-4 dérivés d'une région chromosomique ancestrale commune et GNB5 formaient à la base deux clusters distincts chez l'holozoaire *Capsaspora owczarzaki*, le parent unicellulaire le plus proche connu des métazoaires (Suga et al., 2013; Krishnan et al., 2015). La diversification du gène ancestral GNB1-4 en quatre gènes GNB distincts s'est aussi produite au cours du 2R WGD, ainsi les paralogues GNB1 à 4 sont actuellement présents chez tous les vertébrés. De même, l'analyse phylogénétique de Krishnan et al., a suggéré que les gènes de la famille des Gγ actuels dériveraient à la base de deux séquences Gγ présentes chez la plupart des invertébrés bilatéraux dont l'une est placée à la base dans un cluster nommé GNG, correspondant à tous les membres des Gγ sauf GNG13 qui correspond à l'autre cluster chez les métazoaires. Plus tard, le 2R WGD donna lieu chez les vertébrés actuels à plusieurs groupes, GNG13 seul, la famille des transducines gamma (GNGT1, GNG11 et GNGT2), et le reste des GNG formant un groupe monophylétique avec trois sous-groupes, GNG2, 3, 4 et 8 (sous-groupe 1), GNG7 et 12 (sous-groupe 2), GNG5 et 10 (sous-groupe 3) que l'on distingue sur la Figure 23 avec des cases de la même couleur. Il faut noter qu'en plus du 2R WGD, il a été

suggéré qu'une duplication supplémentaire du génome entier (3R WGD) s'est produite dans la lignée des poissons (*Teleostei*) (Steinke et al., 2006; Lokits et al., 2018) aboutissant en particulier chez les zebrafishs, à la création de quatre paralogues de GNA15 situés sur le même chromosome l'un à côté de l'autre avec une synténie conservée (Lokits et al., 2018).

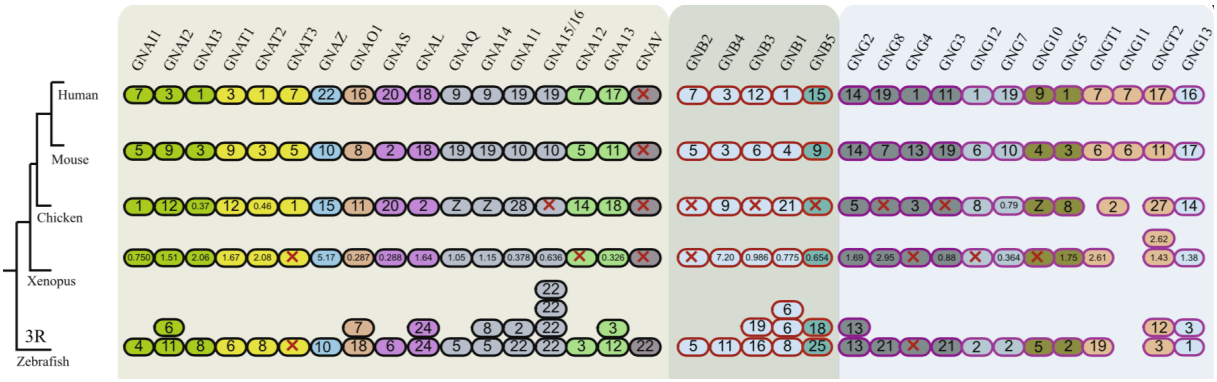


Figure 23. Modèle évolutif proposé pour l'expansion des familles de gènes des protéines G hétérotrimériques au début de la tétraploïdisation des vertébrés. Chaque case correspond à un gène et les sous-familles de gènes sont indiquées avec le même code couleur. Les nombres dans les cases indiquent l'emplacement chromosomique. La présence de duplications supplémentaires chez les vertébrés est indiquée par empilement de cases, avec les emplacements chromosomiques appropriés de chaque duplicata. La perte d'un gène est indiquée par une croix rouge sur les gènes correspondants. (D'après Krishnan et *al.* 2015).

2. Structure des protéines G hétérotrimériques

2.1. Structure des sous-unités Gα

Constituées de sous-unités Gα, Gβ et Gγ, les protéines G hétérotrimériques sont des protéines étroitement associées et liées à la face interne de la membrane plasmique. Holbrook et Kim (Holbrook and Kim, 1989) sont les premiers à proposer une structure de la sous-unité Gα **(**Figure 24) en se basant sur la similarité de séquences entre la sous-unité Gα des protéines G hétérotrimériques et celles des petites protéines G, telles que HRas ($p21^{ras}$) dont la structure cristallographique était déjà connue à l'époque.

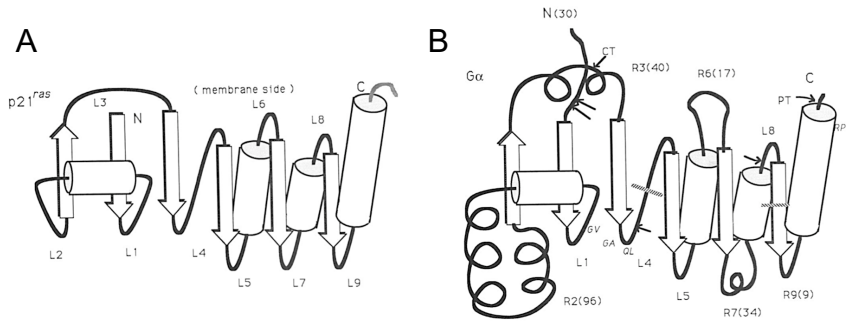


Figure 24. Schéma de la structure tertiaire de $p21^{ras}$ (A) et modèle proposé pour la structure tertiaire de Gα (B). Les feuillets β sont indiqués par des flèches épaisses, les hélices α par des cylindres et les boucles (ou *random coils*) par des lignes noires (notées L1 à L9) reliant les éléments structuraux secondaires. Les boucles qui sont courtes dans $p21^{ras}$ (L2, L3, L6, L7 et L9) sont remplacées dans la

sous-unité Gα par des séquences plus longues nommées R2, R3, R6, R7 et R9 avec le nombre de résidus indiqué entre parenthèses. Les extrémités N- et C-terminales sont indiquées par N et C. Les sites de l'ADP-ribosylation par la toxine cholérique (CT) et la toxine pertussique (PT) sont indiqués, ainsi que les mutations ponctuelles : GV, substitution Glycine/Valine dans la boucle L1 ; GA, substitution Glycine/Alanine et QL, substitution Glutamine/Leucine dans la boucle L4 ; RP, substitution Arginine/Proline dans la partie C-terminale. (D'après Holbrook et Kim 1989).

Plus tard, les premiers travaux de résolution de la structure cristallographique de la transducine Gαt associée aux ligands GTP ou GDP (Noel et al., 1993; Lambright et al., 1994) ont permis de mieux comprendre les bases structurales de la fonction des protéines G. Actuellement, les résidus importants dans l'interaction avec les guanines et la manière dont la sous-unité opère des changements conformationnels au cours de son passage de l'état inactif à l'état actif sont maintenant bien connus. La structure de la sous-unité Gα révèle un repliement protéique qui se compose d'un domaine GTPase conservé qui comprend des hélices α (α1-5 et αG) et des feuillets β (β1-6) constituant 3 boucles flexibles nommées switch I, II et III (Figure 25C**),** et d'un domaine hélicoïdal composés de sept hélices relié au domaine GTPase par les linkers 1 et 2 (Noel et al., 1993; Oldham and Hamm, 2008; Duc et al., 2015). En plus de l'hydrolyse du GTP, le domaine GTPase présente des sites de liaison pour le dimère Gβγ, les RCPGs ainsi que les effecteurs.

Les « switches I, II et III» subissent un important changement de conformation selon les états liant le GDP ou le GTP (Noel et al., 1993; Lambright et al., 1994; Neer, 1995; Duc et al., 2015). Une quatrième boucle flexible hautement conservée, appelée P-loop, entoure la poche de liaison aux guanines GDP ou GTP (Duc et al., 2015). La P-loop, correspondant aussi à la boucle β1-α1 (*random coil*), interagit avec les phosphates α et β du GDP ou GTP **(**Figure 25B). La boucle switch I, également connue comme linker 2, se compose des résidus du feuillet β2 dans le domaine GTPase et des résidus de l'hélice α F du domaine hélicoïdal, reliant ainsi les deux domaines. La boucle switch II s'étend de l'extrémité C-terminale du feuillet β3 à l'hélice α2 et inclut la boucle α2-β4 comme illustré sur la Figure 25C.

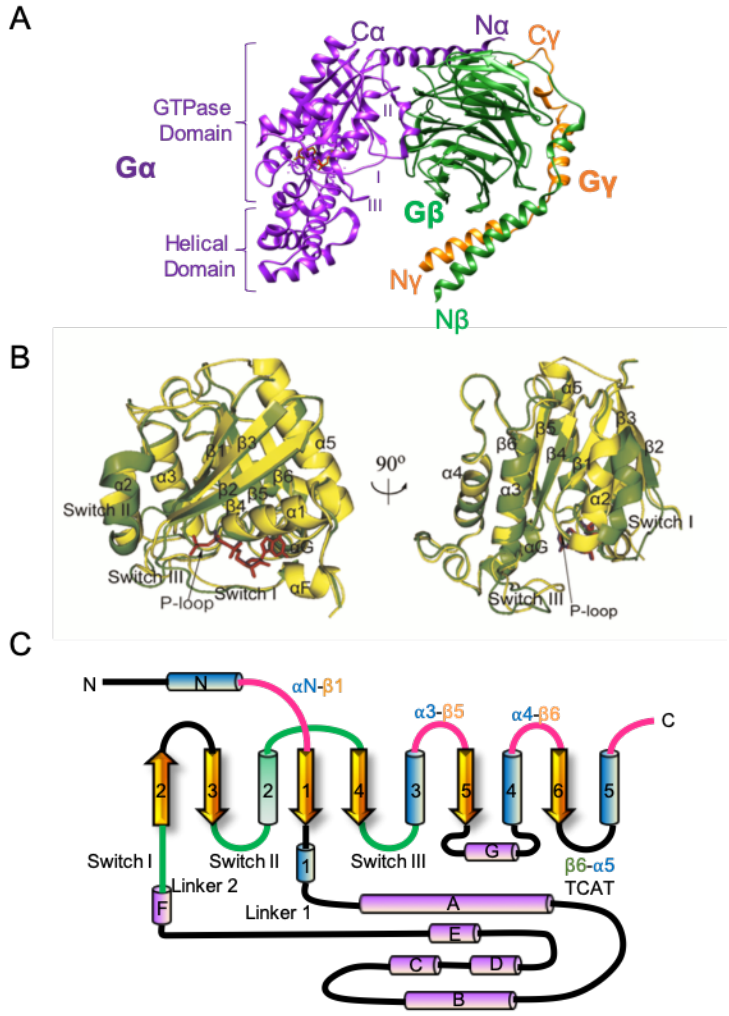


Figure 25. Représentation de la structure modélisée des sous-unités Gα et Gβγ des protéines G. A. Structure cristallographique d'une protéine G hétérotrimérique inactive (Wall et al., 1995). Les sous-unités Gαi1, Gβ1 et Gγ1 sont respectivement représentées en violet, vert et orange (*Protein Data Bank* (PDB) : 1GP2). Les extrémités C- et N-terminales des sous-unités Gα, Gβ et Gγ sont notées Cα, Nα, Cβ, Nβ, Cγ et Nγ, respectivement. **B.** Comparaison du domaine GTPase de la sous-unité Gα inactive liée au GDP (vert) (PDB : 1TAG) et active liée au GTPγS (jaune) (PDB : 1TND). Le GTPγS est visible sous forme de bâtons rouges. (D'après Duc et al., 2015). **C.** Schéma de la structure secondaire de Gα montrant les hélices α en cylindres et les feuillets β en flèches. Le domaine hélicoïdal est composé de sept hélices notées A à G (violet). Les 3 boucles flexibles nommées Switch (vert) et les sites de contact avec les récepteurs (rose) sont mis en évidence. (D'après Oldham et Hamm 2008).

En effet, les structures cristallographiques de Gαt/iβ1γ1 et Gαi1β1γ2 établies entre 1995 et 1996 (Wall et al., 1995; Lambright et al., 1996) suggèrent que l'interaction entre la α-GDP et le complexe Gβγ se produit principalement dans une poche hydrophobe formée par les switches I et II de Gα, cette deuxième boucle flexible étant très importante dans l'interface entre la Gα et les protéines effectrices en aval (Slep et al., 2001; Duc et al., 2015). La liaison au GTP atténue la polarité du domaine d'interaction aux autres sous-unités, ce qui entraîne une réduction de l'affinité de liaison de Gα avec Gβγ, conduisant à leur dissociation (Oldham and Hamm, 2008).

Toutes les sous-unités Gα à l'exception de Gαt (Denis et al., 2012) sont modifiées de manière post-traductionnelle par le greffage d'acide gras palmitique (voire d'acide myristique) à 16 atomes de carbone *via* une liaison thioester catalysée par la palmitoyl acyltransférase, ce qui permet la fixation des protéines G à la membrane plasmique (Milligan and Kostenis, 2006; Tsutsumi et al., 2009; Duc et al., 2015). Ces modifications post-traductionnelles sont décrites en détail dans la section 6.2. Lors du couplage à un RCPG, la sous-unité Gα subit un

changement de conformation au cours duquel l'hélice C-terminale α5 se déplace de 6 Å du site de liaison au nucléotide entraînant la perturbation du site de liaison et la libération consécutive du GDP, remplacé par le GTP (García-Nafría and Tate, 2019). Malgré la faible conservation des séquences entre les différentes familles de sous-unités Gα dans les régions qui entrent en contact avec les RCPGs (Figure 26**)**, la conformation globale des sous-unités Gα reste très similaire. Très récemment, cinq régions principales de la sous-unité Gα, nommées A1 à A5 (Figure 26), ont été décrites formant des contacts avec les RCPGs de la classe A ou Rhodopsine selon la classification GRAFS (par exemple, ,le récepteur β2-adrénergique (β2AR) ou le récepteur de l'adénosine A2A (A2A)) (García-Nafría and Tate, 2019). García-Nafría et Tate ont aussi montré que le couplage de Gαs à des RCPGs de la classe B ou Sécrétine (par exemple, le récepteur du glucagon-like peptide-1 (GLP1R) ou le récepteur de la calcitonine (CTR)), fait référence aux mêmes régions (exceptée la région A3) et inclut également deux résidus (lysine (K) et glutamine (Q)) dans l'hélice N-terminale, en tant qu'extension de la région A1 (Figure 26). La région A5 qui comprend l'hélice α5 de l'extrémité C-terminale de la sous-unité Gα, est la seule région d'interaction présente dans tous les complexes RCPGs-protéine G. Pour les récepteurs de classe A, les sites de contact avec les sous-unités Gαs et Gαi/o sont localisés au niveau des derniers acides aminés de la région A5 (Figure 26A, cercle rouge).

Par cryo-microscopie électronique, García-Nafría et Tate ont aussi montré que les sous-unités Gαs, Gαi et Gαo interagissent avec l'un des 44 acides aminés différents dans la partie cytoplasmique des RCPGs (β2AR, A2aR, GLP-1, CTR, $5HT_{1B}R$ ou Rhodopsine) incluant les boucles intracellulaires (ICL1, 2 et 3), mais le nombre d'interactions établies avec ces résidus diffère pour chaque protéine G (García-Nafría and Tate, 2019).

Des études biochimiques et biophysiques antérieures avaient suggéré plusieurs régions intervenant dans l'interaction entre les RCPGs et les protéines G. Ces régions incluent les boucles intracellulaires ICL2 et ICL3, les domaines transmembranaires TM3, TM5 ou TM6, la charnière TM7/hélice H8 des RCPGs, l'hélices αN, la charnière αN/β1, les boucles β2/β3, α2/β4 ou α4/β6, l'hélice α5, l'extrémité C-terminale de la sous-unité Gα, ainsi que l'extrémité C-terminale du dimère Gβγ, toutes ces régions intervenant dans l'activation des protéines G induite par les RCPGs (Duc et al., 2015).

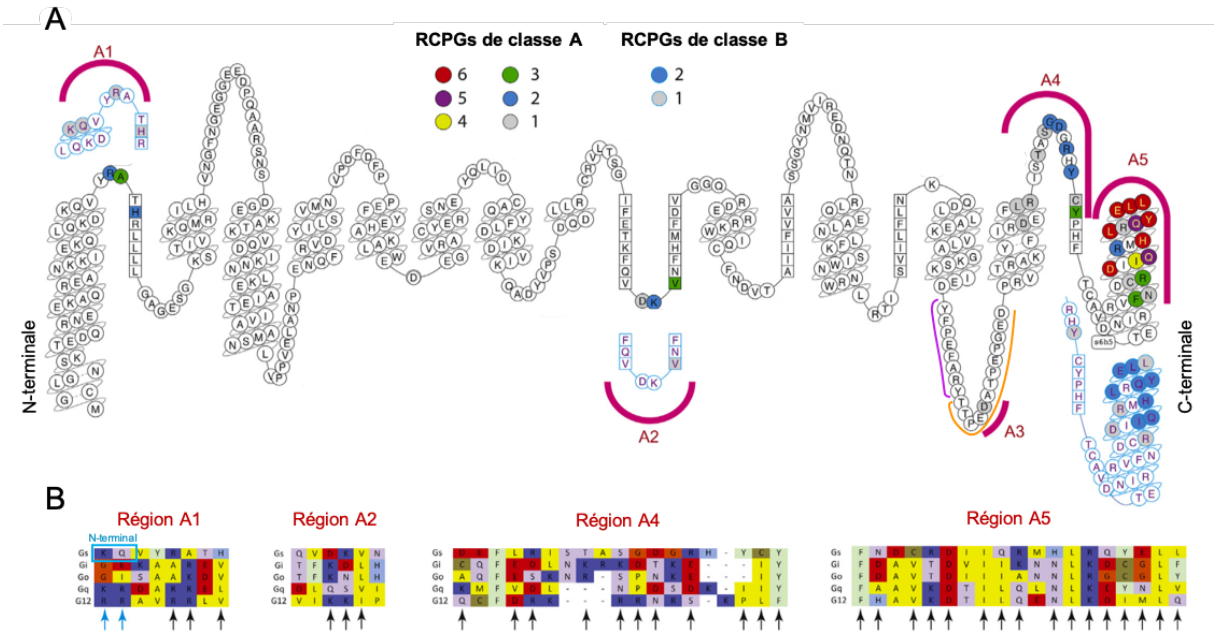


Figure 26. Régions de la sous-unité Gα qui interagissent avec les RCPGs. A. Représentation schématique de la sous-unité Gαs générée dans la base de données des RCPGs (GPCRdb). Les résidus sont colorés en fonction du nombre de fois où le résidu ou les résidus équivalents dans Gαi ou Gαo établissent des contacts avec un RCPG de la classe A Rhodopsine. Les contacts établis par la sous-unité Gαs avec deux RCPGs de la classe B sont indiqués en bleu avec des lettres en violet. L'asparagine (D323) dans la partie A3 est une région d'interaction uniquement dans la structure β2AR-Gαs. **B**. Alignements des acides aminés dans les régions des différentes sous-unités Gα. Les flèches indiquent les positions impliquées dans l'interaction avec les RCPGs. Le rectangle bleu encadre les deux résidus (lysine (K) et glutamine (Q)) dans l'extrémité N-terminale en tant qu'extension de la région A1 qui interviennent dans le couplage de Gαs avec les RCPGs de la classe B ou Sécrétine. L'alignement de la région A3 n'est pas montré car la séquence comprise entre la thréonine (T) et l'acide aspartique (D) (courbe orange en A3) de la région A3 ne se trouve que dans Gαs et Gαolf, les autres sous-unités Gα ayant une boucle plus courte composée de 8 résidus (séquence violette en A3). (D'après García-Nafría et Tate 2019).

L'extrémité C-terminale des sous-unités Gα est un site important dans la spécificité des interactions récepteur-protéine G. En effet, en remplaçant trois acides aminés situés à l'extrémité C-terminale de Gαq par quatre acides aminés présents sur le domaine C-terminal de Gαi2, Conklin et al., ont montré que cette nouvelle chimère pouvait être activée par des RCPGs spécifiquement couplés à la protéine Gαi2 (Conklin et al., 1993). Bien que ces résidus de l'extrémité C-terminale soient importants, ils ne sont pas les seuls déterminants de la spécificité. En effet, les séquences des extrémités C-terminales de plusieurs sous-unités Gα sont identiques et néanmoins interagissent avec des récepteurs distincts (Neer, 1995). Pour exemple, le récepteur du complément C5a (C5aR) interagit avec la sous-unité Gα15 mais pas avec la sous-unité Gα11 de la même famille, qui présente des résidus C-terminaux identiques (Lee et al., 1995). Une chimère de Gα11 portant une grande partie de la séquence C-terminale de Gα15 ne présent pas de couplage à C5aR, alors que la chimère comprenant quelques acides aminés de la

région N-terminale de Gα15 permet de doter cette chimère d'une grande spécificité pour C5aR, suggérant d'autres éléments de spécificité, comme l'extrémité N-terminale. Cette extrémité semble avoir également un rôle important dans l'interaction entre Gα et le complexe Gβγ, aspect qui est abordé ci-dessous.

2.2. Structure des sous-unités Gβγ

Les sous-unités Gβ et Gγ ont respectivement une masse molaire d'environ 36 et 8 kDa. La structure générale de la sous-unité Gβ (Figure 27) présente un enchainement particulier de feuillets β dit « *β-propeller* », une structure tertiaire caractérisée par l'arrangement de quatre à huit feuillets β autour d'un axe central selon une configuration toroïdale (tube courbé refermé sur lui-même) ; chaque feuillet β est typiquement formé de quatre brins β antiparallèles tordus formant un tunnel central. La sous-unité Gβ présente typiquement sept répétitions du motif structural WD40 (40 acides aminés se terminant par le tryptophane (W) et l'acide aspartique (D)), chacun des feuillets comprenant quatre brins antiparallèles en forme de lame autour d'un axe central comme présenté sur la Figure 27B. La séquence répétée WD40 correspond au dernier brin (extérieur) d'une lame et aux trois premiers brins (intérieurs) de la suivante (Wall et al., 1995; Denis et al., 2012). La sous-unité Gγ est constituée de deux hélices α reliées par un coude et présente une cystéine d'ancrage à son extrémité C-terminale au niveau d'un motif CAAX (Cystéine-Arginine-Arginine-n'importe quel résidu), motif susceptible de modifications post-traductionnelles (Lambright et al., 1996). Les régions N-terminales des sous-unités Gβ et Gγ établissent de nombreux contacts entre-elles grâce à un super enroulement d'hélices favorisant l'interaction des hélices de chaque sous-unité Gβ et Gγ (Figure 27), permettant la formation d'un complexe stable de type obligatoire (unité fonctionnelle), indissociable en conditions non-dénaturantes (Denis et al., 2012). Les sous-unités Gγ en particulier, sont soumises à des modifications post-traductionnelles (farnésylation, géranylgéranylation, décrites dans la section 6.2) coopérant en trans avec une Gα palmitoylée pour permettre un ciblage approprié du trimère Gαβγ du réticulum endoplasmique (RE) à la membrane plasmique (Michaelson et al., 2002). Comme les sous-unités Gβ ne présentent pas de modifications lipidiques, les Gγ agissent en tant que chaperons pour le ciblage de Gβ à la membrane plasmique (Denis et al., 2012). Gβ et Gγ augmentent considérablement l'affinité de la sous-unité Gα pour le RCPG inactivé, et inhibe la libération spontanée du GDP. Elles peuvent aussi interagir directement, *via* leurs domaines C-terminaux avec les boucles intracellulaires et le domaine C-terminal du récepteur (Denis et al., 2012). Cela semble plus atypique puisque seuls 11 acides aminés dans la sous-unité Gβ peuvent établir des contacts dans une ou plusieurs

des structures du récepteur de la calcitonine (CTR) (Figure 27) et seul l'acide aspartique (D312) de la sous-unité Gβ1 semble interagir avec les RCPGs (García-Nafría and Tate, 2019). Ces 11 acides aminés se situent dans 4 régions d'interaction avec les RCPGs, identifiées dans le motif *β-propeller* de la sous-unité Gβ et se localisent en particulier entre les feuillets β constituant chaque lame (blade) du motif WD40 (Figure 27**).** Seul Gβ5 présente plus de variabilité dans ces domaines, il est donc possible que cela puisse jouer un rôle dans la spécificité de son couplage, mais cela reste largement inexploré (García-Nafría and Tate, 2019).

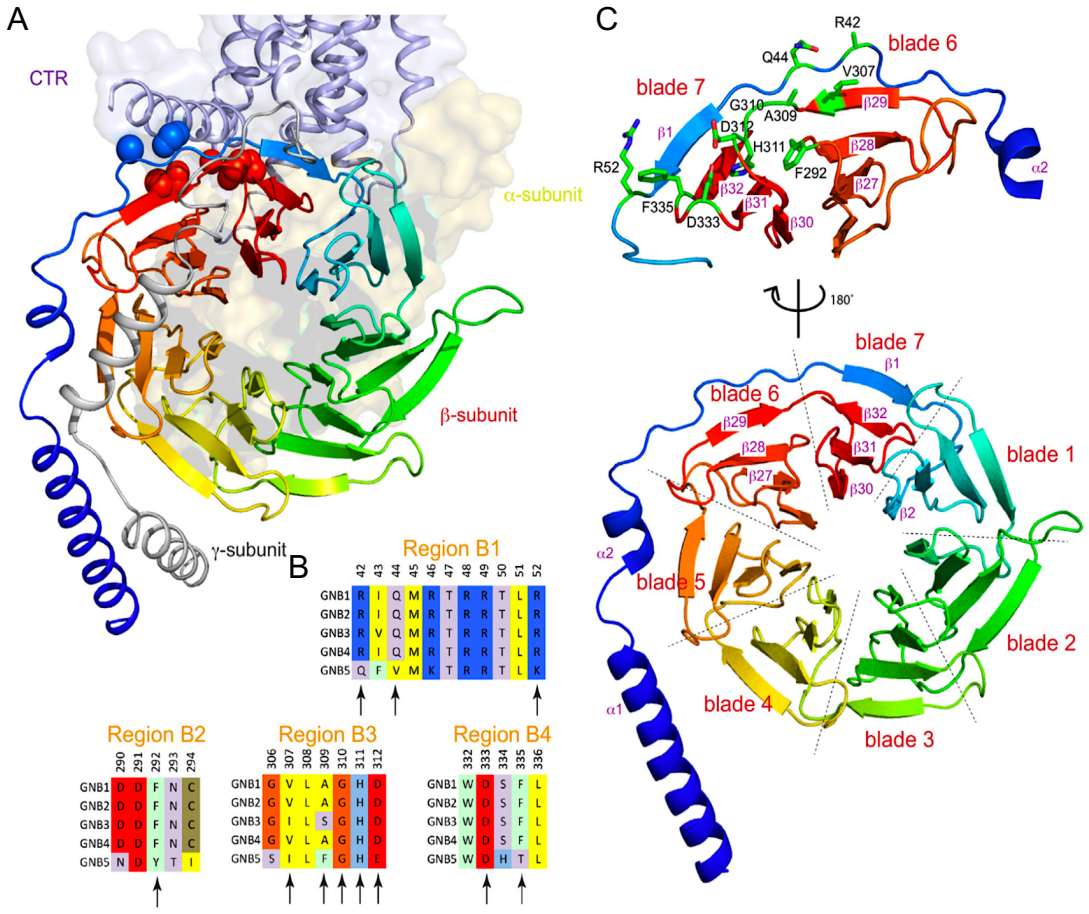


Figure 27. Structure cristallographique des sous-unités Gβγ et régions conservées interagissant avec les RCPGs (PDB : 5UZ7). A. Représentation du complexe CTR-Gα où CTR est représenté en mauve, derrière la sous-unité Gβ en coloration arc-en-ciel et la sous-unité Gγ (devant la sous-unité β) représentée en gris. Les atomes qui établissent des contacts atomiques entre la sous-unité Gβ et le CTR sont représentés par des sphères (CTR, bleu ; sous-unité Gβ, rouge). **B.** Les flèches indiquent les acides aminés des sous-unités Gβ qui forment des contacts avec les RCPGs dans un alignement de cinq sous-unités Gβ du génome humain. La numérotation des acides aminés fait référence à la sous-unité β1 (GNB1). **C.** La position des régions de la sous-unité Gβ qui entrent en contact avec les RCPGs. Les sept répétitions du motif structural WD40 sont isolées par des traits en pointillés. Les résidus mis en évidence dans la sous-unité Gβ sont représentés par des bâtons (verts) dans deux lames (blade 6 et 7) de la structure *β-propeller*. D'après García-Nafría et Tate 2019.

3. Les sous-unités α des protéines G

A l'heure actuelle, les rôles de différentes protéines G ont été décrits participant à différents processus cellulaires caractérisés par la diversité des RCPGs ainsi que la nature des sous-unités qui composent l'hétérotrimère. Chez les mammifères, comme précisé précédemment, toutes les sous-unités Gα décrites jusqu'à présent appartiennent à quatre familles principales **(**Tableau 1, Figure 28**)** (Gαs, Gαi/o, Gαq/11 et Gα12/13) sur la base de leurs homologies de séquence, de la structure de leur gène et de la régulation d'effecteurs spécifiques (Simon et al., 1991; Downes and Gautam, 1999). Chaque famille comprend 2 à 4 membres (Tableau 1) : la famille Gαs contient principalement Gαs et Gαolf, la classe Gαi/o regroupe les Gαi, Gαo, Gαt, Gαz et Gαgust, la famille Gαq/11 comprend Gαq, Gα11, Gα14 et Gα15/16, et la famille Gα12/13 regroupe les deux sous-unités Gα12 et Gα13 (Downes and Gautam, 1999; Wettschureck and Offermanns, 2005). De nombreux gènes codant les sous-unités Gα ont été cartographiés sur des emplacements chromosomiques chez l'homme et la souris. Cela a permis de révéler que les gènes codant les sous-unités Gα présentent une synténie (conservation de l'ordre des gènes) presque parfaite entre les deux espèces. Cependant, certains membres des sous-unités Gα présentent des divergences, comme par exemple les sous-unités murine Gα15 et humaine Gα16 qui sont codées par des orthologues du gène GNA15 ancestral commun, mais ne partagent que 84% d'identité de séquence entre les deux espèces (Hurowitz et al., 2000). En effet, l'ensemble des sous-unités Gα des différentes classes partage une similitude de séquences en acides aminés (Figure 28). L'alignement des séquences en acides aminés obtenues par clonage et séquençage de toutes ces sous-unités Gα a montré qu'environ 20% des acides aminés sont conservés de manière invariable (Lochrie and Simon, 1988). Plus récemment, Temple et al., (Temple et al., 2010) ont identifié par alignement de séquences des quatre principales familles de sous-unités Gα des mammifères, 106 positions invariables en acides aminés et 59 positions distinctes (Figure 28 : I, Q, S et 2, correspondant respectivement à Gαi/o, Gαq, Gαs et Gα12/13), et ont émis l'hypothèse que chaque position distincte d'une famille contribue à une fonctionnalité spécifique de la famille Gα donnée. Les similitudes de séquence et de fonctionnalité ont permis de regrouper ces sous-unités dans différentes familles et sous-groupes (Tableau 1).

Famille	Sous-groupe	Gène	Position cytogénétique	MW (kDa)	Effecteurs	Expression	Autres protéines d'interaction
Gαs	Gαs	GNAS	20ql3.3	46	AC (+)	Ubiquiste	Tubuline, NUCB1, tyrosine kinase Src, axine
	Gαsolf	GNAL	18p11.31	44		Epithélium olfactif, cerveau, appareil digestif et urogénital	
Gαi/o	Gαi1	GNAI1	7q21	40	AC (-), GMPc phosphodiesterase (+)	Largement exprimé	Rap1Gapll, tyrosine kinase Src, NUCB2, tubuline
	Gαi2	GNAI2	3p21.3-p21.2			Ubiquiste	
	Gαi3	GNAI3	1p13	41		Largement exprimé	
	Gαo	GNAO	16q12.1	40		Neurones, glandes neuroendocrines, astroglie, coeur	
	Gαz	GNAZ	22q11.1-q11.2	41		Neurones, plaquettes	
	Gαt1/t2	GNAT1/2	3p21.3-p21.2/1p13	40		Bâtonnets et cônes de la rétine	
	Gαgust	GNAT3	7q21			Cellules gustatives	
Gαq/11	Gαq	GNAQ	9q21	42	PLCβ1-4 (+), p63RhoGEF (+)	Ubiquiste	GRK2, actine, tubuline, PI3K, TPR1, BTK, PLCε, TRPM8
	Gα11	GNA11	19p13.3			Ubiquiste	
	Gα14	GNA14	9q21	42		Reins, poumons, foie, rate	
	Gα15/16	GNA15	19p13.3	44		Cellules hématopoïétiques	
Gα12/13	Gα12	GNA12	7p21-p22	44	p115RhoGEF (+) LARG (+) PDZ-RhoGEF (+) Cadhérine (+) Radixine (+)	Ubiquiste	Gap1, rasGap, BTK, HAX-1, α-SNAP, p120caterine, Intégrine $\alpha_{iiib}\beta_3$
	Gα13	GNA13	7p21-p22			Ubiquiste	

Tableau 1. Les différentes sous-unités Gα et leurs expressions. AC : Adénylyl-cyclase ; GMPc : *Cyclic guanosine monophosphate* ; PDZ : *Post-synaptic density protein ; Drosophila disc larg tumor suppressor and Zonula occludens-1 protein* ; PLCβ1-4, ε : phospholipase C β1-4, ε ; RhoGEF : *guanine exchange factor for Rho* ; LARG : *Leukemia-associated RhoGEF* ; PI3K : Phosphoinositide 3-kinase ; RAP1 : *Ras-related protein 1 ;* RAP1GAP : *RAP1 GTPase-activating protein* ; NUCB1,2 : nucleobindin-1,2 ; GRK : *G protein-coupled receptor kinase* ; BTK : tyrosine kinase de Bruton, TPR1 : tetratricopeptide repeat 1 ; TRPM8 : *Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily M Member 8 ;* HAX-1 : *HS-1-associated protein X-1 ;* α-SNAP : α-*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein* . (+) indique une stimulation et (-) une inhibition. (D'après Syrovatkina et al., 2016; Wettschureck et Offermanns 2005; Milligan et Kostenis 2006; Hurowitz et al., 2000).

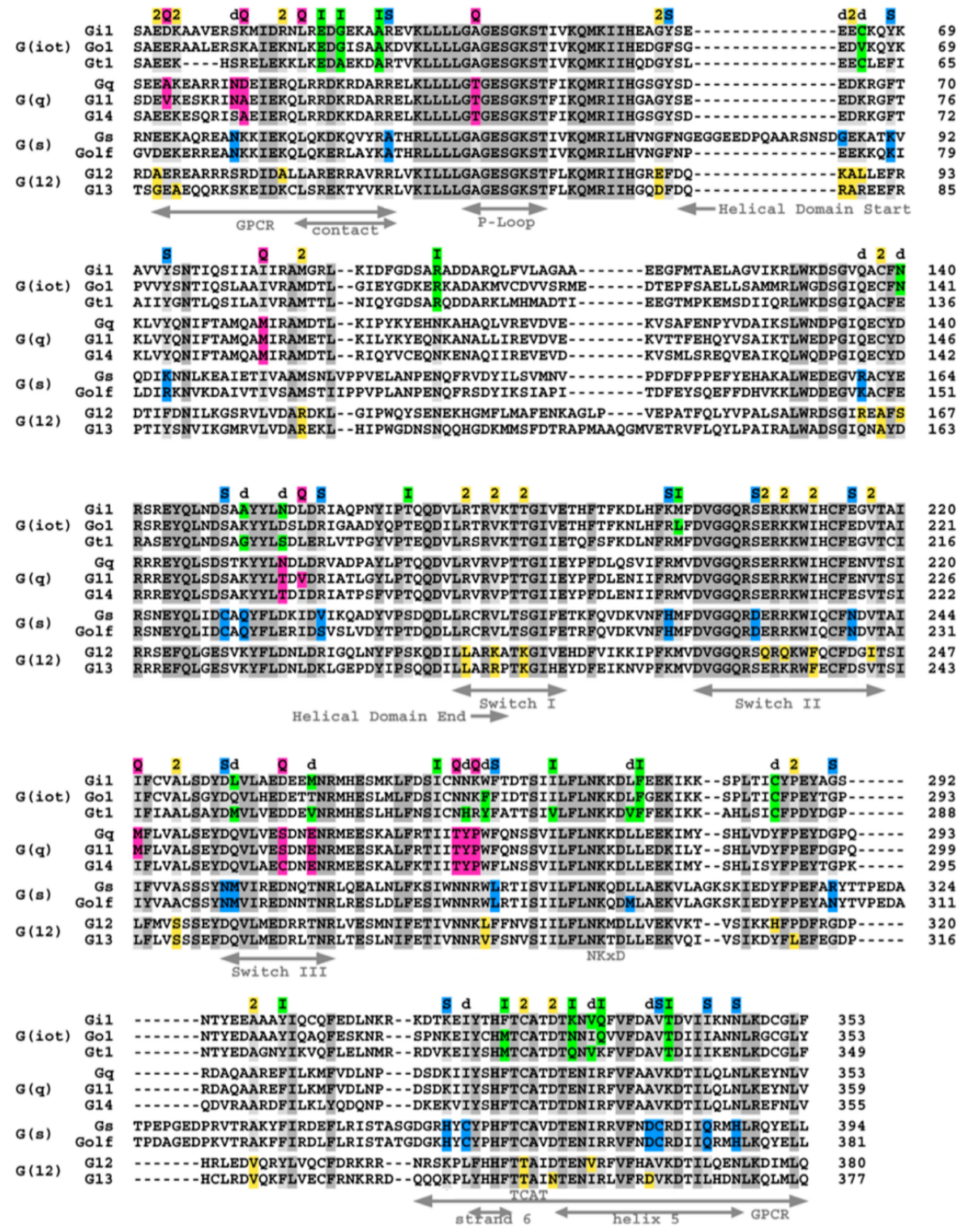


Figure 28. Alignement des différentes sous-unités Gα mettant en évidence les positions invariables et distinctes. Les résidus invariables conservés dans les 4 familles Gα sont en gris foncé alors que ceux conservés dans 3 des 4 familles Gα sont en gris clair. Une variation en acides aminés dans chaque famille est illustrée au niveau des sites spécifiques colorés en fonction de la classe Gα et notées au-dessus de l'alignement : 'S'= Gαs (bleu) ; 'I'= site Gαi/o (vert) ; 'Q'= Gαq (magenta) ; '2' = Gα12/13 (jaune) et 'd'= site. Les positions 'd' sont spécifiques et conservées sur deux familles de Gα. Les régions fonctionnelles sont indiquées sous l'alignement, incluant les régions importantes pour le couplage aux RCPGs (GPCR), les boucles flexibles switches I, II, III et les régions de liaison aux nucléotides (P-loop, motifs NKxD et TCAT). (D'après Temple et al., 2010).

3.1. La famille Gαs

La classe Gαs, principalement composée de Gαs et Gαsolf (Tableau 1), stimule toutes les isoformes de l'AC qui convertissent l'ATP en AMPc. Contrairement à Gαolf dont l'expression est restreinte à certains tissus ou organes (épithélium olfactif, cerveau, appareils digestif et urogénital), Gαs est exprimée de manière ubiquiste (Milligan et Kostenis, 2006, (Hurowitz et al., 2000; Wettschureck and Offermanns, 2005; Milligan and Kostenis, 2006; Syrovatkina et al., 2016)). En effet, les membres de cette famille couplent de nombreux RCPGs associés à l'activation de l'AC et l'augmentation de la concentration intracellulaire de l'AMPc, second messager capable d'exercer ses effets par l'intermédiaire d'une protéine kinase AMPc-dépendante, la PKA, qui par phosphorylation du facteur de transcription CREB (*cAMP response element-binding protein*) entre autres, permet la régulation de l'expression de nombreux gènes. Comme déjà mentionné dans la section 1, la CTX catalyse la ribosylation de l'ADP du NAD+ sur un acide aminé cible Arginine (Arg^{201}) indispensable à la stabilisation de l'état de transition lors de l'hydrolyse du GTP en GDP, de certaines sous-unités Gα. Gαs-GTP reste ainsi bloquée dans sa conformation active et maintient la stimulation de l'AC.

Les sous-unités Gαs sont codées par GNAS, un gène localisé sur le chromosome 20 (Chr. 20q13) soumis à une empreinte parentale complexe qui donne lieu à plusieurs produits géniques en raison de la présence de différents promoteurs et mécanismes d'épissage alternatif (Figure 29) (Weinstein et al., 2004; Wettschureck and Offermanns, 2005). Le principal produit du gène GNAS, qui est généré par le promoteur le plus en aval (exon 1), est la sous-unité Gαs exprimée de manière ubiquiste (Weinstein et al., 2004). Un autre produit du gène GNAS, issu d'un promoteur en amont de celui de Gαs est la protéine neuroendocrine sécrétoire de 55 kDa (Nesp55) n'est pas apparentée à Gαs sur le plan structurel et fonctionnel. Le troisième transcrit de GNAS est l'isoforme GαsXL, spécifique aux tissus neuroendocrines (Hayward et al., 1998; Wettschureck and Offermanns, 2005; Xie et al., 2006). Contrairement à Nesp55, GαsXL est structurellement identique à Gαs, mais possède une très longue séquence N-terminale codée par un premier exon spécifique (Kehlenbach et al., 1994; Wettschureck and Offermanns, 2005). Nesp55 est uniquement exprimé à partir de l'allèle maternel, son promoteur étant méthylé au niveau des dinucléotides CpG sur l'allèle paternel. A l'inverse, GαsXL n'est exprimé que par l'allèle paternel, son promoteur étant méthylé sur l'allèle maternel (Figure 29).

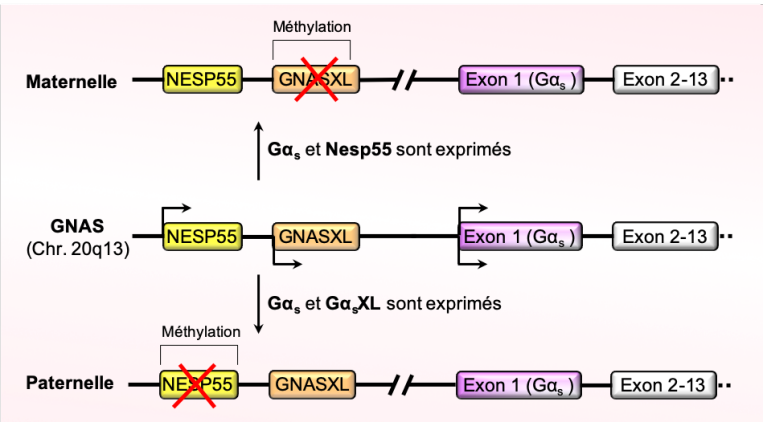


Figure 29. Représentation schématique du locus GNAS. Les transcrits de GNAS générés à partir des allèles maternel et paternel sont représentés en haut et en bas, respectivement. Les promoteurs actifs sur les exons codant pour Nesp55 (NESP), GαsXL (GNASXL) et Gαs (exon 1) sont indiqués par des flèches du côté où ils sont actifs. Ainsi, Nesp55 s'exprime uniquement à partir de l'allèle maternel alors que GαsXL s'exprime à partir de l'allèle paternel. Les régions méthylées sont indiquées au-dessus des promoteurs inactifs (croix rouge). Les exons pour les transcrits non codants ne sont pas représentés. **(**Adapté de Xie et al., 2006; Weinstein et al., 2004).

3.2. La famille Gαi/o

La première sous-unité Gα clonée était celle de la transducine Gαt, capable de moduler le niveau intracellulaire du guanosine monophosphate cyclique (GMPc). En février 1985, plusieurs auteurs ont publié le résultat du clonage de la transducine α à partir de d'ADNc de la rétine de boeuf, montrant des séquences très similaires mais non identiques entre les cellules de cônes et de bâtonnets (Lochrie et al., 1985; Medynski et al., 1985; Birnbaumer, 2007). Ces premières données montrant l'existence de deux isoformes rétiniennes Gαt1 et Gαt2, ont ensuite été complétées pour révéler que la famille Gαi/o est constituée en réalité de Gαt1, Gαt2, de deux isoformes du système nerveux central (SNC) de type GαoA et GαoB, de Gαi1, Gαi2, Gαi3 détectées dans la plupart des types cellulaires, ainsi que de Gαz dont l'expression est limitée à certains neurones et aux plaquettes (Ho and Wong, 1998; Wettschureck and Offermanns, 2005; Milligan and Kostenis, 2006). La famille Gαi/o de nature inhibitrice, et notamment Gαi1, Gαi2, Gαi3 classiquement couplées à de nombreux RCPGs inhibiteurs, est connue pour sa capacité à inhiber l'activité de l'AC (à l'inverse de Gαs) et diminuer la production d'AMPc à partir d'ATP. De nombreuses hormones et neurotransmetteurs essentiels, notamment l'adrénaline, l'acétylcholine, la dopamine ou la sérotonine *via* l'activation de leur RCPGs respectifs, l'adrénocepteur-α2, M2/M4-muscarinique, de la dopamine (D2, D3), de la sérotonine (5-HT1A), utilisent la voie Gαi/o pour des réponses physiologiques (Neves et al., 2002; Dorsam and Gutkind, 2007; Albarrán-Juárez et al., 2009; Ockenga et al., 2013). Les membres de cette famille ainsi que les sous-unités Gβγ issues de leurs activations sont capables de réguler

plusieurs effecteurs notamment les canaux calciques et potassiques (GαoA/B), certaines PLC et la phosphoinositide 3-kinase ou PI3K (Gβγ), ou la voie de transduction des MAPKs (*mitogen activated protein kinases*) (Wickman and Clapham, 1995; Clark et al., 2003; Wettschureck and Offermanns, 2005; Dorsam and Gutkind, 2007). La famille Gαi/o est sensible à la toxine pertussique (PTX) produite par *Bordetella pertussis*, qui catalyse la ribosylation de l'ADP de la sous-unité Gαi au niveau d'une cystéine (Cys^{352}) C-terminale et l'empêche de manière constitutive d'interagir avec le récepteur (Kaslow and Burns, 1992; Neves et al., 2002). Gαz est le seul membre de cette famille à être insensible à PTX mais reste cependant identique aux autres Gαi dans le couplage aux RCPGs et l'activation des effecteurs (Hsia et al., 1984; Birnbaumer, 2007; Mangmool and Kurose, 2011). La famille Gi/o est la famille de protéine Gα la plus grande et la plus diverse.

3.3. La famille Gαq/11

Cette famille est composée de Gαq, Gα11, Gα14 et Gα15/16. En 1990, des efforts de purification à partir de foie de boeuf ont abouti à l'identification et la caractérisation de Gαq/11 sous forme d'un polypeptide de 42 kDa (Taylor et al., 1990). La comparaison des séquences en acides aminés de Gαq et Gα11 obtenues d'ADNc de cerveau de souris avec les autres Gα identifiées à l'époque a permis à Strathmann et Simon de suggérer Gαq/11 comme une $3^{ème}$ famille de protéine G (Strathmann and Simon, 1990). Par hybridation à partir d'ARN purifié de divers tissus de souris, il a été montré que Gαq et Gα11 sont exprimées de manière ubiquiste, contrairement aux deux autres membres Gα14 et Gα15/16 de cette famille dont l'expression est plus restreinte (Wilkie et al., 1991; Milligan and Kostenis, 2006). En effet, Gα14 se trouve principalement dans le rein, le poumon ou le foie, et Gα15/16 est spécifiquement exprimée dans les cellules hématopoïétiques (Downes and Gautam, 1999; Wettschureck and Offermanns, 2005; Syrovatkina et al., 2016). Tous les membres de la famille Gαq sont capables d'activer les trois isoformes de la phospholipase Cβ (PLCβ1-3) (Smrcka et al., 1991; Wu et al., 1992) responsable de l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP2) membranaire en inositol triphosphate (IP3) et diacylglycerol (DAG) qui activent respectivement la libération de Ca^{2+} à partir des pools du réticulum endoplasmique (RE) et les protéines kinases C (PKC). Les membres de la famille Gαq sont toutes insensibles à la PTX mais des inhibiteurs ont pu être proposés plus récemment, bien qu'ils suscitent la controverse. Parmi ces inhibiteurs il y a BIM-46187, qui en particulier inhibe l'activation de Gαq en empêche les changements de conformation du complexe RCPG/Gα bloquant de l'échange GDP/GTP stimulé par l'agoniste (Ayoub et al., 2009). En plus d'inhiber ainsi la signalisation associée à la voie Gαq (comme la

libération de calcium), il a été démontré que BIM-46174 empêche également la signalisation des RCPGs médiée par d'autre sous-unité Gα, notamment la génération d'AMPc par Gαs ou le recrutement de Gαs ou Gαq dans la voie wnt-2/frizzled pour l'invasion tumorale (Prévost et al., 2006; Ayoub et al., 2009). L'absence de spécificité de BIM-46187 dans l'inhibition des sous-unités Gα le rend moins intéressant dans les études de fonctionnalité d'une protéine.

D'autres voies de signalisation activées par la famille Gαq ont été décrites. A titre d'exemple, le couplage Gαq au RCPG PAR-1 dont le ligand est la thrombine, peut activer le promoteur c-jun *via* le recrutement de différentes MAPK (JNK, *c-Jun N-terminal kinase*, MAPK p38, ERK5/6) (Marinissen et al., 2003) ou bien Gαq peut également être impliquée dans l'activation de ERK (van Biesen et al., 1996) et la régulation de la croissance cellulaire (LaMorte et al., 1993). Un lien évident entre les récepteurs couplés à Gαq et l'activation de Rho indépendamment des effets sur les PLCβs a aussi été décrit (Katoh et al., 1998; Vogt et al., 2003; Birnbaumer, 2007; Williams et al., 2007). De plus, la voie Gαq étant hautement conservée chez toutes les espèces (environ 82% d'identité entre *Caenorhabditis elegans* et l'Homme), Williams et al., ont démontré que les membres de la famille Gαq peuvent activés les Rho, notamment RhoA dans les cellules musculaires lisses *via* p63RhoGEF (qui contient un domaine d'échange de nucléotide guanine (GEF) spécifique de Rho) pilotant ainsi la locomotion, la ponte et la croissance chez *C elegans* (Williams et al., 2007; Syrovatkina et al., 2016). Aussi, en surexprimant Gαq et p63RhoGEF dans des cellules embryonnaire 293 du rein humain (HEK293), il a été proposé que l'activation de p63RhoGEF en interagissant directement avec Gαq, entrainerait l'activation de RhoA indépendamment de l'activation de la PLC, l'effecteur canonique de Gαq (Lutz et al., 2005). De plus, la surexpression de p63RhoGEF dans des cellules humaines de carcinome de vessie induirait l'activation de RhoA associée à la formation de fibres de stress à l'actine (Lutz et al., 2004).

Il faut noter que la sous-unité Gα15 semble être la seule sous-unité atypique et différente des autres de la famille Gαq, *i*) par sa faible similitude en acides aminés puisqu'elle possède environ 57% d'identité de séquence avec Gα11 et Gαq (Yu et al., 2008; Syrovatkina et al., 2016) *ii*) surtout parce qu'elle ne semble pas être associée à un type de récepteur (Offermanns and Simon, 1995; Su et al., 2009; Giannone et al., 2010). Les spécificités liées à la sous-unité Gα15 sont détaillées dans le chapitre 3.

3.4. La famille Gα12/13

La famille Gα12/13 regroupe les sous-unités Gα12 et Gα13 dont les séquences nucléotidiques complètes ont été rapportées en 1991 (Strathmann and Simon, 1991) montraient 67% d'identité de séquence en acides aminés entre elles et seulement 45% avec les autres sous-unités Gα, permettant de classer Gα12 et Gα13 en tant que la 4ème famille de sous-unités Gα (Strathmann and Simon, 1991; Milligan and Kostenis, 2006). Elles sont exprimées dans la plupart des types cellulaires (cerveau, rein, foie, poumon, cœur, muscle, rate, testicule, utérus, thymus) (Strathmann and Simon, 1991; Syrovatkina et al., 2016). Fautes d'inhibiteurs pharmacologiques spécifiques, les voies de signalisations relayées par Gα12 et Gα13 ne sont étudiées que depuis peu, grâce aux outils moléculaires tels que les ARN interférents. Des études biochimiques et structurelles chez les vertébrés ont clairement démontré que Gα12/13 sont les activateurs majeurs des Rho GTPases par leurs interactions directes avec le domaine régulateur de signalisation (RGS) de p115RhoGEF (Katoh et al., 1998; Wells et al., 2002; Aittaleb et al., 2010). Les sous-unités Gα12 et Gα13 sont actuellement bien connues pour leur rôle dans le remodelage du cytosquelette permettant notamment la formation des fibres de stress d'actine et de points focaux d'adhésion *via* la GTPase Rho (Buhl et al., 1995; Denis et al., 2012). Dans la lignée de fibroblastes Swiss 3T3, l'utilisation d'un mutant dominant négatif a démontré le rôle de la sous-unité Gα13 sur les fibres de stress *via* la transactivation du récepteur de *l'epidermal growth factor* (EGFR) (Gohla et al., 1998). Une autre fonction cellulaire importante de Gα12 et Gα13 est leur capacité à interagir avec le domaine cytoplasmique de certaines cadhérines (N-cadherine et E-cadherine), provoquant la libération de la β-caténine, qui régule négativement la capacité d'adhésion cellule-cellule de la E-cadhérine, induisant ainsi la migration des cellules de cancer du sein et de leucémie (Meigs et al., 2001; Meigs et al., 2002; Wettschureck and Offermanns, 2005). Il faut mentionner que certains récepteurs des chimiokines, et notamment le récepteur CXCR4 ou le récepteur UT de l'urotensine II (UII) peuvent coupler les protéines Gα12/Gα13 pour l'activation des voies Rho/ROCK (*Rho-associated protein kinase*) permettant la migration chimiotactique cellulaire (Bian et al., 2006; Tan et al., 2006; Lecointre et al., 2015).

4. Les sous-unités Gβ et Gγ des protéines G

Avant les années 1990, les sous-unités Gβγ étaient considérées comme des protéines G structurelles nécessaires à la localisation membranaire et à l'inactivation des sous-unités Gα, mais il est maintenant bien établi que les complexes Gβγ assurent au moins autant de fonctions que les sous-unités Gα (Clapham et Neer 1993 ; van Biesen et al., 1996). Les sous-unités Gβγ

régulent directement un ensemble de molécules effectrices, parmi lesquelles les PLCβs (Park et al., 1993), la phospholipase A2 (Jelsema and Axelrod, 1987), les AC (Federman et al., 1992), certaines PI3K (Stoyanov et al., 1995), les canaux Ca^{2+} (Herlitze et al., 1996), des canaux potassiques de type *gated-inward rectifying potassium* (Logothetis et al., 1987) ainsi que les kinases spécifiques des récepteurs β-adrénergiques appelées βARK ou les kinases spécifiques des récepteurs couplés aux protéines G (GRK), qui sont recrutées par βγ pour la désensibilisation des RCPGs par phosphorylation et internalisation (Pitcher et al., 1992; Shukla et al., 2011; Im, 2013). Le clonage du gène codant la sous-unité β de la transducine par Van der Voorn et Ploegh (1992) a permis de révéler qu'il code une protéine comportant des segments répétitifs maintenant reconnus comme étant le motif répété WD40 (décrit précédemment), que l'on retrouve également dans d'autres protéines dont la localisation et les fonctions sont différentes, notamment la coronine (composant du cytosquelette d'actine), CDC4 (*cell division control protein 4*), Ssn6 (protéine de répétition tétratricopeptidique (TPR)) et TUP1 (répresseur général de la transcription chez la levure) sont nucléaires (van der Voorn and Ploegh, 1992; Birnbaumer, 2007). Finalement, le nombre de sous-unités Gβ connu à l'heure actuelle se compte au nombre de 5, les Gβ1 à Gβ5 codées par les gènes GNB1 à GNB5, respectivement (Tableau 2, Figure 30A). Les sous-unités Gβ1, Gβ2, Gβ3 et Gβ4 présentent une forte identité de séquence entres elles (entre 80 et 90%), et leur expression est considérée comme ubiquiste. En revanche, la sous-unité Gβ5 ne montre que 50 % d'identité environ avec les autres sous-unités β, et se trouve principalement exprimée dans le cerveau (Birnbaumer, 2007; Syrovatkina et al., 2016). En effet, l'analyse phylogénétique des sous-unités Gβ montre qu'elles ont très tôt divergé d'un ancêtre commun en deux superfamilles qui donna ensuite d'une part, la famille composée des sous-types Gβ1 à Gβ4 et d'autre part, celle composée de la sous-unité Gβ5 (Figure 30A) (Khan et al., 2013).

Au même titre que les sous-unités Gα et Gβ, la première sous-unité Gγ clonée est celle de la transducine (Hurley et al., 1984; Yatsunami et al., 1985). Finalement, 12 gènes GNG1 à GNG12 codant les sous-unités Gγ (Gγ1 à Gγ12) ont été identifiés chez les mammifères. Composées entre 68 et 75 acides aminés, ces sous-unités Gγ, contrairement aux sous-unités Gβ, partagent entre 20% et 80% d'identité de séquences (Figure 30B) (Syrovatkina et al., 2016). Au cours de l'évolution, ces sous-unités Gγ ont divergé en cinq classes : classe I (Gγ7 et Gγ12), classe II (Gγ2, Gγ3, Gγ4 et Gγ8), classe III (Gγ5 et Gγ10); classe IV (Gγ1, Gγ9 et Gγ11) et classe V (Gγ13) (Khan et al., 2013).

Les sous-unités Gγ forment des complexes permanents et obligatoires avec les sous-unités Gβ et confèrent une diversité structurelle et fonctionnelle qui n'est pas pleinement étudiée et

comprise. Les dimères Gβγ purifiés constitués de différentes combinaisons d'isoformes Gβ et Gγ présentent généralement des activités biologiques similaires telles que l'activation des PKD *via* PLCβ2/3 (Lau et al., 2013a), la stimulation de l'AC (longtemps réservée pour Gα uniquement) pour produire l'AMPc responsable de l'activation du PKA (Melien, 2007) ou l'activation de Akt *via* PI3K induit par les RCPGs (Hino et al., 2005).

Gène	Position cytogénétique	Protéine	MW (kDa)	Expression	Effecteurs
GNB1	1p36.2	β1	37,37	Largement exprimé, bâtonnets	AC type I (-) AC types II, IV, VII (+) PLCβ (β3> β2> β1) (+) GIRK1–4 (Kir3.1–3.4) (+) PI3K (+) VDCC de type T (+) VDCC de type N, P/Q, R (-) p114-RhoGEF (+)
GNB2	7q21.1-q21.2	β2	37,33	Largement exprimé	
GNB3	12p13	β3	37,22	Largement exprimé, cônes	
GNB4	3q26-q27	β4	37,56	Largement exprimé	
GNB5	15q21	β5	43,56	Cerveau	
GNGT1	7q21.3	γ1	8,49	Bâtonnets, Cerveau	
GNGT2	17q21	γ14, γcone	7,74	Cônes, Cerveau	
GNG2	14q21-q22	γ2, γ6	7,85	Largement exprimé	
GNG3	11p11	γ3	8,3	Cerveau, cellules sanguines	
GNG4	1q43-q44	γ4	8,39	Cerveau, autres tissues	
GNG5	1p22	γ5	7,32	Largement exprimé	
GNG7	19p13.3	γ7	7,52	Largement exprimé	
GNG8	19q13.2-q13.3	γ8, γ9	7,84	Épithélium olfactif / voméronasal	
GNG10	9q31-q32	γ10	7,2	Largement exprimé	
GNG11	7q21.3	γ11	8,48	Largement exprimé	
GNG12	1p31-p33	γ12	8	Largement exprimé	
GNG13	16p13.3	γ13	7,94	Cerveau, papilles gustatives	

Tableau 2. Les différentes sous-unités Gβ et Gγ et leurs fonctions. AC : Adénylyl-cyclase ; PLCβ : phospholipase C-β ; GIRK1-4 : *G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channels 1-4* ; PI3K : Phosphoinositide 3-kinase ; VDCC : Canal calcique dépendant du voltage. RhoGEF : *Rho-guanine*

nucleotide exchange factor. (+) indique une stimulation, (-) représente l'inhibition. (D'après Wettschureck et Offermanns 2005; Milligan et Kostenis 2006; Hurowitz et al., 2000).

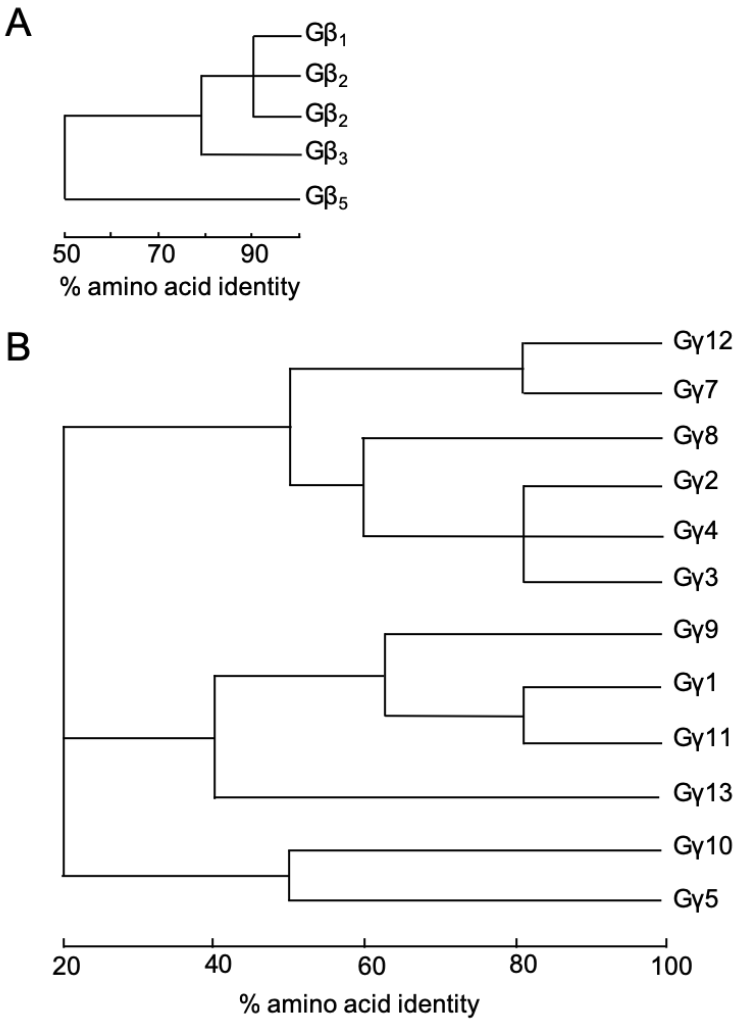


Figure 30. Relation phylogénétique des sous-unités Gβ et Gγ chez l'Homme. (**A**) Les protéines Gβ1 à Gβ4 présentent entre 80 et 80% d'homologie alors que Gβ5 ne montre que 50 % de similarité environ avec les autres Gβ. (**B**) Contrairement aux sous-unités Gβ, les sous-unités Gγ partagent entre 20% et 80% d'homologie de séquence et ont divergé en cinq classes au cours de l'évolution : classe I (Gγ7 et Gγ12), classe II (Gγ2, Gγ3, Gγ4 et Gγ8), classe III (Gγ5 et Gγ10); classe IV (Gγ1, Gγ9 et Gγ11) et classe V (Gγ13) (D'après Syrovatkina et al., 2016).

5. Principe de la signalisation des protéines G hétérotrimériques

Les RCPGs partagent la capacité de s'associer aux protéines G hétérotrimériques, et il était précédemment supposé que ce complexe diffuse librement pour entrer en contact uniquement avec des RCPGs activés. Plus récemment de nombreuses études *in vitro* et *in cellulo* ont permis de montrer que les RCPGs pouvaient être précouplés aux protéines Gαβγ.

En effet, la liaison aux récepteurs activés provoque l'éloignement de l'hélice α5 de la protéine Gα par rapport à la boucle β6-α5, ce qui favoriserait un changement conformationel conduisant à l'échange de nucléotides au niveau de la sous-unité Gα et la dissociation de

l'hétérodimère Gβγ de Gα-GTP (Oldham and Hamm, 2006). Ainsi, la transduction du signal s'effectue par Gα-GTP et/ou Gβγ. La durée de vie du complexe Gα-GTP est limitée par l'activité intrinsèque de la GTPase qui hydrolyse le GTP en GDP ramenant ainsi la sous-unité Gα-GTP à l'état inactif où elle est liée au GDP et peut à nouveau s'associer au dimère Gβγ (Neer, 1995; Wang et al., 2002). Ce mécanisme entraîne ainsi la terminaison de la signalisation.

5.1. Le couplage des protéines G aux récepteurs

Parce qu'il catalyse l'échange du GDP en GTP, un RCPG est donc considéré comme un facteur d'échange du nucléotide guanine ou *guanine nucleotide-exchange factor* (GEF) (Rosenbaum et al., 2009). Avec environ 850 RCPGs jouant le rôle de GEF, et des dizaines d'effecteurs de protéines G, la voie de signalisation des protéines G est diverse et complexe, (Temple et al., 2010). Tous les RCPGs connus n'interagissent en effet pas forcément avec les mêmes protéines G (Figure 31A) : pendant que certains RCPGs peuvent être couplés à la même protéine Gα, comme le β1AR et le récepteur 5-HT_6 qui couplent préférentiellement Gαs (Frielle et al., 1987; Ruat et al., 1993; Flock et al., 2017), d'autres RCPGs peuvent être couplés à plusieurs protéines Gα, tel l'exemple du récepteur β2 adrénergique (β2AR) qui est principalement couplé aux protéines Gαs mais peut également lier Gαi (Li et al., 2004). En effet, les antagonistes sélectifs de Gαi (NF 023) et Gαs (NF 449) ainsi que l'inhibiteur de l'AC (SQ 22536) bloquent la relaxation des cellules musculaires lisses de rat, induite par le procaterol, un agoniste du β2AR (Li et al., 2004). D'autres études ont confirmé ces données suggérant que le couplage de β2AR avec Gαi et Gαs est en réalité dépendant du ligands spécifique du β2AR et du mode de couplage aux protéines G (Wenzel-Seifert and Seifert, 2000; Van Eps et al., 2018).

Dans ce contexte, Satagopam et al., (Satagopam et al., 2010) ont établi une distribution des sous-familles de RCPG en fonction du nombre de familles Gα avec lesquelles ils interagissent (Figure 31B). Leurs travaux ont permis de montrer que seule la famille TSHR (*thyroid-stimulating hormone receptor*) de classe A Rhodopsine des RCPGs couple les membres des quatre familles Gα (tous les membres de la famille Gαq ; les Gαi, Gαo, Gαz, Gα12/13). La majorité des RCPGs couple des membres d'une seule sous-famille Gα (623 des 708 RCPGs). Seulement une quinzaine de sous-familles de RCPG sont capables d'interagir avec des membres de 3 familles Gα, alors que 48 RCPGs couplent des membres de 2 familles Gα. Certes les sous-familles de RCPG et protéines G exactes (Figure 31B) n'ont pas été précisé, ces travaux confirment et mettent en évidence les nombreuses interactions possibles entre différents RCPGs et différentes protéines G complexifiant la signalisation intracellulaire. Ainsi, selon le type de

couplage, des réponses biologiques différentes peuvent être observées, et l'interface entre protéines G-RCPG est responsable de la spécificité d'interaction. En effet, pour chacun des couples protéines G-RCPG, il existe plusieurs sites d'interaction des protéines G avec les récepteurs mais un des mieux caractérisé est l'extrémité C-terminale de la sous-unité Gα comme précédemment évoqué. Aussi, le remplacement de cinq résidus dans la boucle α3-β5 de Gαs par des acides aminés homologues de Gαi2, entraîne la diminution de l'affinité de liaison du GTP induite par le récepteur β2AR tandis que l'affinité pour le récepteur augmente (Grishina and Berlot, 2000). L'hélice αN interagit également avec le récepteur (Oldham and Hamm, 2008).

Deux théories ont été proposées pour expliquer le couplage des protéines G aux RCPGs. Selon la première, l'interaction entre ces deux protéines s'exerce selon un mode collisionnel et par diffusion latérale des protéines G au niveau de la membrane plasmique (couplage collosionnel) où les protéines G n'interagissent qu'avec des récepteurs activés (Gilman, 1987). Cependant, l'observation de complexes RCPG/protéines G (Galés et al., 2005) avant l'activation du récepteur, ainsi que l'activation rapide (de l'ordre de la milliseconde) des protéines G suite à la stimulation d'un RCPG (Hille, 1992) ont fait émerger la seconde hypothèse selon laquelle il existerait un pré-couplage entre les RCPGs et les protéines G. De nombreuses observations ont confirmé cette hypothèse, *i.e. i*) la protéine Gαt peut être associée aussi bien à la rhodopsine activée qu'inactivée (Jastrzebska et al., 2010), *ii*) il est possible d'isoler des complexes récepteur/protéines G en l'absence de stimulation par un agoniste (Nanoff and Stiles, 1993), *iii*) la majorité des sites de contact entre le récepteur M3 muscarinique et Gαs sont détectables aussi bien à l'état actif qu'inactif et *iv*) les sous-unités Gαs et Gβγ sont toujours associées au β2AR indépendamment de son état d'activation (Lachance et al., 1999).

Dans une analyse récente (Flock et al., 2017), des données existantes sur le couplage des protéines G a mis en évidence la complexité de la sélectivité du couplage dans le système de signalisation RCPG-protéine G où un important nombre de récepteurs couple différentes protéines G (Figure 31 C ; Figure 32). A partir de 394 RCPGs classés structurellement en 6 classes (A à F) : Rhodopsine (A), Sécrétine (B), Métabotropique glutamate (C), Fungal pheromone (D), AMPc (E) et *Frizzled smoothened* (F), chaque classe se composant de familles identifiées grâce au guide IUPHAR/BPS (*International Union of Basic and Clinical Pharmacology/British Pharmacological*) de la base de données pharmacologique, les auteurs ont établi les propriétés et caractéristiques de couplage des différentes familles de protéines G

à plusieurs classes de RCPG comme illustré sur la Figure 32. Ainsi, leurs résultats montrent effectivement que les différentes classes et familles de RCPG présentent des préférences de couplage à certaines protéines G. A titre d'exemple, pendant que les 18 RCPGs étudiés de la famille des chimiokines sont tous couplés à la famille Gαi/o, la famille des RCPGs orphelins dans la classe A de IUPHAR peut être couplée à au moins familles de protéines G (au nombre de 5 RCPGs pour Gαs, 7 pour Gαi/o et Gαq/11) ainsi qu'à des combinaisons (au nombre d'un RCPG pour Gαs+Gαi/o et Gαs+Gαi/o+ Gαq/11+Gα12/13 et 2 pour Gαi/o+Gαq/11) (Figure 32A). Dans chaque classe, le nombre total de RCPG avec différentes propriétés de couplage avec les familles de protéines G sont aussi précisés (Figure 32A), mettant en évidence la variation ainsi que la complexité des couplages protéines G-RCPG.

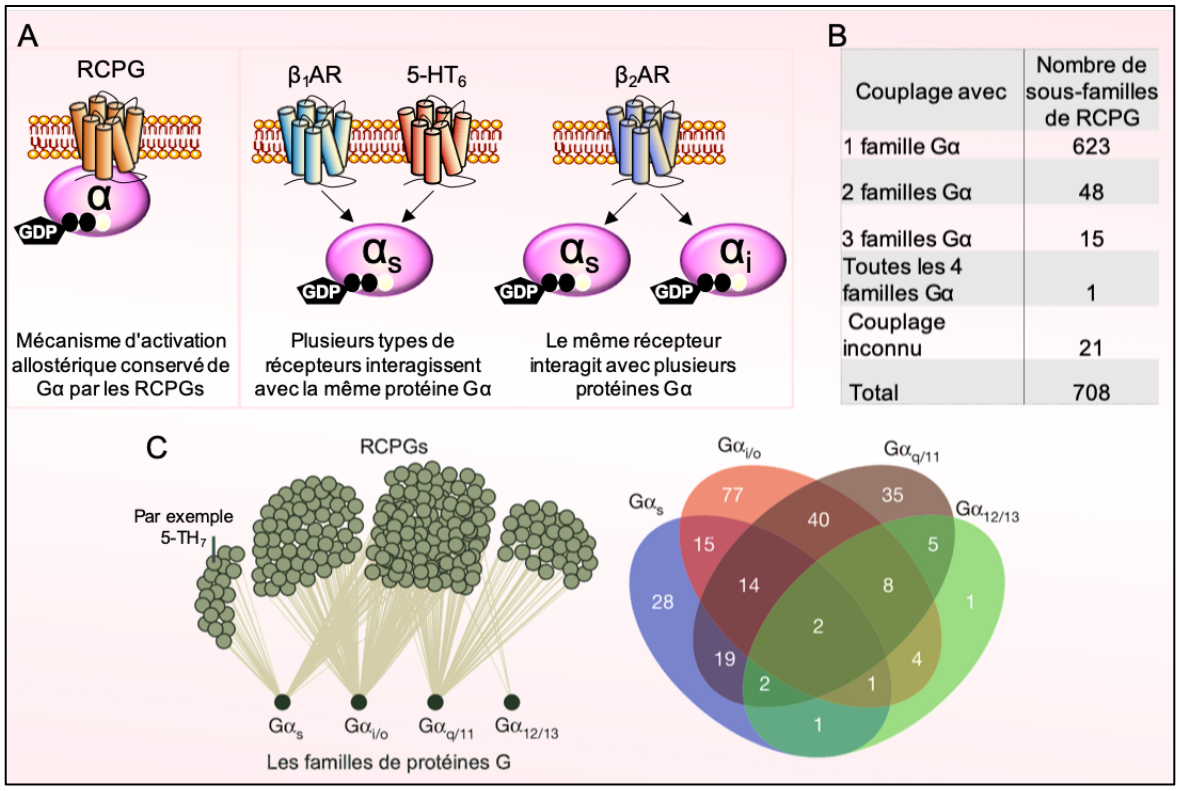


Figure 31. Sélectivité de la signalisation protéine G-RCPG. **A.** La même protéine G peut être activée par différents récepteurs et le même récepteur peut être couplé à différentes protéines G. **B.** Distribution des sous-familles de RCPG (d'après Satagopam et al., 2010) en fonction du nombre de familles Gα avec lesquelles ils interagissent. **C.** Représentation en réseau des données de couplage actuellement disponibles des protéines G avec les RCPGs de classe A (C, gauche) ainsi que le nombre de récepteurs (toutes les classes de RCPG) couplés à différentes protéines G (C, droite). (D'après Flock et al., 2017).

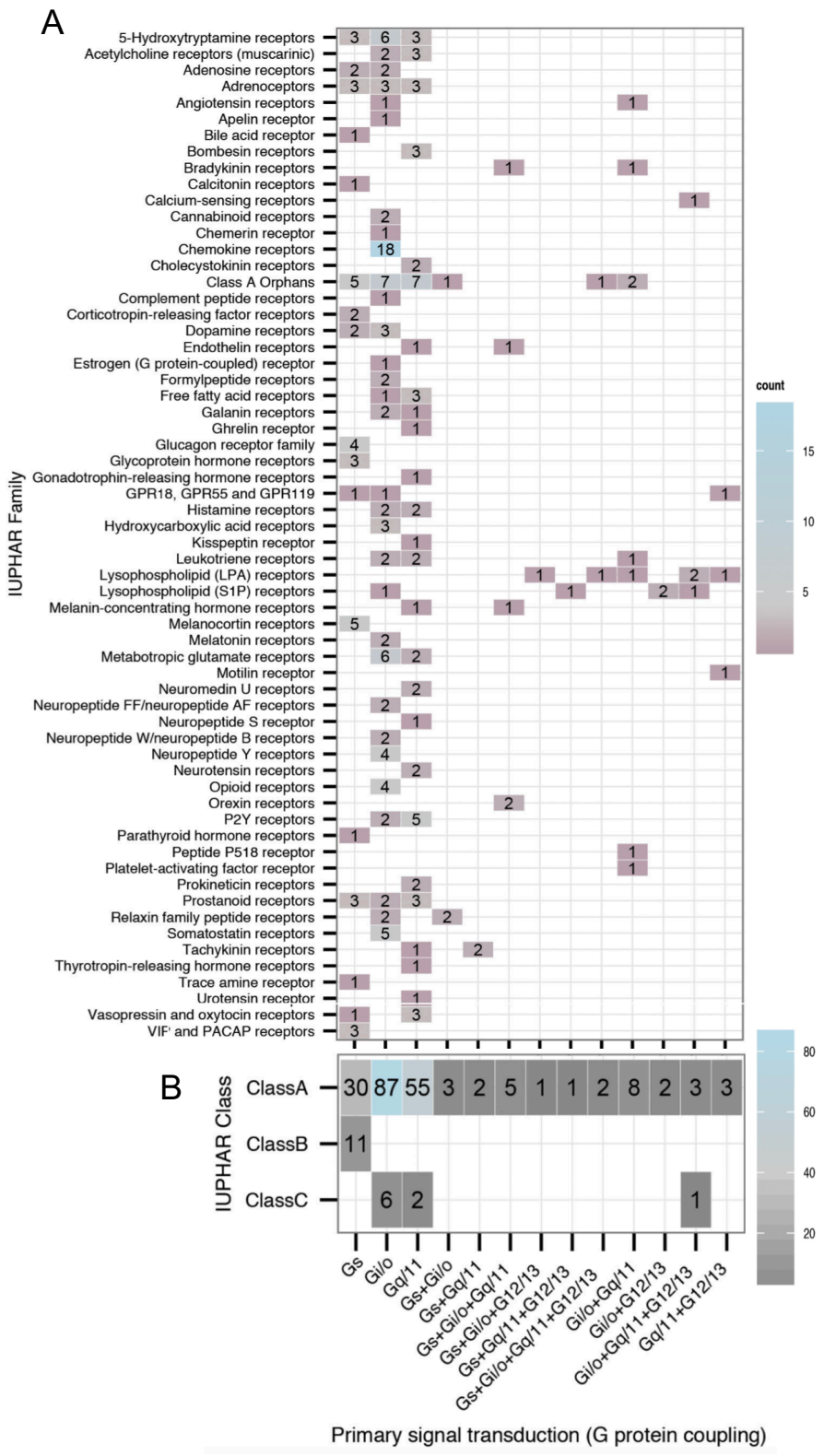


Figure 32. Propriétés de couplage des protéines G aux RCPGs. A. Nombre de RCPG couplés aux différentes protéines G ou combinaison de protéines G, pour chaque famille de RCPG selon le guide IUPHAR/BPS de la base de données pharmacologique (GtoPdb). **B.** Nombre total de RCPG dans les 3 classes A, B, C de la base de données pharmacologique ayant des couplages avec différentes protéines G ou combinaisons de protéines G. Le nombre de RCPGs dans chaque classe ou famille indique le nombre de protéines G ou combinaison de protéines G auxquelles ils peuvent être couplés. (D'après Flock et al., 2017).

En utilisant la méthode STAR (*Structure, Transparent, Accessible Reporting*) récemment introduite et utilisée dans toutes les revues de sciences de la vie de Cell Press, Inoue et ses collègues ont récemment quantifié les interactions entre 148 RCPGs et les extrémités C-terminales des différentes famille de sous-unités Gα (Inoue et al., 2019). Ils ont mis en évidence les résidus d'intérêt des RCPGs impliqués dans la sélectivité du couplage avec les protéines G. Parmi les différentes structures de la protéine Gα, 8 se sont avérés déterminantes pour le couplage aux RCPGs : la partie N-terminale de la sous-unité, les hélices α2, α4 et α6 et les boucles α2-β4, α4-β6, α3-β5, αN-β1 du domaine GTPase. Les extrémités N et C-terminales, les boucles α4-β6 et αN-β1 semblent participer à la spécificité d'interaction entre les protéines G et les RCPG (Moreira, 2014). Du point de vue du RCPG, en fonction de la longueur ainsi que de la charge électrostatique des acides aminés composant les domaines ICL3 et l'extrémité C-terminale du RCPG, ils ont établi une signature des couplages significatifs avec les quatre familles de protéines G (Figure 33 A, B). On peut ainsi remarquer que la sélectivité du couplage de la famille Gα12/13 est surtout dépendante de la composition du domaine ICL3 et du domaine C-terminal du RCPG (Figure 33 B, D), alors que la caractéristique majeure contribuant au couplage avec les familles Gαi/o et Gαs est surtout l'extrémité C-terminale du RCPG. En effet, les caractéristiques déterminantes du couplage sont significativement plus abondantes du côté des interfaces cytosoliques du récepteur (Figure 33 C, D), notamment aux interfaces connues de liaison aux protéines G (comme les hélices TM3, TM5, TM6 et la boucle intracellulaire ICL3) (Venkatakrishnan et al., 2016; Inoue et al., 2019). Pour exemple, l'étude du complexe formé par le M3R et Gαq a montré que *i*) la sous-unité Gαq interagit avec plusieurs sites de l'hélice α8 du M3R notamment *via* des résidus de la boucle α4-β6 et l'extrémité C-terminale, *ii*) Gαq se lie avec au moins 3 résidus de la boucle cytoplasmique du TM6 de M3R et *iii*) le résidu arginine de l'hélice αN de Gαq est en contact avec ICL2 de M3R (J Hu et al., 2010). Dans le cas du récepteur β2AR couplé au complexe Gαsβ1γ2, la structure cristallographique montre que seules les parties N- et C-terminales et l'hélice α4 de Gαs interagissent avec le récepteur (Rasmussen et al., 2011). Il apparaît que la partie C-terminale s'insère au cœur de la cavité cytoplasique (formée par l'activation du RCPG) constituée des TM3, TM5, TM6, et TM7 (Janz and Farrens, 2004; Scheerer et al., 2008; Rasmussen et al., 2011). D'autres études ont également démontré que le motif E/DRY dans la boucle ICL2 est impliqué dans une interaction directe avec les sous-unités Gα (Scheerer et al., 2008; Choe et al., 2011) ce qui corrobore les mécanismes d'activation et la théorie du verrou ionique observé pour les RCPGs.

Ainsi, plusieurs autres caractéristiques se trouvent dans des régions extérieures aux 7 TM, en particulier les régions ICL3 ou C-terminales (Figure 33 B, C, D), qui ne sont généralement pas visibles dans les structures expérimentales, à l'exception de ICL3 dans certains complexes formés avec Gαi/o, mais qui jouent néanmoins un rôle crucial dans la signalisation (Venkatakrishnan et al., 2014). Aussi, il existe plutôt une contribution égale des positions à l'intérieur ou l'extérieur des 7 TM du RCPG pour toutes les familles de protéines G, avec une plus grande prévalence des positions à l'extérieur pour la famille Gα12/13 (Figure 33 C, D).

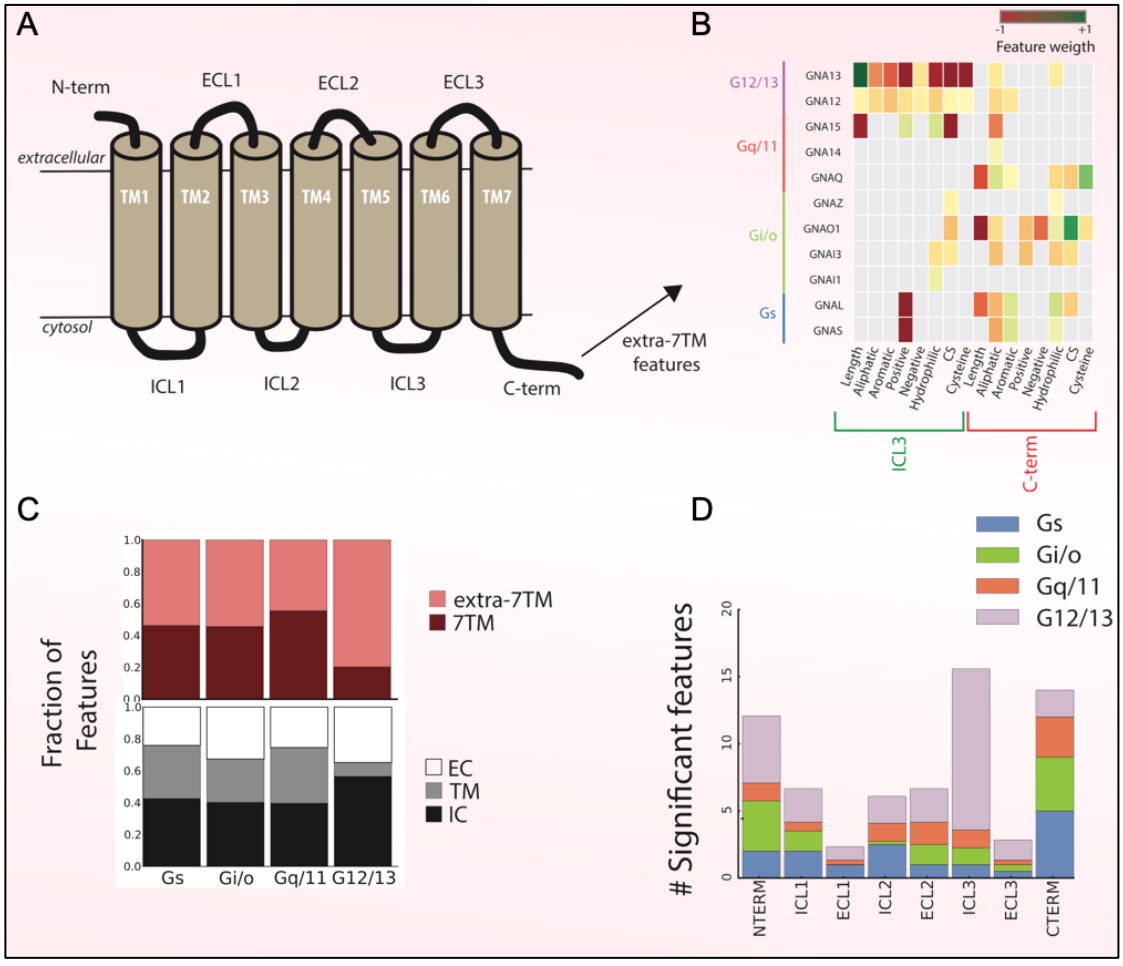


Figure 33. Résidus clés des RCPGs impliqués dans la sélectivité du couplage aux protéines G. A. Schéma du RCPG indiquant les régions contribuant aux caractéristiques. ICL : boucle intracellulaire ; ECL : boucle extracellulaire ; TM : hélice transmembranaire. **B.** L'influence des résidus extra-7TM, notamment les domaines ICL3 et C-terminus incluant la longueur et la composition en acides aminés sur le poids du couplage de 11 protéines G. Chaque cellule est colorée sur la base du coefficient donnée dans la fonction de décision du groupe de couplage correspondant (le poids), les valeurs négatives et positives étant colorées en rouge et en vert, respectivement. **C.** Analyse fonctionnelle des résidus liés à la sélectivité de couplage RCPG-protéine G. La figure du haut correspond à la distribution des fractions extra et intra-7TM du RCPG, caractéristiques du couplage. La fraction des 7TM ne comprend que le domaine hélicoïdal au sein des 7TM alors que l'extra-7TM inclut les extrémités N- et C-terminales et les boucles extracellulaires et intracellulaires (ECL et ICL) des récepteurs. Sur la figure en bas est indiquée la distribution des fractions caractéristiques du couplage dans la zone transmembranaire, incluant le domaine extracellulaire (EC), transmembranaire TM et intracellulaire (IC). **D.** Répartition

significativement des fractions du RCPG caractéristiques du couplage en dehors de la zone des 7TM. (D'après Inoue et al., 2019).

En plus des nombreux déterminants structurels sur Gα, l'un des déterminants moins célèbres de la spécificité du couplage aux RCPGs est la sous-unité Gβγ. Une précédente étude avait par exemple démontré que la composition du dimère Gβγ orientait l'interaction et la signalisation des récepteurs β1AR et A2a de l'adénosine (A2aR). En effet, l'efficacité du dimère Gβ4γ2 peut être plus élevée que celle du dimère Gβ5γ2 pour coupler Gαs aux deux mêmes RCPGs. Aussi, la capacité de couplage au récepteur β1AR de Gβ1γ2 peut être similaire à celle du dimère Gβ4γ2, alors que le couplage au récepteur A2aR peut étonnamment être 20 fois plus élevée que celui de Gβ4γ2 (McIntire et al., 2001; Oldham and Hamm, 2008). De plus, les complexes Gβ1-4γ2 seraient capables de stimuler l'AC2 de manière similaire et les mêmes complexes pourraient entraîner l'inhibition de l'AC1, alors que le complexe Gβ5γ2 n'aurait quant à lui aucun effet. Aussi, dans un même complexe hétérotrimérique, la sous-unité Gγ à elle-seule pourrait influencer l'interaction et la spécificité de la signalisation des RCPGs particulièrement grâce à sa partie C-terminale (Azpiazu et al., 1999; Hou et al., 2000; Jian et al., 2001; Oldham and Hamm, 2006). L'ensemble de ces données suggèrent fortement que l'isoforme des sous-unités dans le dimère Gβγ peut déterminer la spécificité de la signalisation au niveau des récepteurs et des effecteurs.

En résumé, bien que la sous-unité Gα ait été la mieux caractérisée dans le couplage aux RCPGs avec l'implication de ses nombreuses régions moléculaires, Gβγ apporte aussi une contribution majeure dans la spécificité de l'interaction complexe entre protéine G et RCPG. La diversité des sous-unités de protéine G offre donc plusieurs possibilités de combinaison complexifiant ainsi les réponses biologiques associées aux RCPGs, un domaine de recherche encore peu exploré.

5.1.1. Les mécanismes d'activation des protéines G

Deux modèles différents ont été suggérés pour expliquer le couplage des protéines aux RCPGs : le «couplage par collision» et «l'échafaudage physique» (Galés and Bouvier, 2007; Moreira, 2014). Le premier modèle suppose que les interactions se produisent par couplage de collision et diffusion libre dans la membrane plasmique avec des interactions seulement entre les protéines G et les récepteurs activés (Gilman, 1987; Oldham and Hamm, 2008). Néanmoins le modèle par collision ne permet pas d'expliquer les temps de réponse très rapides suite à une stimulation extérieure. D'autre études ont plutôt suggéré que des complexes RCPGs/protéines

G, des complexes protéines G ou les deux pourraient persister pendant le processus d'activation (Klein et al., 2000). C'est cette observation qui a conduit à l'hypothèse de « l'échafaudage physique » suggérant un pré-assemblage des protéines G et du RCPG avant l'activation, formant un complexe stable au cours des premières étapes de l'activation (Moreira, 2014). Beaucoup d'étude récentes en faveur de cette hypothèse de pré-couplage proviennent d'études de BRET et/ou de FRET (*Bioluminescence/Fluorescence Resonance Energy Transfer*) utilisant des récepteurs et des protéines G étiquetées par des fluorophores donneurs et accepteurs pour étudier ces interactions *in vivo* (Galés and Bouvier, 2007; Oldham and Hamm, 2008). Grâce à ces méthodes, pour la première fois l'interaction et les mouvements entre un RCPG et les protéines G en temps réel dans des cellules vivantes ont été mesurés par étiquetage du RCPG β2AR et des sous-unités Gαi1, Gβ1, Gγ2 (Galés et al., 2005). En effet, Galés et Bouvier ont démontré que l'activation du RCPG entraîne une augmentation du signal BRET, suggérant un rapprochement entre le RCPG et la protéine G compatible avec le modèle collisionnel (Galés and Bouvier, 2007). Toutefois, le signal BRET basal spécifique était toujours détectable et n'excluait pas la possibilité que l'augmentation du BRET reflète un réarrangement moléculaire local au sein d'un complexe RCPG-protéine G. Par ailleurs, la stabilité du signal durant les premières minutes d'activation est difficilement conciliable avec le modèle par collision qui ne permet pas d'expliquer les temps de réponse très rapides suite à la stimulation du RCPG. Bien que beaucoup d'étude *in vitro* soutiennent maintenant le modèle conformationnel, compatible avec la spécificité du couplage récepteur-protéine G et la réponse intracellulaire rapide, ce modèle de pré-couplage ne suffit pas pour expliquer toutes les possibilités d'activation notamment dans le cas où le RCPG est capable d'utiliser différentes protéines G pour différentes voies de signalisation (Hill and Baker, 2003; Oldham and Hamm, 2008). Par exemple, le cas de la signalisation des récepteurs β2AR dans l'activation de la voie MAP Kinase, peut impliquer un switch dans le couplage du récepteur de la protéine Gαs à la protéine Gαi (Daaka et al., 1997; Hill and Baker, 2003). En effet, Daaka et al., ont démontré que la stimulation de β2AR entraîne dans un premier temps, l'activation de Gαs conduisant à l'activation de PKA. La PKA en phosphorylant en retour le β2AR au niveau de son ICL3 et de son extrémité C-terminale, provoque d'une part, une atténuation du couplage β2AR-Gαs et facilite d'autre part, le couplage β2AR-Gαi qui conduit à son tour à l'activation de la voie MAP kinase (ERK1) (Daaka et al., 1997; Hill and Baker, 2003). Aussi, par des expériences de BRET, il a été démontré que le récepteur de la thrombine PAR1, connu pour utiliser les voies signalisation de Gαi, Gαq et Gα12 (Ghil et al., 2014) est pré-couplé à Gαi1 mais pas à Gα12 (Ayoub et al., 2010). Ayoub et al., ont prouvé que l'activation PAR1 induit rapidement une

activation transitoire de Gαi1 (t1/2 = 4,13 s) et un recrutement tardif et stable de Gα12 (t1/2 = 8,8 min). De manière intéressante, l'évaluation par BRET de la capacité de recrutement de Gα12 par d'autres RCPGs (5-HT_{2C}, $V_{1A}R$ et M1) a montré que le signal basal mesuré entre ces récepteurs et Gα12 était élevé par rapport à celui observé avec le récepteur PAR1, soutenant ainsi l'existence de complexes préassemblés entre ces récepteurs et Gα12, contrairement à PAR1 dont le recrutement de Gα12 s'effectue sur un temps plus long (Ayoub et al., 2010). Ces travaux confirment non seulement les deux modèles de couplage mais suggèrent aussi que différents modes de couplage peuvent s'opérer selon le type de RCPG et de protéine G.

Il est finalement possible que ces modèles cohabitent dans des événements dynamiques. Globalement, les protéines Gαβγ seraient à l'état basal sous forme libre ou pré-complexée aux RCPGs, et leurs activations résulteraient d'un recrutement ou d'un réarrangement structural de ce complexe. D'un point de vue conceptuel, l'existence d'un tel complexe pourrait permettre une modulation spatio-temporelle sélective des effecteurs régulés par les couples RCPGs/protéines G donnés et la concentration en ligand disponible (Galés and Bouvier, 2007; Ayoub et al., 2010; Civciristov et al., 2018).

5.1.1. Cycle des protéines G

La fonction de commutation des protéines G dépend de la capacité de la sous-unité Gα à effectuer le cycle entre une conformation inactive liée au GDP interagissant avec un récepteur activé, et une conformation active liée au GTP pouvant moduler l'activité des protéines effectrices en aval, comme une variété d'enzymes et de canaux ioniques (Oldham and Hamm, 2006; Oldham and Hamm, 2008). Les stimuli extracellulaires tels que hormones, neurotransmetteurs, chimiokines, lumière et odeurs peuvent activer les récepteurs, entraîner un changement conformationnel qui permet la liaison de la protéine G et catalyser la libération du GDP par Gα, entraînant ainsi la formation d'un complexe stable de haute affinité entre le récepteur activé et la protéine G. La liaison du GTP au Gα déstabilise ce complexe, ce qui conduit à un réarrangement structurel du Gα-GTP, du dimère Gβγ et du récepteur. Les deux protéines Gα-GTP et Gβγ interagissent ensuite avec les protéines effectrices en aval, propageant et amplifiant le signal intracellulaire. Le système est désactivé par l'activité GTPasique intrinsèque à Gα, améliorée par les régulateurs de la signalisation des protéines, les protéines RGS. Cette activité enzymatique permet d'hydrolyser le GTP de Gα-GTP en GDP terminant la réponse cellulaire et Gα se réassociant au dimère Gβγ, complétant ainsi le cycle d'activation (Figure 34A). L'hétérotrimère résultant peut ensuite entrer dans un nouveau cycle si de

nouveaux récepteurs activés sont présents (Wettschureck and Offermanns, 2005). Cependant, il est décrit que l'activité GTPasique des protéines G *in vitro* est inférieure à celle observée dans des conditions physiologiques, suggérant l'existence de mécanismes qui accélèrent l'activité de la GTPase. Divers effecteurs renforçant l'activité GTPasique de la sous-unité Gα ont été décrits, notamment les RGS, qui agissent comme des protéines activant les GTPases (GAP, *GTPase-activating protein*) contribuant ainsi à la désactivation et permettent une modulation rapide de la protéine G régulant la durée et la cinétique de la signalisation (Tinker, 2006; Aittaleb et al., 2010).

5.1.1.1. Relargage du GDP de la sous-unité Gα

Le récepteur une fois activé, agit comme catalyseur de la réaction d'échange de GDP par du GTP au niveau de la sous-unité Gα. Lors de cette dissociation du GDP de la sous-unité G, un complexe de haute affinité est formé entre le récepteur et la protéine G et jusqu'à ce que le GTP se lie à sous-unité Gα. Les modèles courants montrent que la poche de liaison du GDP au sein de Gα est à une distance d'environ 30Å du site de contact du récepteur le plus proche (Ciarkowski et al., 2005; Van Eps et al., 2006). Par conséquent, le récepteur doit induire un changement de conformation dans la protéine G pour provoquer la libération du GDP (Oldham and Hamm, 2008). Deux modèles ont été proposés pour expliquer la manière dont le récepteur modifie l'orientation relative des sous-unités Gα et Gβγ et provoque la libération du GDP de la sous-unité Gα. Dans le premier modèle appelé *lever arm model*, le récepteur utilise l'hélice N-terminale de Gα comme levier pour éloigner la sous-unité Gα de Gβγ. Cela entraîne le décalage des boucles Switch I et Switch II de Gα, loin de la poche de liaison aux nucléotides permettant ainsi la libération du GDP (Iiri et al., 1998). Cette hypothèse a été soutenue dans une étude où le raccourcissement de l'extrémité C-terminale de l'hélice αN, par délétion de quatre acides aminés pour mimer l'orientation supposée induite par le récepteur, permet à Gβγ d'agir comme un facteur d'échange (GEF) pour Gαs (Rondard et al., 2001). Le deuxième modèle appelé *gear-shift*, propose plutôt que le récepteur utilise l'hélice αN pour forcer Gβγ à se rapprocher de Gα, permettant ainsi à l'extrémité N-terminale de Gγ de s'engager avec le domaine hélicoïdal de Gα. Cette interaction provoque l'ouverture de l'écart inter-domaine entre le domaine hélicoïdal et le domaine GTPase de Gα, entrainant la libération du GDP (Cherfils and Chabre, 2003; Oldham and Hamm, 2008). En effet, le mouvement du domaine hélicoïdal a été confirmé par la structure cristalline du complexe hétérotrimérique Gαsβ1γ2 dans l'état de transition en l'absence de nucléotides et en complexe avec le β2AR en conformation active (Rasmussen et al., 2011). Dans cette structure, le domaine hélicoïdal effectue une rotation d'environ 130° par

rapport à sa position dans les structures liées aux nucléotides, libérant l'accès permettant l'échange des nucléotides (Audet and Bouvier, 2012).

Tous ces modèles présentent le dimère Gβγ comme très important dans le relargage du GDP d'où la présence cruciale de ce dimère dans le complexe Gαβγ-RCPG pour l'activation de la protéine G par le RCPG activé.

5.1.1.2. Liaison du GTP et dissociation du complexe trimérique

La plupart des études rapporte que la liaison du GTP à la sous-unité Gα entraîne un réarrangement structural du Gα-GTP, de Gβγ ainsi que du récepteur, ce qui permet la dissociation du récepteur et l'interaction avec des effecteurs. Une comparaison entre les structures cristallines du complexe hétérotrimérique à l'état basal et de la sous-unité Gα liée à un analogue non hydrolysable du GTP, le GTPγS, révèle que des changements conformationnels au niveau des trois régions Switch de Gα, modifient et altèrent la surface d'interaction avec Gβγ, provoquant ainsi la séparation des sous-unités. Bien que ces changements de conformation soient nécessaires pour la liaison de Gα au GTP, il est par exemple démontré que ces changements ne peuvent pas se produire dans l'hétérotrimère formé par Gα1β1γ2, hétérotrimère qui se lie au GDP avec une affinité 100 fois supérieure en présence de Gβγ par rapport à celle des sous-unités Gα libres (Sprang, 2016). L'activation du RCPG par un agoniste induit ainsi le changement conformationnel aboutissant à la fixation du GTP et la dissociation Gβγ.

Ce cycle fonctionnel de l'activité des protéines G est le plus suggéré avec dissociation/réassociation des sous-unités au cours du processus de signalisation ; cependant une autre hypothèse (Figure 34B) propose une dissociation incomplète des sous-unités impliquant de nombreux hétérotrimères actifs liés au GTP (Gα-GTPGβγ) (Bünemann et al., 2003; Lambert, 2008; Bondar and Lazar, 2014). En effet, les premières expériences *in cellulo* basées sur des mesures de FRET chez l'amibe *Dictyostelium discoideum* avec les sous-unités Gα et Gβ marquées respectivement par la protéine fluorescente CFP et YFP (Janetopoulos et al., 2001) indiquent que l'activation du récepteur chimiotactique de l'AMPc (cAR1) dans ces cellules entraîne une forte diminution du signal FRET entre les sous-unités, ce qui est compatible avec la dissociation des hétérotrimères marqués. Cependant, une augmentation du signal FRET est au contraire rapportée entre les sous-unités marquées Gαi-YFP et CFP-Gβ1γ2 après l'activation du récepteur α2AR par la noradrénaline (Bünemann et al., 2003) impliquant un réarrangement des sous-unités, plutôt que leur dissociation et supportant ainsi l'hypothèse d'un hétérotrimère (Gα-GTPGβγ) étroitement associé après activation, même si dans la

majorité des cas il y aura dissociation de l'hétérotrimère (Bünemann et al., 2003; Frank et al., 2005; Digby et al., 2006; Bondar and Lazar, 2014). Il semblerait que l'augmentation ou la diminution du signal FRET induit par l'activation du récepteur dans ces expériences soit dépendant de l'isoforme Gα étudiée et de l'emplacement précis des fragments rapporteurs (Frank et al., 2005; Lambert, 2008; Bondar and Lazar, 2014).

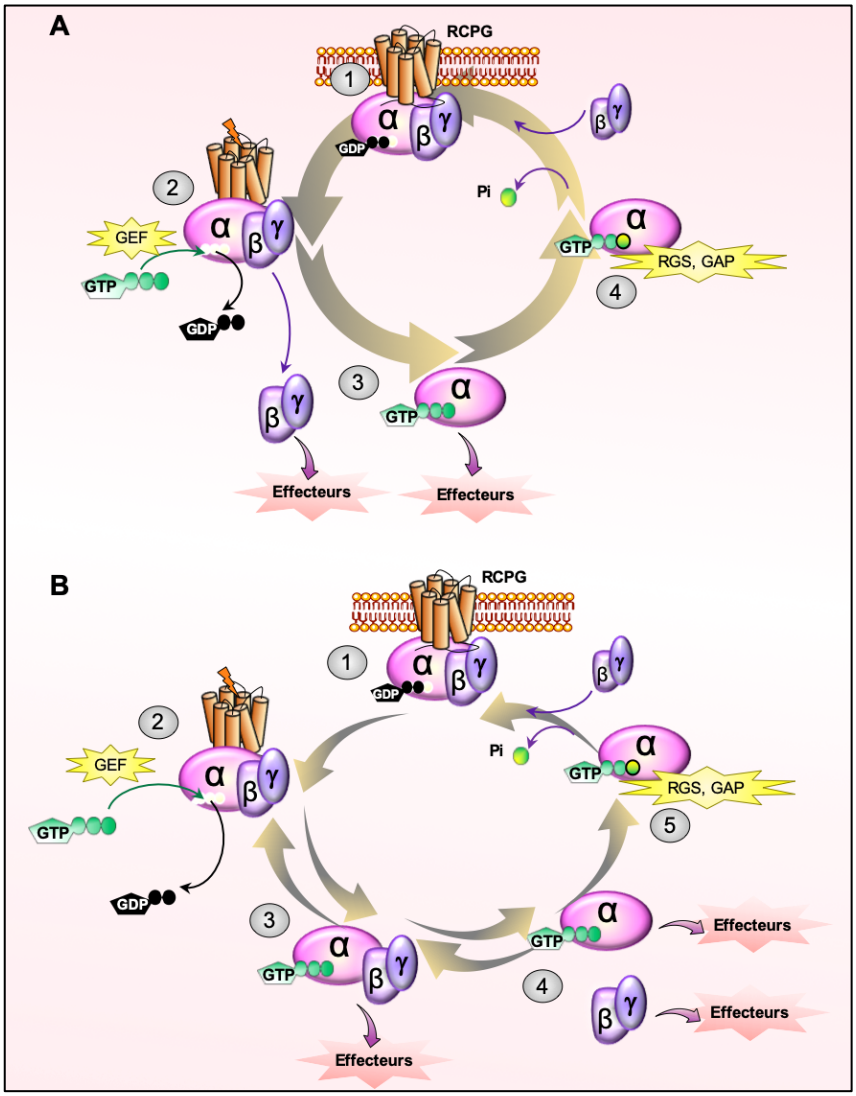


Figure 34. Les deux versions du cycle d'activation des protéines G hétérotrimériques. A. Le modèle commun simplifié dans lequel la liaison au GTP et la dissociation des hétérotrimères est présenté sous la forme d'une étape unique irréversible. L'activité GEF du RCPG accélère l'échange du GDP pour GTP, tandis que les RGS accélèrent l'hydrolyse du GTP. **B.** Un modèle plus complet dans lequel la liaison au GTP et la dissociation des hétérotrimères est présentée sous forme d'étapes réversibles distinctes. Les deux modèles pourraient coexister. (Adaptée de Bondar et Lazar 2014; Lambert 2008; Neubig et Siderovski 2002). GAP : *GTPase activating proteins* ; GEF : facteur d'échange de la guanine ; RGS : *regulator of G protein signaling.*

Aussi, il est suggéré qu'une même sous-unité Gα peut se lier simultanément au dimère Gβγ et à un effecteur respectivement grâce à l'hélice αN et par l'intermédiaire des régions switch

(Lambert, 2008). Par exemple, il a été démontré que les sous-unités Gαq et Gα13 peuvent interagir avec certains de leurs effecteurs (*Regulator of G protein signaling* (RGS2) et PLC pour Gαq, RGSRhoGEF pour Gα13) tout en restant potentiellement associée à Gβγ, régulant ainsi la migration de cellules MCF7 stimulées avec l'acide lysophosphatidique (LPA) (Cervantes-Villagrana et al., 2019). Des résultats similaires sont rapportés avec l'hétérotrimère formé par la sous-unité Gαi1 constitutivement active et Gβ1γ2, qui peut activer les canaux GIRKs (Bondar and Lazar, 2014).

Dans tous les cas, il est important de noter la possibilité que les cellules utilisent des hétérotrimères intacts et dissociés pour le transport des signaux et que la probabilité de dissociation des sous-unités soit optimisée pour répondre à un besoin de signalisation particulier.

5.1.2. Les effecteurs des protéines G

Les protéines G hétérotrimériques régulent une multitude de voies de signalisation cellulaire en transmettant, *via* les sous-unités Gα ainsi que les dimères Gβγ, les signaux des RCPGs aux effecteurs intracellulaires, et les fonctions physiopathologiques.

5.1.2.1. Les effecteurs des sous-unités Gα

5.1.2.1.1. Les adénylyl-cyclases (AC)

Un des effecteurs des sous-unités Gα les plus connus est l'AC, une enzyme membranaire qui synthétise l'AMPc à partir de l'ATP. La réaction nécessite du magnésium (Mg^{2+}) et provoque la libération de pyrophosphate. L'AMPc devient à son tour un activateur allostérique intracellulaire de plusieurs effecteurs intracellulaires dont le plus connu est la PKA (Sunahara et al., 1996; Qi et al., 2019). Grâce aux différents travaux de clonage réalisés depuis la première publication du groupe de Gilman en 1989 (Krupinski et al., 1989), on dénombre actuellement, chez les mammifères, neuf isoformes membranaires d'AC notées AC1 à AC9 largement distribuées (Tableau 3) dont la première (type 1, AC1) fut caractérisée à partir d'une librairie d'ADNc de cerveau de bœuf (Krupinski et al., 1989; Berridge, 2014), et une isoforme soluble (AC10) qui est exprimée essentiellement dans les testicules (Hanoune and Defer, 2001).

Les isoformes membranaires sont des glycoprotéines dont le poids moléculaire est compris entre 120 et 140 kDa. Toutes possèdent une structure secondaire commune contenant une extrémité N-terminale intracellulaire, deux domaines transmembranaires similaires (M1 et M2) constitués chacun de six segments transmembranaires organisés en hélices α et séparés par une boucle cytoplasmique C1 et une extrémité C-terminale cytoplasmique appelée C2 (Qi et al.,

2019). La région C1 porte les domaines de liaison à l'ATP pour former le cœur catalytique de l'AC. Le domaine C2 est le domaine régulateur où se trouve le site de liaison des sous-unités Gα ainsi que les sites de liaison de la forskoline (FSK), activateur connu de la plupart des isoformes membranaires, ou encore du magnésium (Sprang et al., 2007; Willoughby and Cooper, 2007). Toutes les isoformes membranaires d'AC sont activées spécifiquement par la sous-unité Gαs liée au GTP alors que seules les isoformes AC4, AC5 et AC6 sont inhibées spécifiquement par Gαi-GTP. Par sa liaison avec le domaine C2, Gαs-GTP favorise l'hétérodimérisation entre C1 et C2 tandis que Gαi-GTP se lie à C1 et empêche la formation du complexe C1-C2 (Sunahara, et al., 1997 ; (Taussig et al., 1993).

L'AMPc se lie aux sous-unités R (*regulatory*) d'une PKA, ce qui permet ensuite aux sous-unités C (*catalytic*) de cette dernière de phosphoryler un large éventail de substrats en aval comme le facteur de transcription CREB (*cyclic AMP response element-binding protein*) ou les canaux calciques CaV1.1/CaV1.2 (Vandael et al., 2013; Berridge, 2014).

AC isoforme	**Régulation par :**				**Distribution tissulaire**
	Protéines G			**Calcium et kinases**	
	Gα	Gβγ	Gαi ou Gαo		
AC1	(+)	(-)	Gαi (-)	CaM (+) ; PKC (+) ; CaMKII (-)	Cerveau, Glandes surrénales (médulla)
AC2	(+)	(+)		PKC (+)	Cerveau, muscle squelettique et cardiaque, poumon
AC3	(+)			CaM (+) ; PKC (+) ; CaMKII (-)	Cerveau, épithélium olfactif
AC4	(+)	(+)		PKC (+)	Cerveau, cœur, rein, foie,
AC5	(+)	(-)	(-)	Ca^{2+} (+) ; PKC (+) ; PKA (-)	Cœur, cerveau, rein, foie, poumons,
AC6	(+)	(-)	(-)	Ca^{2+} (-) ; PKC (+) ; PKA (-)	Ubiquiste
AC7	(+)	+		PKC (+)	Ubiquiste, forte dans le cerveau
AC8	(+)	(-)		CaM (+)	Cerveau, poumons, utérus, testicules, cœur
AC9	(+)				Cerveau, muscle squelettique
AC10	Pas d'effet			Activé par HCO_3-	Testicules

Tableau 3. Distribution et régulation des AC. Les AC membranaires (AC1-AC9) sont largement distribuées. Elles sont particulièrement riches dans le cerveau, mais sont également exprimées dans de nombreux autres types de cellules. L'AC10 soluble est limitée aux testicules. Elles sont toutes activées par Gαs, mais seulement quelques-unes sont inhibées par Gαi. Gβγ peut aussi activer les isoformes AC2, AC4 et AC7 et inhiber AC1, AC5 et AC8. (D'après Berridge, 2014). CaM : Calmoduline ; CaMK : Calmoduline kinase ; (+) Stimulation ; (-) Inhibition.

5.1.2.1.2. Les phospholipases C (PLC)

Connue pour être activée par les sous-unités de la classe Gαq, la PLC est une phosphodiestérase qui catalyse l'hydrolyse du phosphatidylinositol biphosphate (PIP2) en seconds messagers, l'inositol triphosphate (IP3) et le diacylglycerol (DAG) en réponse à l'activation des RCPG. Cette voie de signalisation est dite « divergente » dans le sens où l'IP3 libéré de la membrane plasmique diffuse dans le cytosol pour générer un signal Ca^{2+} en engageant les récepteurs de l'IP3 (IP3R) libérant le Ca^{2+} du réticulum endoplasmique (RE), alors que le DAG provoque l'activation de la PKC en se fixant à l'un de ces domaines régulateurs (domaine C1) (Berridge, 2014).

À ce jour, il existe treize types de PLC chez les mammifères classés en six familles, β(1–4), γ(1–2), δ(1,3,4), ε, η(1–2) et ξ, en fonction de leurs structures qui présentent des domaines conservés ainsi que les domaines régulateurs spécifiques distincts. La plupart des PLCs partage un mécanisme commun, mais chaque famille possède des mécanismes d'activation distincts, un rôle particulier et une distribution cellulaire spécifique liée à une fonction déterminée (Cocco et al., 2015). Par exemple, les isoformes de PLCβ sont activées par les RCPGs *via* les sous-unités Gαq et/ou Gβγ tandis que les isoformes de PLCγ sont activées par les récepteurs tyrosine kinase (RTK). Les PLCε quant à elles peuvent être activées par les RCPGs et les RTK (Suh et al., 2008). Les isoformes de PLC peuvent également être distinguées par leurs poids moléculaires, leur sensibilité au Ca^{2+} et leur localisation subcellulaire. Seules les PLCβs seront détaillées ici car elles constituent une cible d'intérêt dans notre projet de recherche.

5.1.2.1.2.1. Caractéristiques structurelles des PLCβs

Les PLCβs sont les premières PLCs pour lesquelles une interaction avec les sous-unités Gβγ a été montrée, conduisant à une élévation de la concentration de calcium cytosolique. Trois des 4 isoformes PLCβ, présentent des variants d'épissage (PLCβ1a et b, PLCβ2a et b, PLCβ4a et b). Les sites de variation sont généralement localisés dans la partie C-terminale et modifient la longueur totale de l'enzyme (Figure 35A). L'élément déterminant de la famille PLCβ est un domaine C-terminal d'environ 400 acides aminés qui contient des segments hautement conservés à son extrémité N-terminale (le domaine C-terminal proximal ou CTD) et un domaine hélicoïdal en spirale d'environ 300 acides aminés (le CTD distal) séparé par une région flexible de 28 à 61 résidus (linker CTD). Les isoformes de PLCβ partagent aussi bon nombre de caractéristiques structurelles présentes dans d'autres membres de la famille des PLCs, y compris le domaine TIM (*triose-phosphate isomérase*) contenant les structures catalytiques X et Y conservées, une répétition de quatre motifs EF, les domaines PH et C2 et deux régions de liaison

membrane-phospholipides. Il a été démontré que les sous-unités Gβγ interagissent *via* les domaines PH N-terminal et TIM tandis que les sous-unités Gαq régulent la PLCβ en interagissant avec leur domaine CTD (Gresset et al., 2012; Lyon and Tesmer, 2013), domaine également impliqué dans d'autres fonctions telles que la localisation nucléaire (Rhee, 2001; Suh et al., 2008; Lyon and Tesmer, 2013). La structure cristalline du complexe Gαq/PLCβ3 (Waldo et al., 2010; Lyon and Tesmer, 2013) a révélé un autre site de liaison au niveau du domaine C2.

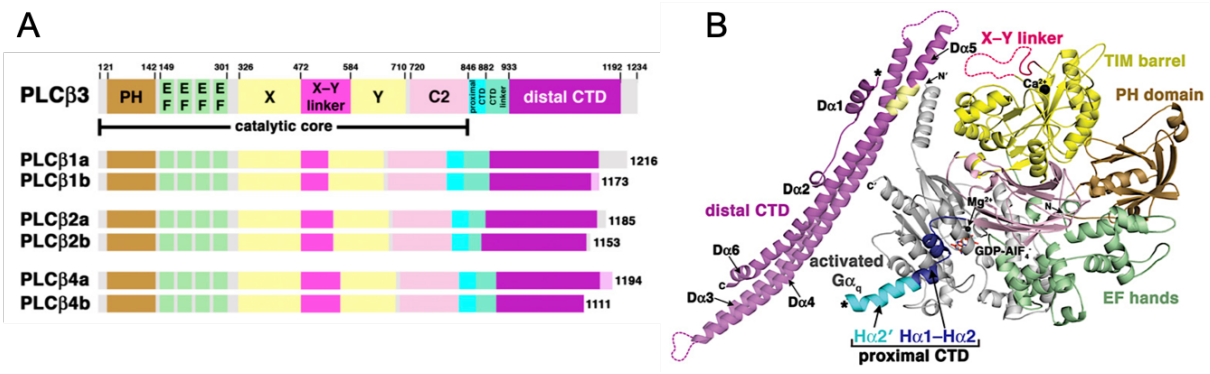


Figure 35. Structure des isozymes de PLCβ et des variantes d'épissage. A. Structure primaire des variants de la PLCβ. Les nombres au-dessus du diagramme correspondent aux limites de chaque domaine de la PLCβ3. Tous les diagrammes présentés en A représentent des isoformes de PLCβ humaines à l'exception de PLCβ4b qui est un variant provenant de *Rattus Norvegicus*. Tous les variants identifiés partagent le même noyau catalytique, qui est le fragment minimal de PLCβ qui hydrolyse le PIP2, situé entre la partie N-terminale et la fin du domaine C2. Les isoformes de PLCβ diffèrent le plus significativement dans la longueur du linker X-Y, alors que les variants d'épissage rapportés pour chaque isoforme varient principalement dans la longueur et la séquence du domaine CTD distal et dans la partie C-terminale extrême. **B.** Structure tertiaire de la PLCβ3 entière complexée avec la sous-unité Gαq activée. La structure présentée ici dérive de la base PDB ID 4GNK. Les domaines de la PLCβ3 est représentée avec le même code couleur que dans la figure A et la sous-unité Gαq est colorée en gris. La surface hydrophobe du domaine CTD distal qui lie l'hélice N-terminale de Gαq est montrée en jaune. Les extrémités N- et C-terminales de la PLCβ3 et de Gαq sont étiquetés N et C ou N'et C', respectivement. (D'après Lyon et Tesmer 2013).

Les sous-unités Gαq, Gα11 et Gα14 activent indistinctement les isoformes 1, 3 et 4 de la PLCβ, et elles sont de faibles activatrices de la PLCβ2 *in vitro* (Wu et al., 1992). En revanche, Gα15/16, qui est surtout connue comme étant spécifiquement exprimée dans les cellules hématopoïétiques, semble activer les PLCβ1, 2 et 3 *in vitro* (Kozasa et al., 1993). De manière intéressante, la PLCβ2 est également exprimée spécifiquement dans les cellules hématopoïétiques. Par conséquent, il est suggéré que Gα15/16 et PLCβ2 sont fonctionnellement liées dans ces cellules. Ensemble, ces données suggèrent que certains membres de la famille Gαq peuvent se coupler de manière sélective aux isoformes de PLCβ dans des cellules pour générer des réponses tissus ou cellules spécifiques *in vivo*.

5.1.2.1.2.2. Distribution tissulaire et régulation des PLCβs

Les quatre isoformes de PLCβ se distinguent aussi par leur profil d'expression et leurs voies de régulation. La PLCβ1 est fortement exprimée dans le cortex cérébral et l'hippocampe, alors que l'expression de PLCβ2 est largement, mais non exclusivement, limitée aux cellules hématopoïétiques (Park et al., 1993; Gresset et al., 2012). La PLCβ3 est très exprimée dans le cerveau, le foie, la glande parotide et peut être retrouvée dans tous les tissus, tandis que l'expression de la PLCβ4 est plus marquée au niveau du cervelet et de la rétine (Suh et al., 2008). Comme précédemment mentionné, toutes les PLCβs sont activées par Gαq, bien qu'il y ait une sélectivité pour les PLCβ1 et PLCβ3 par rapport à PLCβ2 (Smrcka and Sternweis, 1993). De plus, l'implication des sous-unités Gβγ dans l'activation des PLCβ a été proposée par Boyer et al., en utilisant des vésicules constituées de sous-unités Gβγ et de membranes d'érythrocytes de dinde marquées avec de l'inositol-[^{3}H] (Boyer et al., 1992). Ces auteurs ont ainsi montré que Gβγ peut stimuler la voie des polyphosphoinositides *via* les isoformes de PLCβ, excepté PLCβ4 (Gresset et al., 2012). Des études ont finalement suggéré que la signalisation physiologique *via* la PLCβ1 et la PLCβ4 semble être principalement, sinon entièrement, relayée par les sous-unités Gαq. En revanche, la stimulation de la voie des inositol phosphates suite à l'activation de RCPGs couplés à Gαi (tels certains récepteurs pour les peptides chimiotactiques dans les neutrophiles) se produit *via* l'activation de la PLCβ2 et/ou de la PLCβ3 par le dimère Gβγ (Gresset et al., 2012). Aussi, le lipopolysaccharide (LPS) agoniste du TLR4 (*Toll-like receptor-4*), qui est capable d'activer les facteurs de transcription tels que NF-κB (*nuclear factor-kappa B*), AP1 (la protéine activatrice 1) et CREB, induit une sous-expression post-transcriptionnelle rapide et spécifique de PLCβ1 et PLCβ2 dans les macrophages en déstabilisant leurs ARNm (Grinberg et al., 2009).

La PLCβ1 est la première GAP identifiée pour les protéines G et toutes les autres isoformes stimulent de manière robuste l'hydrolyse du GTP des sous-unités Gαq (Ross, 2008). Par ailleurs, l'activité GAP de la PLCβ se traduit par un taux d'hydrolyse du GTP suffisamment élevée pour empêcher le récepteur activé de se dissocier du complexe de signalisation Gαq/PLCβ pendant la durée de vie du GTP lié. En d'autres termes, la PLCβ ramène rapidement la sous-unité Gαq activée à l'état lié au GDP, le récepteur activé reste cependant dans le complexe où il favorise la dissociation rapide du GDP et le cycle d'activation est réinitialisé. En conséquence, la liaison de l'agoniste à un seul récepteur entraîne plusieurs cycles d'activation pour le complexe Gαq/PLCβ (Harden et al., 2011). Un cas concret fut démontré avec des vésicules de phospholipidiques contenant le récepteur M1 muscarinique et le trimère Gαqβ1γ2 et la PLCβ1, où la mesure de la cinétique des réactions d'échanges nucléotidiques dans ce

complexe permit d'observer que l'activité GAP de la PLCβ1 permet dans un premier temps d'hydrolyser le GTP avec un temps de demie-réaction d'environ 25 ms qui est 1000 fois supérieur au taux d'hydrolyse de base du GTP en l'absence de PLCβ1, puis potentialise la capacité du M1R à diminuer l'affinité du GDP ainsi qu'à accélérer d'environ 20 fois sa dissociation de la sous-unité Gαq (Mukhopadhyay and Ross, 1999; Turcotte et al., 2008; Harden et al., 2011).

Dans ce contexte, on peut ajouter que les membres de la sous-famille des petites GTPases Rac activent la PLCβ2 et potentiellement la PLCβ3, mais aucune liaison apparente n'est observée avec la PLCβ1 ou PLCβ4 (Illenberger et al., 1998; Illenberger et al., 2003a). Les approches biochimiques ont montré que le domaine PH de la PLCβ2 est à la fois nécessaire et suffisant pour la liaison de Rac (Illenberger et al., 2003a) suggérant une signalisation PLCβ2 spécifique.

5.1.2.1.2.3. Signalisation de la PLCβ dans le noyau

La signalisation de la PLCβ se produit non seulement au niveau membranaire mais également dans le noyau (Divecha and Irvine, 1995; Cocco et al., 2015). Bien que la présence (par ordre décroissant d'abondance) de PLCβ3, β2 et β4 ait également été détectée (Cocco et al., 1999), PLCβ1 est apparemment l'isoforme la plus abondante dans le noyau de diverses cellules, et sa région C-terminale est requise pour la localisation nucléaire (Kim et al., 1996). La quantité de la protéine PLCβ1 nucléaire, qui semble être activée par un mécanisme inconnu indépendamment de sa forme membranaire, augmente lors de la croissance cellulaire et diminue lors de la différenciation (Manzoli et al., 1997). De manière intéressante, l'exposition des cellules 3T3 à l'IGF-I entraîne une augmentation rapide et transitoire de l'activité de la PLCβ1 dans le noyau de ces cellules. De plus, l'inhibition de l'expression de la PLCβ1 par des ARN antisens supprime l'effet mitogène de l'IGF-I, tandis que la surexpression de cette isoforme améliore considérablement la synthèse de l'ADN observée lors du traitement avec le facteur de croissance (Manzoli et al., 1997). Il a été montré dans des extraits nucléaires de fibroblastes 3T3 que le PIP2, substrat de la PLCβ, est présent à l'intérieur du noyau associé à la matrice nucléaire, avec toutes les enzymes et les précurseurs nécessaires à sa synthèse (Divecha and Irvine, 1995; Smrcka, 2015). Le traitement des mêmes cellules avec IGF-1 induit une diminution du taux de PIP2 nucléaire, concomitante à une augmentation du DAG nucléaire, dépendante de la PLCβ1 nucléaire. Dans le même contexte, la stimulation avec le glutamate de noyaux isolés à partir de cellules HEK exprimant le récepteur du glutamate (mGluR5), entraîne des flux calciques intranucléaires qui sont bloqués par l'U73122 et le ET18OCH3, deux

inhibiteurs de la PLCβ, ainsi que par les inhibiteurs de l'IP3R, le 2-APB et la Xestospongin. Ces flux calciques sont également bloqués dans les neurones striataux transfectés avec la protéine Gαq non fonctionnelle (dominant négatif) ou les siRNA spécifiques de PLCβ1 (Kumar et al., 2008), suggérant ainsi l'existence d'une voie Gαq/PLCβ dans le noyau. En accord avec ces travaux, plusieurs études suggèrent un rôle de la PLCβ nucléaire dans la prolifération cellulaire en contrôlant le cycle cellulaire, en particulier à la frontière des phases G2/M (Faenza et al., 2000; Fiume et al., 2009; Follo et al., 2014).

5.1.2.1.2.4. Rôle physiologique et physiopathologique des PLCβs

Les altérations des isoformes de la PLCβ ont été associées à plusieurs maladies pouvant cibler différents tissus et organes (Follo et al., 2014; Cocco et al., 2015). Par exemple, la PLCβ1 a été décrite comme jouant un rôle important dans le fonctionnement du cerveau et peut être associée à des troubles cérébraux (Koh, 2013). En fait, elle est fortement exprimée dans le cortex cérébral, l'hippocampe, l'amygdale, le septum latéral et le bulbe olfactif (Watanabe et al., 1998; Fukaya et al., 2008), elle régule le développement cortical et la plasticité synaptique, et intervient plus spécifiquement dans la signalisation des récepteurs muscariniques de l'hippocampe. Les isoformes de la PLCβ participent également à la différenciation et à l'activation des cellules immunitaires, et contrôlent à la fois le système immunitaire natif et adaptatif (Kawakami and Xiao, 2013). En particulier, la perte à la fois de PLCβ2 et PLCβ3 est associée à une altération de la capacité migration des lymphocytes T provoquée par une incapacité à augmenter le calcium intracellulaire. De manière intéressante, il a été démontré que l'expression de l'isoforme PLCβ2 est réduite dans les lymphocytes T humains de personnes âgées, suggérant ainsi qu'une déficience spécifique de cette enzyme dans les lymphocytes T âgés pourrait expliquer le défaut d'activité de la PLC lié à l'âge et à contribuer à la suppression de la réponse immune dans ce groupe de personnes (Li et al., 2000; Kawakami and Xiao, 2013). De plus, la sous-expression de PLCβ2 joue un rôle important dans la différenciation des macrophages M1-M2. Alors que l'activité de PLCβ3 est essentielle pour favoriser la survie des macrophages, en particulier dans les plaques d'athérosclérose, elle pourrait ainsi constituer une cible moléculaire spécifique pour le traitement de cette pathologie (Wang et al., 2008; Cocco et al., 2015). Une étude utilisant des neutrophiles primaires a démontré que le récepteur de chimiokine CXCR2 forme un complexe macromoléculaire avec PLCβ2 et la protéine d'échafaudage NHERF1 (*Na^+/H^+ exchanger regulatory factor 1*). L'altération de ce complexe diminue le signal calcique intracellulaire induit par l'activation de CXCR2 et supprime la migration chimiotactique et transépithéliale des neutrophiles (Y Wu et al., 2012) ainsi que

production d'anions superoxyde (Jiang et al., 1997), suggérant ce complexe macromoléculaire comme une cible thérapeutique d'intérêt pour les maladies inflammatoires. De même, les petites GTPases telles que Cdc42, Rac1 et Rac2 lient et stimulent directement PLCβ2 et PLCβ3, mais pas PLCβ1 ni PLCβ4 (Illenberger et al., 2003b; Lyon and Tesmer, 2013). De plus, Rac1, impliquée dans la stabilisation des lamellipodes pour la migration chimiotactique, est activée en aval des protéines G et est nécessaire à l'activation de PLCβ2 et PLCβ3 conduisant à la génération d'IP3 et au flux de calcium dans les cellules myéloïdes humaines (Block et al., 2016). En outre, la déplétion à la fois de PLCβ2 et PLCβ3, mais pas de PLCβ1, inhibe partiellement la migration des lymphocytes T en réponse au SDF-1 (Bach et al., 2007; Lyon and Tesmer, 2013).

L'expression et l'activité altérées des PLCβs sont aussi couramment détectées dans différents cancers humains et sont souvent associées à l'apparition et à la progression de phénotypes tumoraux. Un cas très intéressant est celui de la PLCβ2 : très peu exprimée dans les tissus normaux, sa surexpression (Bertagnolo et al., 2007)(Bertagnolo et al., 2007)est corrélée à un mauvais pronostic dans une grande majorité des cancers du sein (Bertagnolo et al., 2006; Park et al., 2012). Cette isoforme est capable de soutenir certaines caractéristiques malignes des cellules tumorales, telles que la motilité et l'invasion ou la prolifération. Cependant, sa surexpression (plasmide d'expression) ou inhibition (siRNA) dans la lignée MCF10A issue de cellules épithéliales mammaires n'ont pas d'effet significatif sur ces aspects de la tumorigenèse, suggérant qu'elle n'est pas oncogénique en tant que tel. En effet, dans les cellules normales ou de cancer du sein, la régulation de l'expression de la PLCβ2 ne modifie ni l'expression de la cycline D1, de la cycline D3 et de leur partenaire CDK4 (*cyclin-dependent kinase 4*), ni celle de la cycline A qui régule la transition le long des phase S/G2/M (Bertagnolo et al., 2007). Ces données indiquent l'absence de régulation des cyclines par la PLCβ2 contrairement à PLCβ1 qui a été suggérée être un régulateur du cycle cellulaire des cellules murines leucémiques érythroblastiques (LAM) en agissant sur le complexe de la cycline D3-CDK4 (Bertagnolo et al., 2007). Par contre, l'augmentation de l'expression de la PLCβ2 induite par une hypoxie dans les cellules MDA-MB-231 issues d'un adénocarcinome mammaire, favorise la réorganisation du cytosquelette d'actine et renforce la capacité d'invasion, *via* un effet combiné de HIF-1α et son rôle dans la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) et la signalisation relayée par la PLCβ2 (Brugnoli et al., 2016).

Les PLCβs jouent un rôle important dans le fonctionnement du cerveau et sont donc associées à des troubles du système nerveux central. L'expression de la PLCβ1 est inversement corrélée au grade pathologique des gliomes et constitue donc un potentiel facteur pronostique.

En effet, les niveaux d'ARNm de la PLCβ1 sont plus élevés dans les tissus cérébraux non tumoraux, et sont significativement supérieurs à ceux des gliomes de grade II. De plus, leur expression est d'autant plus diminuée que le grade du gliome est élevé (Lu et al., 2016).

En conclusion, les PLCβs décrites ici ainsi que les autres phospholipases (PLA, PLD) non détaillées dans le présent chapitre, sont des relais essentiels de la signalisation intracellulaire et intercellulaire générant de nombreux médiateurs lipidiques bioactifs, tels que le DAG, l'acide phosphatidique, l'acide lysophosphatidique et l'acide arachidonique (Park et al., 2012).

5.1.2.1.2.5. La signalisation du DAG / PKC

Dans le contexte de la signalisation des phospholipases, il est important de rappeler le rôle des PKCs activées en aval. En effet, le DAG formé lorsque le PIP2 est hydrolysé par la PLC reste au niveau membranaire, au niveau de duquel il agit, en parallèle avec le Ca^{2+} libéré du RE, comme un messager lipidique pour activer certains membres de la famille des PKCs. Les PKCs sont réparties en trois familles nommées conventionnelles (PKCα, PKCβI et II, PKCγ), nouvelles (PKCδ, PKCε, PKCη, PKCθ) et atypiques (PKCζ, PKCι) (Tableau 4), qui présentent des structures distinctes. Les PKCs conventionnelles ont un domaine pseudo-substrat N-terminal (PS) suivi des domaines régulateurs C1 dupliqué (C1A, C1B) et C2, responsables de la liaison du DAG et du Ca^{2+} et du recrutement à la membranaire, un domaine C3 de liaison à l'ATP et un domaine catalytique C4. Le domaine PS possède une fonction auto-inhibitrice dans la mesure où il s'associe au site catalytique sur C4, l'empêchant ainsi de phosphoryler ses substrats. Les nouvelles PKC ont une structure similaire, à la différence qu'elles ont un domaine C2-*like* qui ne lie pas le Ca^{2+}. Les PKCs atypiques n'ont pas de domaine C2 et leur domaine C1 qui n'est pas dupliqué ne lie ni le Ca^{2+}, ni le DAG (Griner and Kazanietz, 2007; do Carmo et al., 2013; Berridge, 2014; Cooke et al., 2017).

A l'état inactif, les PKCs se localisent dans le cytoplasme, mais après activation *via* le DAG et le Ca^{2+} libérés suite à l'activation d'un RCPG, les isoformes de la PKC peuvent être transportées vers la membrane plasmique, vers les organites cytoplasmiques ou dans le noyau où elles régulent la mitose, les voies de survie cellulaire, l'apoptose, l'adhésion et la migration cellulaire (do Carmo et al., 2013; Cooke et al., 2017).

Groupe	Isoformes	Mécanisme d'activation	Suppresseur de tumeur	Promoteur de tumeur
Isoformes classiques	**PKCα**	Dépendant du DAG et du Ca2+ Phosphorylations sur les résidus sérine, thréonine et tyrosine	Cellules tumorales intestinales, pancréatiques et mammaires	Cellules tumorales de la prostate, de l'endomètre, du sein, des gliomes et de la vessie urinaire de haut grade
	PKCβ			Cellules tumorales du côlon et du gliome
	PKCγ			
Nouvelles isoformes	**PKCδ**	Phosphorylations sur les résidus sérine, thréonine et tyrosine ; clivage des caspases ; Activation par des cofacteurs lipidiques	Cellules de gliome et d'adénocarcinome pulmonaire	Cellules tumorales du sein et du gliome
	PKCε	Phosphorylations sur les résidus sérine, thréonine et tyrosine ; clivage des caspases		Cellules tumorales de la vessie, du cerveau, du sein, de la peau, de la tête, du cou, du gliome thyroïdien, du foie, du poumon et de la prostate
	PKCθ			
	PKCη	Phosphorylations sur les résidus sérine, thréonine et tyrosine	Cellules NiH3T3 et kératinocytes	Cellules MCF-7 et Glioblastome
	PKCμ			
Isoforme atypique	**PKC ζ**	Clivage des caspases ; Activation par des cofacteurs lipidiques	Cellules tumorales ovariennes	Cellules tumorales du sein, pancréatiques et hématopoïétiques

Tableau 4. Mécanismes d'activation des isoformes de PKC et leur rôle dans la tumorigenèse. (Adapté de do Carmo et al., 2013). PKC : protéine kinase C ; DAG : diacylglycérol.

La première preuve montrant l'implication de la PKC dans la tumorigénèse provient d'études sur les esters de phorbol (PE), suggérant que les PE peuvent imiter les effets du DAG et que le développement des tumeurs par PE est associé à l'activation de la PKC (Nishizuka, 1984; do Carmo et al., 2013). Il a ensuite été démontré récemment que les isoformes de la PKC pouvaient réguler les voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire, la survie et la migration, ainsi que les voies de signalisation impliquées dans la chimiorésistance (Griner and Kazanietz, 2007; Martiny-Baron and Fabbro, 2007; X Wang et al., 2017; Bessa et al., 2018). Par exemple, la surexpression de la PKCα dans la lignée MCF-7 issue d'un adénocarcinome mammaire contribue à augmenter la capacité métastatique de ces cellules alors que son inhibition réduit la prolifération ainsi que la migration des cellules MDA-MB-231 (Lønne et al., 2010). De plus, l'activation de la PKCα par l'initiateur tumoral PE induit la stabilisation des filaments d'actine tout en inactivant l'expression membranaire de la E-cadhérine, suggérant le rôle de la PKCα dans la régulation des jonctions cellule-cellule (Mullin et al., 2000; do Carmo et al., 2013). De même, l'inactivation des PKCα ou PKCβI dans les cellules cancéreuses

gastriques humaines altère la croissance et réduit la taille et le taux de formation de tumeurs dans les xénogreffes de souris, associée à l'inhibition significative de l'activité du facteur de transcription AP-1 connu pour être principalement régulé par la PKC dans la tumorigenèse (Jiang et al., 2004). De manière intéressante, la PKCα a été proposée comme pro-mitotique et pro-survie dans les gliomes et sa perte dans les lignées cellulaires de gliome est associée à une sensibilité accrue à divers stimuli apoptotiques tels que le TNF-α, la camptothécine ou le sulfate de bléomycine (Cameron et al., 2008). Cependant, le mécanisme par lequel la PKCα contribue à la prolifération des cellules de gliome semble complexe, car il fait intervenir différents mécanismes de signalisation. Notamment, l'activation de mTORC1 par la PKCα, indépendamment de l'Akt, alors que cette kinase est plutôt comme la principale modulatrice de la voie de signalisation ERK1/2, puissant mitogène pour la croissance des cellules de gliome (Leirdal and Sioud, 2000; Fan et al., 2009; do Carmo et al., 2013). De plus, Mut et al., ont rapporté que la PKCα peut induire la phosphorylation de NF-κB/p65 qui est un facteur favorisant la survie et la prolifération des cellules de GBM (Mut et al., 2010). Aussi, la phosphorylation de la PKCα est nécessaire pour la régulation de la migration des cellules C6, indiquant ainsi que la PKCα contribue non seulement à la survie et à la prolifération des cellules de gliome, mais également à la motilité de ces cellules tumorales (J-G Hu et al., 2010). En accord avec ces observations, les résultats présentés par Kohutek et al., proposent que la PKCα régule positivement la migration des cellules de GBM (U1242 et U251) en induisant le clivage de la N-cadhérine *via* ADAM-10 (*A disintegrin and metalloproteinases*) (Kohutek et al., 2009).

En ce qui concerne la PKCβ, l'angiogenèse induite par le VEGF dans les GBMs est médiée par la PKCβ, qui en interagissant plus spécifiquement avec la voie PTEN (*phosphatase and tensin homolog*)/PI3K/Akt, augmente la prolifération cellulaire et la résistance à l'apoptose (Graff et al., 2005; do Carmo et al., 2013; Popescu et al., 2016). En effet, l'enzastaurine qui est un inhibiteur sélectif de la PKCβ, peut entraîner dans les études *in vitro* une réduction significative de la prolifération des cellules de gliome (Graff et al., 2005; Griner and Kazanietz, 2007). Cependant, les essais randomisés de phase III de l'enzastaurine chez des patients atteints de GBM récurrent n'ont pas été prometteur, indiquant que d'autres voies que la PKCβ contribuent au comportement agressif des gliomes (Wick et al., 2010).

Nombreuses sont les fonctions jouées par les autres isoformes de PKC dans les cancers. Pour résumer, il a été démontré que PKCε est un oncogène transformant à la fois dans les cellules épithéliales et les fibroblastes, et sa surexpression dans divers modèles cellulaires favorise la prolifération et confère un phénotype tumorigène chez la souris *Nude* (Mischak et al., 1993; Cacace et al., 1996). Cette isoforme, qui est surexprimée dans les GBMs de grade IV mais pas

dans les astrocytomes pilocytiques de grade I, est ainsi considérée comme un marqueur important de l'évolution négative des gliomes et sa sous-expression à l'aide de siRNA inhibe l'activation de STAT3 et la protéine anti-apoptotique BCL-xl (*B-cell lymphoma-extra large*) atténuant ainsi la prolifération et l'invasion cellulaire associées à l'apoptose des cellules U87 et U251 issues de GBM (Sharif and Sharif, 1999; Kahana et al., 2011; Xu et al., 2015). De plus, dans les cancers du sein et de la prostate ainsi que dans les mélanomes, la sous-expression de PKCε inhibe la protéine anti-apoptotique Bcl-2 tout en favorisant l'activation mitochondriale de protéines pro-apoptotiques comme Bax (*Bcl-2–associated X*) sensibilisant ainsi les cellules à l'apoptose (McJilton et al., 2003; Gillespie et al., 2005; Basu and Sivaprasad, 2007; Sivaprasad et al., 2007; Shankar et al., 2010). Des résultats similaires ont été obtenus avec la PKCι dont la sous-expression dans les cellules souches de glioblastome (GSC) provoque aussi l'apoptose, ainsi que la perte de clonogénicité et une réduction de la prolifération cellulaire (Phillips et al., 2016).

Certaines études ont toutefois montré que plusieurs isoformes de PKC agissent en tant que suppresseurs de tumeurs, en activant des voies pro-apoptotiques (Griner and Kazanietz, 2007; Martiny-Baron and Fabbro, 2007; do Carmo et al., 2013). A titre d'exemple, la PKCδ transmet des signaux anti-prolifératifs et apoptotiques dans divers types de cellules. Son inhibition par la staurosporine ou la calphostine C, ou suite au traitement avec l'initiateur tumoral PE dans les cellules 3Y1 de fibroblastes de rat surexprimant le proto-oncogène Src, favorise un phénotype de malignité se manifestant par un changement morphologique ainsi qu'une augmentation de la synthèse d'ADN et de la capacité clonogénique (Lu et al., 1997; Hornia et al., 1999).

Bien que cette fonction de suppresseur de tumeur de la PKCδ par induction de l'apoptose soit confirmée dans de nombreux cancers tels que le cancer du pancréas, du sein ou les gliomes (Gonzalez-Guerrico and Kazanietz, 2005; Yin et al., 2005; Basu and Pal, 2010), des études plus récentes ont révélé que la PKCδ pouvait également fonctionner comme une protéine anti-apoptotique et qu'elle était au contraire essentielle à la survie des cellules dans de nombreux cancers incluant les cancers du poumon, du sein, du pancréas ou du colon (Basu and Pal, 2010; X Wang et al., 2017; Bessa et al., 2018). Il a été proposé que ces effets opposées de la PKCδ soient dépendantes de sa modification post-traductionnelle (phosphorylation, clivage) et de sa localisation cellulaire (cytoplasmique, mitochondriale, nucléaire) (Steinberg, 2004; X Wang et al., 2017). Par exemple, en utilisant la PKCδ constitutivement active dont l'expression a été ciblée dans différents compartiments cellulaires en utilisant des plasmides d'expression spécifique (pShooter, pCMV/myc), il a été démontré dans les cellules de GBM (A172) et les cellules HeLa que la PKCδ cytosolique peut induire l'apoptose en activant la MAPKp38, en

inhibant Akt et en diminuant le niveau d'expression de XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*), alors que la PKCδ nucléaire induit l'apoptose *via* l'activation de JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) (Gomel et al., 2007; Basu and Pal, 2010). Aussi, sa phosphorylation sur la tyrosine 311 induite par le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) facilite son clivage protéolytique par la caspase-3 au niveau des acides aminés situées entre les positions 324-327, causant l'activation de la PKCδ et de sa fonction pro-apoptotique dans les cellules neuronales dopaminergiques et musculaires lisses vasculaires (Steinberg, 2004; Kaul et al., 2005; Kato et al., 2009). En revanche, la phosphorylation sur la tyrosine 332 par la kinase Src est nécessaire pour le clivage protéolytique de PKCδ en réponse à des stimuli apoptotiques TRAIL (*tumor necrosis factor–related apoptosis-inducing ligand*) et au cisplatine dans les cellules de gliomes et les cellules HeLa alors que la phosphorylation sur tyrosine 311 n'a aucun effet (Lu et al., 2007).

Dans le même contexte, contrairement aux études mentionnées plus haut sur le rôle pro-ongénique de PKCα, certaines études montrent au contraire que la PKCα peut avoir des effets anti-prolifératifs *via* $p21^{Cip1}$ (kinase dépendante de la cycline) dans les cellules intestinales, pancréatiques et mammaires (Slosberg et al., 1999; Detjen et al., 2000)**.**

En conclusion, bien que les PKCs jouent clairement un rôle majeur dans le développement de cancers et en particulier des gliomes, la contribution de chaque isoforme de PKC dépend de plusieurs paramètres, notamment de la phosphorylation des résidus tyrosine (Y), de l'apparition de mutations oncogéniques, du type de stimuli et de l'environnement cellulaire (do Carmo et al., 2013; Ardito et al., 2017).

5.1.2.1.3. Les protéines RhoGEF

Il a été démontré que les RhoGEF sont aussi capables de servir d'effecteurs directs en aval des protéines G de type Gα12/13, Gαq/11 et/ou Gβγ (Aittaleb et al., 2010; Berridge, 2014). En effet, ces sous-unités de protéines G, en activant les RhoGEF, jouent ainsi un rôle important dans la régulation des processus dépendants du cytosquelette d'actine, tels que l'adhésion, la polarité et la migration (Moers et al., 2008; Syrovatkina et al., 2016). La famille des RH-RhoGEF (*RGS homology domain containing guanine nucleotide exchange factors for Rho*) comprend les protéines p115RhoGEF (p115), (PDZ)-RhoGEF et LARG (*leukemia-associated RhoGEF*), toutes régulées par Gα13 (Aittaleb et al., 2010; M Patel et al., 2014). Gα12 est capable d'activer que LARG, bien que cela semble nécessiter une phosphorylation de LARG par la tyrosine kinase Tec (Suzuki et al., 2003). En effet, au sein de cette sous-famille, Gα13

(mais pas Gα12) semble directement stimuler l'activité des trois RhoGEF par recrutement membranaire et interaction directe (Syrovatkina et al., 2016). En 2005, il a été démontré que la famille Gαq/11 pouvait aussi activer un autre RhoGEF, p63RhoGEF, lié à l'activation de RhoA (Lutz et al., 2005; Aittaleb et al., 2010). Ce processus est apparemment indépendant de l'effecteur canonique PLCβ de Gαq/11 et de sa signalisation en aval, telle que la mobilisation de Ca^{2+} et l'activation de PKC. On sait désormais que Gβγ peut aussi se lier et activer directement les RhoGEF, tels que P-Rex1 (*PIP3-dependent Rac exchanger 1)*, qui relie les RCPGs de chimiokine couplés à Gαi, à l'activation de Rac2 (Welch et al., 2002; Cervantes-Villagrana et al., 2019).

Plusieurs études ont montré que RhoA est surexprimé et hautement activé dans de nombreuses tumeurs solides. L'augmentation de son activation *via* ses effecteurs en aval, tels que ROCK, la kinase associée à Rho initie d'une part, les modifications du cytosquelette essentielles à la motilité et à l'invasion des cellules cancéreuses et notamment des cellules de GBM (Lecointre et al., 2015), et d'autre part la transcription des gènes favorisant la prolifération des cellules cancéreuses (M Patel et al., 2014). De plus, la migration des cellules de cancer du côlon induite par GRRR (*Gastrin-releasing peptide receptor*) et de GBM par le peptide chimiokine UII est essentiellement relayée par RhoA, principalement activée par Gα13 (M Patel et al., 2014; Lecointre et al., 2015).

5.1.2.2. Les effecteurs des sous-unités Gβγ

Longtemps considéré comme un point d'ancrage à la membrane pour la sous-unité Gα et désactivateur de la forme active de cette dernière, il est maintenant reconnu que le dimère Gβγ est aussi capable de moduler de nombreux autres effecteurs, *via* une interaction directe avec les PLCβ, les AC, ainsi que les canaux calciques voltage-dépendants (Khan et al., 2013). La première preuve évidente du rôle de Gβγ dans la régulation d'effecteurs a été obtenue par l'équipe de Logothetis et al., qui montrait que Gβγ stimule l'activation directe d'un canal potassique sélectif GIRK (*G protein-activated inwardly-rectifier K^+ channel*) dans les cellules atriales cardiaques (Logothetis et al., 1987). L'année suivante, Whiteway et al., ont montré que Gβγ, et non Gα, est l'activateur clé de la signalisation en aval des récepteurs de phéromone codés par STE2 et STE3 (*Receptor for alpha-factor pheromone*) chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Whiteway et al., 1988). Aujourd'hui, la liste des protéines qui peuvent interagir avec Gβγ s'est élargie pour englober un grand nombre de cibles incluant les kinases des RCPGs (GRK2-3), les PLCβs 1 à 3, la PLA2, les AC-1 à 7, les RGS (Clapham and Neer, 1997; Smrcka, 2008; Khan et al., 2013; Samaradivakara et al., 2018). L'activation de la sous-unité Gα expose

des surfaces sur la sous-unité Gβγ, notamment la surface supérieure au niveau du motif structural *β-propeller* de la sous-unité Gβ, qui peuvent servir de sites de liaison aux effecteurs tels que les PLCβ2-3 ou l'AC-2 (Panchenko et al., 1998; Buck and Iyengar, 2001; Smrcka, 2008).

En effet, il a été démontré que Gβγ stimule dans l'ordre de puissance PLCβ3> β2> β1, mais n'augmente pas significativement l'activité de PLCβ4 (Smrcka and Sternweis, 1993; Rhee, 2001). De manière intéressante, dans des dosages de l'activité des effecteurs de la PLCβ2, il a été démontré que certains peptides synthétisés correspondant à différentes régions du *β-propeller* de la sous-unité Gβ inhibent par exemple la régulation dépendante de Gβγ de PLCβ2, tandis que d'autres stimulent la PLCβ2 indépendamment de Gβγ (Buck et al., 1999; Buck et al., 2002). Cela a conduit au concept selon lequel il existe des surfaces distinctes au sein de Gβγ, d'une part pour la liaison de l'effecteur (ici PLCβ2) et d'autre part, pour le transfert de signal. Quant à la régulation des effecteurs par Gβγ, deux mécanismes généraux ont été décrits et dépendent de la localisation cytoplasmique ou membranaire de la cible. Dans le cas de protéines cytoplasmiques telles que la PLCβ2 ou la GRK2, dont les substrats sont localisés dans la membrane plasmique, leur mécanisme potentiel d'activation passe par leur recrutement à la membrane plasmique relayé par Gβγ lié à la membrane. Lors de l'activation du récepteur par exemple, les sous-unités Gβγ sont libérées et fournissent un site de liaison pour GRK2, et en coopération avec les PIP2, Gβγ recrute GRK2 à la membrane, où elle peut interagir et phosphoryler les RCPGs activés (Pitcher et al., 1995; Murga et al., 2019). Pour d'autres cibles, telles que les ACs ou les canaux GIRK, qui sont des protéines transmembranaires, la régulation ne nécessite pas de translocation mais s'effectue directement au niveau membranaire par modification structurale favorisant l'interaction entre Gβγ et les domaines catalytiques des ACs ou les sites de liaison identifiés aux extrémités N- et C-terminales des canaux GIRK (Smrcka, 2008; Khan et al., 2013; Zylbergold et al., 2014).

Il existe également une spécificité associée aux sous-unités Gβγ avec des effecteurs non canoniques. Par exemple, il a été constaté que $G\beta\gamma_{12}$ était associée à la F-actine dans les cellules Swiss 3T3 et les cellules de gliome C6. En revanche, $G\beta\gamma_5$ semble être associée à la vinculine dans les complexes d'adhérence focale (Ueda et al., 1997) plutôt qu'à l'association directe avec l'actine (Hansen et al., 1994). Il a récemment été décrit que la protéine ELMO sert d'effecteur de Gβγ en relayant les signaux des RCPGs de chimiokine pour activer Rac1 induisant ainsi la polymérisation de l'actine, associée à la migration des cellules HeLa et HL60 (Wang et al., 2016). L'activation de ERK par phosphorylation induite par les sous-unités Gβγ issues de

l'activation du β1AR couplé à Gαs, a aussi été montrée dans les cardiomyocytes du rat néonatal ou les cellules HEK293 (Smrcka, 2008; Vidal et al., 2012; Gallo et al., 2019).

Certes, les sous-unités Gα et les dimères Gβγ sont capables d'activer de nombreux effecteurs, il est intéressant de noter que la puissance de l'activation des effecteurs dépendante de la sous-unité Gβγ est 10 à 100 fois inférieure à celle des effets relayés par la sous-unité Gα. (Smrcka, 2008). Ainsi, par exemple, dans les conditions requises pour obtenir une libération maximale des IP3 *via* un récepteur couplé à Gαq, les processus dépendants de Gβγ ne seraient pas activés. Étant donné que Gαi a une affinité relativement faible pour l'AC et que les protéines Gαi sont relativement abondantes, l'activation des récepteurs couplés à Gαi pourrait libérer suffisamment de Gβγ pour obtenir une activation significative d'effecteurs. Ainsi, on considère classiquement que ce sont les sous-unités βγ issues du découplage des protéines Gαi qui sont capables de signaliser.

5.2. Activation des protéines G indépendamment des RCPGs

Bien que l'activation des protéines G résulte principalement de la stimulation des RCPGs, il est maintenant accepté que certains évènements qu'elles relayent se produisent *via* des partenaires de liaison non canoniques. Les partenaires RCPG-indépendants les plus connus sont d'une part des activateurs de la signalisation des protéines G ou AGS (*Activators of G protein Signaling*) qui agissent soit par la liaison à Gα, libérant ainsi Gβγ, soit par liaison directe à Gβγ et les nucléosides diphosphate kinases (NDPKs) qui modifient Gβ de manière post-traductionnelle (phosphorylation) permettant ensuite le transfert de ce phosphate vers le GDP, permettant la synthèse de GTP (Takesono et al., 1999; Melien, 2007; P Zhang et al., 2015; Syrovatkina et al., 2016). Ces découvertes, ainsi que les observations des protéines G dans plusieurs localisations intracellulaires, comme dans l'appareil de Golgi ou le noyau, suggèrent des rôles supplémentaires pour les protéines G, au-delà du rôle de transducteurs de signal du RCPG.

5.2.1. Les NDPKs

Les NDPKs sont ubiquistes et catalysent le transfert des phosphates γ entre les nucléosides 5′-triphosphates (NTP) et les nucléosides 5′-diphosphates (NDP) (Mehta and Orchard, 2009). Actuellement, 10 isoformes humaines de NDPK ont été identifiées, mais elles ne présentent pas toutes une activité NDP kinase et sont organisées en deux groupes (Boissan et al., 2009). Le premier groupe composé par les 4 isoformes A à D (ou H1 à H4) sont ubiquistes, partagent une homologie de séquence élevée (58 à 88%) et présentent une activité NDPK. Les 6 isoformes du

second groupe (E à J ou H5 à H10), principalement exprimées dans les testicules, partagent une faible homologie avec le groupe 1 et entre-elles (22 à 44%), et n'ont pas d'activité NDPK à l'exception de H6.

NDPK-A et B sont les plus étudiées, notamment pour leurs fonctions régulatrices dans le développement normal et le développement tumoral. Il a par exemple été démontré que la sous-expression de NDPK-A est corrélée à l'augmentation du potentiel métastatique dans les mélanomes et les cancers du sein, du foie, des ovaires et du côlon (Milon et al., 1997; Steeg, 2006; Bunce and Khanim, 2018; Lee et al., 2018). A titre d'exemple, il est décrit que l'isoforme B de NDPK (NDPK-B) forme un complexe avec Gβγ et phosphoryle Gβ sur l'histidine His266, ce qui permet un transfert de phosphate sur le GDP et la formation locale de GTP pour un échange et une activation ultérieure de la sous-unité Gα (P Zhang et al., 2015; Abu-Taha et al., 2018) (Figure 37). La surexpression du mutant Gβ1H266Lγ2 qui s'intègre et remplace le Gβγ endogène, entraîne une suppression de la production d'AMPc et la contractilité des cardiomyocytes néonataux et chez l'adulte (Hippe et al., 2007), suggérant que l'activation de Gαs *via* NDPK B/Gβγ contribue à la production d'AMPc et la contractilité des myocytes. L'implication des NDPKs dans l'activation des protéines G, a été suggérée par d'autres études. Cependant, les mécanismes exacts et la signification fonctionnelle de ce mode d'activation indépendant du RCPG sont encore mal compris.

5.2.2. Les AGS

Les protéines AGS ont été initialement identifiées dans des criblages fonctionnels chez la levure à partir de banques d'ADNc afin de caractériser des acteurs de la signalisation des protéines G en l'absence de RCPG par la technique de double hybride (Takesono et al., 1999; Cismowski and Lanier, 2005). Ces protéines sont regroupées en 4 classes (Figure 36) en fonction *i*) de leurs interactions avec les sous-unités de protéines G et *ii*) de leurs mécanismes de régulation des protéines G (Blumer and Lanier, 2014). Les dernières AGS à être découvertes sont celles de la classe IV (AGS11-13) et sont les moins bien comprises (P Zhang et al., 2015). Alors que les protéines AGS de la classe I agissent comme des GEF, celles de la classe II se comportent comme des inhibiteurs de dissociation de nucléotides (GDI) en se liant aux membres de la famille Gαi/o impliquant de un à quatre motifs GPR (*G protein regulatory*, aussi appelé motif GoLoco) présentes sur ces AGS, ce qui conduit à la stabilisation de la sous-unité Gα-GDP et à l'accumulation de Gβγ pouvant activer ses cibles en aval (Park, 2015; P Zhang et al., 2015). En se passant des contraintes présentes au sein de l'hétérotrimère Gα(GDP)βγ, les

AGS de classe III se lient directement à Gβγ et potentiellement à l'hétérotrimère tout en permettant à Gβγ d'entraîner une signalisation en aval (Yuan et al., 2007; Smrcka, 2008).

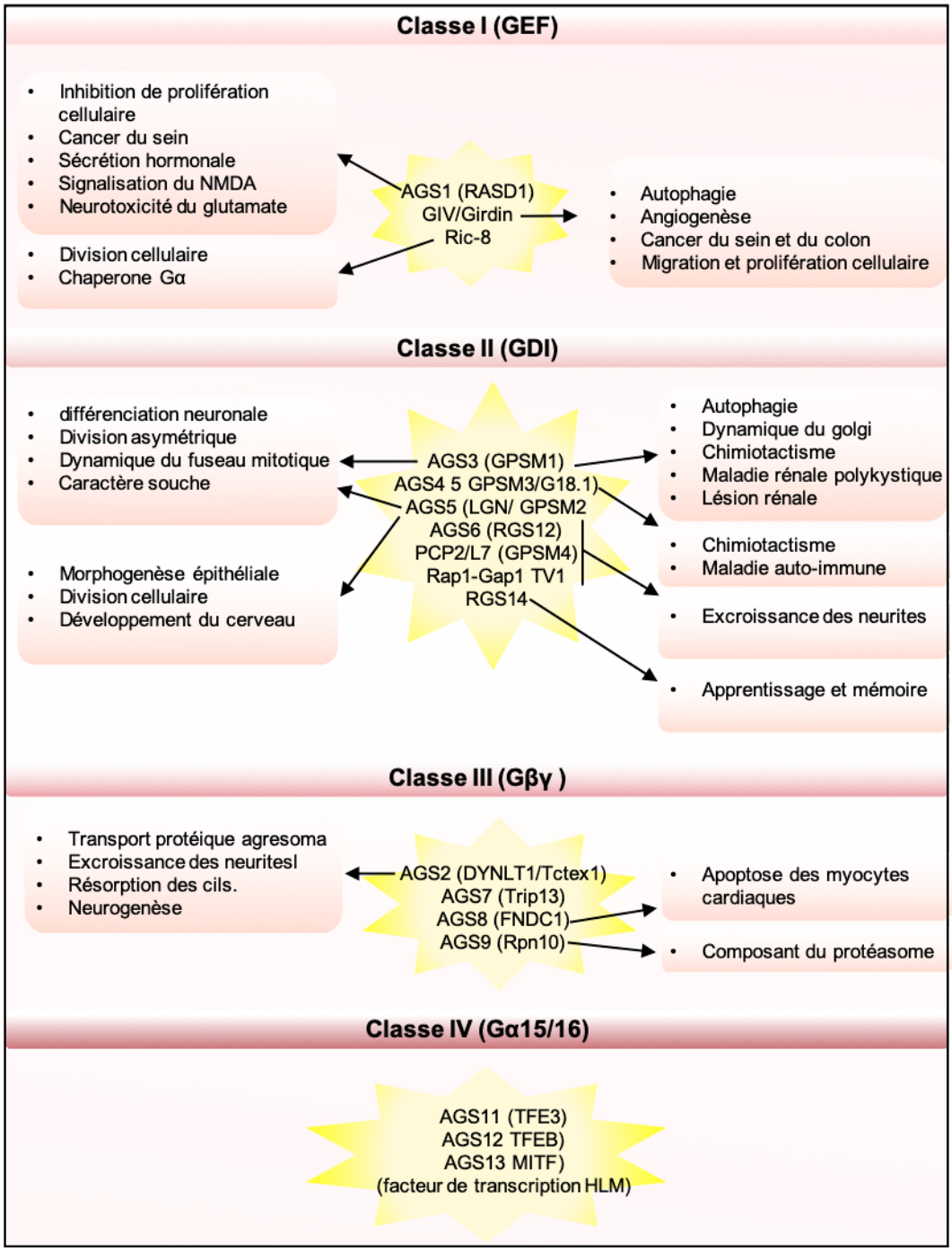


Figure 36. **Diversité des rôles des AGS et des protéines associées.** (Adaptée de Blumer et Lanier 2014). AGS : *Activators of G protein Signaling* ; DYNLT1 : *Dynein light chain Tctex-type 1* ; FNDC1 : *Fibronectin type III domain containing 1* ; Gap1 : *General amino-acid permease 1* ; GIV : *Gα-Interacting-Vesicle-associated protein* ; GPSM : *G-protein-signaling modulator* ; MITF : *Melanocyte inducing transcription factor* ; PCP2/L7 : *Purkinje cell protein 2 L7* ; Rap1 : *Ras-related protein 1* ; RASD1 : *Dexamethasone-induced Ras-related protein 1* ; RGS14 : *Regulator of G-protein signaling 14* ; Ric-8 : *Resistance to inhibitors of cholinesterase 8* ; TFE3, B : *Transcription factor E3, B* ; HLM : *Histone-like DNA-binding protein*.

Globalement, ces protéines AGS peuvent ainsi agir pour : 1) favoriser l'activation de protéines G en tant que GEF comme les RCPGs (Figure 37), 2) interférer avec les interactions des sous-unités lors du cycle d'échange de nucléotide et d'hydrolyse, 3) favoriser la dissociation ou le réarrangement des sous-unités de protéines G indépendamment de l'échange de nucléotides, 4) influencer le trafic des sous-unités de protéines G, et/ou 5) se lier aux sous-unités de protéines G de manière co-traductionnelle de sorte que le trimère Gαβγ ne se forme pas (Blumer et al., 2007; P Zhang et al., 2015). De nombreuses questions restent cependant à résoudre, notamment sur les régulateurs de l'activité des AGS, à savoir si Gα et Gβγ jouent un rôle dans la cellule indépendamment de la formation d'hétérotrimères en se complexant avec d'autres partenaires de liaison.

Il existe d'autres régulateurs de l'activation des protéines G indépendants des RCPGs tels que les protéines Ric-8 (*Resistance to inhibitors of cholinesterase-8*), les protéines à domaine GPR, les protéines contenant le motif GBA (*Gα-binding and activating*) ayant une activité GEF et les protéines contenant le domaine RGS (Coleman et al., 2016; Syrovatkina et al., 2016). Démontrées comme pouvant se lier à la forme inactive de Gαi/o, les protéines à domaine GPR, comme certaines AGS ou RGS (Takesono et al., 1999), favorisent la signalisation des protéines G en séquestrant la sous-unité Gα de Gβγ afin que Gβγ libre puisse interagir avec ses effecteurs et/ou en maintenant Gα sous une forme pouvant par exemple être activée par la protéine Ric-8A afin de prolonger la signalisation de la protéine G (Blumer and Lanier, 2014; Syrovatkina et al., 2016) (Figure 37).

En effet, les protéines Ric-8A/8B ont été initialement proposées en tant que GEF, mais leurs effets de signalisation peuvent être attribués à leur rôle de chaperons Gα (P Zhang et al., 2015). Ric-8A se lie aux protéines Gα-GDP, favorise la libération rapide du GDP et forme un complexe stable transitoire sans nucléotide avec Gα, qui est perturbé lors de la liaison du GTP, conduisant à la formation de Gα-GTP. Ainsi, Ric-8 diffère des RCPGs car ces derniers agissent sur l'hétérotrimère inactif Gα(GDP)Gβγ, tandis que Ric-8 n'agit que sur le monomère Gα(GDP) complexé ou non avec les protéines GPR (Syrovatkina et al., 2016).

Certains facteurs cytoplasmiques portant le motif GBA possèdent aussi une activité GEF *in vitro* pour les protéines de la famille Gαi et favorisent la signalisation de la protéine G dans les cellules, en générant le complexe Gαi-GTP ou Gβγ libre (Marivin et al., 2019). Bien que les RCPGs et GBA partagent une fonction commune, le mécanisme d'activation varie selon les différents types de GEF. Par exemple, les RCPGs exercent leur activité GEF plus efficacement en agissant directement sur les hétérotrimères Gαβγ intacts, alors que les protéines GBA

semblent aussi agir sur les monomères Gα après déplacement de Gβγ (DiGiacomo et al., 2018). Les protéines avec un motif GBA incluent les GIV (*Gα-Interacting-Vesicle-associated protein)* /Girdin qui interagissent uniquement avec Gα-GDP inactif et favorise ainsi la signalisation Gα.

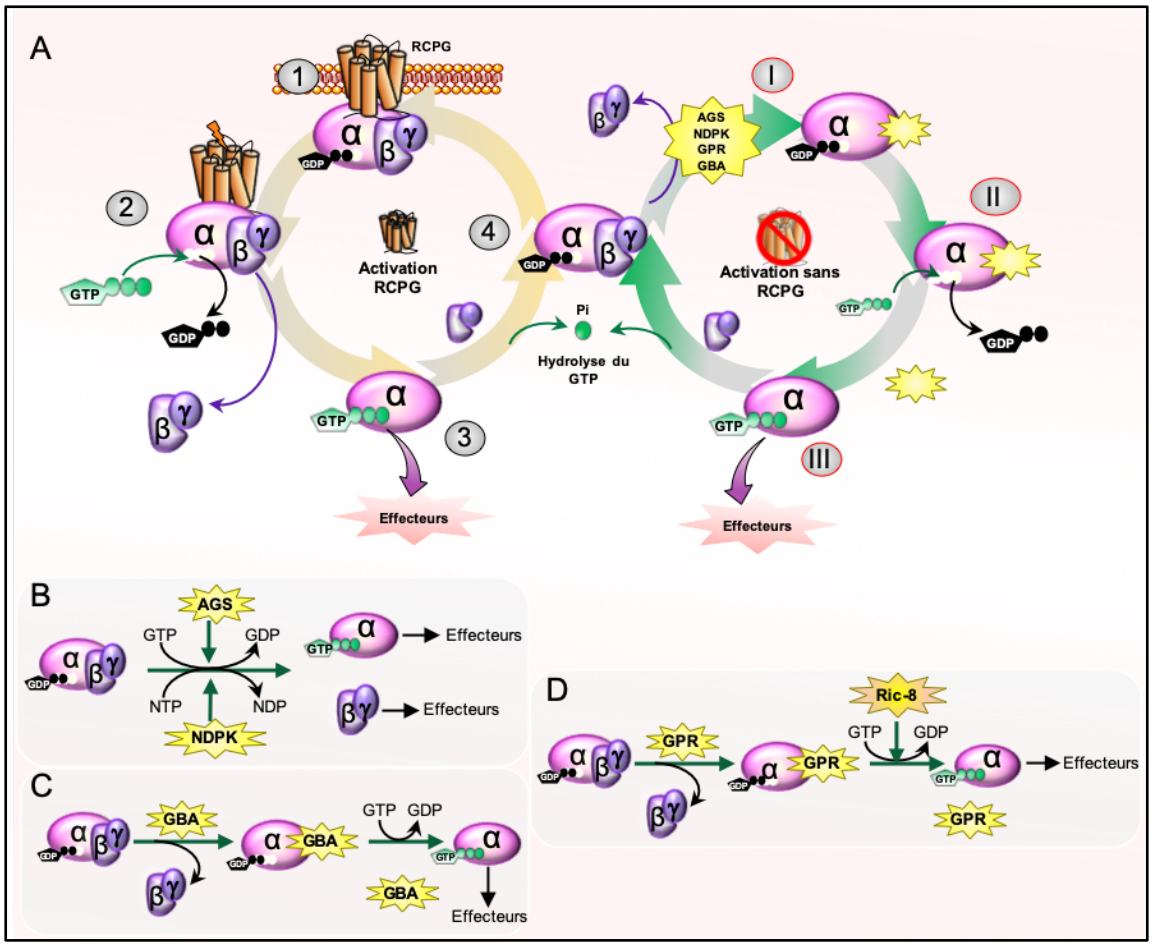


Figure 37. Représentation schématique de l'activation des protéines G hétérotrimérique dépendante et indépendante des RCPGs. A. Cycle d'activation/inactivation des protéines G hétérotrimériques par les RCPGs (gauche) et par d'autres régulateurs indépendants du RCPG (droite) détaillés en **B**, **C** et **D**. Les AGS agissent comme des GEF (**B**) qui favorisent l'échange de nucléotides sur Gα et libèrent du Gβγ dans un mécanisme similaire aux RCPGs. NDPK active les protéines G (**B**) *via* un mécanisme impliquant la formation d'un intermédiaire phosphate à haute énergie sur l'histidine 118 de NDPK. Les protéines GBA (**C**) et les GPR (**D**) agissent sur les sous-unités Gα monomériques suivi de la dissociation de Gβγ, après quoi s'effectue l'échange de GDP en GTP. (Adaptée de Zhang et al., 2015; Syrovatkina et al., 2016; DiGiacomo et al., 2018). AGS : activateurs de la signalisation des protéines G ; GBA : *Gα-binding and activating* ; GEF : facteur d'échange guanine-nucléotide ; GPR : *G protein regulatory* ; NDPK : Nucléosides diphosphate kinases ; Ric-8 : *Resistance to inhibitors of cholinesterase-8.*

Très récemment, un nouveau motif GEM (*guanine-nucleotide exchange modulator*s) de GIV/Girdin a été identifié (Kalogriopoulos et al., 2019). Il faut noter que les GEMs sont des protéines cytosoliques qui agissent uniquement en tant que GEF pour Gαi et en tant que GDI pour Gαs, utilisant toutes le même motif GEM conservé au cours de l'évolution. Les études structurelles ont démontré que GIV-GEM se lie à la sous-unité Gαi à l'interface de liaison

typique des effecteurs, la poche hydrophobe entre switch-II et l'hélice α3 de Gαi (Kalogriopoulos et al., 2019). Lors de la liaison, GIV-GEM perturbe la conformation du switch-II de Gαi et accélère l'échange GDP/GTP dans Gαi.

Le paradigme original de la signalisation de la protéine G dépendante du RCPG, qui prend naissance au niveau de la membrane plasmique, est maintenant considérablement étendu. L'expression et l'assemblage des protéines G, leur état d'activation et leur ciblage subcellulaire sont régulés par des mécanismes impliquant des partenaires d'interaction non canoniques ainsi que des modifications post-traductionnelles (Figure 40).

5.2.3. Les régulateurs de la signalisation des protéines G (RGS)

Au cours de l'activation des protéines G, la durée de vie de Gα-GTP est considérablement réduite par l'hydrolyse du GTP qui peut être accélérée par les membres de la famille des régulateurs de la signalisation des protéines G ou RGS. En fonctionnant principalement comme des GAPs (Hollinger and Hepler, 2002) renforçant l'activité GTPase intrinsèque de la sous-unité Gα, les protéines RGS inhibent les événements de signalisation relayées par Gα et Gβγ, jouant ainsi le rôle de modulateurs négatifs du cycle des protéines G. Chaque protéine RGS contient un domaine d'environ 120 acides aminés, appelé domaine RGS ou « RGS box », responsable de l'activité GAP (Hurst and Hooks, 2009). Elles peuvent antagoniser l'activation des effecteurs canoniques de Gα-GTP par compétition (P Zhang et al., 2015) et sont ainsi importantes dans le contrôle de la durée de vie de la transduction du signal des protéines G-RCPG. Divisées en plusieurs sous-familles (principalement RZ, R4, R7, R12, RA), toutes les protéines RGS contiennent le RGS box conservé et nécessaire à l'activité et à l'interaction avec les sous-unités Gα (Sierra et al., 2002; Hurst and Hooks, 2009; Baltoumas et al., 2013), tandis que certaines contiennent également des domaines supplémentaires qui confèrent une fonctionnalité additionnelle. L'interaction entre la boucle α5-α6 du RGS box et les régions switch de Gα accélère l'activité GAP, favorise l'état de transition pour l'hydrolyse du GTP dans le domaine de liaison aux nucléotides et facilite ainsi la désactivation de Gα (Tesmer et al., 1997; Syrovatkina et al., 2016). Cependant, le positionnement spécifique des RGS sur les sous-unités Gα dont elles vont augmenter l'activité GTPase, ne s'exerce pas seulement avec le RGS box mais aussi par l'intermédiaire d'autres domaines de RGS qui reconnaissent soit directement d'autres régions de Gα, soit la sous-unité Gβ, soit des protéines d'échafaudage. Par exemple, la Gβ5 interagit avec certaines RGS (RGS6, 7, 9, 11) par l'intermédiaire du domaine de liaison à la sous-unité Gγ. Cette interaction entraîne, de manière unique, la séparation des sous-unités Gβ et Gγ (Oldham and Hamm, 2006). Un autre site d'interaction avec les RGS se trouve au

niveau du domaine hélicoïdal de Gα qui est impliqué dans les interactions avec les RCPGs et les effecteurs (Baltoumas et al., 2013).

Il a été démontré que de certaines RGS peuvent réguler l'activité de plusieurs sous-unités Gα. Par exemple, RGS4 interagit avec Gαq et Gαi, et RGS16 peut réguler à la fois Gαi et de Gαo. D'autre part, certains domaines RGS présentent une spécificité vis-à-vis de leurs partenaires en interaction. C'est le cas de RGS2, qui est normalement exclusif à Gαq et est le seul membre connu de la sous-famille R4 à avoir une telle sélectivité (Baltoumas et al., 2013; Sjögren, 2017). Cependant, des mutations dans trois résidus spécifiques de RGS2 permettent des interactions avec Gαi3 sans affecter son activité GAP vis-à-vis de son partenaire d'origine (Kimple et al., 2009). Il existe d'autres interactions exclusives. Finalement, la spécificité de l'action des RGS peut dépendre d'abord du type de sous-unité Gα, du récepteur mais aussi du niveau d'expression de la protéine RGS (Neubig and Siderovski, 2002). En effet, les RGS peuvent être surexprimées ou sous-exprimées différemment dans certaines situations physiopathologiques notamment le cancer (Hurst and Hooks, 2009). Plus particulièrement, RGS2 est significativement sous-exprimée dans le cancer de la prostate indépendant des androgènes et dans la leucémie myéloïde aiguë. L'axine, une RGS atypique, montre quant à elle une sous-expression dans le cancer colorectal métastatique, tandis que RGS5 est surexprimée dans le carcinome hépatocellulaire et le système vasculaire du carcinome rénal.

L'identification des protéines RGS à domaines multiples, a permis de suggérer d'autres fonctions des RGS au-delà de leur activité GAP. Dans ce contexte, Hart et ses collègues ont découvert un autre domaine fonctionnel RGS dans l'extrémité N-terminale de la protéine p115-RhoGEF, connue comme une GEF de RhoA (Hart et al., 1998). La p115-RhoGEF, ainsi que les protéines apparentées structurellement comme PDZ-RhoGEF et LARG, interagissent avec les sous-unités Gα12 et Gα13 activées, par leur domaine RGS de l'extrémité N-terminale (Neubig and Siderovski, 2002). Ces travaux furent les premiers à mettre en évidence qu'une protéine contenant un domaine RGS agit en tant que GAP pour Gα12 ou Gα13 et qu'une protéine RGS peut servir à la fois d'effecteur et de régulateur négatif de la signalisation de la protéine G (Hart et al., 1998; Neubig and Siderovski, 2002).

6. Les modifications des protéines G

6.1. Régulation post-transcriptionnelle de l'expression des protéines G

Le niveau d'expression des ARNm codant les protéines G est régulé dans différentes conditions physiologiques. Bien que les changements dans l'expression des ARNm se traduisent souvent par des variations corrélées à l'expression des protéines, les mécanismes post-transcriptionnels épigénétiques impliquant des micro-ARN (miARN ou miR-) et des chaperons moléculaires jouent un rôle important dans la détermination des niveaux d'expression des protéines G (P Zhang et al., 2015).

Les miARN régulent généralement négativement l'expression des gènes en réprimant la traduction de l'ARNm et/ou en favorisant la dégradation de l'ARNm par liaison à leurs régions 3' non traduites ou directement à la séquence codante du gène cible (Huang et al., 2011). À ce jour, les quelques études portant sur la régulation des protéines G par des miR concernent principalement le domaine du cancer. En effet, il a été décrit que les miR-182 et les miR-200a inhibent spécifiquement la sous-unité Gα13, un médiateur important de l'invasion des cellules du cancer de la prostate (Rasheed et al., 2013). De plus, dans les cellules de cancer du sein, l'expression du gène codant Gα13 est réduite par des mécanismes post-transcriptionnels impliquant miR-31 qui régule partiellement l'invasion cellulaire en ciblant l'expression de GNA13 (Rasheed et al., 2015). Gαi2 a aussi été identifiée comme une cible directe du miR-30d, qui joue un rôle dans l'invasion et les métastases tumorales de carcinome hépatocellulaire (Yao et al., 2010). Il a aussi été suggéré un lien entre le miR-328 et Gγ7 du fait d'une corrélation inverse de leurs niveaux d'expression dans 16 lignées de cellules cancéreuses de l'œsophage (Ohta et al., 2008), mais le lien fonctionnel doit être confirmé (P Zhang et al., 2015). Cette piste dans le domaine du cancer doit notamment être explorée.

En ce qui concerne les chaperons, ils jouent un rôle clé dans l'assemblage des sous-unités Gα, Gβ, et Gγ de la protéine G. En effet, les sous-unités Gβ et Gγ sont intrinsèquement instables et, à l'exception de Gβ5, elles forment très souvent des dimères qui fonctionnent essentiellement comme une protéine unique avec cependant des fonctions distinctes basées sur la spécificité de l'assemblage Gβ et Gγ (P Zhang et al., 2015). Cet assemblage de Gβγ dans le cytoplasme est étroitement régulé et nécessite des chaperons (Figure 38) pour un repliement correct et une stabilisation de ces protéines (Willardson and Tracy, 2012). Comme illustré sur la Figure 38A, la chaperonine cytosolique (*chaperonine-containing T-complex protein 1* (TCP-1)) ou CCT aide la sous-unité Gβ nouvellement synthétisée à adopter sa structure en *β-propeller*. La PhLP1 (*Phosducin-like protein 1*) agit ensuite comme un co-chaperon qui stabilise le complexe ternaire avec CCT et Gβ lorsqu'elle n'est pas phosphorylée. Lors de sa phosphorylation par la caséine

kinase 2, le complexe PhLP1-Gβ est libéré de la CCT, ce qui permet à Gβ de s'associer à Gγ (Lukov et al., 2006; Dingus and Hildebrandt, 2012; Willardson and Tracy, 2012). DRiP78 (protéine d'interaction du récepteur de la dopamine 78) agit comme chaperon de certaines isoformes de Gγ pour la liaison à la membrane du RE avant l'assemblage avec Gβ, assurant la stabilité et facilitant le repliement (Dupré et al., 2007; Dingus and Hildebrandt, 2012). De manière intéressante, l'isoforme court de PhLP1 largement exprimée dans les tissus humains, perturbe le repliement et l'assemblage de Gβ avec Gγ en formant un complexe tertiaire inactif avec CCT et Gβ en cours de synthèse, réduisant ainsi nettement l'expression de Gβγ (Gao et al., 2013; P Zhang et al., 2015). Cette isoforme peut également inhiber au niveau transcriptionnel l'expression de Gα (Gao et al., 2013). Finalement, il y a actuellement très peu de données sur l'implication des chaperons dans l'expression et le repliement de Gα. Les protéines Ric-8A/B sont les rares à être décrites comme jouant un rôle clé dans le repliement post-traductionnel des sous-unités Gα naissantes des quatre familles (Figure 38B), dans l'assemblage de l'hétérotrimère Gαβγ ainsi que son association membranaire (Gabay et al., 2011).

6.1. Régulation des facteurs de transcription par les protéines G

Les cascades de signalisation impliquant l'activation spécifique des protéines G par les RCPGs, ou indépendant des RCPGs, ont été largement étudiées et de plus en plus de preuves indiquent que les quatre familles de protéines G peuvent utiliser des voies uniques, distinctes ou communes pour la régulation de la transcription de nombreux gènes impliqués dans de très vastes processus physiologiques et physiopathologiques. La régulation de principaux facteurs de transcription ainsi que quelques fonctions cellulaires associées sont résumées dans le Tableau 5.

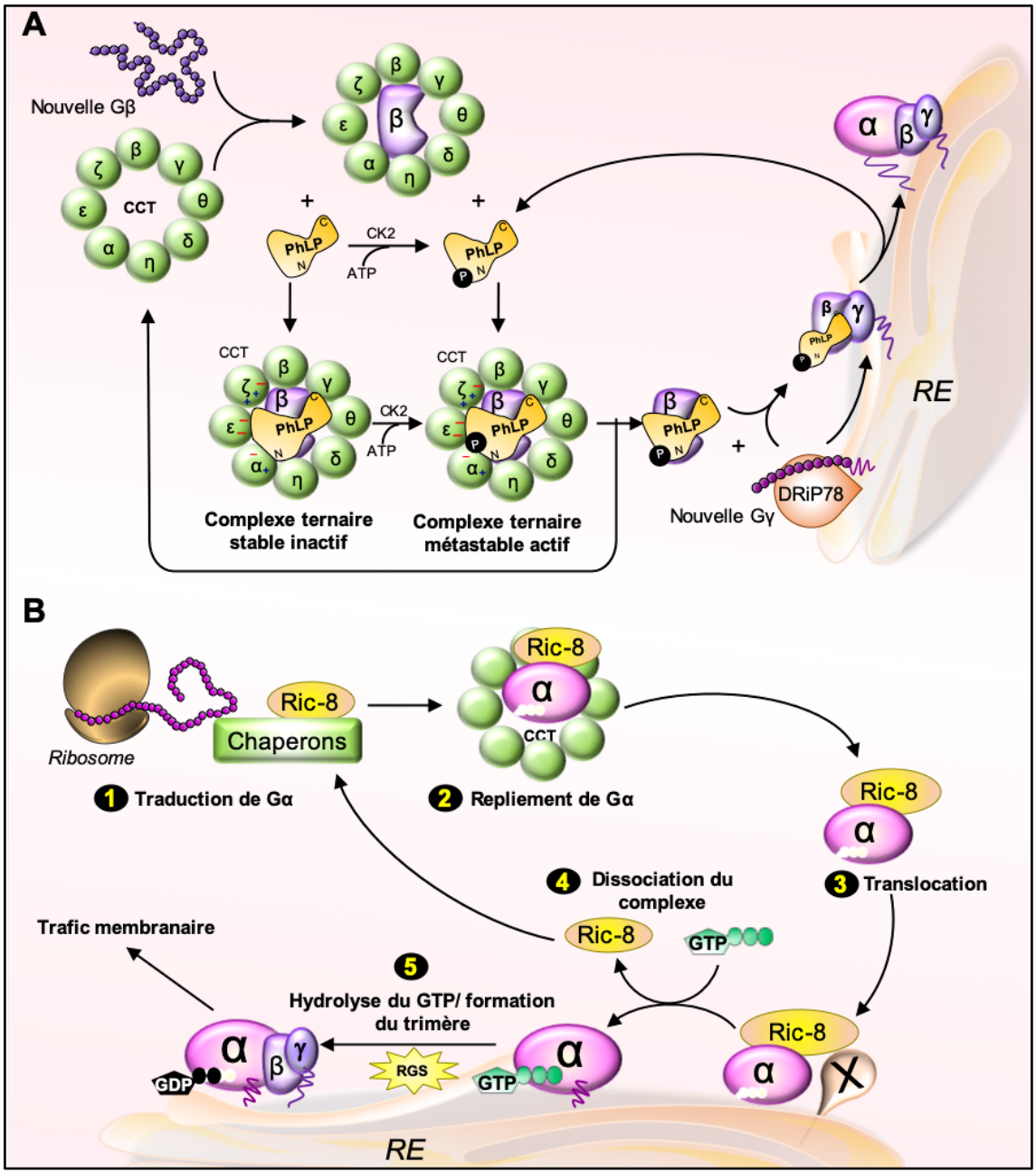


Figure 38. Régulation des protéines G par les chaperons. A. Modèle d'assemblage de Gβγ depuis la synthèse de la chaîne Gβ nouvellement synthétisée à la formation de l'hétérotrimère. La phosphorylation de PhLP déstabilise le complexe ternaire, éventuellement par répulsion électrostatique entre les phosphates du site de phosphorylation (P) sur PhLP et les résidus chargés négativement sur les domaines CCT α ou ε. (Adapté de Lukov et al., 2006; Willardson et Tracy 2012). **B.** Modèle d'action de Ric-8 et du chaperon pendant la biosynthèse de la protéine Gα. (1) La chaine Gα nouvellement synthétisée forme un complexe tertiaire avec Ric-8 et CCT des chaperons lors de son repliement initial (2). (3) Le complexe Ric-8-Gα est ensuite transloqué vers un facteur d'encrage (X) putatif de la membrane du RE, qui peut également servir d'activateur cellulaire de la stimulation de l'activité GEF de Ric-8, permettant ainsi la dissociation de Ric-8 et la production de Gα-GTP lié à la membrane (4). Le GTP de Gα est ensuite hydrolysé (5), éventuellement à l'aide de spécifiques RGS GAP. La résultante Gα(GDP) se lie à Gβγ avant que l'hétérotrimère Gαβγ nouvellement formé ne parvienne à la membrane plasmique. (Adapté de Gabay et al., 2011). CCT : *Cytosolic chaperonin-containing t-complex* ; DRIP78 : *Dopamine receptor-interacting protein 78* ; PhLP : *Phosducin-like protein* ; RE : *Endoplasmic reticulum* ; Ric-8 : *Resistance to inhibitors of cholinesterase-8* ; RGS : *Regulator of G protein signaling.*

Famille Gα	Facteurs de transcription régulés	Les intermédiaires de signalisation	Type de Cellule/Tissue	Fonctions possibles
Gαs	CREB	AC, PKA, DARPP-32, PP1	Neurones	Apprentissage et mémoire
	NF-ATc	mAKAP, calcineurin Aβ, RyR2	Cardiomyocytes	Hypertrophie cardiaque et transformation cellulaire
	NF-κB c-Jun MEF2C c-fos / Fra-1	Epac1, PKA, ERK5, PDE4D3, mAKAP	Cardiomyocytes	Hypertrophie cardiaque et transformation cellulaire
	STAT3	PKA, JAK2/3, Rac1, JNK, PI3K, Src, Ras, Raf-1, MEK1/2	Divers fibroblastes	Transformation cellulaire
Gαi/o	Gli1-3	AC, PKA, GSK3	Fibroblaste embryonnaire de souris	Signalisation développementale médiée par Smoothened
	Lef / Tcf	PDE6, PKG, α-catenin	Tératocarcinome F9	Signalisation développementale médiée par Wnt/Frizzled2
	NF-κB	Src, ERK, IKK, PI3K, JNK, CaMKII	U87 astrocytome; SH-SY5Y neuroblastome	Libération des cytokines ; actions morphiniques aiguës et chroniques
	Six1/4	Eya2	Myoblaste	Suppression de la transcription myogénique
	STAT3	Rap1GAPII, Rap1, Ral, Src	Neurone, Cellules neuro2A	Excroissance des neurites
Gαq/11	NF-AT	PLCβ, PKC, ERK1/2	Cellules-T	Signalisation des récepteurs des cellules-T
	NF-κB	PI3K, Akt, PLCβ, PKC, ERK1/2, c-Src, JAK2/3	Cellules immunitaires, AR4J Cancers pancréatiques, Cellules Reh	Actions chimioattractantes ; réponses inflammatoires
	STAT1/3, c-fos	PLCβ, TPR1, PKC, CaMKII, Ras, Raf-1, MEK, ERK1/2, c-Src, JAK2/3	Érythroleucémie HEL	
	TULP3	PLCβ	Adipocytes ; neurones	Stockage de graisse ; Développement neuronal
Gα12/13	AP-1, c-Jun, NF-κB	p115RhoGEF, Ras, Rac, JNK, p38	Fibroblastes, 1321N1 Astrocytomes	Prolifération cellulaire et migration
	c-fos, Egr-1, SRF	RhoGEF, Rho	Cellules NIH3T3	Réarrangement du cytosquelette
	Glis2, Kaiso,	E-cadherin, p120^{ctn}	SW480 et DLD1 cancer colorectal, Cellules MDCK et HCT116	Adhésion cellulaire ; Métastase tumorale
	Lcf / Tef	Cadherins, β-catenin	Cellules SW480, MDCK cells	Adhésion cellulaire ; Métastase tumorale
	NF-AT	Rac, NADPH oxidase, JNK	Myofibroblastes, Cellules HeLa	Transformation cellulaire
	STAT3	PDGF α, PI3K, JAK, Src	Divers fibroblastes	Transactivation de PDGFα
Gβγ	AEBP1	G γ_5 (direct binding)	Cellules 3T3-L1	Aide aux événements de transcription adipogéniques
	c-Jun	Src, PLCβ, JNK	U87 astrocytome	Expression des cytokines
	GR	G$\beta_2\gamma_2$ (direct binding)	Cellules GH3, HCT116	Supprimer la transcription des gènes médiée par GRE
	NF-AT	PLCβ, PKC, CaMKII, calcineurin	Tératocarcinome F9	Signalisation développementale médiée par Frizzled2
	MEF2C	HDAC5	Cellules HEK293	Faciliter la transcription médiée par MEF2C

Tableau 5. Régulation de l'activité transcriptionnelle par les protéines G. Après leur activation canonique et/ou non canonique, les différentes familles des protéines G incluant Gαs, Gαi/o, Gαq/11 ainsi que le dimère Gβγ exploitent de nombreuses voies de signalisation pour réguler l'activité transcriptionnelle de gènes impliqués dans de processus cellulaires tels que la prolifération, la migration et les métastases parmi d'autres fonctions. (D'après M. K. C. Ho et al., 2009). AC : Adénylyl-cyclase ; AEBP1 *: AE binding protein 1* ; mAKAP : *Muscle-specific A-kinase anchoring protein* ; Akt : Proteine

kinase B ; AP1 : *Activator protein 1* ; CAMKII : *Calmodulin kinase II* ; CREB : *cAMP response element-binding protein* ; EGR-1 : *Early growth response factor 1* ; ERK : *Extracellular-signal-regulated kinase 1/2* ; EPAC1 : *Exchange protein directly activated by cAMP type 1* ; DARPP-32 : *Dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein 32* ; FRA1 : *Fos-related antigen 1* ; GLIS2 : *Neuronal Krueppel-Like Protein 2* ; GLI1-3 : *glioma associated oncogene 1-3* ; GSK3 : *glycogen synthase kinase 3* ; HDAC5 : *histone deacetylase 5* ; IKK : *IkappaB kinase* ; JAK2/3 : *Janus kinase 2/3* ; JNK : *c-Jun N-terminal kinase* ; Kaiso : ou ZBTB33 (*Zinc Finger And BTB Domain Containing 33*) ; MEF2C : *Myocyte enhancer factor 2C* ; MEK1/2 : *Mitogen activated protein kinase 1/2* ; NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate ; NF-κB : *Nuclear factor-kappa B* ; NF-ATc : *Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic* ; P120CTN : ou CTNND1 (*Catenin delta-1)* ; PDE6 : *Phosphodiesterase 6* ; PDE4D3 : *cAMP-specific phosphodiesterase-4D3* ; PI3K : *Phosphoinositide 3-kinase* ; PKA, C, G : Protéine kinase A, C, G ; PLCβ : *Phospholipase C beta* ; PP1 : *Protein phosphatase 1* ; Rac1 : *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1* ; RAL : *Ras-related protein* ; Rap1 : *Ras-related protein 1* ; Rap1GAPII : *Rap1 GTPase activating protein 2* ; RhoGEF : *Rho guanine nucleotid exchange factor* ; RyR2 : *Ryanodine receptor 2 (cardiac)* ; SIX : *Transcription factor SIX Homeobox* ; Src : *Proto-oncogene tyrosine-protein kinase* ; SRF : *Serum response factor* ; STAT3 : *Signal transducer and activator of transcription 3* ; TCF/LEF : *T-cell factor/lymphoid enhancer-binding factor* ; TPR1 : *Tetratricopeptide repeat 1* ; TULP3 : *TUB Like Protein 3.*

6.1. Les modifications post-traductionnelles des protéines G

6.1.1. Modifications lipidiques des protéines G et leur trafic membranaire

Les modifications lipidiques permettent l'association de l'hétérotrimère Gαβγ à la membrane, et c'est surtout la plupart des sous-unités Gα et Gγ qui sont concernées par ces modifications, *i.e.* essentiellement palmitoylation, myristoylation, et l'isoprénylation. Les sous-unités Gα sont surtout concernées au niveau de la face cytoplasmique de la membrane plasmique par des palmitoylations lipidiques réversibles (Tsutsumi et al., 2009).

En fait, toutes les sous-unités Gα, sauf celles de la transducine, subissent une palmitoylation post-traductionnelle par addition d'acides gras saturés à 16 carbones sur un ou plusieurs résidus de cystéine à l'extrémité N-terminale de Gα. Les travaux de Tsutsumi et al., (2009) ont permis d'identifier DHHC3 et DHHC7 (*motif Asp-His-His-Cys palmitoyl acyltransferase*), enzymes responsables de ces modifications. Pendant que certaines Gα sont palmitoylées sur un seul site (Gαs et Gα12), d'autres le sont sur deux sites potentiels (Gαq et Gα13), mais dans tous les cas, la modification a lieu près de l'extrémité N-terminale (Chen and Manning, 2001).

Seules les membres de la famille Gαi/o sont des cibles pour une myristoylation sur l'extrémité N-terminale (Milligan and Kostenis, 2006). Cette myristoylation sur Gαi/o s'effectue sur la glycine N-terminale par ajout de l'acide myristique à 14 atomes de carbone saturés (Milligan and Kostenis, 2006; Oldham and Hamm, 2006). La myristoylation est le premier signal menant à une interaction transitoire de Gαi/o avec la membrane et la palmitoylation est le deuxième signal qui sert à assurer l'ancrage des protéines à la membrane (Oldham and Hamm, 2006).

Bien que la palmitoylation des Gα soit un facteur déterminant du ciblage membranaire de Gαβγ, les modifications lipidiques des sous-unités Gγ sont aussi importantes. D'ailleurs, ces sous-unités Gγ sont isoprenylées grâce au motif CAAX sur leur extrémité C-terminale qui peut spécifiquement être farnésylée ou géranylgéranylée en fonction de l'identité des acides aminés C-terminaux de certaines sous-unités Gγ (Milligan and Kostenis, 2006). Par exemple, Gγ1 est farnésylée, alors que Gγ2 est plutôt géranylgéranylée. L'ensemble des groupements farnésyl ou géranylgéranyl est fixé à Gγ *via* une liaison thioester stable à la cystéine située dans le motif CAAX C-terminal (Clapham and Neer, 1997; Michaelson et al., 2002). La localisation endomembranaire de Gγ1 farnésylée, mais pas de Gγ2 géranylgéranylée, nécessite une méthylation de carboxyl. La farnésylation ou la géranylgéranylation des sous-unités Gγ ne semble pas requise pour la dimérisation de Gβγ mais apparaît indispensable à sa localisation membranaire (Clapham and Neer, 1997). De manière intéressante, pour les sous-unités Gα qui ne sont pas myristoylées, toute perturbation empêchant la palmitoylation peut nuire considérablement à l'association membranaire. Dans ce cas, le groupe isoprényl sur Gγ peut agir comme premier signal, conduisant à la liaison membranaire et à la palmitoylation (Oldham and Hamm, 2006). Les sous-unités Gβ ne sont pas modifiées mais reste étroitement associées à la sous-unité Gγ (Michaelson et al., 2002).

L'ensemble de ces modifications des protéines G sont importantes pour le ciblage à la membrane plasmique et donc pour leur fonctionnement. Après une traduction cytoplasmique, le transport de Gαβγ à la membrane plasmique nécessite ainsi la co-expression des trois sous-unités incluant au moins l'isoprénylation de Gγ sur le motif CAAX avec la modification d'acides gras (palmitoylation) de Gα. L'association de ces deux signaux distincts, initialement dans le Golgi (Figure 39), ne sert pas simplement à stabiliser la liaison à la membrane plasmique mais coopèrent aussi pour la translocation de l'hétérotrimère à la membrane plasmique *via* le trafic des endomembranes (Michaelson et al., 2002). Ces modifications peuvent également jouer un rôle en favorisant la liaison aux effecteurs ou par inhibition de l'association avec les protéines activant la GTPase (Chen and Manning, 2001).

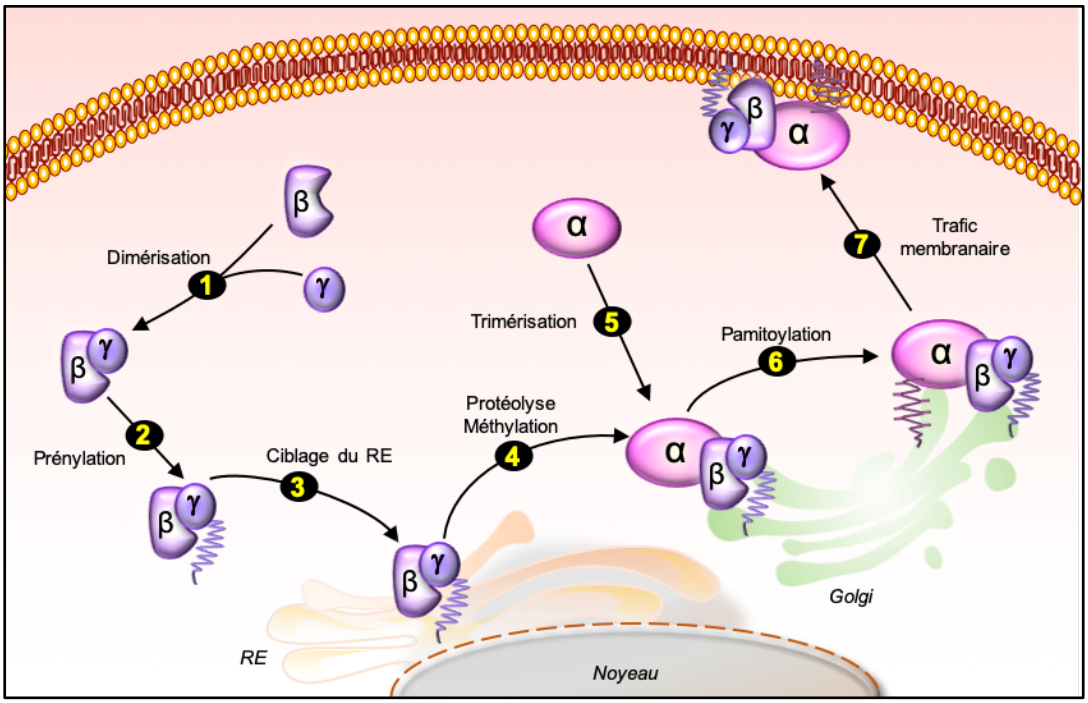


Figure 39. Modèle de modification lipidique et trafic membranaire des protéines G hétérotrimériques. Après la synthèse des sous-unités de protéines G sur des polysomes libres dans le cytosol, Gβ et Gγ se dimérisent immédiatement (1) avant ou après la prénylation de Gγ. La prénylation de Gγ (2) entraîne le dimère Gβγ vers la face cytosolique du RE (3), où son domaine CAAX rencontre la carboxyméthyltransférase (4). Le dimère Gβγ entièrement traité est ensuite acheminé vers la face cytosolique du Golgi, où il recrute Gα (5), qui est ensuite acylé par une acyltransférase du Golgi (6). L'acylation permet à l'hétérotrimère d'être transporté sous forme d'holoenzyme à la membrane plasmique (7) *via* la voie de sécrétion classique par exemple. (Adapté de Michaelson et al., 2002).

6.1.2. Phosphorylation des protéines G

La plupart des études sur la phosphorylation des protéines portaient principalement sur des kinases spécifiques connues pour être situées en aval de la signalisation relayée par la protéine G. Récemment, l'implication de certaines de ces kinases dans la phosphorylation des protéines G a été clairement mise en évidence (Chakravorty and Assmann, 2018). Notamment, la PKA et la PKC ainsi que les tyrosines kinases sont capable de phosphoryler des sous-unités Gα (Tableau 6). Les premières études ont montré que la phosphorylation des sous-unités Gαi2 et Gα13 sont relayées par une PKA. Plus tard, de nombreux sites de phosphorylation aux motifs consensus ont été identifiés sur la plupart des sous-unités Gα (Neuberger et al., 2007). Il a aussi été démontré que la PKC peut phosphoryler Gαz sur les sites p21, S16 et S27, Gα12 ainsi que Gα15 de la famille Gαq (Fields and Casey, 1995; Chakravorty and Assmann, 2018). Cette phosphorylation semble spécifique de la forme monomérique de Gα car Gβγ inhibe ce mécanisme (Chen and Manning, 2001). Cette observation n'est pas surprenante, car Gβγ peut se lier au domaine N-terminal (parmi d'autres régions) des sous-unités de Gα et empêche donc la PKC par encombrement stérique. De même, la phosphorylation de Gα empêche sa liaison à

Gβγ et aux RGS suggérant un prolongement de l'état actif lié au GTP par la PKC (Chen and Manning, 2001), bien que les impacts résultants sur l'activité des effecteurs restent peu connus. Il est intéressant de noter que la phosphorylation en S336 de Gα15 par la PKC, se produit dans une séquence consensus présente dans le domaine C-terminal spécifique de la sous-unité α. Ce domaine de Gα15 est aussi une région d'interaction avec les récepteurs et sa phosphorylation peut affecter cette interaction (Chakravorty and Assmann, 2018).

La phosphorylation par les protéines tyrosines kinases a également été décrite comme mécanisme de régulation de la signalisation des protéines G. Par exemple, la stimulation par le carbachol du récepteur M1R provoque la phosphorylation de Gαq et Gα11 (Umemori et al., 1997). La phosphorylation de Gαq/11 par les tyrosines kinases de la famille v-src augmente son pouvoir stimulateur direct sur l'activité de la PLC *in vitro* (Liu et al., 1996), suggérant un rôle de la phosphorylation d'une tyrosine dans la modulation de l'efficacité du couplage Gαq/11/effecteur. La tyrosine kinase proto-oncogène $p60^{c\text{-}src}$ est aussi directement impliquée dans la phosphorylation des sous-unités Gα (Chakravorty and Assmann, 2018), notamment sur Y37 et Y391 de Gαs, favorisant la liaison au GTPγS et l'hydrolyse du GTP stimulée par le récepteur β2AR (Hausdorff et al., 1992).

Les sous-unités Gγ peuvent aussi être phosphorylée par la PKC avec pour conséquence une interaction plus étroite avec les sous-unités Gα mais moins forte avec certains effecteurs (Chen and Manning, 2001). Il a été démontré que Gγ12 est un substrat de la PKC *in vivo* et que sa phosphorylation sur la première serine favorise la formation de l'hétérotrimère Gαoβ1γ1 (Yasuda et al., 1998). De plus, la phosphorylation de Gγ induite par la PKC n'affecte pas l'activation de la PLCβ par Gβ1γ12, mais diminue l'aptitude du dimère à activer l'ACII (Yasuda et al., 1998). D'autres études ont plutôt constaté que la phosphorylation de Gβ par PKA et PKC augmente au contraire l'activité de l'AC induite par Gβγ (Chakrabarti and Gintzler, 2003). Globalement, le rôle de la phosphorylation des protéines G dans l'interaction et l'activité des effecteurs, peut être spécifique aux différentes sous-unités et aux effecteurs concernés.

L'ensemble de ces données indique que les protéines G, au même titre que les RCPGs, sont des protéines clés de la signalisation, dont les niveaux d'expression, les régulations post-traductionnelles, les nombreuses régulations et contrôles des effecteurs jouent des rôles absolument fondamentaux dans les mécanismes de signalisation cellulaires. A ce degré de diversité et plasticité, s'ajoute des protéines G plus méconnues dont le comportement diffère de celui des autres protéines G, tel le cas de la protéine Gα15/16.

Sous-unités	Phosphosites	Kinase (s)	Fonction de la phosphorylation
Gαi2	S44/S144/S302	PKC	Favorise la désensibilisation des récepteurs μ-opioïdes induite par la morphine
Gαz	S16	PKA	Inhibe la liaison Gβγ
	S16/S27	PKC	Inhibe la liaison Gβγ aux RGS
Gαs	Y37/Y391	SRC	Favorise l'hydrolyse du GTP et la liaison au GTPγS stimulée par le récepteur
Gαq	S53	YpkA	Empêche la fixation du GTP/ l'activation de Gα
	Y356	PMT	Potentialise l'activation de Gαq stimulée par un agoniste et donc l'activation de PLCβ
Gα11	S154	CaMK	Réduit l'activation de PLC-β stimulée par un agoniste
	Y356	Tyrosine Kinase	Réduit l'interaction des récepteurs (M1)
Gα15	S336	PKC	Favorise le couplage des récepteurs (M2 et β2AR)
Gα13	T203	PKA	Réduit l'activation de Rho médiée par Gα13
Gγ12	S2	PKC	Augmente l'affinité à Gαo et réduit la stimulation de l'ACII par Gβγ (aucune modification de la stimulation de la PLCβ)

Tableau 6. Les phosphosites des protéines G et les fonctions connues dans la signalisation. (D'après Chakravorty et Assmann 2018). ACII : *Adenylyl-cyclase 2* ; β2AR : *beta-2 adrenergic receptor* ; CaMK : *Calmodulin kinase* ; M1/2 : *Muscarinic acetylcholine 1/2* ; PKA : Proteine kinase A ; PKC : Proteine kinase C ; PLCβ : *Phospholipase C beta* ; PMT : *Phosphoethanolamine N-Methyltransferase* ; RGS : *Regulator of G protein signaling* ; Src : *Proto-oncogene tyrosine-protein kinase* ; YpkA : *Yersinia protein kinase A*.

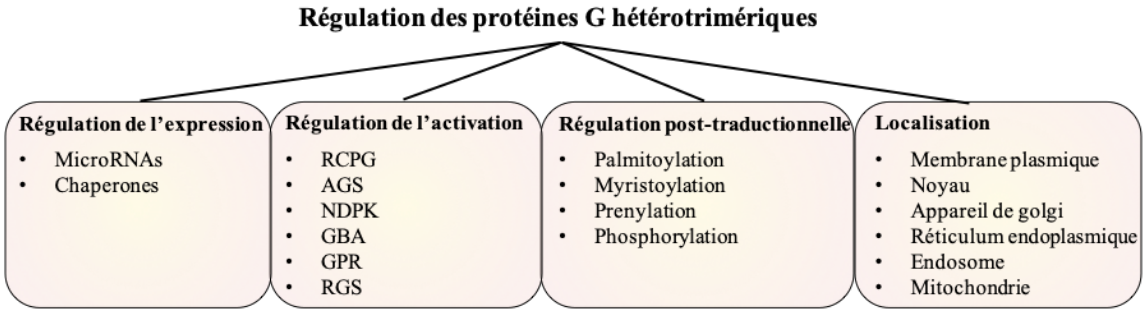


Figure 40. Les facteurs impliqués dans la modulation de la signalisation des protéines G hétérotrimériques. Parmi ces facteurs, il y a ceux impliqués dans la régulation de l'expression, de l'activation des protéines G et de leurs modifications post-traductionnelles, influençant ainsi leurs localisations membranaires et dans les organites subcellulaires ainsi que leurs fonctions. (Adapté de Zhang, et al., 2015). AGS : activateurs de la signalisation des protéines G ; GBA : *Gα-binding and activating* ; GEF : facteur d'échange guanine-nucléotide ; GPR : *G protein regulatory* ; NDPK : nucléosides diphosphate kinases ; RGS : *Regulator of G protein signaling*.

7. Rôle des protéines G dans la physiopathologie du cancer

Notre compréhension des fonctions des protéines G qui relayent les signaux des RCPGs, dans le fonctionnement des cellules tumorales est encore très fragmentaire et presque inconnue dans le contexte des gliomes. Des études émergeantes ont récemment permis de montrer que la perturbation des gènes (mutations, nombre de copies,…) codant les protéines Gα, β ou γ et leurs effecteurs est impliquée dans la régulation de la prolifération, de l'invasion et/ou de la migration chimiotactique de cellules cancéreuses essentielles à l'établissement des métastases (Tableau 7) (Dorsam and Gutkind, 2007; Entschladen et al., 2011; Cherry and Stella, 2014; Iglesias-Bartolome et al., 2015). Ces protéines constituent ainsi des cibles d'intérêt pour le développement de nouvelles thérapies.

7.1. Implication des protéines G dans la Survie/Prolifération/Invasion

L'activation des protéines G par remplacement du GDP de la sous-unité Gα par le GTP favorise la dissociation des sous-unités Gβγ qui avec Gα-GTP concourt, comme nous l'avons déjà vu, à initier plusieurs cascades de signalisation en aval, des mécanismes impliqués dans la survie, la prolifération et l'invasion tumorales. Quelques études sur l'implication des protéines G dans ces processus doivent être évoquées. Par exemple, le rôle de la sous-unité Gαs et du dimère Gβγ dans la croissance tumorale a été évalué dans le cancer du côlon (Castellone et al., 2005; Shao et al., 2005). La prostaglandine E2 (PGE2) en se fixant à son récepteur EP2 (EP2R) provoque d'une part, la libération de sous-unités Gβγ qui stimulent Akt (ou PKB, protéine kinase B) *via* la PI3K et d'autre part, la fixation de la sous-unité Gαs de manière concomitante au domaine RGS de l'axine et l'activation de Akt *via* la PKA (Hino et al., 2005). L'association Gαs-axine libère GSK-3β (*glycogen synthase kinase*) du complexe GSK-3β/axine/β-caténine, GSK-3β est ensuite phosphorylée et inactivée par Akt, ce qui conduit à la stabilisation et à la translocation nucléaire de la β-caténine, pour induire l'expression de gènes favorisant la prolifération et l'invasion tumorale (Figure 41, 1). Très récemment, Konishi et ses collègues ont résumé les nœuds de signalisation impliquant Gαq/11 comme médiateur de la signalisation de l'acétylcholine (Ach) sécrété par les cellules du microenvironnement de cancers gastro-intestinaux (Konishi et al., 2019a). Ainsi, la liaison de l'Ach à son récepteur M3R active Gαq/11, qui régule la prolifération, la survie et la tumorigenèse gastro-intestinale en activant diverses voies de signalisation telles que les MAPKs, Akt, YAP (*yes-associated protein*) et Wnt (Figure 41, 2) (Konishi et al., 2019a). La croissance et l'invasion des GBMs relayées par la chimiokine CXCL12 (ou SDF-1) sont principalement controlées *via* la voie Gαi (Yang et al., 2007). En utilisant des lignées de GBMs (U87) et de médulloblastome (Daoy), Yang et al., ont

montré pour la première fois que le niveau intracellulaire d'AMPc est réduit de 45% dans les U87 et 70% dans les Daoy comparativement aux cellules contrôles, après traitement avec SDF-1. Cette réduction de l'AMPc induite par SDF-1 est bloquée par la forskoline (activateur de l'AMPc). De plus, la croissance tumorale *in vitro* et *in vivo* (xénogreffe intracrânienne de U87 et Daoy), induite par SDF-1 par activation de Gαi pour inhiber l'AMPc, est bloquée suite au traitement avec l'AMD 3465 (un antagoniste de CXCR4) qui empêche la suppression de l'AMPc induite par SDF-1 (Yang et al., 2007). De manière intéressante, les travaux de l'équipe du Dr Castel pour une autre chimiokine, UII/UT, ont montré que l'injection intratumorale d'UII chez des souris *Nude* xénogreffées avec des U87, favorise la croissance du GBM et réduit significativement la survie des souris (Le Joncour et al., article en préparation). Il semblerait que cette stimulation de la prolifération induit par UII/UT passerait également en partie par inhibition de l'AMPc via Gαi (Jarry et al., 2010; Lecointre et al., 2015) (Figure 41, 5).

Ainsi, en plus de confirmer l'implication des récepteurs chimiotactiques dans la croissance tumorale, ces données montrent le rôle important de la sous-unité Gαi et suggèrent que cibler les voies associées à l'AMPc pourrait être efficace dans le traitement de certains cancers, bien que les mécanismes soient encore mal connus. Wang et ses collègues ont récemment démontré que la sous-expression des 3 sous-unités Gαi1, 2 et 3 inhibe l'activation de ERK1/2 et la voie Akt-mTOR associées à la croissance et à l'invasion des cellules de cancer du sein et des fibroblastes traitées par les facteurs de croissance EGF et bFGF (Z Wang et al., 2014). Partant de cette observation importante et des résultats de Lecointre et al., (2015) par exemple, on peut supposer que la dérégulation des mêmes voies ERK1/2, Akt-mTOR relayées par Gαi pourrait aussi impacter la croissance de GBMs et de médulloblastomes (Figure 41, 4 et 5) (Yang et al., 2007).

La fonction proto-oncogénique de la sous-unité Gα12 a aussi été évaluée dans le cancer de l'ovaire (Goldsmith et al., 2011; Ha et al., 2014). Plus spécifiquement, sa sous-expression atténue radicalement la phosphorylation de CREB (*cAMP response element-binding*), stimulée par le LPA, *via* un mécanisme dépendant de la voie Ras-ERK, conduisant à la prolifération de cellules cancéreuses de l'ovaire (Goldsmith et al., 2011; Ha et al., 2014). De plus, la sous-unité Gα13 joue aussi un rôle proto-oncogénique dans les cancers du pancréas par promotion de la prolifération cellulaire stimulée par LPA (Figure 41, 3) (Gardner et al., 2013). Appartenant à la même famille dont les fonctions sont généralement étroitement liées, Gα13 pourrait utiliser des voies similaires à Gα12 pour stimuler la prolifération cellulaire dans le cancer du pancréas. De manière intéressante, LPA stimule plutôt la migration dans les GBMs (Figure 42, 6) à travers

des voies de signalisation de Gαi (Malchinkhuu et al., 2005), suggérant au moins en partie deux couplages possibles.

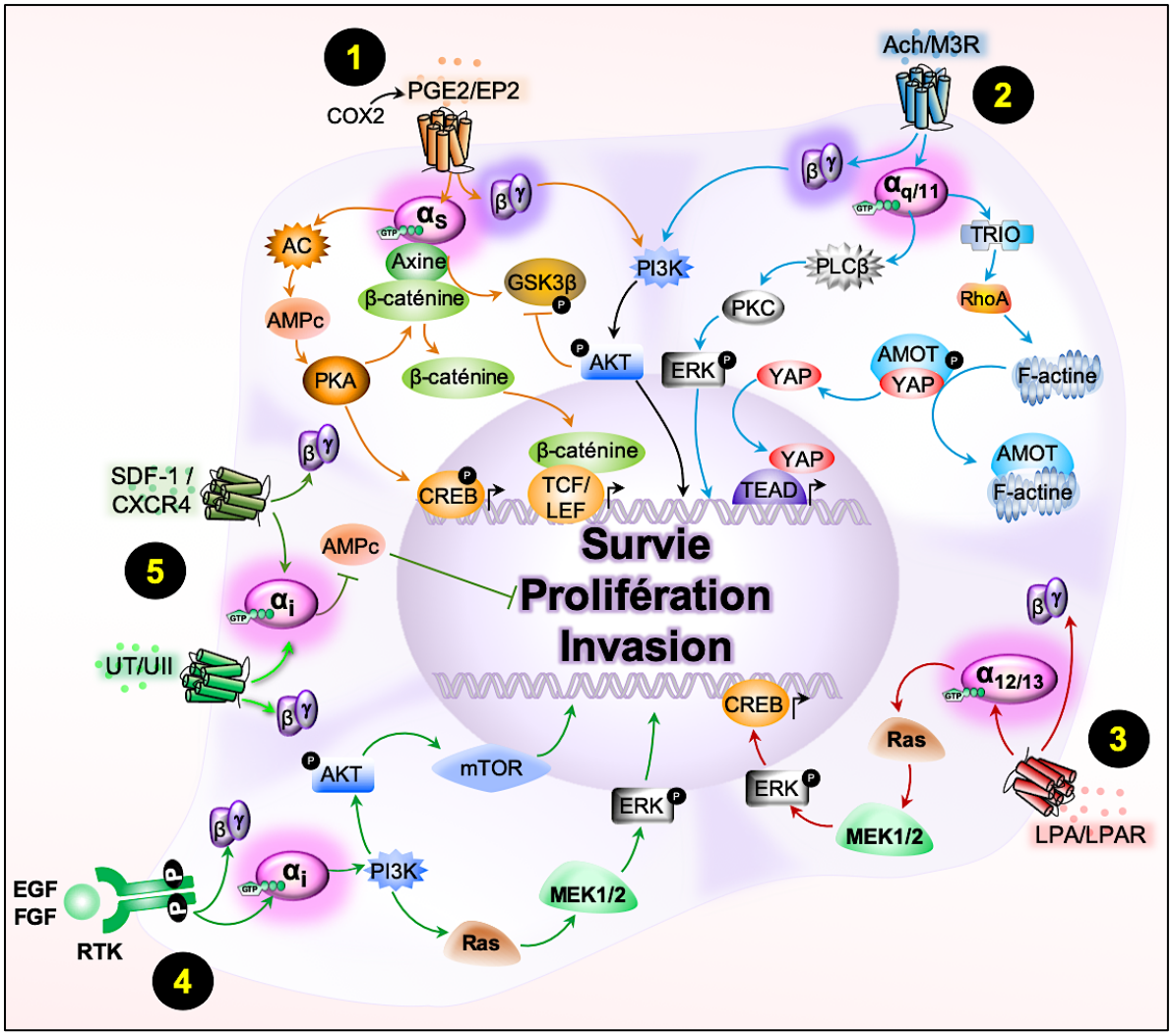


Figure 41. Exemples schématiques de l'implication des protéines G dans la survie, la prolifération ou l'invasion après l'activation par un RCPG. Ces processus sont différemment régulés dans différents types de cancer après activation des RCPGs, qui utilisent les voies de signalisation impliquant: **(1)** les sous-unités GαS et Gβγ dans la prolifération de cellules de cancer du côlon; **(2)** les sous-unités Gαq/11 dans la prolifération, la survie et la tumorigenèse gastro-intestinale; **(3)** les sous-unités Gα12 et Gα13 dans la prolifération de cellules cancéreuses de l'ovaire et du pancréas, respectivement; **(4)** les sous-unités Gαi dans la prolifération de cellules de gliome (Gαi) et de cancer du sein (Gαi1/2/3); **(5)** la sous-unité Gαi dans la prolifération de GBM. Akt (ou PKB) : Protéine kinase B ; AMOT : Angiomotine ; COX2 : cyclooxygenase 2 ; CREB : *cAMP response element-binding* ; GSK : *glycogen synthase kinase* ; MEK : *MAP kinase kinase* ; mTOR : *mammalian target of rapamycin*; TCF/LEF : *T-cell factor/lymphoid enhancer-binding factor* ; TEAD (ou domaine TEA) : *transcriptional enhanced associated domains*; TRIO : Protéine à domaine triple fonctionnel ; YAP : *yes-associated protein.*

7.2. Implication des protéines G dans l'adhésion/migration/métastases

Gα12/13 et Gαq/11 sont les deux familles de protéines G les plus souvent répertoriées comme activateur direct des GTPases de la famille Rho pour réguler la migration et la morphologie cellulaire. Dans ce contexte, la famille Gα12/13 semble surexprimée dans les

cancers du sein de type basal où, une fois activée par couplage à CXCR4, les Gα12/13 régulent la mise en place des métastases *via* RhoA (Figure 42, 2) (Yagi et al., 2011; O'Hayre et al., 2014). De même, la signalisation Gα12/13-RhoA est activée par les récepteurs LPAR et PAR-1 fortement impliqués dans les métastases (O'Hayre et al., 2014). De plus, l'étude de Lecointre et al., a aussi montré que le système UII/UT stimulent l'adhésion et la migration chimiotactique des cellules de gliome (U87, SW1088) par augmentation de la polymérisation d'actine *via* UT/Gα13/Rho/ROCK, de la formation des lamellipodes principalement *via* UT/Gαi/PI3K/Rac (Figure 42) (Lecointre et al., 2015).

Aussi, le RCPG d'adhésion GPR116 dont l'expression est significativement associée aux métastases et à un mauvais pronostic, a été décrit comme favorisant les métastases dans le cancer du sein en stimulant la migration cellulaire *via* la voie Gαq-p63RhoGEF-Rho/Rac1 GTPase (Tang et al., 2013). En effet, après avoir démontré que la modulation (siRNA, shRNA) du niveau d'expression de GPR116 dans les cellules régule l'activation de RhoA et Rac pour la formation des lamellipodes et des fibres de stress d'actine, la sous-expression de Gαq/11, contrairement à celle de Gα12/13, régule négativement l'activation de RhoA et Rac1. De plus, l'effet pro-migratoire qui est inhibé lorsque GPR116 est sous-exprimé, est complètement rétabli par la surexpression du mutant constitutivement actif de Gαq suggérant ainsi que la régulation de la migration par GPR116 des cellules cancéreuses du sein dépend surtout de la voie Gαq/11 (Figure 42, 1) (Tang et al., 2013). De même, l'activation de la voie Gαq-Rho GTPase a été récemment évoquée comme indispensable au GPR78, un RCPG principalement exprimé dans les tissus cérébraux, pour la migration et les métastases de cellules de cancer du poumon (Dong et al., 2016).

Le traitement des cellules de mélanomes avec Wnt5a induit l'activation de Gαq qui par stimulation de la PKC contribue à l'expression des marqueurs d'EMT (Snail, Vimentine) et la survenue de métastases (Figure 42, 5) (Dissanayake et al., 2007). Des résultats similaires ont été observés dans les cancers de l'estomac où il semblerait que Wnt5a active la PKC puis Src *via* Gαq couplé au récepteur Frizzled conduisant ainsi, indépendamment de la β-caténine, à l'activation de FAK (kinase d'adhésion focale) et de la paxilline qui sont importantes pour la migration cellulaire (Figure 42, 4) (Kühl et al., 2000; Huang et al., 2004; Kurayoshi et al., 2006). Toutefois, dans le cancer du sein, la migration cellulaire peut être inhibée *via* la sous-unité Gαs activée par Wnt5a/Frizzled-3 (Hansen et al., 2009). Dans leur étude, Wnt5a active plutôt la sous-unité Gαs qui en stimulant l'AC, active d'une part, la phosphoprotéine DARPP 32 (*dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein*) et d'autre part, la phosphorylation de CREB. En conséquence, DARPP-32 inhibe l'activité de la Rho GTPase Cdc42 qui est cruciale

pour la formation des filopodes, tout en potentialisant l'activité de CREB, ce qui conduit à bloquer la formation des filopodes et la migration (Figure 42, 7) (Hansen et al., 2009). Le rôle suppresseur de tumeur de la voie Gαs a donc été découvert dans de nombreux autres cancers, notamment de la prostate (L Wang et al., 2014), dans les médulloblastomes (He et al., 2014; Iglesias-Bartolome et al., 2015), ainsi que dans les cancers de l'ovaire (Teoh et al., 2014).

Inversement, l'implication de la famille Gαi dans la migration cellulaire a aussi été évaluée. En utilisant des inhibiteurs pharmacologiques, il a été démontré qu'après stimulation du récepteur LPA1, l'activation de Gαi favorise la migration des cellules de GBM *via* des voies dépendantes de PI3K/Rac1/JNK ou PI3K/Cdc42/p38MAPK (Figure 42, 6) (Malchinkhuu et al., 2005), des mécanismes très similaires à ce qui a pu être démontré dans le cas des systèmes chimiokines. Dans le cancer du poumon non à petites cellules et les GBMs, les systèmes chimiotactiques bien connus SDF-1/CXCR4 et UII/UT recrutent aussi Gαi pour activer les voies de signalisation PI3K et MAPK qui contribuent à la migration chimiotactique mais aussi à la sécrétion de diverses MMP menant à l'invasion tumorale (Otsuka and Bebb, 2008; Lecointre et al., 2015).

Li et ses collègues ont aussi démontré que Gαi2 est nécessaire à la translocation membranaire d'ELMO1 (*Engulfment And Cell Motility 1*) induite par SDF-1, à la polymérisation de l'actine et aux métastases des cellules de cancer du sein (Li et al., 2013). Le complexe ELMO/DOCK fonctionne comme une GEF pour réguler l'activation de Rac. Lors de l'activation de ce complexe, la protéine DOCK180 expose son domaine *Docker*, qui à son tour se lie et active Rac (Brugnera et al., 2002; Côté and Vuori, 2007). En utilisant des siRNA et par traitement à la PTX, les auteurs ont démontré, par immunocytochimie, migration en chambre de boyden et *wound healing*, que SDF-1/CXCR4 active la sous-unité Gαi2 qui par interaction avec l'extrémité N-terminale de ELMO1 déclenche sa translocation membranaire et son association à DOCK180 pour activer les petites protéines G Rac1 et Rac2 qui régulent ensuite le cytosquelette d'actine et la migration au cours du processus métastasique de cellules de cancer du sein. Par ailleurs, en utilisant des techniques similaires, Wang et ses collègues ont récemment démontré qu'en réalité les RCPGs de chimiokines stimulent des voies dans lesquelles l'activation de la sous-unité Gαi2 ainsi que du dimère Gβγ (Wang et al., 2016: 1) sont donc nécessaires (Figure 42, 3).

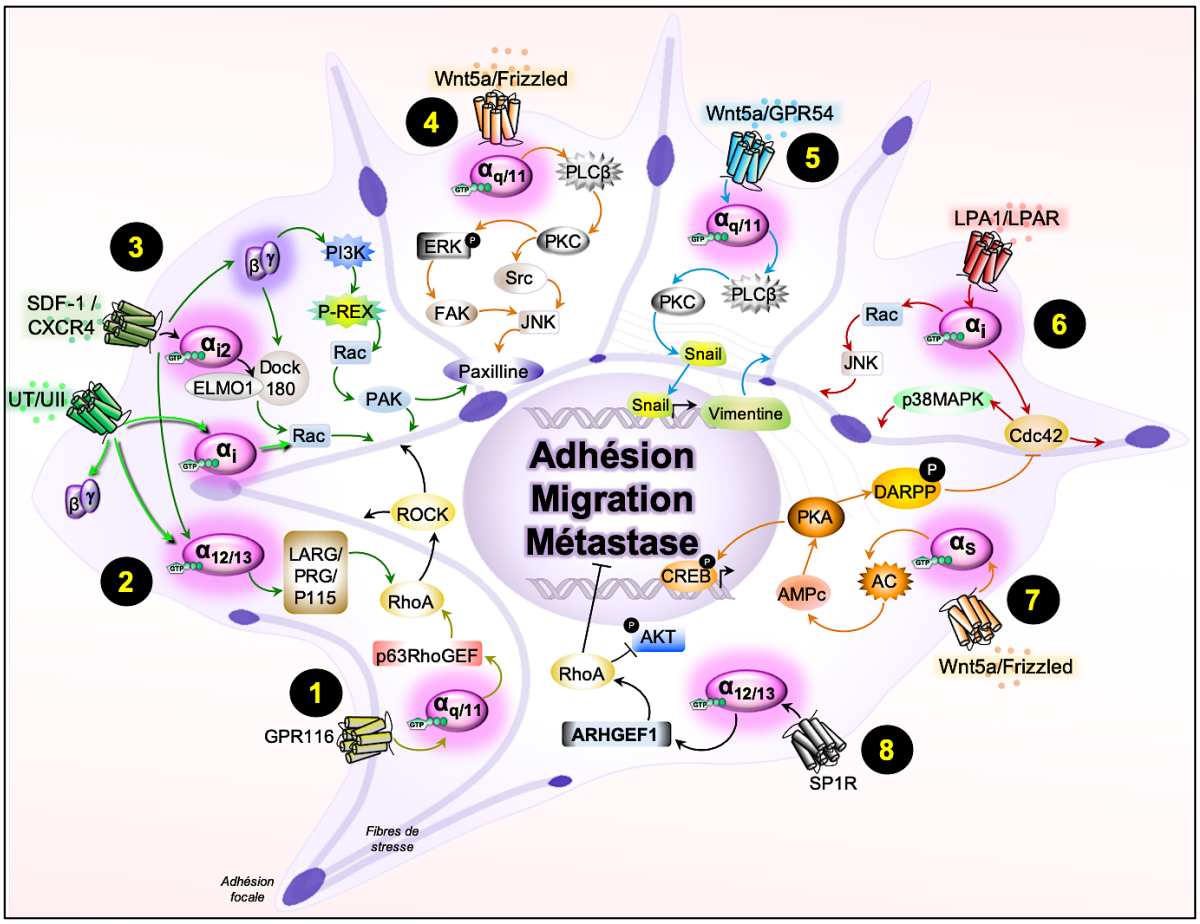


Figure 42. Exemples schématiques de l'implication des protéines G dans l'adhésion, la migration et les métastases après l'activation par un RCPG. Ce schéma non exhaustif illustre des voies de signalisation impliquant d'une part les sous-unités Gαq/11 comme stimulateur de l'adhésion, de la migration et des métastases dans le cancer du sein (**1**), de l'estomac (**4**) et des mélanomes (**5**) ; d'autre part, les sous-unités Gαi comme stimulateur de l'adhésion, de la migration et des métastases dans le cancer du sein et les gliomes (**3** ; **6**) ainsi que Gβγ dans le cancer du sein (**3**). L'activation de Gα12/13, par CXCR4 ou UT, régule positivement l'adhésion et la migration cellulaire dans le cancer du sein et le gliome (**2**) alors qu'elle joue un rôle de suppresseur de tumeur après activation par S1PR dans les lymphomes dérivés de cellules B du centre germinatif (GCB-DLBCL) (**8**). Gαs inhibe la migration cellulaire dans de le cancer du sein (**7**). ARHGEF1 (ou p115RhoGEF) : *Rho guanine nucleotide exchange factor 1* ; Cdc42 : *cell division cycle 42* ; DARPP : phosphoprotéine régulée par la dopamine et l'AMPc ; DOCK180 (ou DOCK1) : *dedicator of cytokinesis 1* ; ELMO1 : *Engulfment and cell motility 1* ; FAK : kinase d'adhésion focale ; JNK : *c-Jun (activator protein 1 transcription factor subunit) N-terminal kinases* ; PAK : *p21-activated serine-threonine kinase* ; P-rex : *PIP3 dependent Rac exchanger protein ;* ROCK : Protéine kinase associée à Rho.

L'implication du dimère Gβγ dans l'agressivité tumorale a aussi été évaluée dans de récentes études. Par exemple, PI3K et P-REX1, un GEF spécifique de Rac (RacGEF), ont été décrits comme des effecteurs fondamentaux de Gβγ dans les voies contrôlant la motilité et la migration directionnelle dans la progression tumorale (Figure 43) (Welch et al., 2002; Vázquez-Prado et al., 2016). Dans les modèles précliniques de cancer murin cancer du sein, l'inhibition de Gβγ atténue la croissance tumorale, alors que chez les patients atteints de certains cancers, la surexpression aberrante des effecteurs chimiotactiques de Gβγ ou les mutations récemment

identifiées dans Gβ sont corrélées à un mauvais pronostic (Vázquez-Prado et al., 2016). D'ailleurs, des travaux récents ont conforté ces données en démontrant que le dimère Gβγ est efficace dans la réorganisation du cytosquelette, la protrusion cellulaire et la migration *via* l'activation directe de P-REX1 (Cervantes-Villagrana et al., 2019). Partant de ce fait, ils ont évalué et démontré que cette signalisation principalement associée à Gβγ est surtout efficace lorsque Gβγ provient de RCPGs qui couplent normalement les sous-unités Gαi, par rapport aux autres Gα (Figure 43). Cette observation recouvre les données précédemment évoquées dans notre introduction, suggérant une vraie spécificité des Gβγ issues du complexe Gαi dans la réorganisation du cytosquelette, les protrusions cellulaires et la migration. Il est possible de suggérer plusieurs hypothèses : la grande disponibilité de Gβγ causée par l'expression abondante de Gαi (Smrcka, 2008; Kehrl, 2016), la possible existence d'hétérotrimères Gαiβγ formant un complexe préassemblé avec des récepteurs et des effecteurs (Hepler, 2014), la dissociation plus efficace de Gαi par rapport aux autres hétérotrimères composés des trois autres familles de Gα (Lambert, 2008). A ce propos, les sous-unités Gαq et Gα12/13 interfèrent avec cette signalisation Gβγ/P-REX1/Rac (Cervantes-Villagrana et al., 2019) en activant plutôt Rho *via* une interaction directe avec p63RhoGEF/TRIO et RGS-RhoGEF, respectivement (Lutz et al., 2005; Rojas et al., 2007). Étant donné que Rho et Rac ont des effets opposés sur la morphologie cellulaire, ils sont considérés comme des signaux contradictoires qui doivent être régulés de manière spatiotemporelle lors de la migration (Cervantes-Villagrana et al., 2019).

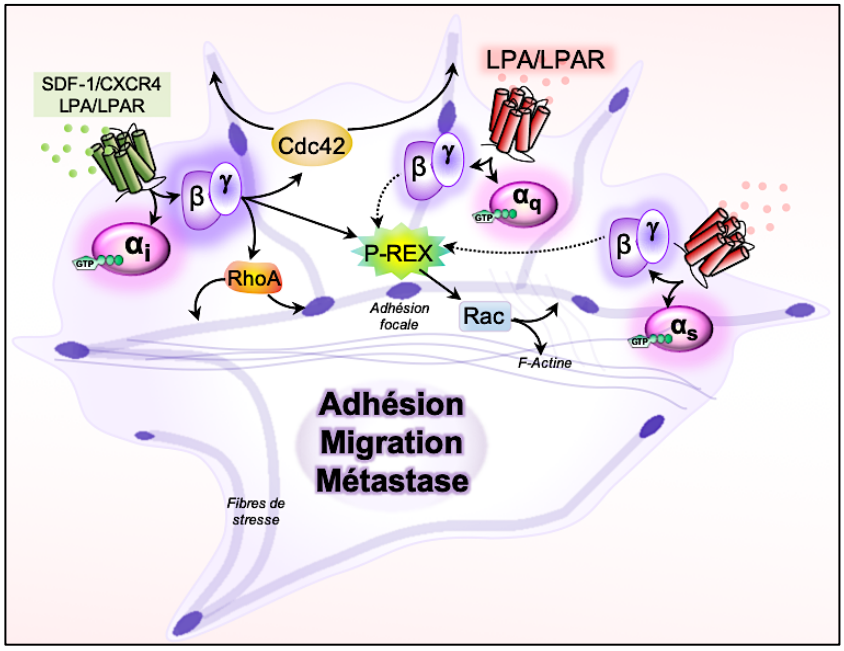


Figure 43. Implication des sous-unités Gβγ dans la migration des cellules de cancers métastatiques. La migration chimiotactique peut être stimulée par les sous-unités Gβγ provenant de Gαi, qui activent les RhoGEF P-REX1/Rac associées la polymérisation de l'actine pour faire avancer la cellule.

7.3. Les protéines G en tant que régulateurs directs de l'agressivité tumorale

Au cours des dernières années, il est devenu évident que les protéines G jouent un rôle important dans la régulation de nombreuses cascades et de signalisations intracellulaires qui sont impliquées dans le développement des cancers. De récentes études ont mis en évidence le rôle crucial direct des protéines G et les conséquences de leurs mutations sur l'agressivité des tumeurs (Figure 44). L'une des protéines G les plus fréquemment mutées dans les cancers est le gène GNAS de la sous-unité Gα, avec 4,4% de mutations sur les 9486 échantillons de tumeurs, dont la grande majorité de ces mutations sont autour de deux résidus R201 et Q227 (O'Hayre et al., 2013). L'une des conséquences de ces mutations est le maintien sur une plus longue période de la sous-unité Gα-GTP active. Il a été suggéré que la mutation de Gαs permet l'activation des voies pro-inflammatoires dans le cancer du pancréas, du poumon, du côlon, de l'ovaire et peut favoriser la croissance aberrante de la tumeur (O'Hayre et al., 2013) alors que sa suppression dans les kératinocytes chez la souris est suffisante pour induire un carcinome basocellulaire *via* l'activation non canonique de GLI (*glioma-associated oncogene*, oncogène associé au gliome) et de YAP1 (Iglesias-Bartolome et al., 2015). Comme précédemment mentionnée, cette fonction suppresseur de tumeurs de $G\alpha_S$ a aussi été décrite dans les médulloblastomes, la tumeur maligne du cerveau la plus répandue chez l'enfant, dans lesquelles Gαs agit en inhibant la voie Sonic Hedgehog (Shh) *via* l'augmentation de l'AMPc (Figure 44, 2) (He et al., 2014).

Dans 8778 échantillons de cancer analysés à partir de la base de données COSMIC (2013), 3,3% de mutations sur les gènes GNAQ et GNA11 ont été identifiées. La majorité de ces mutations affecte les résidus Q209 et R183 nécessaires à l'activité de la GTPase, l'hydrolyse du GTP est ainsi perturbée (O'Hayre et al., 2013; O'Hayre et al., 2014). La croissance du mélanome uvéal dépend essentiellement de la mutation de GNAQ ou GNA11 qui deviennent alors des oncogènes (Van Raamsdonk et al., 2010). De manière intéressante, la mutation somatique de GNAQ a été signalée dans 83% de cas de naevus bleu et 46% de mélanome oculaire de l'uvée. Ces mutations se produisent exclusivement sur Q209 et entraînent une activation constitutive, transformant la GNAQ en un puissant oncogène (Van Raamsdonk et al., 2009). La surexpression du mutant $GNAQ^{Q209L}$ dans les cellules de mélanome induit des tumeurs hautement pigmentées après 10 semaines chez la souris *Nude*, entraîne également la croissance cellulaire ainsi que l'augmentation de la capacité clonogénique des cellules de mélanocyte ou des HEK293T *via* l'activation de ERK. Ces résultats ont été confirmés en sous-exprimant GNAQ avec des siRNA dans des mélanocytes portant la mutation $GNAQ^{Q209L}$, en plus de réduire la croissance cellulaire, la majorité des cellules reste bloquée en phase G0/G1

par rapport aux cellules contrôles (Van Raamsdonk et al., 2009). Récemment, Feng et ses collègues ont démontré qu'en réalité la croissance aberrante de cellules de mélanome est dépendante de l'activation de YAP par Gαq/11 *via* Trio et sa Rho GTPase régulée, RhoA (Figure 44, 3), mais moins dépendante des seconds messagers générés par la PLC (Vaqué et al., 2013; Feng et al., 2014; Feng et al., 2019).

La sous-unité Gα13, membre de la famille Gα12/13, a été démontrée comme très positivement impliquée dans les cancers métastatiques du sein et de la prostate (Kelly, Moeller, et al., 2006; Kelly, Stemmle, et al., 2006) et dans les PDAC (*pancreatic ductal adenocarcinoma*) chez lesquels elle joue un rôle stimulateur dans l'invasion des cellules (Gardner et al., 2013; Chow et al., 2016). Sa sous-expression diminue significativement l'invasion protéolytique induite par les MMPs dans le collagène tridimensionnel et améliore l'adhérence cellule-cellule induite par la E-cadhérine. Par ailleurs, Gα13 peut affaiblir les jonctions adhérentes en se liant à la E-cadhérine et en déplaçant la β-caténine des jonctions adhérentes (Meigs et al., 2001; Meigs et al., 2002). Il a aussi été démontré que cette sous-unité perturbe les jonctions adhérentes endothéliales en se liant à la VE-cadhérine et en provoquant son internalisation (Gong et al., 2014). Cependant, la signalisation exacte par laquelle Gα13 contribue à l'invasion des cellules cancéreuses du pancréas n'est pas encore bien décrite. Le séquençage d'échantillons de patient atteints de lymphome (GCB-DLBCL, *germinal center B cell-derived lymphoma*) a révélé la présence de mutation dans GNA13 (Muppidi et al., 2014). Les cellules B murines du centre germinatif (GCB) et les GCB-DLBCL humaines, dans lesquelles Gα13 a été supprimée, sont incapables d'inhiber l'activation de Akt et la migration en réponse à la S1P, et ces souris déficientes en Gα13 développent un lymphome dérivé de cellules GCB (Muppidi et al., 2014). De plus, la suppression de Gα13 entraîne la dissémination des GCB dans le système lymphatique et sanguin. Cette étude, contrairement à celle de Chow et ses collègues (Chow et al., 2016) dans les cellules PDAC, propose une voie dépendante de Gα13 et son effecteur ARHGEF1 (p115RhoGEF), qui cible directement RhoA pour inactiver pAkt, suffisants pour l'inhibition de la croissance et de la dissémination de GCB- DLBCL (Muppidi et al., 2014).

En ce concerne les sous-unités Gαi, une étude récente a montré que l'ARNm de la sous-unité Gαi3 est significativement surexprimée dans plusieurs tissus de gliome humain et son niveau d'expression est associé à celui des récepteurs tyrosine kinases (RTK, y compris EGFR, FGFR et PDGFRα) et surtout à l'hyperactivité de la voie Akt-mTOR (Li et al., 2016). De manière intéressante, l'inactivation de Gαi3 à l'aide de shRNA spécifiques entraîne l'inactivation significative de la voie Akt-mTOR associée à la diminution de la viabilité cellulaire, de la

capacité clonogénique des cellules de GBM et à l'augmentation de l'apoptose. De plus, la croissance tumorale *in vivo* est inhibée et les cellules sont plus sensibles à une irradiation induisant la mort cellulaire lorsque Gαi3 est inactivée (Li et al., 2016). En revanche, des résultats contraires ont été obtenus lorsque Gαi3 est surexprimée dans les cellules confirmant ainsi la fonction régulatrice de la croissance des gliomes par Gαi3 *via* Akt-mTOR (Figure 44, 1). Très récemment, des mécanismes similaires ont été confirmés avec Gαi1 (Liu et al., 2018). La protéine et l'ARNm de Gαi1 sont, comme Gαi3, significativement surexprimés dans les tissus de gliomes, et leurs expressions sont corrélées à la sous-expression d'un miARN anti-Gαi1 (miR-200a) qui, en condition normale, cible le 3 'UTR de Gαi pour le sous-exprimer, inactive Akt-mTOR et inhibe la prolifération des cellules de gliome (Liu et al., 2018). De manière intéressante, la sous-expression Gαi1 par shRNA (shGNAI1) ou sa délétion fonctionnelle par interférence d'un dominant négatif (mutant G202T), inhibe non seulement l'activation de Akt-mTOR mais aussi la prolifération des cellules de GBM ou des cultures primaires de gliome isolées de patients. De plus *in vivo*, la croissance de xénogreffes sous-cutanées et orthotopiques de gliomes chez la souris *Nude* est largement inhibée suite à la l'expression de shGNAI1 ou de miR-200a. Par ailleurs, miR-200a est incapable d'inhiber la prolifération des cellules lorsque Gαi1 est sous-exprimée ou mutée (Liu et al., 2018). Partant de ces faits, les auteurs ont conclu que la régulation négative de miR-200a dans le gliome conduit à la surexpression de Gαi1 (sans effet sur Gαi2 et Gαi3) puis à l'activation de la voie Akt-mTOR aboutissant à la prolifération accrue des cellules de gliome.

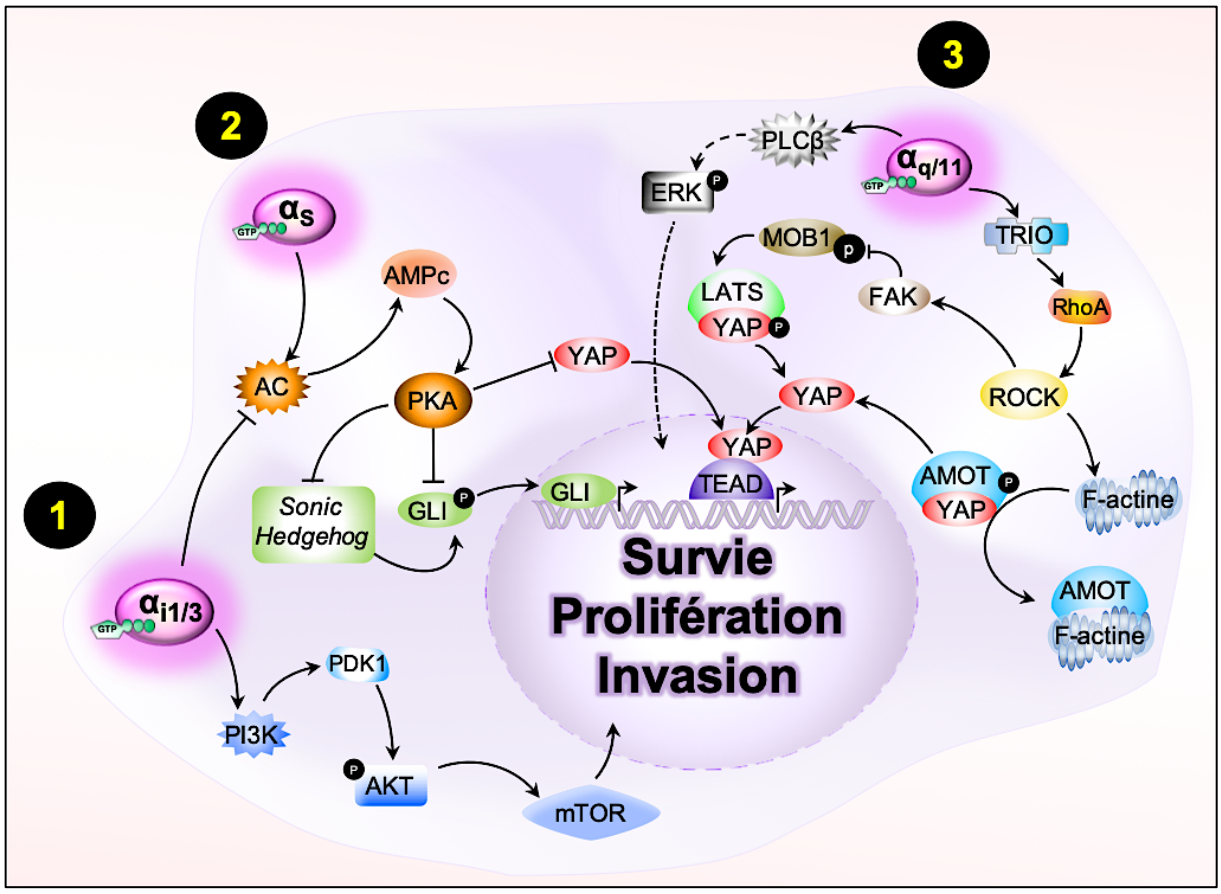


Figure 44. Résumé schématique de l'implication directe des sous-unités Gα dans la survie, la prolifération et l'invasion tumorale. Les différentes sous-unités Gαi et Gαq utilisent différentes voies de signalisation conduisant respectivement à l'agressivité des gliomes **(1)** et des mélanomes **(3)**. Gαs est plutôt un inhibiteur de la croissance cellulaire **(2)** dans les médulloblastomes et les carcinomes basocellulaires. GLI : oncogène associé au gliome ; LATS : *large tumor suppressor* ; MOB1 : *Mps one binder kinase activator protein 1* ; PDK1 : pyruvate déshydrogénase kinase 1.

Bien que les familles Gαi, Gαq, Gαs, Gα12/13 sont classiquement étudiées dans le contexte de la tumorigenèse, ce n'est que récemment que l'implication des sous-unités Gβγ a également été mise en évidence dans le cancer. Yoda et ses collègues ont identifié des altérations de GNB1 et GNB2 dans de multiples cancers humains, notamment dans les leucémies et lymphomes (Yoda et al., 2015). Ces mutations récurrentes, pour la plupart, sont retrouvées sur les sites K57, K78, I80, K89 et M101 localisés sur le gène de la sous-unité β et affectent ainsi l'interface de Gβ qui lie la sous-unité Gα, les effecteurs en aval et perturbent l'interaction entre Gα et le dimère Gβγ. Ils ont ensuite démontré que les mutations de Gβ favorisent l'activation de la voie PI3K/Akt/mTOR et MAPK dans les cellules TF-1 d'érythroleucémie (Yoda et al., 2015). Étant donné que le traitement par la PTX, toxine qui bloque la signalisation Gαi, n'inhibe pas la croissance cellulaire ni la phosphorylation de ERK dans les cellules portant des mutations de GNB1, ils concluent qu'effectivement la croissance cellulaire est favorisée par les mutants Gβ *via* PI3K/Akt/mTOR (Figure 45, 2) (Yoda et al., 2015). De plus, le traitement *in vivo* avec

BEZ235, un double inhibiteur de PI3K/mTOR, inhibe la signalisation induite par Gβ1 mutée et augmente considérablement la survie des souris dont la moelle osseuse est transplantée avec le mutant K89E de Gβ1. L'évaluation de la croissance cellulaire des BaF3-MYC, lignée cellulaire pro-B dépendante de l'interleukine-3 (IL-3) (Shindoh et al., 2012) et exprimant l'oncogène MYC, montre que l'absence d'IL-3 dans leur milieu de culture entraîne leur mort au cours du temps contrairement aux mêmes cellules exprimant le mutant GNB1 K89E. De même, les cellules A375 de mélanome ou K562 de leucémie myéloïde exprimant le mutant GNB1 K89E deviennent résistantes aux inhibiteurs de kinase Vemurafenib et Nilotinib qui sont des inhibiteurs de proto-oncogènes BRAF et Bcr-Abl, respectivement (Yoda et al., 2015).

Plus spécifiquement, le rôle d'une sous-unité Gβ, la Gβ5, dans la régulation de l'apoptose dans le cancer colorectal a été décrit (Fuchs et al., 2015). A partir d'ARNm extraits de tissus de patients classés en grade de tumeur non agressive (cancer du côlon non métastatique) ou très agressive (cancer du côlon métastatique), Fuchs et ses collègues ont d'abord découvert par RT-PCR que la sous-unité Gβ5 est surtout surexprimée dans les cancers du côlon métastatiques. Ils ont ensuite réalisé des études fonctionnelles en surexprimant stablement ou en sous-exprimant Gβ5 dans les lignées HCT116 de cancer du côlon, et ont démontré que Gβ5 rend les cellules résistantes à l'apoptose entraînée par TRAIL (*tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand*) *via* (1) l'activation de la voie de signalisation NF-κB, (2) l'induction de l'expression de la protéine anti-apoptotique XIAP et (3) la diminution de l'expression membranaire du récepteur de mort cellulaire TRAIL-R2 ainsi que la modification de la composition du complexe de signalisation induisant la mort (DISC) dans ce cancer (Figure 45, 1).

Depuis peu, les isoformes de la protéine kinase D (PKD 1/2/3), activées canoniquement par le DAG (Wang, 2006), ont été décrites comme étant dérégulées dans de nombreux cancers et sont impliquées dans des processus cellulaires importants pour la progression tumorale, notamment la survie, la prolifération, la migration, les réponses immunitaires et l'angiogenèse (LaValle et al., 2010; Lau et al., 2013a). Il est intéressant de noter que parmi certains membres des quatre familles de protéines G, seules les sous-unités de la famille Gαq/11 activent efficacement les trois isoformes de PKD. Cependant les Gβγ provenant des sous-unités Gαi sont d'autant plus efficace pour activer la PKD *via* PLCβ2/3 et l'identité spécifique de Gγ au sein des dimères Gβγ détermine cette stimulation (Lau et al., 2013a). En effet, seuls les dimères Gβ1γ avec γ2, γ3, γ4, γ5, γ7 et γ10 peuvent servir d'activateurs efficaces de la PKD. Une fois activée, PKD se localise rapidement à différents emplacements subcellulaires, particulièrement à la membrane plasmique, le noyau et les mitochondries, où elle peut moduler le développement tumorale (Roy et al., 2017).

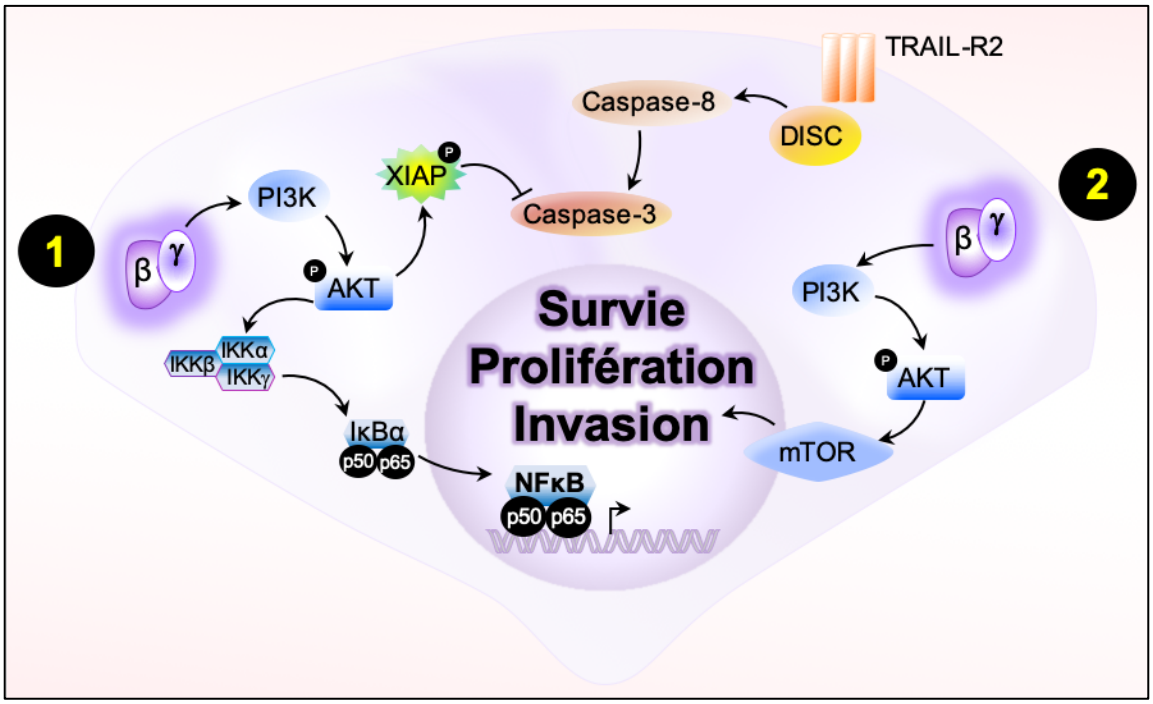


Figure 45. Résumé schématique de l'implication directe du dimère Gβγ dans la survie, la prolifération et l'invasion tumorale. DISC : complexe de signalisation induisant la mort ; IKK : *inhibitor-κB kinase* ; P50/P65 : dimère actif de NF-κB ; XIAP : protéine inhibitrice de l'apoptose liée au chromosome X.

Récepteur associé	Protéine G concernée	Voie(s) principales de signalisation	Type de cancer	Fonctions	Références
Rôle des protéines G après stimulation d'un RCPG					
Wnt5a/GPR54	Gαq/11	PKC/Snail/Vimentine	Mélanome	Invasion/Métastase/EMT	(Dissanayake et al., 2007)
Ach/M3R		YAP, ERK, Akt	Cancers gastro-intestinaux	Prolifération/Survie	(Konishi et al., 2019b)
Frizzled		PKC/Src/Paxillin	Cancers de l'estomac	Adhésion/Migration	(Kühl et al., 2000; Kurayoshi et al., 2006)
SDF1, Neurotensine, TGFα		PLC/PKD1	Cancer du pancréas, de la peau, du col de l'utérus	Prolifération	(Roy et al., 2017; Lau et al., 2013b)
GPR116		p63RhoGEF-Rho/Rac1	Cancer du sein	Migration/Métastase	(Tang et al., 2013)
WNT5a/ Frizzled	Gαs	PKA/DARPP-32/CREB	Cancer du sein	Inhibition de la migration	(Hansen et al., 2009)
ET-1/ETAR		Gαs/cAMP/PKA	Cancer de l'ovaire	Inhibition de la migration et des métastases	(Teoh et al., 2014)
ET-1/ETAR		-	Cancer de la prostate	Invasion	(L Wang et al., 2014)
PGE2/EP2		Axin/β-caténine	Cancer du côlon	Prolifération/Invasion	(Castellone et al., 2005; Shao et al., 2005)
SDF1/CXCR4	Gαi	AMPc	GBM, Médulloblastome	Prolifération/Invasion	(Yang et al., 2007)
LPA_1/LPA_1R		PI3K/Rac/JNK; PI3K/Cdc42/p38MAPK	Gliome, GBM	Migration	(Malchinkhuu et al., 2005)
S1P/S1PR		-	Gliome, GBM	Migration	(Malchinkhuu et al., 2005)
EGF, FGF/RTK	Gαi3	PI3K/Akt/mTOR, ERK1/2	Cancer du sein	Croissance cellulaire/	(Z Wang et al., 2014)

EGF, FGF/RTK	Gαi2	PI3K/Akt/mTOR	GBM	Croissance cellulaire	(Y-M Zhang et al., 2015; Liu et al., 2018)
SDF1/CXCR4	Gαi2	ELMO1/DOCK180/Rac	Cancer du sein	Migration/Métastase	(Li et al., 2013)
SDF1/CXCR4	Gα12	RhoA	Cancer du sein	Migration/Métastase	(Yagi et al., 2011; O'Hayre et al., 2014)
LPA/LPAR		Ras/ERK/CREB	Cancer de l'ovaire	Prolifération	(Ha et al., 2014)
LPA/LPAR	Gα13	-	Cancer du pancréas	Prolifération	(Gardner et al., 2013)
S1P/S1PR		P115RhoGEF/pAkt	GCB-DLBCL	Migration/Métastase	(Muppidi et al., 2014)
SDF1/CXCR4	Gβ	Tax-1/Raf-1/ERK	Leucémie à cellules T	Migration/Infiltration	(Twizere et al., 2007)
SDF1/CXCR4	Gβγ	ELMO	Cancer du sein	Migration chimiotactique	(Wang et al., 2016: 1)
SDF1/CXCR4 LPA/LPAR	Gβγ	PI3K, P-REX/Rac, Akt	Cancer du sein, du col de l'utérus	Motilité/Migration chimiotactique	(Vázquez-Prado et al., 2016; Cervantes-Villagrana et al., 2019).
SDF1, Neurotensine, TGFα	Gβ1γ2-5, Gβ1γ7, Gβ1γ8	PLC/PKD1	Cancer du pancréas, de la peau, du col de l'utérus	Prolifération	(Roy et al., 2017; Lau et al., 2013b)
PGE2/EP2	Gβγ	PI3K/Akt/GSK3β	Cancer du côlon	Prolifération/Invasion	(Castellone et al., 2005; Shao et al., 2005)
	Rôle direct des protéines G				
	Gαs	Inhibition de GLI / YAP1	Carcinome basocellulaire	Inhibition de la croissance cellulaire	(Iglesias-Bartolome et al., 2015)
		Inhibition de Shh/GLI	Médulloblastome	Inhibition de la croissance cellulaire	(He et al., 2014)
	Gαq	ERK	Mélanome	Croissance cellulaire, augmentation de la capacité clonogénique	(Van Raamsdonk et al., 2009)
	Gαq	Trio/FAK/YAP	Mélanome	Croissance cellulaire aberrante	(Feng et al., 2019; Feng et al., 2014; Vaqué et al., 2013).
	Gαi2	PI3K/Akt/mTOR	GBM	Croissance cellulaire	(Liu et al., 2018)
	Gαi3	Akt/mTOR	GBM	Croissance cellulaire/résistance	(Li et al., 2016)
	Gα12/13	Stimulation des MMP, Diminution de la E-cadhérine	Cancer pancréatique, du sein, de la prostate	Invasion ; Métastase	(Kelly, Moeller, et al., 2006; Chow et al., 2016)
	Gβ1/2γ	PI3K/Akt/mTOR	Leucémie, Lymphome	Croissance cellulaire/Résistance	(Yoda et al., 2015)
	Gβ5γ	NF-κB/XIAP, TRAIL-R2	Cancer du côlon	Survie cellulaire/Résistance	(Fuchs et al., 2015)

Tableau 7. Revue non exhaustive des protéines G comme modulateur de l'agressivité tumorale. Ach : Acétylcholine ; Akt : Protéine kinase B ; CREB : *cAMP response element-binding* ; DARPP : *Dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein* ; DOCK : *Dedicator of cytokinesis* ; EGF : *Epidermal growth factor* ; EMT : *Epithelial mesenchymal transition* ; ELMO : *Engulfment and cell motility* ; EP2 : *Prostaglandin EP2 receptor* ; ET-1 : *Endothelin 1* ; ERK : *Extracellular signal-regulated kinase* ; ETAR : *Endothelin receptor* ; FGF : *Fibroblast growth factor* ; GSK3β : *Glycogen synthase kinase 3β* ; JNK : Janus kinase ; LPA : *Lipoprotein A* ; MAPK : *Mitogen-activated protein kinase* ; mTOR: *mechanistic target of rapamycin* ; M3R : *Muscarinic acetylcholine receptor M3* ; NF-κB : *Nuclear factor-kappa B* ; PI3K : Phosphoinositide 3-kinase ; PGE2 : *Prostaglandin E2* ; PKA, C : Protéine kinase A, C ; PKD1 : *Polycystin-1 precursor* ; PLC : Phospholipase C ; P-rex : PIP3-dependent Rac exchanger 1 ; RTK : *Receptor tyrosine kinase* ; SDF1 : *Stromal cell-derived factor 1* ; S1P : *Sphingosine-1-phosphate* ; TGF : *Transforming growth factor* ; TRAIL-R2 : *Tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand R2* ; Wnt5a : Wingless-related integration site family, member 5A ; XIAP : *X-linked inhibitor of apoptosis protein* ; YAP : *Yes-associated protein.*

Ce résumé non exhaustif met en évidence le degré d'implication et le fonctionnement des sous-unités de protéine G dans l'agressivité de nombreux cancers. Cependant très peu d'informations existent à ce jour sur l'implication directe des protéines G dans la progression des gliomes. Dans ce contexte, nous avons tenté d'étudier le rôle principal des protéines G dans les gliomes et avons identifié leur signature d'expression, ce qui a conduit à la découverte de certaines sous-unités Gα, Gβ et Gγ clés et spécifique des GBMs, notamment la protéine Gα15 non ubiquiste et atypique.

CHAPITRE 3 : LA SOUS-UNITE Gα15

1. Structure et modification de la sous-unité Gα15

La sous-unité Gα15, avec une masse moléculaire estimée à 43,5 kDa, est l'un des membres de la famille Gαq partageant une identité de séquence en acides aminés d'environ 57% avec Gα11 et Gαq (Strathmann and Simon, 1990; Yu et al., 2008), environ 40% d'identité en acides aminés avec Gαs et 45% avec les membres de la classe Gαi/o (Amatruda et al., 1991). Clonée dans un premier temps chez la souris (Wilkie et al., 1991; Wilkie et al., 1992), l'isoforme humaine ensuite clonée a été dénommée Gα16 dans l'hypothèse qu'il s'agissait d'une nouvelle protéine Gα (Amatruda et al., 1991), mais a ensuite été reconnue comme forme orthologue mal conservée de Gα15 partageant 85% d'identité de séquence avec Gα16, puis conduisant à sa requalification de Gα15 chez l'Homme (Chakravorty and Assmann, 2018). Comme les autres membres de la famille Gαq, Gα15 est palmitoylée au niveau de séquences polycystéines (Cys9 et Cys10) à l'extrémité N-terminale, ce qui est important pour sa localisation à la membrane plasmique et son activité fonctionnelle (Figure 46) (Pedone and Hepler, 2007). Une autre modification structurelle intéressante de Gα15 est sa possible phosphorylation par la PKC, unique parmi les membres de la famille Gαq (Aragay and Quick, 1999; Gu et al., 2003; Su et al., 2009). En effet, une première étude proposait trois séquences consensus de phosphorylation par la PKC (Serines 4 et 53, Thréonine 6), qui ne sont pas présentes sur les Gαq (Aragay and Quick, 1999). Plus tard, Gu et ses collègues ont d'abord observé que l'activation de RCPGs tels que M2R peut induire la phosphorylation de Gα15 exprimée dans des cellules COS-7 et leur étude de phosphorylation *in vitro* montre que Gα15 est un substrat direct de la PKC. Le site de phosphorylation supposé est la serine 336 sur la boucle α4/β6 unique de Gα15 et ce site de phosphorylation de la PKC est essentiel pour l'activation des PLCs induite par un RCPG, mais pas pour l'interaction directe de la protéine Gα15 avec la PLCβ (Figure 46) (Gu et al., 2003). Ce site (α4/β6) ainsi que l'extrémité C-terminale de Gα15 ont aussi été décrits comme étant des régions critiques d'interaction avec les récepteurs, notamment le récepteur C5aR impliqué dans la chimiotaxie/inflammation (Lee et al., 1995; Davignon et al., 2000). D'autres régions d'interaction avec des RCPGs ont été décrites et sont indiquées sur la Figure 46, notamment les boucles α4/β6, αN/β1 et l'hélice α5 à proximité de l'extrémité C-terminale, des régions qui sont toutes impliquées dans le couplage avec mGluR2 (*metabotropic glutamate receptor 2*), un RCPG principalement impliqué dans le maintien de l'homéostasie du SNC, et stimulant la

croissance des cellules U87 de GBMs (Blahos et al., 2001; Gu et al., 2003; Ho et al., 2004; Su et al., 2009; Pereira et al., 2017).

En plus d'être palmitoylée et phosphorylée, la sous-unité Gα15 peut être dégradée par la voie du protéasome (Johansson et al., 2005). En effet, un prétraitement des cellules HEK293, exprimant transitoirement Gαq et Gα15, avec des inhibiteurs du protéasome (MG132, lactacystin) atténue la dégradation de Gα15 ainsi que de Gαq alors que les inhibiteurs de protéases lysosomales (leupeptine) et de protéases à cystéine non-protéasomales (ALLN) ont très peu d'effets sur la stabilité de ces sous-unités (Johansson et al., 2005). L'absence de site de palmitoylation semble être déterminante pour l'adressage de ces protéines G au protéasome.

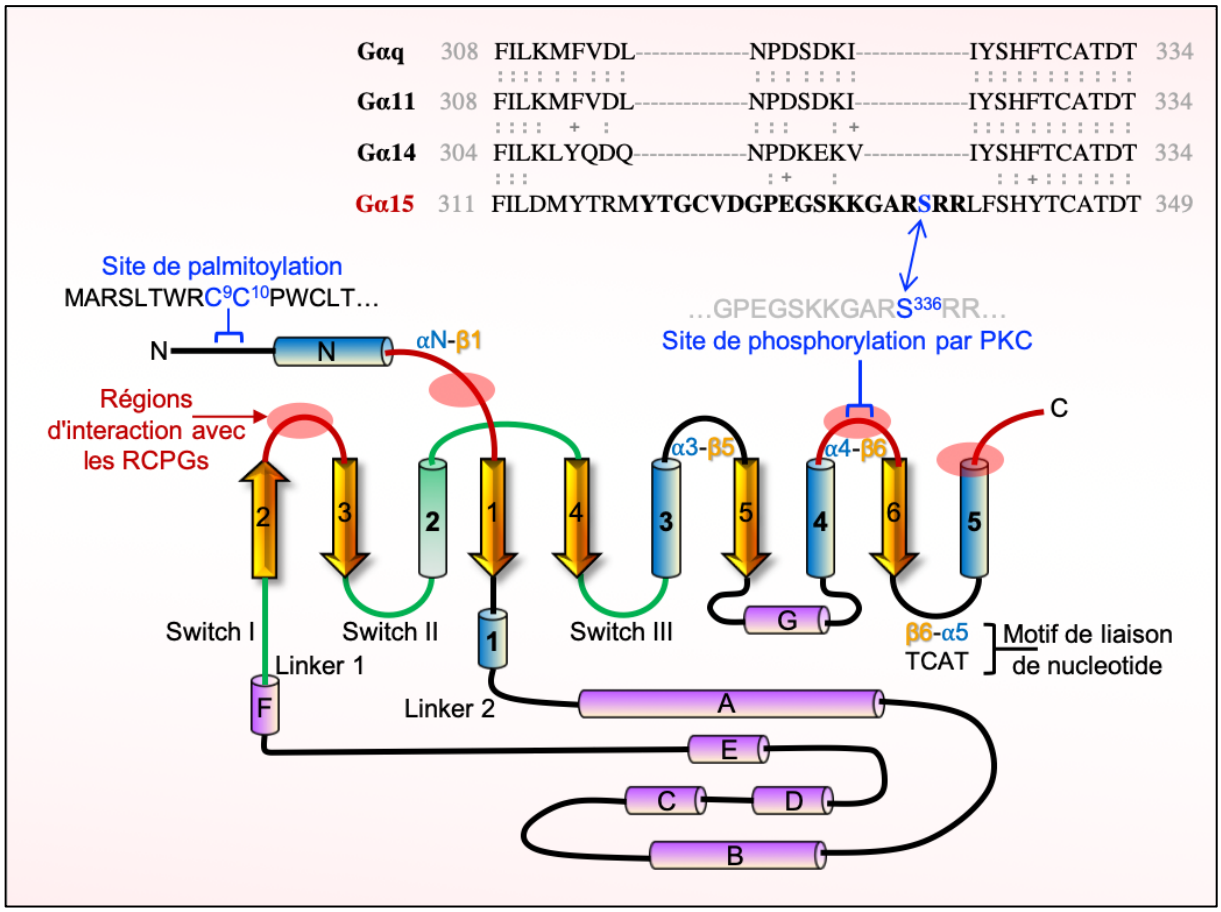


Figure 46. Structure secondaire de la sous-unité Gα15 avec les modifications covalentes et régions interagissant avec les récepteurs. La comparaison des acides aminés des membres de la famille Gαq est représentée en haut avec des régions "gaps" (--) pour optimiser l'alignement et les + indiquent un alignement entre acides aminées similaires. (Adapté de Gu et al., 2003 ; Su et al., 2009 ; Oldham et Hamm 2008).

2. Spécificité de l'expression de Gα15

Amatruda et ses collègues sont les premiers à identifier la sous-unité Gα15 comme spécifiquement exprimée dans les cellules humaines de la lignée hématopoïétique (Amatruda et al., 1991). D'autres études ont ensuite confirmé son expression exclusive dans les progéniteurs hématopoïétiques normaux et malins, et son absence d'expression dans les leucocytes matures (Pfeilstöcker et al., 1996; Grant et al., 1997). Dans les cellules hématopoïétiques normales, Gα15 est surexprimée dans les cellules progénitrices hématopoïétiques, les cellules $CD34^+$, une expression qui diminue brusquement au cours de la différenciation granulocytaire et érythrocytaire (Tenailleau et al., 1997). Depuis, de nombreuses études ont identifié son expression dans différents tissus (Figure 47). Il a été rapporté que la sous-unité Gα15 est absente ou sous-exprimée dans les cellules normales différenciées ou dans les lignées de cellules leucémiques après induction de la différenciation (Grant et al., 1997; Mapara et al., 1995; Amatruda et al., 1991). Elles a aussi été observée dans des lignées cellulaires humaines provenant de myélomonocytes et de lymphocytes T, mais son expression est seulement observée au début de l'ontogenèse des lymphocytes B puis sous-exprimée lors de la différenciation (Mapara et al., 1995). Ces observations impliquent que la signalisation dépendante de Gα15 peut moduler la prolifération ou la différenciation cellulaire en fonction de l'environnement cellulaire spécifique (Tenailleau et al., 1997; Su et al., 2009). D'ailleurs, il a été récemment démontré que GNA15 est l'un des gènes altérés par l'urbanisation des populations (Bickler et al., 2016). En effet, GNA15 serait significativement surexprimé dans les populations rurales contrairement aux populations urbaines positionnant ce gène/cette protéine dans une signature moléculaire du milieu, un aspect qui pourrait s'avérer intéressant dans le domaine de l'immunité, l'inflammation et le cancer. Il faut dans ce contexte souligner que l'expression de Gα15 a été aussi constatée dans des kératinocytes en culture (Rock et al., 1997) et la surexpression de son ARNm a été mise en évidence dans les cellules de la peau, les lignées cellulaires épidermoïdes A431, les cellules souches hématopoïétiques, contrairement à d'autres tissus humains comme le foie, les muscles, la rate ou les surrénales (Giannone et al., 2010). Ces études ont montré que le profil de distribution de Gα15 est non ubiquiste et devrait être davantage étudié dans les situations pathologiques, surtout lorsqu'on constate que son niveau d'expression est significativement plus élevé dans de nombreuses tumeurs (côlon, rein, thyroïde, carcinome épidermoïde du poumon) (Figure 47B).

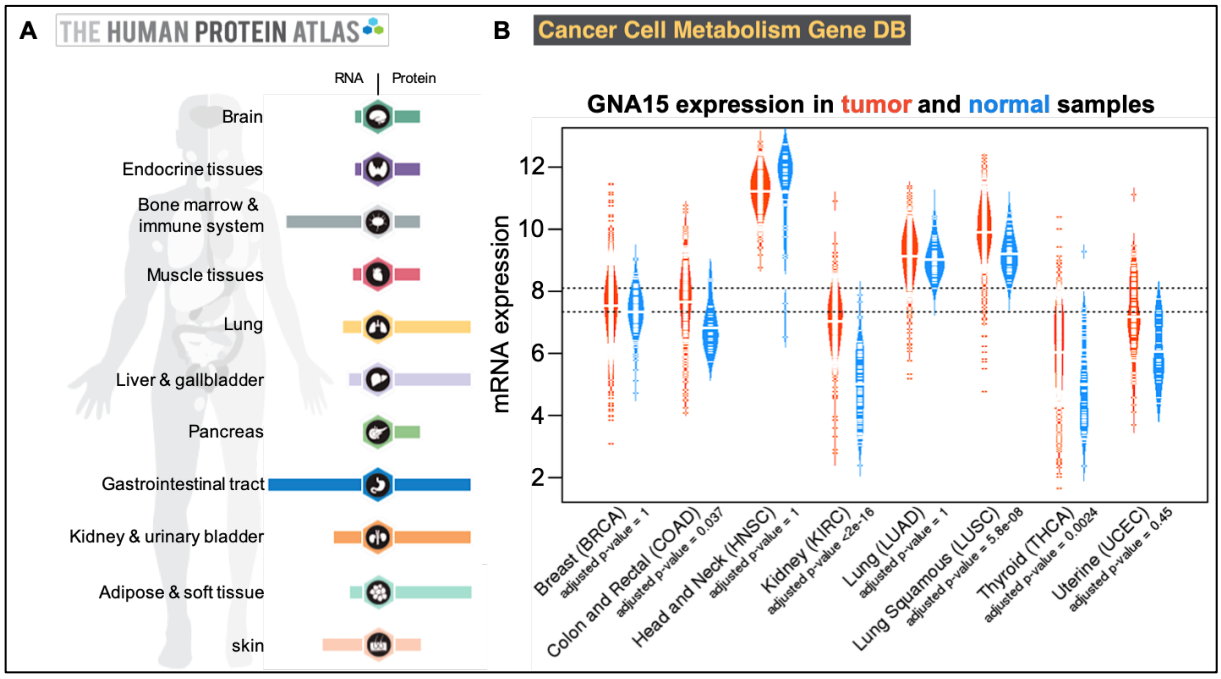


Figure 47. Expression de la sous-unité Gα15. (**A**) Niveau d'expression en ARN et en protéine de Gα15 dans différents tissus, normalisé à partir de 3 bases de données transcriptomiques (HPA, GTEx, FANTOM5) ou protéiques (UniProtKB / Swiss-Prot). D'après *The Human Protein Atlas.* (**B**) Analyse différentielle de l'expression de GNA15. Les données d'expression génique normalisées (données de 2015) ont été obtenues à partir de RNASeqV2 extraites de la base données TCGA en utilisant le logiciel R *TCGA-Assembler*. *T*-test, *adjusted P<0.05*. D'après *Cancer Cell Metabolism Gene DataBase.*

3. Rôle physiologique et physiopathologique de la sous-unité Gα15

3.1. Promiscuité et fonction physiologique de Gα15

A ce jour, nombreuses sont les fonctions physiologiques associées à la sous-unité Gα15. Gα15 peut activer les PLCs et montre des caractéristiques particulières vis à vis des RCPGs : elle a une promiscuité unique avec les RCPGs en général avec moins de spécificité (Offermanns and Simon, 1995), ce qui souligne son importance dans la signalisation cellulaire, lorsqu'elle est exprimée. Alors que les membres de la famille Gαq entraînent le recrutement de la PLC-β1=β3≥β4≥β2, il est proposé que Gα15 couple l'ensemble des PLCβ (Kozasa et al., 1993) mais de préférence la PLCβ2 (Lee et al., 1992). La co-transfection de Gα15 avec β2AR dans des cellules COS-7 favorise l'accumulation d'inositol phosphates (IPs) au cours d'une activation concentration-dépendante par la noradrénaline (Wu et al., 1995). De manière intéressante, les récepteurs de la vasopressine (V2R), de la dopamine (D1R) et de l'adénosine (A2aR) sont naturellement couplés à Gαs et à l'AC pour la production d'AMPc. Lorsque ces RCPGs sont co-exprimés avec Gα15, la formation d'IPs dépendant du ligand est significativement accrue

(Offermanns and Simon, 1995). De résultats similaires ont été obtenus avec d'autres RCPGs (Innamorati et al., 2009). En effet, Innamorati et ses collègues ont montré que Gα15 est capable de coupler plusieurs autres RCPGs tels que les récepteurs β2AR (qui couplent normalement Gαs and Gαi) ou, δ-opioïdes (DOR) principalement couplés à Gαi (Lee et al., 1995), et d'orienter les voies de signalisation en aval de type IPs et AMPc. De plus, co-expression de Gα15 avec le mutant de V2R (V2R-R137H), qui est normalement séquestré à l'intérieur de la cellule à cause de son internalisation stable par la β-arrestine ; restitue une fraction significative de ce récepteur à la surface de la cellule (Innamorati et al., 2009). Le mécanisme particulier de translocation à la membrane plasmique a été confirmé pour d'autres RCPGs suggérant ainsi que la sous-unité Gα15 présente une résistante à la désensibilisation induite par la β-arrestine. Une autre particularité de cette sous-unité, contrairement aux autres membres Gαq, est sa capacité à induire l'activation de la PLC dépendante, déjà mentionnée dans le cas de β2AR. En effet, Lee et ses collègues ont montré que le récepteur du complément C5aR peut stimuler la PLC *via* l'activation de Gα15 alors que Gα11 de la même famille est sans effet après stimulation par C5a (Lee et al., 1995). De plus, la délétion (KO total, conditionnel, dans les cellules souches embryonnaires de souris) de Gα15 chez des souris transgéniques réduit la libération du Ca^{2+} induite par C5a dans les macrophages sans impacter d'autres RCPGs tels que le récepteur P2Y2R dont le couplage n'est pas altéré (Davignon et al., 2000). Contre toute attente, l'inhibition de Gα15 dans les cellules érythroleucémiques (LAM) réduit la mobilisation intracellulaire de Ca^{2+} lorsque le même P2Y2R est stimulé (Baltensperger and Porzig, 1997). Ces études prouvent que la spécificité fonctionnelle de Gα15 pourrait dépendre du type cellulaire ou du couplage spécifique à un RCPG.

Malgré la longue liste de récepteurs pouvant activer Gα15, notamment les récepteurs DOR, opiacés (KOR), D2AR, ADR1, β2AR, SSTR-1 et SSTR-2 (Tableau 8), Gα15 présente une préférence sélective pour certains RCPGs. Cet aspect est mieux perçu lorsqu'on compare son couplage avec les récepteurs de la même famille (Lee et al., 1995; Innamorati et al., 2009; Su et al., 2009). Dans ce contexte, Lee et ses collègues ont par exemple montré que, dans la famille des récepteurs opioïdergiques, l'ordre d'efficacité du couplage à Gα15 est DOR, KOR > MOR. Toutes ces études ont contribué à identifier Gα15 comme unique parmi les autres protéines G en ce sens qu'elle peut être recrutée par une grande variété de RCPGs (Tableau 8).

Catégorie des récepteurs	Sous-types
Récepteurs normalement couplés à Gαi	
Adénosine	A1
Adrenergique	α2
Cannabinoïde	CB_1
Chimioattractant	C3a, C5a, fMLP
Chimiokine	CCR1, CCR2b, CCR3, CXCR1, CXCR2 CCR2a, CCR5, CCR7, CXCR4
Dopamine	D1, D2
Acide γ-aminobutyrique, métabotropique	$GABA_{B1a}$ + $GABA_{B2}$, $GABA_{B1b}$ + $GABA_{B2}$
Mélatonine	MT1, MT2
Muscarinique	M2
Neuropeptide	AF/FF
Opioïde	δ, κ, μ, nociceptine
Purinergique	UDP-glucose
Sérotonine	5-HT1A
Somatostatine	SST1, SST2
Récepteurs normalement couplés à Gαs	
Adénosine	A2A
Adrénergique	β_1, β_2
Dopamine	D1, D5
Histamine	H2
Hormone lutéinisante	-
Hormone parathyroïdienne	-
Prostaglandine	IP
Sécrétine	-
Hormone libérant la thyrotropine	-
Vasopressine	V2
Récepteurs normalement couplés à Gαq	
Adrénergique	α1B
Bombesin	-
Muscarinique	M1, M3, M5
Sérotonine	5-HT1C/2C
Thrombine	-
Thromboxane	TXA2
Vasopressine	V1A

Tableau 8. Différents récepteurs couplés à Gα15 induisant l'activation de la PLCβ et une mobilisation intracellulaire rapide de Ca^{2+}. (D'après Su et al., 2009).

L'implication de la sous-unité Gα15 dans l'activation de plusieurs facteurs de transcription importants dans de nombreux processus cellulaires a été prouvée (Figure 48). Pour mieux préciser les fonctions de Gα15, de nombreux chercheurs ont mis à profit le mutant constitutivement actif de Gα15 (Gα15-Q212L). En effet, de nombreuses études ont démontré

que l'expression de Gα15QL dans différentes lignées cellulaires induit d'abord l'activation de la PLCβ qui entraîne la transformation des PIP2 en IP3 et DAG, ces derniers pouvant ensuite moduler de nombreuses cascades de signalisation, comme l'activation des voies de signalisation PKC, ERK, STAT3 et NF-κB (Lo et al., 2003; Lo and Wong, 2006; Yang et al., 2001; Liu and Wong, 2004). Cependant, Gα15 possède des propriétés de signalisation supplémentaires qui peuvent être indépendantes de l'activité de la PLCβ. La découverte d'un nouveau partenaire de liaison de Gα15, le TPR1 (*tetratricopeptide repeat 1*) ouvre de nouvelles possibilités de régulation de la signalisation cellulaire (Figure 48). Étant donné que TPR1 préfère interagir avec les Ras actifs, son activation par Gα15 peut faciliter la signalisation *via* l'axe Ras/Raf-1/MEK/ERK et d'autres effecteurs en aval (Marty et al., 2003). Aussi, le facteur de transcription E3 (TFE3) et Gα15 semblent surexprimés dans l'hypertrophie cardiaque. De manière intéressante, la formation du complexe TFE3-Gα15 active, entraîne la translocation nucléaire de Gα15 et la régulation positive de la protéine de jonction cellulaire Claudine 14 dans les cardiomyocytes (Sato et al., 2011). Sato et ses collègues ont ainsi suggéré Gα15 comme un nouveau régulateur spécifique et direct de la transcription (une première pour une sous-unité Gα) *via* TFE3, son AGS indépendant des RCPGs.

3.2. Implication de la sous-unité Gα15 dans la physiopathologie du cancer

La signalisation oncogénique de la sous-unité Gα15 n'est pas encore bien décrite, cependant, quelques études récentes suggèrent l'implication de Gα15 dans la signalisation et l'agressivité tumorale. Il a été démontré que Gα15 n'est pas exprimée dans les cellules pancréatiques normales (Giannone et al., 2010), elle est le seul membre de la famille Gαq absent dans les cellules acineuses pancréatiques (Yule et al., 1999). De manière surprenante, l'expression de l'ARNm codant Gα15 a été détectée dans 11 lignées cellulaires établies de carcinome du pancréas (PaCa), suggérant que son expression dans les cellules PaCa est strictement corrélée à la transformation oncogénique (Giovinazzo et al., 2013). De plus, la sous-expression de Gα15 à l'aide de shRNA spécifiques, dans les cellules PaCa réduit significativement la densité de cellules adhérentes uniquement lorsque le microenvironnement tumoral est simulé par diminution de la concentration en sérum (Giovinazzo et al., 2013). Ainsi, la signalisation par Gα15 peut soutenir la résistance des cellules tumorales à un microenvironnement tumoral hostile. Giovinazzo et ses collègues ont été les premiers à proposer Gα15 en tant que nouvelle cible pharmacologique de tumeurs solides et/ou en tant que nouveau marqueur tumoral pour le traitement du PaCa.

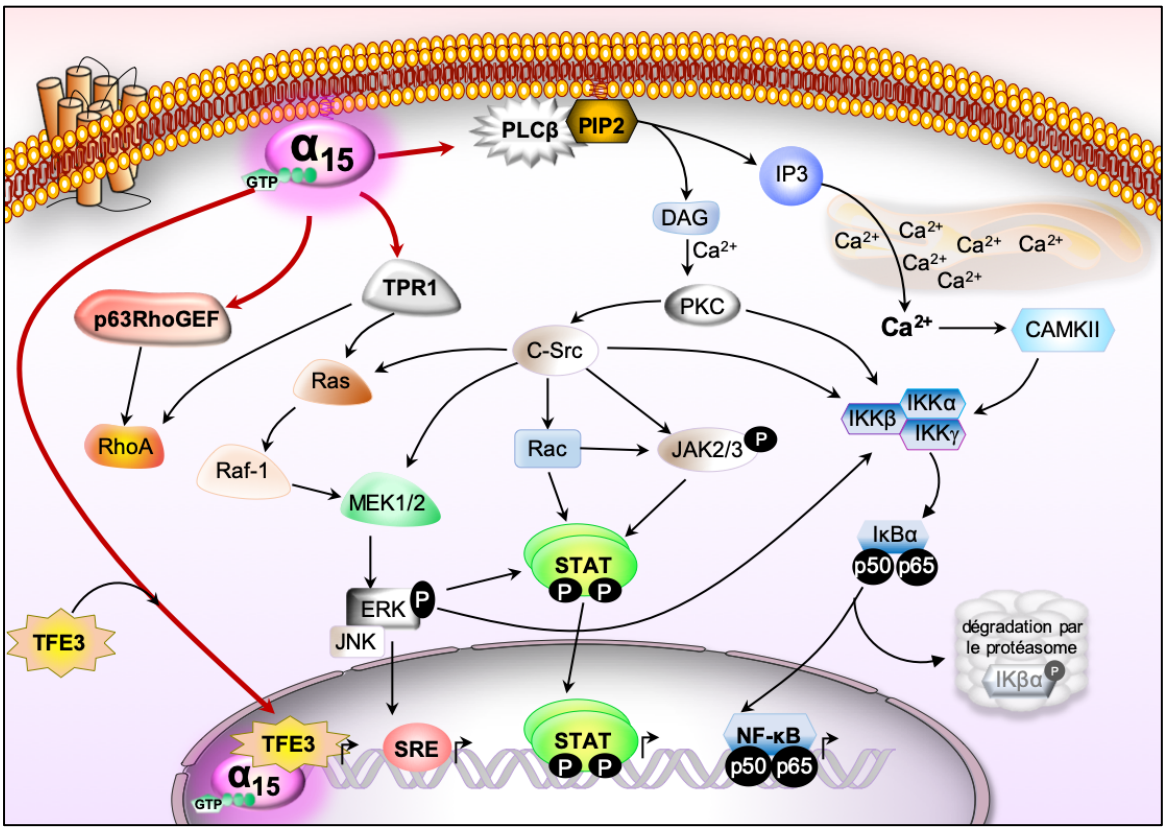


Figure 48. Les voies de signalisation régulées par Gα15. Comme tous les autres membres de la famille Gαq, Gα15 active les différents isoformes de PLCβ favorisant l'hydrolyse du PIP2 en réponse à la stimulation d'un RCPG (Offermanns and Simon, 1995; Kozasa et al., 1993; Wu et al., 1993). La sous-unité Gα15 intervient dans la régulation des facteurs de transcription STAT (Wu et al., 2003; Lo et al., 2003; Lo and Wong, 2006) principalement par la signalisation Ras/Raf-1/MEK/ERK ou PKC/c-Src alors qu'elle stimule l'activation de NF-κB (Yang et al., 2001; Lee and Wong, 2009) principalement par les voies PLCβ/CaM/CAMKII (*calmodulin kinase II*) et PKC, mais aussi par la voie ERK. L'activation de la PKC déclenche plusieurs voies, notamment la voie JAK (Lo and Wong, 2006; Lo et al., 2008), c-Src (Lee and Wong, 2009) et JNK (M. M. K. Lee et Wong 2009). La protéine adaptatrice TPR1 (*Tetratricopeptide repeat 1*) relie l'interaction entre Gα15 activés et Ras, ce qui contribue d'une part à l'activation de ERK (Heasley et al., 1996), d'autre part à l'activation de STAT3 et de NF-κB (Marty, Browning, et Ye 2003; Yu et al., 2008). La petite GTPase Rho est aussi modulée par Gα15 *via* p63RhoGEF (Su, Ho, et Wong 2009; Giannone et al., 2010). Le facteur de transcription TFE3 peut activer Gα15 indépendamment des RCPGs et sa complexation avec Gα15 entraîne leur translocation nucléaire pour réguler l'expression de gènes (Yeung et Wong 2009). (Adapté de Lo et al., 2003; Su et 2009; Giannone et al., 2010).

Récemment, il a été démontré que la protéine Gα15 et son ARNm sont fortement exprimés dans les cellules de tumeurs neuroendocrines gastro-entéro-pancréatiques (GEP-NEN) et sont aussi détectables dans les échantillons cliniques (Zanini et al., 2015). Dans les cellules de néoplasie neuroendocrine de l'intestin grêle (SI-NEN), la sous-expression de Gα15 entraîne une diminution de la prolifération associée à l'inhibition de facteurs pro-prolifératifs Akt et ERK ainsi qu'à l'activation de l'apoptose. Cependant, l'activation de NF-κB est quant à elle amplifiée après stimulation du β1AR par exemple. Aussi, lorsque Gα15 est sous-exprimée, les niveaux de transcription des inhibiteurs de cycle cellulaire (inhibiteur de la kinase dépendante des

cyclines 2A, CDKN2A) augmentent malgré la stimulation par la NNK (*Nicotine-derived nitrosamine ketone*, un agoniste pro-prolifération du β1AR) contrairement aux conditions contrôles, suggérant ainsi que l'expression de Gα15 pourrait les réguler négativement, les inhibiteurs de cycle cellulaire favorisant ainsi la croissance tumorale. De plus, la surexpression de Gα15 est associée à une survie plus faible des patients SI-NEN (*Small intestinal neuroendocrine neoplasia*) (Zanini et al., 2015). Récemment, l'anticorps monoclonal AC10364 nouvellement mis au point et capable de cibler des protéines dans les lysats cellulaires provenant de plusieurs lignées de carcinome incluant les cancers gastriques (cellules KATO-III), du sein (cellule MCF-7), hépatocellulaires multi-résistant (cellule Bel/fu) ou l'adénocarcinome colorectal (cellule HCT-8), a été démontré comme inhibiteur spécifique de la viabilité et de la prolifération de cellules de carcinome hépatocellulaire (Wu et al., 2019). De manière intéressante, les cellules traitées avec AC10364 présentent une sous-expression significative de GNA15 associée à l'expression aberrante de multiples gènes liés à la tumorigenèse, comme la surexpression du suppresseur de tumeur P53, l'activation de Caspases 3 et 9 pour induire la mort cellulaire et la sous-expression de protéines anti-apoptotiques BLC-xl, accompagnée du blocage en phase S du cycle cellulaire (Wu et al., 2019). Certes, le lien direct entre Gα15 et ces facteurs n'est pas élucidé, mais il paraît évident que cette sous-unité est un acteur clé de la croissance tumorale.

Actuellement, l'émergence des bases de données « omiques », répertoriant les niveaux d'expression de nombreux gènes et protéines, a permis d'identifier GNA15 comme l'un des gènes codant une protéine G les plus importantes dans l'agressivité de nombreux cancers. Par exemple, le criblage fonctionnel à l'échelle du génome a révélé GNA15 parmi les gènes qui stimulent la surexpression de MDM2 (*murine double minute 2*), un important régulateur négatif du suppresseur de tumeur p53 dans les leucémies (Kim et al., 2016). De même GNA15 s'est révélé, avec de nombreuses chimiokines pro-inflammatoires, comme l'un des gènes impliqués dans la pathologie du cancer de l'ovaire (Lu et al., 2017). Très récemment, dans le but de trouver des gènes candidats potentiels biomarqueurs dans les PDAC, Gu et ses collègues ont évalué les bases de données (*Gene Expression Omnibus*) et identifié GNA15 combiné à 7 autres gènes (CXCL5, CCL20, NMU, F2R, ANXA1, EDNRA, LPAR6), tous surexprimés dans les PDAC par rapport au pancréas normal, comme potentielles cibles pour le diagnostic et les stratégies thérapeutiques des PDAC (Gu et al., 2019).

Même si le mécanisme fonctionnel n'est pas toujours bien décrit dans ces cancers, globalement, ces études proposent que l'expression ectopique de Gα15 dans des systèmes non hématopoïétiques doit être considérée comme un signe pathologique. Cependant, Gα15

présente des niveaux faibles en ARNm ainsi qu'au niveau protéique dans de nombreuses lignées cellulaires de cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC) par exemple (Avasarala et al., 2013). Sa sous-expression augmente la prolifération de ces cellules tandis que sa surexpression à l'aide du mutant actif Gα15QL diminue significativement la prolifération cellulaire. Avasarala et ses collègues ont aussi établi l'importance de Gα15 en tant qu'effecteur essentiel en aval de la voie de signalisation non canonique de Wnt. En effet, Wnt7a/Frizzled9 peut recruter Gα15 pour activer le suppresseur de tumeur PPARc (*peroxisome proliferator-activated receptor γ pathways*) *via* ERK5 indépendamment de la β-caténine dans les cancers du poumon (Avasarala et al., 2013).

En conclusion, la fonction exacte de cette sous-unité Gα15 au niveau cellulaire est encore peu connue et semble provoquer des effets distincts en fonction du type cellulaire ou du cancer testé. Le rôle de Gα15 dans la gliomagenèse n'est pas abordé et a donc été étudié dans ce travail de thèse.

Objectifs de thèse

Représentant environ 45% de tous les gliomes, le GBM est la tumeur cérébrale la plus agressive chez l'adulte. Comme nous l'avons décrit dans l'introduction de ce manuscrit, le caractère très hétérogène du GBM associé aux signatures moléculaires et expressions géniques, mais également aux conditions microenvironnementales hypoxique et inflammatoire, contribuent à la récidive quasi-systématique après exérèse complète-radio/chiomiothérapie, et expliquent les nombreux échecs thérapeutiques. Malgré l'arsenal thérapeutique potentiellement disponible, appliqué parfois de manière multimodale, la survie des patients atteints de GBM n'est pas significativement améliorée, les défis à relever pour améliorer cette survie et la qualité de vie des patients restent énormes. Ainsi, l'identification de facteurs exprimés de manière différentielle qui pourraient mieux définir le comportement agressif des cellules de GBM fournirait une base pour le développement de thérapies innovantes et peut-être plus efficaces.

Une des caractéristiques des GBMs est leur capacité très migratoire et invasive, relayées principalement par des facteurs chimiotactiques dans un microenvironnement tumoral hypoxique et inflammatoire. Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) et leurs ligands, particulièrement les RCPGs de chimiokines, surexprimés dans les GBMs et stimulant la migration chimiotactique, l'invasion et l'angiogenèse jouent un rôle majeur dans le développement des GBMs et l'acquisition d'un phénotype agressif. Dans ce contexte, notre équipe avait démontré que le récepteur UT de l'urotensine II (UII), une chimiokine peptidique pro-angiogénique et pro-inflammatoire, ainsi que le système chimiokine bien connu SDF-1α/CXCR4 semblent systématiquement co-exprimés dans les GBMs, plus spécifiquement dans les zones vasculaires et périnécrotiques, montrant une corrélation avec le grade des gliomes. *In vitro*, nous avions aussi établi que l'UII/UT stimule la migration chimiotactique des cellules de GBM *via* les couplages de type Gαi/PI3K et Gα13/Rho/ROCK, des couplages précédemment mis en évidence pour le système SDF-1α/CXCR4 et d'autres RCPGs chimiotactiques. De plus, une récente analyse de la base de données TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) en composante principale réalisée par Alexandre Mutel, étudiant en thèse dans l'équipe, a permis d'identifier la signature d'expression des RCPGs exprimés dans les gliomes et particulièrement dans les GBMs, qui révèle un nombre très important de RCPGs chimiotactiques. Dans l'ensemble, leur expression et activité signalisante redondantes fréquemment associées à la tumorigenèse, en particulier dans les GBMs, soulignent l'intérêt d'étudier les nœuds de signalisation communs à l'ensemble de ces RCPGs chimiokines. Ces nœuds sont principalement représentés par les

protéines G hétérotrimériques composées des sous-unité α, β et γ, qui couplent ces RCPGs et relayent les effecteurs secondaires intracellulaires, probablement essentiels à la régulation de l'agressivité des GBMs.

Ainsi, l'objectif de mon travail de thèse était d'identifier les principales protéines Gα, β et γ parmi les 31 protéines G exprimées chez l'Homme dans les gliomes et celles plus spécifiquement associées au degré de malignité, et à l'agressivité des GBMs, puis à déterminer le rôle d'une de ces protéine G dans les mécanismes de prolifération et d'invasion de cellules de GBM.

Pour atteindre cet objectif, ce projet de recherche a consisté à :

(1) analyser le niveau d'expression des protéines G dans les gliomes et identifier les plus spécifiques des GBMs incluant la sous-unité Gα15 atypique et non ubiquiste et tester leur implication potentielle dans la prolifération et la migration des GBM par répression de leur expression dans la lignée U87 de GBM,

(2) déterminer les effets de l'inhibition d'expression ou de la surexpression de Gα15 qui se montre exprimée *de novo* dans certains GBM notamment mésenchymateux, dans les processus cellulaires de type la survie/prolifération, remodelage du cytosquelette d'actine, adhésion et migration des cellules de GBM (U87 et 8MG),

(3) caractériser les principales voies de signalisation oncogénique et mésenchymateuse dépendantes de l'expression de Gα15 par des méthodes de qPCR et Western blot et enfin,

(4) rechercher l'impact d'une diminution ou d'une stimulation de l'expression de Gα15 sur la croissance *in vivo* des cellules U87 xénogreffées dans le striatum de souris *Nude*, et la survie des animaux.

Résultats

G proteins expression determines glioma subgroup signature: specific role of Gα15 in GBM mesenchymal phenotype

Kléouforo-Paul Dembélé, Alexandre Mutel, Laurence Desrues, Celeste Nicola, Pierre-Olivier Guichet, Laurent Mouchard, Caroline Bérard, Estelle Dupel, Jean-Baptiste Latouche, Olivier Langlois, Fabrice Morin, Pierrick Gandolfo and Hélène Castel.

G proteins expression determines glioma subgroup signature: specific role of Gα15 in GBM mesenchymal phenotype

Kléouforo-Paul Dembélé[1], Alexandre Mutel[1], Laurence Desrues[1], Celeste Nicola[1], Pierre-Olivier Guichet[1], Laurent Mouchard[2], Caroline Bérard[2], Estelle Dupel[3], Jean-Baptiste Latouche[3], Olivier Langlois[1,4], Fabrice Morin[1], Pierrick Gandolfo[1] and Hélène Castel[1]

[1]Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM U1239, DC2N, 76000 Rouen, France, Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), 76000 Rouen, France
[2]UNIROUEN, LITISLAB, TIBS, 76000 Rouen, France
[3]UNIROUEN, INSERM 1245, Genomic and personalized medicine in cancer and neurological disorders, 76000 Rouen, France;
[4] Department of Neurosurgery, Rouen University Hospital, France

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

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

Running head: Gα15 protein subunit involvement in mesenchymal glioma migration

Conflicts of Interest and Source of Funding

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

This work was co-supported by Inserm, Normandie Rouen University, Ligue contre le Cancer Normandie and Géfluc. Europe gets involved in Normandie with European Regional Development Fund (ERDF).

Abstract

Glioma represent 81% of malignant brain tumors, and the most aggressive form corresponds to glioblastoma multiform (GBM). Despite multimodal surgery and radio-chemotherapy treatments, the median overall survival of patient is only 14.6 months. Thus, improved strategies for an effective treatment are urgently needed. One of the main reasons for this poor prognosis resides in the highly invasive nature of these tumors towards chemokine cues, making total resection of glioma impossible. We recently demonstrated that UT, the receptor of urotensin II (UII), a pro-angiogenic and pro-inflammatory chemokine, as well as the well-known chemokine system SDF-1/CXCR4 are systematically co-expressed in GBMs and their expression are correlated with the grade. Thus, the implication and redundant overexpression of chemokine G protein-coupled receptors (GPCRs) raise the issue of studying signaling nodes common to all these GPCRs promoting invasiveness. These nodes are primarily represented by heterotrimeric G proteins (Gα, β, and γ) relaying many intracellular signaling pathways, potentially regulating GBM aggressiveness.

Here we first analyzed the expression of the 31 subunits (15α, 5β and 11γ) of G proteins from the TCGA database and identified Gα15 Gαi3, Gβ2 and Gγ5 subunits particularly overexpressed and specific of GBM, associated with a poor patient survival. Then, the function of Gα15, an atypical and non-ubiquitous G protein, was studied by its repression using siRNA, shRNA or Crispr-Cas9 (Gα15-KO) technology or overexpression *via* pLenti-viral infection of U87 and 8MG GBM cell lines. Results demonstrated that in the absence of exogenous stimulation of chemokine GPCRs, Gα15 expression promotes GBM cell survival/proliferation and GBM cell motility/migration through an increased number of Phospho-paxillin and vinculin-enriched focal adhesion complexes and activation of stress actin fiber polymerization, mechanisms associated with the PLCβ2, ERK, Akt and STAT3 oncogenic protein expression. These Gα15-induced signaling cascades were associated with i) mRNA expression of master mesenchymal transcription factors including C/EBPβ, RUNX1, FOSL2, BHLHB2, ZEB1 and repression of tumor repressors DKK1, ZNF23 or SOX2, ii) expression of angiogenic (Angiogenin and VEGFA) and the inflammatory SERPINA1 markers. *In vivo*, Gα15-KO GBM xenografts significantly improved *Nude* mouse survival while Gα15 overexpressing cells induced the poorest survival animal rate compared with U87-bearing mice.

Collectively, this work highlights for the first time the direct involvement of the Gα15 subunit in the aggressiveness of GBMs and suggests this subunit as a potential diagnostic and therapeutic target of GBMs.

Introduction

1. Classification of glioma

Gliomas are the most common primary intracranial tumor, representing 81% of malignant brain tumors. Although relatively rare, they cause significant mortality and morbidity. Gliomas form a heterogeneous group of tumors of the central nervous system (CNS) and were classically through the World Health Organization (WHO) classified based on histologic types and malignancy grades (Louis et al., 2007). All tumors with an astrocytic phenotype were grouped differently from those with an oligodendroglial phenotype, no matter if the various astrocytic tumors were clinically similar or disparate. According to these criteria, WHO 2007 has identified the growing malignancy of astrocytomas into 4 grades (I-IV) and of oligodendrogliomas in 3 ones (I-II) (Louis et al., 2007). But, in a clinical point of view, for most of low- or high-grade gliomas, their diffuse nature leads to extensive infiltration in the CNS parenchyma (Louis et al., 2016). Patients with glioblastoma multiform (GBM), the most common (~45% of all gliomas) and aggressive glioma (Grade IV), show only a very poor prognosis with only 5% of patients still alive at 5 years (Ostrom et al., 2014).

It's important to underline the genetic aspect also because it can be responsible for divergent clinical outcomes between these two types of neoplasm and may explain differential response to treatments. In agreement with this concept, in 2016, WHO gives rise to a new glioma classification that breaks with the old principle of diagnosis based entirely on microscopy by incorporating molecular parameters to define many glioma tumor entities (Louis et al., 2016). The use of "integrated" phenotypic and genotypic parameters for CNS tumor classification adds in fact levels of objectivity that has been missing from some aspects of the previous diagnostic processes. Thus, the mutation of the gene encoding isocitrate dehydrogenase 1 or 2 (IDH1/2), associated with 1p19q co-deletion, is a predictive marker of response to chemotherapy (Stancheva et al., 2014) and is mainly associated with oligodendrogliomas. Conventionally, the vast majority of GBMs have a wild-type IDH1/2 status, with an amplification of EGFR. In addition, mutations in PTEN are rather poor prognosis in terms of overall survival and fall into the category of GBM. GBM is the most frequent and aggressive primary malignant brain tumor in adults (Stupp et al., 2005; Teo et al., 2014).

Despite intensive standard treatment including surgical resection followed by concomitant radio-chemotherapy and adjuvant chemotherapy with temozolomide (Stupp et al., 2005; Stupp et al., 2015), the median overall survival is around 15 months from the time of diagnosis. Unlike with most other cancers like melanoma, breast, renal and lung cancers in which systemic

treatments now improve long-term survival, the survival rates for GBM have not improved much in recent years, even with the introduction of new treatments such as targeted therapies and immunotherapies (Touat et al., 2017; McGranahan et al., 2017).

The reasons for this poor prognosis can be explained by *i)* the highly invasive nature of these tumors, making total resection of gliomas impossible, *ii)* the intrinsic or acquired radio- and/or chemo-resistance of these glial tumor cells and/or *iii)* the presence of a blood-brain barrier (BBB) that limits the delivery of anti-neoplastic agents.

2. Invasion and chemotactic brain invasion

One of the defining characteristics of GBM is an abundant and aberrant vasculature (Hardee and Zagzag, 2012) associated with hypoxic state of pseudopalisading peri-necrotic areas with the GBM. This angiogenesis process is promoted by diverse molecular mechanisms initiated by GBM cells to adapt to local hypoxic environment for continuous growing. Among these molecular mechanisms, the hypoxia-induced transcription factor-1α (HIF-1α) has been described as being related to tumor growth and invasiveness (Zagzag et al., 2008; Seidel et al., 2010).

Glioma cells undergoing mesenchymal (MES) transition acquire the potential to initiate metastasis and invasion. Inflammatory processes or hypoxic microenvironment within the tumor or neighboring normal tissues, may result in the recruitment of circulating or residential myeloid cells (macrophages or microglia) into the tumor stroma (Ye et al., 2012). These cells release a number of growth factors, including TGF-β, EGF, PDGF and FGF-2, which trigger alterations in the levels of transcription factors required for the initiation of EMT, and also in numerous proteases that increase invasiveness into the surrounding normal brain (Ye et al., 2012).

3. Detailed description of transcription factors involved in MES transition in glioma

It has been shown that Twist-1 increases GBM invasion, migration, widespread gene transcription (as SNAI2) (Mikheeva et al., 2010) and that STAT3 is a signaling protein activated by cytokines to form phosphorylated dimer proteins and act as transcription activator to regulate cell growth and apoptosis inducing MES transition. The transcription factor C/EBPβ has also been shown to be associated with the initiation and regulation of mesenchymal transformation and, like STAT3 in GBM, regulates mesenchymal gene expression and tumor aggressiveness (Carro et al., 2010). The snail family factors, in particular SNAI1 is a transcriptional repressor that down-regulates expression of ectodermal genes in mesoderm and

promotes in GBM MES transition, proliferation, viability and migration (Myung et al., 2014). SNAI2/SLUG is a transcription factor that represses the transcription of E-cadherin involved in MES transition and provides the mesenchymal signature of GBM, increases tumor invasiveness and growth (Mikheeva et al., 2010; Yang et al., 2010; Cheng et al., 2012).

Patient GBM samples with increased expression of a mesenchymal gene signature have shown a shorter time to tumor recurrence (Cheng et al., 2012) and in one study, 52% of primary GBM and 85% of recurrent primary GBM with prior treatment expressed a mesenchymal transcriptome, and molecular phenotype (Tso et al., 2006). These results support the poor prognosis factor of mesenchymal-types GBM and suggest that this subtype transformation may be a mechanism of resistance.

GBM cells evolve in an acidic and hypoxic environment which releases numerous factors promoting cell motility, including ligands of Receptor Tyrosine Kinase-type (RTK) expressed by glioma cells. One of them, EGF, plays an important role in the proliferation of GBM and is also involved in tumor invasion by activating the EGFR constitutively active (EGFRvIII) (Welch et al., 2002; Vázquez-Prado et al., 2016)(Lal et al., 2002) and/or overexpressed (Silbergeld and Chicoine, 1997). Other auto/paracrine phenomena involved in the invasion have been described for the TGFα (El-Obeid et al., 1997), PDGF-α (Feng et al., 2012) or SF/HGF (Eckerich et al., 2007), whose receptors are expressed by tumor cells. Consistent with these data, the expression of the HGF/SF-Met receptor system is positively correlated with tumor grade (Koochekpour et al., 1997), and HGF/SF appears to be the most potent chemotactic factor tested on glioma cell lines (Brockmann et al., 2003).

The *WNT/β-catenin* pathway is an important stem cell maintenance pathway and is involved in therapy resistance (Clevers et al., 2014). GBM cells, in which the WNT/β-catenin pathway is activated, may also trigger the expression of a set of MES transition activators, including Twist1, ZEB1, SNAI1 and SLUG. Furthermore, high expression levels of the WNT/β-catenin receptor, Frizzled-4, promotes the expression of SNAI1 and the acquirement of a mesenchymal phenotype in GBM (Liu et al., 2011). In addition to WNT/β-catenin, *NOTCH* is a major regulator of glioma stem cells (GSCs) within their microenvironments. Fan et al. (2010) reported that inhibition of this signaling pathway by γ-secretase inhibitors reduces stemness of GBM cells and CD133-expression (Fan et al., 2010).

4. G protein coupled receptors and G proteins: emerging key actors in cancer

GPCRs comprise a large and diverse superfamily of members identified in organisms as evolutionarily distant and involved in cell-surface signal transmission. With more than 800

members and accounting for >2% of the total genes encoded by the human genome (Dorsam and Gutkind, 2007), many of the GPCRs activated by ligands are linked to cellular functions including neurotransmission, hormone and enzyme release from endocrine and exocrine glands or cell proliferation while aberrant activation contributes to many pathological progression like tumorigenesis, angiogenesis and metastasis including GBM development (Rubin et al., 2003; Epstein, 2004; Dorsam and Gutkind, 2007; Grieco et al., 2011; Wu et al., 2012; Liu et al., 2013; Federico et al., 2014; Franco et al., 2014; Castel et al., 2017). This suggests the potential interest of GPCRs and their primary effectors in the treatment of devastating cancers.

Among GPCRs, receptors for chemokines or vasoactive molecules are of key interest in the development of gliomas and acquisition of an aggressive phenotype. Chemokines can be secreted by normal brain cells and gliomas. As the most known example, the chemokine Stromal cell-Derived Factor-1α (SDF-1α also known as CXCL12) and its receptor C-X-C chemokine receptor type 4 (CXCR4), are overexpressed in GBM compared with health brain parenchyma (Sehgal et al., 1998; Bajetto et al., 2006). The effect of SDF-1α on glioma cell invasion was first demonstrated *in vitro* (Ehtesham et al., 2006). Its role was then tested *in vivo* in a mouse model of brain tumor using a particular siRNA directed against CXCR4, showing a decrease in tumor growth and cell infiltration through the fibers in brain parenchyma (Zagzag et al., 2008; Wang et al., 2012). Moreover, CXCR4 knockdown in glioma cells has also shown to reduce tumor invasiveness *in vivo*, to inhibit invasion of tumor cells along blood vessels. Interestingly, CXCR4–deficient glioma cells were more sensitive to radiation-mediated cell death (Yadav et al., 2016). In fact, tumor cell migration is a key and rate-limiting event in metastasis, and CXCL12/CXCR4 activates mTORC inducing chemotaxis migration and spontaneous metastasis dependent of Gαi family (Dillenburg-Pilla et al., 2015).

Other paracrine signals involved in motility also require bioactive lipids. Indeed, autotaxin, a protein overexpressed in GBM (Kishi et al., 2006) induces a lysophospholipase D activity catalyzing the production of Lysophosphatidic Acid (LPA). By linking its LPA1 receptor expressed on the membrane of glial tumor cells, it promotes invasion into the brain parenchyma (Hoelzinger et al., 2008). More recently, the Team Astrocyte and Vascular Niche similarly established that a vasoactive peptide urotensin II (UII) activating a GPCR named UT (Lecointre et al., 2015) also promotes migration of glioma cells *via* chemotaxis and localized inhibition of autophagic mechanisms (Coly et al., 2016).

4.1. The transducing mechanism of GPCR and G proteins

Stimulation of these GPCRs activates a group of coupling proteins, the heterotrimeric guanine nucleotide-binding proteins (G proteins) composed of α, β and γ subunits, which are signal transducers of cell surface GPCR to numerous intracellular signaling pathways (Gilman, 1987; Simon et al., 1991). In fact, upon agonist binding, GPCRs increase the exchange of GDP bound on the Gα subunit with GTP, this leads to the dissociation of Gα subunit from Gβγ dimer resulting in two functional subunits (Gα and Gβγ). Both Gα and Gβγ subunits signal to various cellular pathways. All vertebrate Gα proteins described so far belong to four major classes, Gαs, Gαi/o, Gαq/11 and Gα12/13 (Hurowitz et al., 2000). Recently, a fifth family called Gαv, was identified in fish (Oka et al., 2009) and considered attributed to Gαi and Gαq families despite the presence of its gene in a limited number of species (Krishnan et al., 2015; Lokits et al., 2018). Based on the amino acid sequence, structural and functional homologies, Gαs class is composed by Gαs et Gαolf; the Gαi/o class contains Gαi, Gαo, Gαt, Gαz and Gαgust; the Gαq/11 class includes Gαq, Gα11, Gα14 and Gα15/16; and the Gα12/13 class is composed of the two Gα12 and Gα13 subunits (Downes and Gautam, 1999; Wettschureck and Offermanns, 2005). In addition, 5 β subunits and 12 γ subunits are identified exhibiting distinct signaling (Downes and Gautam, 1999).

Heterotrimeric G proteins and effectors were shown to be involved in oncogenic cell signaling and become very attractive for therapeutic peptide development. Indeed, many studies have demonstrated that they regulate cancer cell migration and chemotaxis, which are prerequisites for metastasis formation (Dorsam and Gutkind, 2007; Entschladen et al., 2011). For example, GPR116, an adhesion GPCR, promotes breast cancer metastasis by regulating cell migration *via* the Gαq-p63RhoGEF-Rho GTPase pathway (Tang et al., 2013). Similarly GPR78 likely promotes lung cancer cell migration and metastasis through activation of Gαq-Rho GTPase pathway (Dong et al., 2016). More specifically, a proto-oncogenic function of Gα12 has been demonstrated in ovarian cancer (Goldsmith et al., 2011; Ha et al., 2014), since silencing of Gα12 drastically attenuates LPA-stimulated phosphorylation of CREB through Ras-ERK-dependent mechanism, leading to the proliferation of ovarian cancer cells (Ha et al., 2014). LPA has also been shown to stimulate the migration of GBM cells through PTX-sensitive Gαi signaling pathways (Malchinkhuu et al., 2005), suggesting at least in part two possible couplings. Other lipids as PGE2 can stimulate the proliferation of colon cancer cells by activation its EP2 receptor coupled to the Gαs. The mechanism requires activated Gαs able to bind the RGS domain of axin, promoting the release of GSK-3β from the complex leading to the stabilization and nuclear translocation of β-catenin, to induce expression of growth-

promoting genes (Castellone et al., 2005). Finally, In Non-small Cell Lung Cancer, the well-known CXCL12-CXCR4 and the UII/UT systems recruit Gαi to activate the PI3K and MAPK signaling pathways which contribute to chemotaxis, cell migration, or secretion of various matrix metalloproteinases (MMP) leading to invasion (Otsuka and Bebb, 2008).

4.2. Current work hypothesis

Interestingly, many cancers rely on G proteins and GPCRs (Dorsam and Gutkind, 2007; Cherry and Stella, 2014; O'Hayre et al., 2013); their aberrant expression and activity are frequently associated with tumorigenesis. More than these previously enumerated, GPCRs are usually highly expressed in cancer, their implication and redundant expression raises the issue of studying signaling nodes common to all these GPCRs. These nodes, are primarily represented by G proteins that couple these GPCRs, relaying secondary effectors, playing a central role in the regulation of cancer development.

In this context, we attempted to investigate the main role of G proteins in glioma and identified their expression signature (see results section) leading to the discovery of some key Gα, β and γ protein subunits specific of GBM including the non-ubiquitous and rather atypical Gα15. Indeed, little information is currently available about its exact functions and role in cancer, especially in glioma.

4.3. Direct role of G proteins in oncogenesis

Some recent publications highlighted the direct crucial role of G proteins and the consequences of their mutations on tumor aggressiveness. As an example, mutations on the GNAQ and GNA11 genes occur in 3.3% of 8,778 samples analyzed from the COSMIC database (2013) and one of the most frequently mutated G proteins in human cancer appears to be GNAS with 4.4% mutations in the 9,486 tumor samples (O'Hayre et al., 2013). It has been suggested that $G\alpha_S$ mutation could activate pro-inflammatory pathways in pancreatic, lung, colon, ovarian cancer and promote the aberrant growth (O'Hayre et al., 2013) while its deletion in the mouse skin was sufficient to induce basal-cell carcinogenesis (Iglesias-Bartolome et al., 2015). Frequent somatic mutations have also been reported in GNAQ encoding $G\alpha_q$ subunit, promoting blue nevi (83%) and ocular melanoma of the uvea (46%) (Van Raamsdonk et al., 2009). Gα13, a Gα12/13 family member, has been shown to be upregulated in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). Its knockdown decreased membrane type 1 matrix metalloproteinase-driven proteolytic invasion in three-dimensional collagen and enhanced E-cadherin-mediated cell-cell adhesion. They conclude that Gα13 regulate PDAC cell invasion

(Chow et al., 2016). A deep sequencing study on germinal center B cell-derived lymphoma (GCB-DLBCL) have revealed mutation of Gα13 gene GNA13 (Muppidi et al., 2014). Gα13-deficient mouse GC B cells and human GCB-DLBCL cells were unable to suppress pAkt and migration in response to sphingosine-1-phosphate (S1P), and Gα13-deficient mice developed GC B cell-derived lymphoma. In addition, deficiency in Gα13 led to GC B cell dissemination into lymph and blood. This study of Muppidi and colleagues (Muppidi et al., 2014), in contrast to those of Chow and colleagues (Chow et al., 2016) in PDAC cell, proposes Gα13-dependent pathway as a growth suppressor and dissemination blocker of GCB-DLBCL.

Recent study has shown that Gαi3 is overexpressed in glioma and promote glioma cell growth via Akt-mTOR activation (Z Li et al., 2016a). They demonstrated that Gαi3 knockdown significantly decrease cell viability, colony-forming ability and increase apoptosis. Moreover, the silencing of Gαi3 inhibits tumor growth *in vivo* and sensitizes cells to irradiation inducing cell death.

Although Gαi, Gαq, Gαs, Gα12/13 families, in general have been shown to regulate tumorigenesis, it is only recently that the involvement of Gβγ subunits have also been highlighted in cancer. Yoda and colleagues identified alterations in GNB1 and GNB2 in multiple human cancers. They demonstrated that recurrent mutations in the Gβ proteins promotes transformation and confer resistance to targeted kinase inhibitors across a range of human tumors (Yoda et al., 2015). It has also been shown that Gβ subunits interact with the oncoprotein Tax-1, which expression is correlated with activation of the CXCR4 and known to regulate the expression of several cellular genes involved in cellular activation, proliferation, and transformation (Twizere et al., 2007).

In fact, Gαi2 is necessary for CXCL12-induced membrane translocation of ELMO1, and metastasis of breast cancer cells (Li et al., 2013)**.** Interestingly, it has been demonstrated that diverse chemoattractants stimulate ELMO1/2 translocation to the plasma membrane. This relocalization is mediated by Gβ, which directly interacts with the amino-terminal region of ELMO (Wang et al., 2016: 1). Gβ5 was described to protect colon carcinoma cells from apoptosis by decreasing the cell surface expression of the TRAIL-R2 death receptor, inducing the expression of the anti-apoptotic protein XIAP and activating the NF-κB signaling pathway (Fuchs et al., 2015). Moreover, PI3Ks and P-REX1, a Rac-specific guanine nucleotide exchange factor (RacGEF), are fundamental Gβγ effectors in the pathways controlling directionally persistent motility for tumor progression (Vázquez-Prado et al., 2016). In preclinical murine models of cancer, inhibition of Gβγ attenuates tumor growth, whereas in cancer patients, aberrant overexpression of chemotactic Gβγ effectors and recently identified

mutations in Gβ correlate with poor clinical outcome (Vázquez-Prado et al., 2016). A very recent study highlights that Gβγ is efficient to promote cytoskeletal reorganization, cell protrusion, and migration via P-REX1 directly activation. They suggest that this signaling is mainly associated to Gβγ and is more effective when it comes from Gαi-linked GPCRs, Gαq and Gα13 interfere with this signaling (Welch et al., 2002; Cervantes-Villagrana et al., 2019).

Emerging studies have revealed that specific protein kinase D (PKD) isoforms are dysregulated in cancer cells and implicated in a variety of cellular processes important to cancer development, including cell survival, migration, proliferation, immune responses, and angiogenesis (LaValle et al., 2010; Lau et al., 2013). Interestingly, Lau and colleagues demonstrated that Gβγ mediates activation of PKD in phospholipase C (PLC) β2/3-dependent manner, and the specific identities of Gγ components within Gβγ dimers may determine this stimulatory action. In fact, only those Gβ1γ dimers with γ2, γ3, γ4, γ5, γ7, and γ10 can serve as effective activators of PKD (Lau et al., 2013).

4.4. Description of Gα15 and its expression

The Gα15, with a predicted molecular mass of 43,5 kDa, is a Gαq subfamily member sharing ~57% amino acid sequence identity with $G\alpha_{11}$ and Gαq (Strathmann and Simon, 1990; Yu et al., 2008), 40% amino acid identity with Gαs and 45% identity with members of the Gαi class of G proteins (Amatruda et al., 1991). First cloned in mouse (Wilkie et al., 1991; Wilkie et al., 1992) the human isoform then isolated was named $G\alpha_{16}$ assuming it represented a novel subtype (Amatruda et al., 1991) but later it was recognized as the poorly conserved ortholog of Gα15 sharing only 85% sequence identity, then renamed Gα15 (Chakravorty and Assmann, 2018). Like the other $G\alpha_q$ subfamily members, Gα15 is palmitoylated at distinct polycysteine sequences (Cys9 and Cys1) in N-terminus, important for its plasma membrane localization and functional activity (Pedone and Hepler, 2007). Another interesting structural modification of Gα15 is its possible phosphorylation by protein kinase C (PKC), unique among the members of the Gαq subfamily (Aragay and Quick, 1999; Gu et al., 2003; Su et al., 2009). Besides being palmitoylated and phosphorylated, recent study characterizes the degradation process of Gα15 through proteasome pathway depending on the subcellular localization and⁄or other protein interactions (Johansson et al., 2005).

Amatruda and colleagues first identified a Gα15 subunit as specifically expressed in human cells of hematopoietic lineage (Amatruda et al., 1991). Some studies, then confirmed its rather exclusive expression in normal and malignant hematopoietic progenitors with lack of expression in mature leukocytes (Pfeilstöcker et al., 1996; Grant et al., 1997). In normal

hematopoietic cells, Gα15 expression was high in hematopoietic progenitor cells, $CD34^+$ cells, then decreased sharply during granulocytic and erythroid differentiation (Tenailleau et al., 1997). Since many studies have identified its expression in different cell lines. It was reported that Gα15 expression is absent or strongly downregulated in differentiated normal cells or in leukemia cell lines after induction of differentiation (Grant et al., 1997; Mapara et al., 1995; Amatruda et al., 1991). Moreover, Gα15 expression was observed in human cell lines of myelomonocytic and T-lymphocytic origins, but its expression is restricted to progenitor B cells during B-cell differentiation (Mapara et al., 1995). These results imply that Gα15-dependent signaling may modulate cell proliferation or differentiation, depending on the specific cellular environment (Tenailleau et al., 1997; Su et al., 2009). Further information about expression and potential roles of Gα15 in non-hematopoietic cells has been investigated. Expression of Gα15 was found in cultured keratinocytes (Rock et al., 1997), and enhanced Gα15 mRNA expression was detected in skin, epidermoid A431 cell lines, hematopoietic stem cells, unlike other human tissues like liver, muscle, spleen or adrenal (Giannone et al., 2010). These studies have shown that Gα15 distribution profile is non-ubiquitous and should be more investigated depending on the pathological situations.

4.5. Roles of Gα15

Many physiological and physiopathological roles of the Gα15 subunit have been described. Gα15 can activate PLC and its unique promiscuity for GPCRs in general with low specificity (Offermanns and Simon, 1995), highlights its importance in cellular signaling. It has been proposed that whilst $G\alpha_{q/11}$ members lead to the recruitment of PLC-β1=β3≥β4≥β2, Gα15 is also able to couple all these PLCβ (Kozasa et al., 1993) but preferentially the PLC-β2 (Lee et al., 1992). Interestingly, the vasopressin V2 (V2R), the dopamine D1A and the adenosine A2A GPCRs are naturally coupled to Gαs and the adenylyl-cyclase (AC) for cAMP production. When coexpressed with Gα15, unlike the others of $G\alpha_q$ family, the ligand-dependent inositol phosphate formation was significantly increased (Offermanns and Simon, 1995). In addition, Innamorati and colleagues demonstrated similar result with other GPCR (Innamorati et al., 2009) and showed that Gα15 was able to couple multiple GPCRs like β2 adrenergic (β2AR), V2R, and δ-opioïd receptors (DOR), to various downstream signaling pathways like inositol phosphate (IP) and cAMP accumulation but exhibit resistance to β-arrestin-induced desensitization. Interestingly, unlike Gα15, the other $G\alpha_q$ members were not able to mediate β2AR ligand-dependent activation of PLC when cotransfected in COS-7 cells (Wu et al., 1995). Deletion of the gene encoding Gα15 in mice reduced the ability of C5a to induce Ca^{2+} release

in macrophages without impacting other GPCRs like $P2Y_2$ purinoceptor coupling (Davignon et al., 2000). Unexpectedly, Gα15 silencing in erythroleukemia cells reduced intracellular Ca^{2+} mobilization upon stimulation of the same $P2Y_2$ purinoceptor (Baltensperger and Porzig, 1997). These studies establish that Gα15 functional specificity could depend on the cell type or the specific GPCR coupling. To better specify the Gα15 functions, many researchers took advantage of Gα15 constitutively active mutant (Gα15-Q212L). Indeed, many studies have shown that expression of Gα15QL in different cell lines first induces activation of PLCβ which triggers the metabolism of PIP2 to form IP3 and DAG, and the latter can modulate numerous signaling cascades, like activation of PKC, STAT3 and NF-κB signaling pathways (Lo et al., 2003; Lo and Wong, 2006; Yang et al., 2001; Liu and Wong, 2004).

The oncogenic signaling of Gα15 is not well described however, some recent studies suggest that Gα15 supports tumorigenic signaling. It has been shown that Gα15 was not expressed in normal pancreas (Giannone et al., 2010), being the only member of the $G\alpha_q$ subfamily absent in pancreatic acinar cells (Yule et al., 1999). Surprisingly, Gα15 mRNA expression was detected in 11 established Pancreatic carcinoma (PaCa) cell lines showing that its expression in PaCa cells is strictly correlated with cell transformation (Giovinazzo et al., 2013). Giovinazzo and colleagues have then shown that Gα15 signaling may support tumor cells resistance to the hostile tumor microenvironment and proposed Gα15 as a novel pharmacological target of solid cancer and/or as a novel tumor marker for PaCa treatment. Recently, it has been shown that Gα15 was highly expressed at the mRNA and protein levels in Gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasia (GEP-NEN) cells and is detectable in clinical samples (Zanini et al., 2015). In small intestinal neuroendocrine neoplasia cell (SI-NEN), decreased expression of GNA15 was associated with inhibition of proliferation, activation of apoptosis and differential effects on pro-proliferative ERK, NF-κB and Akt signaling pathways. Higher Gα15 expression was associated with a poorer survival of patients with SI-NEN. Together, these studies suggest that the ectopic expression of this Gα15 protein in non-hematopoietic system must be considered as a pathological sign.

5. Objective of the study

Many cancers rely on G proteins and GPCRs (Dorsam and Gutkind, 2007; Cherry and Stella, 2014; O'Hayre et al., 2013); their aberrant expression and activity are frequently associated with tumorigenesis. Their implication and redundant expression of GPCRs coupling the same effectors, raise the issue of studying signaling nodes common to all these GPCRs. Indeed, these nodes are primarily represented by G proteins α and βγ potentially relaying many signaling

pathways would play a central role in the regulation of cancer development. In particular, we demonstrated that the chemokine components UII/UT and SDF-1α/CXCR4 (Rouen CHU Hospital, Pr A. Laquerrière) are found systematically co-expressed in GBM and found in vascular and perinecrotic areas, with a correlation with the grade. They are known to stimulate GBM cell chemotactic migration and invasion *via* activation of Gα12/13 and Gαi proteins (Lecointre et al., 2015; Coly et al., 2016). In addition, the role of the UII peptide as also observed for SDF-1α/CXCR4, favors the GBM growth *in vivo via* the stimulation of angiogenesis, suggesting a key role of the peptide in the progression of glioma.

In this context, we investigated about the main role of G proteins in glioma and identified their expression signature in GBM including the non-ubiquitous G protein alpha 15 (Gα15) from TCGA. It appears that Gα15 is one of the few GBM-specific G proteins. Up to know, sparse information is currently available about its specific role in cancer, and especially in glioma.

6. Material and Methods

6.1. Products and reagents

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Trypsin-EDTA (0.05%) and Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) were from GIBCO Life Technologies (Fisher Scientific, Illkirch, France). Lipofectamine 2000 and one shot TOP10 chemically competent E. Coli, were provided by Invitrogen (Fisher Scientific). 10% sodium dodecyl sulfate (SDS) solution and methanol were from Fisher Scientific. Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS), the antibiotic-antimycotic solution (penicillin 10,000 U/mL; streptomycin 10 mg/mL; amphotericin B 25 µg/ml), the penicillin/streptomycin solution (penicillin 10,000 U/mL; streptomycin 10 mg/mL), sodium pyruvate solution (100 mM), puromycin, fibronectin from human plasma (0.1%), 4′,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI), hematoxylin, normal donkey serum (NDS), paraformaldehyde (PFA), triton X-100, hydrochloric acid (HCl), TRIS-HCl (1 M), glycine, the cocktails of protease and phosphatase inhibitors, ammonium persulfate (APS), U73122, Tween-20, TRI Reagent, acrylamide/bisacrylamide 30% solution, N,N,N',N'-tetra-methyl-ethylenediamine (TEMED), polyvinylidene difluoride transfer membranes (PVDF, Merck), isopentane and WST-1 reagent were purchased from Sigma Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). PLC inhibition U73122 (112648-68-7) was from TOCRIS. Fetal Bovine Serum (FBS) was purchased from Dutscher (Brumath, France). FuGene HD and Improm-IITM Reverse Transcription System were obtained from Promega (Charbonnières-les bains, France). Cell line nucleofector kit V was from Lonza Sales Ltd (Basel, Switzerland). Mowiol 4-88 (Calbiochem) and ethanol were from VWR (Fontenay-sous-bois, France). ECL prime western-blotting detection reagent was from GE Heathcare (Freiburg, Germany). Transblot turbo RTA transfer kit PVDF was provided by Bio-Rad (Marnes-la-Coquette, France). 6,5 mm transwell with 8 µm pore polycarbonate membrane insert, 24- and 96-well cell culture plates were from Corning (Bagneaux-Sur-Loing, France). Antibodies raised against the Gβ2 subunit, the horseradish peroxidase-conjugated (HRP-conjugated) secondary antibodies against rabbit, mouse and sheep IgGs were from Santa-Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany). The rabbit monoclonal anti-Gα15 and mouse monoclonal anti-vinculin antibodies were obtained from Sigma Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). The secondary antibodies Alexa Fluor 488- and 594-conjugated donkey anti-rabbit (DAR488, DAR594) and Alexa Fluor 594-conjugated donkey anti-mouse and anti-sheep (DAM594, DAS594), the secondary Alexa Fluor 647-conjugated donkey anti-rabbit (DAM647) antibody, R415 rhodamine-phalloïdin and CellTracker™ Green CMFDA Dye were provided by Invitrogen (Fisher Scientific). Antibodies raised against paxillin (phospho Y31), CD44 and STAT3 were

purchased from Abcam (Cambridge, Great Britain). The polyclonal rabbit anti-Gαi3 and sheep anti-N-cadherin were respectively obtained from Proteintech (Euromedex, Souffelweyersheim France) and Novus Biologicals (Bio-Techne, Abingdon, UK). Primers were synthetized by Eurofins Genomics (Ebersberg, Allemagne). The control and Gα15 siRNA, GIPZ shRNA plasmid (control, GNA15, GNAI3, GNB2, GNG5), the transduction kit containing Trans-Lentiviral packaging mix (Kit TLP59143), the CaCl2 solution were purchased from Dharmacon (Horizon Discovery, Cambridge, UK). The lentiviral plasmid pLenti-CMV-MCS-GFP-SV-puro (Plasmid # 73582) was from Addgene (Cambridge, USA). The polybrene infection/transfection reagent (Sigma Aldrich, 107689) was generously provided by Dr. Luca GRUMOLATO (Inserm 1239, Mont-Saint-Aignan, France). The pLentiCRISPR V2 plasmid (control and with GNA15 guides) was purchased from GenScript (Hong-Kong, China). NucleoSpin RNAII kit for mRNA purification was from Macherey-Nagel (Hoerdt, France). Fast SYBR Green Master Mix and QuantStudio3 Real-Time PCR System were from Applied Biosystems (ThermoFisher Scientific, Illkirch, France). Temozolomide (TMZ) and Irinotecan (CPT-11) were from CTI Europe (Heusenstamm, Germany).

6.2. TCGA data analysis

The clinical and molecular data of 703 low grade glioma and GBM patient samples were down-loaded from The Cancer Genome Atlas (TCGA, https://tcga-data.nci.nih.gov/docs/publications/tcga/) generated by the TCGA Research Network (http://cancergenome.nih.gov/) firstly in 2014, and additional molecular informations were completed in February 2016. The molecular data used were mRNA expression levels of G protein α, β and γ subunits obtained from RNAseq analyses by means of Illumina TruSeq Kit Paired-end Sequencing on Illumina HiSeq2000 (TCGA Research Network, 2008). Detection of somatic variants (IDH_{mut}) from TCGA Whole-Exome Sequencing and RNA-Seq data was done using RADIA (Radenbaugh et al., 2014). The mRNA levels were represented as "normalized count" corresponding to a transformation of the "raw_count". For each gene of interest, all "raw_count" values were divided by the 75th percentile of the column patient (after removing zeros) and multiply by 1000.

6.3. Cell culture and transfection

The glioma cell lines SW1088 and U87MG were from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). 8MG, 42MG and GL15 cell lines were provided by Professor J Honnorat (CRNL, Lyon, France) and HEK293T were obtained in collaboration with Dr. J-B

Latouche (Inserm U1245, Rouen CHU Hospital). These cell lines were routinely maintained in our laboratory according to the instructions from ATCC. For all experiments, cells were cultured in complete culture medium containing DMEM, 2 mM sodium pyruvate, 1% antibiotic-antimycotic solution and 10% FBS, at 37°C in a humidified incubator (5% CO_2). Transient transfections were performed using FuGene HD or Amaxa Cell Line Nucleofector kit V according to the manufacturer's protocol recommendations. More precisely, for experiments done with siRNAs targeting Gα15, PLCβ2 or with control siRNA, 400 pmol of siRNA were used to transfect 2×10^6 glioma cells 72 h (for siGα15) and 48 h (for siPLCβ2) before all analysis, by means of the Amaxa Cell Line Nucleofector kit V protocol.

6.4. Stable cell line production by lentiviral infection

Plasmid construction

The human GNA15 cDNA inserted into pcDNA3.1 (cDNA Ressource Center, Detroit, MI, USA) was amplified and the PCR product was subcloned into pLenti-CMV-MCS-GFP-SV-puro (Appendix A) using the XbaI restriction site. The sequence of the resulting plasmid (pLentiGNA15) used for Gα15 stable overexpression was verified by sequencing (GATC Biotech, Köln, Germany).

Production of lentiviral particles in HEK293T cells

HEK293T cells (1.2×10^6) were seeded into a 6-well plate. After 24 h, 6 µg of each lentiviral vector (pGIPZ) (Appendix B) encoding the control shRNA plasmid or shRNA directed against mRNA encoding Gα15, Gαi3, Gβ2 or Gγ5, as well as the lentiviral vector GNA15 (pLentiGNA15) or its control vector (pLenti-CMV-MCS-GFP-SV-puro) have been successively mixed in the Trans-Lentiviral packaging mix, according to the manufacturer's protocol recommendations. The mixture was then incubated at room temperature for 3 min before incubation with the cells. After 16 hours of incubation (37 °C, 5% CO_2), the culture medium was replaced with serum-reduced medium (5% FBS, 1% penicillin/streptomycin). The viral particles released in the medium were collected at 48 h, centrifuged (1000 rpm, 3 min), and the particles-containing supernatants were stored at -80°C.

Glioma cell infection

To produce stable Gα15-upregulated or Gα15-downregulated glioma cell lines, 2×10^5 U87MG or 8MG cells were seeded in 6-well plates containing complete culture medium. After 24 hours, cell culture medium was replaced by the viral particles diluted in medium (1:1, vol:vol) supplemented with 8 µg/ml of polybrene infection reagent. The next day, culture medium of infected cells was renewed. The infected and expressing cells were selected in the

presence of 4 µg/ml of puromycin 48 h after infection for 10-15 days, with selective medium renewed every two days.

6.5. Generation of Gα15 knockout GBM cells

The Gα15 protein subunit encoded by the GNA15 gene, was targeted by a CRISPR-Cas9 system. GNA15-targeting sgRNA sequence is 5'-CGATCACGTTCTCGAAACAA-3'. The sgRNA sequence was inserted in the CRISPR-Cas9 vector and the ready-to-use plasmid called pLentiCRISPR V2 (control or containing GNA15 guide) was purchased from GenScript (https://www.genscript.com) (Appendix C). GBM cells (10^6) were cultured in complete medium and transfected 24 h after seeding with 4 µg of pLentiCRISPR V2 vector (control and containing GNA15 guide) using FuGene HD. After 48h, integrated cells were selected *via* resistance to puromycin and cloned by limiting dilution to attempt isolation of a GNA15 knockout cell (Gα15-KO individual clones). Thus, Gα15-KO clones 26-1, 26-2, 26-4, 26-6 and clone 3-1 were isolated and finally selected after verification of Gα15 expression levels. None of these clones was totally KO for GNA15.

6.6. Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)

Total mRNAs from all cell lines were extracted using TRI Reagent and purified with NucleoSpin RNAII kit according to the manufacturer's instructions and quantified by spectrophotometry (Nanodrop 1000, Ozyme, Saint-Cyr-l'Ecole, France). cDNA synthesis was carried out using Improm-II reverse transcription kit. All primers used are listed in Table 1. Each target mRNA gene was amplified and measured using the Fast SYBR Green Master Mix and the QuantStudio3 Real-Time PCR System according to the following protocol: 20 sec at 95°C, 40 cycles of amplification (denaturation: 3 sec at 95 °C, annealing and amplification: 30 sec at 60 °C). Fluorescence signals, which are proportional to the concentration of the PCR products, are measured at the end of each cycle and immediately displayed on a computer screen, allowing real-time monitoring of the PCR reactions. The fold change in expression of each target mRNA relative to ubiquitin C mRNA (UBC, internal control) was calculated based on the threshold cycle (Ct) as $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$, where $\Delta Ct = Ct_{target} - Ct_{UBC}$, and $\Delta(\Delta Ct) = \Delta Ct_{sample} - \Delta Ct_{control}$.

Genes	5'--3'	Primer sequences	Base number
ANG	forward	TTCCATTGTCCTGCCCGTTT	20
	reverse	GAAGTGTGTGTACCTGGAGTT	21
VEGFA	forward	CTTGCCTTGCTGCTCTACCT	20
	reverse	GCAGTAGCTGCGCTGATAGA	20
C/EBPβ	forward	ATCGACTTCAGCCCGTACC	19
	reverse	CCGTAGTCGTCGGAGAAGAG	20
FOSL2	forward	TATCCCGGGAACTTTGACAC	20
	reverse	TGAGCCAGGCATATCTACCC	20
BHLHB2	forward	ACCCAGCTCCCAAAGTGATG	20
	reverse	AAAGTCCGCTGGATGACTGG	20
RUNX1	forward	CCCATCGCTTTCAAGGTG	18
	reverse	TGGTCAGAGTGAAGCTTTTCC	21
ZEB1	forward	CAGCTTGATACCTGTGAATGGG	22
	reverse	TATCTGTGGTCGTGTGGGACT	21
TFE3	forward	CCCCTGCCATGTCGTCATC	19
	reverse	GTGGACGGCTCAATGTGTG	19
SERPINA1	forward	GACACCGAAGAGGCCAAGAA	20
	reverse	TGGAAGTCCTCTTCCTCGGT	20
TGF-β	forward	CGACTCGCCAGAGTGGTTAT	20
	reverse	GTAGTGAACCCGTTGATGTCC	21
KLF4	forward	AGAAGACACTGCGTCAAGC	19
	reverse	GGAAGTCGCTTCATGTGGGA	20
OCT4	forward	TCAGCTTCCTCCACCCACTT	20
	reverse	TATTCAGCCAAACGACCATCT	20
SOX2	forward	GGGAAATGGGAGGGGTGCAAAAGAGG	26
	reverse	TTGCGTGAGTGTGGATGGGATTGGTG	26
DKK1	forward	ATAGCACCTTGGATGGGTATTCC	23
	reverse	CTGATGACCGGAGACAAACAG	21
ZNF238	forward	TCCACTTTGCATCTGTCTCTCT	22
	reverse	AAAACCCTGGTGTCTCTGCTC	21
TAZ	forward	TGACGTCCTTCCTAACAGTCC	21
	reverse	GTACAGGCAGGGCACTGAAG	20
UBC	forward	CTGGAAGATGGTCGTACCCTG	21
	reverse	GGTCTTGCCAGTGAGTGTCT	20

Table 1. Primer sequences of target genes used in qPCR.

6.7. Protein extraction, SDS-PAGE and Western blot

Cell were rinsed twice with cold PBS and then scraped in ice-cold RIPA lysis buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) supplemented with 1% protease and phosphatase inhibitor cocktails. Cell lysates were homogenized and centrifuged (18000 rpm, 15 min, 4 °C). The proteins of the supernatant are quantified by a colorimetric assay derived from the Lowry method (DC Protein Assay, Bio-Rad). Protein extracts (20 µg) were mixed with Laemmli buffer 5X (50 mM Tris HCl 0,84 M, pH 6.8; bromophenol blue, 10% glycerol, 2% SDS and 4% β-mercaptoethanol) (4:1, vol:vol), boiled at 95°C for 5 minutes and loaded onto a polyacrylamide 10% SDS-PAGE gel. After separation (150 V, 90 min), proteins were transferred onto a PVDF membrane. Membranes were blocked with either 5% non-fat milk or 5% BSA (1 h, room temperature), incubated overnight at 4°C with the primary antibodies diluted in 10% of the blocking solution. The following day, membranes were rinsed with TBS-Tween (0.05%) and incubated with HRP-conjugated secondary antibodies at room temperature for 2 h. After several washes with TBS-Tween (0.05%), immunoreactive bands were then visualized with ECL western blotting substrate kit using a ChemiDoc XRS gel imaging system (Bio-Rad).

6.8. Glioma cell growth in vitro

Crystal violet staining

Cells were seeded in 6-well plates for 24 h and then starved with FBS-reduced culture medium (0,5% FBS). After 72 h, viable cells were fixed with 4% PFA (5 min, room temperature), stained with 0.2% crystal violet (10 min) and then rinsed 2-3 times with PBS. Stained cells were visualized using the Bio-Rad ChemiDoc XRS Imager, and the relative staining intensities were analyzed by binarizing the images. The integrated density of each well was calculated using the ImageJ software (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA).

Cell proliferation analysis with the Nucleocounter NC3000

NucleoCounter (Chemometec, Villeneuve-Loubet, France) allows by means of fluorescence microscopy to determine cell number or viability. Cells were seeded in 24-well plates for 24 h, then starved for 20 h in DMEM without serum or in 0.5% FBS. After 48 and 72 h, the number of proliferating cells was evaluated according to the manufacturer's protocol "Cell Viability and Cell Count Assays". Briefly, cell suspension is stained with cell tracker green, loaded into the NucleoCassette A8, and inserted in the NucleoCounter chamber. According to the protocol, three different photos of each condition are generated and the total fluorescent cell number is estimated.

6.9. GBM cell viability analysis by WST-1 colorimetric assay and resistance to chemotherapy

Cells were seeded into 96-well plates at a density of $1,3\times10^6$ cells/well in FBS-reduced medium (0,5% FBS). After 72 h, cell proliferation reagent WST-1 was added to each well and cells were incubated for 1 h at 37 °C. Cell metabolic activity was determined by measuring absorbance at 450 nm of formazan produced by WST-1 reduction by cell mitochondrial succinate-tetrazolium-reductase system, using the Infinite 200 PRO Tecan platereader. Absorbance means of each condition in sextuplicate were normalized to the activity of control cell lines.

To evaluate whether the level of expression of Gα15 can sensitize glioma cells to chemotherapy, we analyzed cell viability after treatment with Temozolomide (TMZ) and Irinotecan. Cell lines were seeded in 96-well plates 24 h before incubation with serum-reduced medium (0.5% FBS) supplemented with different concentrations of TMZ or Irinotecan (10^{-10}-10^{-4} M) during 72 h. The metabolic activity of treated cells was determined by measuring absorbance at 450 nm of cleaved WST-1 using the Infinite 200 PRO Tecan platereader. Absorbance means of each point in sextuplicate were normalized to the activity of non-treated cells.

6.10. Cell migration assay

Transfected or infected cells were seeded (50,000 cells/125 µL serum-free medium) on the upper chamber of transwell membranes with 8 µm pores, previously coated with human fibronectin (20 µg/mL, 4°C, overnight). Serum-free medium (600 µl) was added in the lower chamber. After 24h of incubation (37°C, 5% CO_2), membranes were rinsed with PBS, non-migrating cells were removed from the upper surface of the membrane using a cotton swab while cells that migrated through the pores onto the lower surface were fixed with 4 successive baths of methanol (50, 70, 90 and 100%) and then stained with hematoxylin. Membranes were removed and mounted on glass slides using Mowiol, and randomly photographed using a camera connected to a Nikon microscope (Eclipse TS-100). Cells on photographic fields were counted using the "Cell counter" plug-in of ImageJ software.

6.11. Cell motility

Gα15-KO clones of U87MG were plated onto fibronectin-coated petri dishes in complete medium. After 6 h of incubation (37°C, 5% CO2), cells were incubated in fresh medium and

images were collected every 1 min during 20 h with a Lumascope videomicroscopy system (Etaluma Lumascope 620, Carlsbad, California, USA). Data were first analyzed with a cell tracking plug-in software and then with The Plot-At-Origin of ImageJ software. The average speed for each condition was computed with an excel macro as already described (Gorelik and Gautreau, 2014).

6.12. Wound healing

Glioma cells (150, 000 cells) were seeded onto 12-well plates. After 24 h of adhesion in complete medium, cells were treated with PLC inhibitor U73122 (10µM/1 h) (the control conditions were treated with the same amount of DMSO) and mitomycin C (10µg/mL/2 h) diluted in serum free media. Images of wound healing were taken in different times (every hour during 17 h) to follow the wound closure with the Zeiss Cell Discoverer 7 microscope and wound closure was quantified manually using ImageJ® software.

6.13. Immunocytochemistry and image analysis

Transfected or infected cells were seeded at the density of 30,000 cells/well on 24-well plate containing fibronectin-coated glass coverslips. After a 24-h incubation (37°C, 5% CO_2), cells were starved for 2 h with serum-free medium, then fixed with PFA (4%, 5 min), permeabilized with Triton X-100 (0,05%; 5 min) and the non-specific binding sites were blocked with normal donkey serum (NDS; 2%, 1 h, RT). Cells were incubated (overnight, 4°C) with the primary antibodies (anti-Gα15, anti-P-Paxillin or anti-Vinculin). After several washes with PBS, cells were incubated with the appropriate Alexa Fluor secondary antibody (DAR488, DAR594 or DAM647) 2 h at RT. Cells were then stained with DAPI (1 µg/mL, 10min) to label nuclei, and/or with phalloidin-rhodamine (1/200, 10 min) for stress F-actin staining. Cells were mounted on glass slides and imaged by confocal microscopy (Leica TCS SP8 confocal laser scanning microscope, PRIMACEN platform, Rouen). The number and size of focal adhesion complexes were calculated using a "particle analysis" plug-in after successive image treatment by ImageJ software. Gα15- or F-actin-labeling intensities were also quantified by measured the integrated density using ImageJ software.

6.14. *In vivo* xenografts studies

6 weeks old male *Nude* mice (Janvier, Le Genest Saint Isle, France) were housed under controlled standard environmental conditions (25±1°C; 12 hours/12 hours light/dark cycle; water and food available *ad libitum*). Animal procedures were carried out in accordance with recommendations of the French Ethical Committee and under the supervision of authorized

investigators (M. Dubois and H. Castel, Animal experimentation I and microsurgery). Orthotopic intrastriatal xenografts of Gα15-KO clones of U87MG and control cell line, or pLenticontrol and pLentiGα15 U87MG cells (50,000 cells/3µl HBSS) were conducted in mice (at least six mice per group). When mice developed signs and symptoms of pains associated with weight loss, they were sacrificed and the brains were removed and stored at -80°C. Mouse survival was evaluated through Kaplan-Meier analysis and groups were statistically compared using the log-rank test. $P < 0.05$ was determined as significant.

6.15. Statistical analysis

Data are presented as the mean ± SEM for each group of samples. Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism version 7 software. Comparisons between two groups were performed using unpaired *t*-test or Mann and Whitney test for non-parametric comparisons. Multivariate analysis was done with ANOVA one-way test and survival curves were generated by the Kaplan-Meier method. All reported P values were considered to be statistically significant at $P<0.05$, *, $P<0.001$, **, $P<0.001$.

Results

1. The expression level of G protein in glioma: signature with the grade

Currently, four families of G proteins, defined by the Gαs, Gαi/o, Gαq and Gα12/13 families as well as 5 types of Gβ and 12 types of Gγ subunits, differently expressed in different cell types and participating in a number of cell signaling pathways, were identified (Wettschureck and Offermanns, 2005; Goldsmith and Dhanasekaran, 2007). We examined the 31 G protein subunit expression levels using RNAseq available data and clinical informations from TCGA composed of samples from normal human brain tissue (NT, n=5) and glioma of different grades (n=703). As shown in Figure 1A, the heatmap allowed classification and organization of the relative expression level of upregulated (red) and downregulated (blue) G proteins in different glioma grade, e.g. oligodendroglioma, oligoastrocytoma, astrocytoma and GBM compared with NT (Figure 1A). The results highlight a higher expression level of the GNA15 (Gα15), GNAI3 (Gαi3), GNB2 (Gβ2), GNG5 (Gγ5), GNG10 (Gγ10), GNG11 (Gγ11) and GNG12 (Gγ12) subunits in GBM. In addition, the principal component analysis (PCA) makes it possible to clearly separate the NT and 4 glioma grades according to the expression of G protein subunits (Figure 1B). The expression signature in GBM thus established and included the genes encoding Gα15, Gαi3, Gβ2, Gγ5, Gγ10, Gγ11 and Gγ12, same G proteins as reported in the heatmap. These results suggest that these identified G proteins could play a key role, or at least in part are associated with glioma acquisition of aggressiveness. More particularly, the analysis of the expression levels of specific subunits showed that GNA15 and GNAI3 and in the less extent GNB2 and GNG5 (solid lines) appeared preferentially expressed in GBM than in other gliomas while GNB3 seemed particularly specific of oligodendroglioma (Figure 1C). The quantification of the expression levels of the main G proteins highlighted in the radar graph are summarized in Table (Figure 1C) with a statistical comparison of their individual expression in each glioma grade to their expressions in NT or in the oligodendroglioma.

Reported for the first time by Parsons and colleagues in 2008 (Parsons et al., 2008), several recent studies have since confirmed recurrent somatic mutations in the isocitrate dehydrogenase-1 or -2 (IDH1/2) genes in glioma patients. The discovery of this IDH1/2 mutation in gliomas provided a new molecular angle for classification, diagnostic and prognostic aspects, taking into account somatic driver mutations (Park et al., 2017). Thus, we evaluated the mRNA expression level of identified G proteins classified according to the IDH mutational status of glioma patients. Indeed, IDH mutations (IDH_{mut}) in glioma were generally associated with a better prognosis (Sanson et al., 2009; Yan et al., 2009) while no mutated forms

(IDH_{wt}) usually present in primary GBM, are here associated with significant increased expression of all identified G proteins (Figure 2A).

In addition, when the analysis was made from all glioma patients, it was established from the overall survival curves that the high expression levels of Gαi3, Gβ2, Gγ5, Gγ10, G11 and Gγ12 protein subunits were significant factors of poor prognosis (Figure 2B). For example, the median survival of low *vs* high GNAI3 and GNB2 expression is 11 years *vs* 4 years; GNG10, 9.5 years *vs* 4 years; GNG11, 9.5 years *vs* 4 years. However, the survival curve depending on the expression level of these G protein subunits in GBM patients shows no significant difference (Figure 2C), likely suggesting homogenous G protein expression levels among the different GBM subclasses belonging to the Verhaak classification. In addition to these rather ubiquitous G proteins, important in term of diagnosis potential, our attention specifically focused on the non-ubiquitous G protein Gα15, as a potential specific marker of GBM, and potentially (Figure 3) involved in GBM aggressiveness as a new category of therapeutic target.

2. Gα15 expression level is associated with glioma aggressiveness and varies among GBM samples

Gα15 is a non-ubiquitous G protein described as to be expressed in specific tissues/organs and more particularly in hematopoietic stem cells (Giannone et al., 2010). The composition of the G protein signature characterizing GBM includes Gα15 whose expression is distinctive in that it was almost absent in NT and glioma, and appeared *de novo* in GBM as shown in Figure 1. The quantification of Gα15 subunit mRNA expression according to IDH mutational status of glioma patients showed that Gα15 is also significantly highly expressed in glioma IDH_{wt} patients (n= 238) compared with IDH_{mut} patients (n=346) (Figure 3A, left panel). From the anatomocytopathological classification, GNA15 appeared significantly overexpressed in all glioma grades and more specifically in GBM (Figure 3A, middle panel). Moreover, Gα15 mRNA expression in the four GBMs molecular subtypes according to the Verhaak classification showed a significantly higher expression of Gα15 in the neural and mesenchymal subtypes of GBMs (Figure 3A, right panel). Survival curves based on GNA15 expression in all glioma (Figure 3B, left panel) and GBM (Figure 3B, right panel) showed that high expression of GNA15 compared with the mean expression value in glioma patients was significantly associated with a lower overall patient survival (survival median in patients with high Gα15 expression is 5 years *vs* 8 years). No significant difference was observed within GBM groups suggesting, again that G proteins are key markers of all GBMs. Pearson correlation analysis

was thus performed to assess from TCGA the association between Gα15 expression, and higher and lower expression of other interesting genes. The top significantly positively correlated genes (only overexpressed were represented) with GNA15, according to the ranked coefficients from 0.5 to 1, were illustrated in the curves of Figure 3C. From the numerous genes whose higher expression was correlated with Gα15, were included mesenchymal transition markers such as FOSL2, RUNX1, C/EBPβ, SERPINA1 or GSC markers like CD44, indicating potential Gα15-regulated signaling pathways linked to the glioma-mesenchymal transition and migration. Altogether, these data provide the first evidence of the importance of Gα15 in glioma aggressiveness.

3. G protein expression level in human GBM biopsies, GBM cell lines and role in glioma cell growth in vitro

In order to confirm the presence of some identified G proteins of interest in GBM or astrocytoma cells, we examined the expression of GNA15, GNAI3, GNB2 or GNG5 in GBM patient biopsies (Rouen CHU hospital) and in different glioma cell lines by RT-qPCR. The results showed that G proteins are present but differently expressed in the different GBM samples and GBMs (SW1088, astrocytoma cell line) previously found as G protein signatures in TCGA (Figure 4A). These G proteins thus constitute potential diagnostic/prognostic tools and this raises the question about their potential roles in glioma growth. We thus investigated their function in GBM by leading a stable downregulation of Gα15, Gαi3, Gβ2 and Gγ5 with specific shRNAs according to the material and methods section. After infection of the U87MG GBM cell line with lentiviral particles of shRNA targeting GNA15, GNAI3, GNB2 or GNG5, the effectiveness of shRNA-induced depression of the G protein expression was confirmed by RT-qPCR and western blot analyses (Figure 4B). We then analyzed the impact of the downregulation of these G protein subunits on glioma cell proliferation/survival during 72 h using the nucleocounter NC3000. As illustrated in Figure 4C, the downregulation of Gα15, Gαi3 or Gβ2 expression led to a significant decrease of U87MG at 48 h and 72 h post-seeding in the absence of serum compared with the respective control cell line infected with lentiviral particles of shControl. However, no significant difference was observed between control cells and shGNG5 cells growing rate. Interestingly, by means of the Boyden chamber assay, the directional migration of shControl cells and shG protein cells, revealed a drastic positive effect of the Gα15, Gαi3 and Gβ2 subunits in GBM cells migration (Figure S1A) compared with the control cells. Immunofluorescence analyses of the number of P-Paxillin-enriched focal adhesion complexes as a key player of adhesion indicated a significant decrease of the total

number of P-paxillin-enriched FA points (Figure S1B) suggesting a key role of these proteins in GBM cell adhesion, confirming a major role of the Gα15, Gαi3 and Gβ2 subunits in directional migration, in the absence of chemotactic stimuli. Together, these data thus suggest that the endogenous expression level of G protein could therefore modulate different cellular processes including proliferation, adhesion and migration promoting glioma aggressiveness. These observations are in agreement with sparse studies evoking the involvement of G proteins in cellular processes such as cell cytoskeleton dynamic and migration (Ueda et al., 1997; Schwindinger and Robishaw, 2001; Z Li et al., 2016a). Nevertheless, here we highlight for the first time the importance of some selective G proteins including the non-ubiquitous Gα15 in high-grade glioma aggressiveness.

4. Gα15 extinction inhibits GBM cell growth

The involvement of Gα15 in cell proliferation has been reported in different pathologies. Highlighted as primarily expressed in hematopoietic cells, an association of Gα15 with hematopoietic cell growth has first long been suggested (Amatruda et al., 1991; Yang et al., 2001). Indeed, it has been shown that decreased expression of GNA15 was associated with inhibition of proliferation of small intestinal neuroendocrine neoplasia cells (Zanini et al., 2015) and pancreatic carcinoma cell (Giovinazzo et al., 2013). In GBM, the highly proliferating level of GBM cells likely induces a mass effect leading to important brain damages, neurological deficits and patients' pain, then inducing hypoxia and necrosis in the core of the tumor, responsible secondly to invasion and angiogenesis. In order to confirm the key role of Gα15 in GBM growth and migration/adhesion properties, we used two GBM cell lines (U87MG and 8MG) in which GNA15 was knockout as completely as possible by means of the CRISPR-Cas9 technology (see material and methods, Figure 5A).

First, crystal violet staining assay showed that Gα15 depletion in U87MG and 8MG GBM cells significantly inhibits GBM cell growth/survival 72 h after seeding (Figure 5B). In fact, crystal violet staining intensity was decreased by more than 50% in all Gα15-KO cells tested (U87MG KO 26-6; 8MG KO 2) compared with the control cell lines. These finding were confirmed by Nucleocounter NC3000 system. As shown in Figure 5C the counted number of Gα15-KO cells (KO 26-6; KO 2) significantly decrease after 72 h compared with the control cell lines confirming the role of Gα15 in GBM cell proliferation or survival. In addition, we evaluated the effect of Gα15 depletion on GBM cell viability by measuring the cell metabolic activity determined by the WST-1 cleavage assay. Interestingly, the estimation of cell growth by WST-1 activity was significantly reduced to ~40% in Gα15-KO cells (KO 26-6; 3-1; KO 2)

compared with the control cells (Figure 5D). Together, these findings showed that loss of Gα15 expression inhibits GBM cell viability/proliferation and demonstrated that Gα15 is an important G protein also implicated in cell growth, consistent with previous articles on other types of cancer. However, we can note (data not shown) that the U87MG cell cycle was not modified between native cells and KO cells, rather suggesting an impact of Gα15 on cell survival and not on cell proliferation.

5. Gα15 regulates GBM cell migration and motility

The invasive nature of GBM is particularly characterized by the ability of GBM cells to migrate leading ultimately to local destruction of healthy tissues, and importantly, is the main source of recurrence (Demuth and Berens, 2004; Armento et al., 2017). We investigated the role of Gα15 in GBM cell migratory properties using a transwell assay, time-lapse videomicroscopy and wound healing assay in unstimulated –no FBS and Chemotactic stimuli-conditions. We first evaluated the effect of Gα15 downregulation or overexpression on U87MG and 8MG GBM cell migration by using siRNA directed against human GNA15 and a plasmid overexpressing GNA15 (pLentiGNA15) (Figure 6A). The cell lysates were analyzed by Western blot. Gα15-attenuated specific immunoreactive bands were detected at ~43 kDa in siGNA15 transfected cells compared with control cells (Figure 6A) while the presence of specific slightly overexpressed bands was more detected in 8MG pLentiGNA15 cells compared with control cells (Figure 6B) with no evidence of overexpression in U87MG. We next evaluated whether GNA15 silencing or overexpression modulates the directional migration of these different GBM cell lines. Cells were seeded in the upper chamber of transwell 24 h before fixing, staining and counting. The number of migrated cells was evaluated by counting cells in all the membrane surface. In the two glioma cell lines, Gα15 downregulation triggered a decrease of the number of cells which have migrated compared with control cells (Figure 6C, left panel) while the overexpression of Gα15 significantly promoted cell migration (Figure 6C, right panel) in the absence of stimuli. The effect of Gα15 disruption on inhibition of cell migration was confirmed in two Gα15-KO cells (Figure 7A) demonstrating that Gα15 plays a major role in GBM cell migration in the absence of extracellular stimuli.

We next explored whether this loss of migratory capacity in GBM cells is associated with individual cell motility and not survival. Indeed, motility and migration are associated and involves a cycle of four steps: protrusion of the leading edge and lamellipodia expansion, adhesion to the substrate, retraction of the rear, and de-adhesion (Pollard and Borisy, 2003).

Using videomicroscopy for time-lapse recordings of cell movement, we first visually examine the entire cohort of cell trajectories using the Plot-At-Origin displaying all the continuous trajectories emanating from the origin of each cell (Figure 7B, upper panels).

This showed reduction of the trajectory lengths when Gα15 is knockout compared with control cells. In addition, the average speeds of each cell per condition was computed, then the overall average speed was plotted and showed a significant decrease of the three tested Gα15-KO clone average speed compared with control cells (Figure 7B, bottom bar graphs). Moreover, the cumulative distances were significantly lowered compared with control cells (Figure 7B, middle curves) suggesting a reduction of cell motility. Together, we have shown for the first time that the inactivation of Gα15 in GBM cells is critical in cell movement.

It has been shown that Gα15 would directly interact with PLCβ2 and TPR1 (tetratricopeptide repeat 1), and Gα15 signals proceed via PLCβ which triggers the cleavage of PIP2 to IP_3 and DAG, and the latter can modulate numerous signaling cascades through the activation of PKC. It has also been shown that Gα15 may activate transcription factors such as STAT3 and NF-κB (key mesenchymal markers/inducers) which also require PLCβ activity. The discovery of a novel binding partner of Gα15 (TPR1) opens up new possibilities for the regulation of Ras/RAF/ERK and its downstream effectors. To understand which signaling pathway components relayed the Gα15-induced GBM cell survival or migration, we analyze the mRNA expression level of three main effectors of Gα15 (PLCβ1, PLCβ2 and TPR1). Interestingly, the expression of PLCβ1 and TPR1 was significantly increased when Gα15 is knockout while PLCβ2 mRNA expression was significantly diminished compared with the expression in control cells (Figure 8A) suggesting an association between some PLCβ and Gα15 in GBM as previously proposed in COS-7 cells (Lee et al., 1992; Park et al., 1992). We thus investigated the involvement of PLCβ on GBM cell migration in normal or Gα15-KO cell. *In vitro* wound-healing assays revealed that knockout of Gα15 significantly inhibits cell migration into the lesioned area confirming our previous results. When treated in the presence of the PLCs inhibitor U73122, the surfaced covered by the U87MG cells was drastically reduced demonstrating a key role of PLCβ on directional migration (Figure 8B). In KO cell lines, inhibition of PLCs did not significantly counteracted cell migration, suggesting that some PLCs would be involved in the Gα15-mediating migration. In order to confirm whether the well-described PLCβ, PLCβ2, is associated with this mechanism and which expression is correlated with Gα15 expression in our GBM cell lines, we transiently transfected both U87MG control cells and Gα15-KO 26-6 with siRNA against PLCβ2 or non-targeting control siRNA. As shown

in Figure 8C, downregulation of PLCβ2 significantly reduced both cell transwell migration with a totally abolished migration in Gα15-KO 26-6. Interestingly, no notable difference in the amplitude of migration was observed between U87MG control cell downregulated for PLCβ2 and Gα15-KO 26-6 control. Although we are aware that further investigations have to be done, together, at first sight, these data seem to suggest that Gα15-mediated migration appears to be associated with PLCs except the PLCβ2.

6. Gα15 regulates focal adhesion (FA) enriched proteins formation in GBM

A requisite for the cell migration program is adhesion to the surrounding matrix and the proteins implicated in adhesion complexes are known to play important roles in glioma and metastasis (Demuth and Berens, 2004). During cell migration, transient adhesive contacts occur at the leading edge of lamellipodia where integrins recruit proteins such as paxillin or vinculin to form immature adhesive contacts called focal adhesion (FA) complexes, and transition to mature FA is marked by increase in size (Jarjour et al., 2011; Kuo et al., 2011). To investigate if Gα15 is associated with FA complex formation, we analyzed the FA-enriched proteins P-paxillin and vinculin in Gα15-KO clones. The FA dot number and size were determined as described in materials and methods. We found that the total FA-enriched proteins P-paxillin and vinculin are well-distributed in control U87MG cells and the number of P-paxillin (Figure 9A and B, left panel) and vinculin dots (Figure 9A and B, right panel) were significantly reduced by ~ 50% in at least three Gα15-KO clones compared with control cell line. This effect was associated with a change in FA size distribution, the number of P-paxillin-enriched dots in all size intervals were also significantly decreased when Gα15 is knockout (KO clones 26-2, 26-6, 3-1) (Figure 9B, left panel). The number of vinculin-enriched dots in the size intervals]20-40] and [5-20] pixel^2 were significantly decreased in Gα15-KO clones 26-2, 26-6 and 3-1 while any significant difference was observed between Gα15-KO clones and the control cell vinculin dots larger than 40 pixel^2 (Figure 9B, right panel). In contrast, Gα15 overexpression significantly increases the number as well as the size of vinculin-enriched FA dots compared to the control cell lines, and the increase of co-localized Gα15 with vinculin at the plasma membrane is detected (Figure 10A and B). These results show that Gα15 is involved in GBM cells adhesion properties. The role of some G proteins in cell adhesion processes (Leyme et al., 2015; Goldsmith and Dhanasekaran, 2007) including the role of Gαi/oβγ on adhesion induced by chemotactic-receptors (Lecointre et al., 2015) has previously been reported. Especially, Giovinazzo and colleagues have shown that the depletion of Gα15 significantly reduced pancreatic carcinoma cell adhesion (Giovinazzo et al., 2013). Here we suggest that Gα15 is

implicated in positive regulation of GBM cell FA complex formation, however the mechanism by which Gα15 regulates P-paxillin and vinculin point remains to be identified.

7. Gα15 is involved in actin polymerization and lamellipodia formation in GBM cells

Cell invasion requires precise coordination of the actin cytoskeleton (Sahai and Marshall, 2003; Chow et al., 2016). Because Gα15 subunit is one of the key G proteins in GBM, we examined the extent to which Gα15 level could modify the remodeling of the actin cytoskeleton as well the formation of large membrane protrusions called lamellipodia in GBM cells. Gα15-KO cells were seeded for 24 h, fixed and F-actin staining revealed that Gα15 depletion in GBM cell impairs actin cytoskeleton remodeling, with significant decreases of 60% and 54% of F-actin staining intensity, respectively in Gα15-KO clone 26-6 and clone 3-1 compared to the control cell line (Figure 11A and B).

In addition, the two Gα15-KO clones 26-6 and 3-1 showed a significant decrease of well-formed lamellipodia number (twice as low as the control cell line) as illustrated in Figure 11A and B. By contrast, overexpression of Gα15 significantly increased the well-formed lamellipodia number (Figure 11C). The high expression level of Gα15 in GBM cells seems to regulate F-actin cytoskeleton and promotes lamellipodia formation that drives the motility of GBM cells. In fact, directional motility requires lamellipodia, that expands forward as the cell moves during migration (Pollard and Borisy, 2003). All cellular processes previously described here, cell adhesion, migration and motility, are associated with F-actin remodeling, these data together strongly corroborated the major implication of Gα15 in the regulation of cellular processes leading to glioma invasion.

8. Gα15 regulates pro-tumorigenic/mesenchymal marker expression in GBM

Based on the TCGA analysis and the literature belonging to the Gα15 protein, it may be postulated that this G protein is associated with the regulation of mesenchymal transition. We analyzed by RT-qPCR the mRNA relative expression in Gα15-KO clones of several mesenchymal markers such as well-known transcription factors C/EBPβ, RUNX1, FOSL2, ZEB1, KLF4 previously described as being involved in the mesenchymal signature of GBM, angiogenic markers like ANG and VEGFA, stemness markers (SOX2, OCT4) as well as tumor repressor components (DKK1, ZNF238) (Figure 12). The relative expression of each gene in Gα15-KO clones was normalized to the endogenous control gene UBC and then compared with the expression in U87MG control. Glioma mesenchymal transcription factors including C/EBPβ, RUNX1, FOSL2, ZEB1, BHLHB2 and KLF4, were systematically significantly

downregulated in at least Gα15-KO 26-6 compared with control cells (Figure 12A). However, no difference was detected in the mRNA expression level of TAZ which was shown to promote the growth and viability of glioma cells (Yuan et al., 2015; Chen et al., 2017) and TFE3, a GPCR-independent AGS of Gα15 (Sato et al., 2011). Interestingly, the well-known pro-angiogenic factor VEGF, that is highly expressed in GBM and involved in treatment resistance (Kloepper et al., 2016; Okuda et al., 2017), and ANG positively correlated with the malignant grades (Xia et al., 2015), were also downregulated when Gα15 was knockout (Figure 12B, KO 26-6). Moreover, SOX2 and OCT4, two transcription factors known to contribute to the stemness properties in GBM (Vleeschouwer, 2017) were overexpressed in Gα15-KO 26-6 compared with control cells (Figure 12C). In contrast to these pro-tumorigenic markers, we also observed in Gα15-KO clones 26-6 that expression levels of tumor suppressor such as DKK1 and ZNF238 normally repressed in GBM, were markedly increased (Figure 12D). In fact, DKK1, a Wnt pathway inhibitor, was previously described to be able to disrupt GBM cell growth and sensitize cells to apoptosis (Foltz et al., 2010; McCord et al., 2017) and ZNF238 is a mesenchymal GBM repressor which can bind SERPIN1 promoter to directly repress its expression, inhibiting thus GBM aggressiveness (Fedele et al., 2017). These very encouraging results, summarized in heatmap (Figure 12D), underline the essential role of Gα15 in the repression of the tumor suppressor gene while stimulating the expression of pro-tumorigenic factors promoting GBM mesenchymal transition.

In order to clarify the oncogenic signaling used by Gα15 to regulate gliomagenesis, we analyzed by Western blot the effect of Gα15 knockout on the expression of key oncogenic factors (ERK, STAT3, AKT, β-catenin) and two mesenchymal markers (CD44, N-cadherin) in different Gα15-KO clones (Figure 13). Interestingly, both oncogenic factors were strongly repressed when Gα15 is knockout (Figure 13A).

In fact, these proteins are well-known to be pro-proliferative factors, and the significant downregulation of the activated ERK (pERK) associated with a decrease in AKT and STAT3 expressions may explain the observed significant inhibition of Gα15-KO clone proliferation as we previously described (Figure 5). Similar results were found in small intestinal neuroendocrine neoplasia where Gα15 regulates cell growth and inhibits apoptosis associated with pERK and AKT activations (Zanini et al., 2015). STAT3 modification is also in agreement with the literature (Lo et al., 2003), this is, however, the first time to be described in GBM. The decreased expression of Wnt signaling protein β-catenin is interesting and probably correlated

with the high mRNA expression of Wnt signaling inhibitor DKK1 previously shown when Gα15 is knockout, suggesting the involvement of Gα15 in LRP/Wnt/ β-catenin pathway.

However, this process needs to be more investigated since β-catenin is commonly regulated rather by degradation processes. CD44, an overexpressed protein in mesenchymal subtype of GBM proposed as a cancer stem cell marker (Wang et al., 2017; Nishikawa et al., 2018) seem to be slightly overexpress in Gα15-KO clones compared with control U87MG (Figure 13B, right panel). Regarding N-cadherin, a key marker of the mesenchymal transition in many aggressive cancers, it appeared to be weakly expressed in at least three Gα15-KO sub-clones (Figure 13B, left panel).

Furthermore, the silencing of Gα15 using a specific siRNA against GNA15 significantly decreased transmembrane N-cadherin translocation (Figure 14A). The opposite effect is obtained by overexpressing of Gα15 in the two GBM cell lines U87MG and 8MG where N-cadherin appeared strongly expressed at the plasma membrane (Figure 14B), suggesting that Gα15 regulates transmembrane N-cadherin expression.

Altogether, we propose that Gα15 expression level in GBM would be a marker and the driver of mesenchymal glioma transition and status, independent on the key GPCR signaling activation.

9. Gα15 expression level regulates U87MG xenografted Nude mice survival

Finally, we evaluated the potential requirement of Gα15 on U87MG cell growth *in vivo*. As described in the material and methods section, the exact same number of U87MG Gα15-KO cells (clones 26-1, 26-2, 26-6) and U87MG pLentiGNA15 cells as well as the respective control U87MG cells were intrastrially injected into the brain of *Nude* mice (Figure 15A). Gα15 knockout in U87MG significantly improved xenografted *Nude* mouse survival, by prolonging the median survival to 60 and 84 days for KO 26-1 (p=0,0436) and 26-6 (p=0,0016) respectively *vs* 44 days for the control (Figure 15B), while xenografted *Nude* mice bearing Gα15 overexpressing cells exhibited the poorest survival rates (50 days *vs* 61 days for the control, p = 0,0326) (Figure 15C). This improved survival indicated the key role of Gα15 in GBM growth *in vivo*, at least in part through promotion of tumor growth/survival and invasion within the brain.

Discussion

Limited previous research investigated expression levels and/or function of the well characterized Gα subunits in physiological and pathological conditions, and particularly in cancer. Some GPCRs were shown to be largely involved in tumorigenesis, angiogenesis and metastasis including glioma development (Castel et al., 2017; De Francesco et al., 2017; Wu et al., 2019), stressing that GPCRs expression and aberrant activation as well as their primary effectors within intracellular compartments would constitute key therapeutic targets to treat some malignant behaviors of devastating cancers. In GBM, Among GPCRs, chemokine GPCRs and their respective ligands, e.g. CXCR4/CXCL12, UII/UT or LPA1 receptor/LPA play a major role in the acquisition of an aggressive phenotype, relaying migration *in vitro* and/or invasion of the brain parenchyma *in vivo* in preclinical models (Yadav et al., 2016; Malchinkhuu et al., 2005; Le Joncour et al., submitted). In addition, the expression levels of CCR5 is correlated to the grades of glioma, while increased expression being associated with reduced survival (Zhao et al., 2015). A large number of other chemokines GPCRs is also overexpressed in GBM, such as CCR2A (Vakilian et al., 2017), CCR3 (Kouno et al., 2004), CX3CR1 (Sciumè et al., 2010), CXCR1 and CXCR2 (Desbaillets et al., 1997), their overexpression being associated with a potentiation of the invasive properties of GBM cells. These receptor types were shown to couple to Gαi activating the PI3K and MAPK signaling pathways which contribute to chemotaxis, cell migration, or secretion of various matrix metalloproteinases (MMP) leading to invasion (Otsuka and Bebb, 2008; Lecointre et al., 2015; Le Joncour et al., submitted), and also to Gα12/13 to activate Rho/ROCK kinase leading to the cell membrane contraction and movement (Yagi et al., 2011; O'Hayre et al., 2014; Lecointre et al., 2015), suggesting that targeting one the those GPCRs would not be sufficient to counteract GBM malignancy and invasiveness. Accordingly, there is a wide range of pharmacological tools targeting chemokine GPCRs for a number of cancer types, but the number of tools tested and efficient in GBMs is reduced compared with the available arsenal. Currently, CXCR4 inhibitors/antagonist are being tested in several clinical trials in newly diagnosed or recurrent patients (Access Number: NCI2013-02012) and association with chemotherapy is also proposed in phase I/II clinical trial in recurrent GBMs (Access number: NCT02765165), but until now, no major improvements can be described.

1. Chemokines GPCRs and Gα, β or γ proteins in GBM

The redundancy of GPCRs expression and functions observed in many cancers in general, and in GBM in particular, prompted us to wonder about the main mediators of GPCRs signaling, the Gα, β and γ proteins. To explore how G proteins would intervene in the chemokine GPCRs roles in glioma progression, we first analyzed from American TCGA, the 31 Gα, β and γ protein expression profile in the different grades of glioma, and established that they can constitute key signatures of glioma malignancy and grade. Indeed, to date, the reported deregulation of the expression level of some G proteins in cancers were previously being shown associated with positive or negative regulation of cancer progression as detailed in the introduction (O'Hayre et al., 2014; Iglesias-Bartolome et al., 2015; Syrovatkina et al., 2016; Z Zhang et al., 2018).

Here, by means of the RNAseq TCGA available expression status of the 31 G proteins on normal human brain tissue and glioma of different grades, associated with the clinical information, we were able to distinguish panel of G proteins associated with lower to higher glioma grade, with a higher expression level of the GNA15 (Gα15), GNAI3 (Gαi3), GNB2 (Gβ2), GNG5 (Gγ5), GNG10 (Gγ10), GNG11 (Gγ11) and GNG12 (Gγ12) subunits in GBM. These data are confirmed by the PCA showing that these genes encoding Gα15, Gαi3, Gβ2, Gγ5, Gγ10, Gγ11 and Gγ12, constitute a key signature of GBM, suggesting a role in malignancy and aggressiveness. It can be notices that GNA15 and GNAI3 and in the less extent GNB2 and GNG5 appeared preferentially expressed (de novo) in GBM than in other gliomas while GNB3 seemed particularly specific of oligodendroglioma. Accordingly, it has been described that expression of GTPase defective mutants constitutively active of GNA12 and GNA13, may lead to cell transformation (Ha et al., 2014; Muppidi et al., 2014). But more interestingly, Gαi3 subunit has been previously shown to be significantly overexpressed in several human glioma tissues associated with EGFR, FGFR or PDGFRα overexpression, and with hyperactivity of the Akt-mTOR pathway (Z Li et al., 2016b). This Gαi3/Akt-mTOR pathway likely plays a role in cell viability, clonogenic capacity of GBM cells and resistance to irradiation (Z Li et al., 2016b), suggesting a major oncogenic role of Gαi3 in GBM. The role of expression of Gβ or γ subunits in cancer is much matter of debate. Very recently, Yoda et al., (2015) demonstrate that multiple mutations in Gβ1 or Gβ2 subunit affects the protein interface that binds Gα subunits as well as downstream effector including PI3K and mTOR cascades, and confer resistance to targeted kinase inhibitors in myeloid neoplasms (Yoda et al., 2015). In the present study, we confirmed the expression the G proteins belonging to the GBM signature in different GBM

samples and GBM cell lines and the basic function of Gα15, Gαi3, Gβ2 and Gγ5 through specific shRNAs stable downregulation in GBM cells. The downregulation of Gα15, Gαi3 or Gβ2 expression significantly reduced GBM cell growth and migration in the boyden chamber assay, accompanied by a decreased number of focal adhesion points establishing a major role of the Gα15, Gαi3 and Gβ2 subunits in directional migration, in the absence of chemotactic stimuli. This strongly supports the overexpressed G proteins as key nodes of signaling pathways involved in high-grade glioma and controlling at least their invasiveness in vivo. This area of research would open important perspectives in term of specific inhibitors of some key Gα, β and also γ that would be up-regulated in high-grade gliomas, but also in other aggressive and metastatic cancers. But currently, may also be useful in term of diagnosis and prognostic. Indeed, from all glioma patients, it was established from the overall survival curves (TCGA clinical information) that the high expression level of Gαi3, Gβ2, Gγ5, Gγ10, Gγ11 and Gγ12 and in a less extent, of Gα15 protein subunits were significant factor of poor prognosis. For example, the median survival of low vs high of GNAI3 and GNB2 expression is 11 years vs 4 years; GNG10, 9.5 years vs 4 years; GNG11, 9.5 years vs 4 years. Together, considering also that i) the role of GNA15 is not completely understood, particularly in cancer, ii) fragmentary studies suggest that not all combinations of Gαβγ subunits are possible and iii) G proteins are not only associated with the plasma membrane but also with intracellular components including the cytoskeleton suggesting pleiotropic roles of G proteins. Thus, the role of G proteins in cancer and in GBM more specifically remain to be determined.

Our attention specifically focused on the non-ubiquitous G protein, Gα15, as a potential specific marker of GBM since exhibiting *de novo* expression, and potentially involved in GBM aggressiveness as a new category of therapeutic target. As for the previously described G protein subunits, Gα15 subunit mRNA expression is significantly highly expressed in glioma IDHwt patients compared with IDHmut patients as well as in GBM samples along the anatomocytopathological classification. Within GBM subtypes according to the Verhaak classification, a significantly higher expression of Gα15 in the neural and more particularly mesenchymal subtypes (MES) of GBMs is found, but no significant difference was observed within GBM groups in term of overall survival. Interestingly, we detected that Gα15-correlated over-regulated genes in GBM were for most, MES transition markers such as FOSL2, RUNX1, C/EBPβ, SERPINA1 or glioma stem cell markers like CD44, indicating potential Gα15-regulated signaling pathways linked to the glioma-mesenchymal transition and, consequently migration. This original observation is likely compatible to the previously description of the

selective expression of Gα15 in murine hematopoietic cells while current studies recently suggest that Gα15 expression cannot be generalized to all stem cells, but may overlap with the CD34 marker for stem and hematopoietic progenitor cell populations (Giannone et al., 2010) being subsequently lost upon cell maturation. Moreover, in these cell population, a lost selectivity combined to high affinity and atypical resistance to GPCR desensitization could provide a strategy to deliver stimuli that are particularly intense (Innamorati et al., 2009). Such a powerful action would be developing along specific intracellular pathways including NF-kB and STAT3 (Carro et al., 2010) particularly involved in MES GBM progression and resistance to treatment. Thus, the identification of the key role of some G proteins in the process of mesenchymal transition could help define new strategies against the most aggressive mesenchymal brain tumors (mainly GBM and gliosarcomas).

2. The pro-proliferative function of Gα15

High proliferation rates are specific to many solid tumors including GBMs. Here, we have established that Gα15 silencing with shRNA infection or knockout (KO) with CRISPR/Cas9 technology (U87MG Gα15-KO clones 26-6, 3-1 or 8MG clone 2) significantly decreases the number and the viability of GBM cells in the absence of GPCRs exogenous activation. This *in vitro* observation would at least in part explain the significant prolonged survival of Nude mice xenografted with the Gα15-KO clone 26-1 and 26-6 while xenografted U87MG overexpressing cells provokes a significant poor mouse survival. Previous studies already reported a Gα15-dependent regulation of proliferation in various physiological and pathological situations. Gα15-expressing cells such as hematopoietic cells appear to be able to proliferate indefinitely (Amatruda et al., 1991), the expression of Gα15 being specifically diminished during granulocytic and erythroid differentiation associated with the arrest of proliferation (Tenailleau et al., 1997). This effect on proliferation seems to be closely associated with cell survival, since among the Gαq/11 family member, Gα15 overexpression more specifically promotes vascular smooth muscle cells survival (Peavy et al., 2005), and in cancer cells the expression of Gα15 favors SI-NEN (small intestinal neuroendocrine neoplasia) cells proliferation and inhibit cell apoptosis whereas its deletion inhibits tumor growth and activates apoptosis (Zanini et al., 2015). This Gα15-induced SI-NENs cell proliferation is likely related by activation of ERK1/2, a key stimulator of cell growth commonly associated with the Gα15-signalling pathways (Lo et al., 2003; Su et al., 2009; Giannone et al., 2010), and Akt, whose pathway is also associated to cell growth, and classically dysregulated in GBM patients with a poor prognosis (X Li et al., 2016; Langhans et al., 2017; Lombardi and Assem, 2017). Our present data allow to assess that

downregulation of Gα15 in U87MG GBM cells led to decreased activated form of ERK1/2 (P-ERK1/2) as well as of Akt in basal culture conditions, suggesting that this G protein is a key factor controlling directly or indirectly these signaling cascades involved at least in part in GBM survival, rather than proliferation since U87MG cell cycle was not modified between native cells and KO cells (not shown).

In addition to the ERK and Akt pathways, the constitutively active Gα15QL activates PLCβ in HEK-293 or COS7 cells leading to CaM-KII (Ca^{2+}-dependent calmodulin-kinase II) but also PKC (or TPR1)/Raf-1/MEK or PKC/c-Src/Rac1/JAK pathways activation, that opens additional mechanism potentially involved in cell survival, but also MES transition and invasion (Giannone et al., 2010; Su et al., 2009; Lo and Wong, 2006; Liu and Wong, 2004; Lo et al., 2003; Yang et al., 2001). Here, we observed a reduced level of expression of PLCβ2 and increased levels of PLCβ1 and TPR1 in Gα15-U87MG-KO cells suggesting a preferential association of PLCβ2-Gα15 in U87MG GBM cells that would be responsible at least in part in GBM growth and survival. In a good agreement, it has been reported that Gα15 most effectively activates PLCβ2 and may have a higher affinity for this isoform than any of the other G proteins (Lee et al., 1992), functionally interacting in hematopoietic cells. In addition, our data also show that PLCβ1 is overexpressed in Gα15-KO cells compared with control cells, this should be paralleled with the inverse association between the high expression of PLCβ1 and the aggressiveness of GBMs (Lu et al., 2016), PLCβ1 being overexpressed in cells with neuronal phenotype exhibiting better prognosis. Thus, the knockout of Gα15 in our GBM cells appears not only to reduce survival rate potentially in conjunction with PLCβ2, but also promotes the expression of PLCβ1 reinforcing the key link between Gα15 expression and GBM aggressiveness.

In line of the PLC-related pathways, the PKC/Raf/MEK/ERK pathway or MAPK pathway commonly activated by growth factors receptor like RTK or GPCRs, classically relayed proliferation, differentiation and survival (Belcheva and Coscia, 2002; See and Mukherjee, 2018; Zhou et al., 2019). Here, we expect that the Ras-induced phosphorylation of Raf can indeed activate MEK1/2 (Roberts and Der, 2007), responsible for activation of ERK1/2, which subsequently may phosphorylate multiple cytoplasmic and nuclear substrates including STAT3, NF-κB, CREB or SRE (*serum response element*), mainly controlling cell growth (See and Mukherjee, 2018). In glioma, as in mainly cancers, these described pathways play important roles. From TCGA database it is found that 73% of glioma contained mutations in the components maintaining activation of these pathways, and more particularly within the most

aggressive GBM, IDHwt (Ceccarelli et al., 2016). Interestingly, Ras activation associated with Akt pathway, in neural progenitors or anaplastic astrocytoma (grade III) seems to be sufficient to induce GBM secondary development, in mice (Holland et al., 2000; Sonoda et al., 2001). In addition, we also clearly establish that STAT3 protein expression level is down-regulated in Gα15-KO GBM cells, which in combination with Akt, reinforces the potential impact of Gα15 in GBM survival. STAT3 works as a TF regulating cell growth and apoptosis, inducing MES transition. Interestingly, this event occurs in the absence of applied extracellular stimuli, likely being associated with Gα15 expression. Different STAT3 activator signals have been described, including growth factors such as EGF and IL-6 cytokines (Wendt et al., 2014), activating factors specifically found in the inflammatory and hypoxic niches of GBM (Hambardzumyan and Bergers, 2015; Quail and Joyce, 2017). Interestingly, it has been shown in melanoma and prostate cancer cells that STAT3 is the main TF responsible for the constitutive activation of NF-κB (Lee et al., 2009) whose role in stimulating the expression of many other TF such as Snail, Twist1, ZEB1, or C/EBPβ is now demonstrated (Bhat et al., 2013; Yamini, 2018). By qPCR we here confirmed that ZEB1, RUNX1 as well as C/EBPβ are also down-regulated in the absence of Gα15 in GBM cells, strongly supporting a key STAT3/NF-κB signaling cascade leading to MES transition in GBM. The activation of NF-κB plays a major role in the production of IL-6, which can relay also activate STAT3 and us leading to a STAT3/NF-κB/IL-6 signal loop in tumor development (Wendt et al., 2014). Together, and in agreement with the literature, we hypothesized that Gα15 when present in GBM cells, activates at least in part ERK, Akt and STAT3, potentially involving the NF-κB component, likely through the PLCβ2/PKC pathway promoting better survival of GBM cells. Addition mechanism can be suspected. Indeed, we observed that Gα15 down-regulation was associated with increased expression levels of the tumor suppressor such as DKK1 usually repressed in GBM and previously described to be able to disrupt GBM cell growth and to sensitize cells to apoptosis (Foltz et al., 2010; McCord et al., 2017) via inhibition of the Wnt/β-catenin signaling pathway. This is here confirmed by the relative decrease of β-catenin in U87MG-KO cells, suggesting that GBM in which Gα15 is present, exhibit low level of DKK1, the Wnt pathway inhibitor, and high level of β-catenin. In this context, it was reported that PYK2 in myeloma cells or colorectal carcinogenesis would induce activation of Wnt/β-catenin signaling by stabilizing β-catenin leading to upregulation of the proto-oncogenes associated with cell proliferation or adhesion (Zhang et al., 2014; Gao et al., 2015). Collectively, the absence of DKK1 and the stabilized level of β-catenin lead us to speculate that Gα15 could also activate

Wnt/β-catenin pathway *via* at least PYK2. This pathway can also be connected to the Akt-phosphorylation of GSK3β and its inactivation, leading to β-catenin stabilization and translocation to the nucleus where it can bind to the complex TCF/LEF (*T-cell factor/lymphoid enhancing factor*), leading to gene expression involved in proliferation, differentiation and survival (Majewska and Szeliga, 2017). At least, our data indicate an involvement of Gα15 in the regulation of PLCβ2/Akt, ER, STAT3 and Wnt/β-catenin pathways for GBM survival and progression.

3. Gα15-dependent mesenchymal migration of GBM cells

GBM cells, the most common type and aggressive glial brain tumor cells, are characterized by their highly migratory and invasive behaviors. GBM invasiveness is one of the hallmarks that contribute to tumor recurrence and the major cause of poor prognosis. Tumor cell migration and invasion is a coordinated multi-step process including the dynamic reorganization of the actin cytoskeleton, emission of the protrusions named lamellipodia, formation of new adhesions, cell body contraction, and tail detachment for mesenchymal migration (Pollard and Borisy, 2003; Nürnberg et al., 2011; Tang and Gerlach, 2017). Many key proteins have been described, especially small GTPases such RhoA, Rac, Cdc42, and the actin-related protein 2/3 (Arp2/3), as major regulators of these key steps (Sit and Manser, 2011; Spiering and Hodgson, 2011; Ridley, 2015; Swaney and Li, 2016; Lawson and Ridley, 2018).

The involvement of G proteins in migration, adhesion as well as cell motility has already been studied. For instance Svensson *et al.,* previously showed that Gαq/11 is essential to stimulate the random and directed migration of HSB2 cells (T cell isolated from an acute lymphoblastic leukemia) while Gαi2 also promotes T-cell migration mediated by the chemotactic GPCR CXCR4 (Svensson et al., 2012). Similarly, from glioma cells (U87MG, SW1088) and HEK-293 cells transfected with the GPCR UT, it has been demonstrated that the pro-angiogenic chemokine system UII/UT stimulates adhesion and chemotactic migration by increasing actin polymerization via Gα13/Rho/ROCK, lamellipodia and vinculin-rich FA formation mainly *via* Gαi/PI3K signaling pathway (Lecointre et al., 2015; Coly et al., 2016). In our study, in the absence of exogenous stimulation of chemokine GPCRs, we establish that Gα15 expression is highly effective to allow (1) actin cytoskeleton remodeling *via* stress fiber formation, (2) lamellipodia expansion, (3) adhesion through increased number of Phospho-paxillin and vinculin-enriched FA complexes and (4) GBM cell motility/migration while promoting expression of mesenchymal markers. However, the molecular mechanism by which Gα15 regulates these processes in GBM has not yet been fully elucidated and requires

additional studies. Earlier studies using immunoprecipitation or immunocytochemistry on rat glomerulosa cells or rat mammary tumor cell lines revealed that Gαq/11 protein subunit can be associated with F-actin fiber formation (Ibarrondo et al., 1995; Côté et al., 1997). More recently, the role of Gαq/11 family members in the activation of the Rho/Rac kinases to promote actin polymerization in melanoma cells (Feng et al., 2014) has been suggested. Since the activation of RhoA by Gα15 was previously established (Yeung and Wong, 2009; Giannone et al., 2010; Su et al., 2009), we hypothesize that in GBM, Gα15, a Gαq/11 family member, promotes the actin polymerization *via* Rho/Rac activation in a constitutive way, in the absence of GPCR activation. Indeed, Yeung *et al.,* showed that a guanine nucleotide exchange factor p63RhoGEF can form a stable complex with the constitutively active mutant of Gα15, thus leading to RhoA activation (Yeung and Wong, 2009). However, in their study, the overexpression of p63RhoGEF and Gα15 in HEK293 cells likely leads to inhibition of PLCβ2 and TPR1 activation and their downstream signaling such as the stimulation of transcription factors STAT3 and NF-κB or ERK (Su et al., 2009; Yeung and Wong, 2009). They suggested that p63RhoGEF interacts with a high affinity with Gα15 (a constitutive active mutant), competing with the canonical effectors PLCβ2 and TPR1, previously described as being involved in Gα15-mediated cell proliferation. The question is to know which signaling pathways are activated and when in GBM leading to migration and adhesion? One could for example propose that, depending to the needs of the cell in its microenvironment, it can activate the signaling pathways essential for its proliferation (*e.g.* via Gα15/PLCβ/ERK/STAT3 or Akt pathways) or rather adapt his cytoskeleton to migrate (*e.g.* via Gα15/p63RhoGEF/RhoA). In any case, the link between Gα15 and RhoA allows us to suggest that Gα15 depletion in GBM cell decrease the Gα15/p63RhoGEF interaction leading to decrease of RhoA activation that impairs actin cytoskeleton remodeling detected here by significant decreases F-actin staining intensity (Figure 16).

Recently, a link between Gαq, Cdc42 and actin polymerization in response to muscarinic M3 receptor activation has been shown in gastric smooth muscle cells (Mahavadi et al., 2018). Combining different techniques of cell and molecular biology (*ie.* immunocytochemistry**,** immunoblot, immunoprecipitation) Mahavadi *et al.,* demonstrated that the treatment of gastric smooth muscle cells with acetylcholine (Ach/M3R) can lead to Ca^{2+} dependent contraction and actin polymerization, mediated by PLCβ1 activation and IP3/Ca^{2+} release that leads to Ca^{2+} dependent phosphorylation of PYK2 at Tyrosine402. The sustained Ca^{2+} independent contraction and actin polymerization is mediated by RhoA which phosphorylates FAK at

Tyrosine397. Both activated PYK2 and FAK, leads to phosphorylation of paxillin at Tyrosine118 and its association with the GEF proteins p21-activated kinase (PAK) interacting exchange factor α, β (α and β PIX) and DOCK 180. These GEF proteins then stimulate Cdc42 leading to the activation of nucleation promoting factor N-WASP, which interacts with actin related protein complex 2/3 (Arp2/3) to induce actin polymerization and muscle contraction. The belonging of Gα15 to the Gαq/11 family allows us to assume that Gα15 could potentially regulate this Rho GTPase Cdc42 to promote F-actin polymerization in filopodia, either by individual activation of RhoA or PYK2 or by the combined activation of both leading to the regulation of Cdc42**.** It is obvious that additional experiments are needed to evaluate the regulation of Cdc42 by Gα15 in filopodia, in the leading edge of lamellipodia, in GPCR-activated or basal condition. However, here, the originality comes from the atypical nature of Gα15 in a way this G protein competes with other G proteins in their ability to interact with GPCRs, inducing mainly PLCβ couplings and leading to resistance to the desensitization relayed by β-arrestin (Lee et al., 1995; Wu et al., 1995; Innamorati et al., 2009).

As previously mentioned, activated Gα15 in HEK-293 cells stimulates PLCβ/PKC pathways leading to the activation of c-Src cascades (Lee and Wong, 2009; Giannone et al., 2010). One of the well-known downstream effector of c-Src is Rac1, especially in many cancers including glioma, prostate and colon cancers to induce migration and metastasis (Servitja et al., 2003; Feng et al., 2011; W Liu et al., 2015). In addition, early studies in PC12 cells propose Gα15QL as an activator of cJun NH_2-terminal kinases (JNKs) (Heasley et al., 1996; Higashita et al., 1997) which can be activated by Rac1 to regulate actin polymerization, paxillin activation associated to migration and motility (Servitja et al., 2003; Huang et al., 2004; Goldsmith and Dhanasekaran, 2007). Collectively, we speculate that Gα15 could also regulate F-actin polymerization in GBM cells, lamellipodia protrusion associated with paxillin recruitment in FA complexes, through at least PLCβ/PKC/c-Src/Rac-1 pathway (Figure 16).

But, presently, further assumption can be proposed considering that the Gα15 potential effector PYK2, has been shown to regulate some of FAK-associated proteins such as Src and paxillin (Zhang et al., 2014). In agreement with this study, Genna *et al.,* demonstrated by immunocytochemistry that PYK2 localizes to invadopodia and recruits Src kinase and also colocalize with FAK to vinculin-rich FA of the MDA-MB-231 breast cancer cell line, thus regulating both migration and MMP-dependent extracellular matrix (MEC) degradation for invasion in breast cancer cells in response to EGF (Genna et al., 2018). According to these data,

it can be expected that PYK2 also contributes to Gα15-mediated increase of paxillin/vinculin-enriched FA complexes formation associated with high migratory capacity of GBM cells.

As previously mentioned in association with actin polymerization, paxillin activation could be carried out by Gα15 *via* both, or either PLCβ2/PKC/c-Src/Rac-1 or PLCβ2/Ca^{2+}/PYK2 pathways. Furthermore, it has been described that paxillin exhibit many phosphorylation sites by PKC as well as JNK (López-Colomé et al., 2017), promoting its anchoring to the plasma membrane and its targeting to FA. Paxillin is present at low expression level in normal brain tissue and has been shown elevated in many cancers with the high expression level correlating with higher invasive potential and migration. It is even regarded as a potential biomarker as it negatively correlates with GBM patient survival (Chandrika et al., 2016; Sun et al., 2017). Nomura *et al.,* have been shown that in GBM, paxillin is a critical downstream target of integrins and modulates the proper formation of FA complex involved in PMA (*Phorbol-12-Myristate-13-Acetate*)-stimulated GBM cells migration (Nomura et al., 2008). PMA, a tumor promoting compound highly potent to activate PKC, can stimulate Rac1 promoting paxillin activation and expression in the leading edge of GBM cells, suggesting that signaling cascades involving PKC as for Gα15 may lead to paxillin recruitment and lamellipodia expansion.

Also, the PI3k/PTEN pathway should be evoked, since PTEN appeared to be involved in the downregulation of paxillin expression via the inhibition of PI3K/Akt/NF-κB signaling pathway, in three colon cancer cell lines (Lovo, HT-19, and HCT-116). As PTEN (*the human phosphatase and tensin homolog*) is frequently mutated in a large number of cancers and more particularly in GBM (Verhaak et al., 2010; Kim et al., 2015; Mansouri et al., 2017), and considering that three NF-κB binding sites on paxillin promoter have been identified (Zhang et al., 2015), we can propose that paxillin is a direct transcriptional target of the Akt/NF-κB cascade positively activated in the context of in the presence of Gα15 in U87MG GBM cells, stimulating cell invasion, migration, and cancer progression. This would potentially be relayed by PLCβ2/PKC and/or PLCβ2/PYK2/Akt pathways (Figure 16).

Moreover, the assembly/disassembly cycle of FA complexes are highly dynamic and these coordinated processes are essential during cell migration. It has been shown that MEK/ERK pathway is involved to FA disassembly during migration (Choi et al., 2008; Coló et al., 2012). In this context, ERK phosphorylation of serines 106, 231, and 290 has been shown to regulate paxillin disassembly from adhesion complexes and to promote cell migration (López-Colomé et al., 2017). Thus, Gα15 could regulate the activation of both ERK and NF-κB to control the kinetic of the formation of FA complexes and their de-assemblings during the migration of cells.

Vinculin was also been shown to be associated with a large number of actin cytoskeleton and FA proteins like paxillin, talin and Arp2/3 (Turner et al., 1990; Carisey and Ballestrem, 2011; Peng et al., 2011). Considered to be activated by PIP2, the role of vinculin in cellular processes like motility, migration and survival is very controversial and complicated (Critchley, 2004; Magro et al., 2007; Goldmann et al., 2013; Yu et al., 2019). In a good agreement with our data, vinculin-rich FA have been shown to contribute to glioma cell migration (Chantaravisoot et al., 2015; Lecointre et al., 2015). By immunocytochemistry, Chantaravisoot *et al.,* demonstrated that specific inhibition of mTORC2 (using PP242) in U87MG GBM cells significantly alters actin cytoskeleton and vinculin-rich FA formation but also inhibits other proteins functions such as filamin A (Chantaravisoot et al., 2015). This suggests a regulatory link between vinculin and PI3K/Akt/mTORC2 pathways, a key signaling pathway under stimulation by chemokine GPCRs coupled to Gαi in GBMs (Lombardi and Assem, 2017), but here proposed to be stimulated by Gα15 likely *via* PYK2. In fact, vinculin appears to be able to couple actin filaments to integrins mediating cell-matrix adhesions and to cadherin-based intercellular junctions (Lausecker et al., 2018). Its N-terminal head domain binds to talin at cell-matrix adhesions and predominantly to α-catenin at cell-cell junctions (Peng et al., 2012). The C-terminal tail domain has been shown to bind paxillin, F-actin, and PIP2 (Hemmings et al., 1996; Carisey and Ballestrem, 2011; Peng et al., 2011). It has been proposed that vinculin controls FA formation by direct interactions with talin and F-actin and regulates paxillin recruitment at FA (Humphries et al., 2007; Dumbauld et al., 2013). These coordinated regulation between these proteins can explain why they are modified simultaneously when Gα15 is knockout. Together, we may suppose that activation of PLCβ by Gα15 can result in the transformation of PIP2 into IP3 and DAG, modulating many signaling cascades, such as the activation of the PKC, ERK, STAT3 and NF-κB signalings. We can't exclude that Gα15 may also interact with the transcription factor E3 (TFE3) to allow nuclear translocation of Gα15 and the positive regulation of some genes as previously observed in cardiomyocytes (Sato et al., 2011), a GPCR-independent mechanism. In any rate, we here show the potential role of Gα15 in binding with PIP2, and FA complexes formation for mesenchymal migration, even in the absence of GPCR-associated exogenously signaling cascades.

4. Gα15 as an important regulator of GBM aggressive mesenchymal phenotype

EMT is recognized as the crucial event by which cancer cells acquire an invasive phenotype through the activation of specific transcription factors and signaling pathways. Even though glial cells have a mesenchymal phenotype, an MES transition process tends to exacerbate this phenotype during gliomagenesis, accompanying progression to more aggressive stages of the disease (Colella et al., 2019). The MES transition of GBM is characterized detachment from the tumor mass, adhesion to the MEC, degradation of MEC components and invasion of the brain tissue through vascular branches or white fiber tracts. The MES transition is associated with the presence the inflammatory and hypoxic microenvironment, which stimulate transcription of a number of genes encoding master mesenchymal TFs and angiogenic factors (Joseph et al., 2015; Iwadate, 2016), controlling GBM cell survival, migration and invasion. Despite numerous aggressive multimodal therapies (surgery, radiotherapy, TMZ, lomustine, bevacizumab, re-irradiation, etc.) provided to GBM patients, the survival remains extremely poor (Stupp et al., 2017: 2017; Stepanenko and Chekhonin, 2018), thus mesenchymal signatures and mechanisms constitute key therapeutic targets.

Here, we first detect from TCGA a positive correlation (Pearson coefficient higher than 0.5) between Gα15 expression and some key mesenchymal genes including C/EBPβ, RUNX1, FOSL2, CD44, SERPINA1. We then demonstrated that Gα15 knockout in U87MG GBM cells is sufficient (1) to significantly decrease the mRNA expression of several mesenchymal TFs such as C/EBPβ, RUNX1, FOSL2, BHLHB2, ZEB1 or KLF4, the protein expression of N-cadherin and translocation at the plasma membrane, (2) to significantly decrease the mRNA expression of angiogenic markers like angiogenin (ANG) and VEGFA, (3) on the contrary, to promote the mRNA expression of stemness markers such as SOX2, OCT4 and (4) to stimulate the tumor suppressor as ZNF238 mRNA expression. These results reveal for the first time the positive association between Gα15 and the mesenchymal gene expression and pro-tumorigenic factors promoting GBM aggressiveness. Interestingly, the study of the Lavarone research group (Carro et al., 2010) stressed that six essential TFs overexpressed in high-grade gliomas, e.g. STAT3, C/EBPβ, bHLHB2, RUNX1, FOSL2 and a tumor repressor ZNF238; are necessary and sufficient to maintain the MES signature of high-grade gliomas. By using specific shRNA to downregulate C/EBPβ and STAT3 in SNB19 glioma cell lines, they observed a significant reduction of mRNA expression levels of bHLHB2, FOSL2 and RUNX1, suggesting that STAT3 and C/EBPβ are key MES drivers. STAT3 and NF-κB, both activated by Gα15 as previously stated, act together to induce angiogenesis and inflammatory cell infiltration (Grivennikov and Karin, 2010), processes that are central to mesenchymal phenotype.

Interestingly, it has been shown that NF-κB promotes GBM MES transition by inducing the expression of master mesenchymal TFs, including STAT3, C/EBPβ and TAZ (Bhat et al., 2013; Yamini, 2018). In GBM, we assume that Gα15 could enhance the expression of mesenchymal TFs including RUNX1, FOSL2, BHLHB2, ZEB1 by regulating C/EBPβ and STAT3 via and NF-κB, with positive crosstalk between these master factors.

The inflammatory and hypoxic TME molecules like chemokines and cytokines, including IL-6; IL-8, TGFβ, SDF-1, stimulate many stemness factors (OCT4, SOX2, KLF4, Nanog, Nestin, CD44 or CD133), that promote self-renewal and survival pathways of glioma stem cells (GSCs) (Wang et al., 2015; Carnero and Lleonart, 2016; Ray, 2016; Roos et al., 2017). In this context, by analyzing the stemness status of our GBM cells, the MES TF KLF4 (Krüppel-like factor 4) was the only GBM stemness marker whose expression is reduced when Gα15 is deleted in U87MG GBM cells, unlike the well-known stemness markers SOX2 or OCT4. In fact, SOX2, OCT4, KLF4 were described to allow induction of pluripotency in differentiated embryonic and adult fibroblast cells, leading to the generation of pluripotent stem cells (Li et al., 2019). In cancer, different studies suggest that KLF4 exhibit an oncogenic potential in GBM and contributes significantly to the survival of GSCs and the recurrence of GBM. Under hypoxic conditions (2% O_2) HIF-1α is stabilized and promote expression of KLF4, c-Myc, Nanog, Oct4, and Sox2 genes in eleven cancer cell lines including glioma, kidney, lung breast tumors among others (Mathieu et al., 2011). KLF4 can also suppress the p53-dependent apoptotic pathways by directly acting on TP53 promoter and inhibiting its expression in tumor cell lines (Rowland et al., 2005). Although these aspects have not been evaluated in our studies, KLF4 mRNA downregulation in Gα15-KO GBM cells still seems to suggest its oncogenic function in GBM. While the expression of KLF4 would depend on STAT3 (Ray, 2016; Riddick et al., 2017; Li et al., 2019), we can propose that in GBM cells, Gα15 positively regulates the STAT3 pathway to promote cell survival and mesenchymal stemness properties in our study, even if we don't explain the increased expression of OCT4 and SOX2 in the absence of Gα15, it can be interesting to note that SOX2 and OCT4 have been described to bind the promoter and regulate the expression of DKK1; while SOX2 appears to activate DKK1 expression in MES stem cells (Park et al., 2012), OCT4 represses its expression in embryonic stem cells (Babaie et al., 2007; Kunarso et al., 2010). Ectopic expression of DKK1 significantly decreases colony formation and chemosensitizes T98 GBM cells to apoptotic stimuli (camptothecin and etoposide) but also inhibits the migration of two GBM cells (U87MG and primary GBM cells) and bone-marrow-derived MES stem cells, suggesting the interest of inhibiting the WNT

signaling pathway to treat GBM (Foltz et al., 2010; Guo et al., 2014; McCord et al., 2017). Here, DKK1 being overexpressed when Gα15 is KO, suggesting in a mesenchymal GBM cell expressing Gα15, SOX2, OCT4 and DKK1 are expressed at low level, while KLF4 as mesenchymal stemness marker, is overexpressed, thus keeping the Wnt/β-catenin pathway constitutively activatable to promote survival and migration of GBM cells.

Interestingly, this hypothesis corroborates with the stability of β-catenin as well as one of these target genes, ZEB1, which is also a master TFs initiating the expression of specific mesenchymal markers, such as N-cadherin, vimentin, fibronectin and conversely, inhibiting the expression of epithelial markers like E-cadherin, claudines, occludins and cytokeratins and stem cell marker SOX2 (Edwards et al., 2017; Colella et al., 2019). In fact, the analysis of many GBM patient samples suggested that the loss of ZEB1 expression leads to the expression of the stem cell markers SOX2, OLIG2 and CD133, while these results were confirmed in vitro by downregulating ZEB1 in GSCs isolated from patients (Edwards et al., 2017).

The key epithelial and mesenchymal markers that define the respective phenotypes are epithelial (E) and neuronal (N) cadherins, and this cadherin switch often coincides with the transition from benign to aggressive cancers (Cui and Yamada, 2013). E-cadherin expression is almost absent in neural tissues, where its expression appears limited to GSCs and to a subset of highly aggressive GBM cells. Otherwise, N-cadherin is absent in epithelial tumors before the EMT execution, whereas is highly expressed in astrocytes, where it contributes to regulate cell polarity and migration (Colella et al., 2019). However, N-cadherin expression levels increased with glioma grade (J Zhang et al., 2018). Immunohistochemical studies showed its expression in the invasive edge of human glioma tissues. ERK knock-down or the treatment of two GSCs (U251, 5310) with U0126 (MEK/ERK inhibitor) have been shown to reduce the expression and co-localization of N-cadherin and integrin α6, a GSC marker (Velpula et al., 2012), and active β-catenin can also stimulate the expression of N-cadherin in GBM cells (Mrozik et al., 2018; J Zhang et al., 2018). In addition, the downregulation of both N-cadherin and integrin α6 using specific shRNA significantly decreases GSCs migration and matrigel invasion, suggesting their contribution to GSCs spreading out (Velpula et al., 2012). Notably, it has been shown that differences in N-cadherin cell distribution rather than in its expression levels are responsible for different motility behaviors (Colella et al., 2019). In the present study, we detect by western blot a slight decrease of N-cadherin expression in Gα15-KO cells. In addition, the silencing of Gα15 significantly inhibits transmembrane N-cadherin localization while the overexpression of Gα15 significantly increases N-cadherin staining at the plasma membrane, indicating a master role of Gα15 in transmembrane localization of N-cadherin.

Taking together, we propose that in our study, Gα15 stimulates the expression and/or activation of STAT3/MEK/ERK and β-catenin (as suggested above) which promotes in part the expression of ZEB1 to block the SOX2/DKK1 signaling, while reinforcing MES GBM aggressiveness and to stimulate the expression and the plasma membrane translocation of the MES marker N-cadherin, resulting from GBM cell migration/invasion.

5. Gα15 expression in glioma cells and inflammatory status of GBM

Gα15 has long been described as specific for hematopoietic cells and their derived immune cells such as lymphocytes and macrophages (Su et al., 2009; Giannone et al., 2010). Numerous recent studies reported that inflammatory status has a close relationship, although still poorly understood, with the development of cancers. More particularly, GBM has been recognized as a highly inflammatory tumor with ~40% of the tumor mass being composed of at least infiltrating tumor macrophages or TAMs (Quail and Joyce, 2017; S Zhang et al., 2018; Perrin et al., 2019). This inflammation is favored by secreted factors first from glioma cells, such as chemokines and cytokines whose expression can be stimulated in part by the hypoxia factor HIF-1α, responsible for recruitment of TAMs, these latter contributing to tumor aggressiveness and angiogenesis (Triner and Shah, 2016; Matias et al., 2018; Roesch et al., 2018).

Interestingly, the GNA15 gene expression was significantly found in the MES subgroup of the Verhaak classification, associated with the mutation or suppression of neurofibromin 1 (NF1), the mutation of TP53 and/or PTEN, the overexpression of genes from the superfamily of tumor necrosis factor-α (TNF-α) and the NF-κB pathway (nuclear factor-kappa B) (Verhaak et al., 2010), potentially due to higher overall necrosis and inflammatory infiltrates associated with this subtype. Other alterations of mesenchymal or inflammatory markers such as CHI3L1 (Chitinase-3-like protein 1), cMET or CD44 proto-oncogene are also observed (Phillips et al., 2006; Agnihotri et al., 2013), suggesting that Gα15 accompanies the inflammatory status of MES GBM. We thus investigated the expression of two inflammatory factors SERPINA1, encoding alpha 1 antitrypsin protein, a major peptidases inhibitor produced principally by hepatocytes, neutrophils or monocytes and important during inflammation and MEC changes (Askew and Silverman, 2008; Greene et al., 2016), and TGF-β, for which a high expression in GBM has been shown to be associated with poor survival of patients (Caja et al., 2015; Seystahl et al., 2017; Ookawa et al., 2018), and pro-angiogenesis factor VEGFA and ANG. Although TGF-β mRNA expression is not modified in Gα15-KO cells compared with the control cells, SERPINA1 expression, exhibit a tendency of diminution in Gα15-KO cells. Note that SERPINA1 was also found to be positively correlated with GNA15 from our TCGA analysis.

As previously mentioned, SERPINA1 is an important peptidase inhibitor, known to protect at least the cancer cells from other proteases-induced apoptosis (Hunt and Tuder, 2012; Gollapalli et al., 2017) and to favor migration in some cancer cells (Ercetin et al., 2019). Indeed, recent study in different lung cancer cells (H1975 and H661) found five common SERPINA1 related genes (Ercetin et al., 2019), including SERPINE1 (PAI-1), the principal inhibitor of tPA (tissue-type plasminogen activator) and uPA (Urokinase-type Plasminogen Activator), which also expression in human glioma correlates with low survival rate (Roy et al., 2015). In GBM, S1P, IL-1 and EGF were shown to stimulate PAI-1 mRNA and protein expression, promoting GBM invasiveness and mast à verifier cell infiltration (Bryan et al., 2008; Paugh et al., 2008; Roy et al., 2015). Interestingly, ZNF238 would be able to bind the promoters of the genes encoding for PAI-1 as well as α-actinin to repress their expression in gliomas (Fedele et al., 2017). Thus, the overexpression of the negative master MES TF in GBM ZNF238 (Carro et al., 2010) when Gα15 is KO in GBM, can likely explain the low level of SERPINA1 and potentially that of PAI-1, although this remains to be confirmed.

Collectively, we assume that in MES GBM in the absence of the repressive action of ZNF238, and *via* activation of the STAT3-NF-κB pathway, Gα15 could on the one hand stimulate the mesenchymal migration through positive regulation of actin cytoskeleton, and on the other hand, Gα15 would participate to the tumor inflammation by overexpression and release of SERPINA1 and PAI-1 as well as of pro-angiogenic factors such as VEGFA or ANG, and potentially some chemotactic cytokines including IL-8 or the C5a (Norgauer et al., 1996; Davignon et al., 2000). In a physiopathological context, attracted inflammatory cells such as macrophages would also express Gα15 and could promote immunosuppressive microenvironment while these cells likely contribute in tumor development by secretion of many tumor promoting factors (IL-8, IL-6, IL-1β, IL-10, TGF-β, EGF, VEGFA) (Karsy et al., 2016; Roesch et al., 2018).

In conclusion, Gα15 seems to be involved in a STAT3→NF-κB→IL-6 signaling loop important in tumor inflammatory processes and development (Yamini, 2018; Wendt et al., 2014). It has also been shown that C/EBPβ, the other Mater TF of the mesenchymal status, can stimulate angiogenesis by binding to the IL-6 promoter and inducing its expression in U87MG GBM cell overexpressing EGFRvIII (X Liu et al., 2015). In fact, tumor angiogenesis corresponds to aberrant proliferation and organization of blood vessels usually inefficient to supply tumors for nutrients and oxygen, contributing to hypoxia and metastasis or invasion

(Yadav et al., 2015). Here, Gα15 is also associated with higher levels of VEGFA and ANG currently known to promote GBM aggressiveness (Zhao and Adjei, 2015; Mondal et al., 2017; Treps et al., 2017; Tan et al., 2018; Hu et al., 2019). These factors, non-exclusively both are well described to be able to stimulate cells intracellular signaling pathways including ERK, Akt, NF-κB, to mediate growth and survival of tumors such as GBM (Gao and Xu, 2008; Goel and Mercurio, 2013; Sheng and Xu, 2016). Also, Gα15 would also lead to activation of the transcription of VEGFA and ANG *via* the Akt/mTOR pathway previously reported as stabilizing HIF-1α expression and promoting angiogenesis (Liu et al., 2018). In addition, STAT3 and Wnt/β-catenin pathways have also been proposed to activate VEGFA secretion (Ashizawa et al., 2013; Olsen et al., 2017). Finally, Gα15 may exploit these different pathways (STAT3, NF-κB, ERK, Akt, C/EBPβ) pathways to promote GBM progression and mesenchymal phenotype acquisition, associated with angiogenesis and inflammatory status. Thereby, targeting this non-ubiquitous Gα15 subunit in GBM should be constitute a promising therapeutic strategy.

References

Agnihotri S, Burrell KE, Wolf A, Jalali S, Hawkins C, Rutka JT, Zadeh G. 2013. Glioblastoma, a brief review of history, molecular genetics, animal models and novel therapeutic strategies. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **61**(1): 25–41. doi: 10.1007/s00005-012-0203-0

Amatruda TT, Steele DA, Slepak VZ, Simon MI. 1991. G alpha 16, a G protein alpha subunit specifically expressed in hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**(13): 5587–5591.

Aragay AM, Quick MW. 1999. Functional regulation of Galpha16 by protein kinase C. *J Biol Chem* **274**(8): 4807–4815.

Armento A, Ehlers J, Schötterl S, Naumann U. 2017. Molecular Mechanisms of Glioma Cell Motility. In: De Vleeschouwer S, editor. *Glioblastoma*. Brisbane (AU): Codon Publications. Available at http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470001/. Accessed 2019 Sep 10.

Ashizawa T, Miyata H, Iizuka A, Komiyama M, Oshita C, Kume A, Nogami M, Yagoto M, Ito I, Oishi T, et al. 2013. Effect of the STAT3 inhibitor STX-0119 on the proliferation of cancer stem-like cells derived from recurrent glioblastoma. *Int J Oncol* **43**(1): 219–227. doi: 10.3892/ijo.2013.1916

Askew DJ, Silverman GA. 2008. Intracellular and extracellular serpins modulate lung disease. *J Perinatol* **28 Suppl 3**: S127-135. doi: 10.1038/jp.2008.150

Babaie Y, Herwig R, Greber B, Brink TC, Wruck W, Groth D, Lehrach H, Burdon T, Adjaye J. 2007. Analysis of Oct4-dependent transcriptional networks regulating self-renewal and pluripotency in human embryonic stem cells. *Stem Cells* **25**(2): 500–510. doi: 10.1634/stemcells.2006-0426

Bajetto A, Barbieri F, Dorcaratto A, Barbero S, Daga A, Porcile C, Ravetti JL, Zona G, Spaziante R, Corte G, et al. 2006. Expression of CXC chemokine receptors 1-5 and their ligands in human glioma tissues: role of CXCR4 and SDF1 in glioma cell proliferation and migration. *Neurochem Int* **49**(5): 423–432. doi: 10.1016/j.neuint.2006.03.003

Baltensperger K, Porzig H. 1997. The P2U purinoceptor obligatorily engages the heterotrimeric G protein G16 to mobilize intracellular Ca2+ in human erythroleukemia cells. *J Biol Chem* **272**(15): 10151–10159.

Belcheva MM, Coscia CJ. 2002. Diversity of G protein-coupled receptor signaling pathways to ERK/MAP kinase. *Neurosignals* **11**(1): 34–44. doi: 10.1159/000057320

Bhat KPL, Balasubramaniyan V, Vaillant B, Ezhilarasan R, Hummelink K, Hollingsworth F, Wani K, Heathcock L, James JD, Goodman LD, et al. 2013. Mesenchymal differentiation mediated by NF-κB promotes radiation resistance in glioblastoma. *Cancer Cell* **24**(3): 331–346. doi: 10.1016/j.ccr.2013.08.001

Brockmann MA, Papadimitriou A, Brandt M, Fillbrandt R, Westphal M, Lamszus K. 2003. Inhibition of intracerebral glioblastoma growth by local treatment with the scatter factor/hepatocyte growth factor-antagonist NK4. *Clin Cancer Res* **9**(12): 4578–4585.

Bryan L, Paugh BS, Kapitonov D, Wilczynska KM, Alvarez SM, Singh SK, Milstien S, Spiegel S, Kordula T. 2008. Sphingosine-1-phosphate and interleukin-1 independently regulate plasminogen activator inhibitor-1 and urokinase-type plasminogen activator receptor expression in glioblastoma cells: implications for invasiveness. *Mol Cancer Res* **6**(9): 1469–1477. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-08-0082

Caja L, Bellomo C, Moustakas A. 2015. Transforming growth factor β and bone morphogenetic protein actions in brain tumors. *FEBS Lett* **589**(14): 1588–1597. doi: 10.1016/j.febslet.2015.04.058

Carisey A, Ballestrem C. 2011. Vinculin, an adapter protein in control of cell adhesion signalling. *Eur J Cell Biol* **90**(2–3): 157–163. doi: 10.1016/j.ejcb.2010.06.007

Carnero A, Lleonart M. 2016. The hypoxic microenvironment: A determinant of cancer stem cell evolution. *Bioessays* **38 Suppl 1**: S65-74. doi: 10.1002/bies.201670911

Carro MS, Lim WK, Alvarez MJ, Bollo RJ, Zhao X, Snyder EY, Sulman EP, Anne SL, Doetsch F, Colman H, et al. 2010. The transcriptional network for mesenchymal transformation of brain tumours. *Nature* **463**(7279): 318–325. doi: 10.1038/nature08712

Castel H, Desrues L, Joubert J-E, Tonon M-C, Prézeau L, Chabbert M, Morin F, Gandolfo P. 2017. The G Protein-Coupled Receptor UT of the Neuropeptide Urotensin II Displays Structural and Functional Chemokine Features. *Front Endocrinol (Lausanne)* **8**: 76. doi: 10.3389/fendo.2017.00076

Castellone MD, Teramoto H, Williams BO, Druey KM, Gutkind JS. 2005. Prostaglandin E2 promotes colon cancer cell growth through a Gs-axin-beta-catenin signaling axis. *Science* **310**(5753): 1504–1510. doi: 10.1126/science.1116221

Ceccarelli M, Barthel FP, Malta TM, Sabedot TS, Salama SR, Murray BA, Morozova O, Newton Y, Radenbaugh A, Pagnotta SM, et al. 2016. Molecular Profiling Reveals Biologically Discrete Subsets and Pathways of Progression in Diffuse Glioma. *Cell* **164**(3): 550–563. doi: 10.1016/j.cell.2015.12.028

Cervantes-Villagrana RD, Adame-García SR, García-Jiménez I, Color-Aparicio VM, Beltrán-Navarro YM, König GM, Kostenis E, Reyes-Cruz G, Gutkind JS, Vázquez-Prado J. 2019. Gβγ signaling to the chemotactic effector P-REX1 and mammalian cell migration is directly regulated by Gαq and Gα13 proteins. *J Biol Chem* **294**(2): 531–546. doi: 10.1074/jbc.RA118.006254

Chakravorty D, Assmann SM. 2018. G protein subunit phosphorylation as a regulatory mechanism in heterotrimeric G protein signaling in mammals, yeast, and plants. *Biochem J* **475**(21): 3331–3357. doi: 10.1042/BCJ20160819

Chandrika G, Natesh K, Ranade D, Chugh A, Shastry P. 2016. Suppression of the invasive potential of Glioblastoma cells by mTOR inhibitors involves modulation of NFκB and PKC-α signaling. *Sci Rep* **6**: 22455. doi: 10.1038/srep22455

Chantaravisoot N, Wongkongkathep P, Loo JA, Mischel PS, Tamanoi F. 2015. Significance of filamin A in mTORC2 function in glioblastoma. *Mol Cancer* **14**: 127. doi: 10.1186/s12943-015-0396-z

Chen M, Zhang Y, Zheng P-S. 2017. Tafazzin (TAZ) promotes the tumorigenicity of cervical cancer cells and inhibits apoptosis. *PLoS ONE* **12**(5): e0177171. doi: 10.1371/journal.pone.0177171

Cheng W-Y, Kandel JJ, Yamashiro DJ, Canoll P, Anastassiou D. 2012. A multi-cancer mesenchymal transition gene expression signature is associated with prolonged time to recurrence in glioblastoma. *PLoS ONE* **7**(4): e34705. doi: 10.1371/journal.pone.0034705

Cherry AE, Stella N. 2014. G protein-coupled receptors as oncogenic signals in glioma: emerging therapeutic avenues. *Neuroscience* **278**: 222–236. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.08.015

Choi CK, Vicente-Manzanares M, Zareno J, Whitmore LA, Mogilner A, Horwitz AR. 2008. Actin and alpha-actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner. *Nat Cell Biol* **10**(9): 1039–1050. doi: 10.1038/ncb1763

Chow CR, Ebine K, Knab LM, Bentrem DJ, Kumar K, Munshi HG. 2016. Cancer Cell Invasion in Three-dimensional Collagen Is Regulated Differentially by Gα13 Protein and Discoidin Domain Receptor 1-Par3 Protein Signaling. *J Biol Chem* **291**(4): 1605–1618. doi: 10.1074/jbc.M115.669606

Clevers H, Loh KM, Nusse R. 2014. Stem cell signaling. An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control. *Science* **346**(6205): 1248012. doi: 10.1126/science.1248012

Colella B, Faienza F, Di Bartolomeo S. 2019. EMT Regulation by Autophagy: A New Perspective in Glioblastoma Biology. *Cancers (Basel)* **11**(3). doi: 10.3390/cancers11030312

Coló GP, Hernández-Varas P, Lock J, Bartolomé RA, Arellano-Sánchez N, Strömblad S, Teixidó J. 2012. Focal adhesion disassembly is regulated by a RIAM to MEK-1 pathway. *J Cell Sci* **125**(Pt 22): 5338–5352. doi: 10.1242/jcs.105270

Coly P-M, Perzo N, Le Joncour V, Lecointre C, Schouft M-T, Desrues L, Tonon M-C, Wurtz O, Gandolfo P, Castel H, et al. 2016. Chemotactic G protein-coupled receptors control cell migration by repressing autophagosome biogenesis. *Autophagy* **12**(12): 2344–2362. doi: 10.1080/15548627.2016.1235125

Côté M, Payet MD, Dufour MN, Guillon G, Gallo-Payet N. 1997. Association of the G protein alpha(q)/alpha11-subunit with cytoskeleton in adrenal glomerulosa cells: role in receptor-effector coupling. *Endocrinology* **138**(8): 3299–3307. doi: 10.1210/endo.138.8.5319

Critchley DR. 2004. Cytoskeletal proteins talin and vinculin in integrin-mediated adhesion. *Biochem Soc Trans* **32**(Pt 5): 831–836. doi: 10.1042/BST0320831

Cui Y, Yamada S. 2013. N-cadherin dependent collective cell invasion of prostate cancer cells is regulated by the N-terminus of α-catenin. *PLoS ONE* **8**(1): e55069. doi: 10.1371/journal.pone.0055069

Davignon I, Catalina MD, Smith D, Montgomery J, Swantek J, Croy J, Siegelman M, Wilkie TM. 2000. Normal hematopoiesis and inflammatory responses despite discrete signaling defects in Galpha15

knockout mice. *Mol Cell Biol* **20**(3): 797–804.
De Francesco EM, Sotgia F, Clarke RB, Lisanti MP, Maggiolini M. 2017. G Protein-Coupled Receptors at the Crossroad between Physiologic and Pathologic Angiogenesis: Old Paradigms and Emerging Concepts. *Int J Mol Sci* **18**(12). doi: 10.3390/ijms18122713
Demuth T, Berens ME. 2004. Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion. *J Neurooncol* **70**(2): 217–228. doi: 10.1007/s11060-004-2751-6
Desbaillets I, Diserens AC, Tribolet N, Hamou MF, Van Meir EG. 1997. Upregulation of interleukin 8 by oxygen-deprived cells in glioblastoma suggests a role in leukocyte activation, chemotaxis, and angiogenesis. *J Exp Med* **186**(8): 1201–1212. doi: 10.1084/jem.186.8.1201
Dillenburg-Pilla P, Patel V, Mikelis CM, Zárate-Bladés CR, Doçi CL, Amornphimoltham P, Wang Z, Martin D, Leelahavanichkul K, Dorsam RT, et al. 2015. SDF-1/CXCL12 induces directional cell migration and spontaneous metastasis via a CXCR4/Gαi/mTORC1 axis. *FASEB J* **29**(3): 1056–1068. doi: 10.1096/fj.14-260083
Dong D-D, Zhou H, Li G. 2016. GPR78 promotes lung cancer cell migration and metastasis by activation of Gαq-Rho GTPase pathway. *BMB Rep* **49**(11): 623–628.
Dorsam RT, Gutkind JS. 2007. G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat Rev Cancer* **7**(2): 79–94. doi: 10.1038/nrc2069
Downes GB, Gautam N. 1999. The G protein subunit gene families. *Genomics* **62**(3): 544–552. doi: 10.1006/geno.1999.5992
Dumbauld DW, Lee TT, Singh A, Scrimgeour J, Gersbach CA, Zamir EA, Fu J, Chen CS, Curtis JE, Craig SW, et al. 2013. How vinculin regulates force transmission. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**(24): 9788–9793. doi: 10.1073/pnas.1216209110
Eckerich C, Zapf S, Fillbrandt R, Loges S, Westphal M, Lamszus K. 2007. Hypoxia can induce c-Met expression in glioma cells and enhance SF/HGF-induced cell migration. *Int J Cancer* **121**(2): 276–283. doi: 10.1002/ijc.22679
Edwards LA, Li A, Berel D, Madany M, Kim N-H, Liu M, Hymowitz M, Uy B, Jung R, Xu M, et al. 2017. ZEB1 regulates glioma stemness through LIF repression. *Sci Rep* **7**(1): 69. doi: 10.1038/s41598-017-00106-x
Ehtesham M, Winston JA, Kabos P, Thompson RC. 2006. CXCR4 expression mediates glioma cell invasiveness. *Oncogene* **25**(19): 2801–2806. doi: 10.1038/sj.onc.1209302
El-Obeid A, Bongcam-Rudloff E, Sörby M, Ostman A, Nistér M, Westermark B. 1997. Cell scattering and migration induced by autocrine transforming growth factor alpha in human glioma cells in vitro. *Cancer Res* **57**(24): 5598–5604.
Entschladen F, Zänker KS, Powe DG. 2011. Heterotrimeric G protein signaling in cancer cells with regard to metastasis formation. *Cell Cycle* **10**(7): 1086–1091. doi: 10.4161/cc.10.7.15208
Epstein RJ. 2004. The CXCL12-CXCR4 chemotactic pathway as a target of adjuvant breast cancer therapies. *Nat Rev Cancer* **4**(11): 901–909. doi: 10.1038/nrc1473
Ercetin E, Richtmann S, Delgado BM, Gomez-Mariano G, Wrenger S, Korenbaum E, Liu B, DeLuca D, Kühnel MP, Jonigk D, et al. 2019. Clinical Significance of SERPINA1 Gene and Its Encoded Alpha1-antitrypsin Protein in NSCLC. *Cancers (Basel)* **11**(9). doi: 10.3390/cancers11091306
Fan X, Khaki L, Zhu TS, Soules ME, Talsma CE, Gul N, Koh C, Zhang J, Li Y-M, Maciaczyk J, et al. 2010. NOTCH pathway blockade depletes CD133-positive glioblastoma cells and inhibits growth of tumor neurospheres and xenografts. *Stem Cells* **28**(1): 5–16. doi: 10.1002/stem.254
Fedele V, Dai F, Masilamani AP, Heiland DH, Kling E, Gätjens-Sanchez AM, Ferrarese R, Platania L, Soroush D, Kim H, et al. 2017. Epigenetic Regulation of ZBTB18 Promotes Glioblastoma Progression. *Mol Cancer Res* **15**(8): 998–1011. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-16-0494
Federico A, Zappavigna S, Romano M, Grieco P, Luce A, Marra M, Gravina AG, Stiuso P, D'Armiento FP, Vitale G, et al. 2014. Urotensin-II receptor is over-expressed in colon cancer cell lines and in colon carcinoma in humans. *Eur J Clin Invest* **44**(3): 285–294. doi: 10.1111/eci.12231
Feng H, Hu B, Liu K-W, Li Y, Lu X, Cheng T, Yiin J-J, Lu S, Keezer S, Fenton T, et al. 2011. Activation of Rac1 by Src-dependent phosphorylation of Dock180(Y1811) mediates PDGFRα-stimulated glioma tumorigenesis in mice and humans. *J Clin Invest* **121**(12): 4670–4684. doi: 10.1172/JCI58559
Feng H, Liu KW, Guo P, Zhang P, Cheng T, McNiven MA, Johnson GR, Hu B, Cheng SY. 2012. Dynamin 2 mediates PDGFRα-SHP-2-promoted glioblastoma growth and invasion. *Oncogene*

31(21): 2691–2702. doi: 10.1038/onc.2011.436
Feng X, Degese MS, Iglesias-Bartolome R, Vaque JP, Molinolo AA, Rodrigues M, Zaidi MR, Ksander BR, Merlino G, Sodhi A, et al. 2014. Hippo-independent activation of YAP by the GNAQ uveal melanoma oncogene through a trio-regulated rho GTPase signaling circuitry. *Cancer Cell* **25**(6): 831–845. doi: 10.1016/j.ccr.2014.04.016
Foltz G, Yoon J-G, Lee H, Ma L, Tian Q, Hood L, Madan A. 2010. Epigenetic regulation of wnt pathway antagonists in human glioblastoma multiforme. *Genes Cancer* **1**(1): 81–90. doi: 10.1177/1947601909356103
Franco R, Zappavigna S, Gigantino V, Luce A, Cantile M, Cerrone M, Facchini G, Perdonà S, Pignata S, Di Lorenzo G, et al. 2014. Urotensin II receptor determines prognosis of bladder cancer regulating cell motility/invasion. *J Exp Clin Cancer Res* **33**: 48. doi: 10.1186/1756-9966-33-48
Fuchs D, Metzig M, Bickeböller M, Brandel C, Roth W. 2015. The Gβ5 protein regulates sensitivity to TRAIL-induced cell death in colon carcinoma. *Oncogene* **34**(21): 2753–2763. doi: 10.1038/onc.2014.213
Gao C, Chen G, Kuan S-F, Zhang DH, Schlaepfer DD, Hu J. 2015. FAK/PYK2 promotes the Wnt/β-catenin pathway and intestinal tumorigenesis by phosphorylating GSK3β. *Elife* **4**. doi: 10.7554/eLife.10072
Gao X, Xu Z. 2008. Mechanisms of action of angiogenin. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **40**(7): 619–624. doi: 10.1111/j.1745-7270.2008.00442.x
Genna A, Lapetina S, Lukic N, Twafra S, Meirson T, Sharma VP, Condeelis JS, Gil-Henn H. 2018. Pyk2 and FAK differentially regulate invadopodia formation and function in breast cancer cells. *J Cell Biol* **217**(1): 375–395. doi: 10.1083/jcb.201702184
Giannone F, Malpeli G, Lisi V, Grasso S, Shukla P, Ramarli D, Sartoris S, Monsurro V, Krampera M, Amato E, et al. 2010. The puzzling uniqueness of the heterotrimeric G15 protein and its potential beyond hematopoiesis. *Journal of Molecular Endocrinology* **44**(5): 259–269. doi: 10.1677/JME-09-0134
Gilman AG. 1987. G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem* **56**: 615–649. doi: 10.1146/annurev.bi.56.070187.003151
Giovinazzo F, Malpeli G, Zanini S, Parenti M, Piemonti L, Colombatti M, Valenti MT, Carbonare LD, Scarpa A, Sinnett-Smith J, et al. 2013. Ectopic expression of the heterotrimeric G15 protein in pancreatic carcinoma and its potential in cancer signal transduction. *Cellular Signalling* **25**(3): 651–659. doi: 10.1016/j.cellsig.2012.11.018
Goel HL, Mercurio AM. 2013. VEGF targets the tumour cell. *Nat Rev Cancer* **13**(12): 871–882. doi: 10.1038/nrc3627
Goldmann WH, Auernheimer V, Thievessen I, Fabry B. 2013. Vinculin, cell mechanics and tumour cell invasion. *Cell Biol Int* **37**(5): 397–405. doi: 10.1002/cbin.10064
Goldsmith ZG, Dhanasekaran DN. 2007. G protein regulation of MAPK networks. *Oncogene* **26**(22): 3122–3142. doi: 10.1038/sj.onc.1210407
Goldsmith ZG, Ha JH, Jayaraman M, Dhanasekaran DN. 2011. Lysophosphatidic Acid Stimulates the Proliferation of Ovarian Cancer Cells via the gep Proto-Oncogene Gα(12). *Genes Cancer* **2**(5): 563–575. doi: 10.1177/1947601911419362
Gollapalli K, Ghantasala S, Kumar S, Srivastava R, Rapole S, Moiyadi A, Epari S, Srivastava S. 2017. Subventricular zone involvement in Glioblastoma - A proteomic evaluation and clinicoradiological correlation. *Sci Rep* **7**(1): 1449. doi: 10.1038/s41598-017-01202-8
Gorelik R, Gautreau A. 2014. Quantitative and unbiased analysis of directional persistence in cell migration. *Nat Protoc* **9**(8): 1931–1943. doi: 10.1038/nprot.2014.131
Grant KR, Harnett W, Milligan G, Harnett MM. 1997. Differential G-protein expression during B- and T-cell development. *Immunology* **90**(4): 564–571.
Greene CM, Marciniak SJ, Teckman J, Ferrarotti I, Brantly ML, Lomas DA, Stoller JK, McElvaney NG. 2016. α1-Antitrypsin deficiency. *Nat Rev Dis Primers* **2**: 16051. doi: 10.1038/nrdp.2016.51
Grieco P, Franco R, Bozzuto G, Toccacieli L, Sgambato A, Marra M, Zappavigna S, Migaldi M, Rossi G, Striano S, et al. 2011. Urotensin II receptor predicts the clinical outcome of prostate cancer patients and is involved in the regulation of motility of prostate adenocarcinoma cells. *J Cell Biochem* **112**(1): 341–353. doi: 10.1002/jcb.22933
Grivennikov SI, Karin M. 2010. Dangerous liaisons: STAT3 and NF-kappaB collaboration and crosstalk

in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* **21**(1): 11–19. doi: 10.1016/j.cytogfr.2009.11.005
Gu JL, Lu W, Xia C, Wu X, Liu M. 2003. Regulation of hematopoietic-specific G-protein Galpha15 and Galpha16 by protein kinase C. *J Cell Biochem* **88**(6): 1101–1111. doi: 10.1002/jcb.10455
Guo K-T, Fu P, Juerchott K, Motaln H, Selbig J, Lah T, Tonn J-C, Schichor C. 2014. The expression of Wnt-inhibitor DKK1 (Dickkopf 1) is determined by intercellular crosstalk and hypoxia in human malignant gliomas. *J Cancer Res Clin Oncol* **140**(8): 1261–1270. doi: 10.1007/s00432-014-1642-2
Ha JH, Ward JD, Varadarajalu L, Kim SG, Dhanasekaran DN. 2014. The gep proto-oncogene Gα12 mediates LPA-stimulated activation of CREB in ovarian cancer cells. *Cell Signal* **26**(1): 122–132. doi: 10.1016/j.cellsig.2013.08.012
Hambardzumyan D, Bergers G. 2015. Glioblastoma: Defining Tumor Niches. *Trends Cancer* **1**(4): 252–265. doi: 10.1016/j.trecan.2015.10.009
Hardee ME, Zagzag D. 2012. Mechanisms of glioma-associated neovascularization. *Am J Pathol* **181**(4): 1126–1141. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.06.030
Heasley LE, Storey B, Fanger GR, Butterfield L, Zamarripa J, Blumberg D, Maue RA. 1996. GTPase-deficient G alpha 16 and G alpha q induce PC12 cell differentiation and persistent activation of cJun NH2-terminal kinases. *Mol Cell Biol* **16**(2): 648–656.
Hemmings L, Rees DJ, Ohanian V, Bolton SJ, Gilmore AP, Patel B, Priddle H, Trevithick JE, Hynes RO, Critchley DR. 1996. Talin contains three actin-binding sites each of which is adjacent to a vinculin-binding site. *J Cell Sci* **109 (Pt 11)**: 2715–2726.
Higashita R, Li L, Van Putten V, Yamamura Y, Zarinetchi F, Heasley L, Nemenoff RA. 1997. Galpha16 mimics vasoconstrictor action to induce smooth muscle alpha-actin in vascular smooth muscle cells through a Jun-NH2-terminal kinase-dependent pathway. *J Biol Chem* **272**(41): 25845–25850.
Hoelzinger DB, Nakada M, Demuth T, Rosensteel T, Reavie LB, Berens ME. 2008. Autotaxin: a secreted autocrine/paracrine factor that promotes glioma invasion. *J Neurooncol* **86**(3): 297–309. doi: 10.1007/s11060-007-9480-6
Holland EC, Celestino J, Dai C, Schaefer L, Sawaya RE, Fuller GN. 2000. Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice. *Nat Genet* **25**(1): 55–57. doi: 10.1038/75596
Hu J-L, Luo W-J, Wang H. 2019. Angiogenin Upregulation Independently Predicts Unfavorable Overall Survival in Proneural Subtype of Glioblastoma. *Technol Cancer Res Treat* **18**: 1533033819846636. doi: 10.1177/1533033819846636
Huang C, Jacobson K, Schaller MD. 2004. A role for JNK-paxillin signaling in cell migration. *Cell Cycle* **3**(1): 4–6.
Humphries JD, Wang P, Streuli C, Geiger B, Humphries MJ, Ballestrem C. 2007. Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin. *J Cell Biol* **179**(5): 1043–1057. doi: 10.1083/jcb.200703036
Hunt JM, Tuder R. 2012. Alpha 1 anti-trypsin: one protein, many functions. *Curr Mol Med* **12**(7): 827–835. doi: 10.2174/156652412801318755
Hurowitz EH, Melnyk JM, Chen YJ, Kouros-Mehr H, Simon MI, Shizuya H. 2000. Genomic characterization of the human heterotrimeric G protein alpha, beta, and gamma subunit genes. *DNA Res* **7**(2): 111–120.
Ibarrondo J, Joubert D, Dufour MN, Cohen-Solal A, Homburger V, Jard S, Guillon G. 1995. Close association of the alpha subunits of Gq and G11 G proteins with actin filaments in WRK1 cells: relation to G protein-mediated phospholipase C activation. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**(18): 8413–8417. doi: 10.1073/pnas.92.18.8413
Iglesias-Bartolome R, Torres D, Marone R, Feng X, Martin D, Simaan M, Chen M, Weinstein LS, Taylor SS, Molinolo AA, et al. 2015. Inactivation of a Gα(s)-PKA tumour suppressor pathway in skin stem cells initiates basal-cell carcinogenesis. *Nat Cell Biol* **17**(6): 793–803. doi: 10.1038/ncb3164
Innamorati G, Giannone F, Guzzi F, Rovati GE, Accomazzo MR, Chini B, Bianchi E, Schiaffino MV, Tridente G, Parenti M. 2009. Heterotrimeric G proteins demonstrate differential sensitivity to β-arrestin dependent desensitization. *Cellular Signalling* **21**(7): 1135–1142. doi: 10.1016/j.cellsig.2009.03.002

Iwadate Y. 2016. Epithelial-mesenchymal transition in glioblastoma progression. *Oncol Lett* **11**(3): 1615–1620. doi: 10.3892/ol.2016.4113

Jarjour AA, Durko M, Luk TL, Marçal N, Shekarabi M, Kennedy TE. 2011. Autocrine netrin function inhibits glioma cell motility and promotes focal adhesion formation. *PLoS ONE* **6**(9): e25408. doi: 10.1371/journal.pone.0025408

Johansson BB, Minsaas L, Aragay AM. 2005. Proteasome involvement in the degradation of the G(q) family of Galpha subunits. *FEBS J* **272**(20): 5365–5377. doi: 10.1111/j.1742-4658.2005.04934.x

Joseph JV, Conroy S, Pavlov K, Sontakke P, Tomar T, Eggens-Meijer E, Balasubramaniyan V, Wagemakers M, den Dunnen WFA, Kruyt FAE. 2015. Hypoxia enhances migration and invasion in glioblastoma by promoting a mesenchymal shift mediated by the HIF1α-ZEB1 axis. *Cancer Lett* **359**(1): 107–116. doi: 10.1016/j.canlet.2015.01.010

Karsy M, Guan J, Jensen R, Huang LE, Colman H. 2016. The Impact of Hypoxia and Mesenchymal Transition on Glioblastoma Pathogenesis and Cancer Stem Cells Regulation. *World Neurosurg* **88**: 222–236. doi: 10.1016/j.wneu.2015.12.032

Kim H, Zheng S, Amini SS, Virk SM, Mikkelsen T, Brat DJ, Grimsby J, Sougnez C, Muller F, Hu J, et al. 2015. Whole-genome and multisector exome sequencing of primary and post-treatment glioblastoma reveals patterns of tumor evolution. *Genome Res* **25**(3): 316–327. doi: 10.1101/gr.180612.114

Kishi Y, Okudaira S, Tanaka M, Hama K, Shida D, Kitayama J, Yamori T, Aoki J, Fujimaki T, Arai H. 2006. Autotaxin is overexpressed in glioblastoma multiforme and contributes to cell motility of glioblastoma by converting lysophosphatidylcholine to lysophosphatidic acid. *J Biol Chem* **281**(25): 17492–17500. doi: 10.1074/jbc.M601803200

Kloepper J, Riedemann L, Amoozgar Z, Seano G, Susek K, Yu V, Dalvie N, Amelung RL, Datta M, Song JW, et al. 2016. Ang-2/VEGF bispecific antibody reprograms macrophages and resident microglia to anti-tumor phenotype and prolongs glioblastoma survival. *Proc Natl Acad Sci USA* **113**(16): 4476–4481. doi: 10.1073/pnas.1525360113

Koochekpour S, Jeffers M, Rulong S, Taylor G, Klineberg E, Hudson EA, Resau JH, Vande Woude GF. 1997. Met and hepatocyte growth factor/scatter factor expression in human gliomas. *Cancer Res* **57**(23): 5391–5398.

Kouno J, Nagai H, Nagahata T, Onda M, Yamaguchi H, Adachi K, Takahashi H, Teramoto A, Emi M. 2004. Up-regulation of CC chemokine, CCL3L1, and receptors, CCR3, CCR5 in human glioblastoma that promotes cell growth. *J Neurooncol* **70**(3): 301–307. doi: 10.1007/s11060-004-9165-3

Kozasa T, Hepler JR, Smrcka AV, Simon MI, Rhee SG, Sternweis PC, Gilman AG. 1993. Purification and characterization of recombinant G16 alpha from Sf9 cells: activation of purified phospholipase C isozymes by G-protein alpha subunits. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**(19): 9176–9180.

Krishnan A, Mustafa A, Almén MS, Fredriksson R, Williams MJ, Schiöth HB. 2015. Evolutionary hierarchy of vertebrate-like heterotrimeric G protein families. *Mol Phylogenet Evol* **91**: 27–40. doi: 10.1016/j.ympev.2015.05.009

Kunarso G, Chia N-Y, Jeyakani J, Hwang C, Lu X, Chan Y-S, Ng H-H, Bourque G. 2010. Transposable elements have rewired the core regulatory network of human embryonic stem cells. *Nat Genet* **42**(7): 631–634. doi: 10.1038/ng.600

Kuo J-C, Han X, Hsiao C-T, Yates JR, Waterman CM. 2011. Analysis of the myosin-II-responsive focal adhesion proteome reveals a role for β-Pix in negative regulation of focal adhesion maturation. *Nat Cell Biol* **13**(4): 383–393. doi: 10.1038/ncb2216

Lal A, Glazer CA, Martinson HM, Friedman HS, Archer GE, Sampson JH, Riggins GJ. 2002. Mutant epidermal growth factor receptor up-regulates molecular effectors of tumor invasion. *Cancer Res* **62**(12): 3335–3339.

Langhans J, Schneele L, Trenkler N, von Bandemer H, Nonnenmacher L, Karpel-Massler G, Siegelin MD, Zhou S, Halatsch M-E, Debatin K-M, et al. 2017. The effects of PI3K-mediated signalling on glioblastoma cell behaviour. *Oncogenesis* **6**(11): 398. doi: 10.1038/s41389-017-0004-8

Lau WW, Chan AS, Poon LS, Zhu J, Wong YH. 2013. Gβγ-mediated activation of protein kinase D exhibits subunit specificity and requires Gβγ-responsive phospholipase Cβ isoforms. *Cell Commun Signal* **11**(1): 22. doi: 10.1186/1478-811X-11-22

Lausecker F, Tian X, Inoue K, Wang Z, Pedigo CE, Hassan H, Liu C, Zimmer M, Jinno S, Huckle AL, et al. 2018. Vinculin is required to maintain glomerular barrier integrity. *Kidney Int* **93**(3): 643–655. doi: 10.1016/j.kint.2017.09.021

LaValle CR, George KM, Sharlow ER, Lazo JS, Wipf P, Wang QJ. 2010. Protein kinase D as a potential new target for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta* **1806**(2): 183–192. doi: 10.1016/j.bbcan.2010.05.003

Lawson CD, Ridley AJ. 2018. Rho GTPase signaling complexes in cell migration and invasion. *J Cell Biol* **217**(2): 447–457. doi: 10.1083/jcb.201612069

Lecointre C, Desrues L, Joubert JE, Perzo N, Guichet P-O, Le Joncour V, Brulé C, Chabbert M, Leduc R, Prézeau L, et al. 2015. Signaling switch of the urotensin II vasosactive peptide GPCR: prototypic chemotaxic mechanism in glioma. *Oncogene* **34**(39): 5080–5094. doi: 10.1038/onc.2014.433

Lee CH, Katz A, Simon MI. 1995. Multiple regions of G alpha 16 contribute to the specificity of activation by the C5a receptor. *Mol Pharmacol* **47**(2): 218–223.

Lee CH, Park D, Wu D, Rhee SG, Simon MI. 1992. Members of the Gq alpha subunit gene family activate phospholipase C beta isozymes. *J Biol Chem* **267**(23): 16044–16047.

Lee H, Herrmann A, Deng J-H, Kujawski M, Niu G, Li Z, Forman S, Jove R, Pardoll DM, Yu H. 2009. Persistently activated Stat3 maintains constitutive NF-kappaB activity in tumors. *Cancer Cell* **15**(4): 283–293. doi: 10.1016/j.ccr.2009.02.015

Lee MMK, Wong YH. 2009. CCR1-mediated activation of Nuclear Factor-kappaB in THP-1 monocytic cells involves Pertussis Toxin-insensitive Galpha(14) and Galpha(16) signaling cascades. *J Leukoc Biol* **86**(6): 1319–1329. doi: 10.1189/jlb.0209052

Leyme A, Marivin A, Perez-Gutierrez L, Nguyen LT, Garcia-Marcos M. 2015. Integrins activate trimeric G proteins via the nonreceptor protein GIV/Girdin. *J Cell Biol* **210**(7): 1165–1184. doi: 10.1083/jcb.201506041

Li H, Yang L, Fu H, Yan J, Wang Y, Guo H, Hao X, Xu X, Jin T, Zhang N. 2013. Association between Gαi2 and ELMO1/Dock180 connects chemokine signalling with Rac activation and metastasis. *Nat Commun* **4**: 1706. doi: 10.1038/ncomms2680

Li X, Wu C, Chen N, Gu H, Yen A, Cao L, Wang E, Wang L. 2016. PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and targeted therapy for glioblastoma. *Oncotarget* **7**(22): 33440–33450. doi: 10.18632/oncotarget.7961

Li Z, Cai S, Liu Y, Yang C, Tian Y, Chen G, Cao C. 2016a. Over-expression of Gαi3 in human glioma is required for Akt-mTOR activation and cell growth. *Oncotarget* **5**(0). doi: 10.18632/oncotarget.10995

Li Z, Cai S, Liu Y, Yang C, Tian Y, Chen G, Cao C. 2016b. Over-expression of Gαi3 in human glioma is required for Akt-mTOR activation and cell growth. *Oncotarget* **5**(0). doi: 10.18632/oncotarget.10995

Li Z, Chen Y, An T, Liu P, Zhu J, Yang H, Zhang W, Dong T, Jiang J, Zhang Y, et al. 2019. Nuciferine inhibits the progression of glioblastoma by suppressing the SOX2-AKT/STAT3-Slug signaling pathway. *J Exp Clin Cancer Res* **38**(1): 139. doi: 10.1186/s13046-019-1134-y

Liu AMF, Wong YH. 2004. G16-mediated activation of nuclear factor kappaB by the adenosine A1 receptor involves c-Src, protein kinase C, and ERK signaling. *J Biol Chem* **279**(51): 53196–53204. doi: 10.1074/jbc.M410196200

Liu C, Pham K, Luo D, Reynolds BA, Hothi P, Foltz G, Harrison JK. 2013. Expression and functional heterogeneity of chemokine receptors CXCR4 and CXCR7 in primary patient-derived glioblastoma cells. *PLoS ONE* **8**(3): e59750. doi: 10.1371/journal.pone.0059750

Liu C, Tu Y, Sun X, Jiang J, Jin X, Bo X, Li Z, Bian A, Wang X, Liu D, et al. 2011. Wnt/beta-Catenin pathway in human glioma: expression pattern and clinical/prognostic correlations. *Clin Exp Med* **11**(2): 105–112. doi: 10.1007/s10238-010-0110-9

Liu C-A, Chang C-Y, Hsueh K-W, Su H-L, Chiou T-W, Lin S-Z, Harn H-J. 2018. Migration/Invasion of Malignant Gliomas and Implications for Therapeutic Treatment. *Int J Mol Sci* **19**(4). doi: 10.3390/ijms19041115

Liu W, Yue F, Zheng M, Merlot A, Bae D-H, Huang M, Lane D, Jansson P, Lui GYL, Richardson V, et al. 2015. The proto-oncogene c-Src and its downstream signaling pathways are inhibited by the metastasis suppressor, NDRG1. *Oncotarget* **6**(11): 8851–8874. doi: 10.18632/oncotarget.3316

Liu X, Liu K, Qin J, Hao L, Li X, Liu Y, Zhang X, Liu Xiuxiu, Li P, Han S, et al. 2015. C/EBPβ promotes angiogenesis through secretion of IL-6, which is inhibited by genistein, in EGFRvIII-positive glioblastoma. *Int J Cancer* **136**(11): 2524–2534. doi: 10.1002/ijc.29319

Lo RKH, Cheung H, Wong YH. 2003. Constitutively active Galpha16 stimulates STAT3 via a c-Src/JAK- and ERK-dependent mechanism. *J Biol Chem* **278**(52): 52154–52165. doi: 10.1074/jbc.M307299200

Lo RKH, Wong YH. 2006. Transcriptional activation of c-Fos by constitutively active Galpha(16)QL through a STAT1-dependent pathway. *Cell Signal* **18**(12): 2143–2153. doi: 10.1016/j.cellsig.2006.04.004

Lokits AD, Indrischek H, Meiler J, Hamm HE, Stadler PF. 2018. Tracing the evolution of the heterotrimeric G protein α subunit in Metazoa. *BMC Evol Biol* **18**(1): 51. doi: 10.1186/s12862-018-1147-8

Lombardi MY, Assem M. 2017. Glioblastoma Genomics: A Very Complicated Story. In: De Vleeschouwer S, editor. *Glioblastoma*. Brisbane (AU): Codon Publications. Available at http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470004/. Accessed 2019 Aug 20.

López-Colomé AM, Lee-Rivera I, Benavides-Hidalgo R, López E. 2017. Paxillin: a crossroad in pathological cell migration. *J Hematol Oncol* **10**(1): 50. doi: 10.1186/s13045-017-0418-y

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. 2007. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* **114**(2): 97–109. doi: 10.1007/s00401-007-0243-4

Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. 2016. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol* **131**(6): 803–820. doi: 10.1007/s00401-016-1545-1

Lu G, Chang JT, Liu Z, Chen Y, Li M, Zhu J-J. 2016. Phospholipase C Beta 1: a Candidate Signature Gene for Proneural Subtype High-Grade Glioma. *Mol Neurobiol* **53**(9): 6511–6525. doi: 10.1007/s12035-015-9518-2

Magro AM, Magro AD, Cunningham C, Miller MR. 2007. Down-regulation of vinculin upon MK886-induced apoptosis in LN18 glioblastoma cells. *Neoplasma* **54**(6): 517–526.

Mahavadi S, Nalli AD, Wang H, Kendig DM, Crowe MS, Lyall V, Grider JR, Murthy KS. 2018. Regulation of gastric smooth muscle contraction via Ca2+-dependent and Ca2+-independent actin polymerization. *PLoS ONE* **13**(12): e0209359. doi: 10.1371/journal.pone.0209359

Majewska E, Szeliga M. 2017. AKT/GSK3β Signaling in Glioblastoma. *Neurochem Res* **42**(3): 918–924. doi: 10.1007/s11064-016-2044-4

Malchinkhuu E, Sato K, Horiuchi Y, Mogi C, Ohwada S, Ishiuchi S, Saito N, Kurose H, Tomura H, Okajima F. 2005. Role of p38 mitogen-activated kinase and c-Jun terminal kinase in migration response to lysophosphatidic acid and sphingosine-1-phosphate in glioma cells. *Oncogene* **24**(44): 6676–6688. doi: 10.1038/sj.onc.1208805

Mansouri A, Karamchandani J, Das S. 2017. Molecular Genetics of Secondary Glioblastoma. In: De Vleeschouwer S, editor. *Glioblastoma*. Brisbane (AU): Codon Publications. Available at http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK469981/. Accessed 2019 Aug 19.

Mapara MY, Bommert K, Bargou RC, Leng C, Beck C, Ludwig WD, Gierschik P, Dörken B. 1995. G protein subunit G alpha 16 expression is restricted to progenitor B cells during human B-cell differentiation. *Blood* **85**(7): 1836–1842.

Mathieu J, Zhang Z, Zhou W, Wang AJ, Heddleston JM, Pinna CMA, Hubaud A, Stadler B, Choi M, Bar M, et al. 2011. HIF induces human embryonic stem cell markers in cancer cells. *Cancer Res* **71**(13): 4640–4652. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3320

Matias D, Balça-Silva J, da Graça GC, Wanjiru CM, Macharia LW, Nascimento CP, Roque NR, Coelho-Aguiar JM, Pereira CM, Dos Santos MF, et al. 2018. Microglia/Astrocytes-Glioblastoma Crosstalk: Crucial Molecular Mechanisms and Microenvironmental Factors. *Front Cell Neurosci* **12**: 235. doi: 10.3389/fncel.2018.00235

McCord M, Mukouyama Y-S, Gilbert MR, Jackson S. 2017. Targeting WNT Signaling for Multifaceted Glioblastoma Therapy. *Front Cell Neurosci* **11**: 318. doi: 10.3389/fncel.2017.00318

McGranahan T, Li G, Nagpal S. 2017. History and current state of immunotherapy in glioma and brain metastasis. *Ther Adv Med Oncol* **9**(5): 347–368. doi: 10.1177/1758834017693750

Mikheeva SA, Mikheev AM, Petit A, Beyer R, Oxford RG, Khorasani L, Maxwell J-P, Glackin CA, Wakimoto H, González-Herrero I, et al. 2010. TWIST1 promotes invasion through mesenchymal change in human glioblastoma. *Mol Cancer* **9**: 194. doi: 10.1186/1476-4598-9-194

Mondal A, Kumari Singh D, Panda S, Shiras A. 2017. Extracellular Vesicles As Modulators of Tumor Microenvironment and Disease Progression in Glioma. *Front Oncol* **7**: 144. doi: 10.3389/fonc.2017.00144

Mrozik KM, Blaschuk OW, Cheong CM, Zannettino ACW, Vandyke K. 2018. N-cadherin in cancer metastasis, its emerging role in haematological malignancies and potential as a therapeutic target in cancer. *BMC Cancer* **18**(1): 939. doi: 10.1186/s12885-018-4845-0

Muppidi JR, Schmitz R, Green JA, Xiao W, Larsen AB, Braun SE, An J, Xu Y, Rosenwald A, Ott G, et al. 2014. Loss of signalling via Gα13 in germinal centre B-cell-derived lymphoma. *Nature* **516**(7530): 254–258. doi: 10.1038/nature13765

Myung JK, Choi SA, Kim S-K, Wang K-C, Park S-H. 2014. Snail plays an oncogenic role in glioblastoma by promoting epithelial mesenchymal transition. *Int J Clin Exp Pathol* **7**(5): 1977–1987.

Nishikawa M, Inoue A, Ohnishi T, Kohno S, Ohue S, Matsumoto S, Suehiro S, Yamashita D, Ozaki S, Watanabe H, et al. 2018. Significance of Glioma Stem-Like Cells in the Tumor Periphery That Express High Levels of CD44 in Tumor Invasion, Early Progression, and Poor Prognosis in Glioblastoma. *Stem Cells Int* **2018**: 5387041. doi: 10.1155/2018/5387041

Nomura N, Nomura M, Mizuki N, Hamada J-I. 2008. Rac1 mediates phorbol 12-myristate 13-acetate-induced migration of glioblastoma cells via paxillin. *Oncol Rep* **20**(4): 705–711.

Norgauer J, Metzner B, Czech W, Schraufstatter I. 1996. Reconstitution of chemokine-induced actin polymerization in undifferentiated human leukemia cells (HL-60) by heterologous expression of interleukin-8 receptors. *Inflamm Res* **45**(3): 127–131.

Nürnberg A, Kitzing T, Grosse R. 2011. Nucleating actin for invasion. *Nat Rev Cancer* **11**(3): 177–187. doi: 10.1038/nrc3003

Offermanns S, Simon MI. 1995. $G\alpha_{15}$ and $G\alpha_{16}$ Couple a Wide Variety of Receptors to Phospholipase C. *Journal of Biological Chemistry* **270**(25): 15175–15180. doi: 10.1074/jbc.270.25.15175

O'Hayre M, Degese MS, Gutkind JS. 2014. Novel insights into G protein and G protein-coupled receptor signaling in cancer. *Curr Opin Cell Biol* **27**: 126–135. doi: 10.1016/j.ceb.2014.01.005

O'Hayre M, Vázquez-Prado J, Kufareva I, Stawiski EW, Handel TM, Seshagiri S, Gutkind JS. 2013. The emerging mutational landscape of G proteins and G-protein-coupled receptors in cancer. *Nat Rev Cancer* **13**(6): 412–424. doi: 10.1038/nrc3521

Oka Y, Saraiva LR, Kwan YY, Korsching SI. 2009. The fifth class of Galpha proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**(5): 1484–1489. doi: 10.1073/pnas.0809420106

Okuda T, Tasaki T, Nakata S, Yamashita K, Yoshioka H, Izumoto S, Kato A, Fujita M. 2017. Efficacy of Combination Therapy with MET and VEGF Inhibitors for MET-overexpressing Glioblastoma. *Anticancer Res* **37**(7): 3871–3876. doi: 10.21873/anticanres.11767

Olsen JJ, Pohl SÖ-G, Deshmukh A, Visweswaran M, Ward NC, Arfuso F, Agostino M, Dharmarajan A. 2017. The Role of Wnt Signalling in Angiogenesis. *Clin Biochem Rev* **38**(3): 131–142.

Ookawa S, Wanibuchi M, Kataoka-Sasaki Y, Sasaki M, Oka S, Ohtaki S, Noshiro S, Komatsu K, Akiyama Y, Mikami T, et al. 2018. Digital Polymerase Chain Reaction Quantification of SERPINA1 Predicts Prognosis in High-Grade Glioma. *World Neurosurg* **111**: e783–e789. doi: 10.1016/j.wneu.2017.12.166

Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, Rouse C, Chen Y, Dowling J, Wolinsky Y, Kruchko C, Barnholtz-Sloan J. 2014. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007-2011. *Neuro-oncology* **16 Suppl 4**: iv1-63. doi: 10.1093/neuonc/nou223

Otsuka S, Bebb G. 2008. The CXCR4/SDF-1 chemokine receptor axis: a new target therapeutic for non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* **3**(12): 1379–1383. doi: 10.1097/JTO.0b013e31818dda9d

Park D, Jhon DY, Kriz R, Knopf J, Rhee SG. 1992. Cloning, sequencing, expression, and Gq-independent activation of phospholipase C-beta 2. *J Biol Chem* **267**(23): 16048–16055.

Park SB, Seo KW, So AY, Seo MS, Yu KR, Kang SK, Kang KS. 2012. SOX2 has a crucial role in the lineage determination and proliferation of mesenchymal stem cells through Dickkopf-1 and c-MYC. *Cell Death Differ* **19**(3): 534–545. doi: 10.1038/cdd.2011.137

Park S-H, Won J, Kim S-I, Lee Y, Park C-K, Kim S-K, Choi S-H. 2017. Molecular Testing of Brain Tumor. *J Pathol Transl Med* **51**(3): 205–223. doi: 10.4132/jptm.2017.03.08

Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC-H, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu I-M, Gallia GL, et al. 2008. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* **321**(5897): 1807–1812. doi: 10.1126/science.1164382

Paugh BS, Paugh SW, Bryan L, Kapitonov D, Wilczynska KM, Gopalan SM, Rokita H, Milstien S, Spiegel S, Kordula T. 2008. EGF regulates plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) by a pathway involving c-Src, PKCdelta, and sphingosine kinase 1 in glioblastoma cells. *FASEB J* **22**(2): 455–465. doi: 10.1096/fj.07-8276com

Peavy RD, Hubbard KB, Lau A, Fields RB, Xu K, Lee CJ, Lee TT, Gernert K, Murphy TJ, Hepler JR. 2005. Differential effects of Gq alpha, G14 alpha, and G15 alpha on vascular smooth muscle cell survival and gene expression profiles. *Mol Pharmacol* **67**(6): 2102–2114. doi: 10.1124/mol.104.007799

Pedone KH, Hepler JR. 2007. The importance of N-terminal polycysteine and polybasic sequences for G14alpha and G16alpha palmitoylation, plasma membrane localization, and signaling function. *J Biol Chem* **282**(35): 25199–25212. doi: 10.1074/jbc.M610297200

Peng X, Maiers JL, Choudhury D, Craig SW, DeMali KA. 2012. α-Catenin uses a novel mechanism to activate vinculin. *J Biol Chem* **287**(10): 7728–7737. doi: 10.1074/jbc.M111.297481

Peng X, Nelson ES, Maiers JL, DeMali KA. 2011. New insights into vinculin function and regulation. *Int Rev Cell Mol Biol* **287**: 191–231. doi: 10.1016/B978-0-12-386043-9.00005-0

Perrin SL, Samuel MS, Koszyca B, Brown MP, Ebert LM, Oksdath M, Gomez GA. 2019. Glioblastoma heterogeneity and the tumour microenvironment: implications for preclinical research and development of new treatments. *Biochem Soc Trans* **47**(2): 625–638. doi: 10.1042/BST20180444

Pfeilstöcker M, Karlic H, Salamon J, Krömer E, Mühlberger H, Pavlova B, Selim U, Tüchler H, Fritsch G, Kneissl S, et al. 1996. Expression of G alpha 16, a G-protein alpha subunit specific for hematopoiesis in acute leukemia. *Leukemia* **10**(7): 1117–1121.

Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, Misra A, Nigro JM, Colman H, Soroceanu L, et al. 2006. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* **9**(3): 157–173. doi: 10.1016/j.ccr.2006.02.019

Pollard TD, Borisy GG. 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* **112**(4): 453–465.

Quail DF, Joyce JA. 2017. The Microenvironmental Landscape of Brain Tumors. *Cancer Cell* **31**(3): 326–341. doi: 10.1016/j.ccell.2017.02.009

Radenbaugh AJ, Ma S, Ewing A, Stuart JM, Collisson EA, Zhu J, Haussler D. 2014. RADIA: RNA and DNA integrated analysis for somatic mutation detection. *PLoS ONE* **9**(11): e111516. doi: 10.1371/journal.pone.0111516

Ray SK. 2016. The Transcription Regulator Krüppel-Like Factor 4 and Its Dual Roles of Oncogene in Glioblastoma and Tumor Suppressor in Neuroblastoma. *For Immunopathol Dis Therap* **7**(1–2): 127–139. doi: 10.1615/ForumImmunDisTher.2016017227

Riddick G, Kotliarova S, Rodriguez V, Kim HS, Linkous A, Storaska AJ, Ahn S, Walling J, Belova G, Fine HA. 2017. A Core Regulatory Circuit in Glioblastoma Stem Cells Links MAPK Activation to a Transcriptional Program of Neural Stem Cell Identity. *Sci Rep* **7**: 43605. doi: 10.1038/srep43605

Ridley AJ. 2015. Rho GTPase signalling in cell migration. *Curr Opin Cell Biol* **36**: 103–112. doi: 10.1016/j.ceb.2015.08.005

Roberts PJ, Der CJ. 2007. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* **26**(22): 3291–3310. doi: 10.1038/sj.onc.1210422

Rock BM, Xin L, Wilcox JN. 1997. Two Gq class G proteins are expressed in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* **109**(5): 645–649. doi: 10.1111/1523-1747.ep12337646

Roesch S, Rapp C, Dettling S, Herold-Mende C. 2018. When Immune Cells Turn Bad-Tumor-Associated Microglia/Macrophages in Glioma. *Int J Mol Sci* **19**(2). doi: 10.3390/ijms19020436

Roos A, Ding Z, Loftus JC, Tran NL. 2017. Molecular and Microenvironmental Determinants of Glioma Stem-Like Cell Survival and Invasion. *Front Oncol* **7**: 120. doi: 10.3389/fonc.2017.00120

Rowland BD, Bernards R, Peeper DS. 2005. The KLF4 tumour suppressor is a transcriptional repressor

of p53 that acts as a context-dependent oncogene. *Nat Cell Biol* **7**(11): 1074–1082. doi: 10.1038/ncb1314

Roy A, Coum A, Marinescu VD, Põlajeva J, Smits A, Nelander S, Uhrbom L, Westermark B, Forsberg-Nilsson K, Pontén F, et al. 2015. Glioma-derived plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) regulates the recruitment of LRP1 positive mast cells. *Oncotarget* **6**(27): 23647–23661. doi: 10.18632/oncotarget.4640

Rubin JB, Kung AL, Klein RS, Chan JA, Sun Y, Schmidt K, Kieran MW, Luster AD, Segal RA. 2003. A small-molecule antagonist of CXCR4 inhibits intracranial growth of primary brain tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**(23): 13513–13518. doi: 10.1073/pnas.2235846100

Sahai E, Marshall CJ. 2003. Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat Cell Biol* **5**(8): 711–719. doi: 10.1038/ncb1019

Sanson M, Marie Y, Paris S, Idbaih A, Laffaire J, Ducray F, El Hallani S, Boisselier B, Mokhtari K, Hoang-Xuan K, et al. 2009. Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. *J Clin Oncol* **27**(25): 4150–4154. doi: 10.1200/JCO.2009.21.9832

Sato M, Hiraoka M, Suzuki H, Bai Y, Kurotani R, Yokoyama U, Okumura S, Cismowski MJ, Lanier SM, Ishikawa Y. 2011. Identification of transcription factor E3 (TFE3) as a receptor-independent activator of Gα16: gene regulation by nuclear Gα subunit and its activator. *J Biol Chem* **286**(20): 17766–17776. doi: 10.1074/jbc.M111.219816

Schwindinger WF, Robishaw JD. 2001. Heterotrimeric G-protein betagamma-dimers in growth and differentiation. *Oncogene* **20**(13): 1653–1660. doi: 10.1038/sj.onc.1204181

Sciumè G, Soriani A, Piccoli M, Frati L, Santoni A, Bernardini G. 2010. CX3CR1/CX3CL1 axis negatively controls glioma cell invasion and is modulated by transforming growth factor-β1. *Neuro-oncology* **12**(7): 701–710. doi: 10.1093/neuonc/nop076

See WL, Mukherjee J. 2018. Chapter 22 - Targeting the RAS-RAF-MEK-ERK Signaling Pathway in Gliomas. In: Newton HB, editor. *Handbook of Brain Tumor Chemotherapy, Molecular Therapeutics, and Immunotherapy (Second Edition)*. Academic Press. p. 323–332. doi: 10.1016/B978-0-12-812100-9.00022-X

Sehgal A, Keener C, Boynton AL, Warrick J, Murphy GP. 1998. CXCR-4, a chemokine receptor, is overexpressed in and required for proliferation of glioblastoma tumor cells. *J Surg Oncol* **69**(2): 99–104.

Seidel S, Garvalov BK, Wirta V, von Stechow L, Schänzer A, Meletis K, Wolter M, Sommerlad D, Henze A-T, Nistér M, et al. 2010. A hypoxic niche regulates glioblastoma stem cells through hypoxia inducible factor 2 alpha. *Brain* **133**(Pt 4): 983–995. doi: 10.1093/brain/awq042

Servitja J-M, Marinissen MJ, Sodhi A, Bustelo XR, Gutkind JS. 2003. Rac1 function is required for Src-induced transformation. Evidence of a role for Tiam1 and Vav2 in Rac activation by Src. *J Biol Chem* **278**(36): 34339–34346. doi: 10.1074/jbc.M302960200

Seystahl K, Papachristodoulou A, Burghardt I, Schneider H, Hasenbach K, Janicot M, Roth P, Weller M. 2017. Biological Role and Therapeutic Targeting of TGF-β3 in Glioblastoma. *Mol Cancer Ther* **16**(6): 1177–1186. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0465

Sheng J, Xu Z. 2016. Three decades of research on angiogenin: a review and perspective. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **48**(5): 399–410. doi: 10.1093/abbs/gmv131

Silbergeld DL, Chicoine MR. 1997. Isolation and characterization of human malignant glioma cells from histologically normal brain. *J Neurosurg* **86**(3): 525–531. doi: 10.3171/jns.1997.86.3.0525

Simon MI, Strathmann MP, Gautam N. 1991. Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* **252**(5007): 802–808.

Sit S-T, Manser E. 2011. Rho GTPases and their role in organizing the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* **124**(Pt 5): 679–683. doi: 10.1242/jcs.064964

Sonoda Y, Ozawa T, Aldape KD, Deen DF, Berger MS, Pieper RO. 2001. Akt pathway activation converts anaplastic astrocytoma to glioblastoma multiforme in a human astrocyte model of glioma. *Cancer Res* **61**(18): 6674–6678.

Spiering D, Hodgson L. 2011. Dynamics of the Rho-family small GTPases in actin regulation and motility. *Cell Adh Migr* **5**(2): 170–180. doi: 10.4161/cam.5.2.14403

Stancheva G, Goranova T, Laleva M, Kamenova M, Mitkova A, Velinov N, Poptodorov G, Mitev V,

Kaneva R, Gabrovsky N. 2014. IDH1/IDH2 but not TP53 mutations predict prognosis in Bulgarian glioblastoma patients. *Biomed Res Int* **2014**: 654727. doi: 10.1155/2014/654727

Stepanenko AA, Chekhonin VP. 2018. Recent Advances in Oncolytic Virotherapy and Immunotherapy for Glioblastoma: A Glimmer of Hope in the Search for an Effective Therapy? *Cancers (Basel)* **10**(12). doi: 10.3390/cancers10120492

Strathmann M, Simon MI. 1990. G protein diversity: a distinct class of alpha subunits is present in vertebrates and invertebrates. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**(23): 9113–9117.

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, et al. 2005. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* **352**(10): 987–996. doi: 10.1056/NEJMoa043330

Stupp R, Taillibert S, Kanner A, Read W, Steinberg D, Lhermitte B, Toms S, Idbaih A, Ahluwalia MS, Fink K, et al. 2017. Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* **318**(23): 2306–2316. doi: 10.1001/jama.2017.18718

Stupp R, Taillibert S, Kanner AA, Kesari S, Steinberg DM, Toms SA, Taylor LP, Lieberman F, Silvani A, Fink KL, et al. 2015. Maintenance Therapy With Tumor-Treating Fields Plus Temozolomide vs Temozolomide Alone for Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* **314**(23): 2535–2543. doi: 10.1001/jama.2015.16669

Su Y, Ho MKC, Wong YH. 2009. A hematopoietic perspective on the promiscuity and specificity of Galpha16 signaling. *Neurosignals* **17**(1): 71–81. doi: 10.1159/000186691

Sun L-H, Yang F-Q, Zhang C-B, Wu Y-P, Liang J-S, Jin S, Wang Z, Wang H-J, Bao Z-S, Yang Z-X, et al. 2017. Overexpression of Paxillin Correlates with Tumor Progression and Predicts Poor Survival in Glioblastoma. *CNS Neurosci Ther* **23**(1): 69–75. doi: 10.1111/cns.12606

Svensson L, Stanley P, Willenbrock F, Hogg N. 2012. The Gαq/11 proteins contribute to T lymphocyte migration by promoting turnover of integrin LFA-1 through recycling. *PLoS ONE* **7**(6): e38517. doi: 10.1371/journal.pone.0038517

Swaney KF, Li R. 2016. Function and regulation of the Arp2/3 complex during cell migration in diverse environments. *Curr Opin Cell Biol* **42**: 63–72. doi: 10.1016/j.ceb.2016.04.005

Syrovatkina V, Alegre KO, Dey R, Huang X-Y. 2016. Regulation, Signaling, and Physiological Functions of G-Proteins. *J Mol Biol* **428**(19): 3850–3868. doi: 10.1016/j.jmb.2016.08.002

Tan Z, Chen K, Wu W, Zhou Y, Zhu J, Wu G, Cao L, Zhang X, Guan H, Yang Y, et al. 2018. Overexpression of HOXC10 promotes angiogenesis in human glioma via interaction with PRMT5 and upregulation of VEGFA expression. *Theranostics* **8**(18): 5143–5158. doi: 10.7150/thno.27310

Tang DD, Gerlach BD. 2017. The roles and regulation of the actin cytoskeleton, intermediate filaments and microtubules in smooth muscle cell migration. *Respir Res* **18**(1): 54. doi: 10.1186/s12931-017-0544-7

Tang X, Jin R, Qu G, Wang X, Li Z, Yuan Z, Zhao C, Siwko S, Shi T, Wang P, et al. 2013. GPR116, an adhesion G-protein-coupled receptor, promotes breast cancer metastasis via the Gαq-p63RhoGEF-Rho GTPase pathway. *Cancer Res* **73**(20): 6206–6218. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1049

Tenailleau S, Corre I, Hermouet S. 1997. Specific expression of heterotrimeric G proteins G12 and G16 during human myeloid differentiation. *Exp Hematol* **25**(9): 927–934.

Teo M, Martin S, Owusu-Agyemang K, Nowicki S, Clark B, Mackinnon M, Stewart W, Paul J, St George J. 2014. A survival analysis of GBM patients in the West of Scotland pre- and post-introduction of the Stupp regime. *Br J Neurosurg* **28**(3): 351–355. doi: 10.3109/02688697.2013.847170

Touat M, Idbaih A, Sanson M, Ligon KL. 2017. Glioblastoma targeted therapy: updated approaches from recent biological insights. *Ann Oncol* **28**(7): 1457–1472. doi: 10.1093/annonc/mdx106

Treps L, Perret R, Edmond S, Ricard D, Gavard J. 2017. Glioblastoma stem-like cells secrete the pro-angiogenic VEGF-A factor in extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* **6**(1): 1359479. doi: 10.1080/20013078.2017.1359479

Triner D, Shah YM. 2016. Hypoxia-inducible factors: a central link between inflammation and cancer. *J Clin Invest* **126**(10): 3689–3698. doi: 10.1172/JCI84430

Tso C-L, Shintaku P, Chen J, Liu Q, Liu J, Chen Z, Yoshimoto K, Mischel PS, Cloughesy TF, Liau LM,

et al. 2006. Primary glioblastomas express mesenchymal stem-like properties. *Mol Cancer Res* **4**(9): 607–619. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-06-0005

Turner CE, Glenney JR, Burridge K. 1990. Paxillin: a new vinculin-binding protein present in focal adhesions. *J Cell Biol* **111**(3): 1059–1068.

Twizere J-C, Springael J-Y, Boxus M, Burny A, Dequiedt F, Dewulf J-F, Duchateau J, Portetelle D, Urbain P, Van Lint C, et al. 2007. Human T-cell leukemia virus type-1 Tax oncoprotein regulates G-protein signaling. *Blood* **109**(3): 1051–1060. doi: 10.1182/blood-2006-06-026781

Ueda H, Saga S, Shinohara H, Morishita R, Kato K, Asano T. 1997. Association of the gamma12 subunit of G proteins with actin filaments. *J Cell Sci* **110 (Pt 13)**: 1503–1511.

Vakilian A, Khorramdelazad H, Heidari P, Sheikh Rezaei Z, Hassanshahi G. 2017. CCL2/CCR2 signaling pathway in glioblastoma multiforme. *Neurochem Int* **103**: 1–7. doi: 10.1016/j.neuint.2016.12.013

Van Raamsdonk CD, Bezrookove V, Green G, Bauer J, Gaugler L, O'Brien JM, Simpson EM, Barsh GS, Bastian BC. 2009. Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi. *Nature* **457**(7229): 599–602. doi: 10.1038/nature07586

Vázquez-Prado J, Bracho-Valdés I, Cervantes-Villagrana RD, Reyes-Cruz G. 2016. Gβγ Pathways in Cell Polarity and Migration Linked to Oncogenic GPCR Signaling: Potential Relevance in Tumor Microenvironment. *Mol Pharmacol* **90**(5): 573–586. doi: 10.1124/mol.116.105338

Velpula KK, Rehman AA, Chelluboina B, Dasari VR, Gondi CS, Rao JS, Veeravalli KK. 2012. Glioma stem cell invasion through regulation of the interconnected ERK, integrin α6 and N-cadherin signaling pathway. *Cell Signal* **24**(11): 2076–2084. doi: 10.1016/j.cellsig.2012.07.002

Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP, et al. 2010. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* **17**(1): 98–110. doi: 10.1016/j.ccr.2009.12.020

Vleeschouwer SD. 2017 Sep 20. Glioblastoma. *Codon Publications*, in press. Available at https://codonpublications.com/index.php/codon/catalog/view/35/142/290-1. Accessed 2019 Sep 10.

Wang H-H, Liao C-C, Chow N-H, Huang LL-H, Chuang J-I, Wei K-C, Shin J-W. 2017. Whether CD44 is an applicable marker for glioma stem cells. *Am J Transl Res* **9**(11): 4785–4806.

Wang L, Huang T, Chen W, Gao X, Zhou T, Wu Z, Sun Y. 2012. Silencing of CXCR4 by RNA interference inhibits cell growth and metastasis in human renal cancer cells. *Oncol Rep* **28**(6): 2043–2048. doi: 10.3892/or.2012.2028

Wang Y, Xu X, Pan M, Jin T. 2016. ELMO1 Directly Interacts with Gβγ Subunit to Transduce GPCR Signaling to Rac1 Activation in Chemotaxis. *J Cancer* **7**(8): 973–983. doi: 10.7150/jca.15118

Wang Z, Yang J, Xu G, Wang W, Liu C, Yang H, Yu Z, Lei Q, Xiao L, Xiong J, et al. 2015. Targeting miR-381-NEFL axis sensitizes glioblastoma cells to temozolomide by regulating stemness factors and multidrug resistance factors. *Oncotarget* **6**(5): 3147–3164. doi: 10.18632/oncotarget.3061

Welch HCE, Coadwell WJ, Ellson CD, Ferguson GJ, Andrews SR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Hawkins PT, Stephens LR. 2002. P-Rex1, a PtdIns(3,4,5)P3- and Gbetagamma-regulated guanine-nucleotide exchange factor for Rac. *Cell* **108**(6): 809–821.

Wendt MK, Balanis N, Carlin CR, Schiemann WP. 2014. STAT3 and epithelial-mesenchymal transitions in carcinomas. *JAKSTAT* **3**(1): e28975. doi: 10.4161/jkst.28975

Wettschureck N, Offermanns S. 2005. Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev* **85**(4): 1159–1204. doi: 10.1152/physrev.00003.2005

Wilkie TM, Gilbert DJ, Olsen AS, Chen XN, Amatruda TT, Korenberg JR, Trask BJ, de Jong P, Reed RR, Simon MI. 1992. Evolution of the mammalian G protein alpha subunit multigene family. *Nat Genet* **1**(2): 85–91. doi: 10.1038/ng0592-85

Wilkie TM, Scherle PA, Strathmann MP, Slepak VZ, Simon MI. 1991. Characterization of G-protein alpha subunits in the Gq class: expression in murine tissues and in stromal and hematopoietic cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**(22): 10049–10053.

Wu D, Kuang Y, Wu Y, Jiang H. 1995. Selective coupling of beta 2-adrenergic receptor to hematopoietic-specific G proteins. *J Biol Chem* **270**(27): 16008–16010.

Wu J, Xie N, Zhao X, Nice EC, Huang C. 2012. Dissection of aberrant GPCR signaling in tumorigenesis--a systems biology approach. *Cancer Genomics Proteomics* **9**(1): 37–50.

Wu V, Yeerna H, Nohata N, Chiou J, Harismendy O, Raimondi F, Inoue A, Russell RB, Tamayo P, Gutkind JS. 2019. Illuminating the Onco-GPCRome: Novel G protein-coupled receptor-driven oncocrine networks and targets for cancer immunotherapy. *J Biol Chem* **294**(29): 11062–11086. doi: 10.1074/jbc.REV119.005601

Xia W, Fu W, Cai X, Wang M, Chen H, Xing W, Wang Y, Zou M, Xu T, Xu D. 2015. Angiogenin promotes U87MG cell proliferation by activating NF-κB signaling pathway and downregulating its binding partner FHL3. *PLoS ONE* **10**(2): e0116983. doi: 10.1371/journal.pone.0116983

Yadav L, Puri N, Rastogi V, Satpute P, Sharma V. 2015. Tumour Angiogenesis and Angiogenic Inhibitors: A Review. *J Clin Diagn Res* **9**(6): XE01–XE05. doi: 10.7860/JCDR/2015/12016.6135

Yadav VN, Zamler D, Baker GJ, Kadiyala P, Erdreich-Epstein A, DeCarvalho AC, Mikkelsen T, Castro MG, Lowenstein PR. 2016. CXCR4 increases in-vivo glioma perivascular invasion, and reduces radiation induced apoptosis: A genetic knockdown study. *Oncotarget* **7**(50): 83701–83719. doi: 10.18632/oncotarget.13295

Yagi H, Tan W, Dillenburg-Pilla P, Armando S, Amornphimoltham P, Simaan M, Weigert R, Molinolo AA, Bouvier M, Gutkind JS. 2011. A synthetic biology approach reveals a CXCR4-G13-Rho signaling axis driving transendothelial migration of metastatic breast cancer cells. *Sci Signal* **4**(91): ra60. doi: 10.1126/scisignal.2002221

Yamini B. 2018. NF-κB, Mesenchymal Differentiation and Glioblastoma. *Cells* **7**(9). doi: 10.3390/cells7090125

Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, Kos I, Batinic-Haberle I, Jones S, Riggins GJ, et al. 2009. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med* **360**(8): 765–773. doi: 10.1056/NEJMoa0808710

Yang HW, Menon LG, Black PM, Carroll RS, Johnson MD. 2010. SNAI2/Slug promotes growth and invasion in human gliomas. *BMC Cancer* **10**: 301. doi: 10.1186/1471-2407-10-301

Yang M, Sang H, Rahman A, Wu D, Malik AB, Ye RD. 2001. G alpha 16 couples chemoattractant receptors to NF-kappa B activation. *J Immunol* **166**(11): 6885–6892.

Ye X, Xu S, Xin Y, Yu S, Ping Y, Chen L, Xiao H, Wang B, Yi L, Wang Q, et al. 2012. Tumor-associated microglia/macrophages enhance the invasion of glioma stem-like cells via TGF-β1 signaling pathway. *J Immunol* **189**(1): 444–453. doi: 10.4049/jimmunol.1103248

Yeung WWS, Wong YH. 2009. The RhoA-specific guanine nucleotide exchange factor p63RhoGEF binds to activated Galpha(16) and inhibits the canonical phospholipase Cbeta pathway. *Cell Signal* **21**(8): 1317–1325. doi: 10.1016/j.cellsig.2009.03.017

Yoda A, Adelmant G, Tamburini J, Chapuy B, Shindoh N, Yoda Y, Weigert O, Kopp N, Wu S-C, Kim SS, et al. 2015. Mutations in G protein β subunits promote transformation and kinase inhibitor resistance. *Nat Med* **21**(1): 71–75. doi: 10.1038/nm.3751

Yu MY, Ho MK, Liu AM, Wong YH. 2008. Mutations on the Switch III region and the alpha3 helix of Galpha16 differentially affect receptor coupling and regulation of downstream effectors. *J Mol Signal* **3**: 17. doi: 10.1186/1750-2187-3-17

Yu Q, Xu L, Chen L, Sun B, Yang Zhiyun, Lu K, Yang Zhiyong. 2019 Apr 5. Vinculin expression in non-small cell lung cancer. *J Int Med Res*: 300060519839523. doi: 10.1177/030006051983952

Yuan J, Xiao G, Peng G, Liu D, Wang Z, Liao Y, Liu Q, Wu M, Yuan X. 2015. MiRNA-125a-5p inhibits glioblastoma cell proliferation and promotes cell differentiation by targeting TAZ. *Biochem Biophys Res Commun* **457**(2): 171–176. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.12.078

Yule DI, Baker CW, Williams JA. 1999. Calcium signaling in rat pancreatic acinar cells: a role for Galphaq, Galpha11, and Galpha14. *Am J Physiol* **276**(1 Pt 1): G271-279.

Zagzag D, Esencay M, Mendez O, Yee H, Smirnova I, Huang Y, Chiriboga L, Lukyanov E, Liu M, Newcomb EW. 2008. Hypoxia- and vascular endothelial growth factor-induced stromal cell-derived factor-1alpha/CXCR4 expression in glioblastomas: one plausible explanation of Scherer's structures. *Am J Pathol* **173**(2): 545–560. doi: 10.2353/ajpath.2008.071197

Zanini S, Giovinazzo F, Alaimo D, Lawrence B, Pfragner R, Bassi C, Modlin I, Kidd M. 2015. GNA15 expression in small intestinal neuroendocrine neoplasia: Functional and signalling pathway analyses. *Cellular Signalling* **27**(5): 899–907. doi: 10.1016/j.cellsig.2015.02.001

Zhang J, Cai H, Sun L, Zhan P, Chen M, Zhang F, Ran Y, Wan J. 2018. LGR5, a novel functional glioma stem cell marker, promotes EMT by activating the Wnt/β-catenin pathway and predicts poor survival of glioma patients. *J Exp Clin Cancer Res* **37**(1): 225. doi: 10.1186/s13046-018-

0864-6
Zhang L-L, Mu G-G, Ding Q-S, Li Y-X, Shi Y, Dai J-F, Yu H-G. 2015. Phosphatase and Tensin Homolog (PTEN) Represses Colon Cancer Progression through Inhibiting Paxillin Transcription via PI3K/AKT/NF-κB Pathway. *J Biol Chem* **290**(24): 15018–15029. doi: 10.1074/jbc.M115.641407
Zhang S, Yang X, Wang L, Zhang C. 2018. Interplay between inflammatory tumor microenvironment and cancer stem cells. *Oncol Lett* **16**(1): 679–686. doi: 10.3892/ol.2018.8716
Zhang Yu, Moschetta M, Huynh D, Tai Y-T, Zhang Yong, Zhang W, Mishima Y, Ring JE, Tam WF, Xu Q, et al. 2014. Pyk2 promotes tumor progression in multiple myeloma. *Blood* **124**(17): 2675–2686. doi: 10.1182/blood-2014-03-563981
Zhang Z, Tan X, Luo J, Cui B, Lei S, Si Z, Shen L, Yao H. 2018. GNA13 promotes tumor growth and angiogenesis by upregulating CXC chemokines via the NF-κB signaling pathway in colorectal cancer cells. *Cancer Med* **7**(11): 5611–5620. doi: 10.1002/cam4.1783
Zhao L, Wang Y, Xue Y, Lv W, Zhang Y, He S. 2015. Critical roles of chemokine receptor CCR5 in regulating glioblastoma proliferation and invasion. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **47**(11): 890–898. doi: 10.1093/abbs/gmv095
Zhao Y, Adjei AA. 2015. Targeting Angiogenesis in Cancer Therapy: Moving Beyond Vascular Endothelial Growth Factor. *Oncologist* **20**(6): 660–673. doi: 10.1634/theoncologist.2014-0465
Zhou G, Yang J, Song P. 2019. Correlation of ERK/MAPK signaling pathway with proliferation and apoptosis of colon cancer cells. *Oncol Lett* **17**(2): 2266–2270. doi: 10.3892/ol.2018.9857

Acknowledgements

We grateful the PRIMACEN platform (University of Rouen, France) for imaging equipment and the members of the Arpège platform led by L. Prézeau (IGF Montpellier, France). This work Co-supported by European Union and Région Normandie. Europe gets involved in Normandie with European Regional Development Fund (ERDF).

Financial disclosure

The authors have no financial relationships relevant to this article to disclose.

Conflicts of interest

The authors have no conflicts of interests to disclose.

Legend to Figures

Figure 1. Expression level of the 31 genes encoding G proteins in glioma, as a key signature of glioma grade. (**A**) Heatmap of the G protein mRNAs differentially expressed in glioma patients (TCGA, n=703). G protein subunits mRNA expression was analyzed in different glioma grades compared with the normal brain tissue (NT). Panel of relatively over-expressed (red) or under-expressed (blue) G proteins in GBM on this hierarchical cluster have been identified. (**B**) G protein expression signatures in glioma were obtained through a principal component analysis (PCA) corroborating the importance of various Gα, β and γ proteins in glioma grade and aggressiveness. PCA was performed from TCGA data base on the R software. The length of the arrows weights the importance of the gene in the signature of the group associated with the corresponding sector. Each colored ellipse corresponds to the center of gravity of the predefined groups, more the ellipse is smaller, more centered is the distribution of the individuals in a group. (**C**) Radar graph summarizing differences in G protein expression associated with glioma grade. Each G protein mRNA expression was normalized to its expression level in normal tissues. G proteins were grouped by family in the radar graph and the four identified G proteins were represented by bold lines. Gαs and Gα12/13 families have been omitted from the representation because their expressions were highly variable in the different glioma grades. The table summarizes the expression levels of the main G proteins highlighted in the radar graph in the different gliomas. Statistical significance was evaluated using a Mann and Whitney test comparing the expression levels to the normal tissue as well as to the oligodendroglioma (OligodG).

Figure 2. G proteins expression level is associated with glioma aggressiveness. (**A**) Differential mRNA expression of identified G proteins classified according to the IDH mutational status of glioma patient biopsies. The boxes and whiskers were given according to the IDH status of 703 glioma patients from TCGA. Statistical significance was determined by a Mann and Whitney test; ***$p < 0.001$. (**B**) Quantitative assessment of the correlation between different G proteins and patient survival was analyzed. The Kaplan–Meier estimates of overall survival among all TCGA glioma patients (n=703) with high versus low expression level of different G proteins (GNAI3, GNB2, GNG5, GNG10, GNG11, GNG12). The red curves represent the survival of patients whose gene expression is higher than the median of expression and the blue curve represent the survival of patients with low expression compared with the median of expression. (**C**) Involvement of G protein expression levels on survival among

patients with GBM (n=165). The high and low expressions were determined as in (B) in GBM patients. In (B) and (C) panels, statistical significances were determined by Log-rank (Mantel-Cox) test.

Figure 3. GNA15 expression level is associated with glioma aggressiveness. (**A**) The left-hand side graph represents Gα15 subunit mRNA expression according to IDH mutational status of glioma patients. Statistical significance was evaluated using Mann and Whitney test; ***p < 0.001. The middle graph represents Gα15 subunit mRNA expression in NT and different gliomas. The right-hand side graph represents Gα15 subunit mRNA expression in the four molecular subtypes of GBM (Proneural, Neural, Classical, Mesenchymal) according to the Verhaak classification. All boxes and whiskers were given using the expression levels in 703 glioma patients from TCGA among whom 165 patients have GBM. Statistical significance was determined by a Kruskal–Wallis test followed by a Dunn's Multiple Comparison test; ns, not significant; *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001. (**B**) Kaplan–Meier survival curve based on GNA15 expression in all gliomas (left panel, n=703) and GBM (right panel, n=165). The red curves represent the survival of patients whose GNA15 expression was higher than the median of expression and the blue curve represent the survival of patients with lower GNA15 expression than the median. Statistical significance was determined by Log-rank (Mantel-Cox) test. (**C**) GNA15 expression is correlated with many genes. Pearson correlation analysis was performed to explore from TCGA, the positive correlated genes with GNA15. According to the ranked coefficients, positive correlated genes from 0.5 to 1 were represented. Some of them are illustrated as key players in mesenchymal profile (left) or inflammation (right).

Figure 4. **G protein expression levels from patients' biopsies and GBM cell lines, and role in GBM cells growth**. (**A**) G protein expression in different GBM cell lines (top bar graphs) and GBM tumor samples from Rouen CHU hospital (bottom bar graphs). Total mRNA from each cells and glioma samples were extracted and then cDNA synthesis was performed using 1 µg of total mRNA. Specific G protein mRNA relative expression were assessed by quantitative real-time PCR (RT-PCR). The experiments were performed in triplicate, data were presented as mean ± SEM after normalization to the endogenous control gene UBC. (**B**) Downregulation of the main expressed G proteins in GBM cells**.** Stable downregulation of G proteins was established in GBM cells using pGIPZ shRNA technology. Briefly, G protein shRNA transfer vector encoding GFP gene and the puromycin resistance gene, and containing the sequence of shRNA of interest and a trans-lentiviral packaging mix composed of 5 plasmids,

were co-transfected in HEK cells. Two days after transfection, the viral particles in the culture supernatants were collected over a period of three days. GBM cells were then infected and selected in complete media containing puromycin. GNA15, GNAI3, GNB2 and GNG5 downregulations in U87 cells were validated by RT-PCR and Western blot analysis. (**C**) Impact of downregulation of identified G protein expression on GBM cells proliferation. Using Nucleocounter NC3000, the number of Gα15-, Gαi3-, Gβ2- and Gγ5-downregulated cells was measured over time. Cells were seeded in 24-well plates for 24 h then 20 h starving in serum free medium. After 48 h and 72 h, the number of proliferating cells was evaluated according to the manufacturer's protocol "Cell Viability and Cell Count Assays". The green fluorescence corresponds to GFP from pGIPZ. Statistical significance was evaluated using Mann and Whitney test; ns, not significant; *p < 0.05; **p < 0.01.

Figure 5. GNA15 knockout inhibits GBM cells growth. (**A**) Schematic representation of GNA15 knockout (KO) cell line production. GBM cells were transfected with the CRISPR plasmid used to deliver Cas9 and GNA15 specific sgRNA. After selecting for positively transfected cells using puromycin resistance, different KO clones (Gα15-KO) were thus selected after analysis by Western blot (bottom). (**B**) Analysis of Gα15 effect on GBM cell growth using crystal violet staining assay. Gα15 knockout cell, U87 clone 26-6 and 8MG clone 2, as well as the corresponding control cell lines were seeded in 24-well plates 24 h before growing in serum-reduced media (0.5% FBS). After 72 h, viable cells were fixed, stained with crystal violet, and then photos were taken with Chemidoc imaging system. Crystal violet staining intensity were quantified using imageJ software. Representative staining images are shown. Each bar corresponds to mean ± SEM obtained from 2 independent experiments in triplicate. Mann and Whitney test; **p < 0.01. (**C**) Analysis of Gα15 effect on GBM cell growth using the Nucleocounter NC3000 assay. 72 h after seeding Gα15 knockout cells and the corresponding control cell lines in 96-well plate, the number of proliferating cells was evaluated by means of Nucleocounter NC3000's protocol "Cell Viability and Cell Count Assays". Each bar represents mean ± SEM obtained from 2 independent experiments in sextuplicate. Mann and Whitney test; ns, not significant; ***p < 0.001. (**D**) Analysis of Gα15 effect on GBM cell viability by measuring WST-1 activity. Cells were seeded in 96-well plates 24 h before growing in serum-reduced media (0.5% FBS) and after 72 h, incubated for 1 h with WST-1. The effect of Gα15 depletion on GBM cell metabolic activity was determined by measuring WST-1 cleavage. Each bar represents mean ± SEM obtained from 2 independent experiments in sextuplicate. Mann and Whitney test; ***p < 0.001.

Figure 6. Gα15 expression level controls GBM cells migration. (**A**) The two GBM cell lines U87 and 8MG were transfected with control siRNA or siRNA directed against GNA15 in order to downregulate GNA15. Three days after transfection, expression of Gα15 was analyzed by Western blot using anti-Gα15 antibody and β-actin was used as a loading control. Gα15 and β-actin immunoreactive bands were detected at ~ 43 kDa. (**B**) Stable overexpression of Gα15 was established in U87 and 8MG cells using GNA15 overexpressing plasmid (pLentiGNA15). Briefly, pLentiGNA15 or pLentiControl plasmids, and the trans-lentiviral packaging mix composed of 5 plasmids, were co-transfected in HEK293 cells. Two days after transfection, the viral particles in the culture supernatants were collected over a period of 3 days. GBM cells were then infected and selected in complete media-containing puromycin. The GNA15 upregulation was analyzed by Western blot using anti-Gα15 antibody and β-tubulin was used as a loading control. The immunoreactive bands of both Gα15 and β-tubulin were respectively detected at ~ 43 and 56 kDa. (**C**) Analysis of Gα15 downregulation using siGNA15 (left bar graph) and Gα15 overexpression using pLentiGNA15 plasmid (right bar graph) on the migration capacity of GBM transfected cells. The cells were loaded in the upper chamber of transwells containing serum-free DMEM and left to migrate onto the lower surface of the transwell membrane for 24 h before fixing, staining and counting. The number of migrated cells was evaluated by counting cells in all the membrane surface. Bar graph represents mean ± SEM obtained from one representative experiment in triplicate normalized to the control cells. Statistical significance was evaluated using a Mann and Whitney test; ns, not significant; *$p < 0.05$.

Figure 7. Gα15 is involved in GBM cells motility/migratory properties. (**A**) The transwell migration assay was performed to evaluate the effect of Gα15 disruption on cell migration. Gα15-KO clones were loaded in the upper chamber of transwells. DMEM without serum is added in both upper and bottom chambers, cells are then left to migrate onto the lower surface of the transwell membrane for 24 h before fixing, staining and counting. Bar graph represents mean ± SEM of migrated cells from representative experiment in triplicates normalized to the control cells. Statistical significance was evaluated using a Mann and Whitney test; ns, not significant; *$p < 0.05$; ***$p < 0.001$. (**B**) Videomicroscopy for time-lapse recordings of Gα15-KO clone motility was performed with Lumascope (1-min interval acquisition, 20 h). The Plot-At-Origin displaying all the continuous trajectories emanating from the origin of each cells were redrawn (upper panels). The cumulative distances (middle curves) as well as the average speed (bottom bar graphs) of Gα15-KO clones were also compared to control cells. Values

represent tracking of 7 individual cells from each clone. Statistical significance was evaluated using a Mann and Whitney test; ns, not significant; **p < 0.01; ***p < 0.001.

Figure 8. The Gα15 effector PLCs are important for GBM cells migration. (**A**) The effect of GNA15 disruption on mRNA expression level of the main Gα15 effectors was evaluated by RT-qPCR. The relative expression of each gene (PLCβ1, PLCβ2, TPR1) in Gα15-KO clones was compared with their expression in control cells. (**B**) Wound healing assay was performed to analyze the impact of PLC inhibition on Gα15-KO clone migration. Briefly, cells were seeded in 12-well plates 24 h before treatment with PLC inhibitor U73122 (10 µM; 1 h) and mitomycin C (10 µg/mL; 2 h) to inhibit proliferation prior to scratching; the control conditions were treated with the same amount of DMSO. Images of wound healing were taken at different times to follow the wound closure; scale bars indicate 100 µm. Bar graph represents mean ± SEM from one representative experiment performed at least in quintuplicate. Mann and Whitney test; ns, not significant; *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001. (**C**) The transwell migration assay was performed to evaluate the effect of PLCβ2 silencing (siPLCβ2) on cell migration. U87 control cells and Gα15 KO clone were transfected with siRNA against PLCβ2 or the control siRNA for 48h. Cells were then loaded in the upper chamber of transwells. DMEM without serum is added in both upper and bottom chambers, cells are then left to migrate onto the lower surface of the transwell membrane for 24 h before fixing, staining and counting. Bar graph represents mean ± SEM of migrated cells from representative experiment in triplicates, normalized to control cells without treatment. Statistical significance was evaluated using a Mann and Whitney test; ns, not significant; *p < 0.05; ***p < 0.001.

Figure 9. Gα15 extinction decreases the number of focal adhesion enriched proteins. (**A**) Immunofluorescence analysis of the number of focal adhesion (FA) points labeled with antibodies directed against P-Paxillin (green, left panel) or Vinculin (cyan, right panel) in control U87 and Gα15-KO clones. Nuclei (blue) were counterstained with DAPI. Scale bars indicate 25 µm. White squares on the pictures illustrate the specific cell areas enlarged on the right panel (zoom). The P-Paxillin and Vinculin enriched dots per cell were analyzed by confocal microscopy by successive image acquisition. (**B**) Quantification of FA points per cell and distribution of FA areas (P-Paxillin, left bar graph; Vinculin, right bar graph) in Gα15-KO clones compared to control U87 cell line. The FA complex is illustrated in the center of figure B. For each photographic field in (A), adhesion complexes were quantified using the ImageJ software and normalized to the number of cells. FA points were divided into three groups

according to their size (green, 5–20 pixel^2; blue, 20–40 pixel^2; red, > 40 pixel^2). Stacked bar represents the number of FA points per area interval from one representative experiment. Statistical significance was evaluated using a Mann and Whitney test; ns, not significant; *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; ****p < 0.0001.

Figure 10. Gα15 overexpression increases the number of focal adhesion enriched protein. (**A**) Co-immunofluorescence analysis of the number of FA points labeled with an antibody directed against Vinculin (red) in cells overexpressing Gα15 (cyan) compared cells transfected with pLentiControl plasmid. Merge images allowed visualization of Gα15 and Vinculin in the plasma and cytosolic compartments (white). Nuclei (blue) were counterstained with DAPI. Scale bars indicate 25 µm. White squares on the pictures illustrate the specific cell areas enlarged on the right panel (zoom). Arrow show Gα15 colocalization with Vinculin in the plasma membrane. (**B**) Quantification of FA points per cell (Vinculin, left stacked bar) in Gα15-overexpressed cells compared to control cell line. For each photographic field in (A), Vinculin points were quantified and normalized to the number of cells. All Vinculin points were divided into three groups according to their size (green, 5–20 pixel^2; blue, 20–40 pixel^2; red, >40 pixel^2). The right bar graph represents the quantification of Gα15 at the plasma membrane. FA number as well as the plasma membrane Gα15 (arrows, panel A) fluorescence intensity were quantified using the ImageJ software. Bar graph represents mean ± SEM from one representative experiment. Statistical significance was evaluated using a Mann and Whitney test; **p < 0.01.

Figure 11. Gα15 is involved in actin polymerization and lamellipodia formation in GBM cells. (**A**) Immunofluorescence of phalloidin-rhodamine stained F-actin (red) in Gα15-KO clones compared to control U87 cells. The nuclei were counterstained with DAPI (blue). White squares on the pictures illustrate the specific cell areas enlarged on the bottom panel (zoom). Scale bars indicate 25 µm. F-actin staining was analyzed by confocal microscopy by successive image acquisitions (~10 acquisitions per condition). (**B**) Quantification of phalloidin-rhodamine intensities (left bar graph) and lamellipodia formation per cell (right bar graph) in Gα15-KO clones compared to control U87 cells. For each photographic field acquired in (A), phalloidin-rhodamine fluorescence intensity was quantified using the ImageJ software and normalized to the number of cells in each Gα15-KO clone compared to control U87 cells. Effect of Gα15 overexpression on lamellipodia formation is also evaluated (**C**). Arrow show an edge of lamellipodia of migrating cell; Scale bars indicate 25 µm. Bar graph represents mean ± SEM

from one representative experiment. Statistical significance was evaluated using a Mann and Whitney test; ns, not significant; *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001.

Figure 12. Gα15 is involved in GBM mesenchymal, angiogenic or stemness regulation. Expression of transcription factors regulating mesenchymal GBM phenotype (**A**), pro-angiogenic markers (**B**), stemness markers (**C**) as well as the tumor repressors (**D**) analyzed by RT-qPCR from mRNA isolated from Gα15-KO clones and control cell line. The relative expression of each gene in Gα15-KO clones was compared with the expression in control cells. (**E**) Heatmap based on normalized expression level of the indicated genes generated by RT-PCR. The two-color gradient ends correspond to red when the gene is overexpressed compared with the control (100%) and conversely to green when the gene expression is downregulated. Bar graph represents mean ± SEM from three representative experiments performed at least in triplicates (except Serpina1 and TGF-β in triplicate). Mann and Whitney test; ns, not significant; *p < 0.05; **p < 0.01.

Figure 13. Gα15 is involved in key factor expression in gliomagenesis. The effect of Gα15 disruption on some key protein expression implicated in oncogenic signaling (**A**) and mesenchymal phenotype (**B**) were analyzed in different Gα15-KO clones by western blot. Histograms show quantification of each detected protein normalized to β-actin or β-tubulin. Each bar corresponds to mean ± SEM obtained from three (pERK) or two (STAT3, CD44 and N-cadherin) independent experiments. Mann and Whitney test; ns, not significant; *p < 0.05; **p < 0.01.

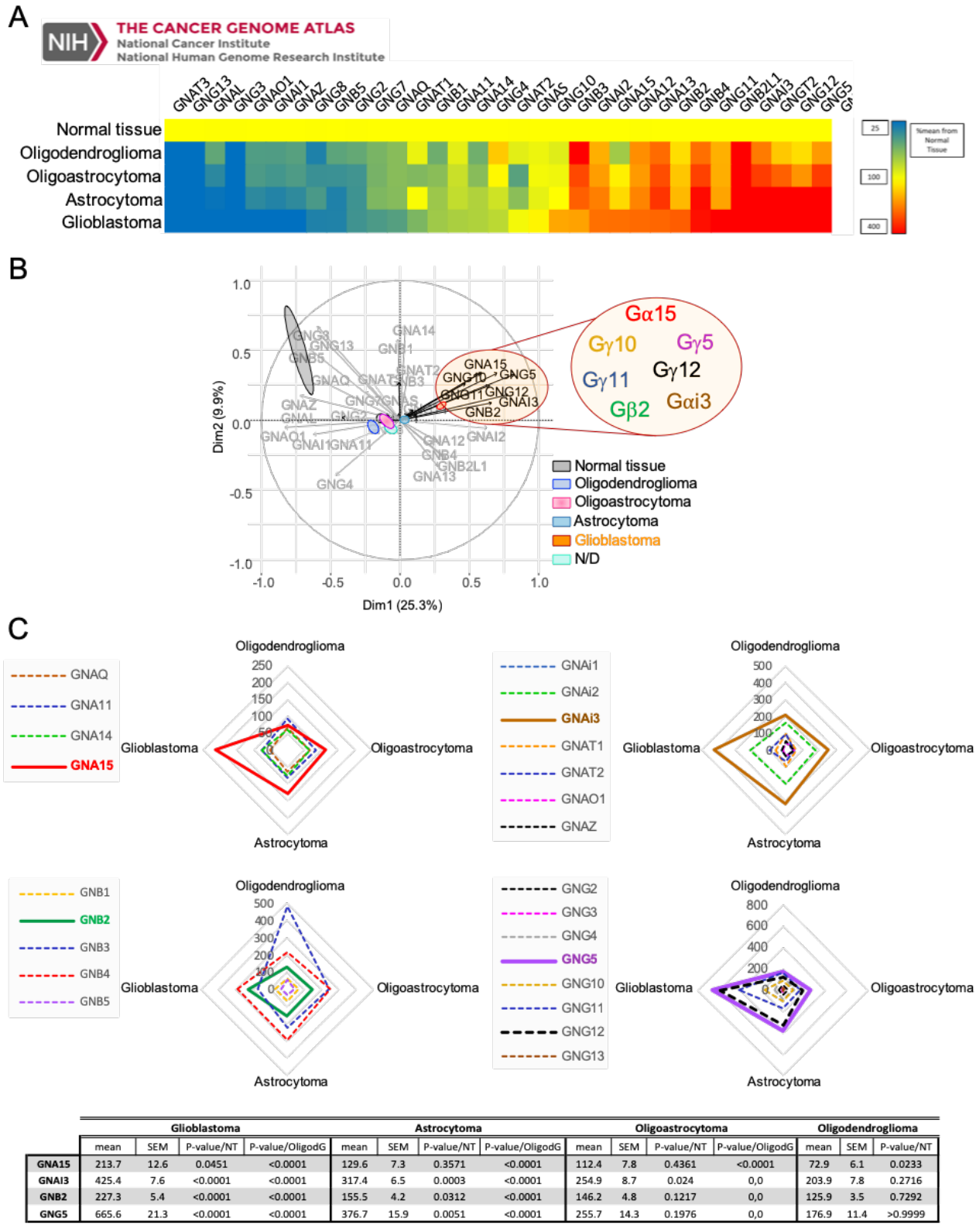
Figure 14. Gα15 regulate transmembrane N-cadherin translocation. Immunofluorescence analysis of the N-cadherin in 8MG cells transfected with siRNA directed against GNA15 (**A**) and Gα15-stably overexpressing U87MG and 8MG cells (pLentiGNA15) (**B**). siGNA15 or control siRNA transfected cells and Gα15-overexpressing cells were seeded in 24-well plates containing fibronectin-coated coverslips for 24 h before fixation and labelling with an anti-N-cadherin antibody. The nuclei (blue) were counterstained with DAPI. Scale bars indicate 25 µm. White squares on the pictures illustrate the specific cell area enlarged on the right panel (zoom). Merge images which allowed visualization of N-cadherin (red) were analyzed in confocal microscopy by successive image acquisition and transmembrane N-cadherin intensity was quantified using imageJ software (bar graphs). The data represent mean ± SEM from one representative experiment. Statistical significance was evaluated using a Mann and Whitney test; **p < 0.01; ***p < 0.001.

Figure 15. Impact of Gα15 on glioblastoma progression *in vivo*. NMRI *Nude* mice were implanted intrastrially with Gα15-KO clones or pLentiGNA15 cells as well as the respective control cells (**A**). The orthotopic xenografted mice survival was monitored to evaluate the effect of Gα15 disruption (**B**) or overexpression (**C**) on tumor growth *in vivo*. Animal survival was analyzed using the log-rank test for statistical comparison, median survival: U87 control, 44 days; Gα15-KO 26-1, 60 days; Gα15-KO 26-2, 57 days; Gα15-KO 26-6, 84 days; the median survival of U87 pLentiControl is 61 days *vs* 50 days for pLentiGNA15.

Figure 16. Gα15 regulates GBM cells migration through FA complexes formation and actin cytoskeleton remodeling. This hypothetical scheme summarizes the signaling profiles regulated by Gα15 to stimulate actin polymerization and FA mainly in the back of cell, in the lamellipodia and filopodia at cell leading edge, of motile and migrating cells. Small GTPases RhoA, Rac and Cdc42 as well as FA proteins paxillin and vinculin are the main actors regulated by Gα15 via different potential pathways (see the text and Figure for more details) to promote GBM cells motility/migration. Akt: or PKB, protein kinase B; Cdc42: cell division cycle 42; DAG: diacylglycerol; DOCK180: or DOCK1, dedicator of cytokinesis 1; ERK: extracellular signal-regulated kinases; IP3: inositol trisphosphate; MEK: MAPK/ERK kinase; mTORC2: mammalian target of rapamycin complex 2; FAK: focal adhesion kinase; NF-κB: Nuclear factor-kappa B; PKC: protein kinase C; PIP2: phosphatidylinositol bisphosphate; PI3K: Phosphoinositide 3-kinase; PIX: proteins p21-activated kinase interacting exchange factor α, β; PLC: Phospholipase C; PYK2: proline-rich tyrosine kinase-2; p63RhoGEF: p63 Rho G protein exchange factor; Rac1: Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1; Raf-1: V-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1; RhoA: Ras homolog gene family, member A; ROCK: Rho-associated protein kinase; STAT: signal transducers and activators of transcription.

Legend to supplementary figure

Figure S1. Effect of G protein-downregulation on cell adhesion and migration properties. Using specific shRNA, the downregulation of Gα15, Gαi3, Gβ2 and Gγ5 in 42MG and U87 cells was performed to test the impact on cell adhesion and migration compared with the control shRNA. (**A**) Transwell migration assay was performed to evaluate the effect of G protein-downregulation on cell migration. G protein downregulated cells were loaded in the upper chamber of transwells in serum-free medium, the same medium was added to the bottom well. After 24 h, cells migrating onto the lower surface of the membrane were fixed, stained and counted. The number of migrated cells was evaluated by counting cells in all the membrane surface (20 fields at least). Bar graph represents mean ± SEM obtained from one representative experiment in quadruplicate normalized to the shControl cells. Statistical significance was evaluated using a Mann and Whitney test; ns, not significant; *$p < 0.05$; **$p < 0.01$; ***$p < 0.001$. (**B**) Immunofluorescence analysis of the number of phospho-paxillin-enriched (P-paxallin) focal adhesion (FA) points labeled with an antibody directed against P-paxillin in 42MG downregulated cells. Cells were seeded in 24-well plates containing fibronectin coated coverslip for 24 h then starved for 2 h with DMEM without serum. After fixation and labelling with an anti-P-paxillin antibody, the area of P-paxillin enriched dots per cell was quantified from confocal images by successive image acquisition. FA points were divided into three groups according to their size (green, 5–20 $pixel^2$; blue, 20–40 $pixel^2$; red, > 40 $pixel^2$), illustrated on the images of FA area analysis. The green fluorescence corresponds to GFP and nuclei (blue) were counterstained with DAPI. Stacked bar represents the number of FA points per area interval from one representative experiment. Statistical significance was evaluated using a Mann and Whitney test; ns, not significant; *$p < 0.05$; **$p < 0.01$.



	Glioblastoma				Astrocytoma				Oligoastrocytoma				Oligodendroglioma		
	mean	SEM	P-value/NT	P-value/OligodG	mean	SEM	P-value/NT	P-value/OligodG	mean	SEM	P-value/NT	P-value/OligodG	mean	SEM	P-value/NT
GNA15	213.7	12.6	0.0451	<0.0001	129.6	7.3	0.3571	<0.0001	112.4	7.8	0.4361	<0.0001	72.9	6.1	0.0233
GNAI3	425.4	7.6	<0.0001	<0.0001	317.4	6.5	0.0003	<0.0001	254.9	8.7	0.024	0,0	203.9	7.8	0.2716
GNB2	227.3	5.4	<0.0001	<0.0001	155.5	4.2	0.0312	<0.0001	146.2	4.8	0.1217	0,0	125.9	3.5	0.7292
GNG5	665.6	21.3	<0.0001	<0.0001	376.7	15.9	0.0051	<0.0001	255.7	14.3	0.1976	0,0	176.9	11.4	>0.9999

Figure 1, Dembélé et *al.*

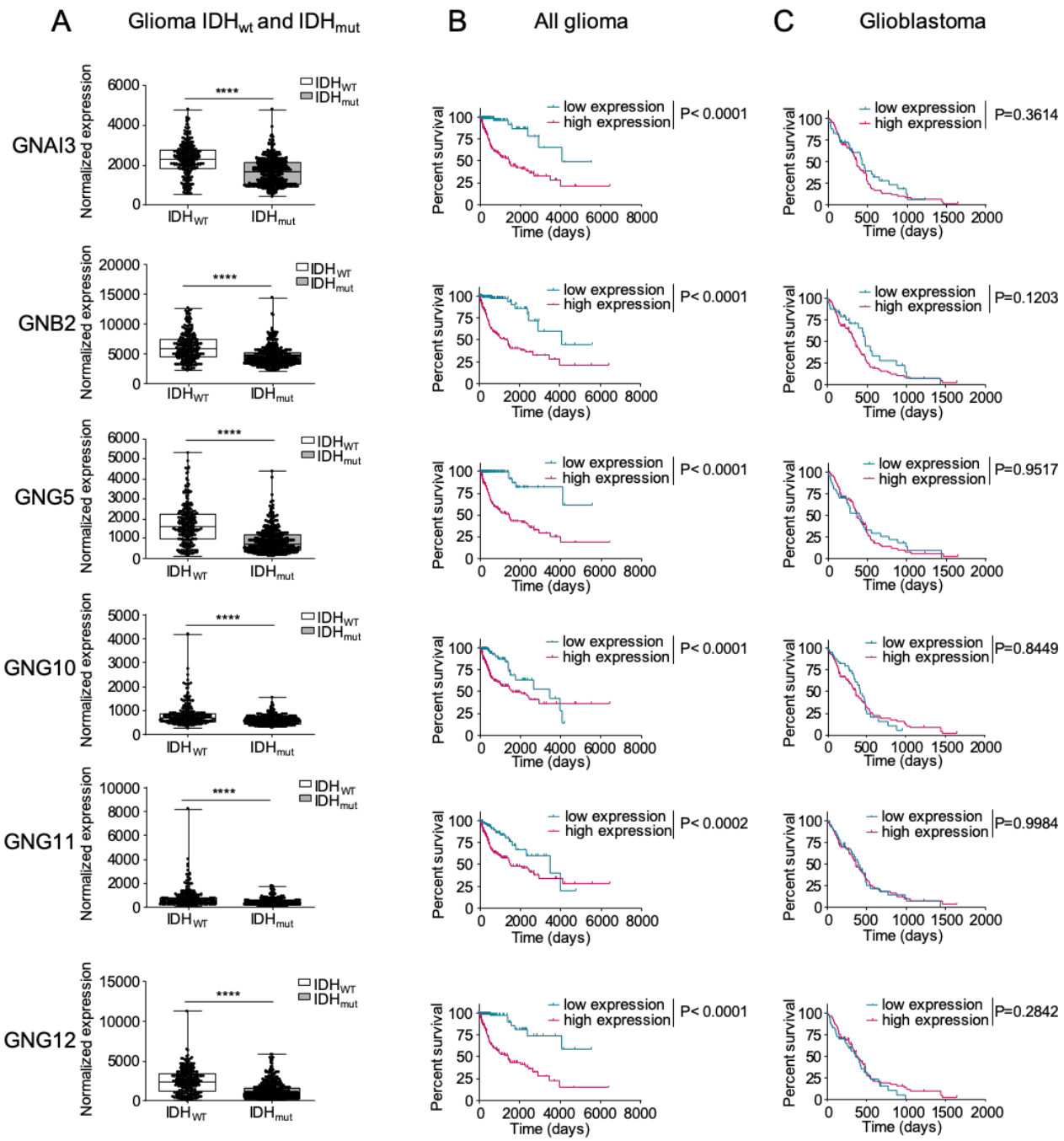


Figure 2, Dembélé *et al.*

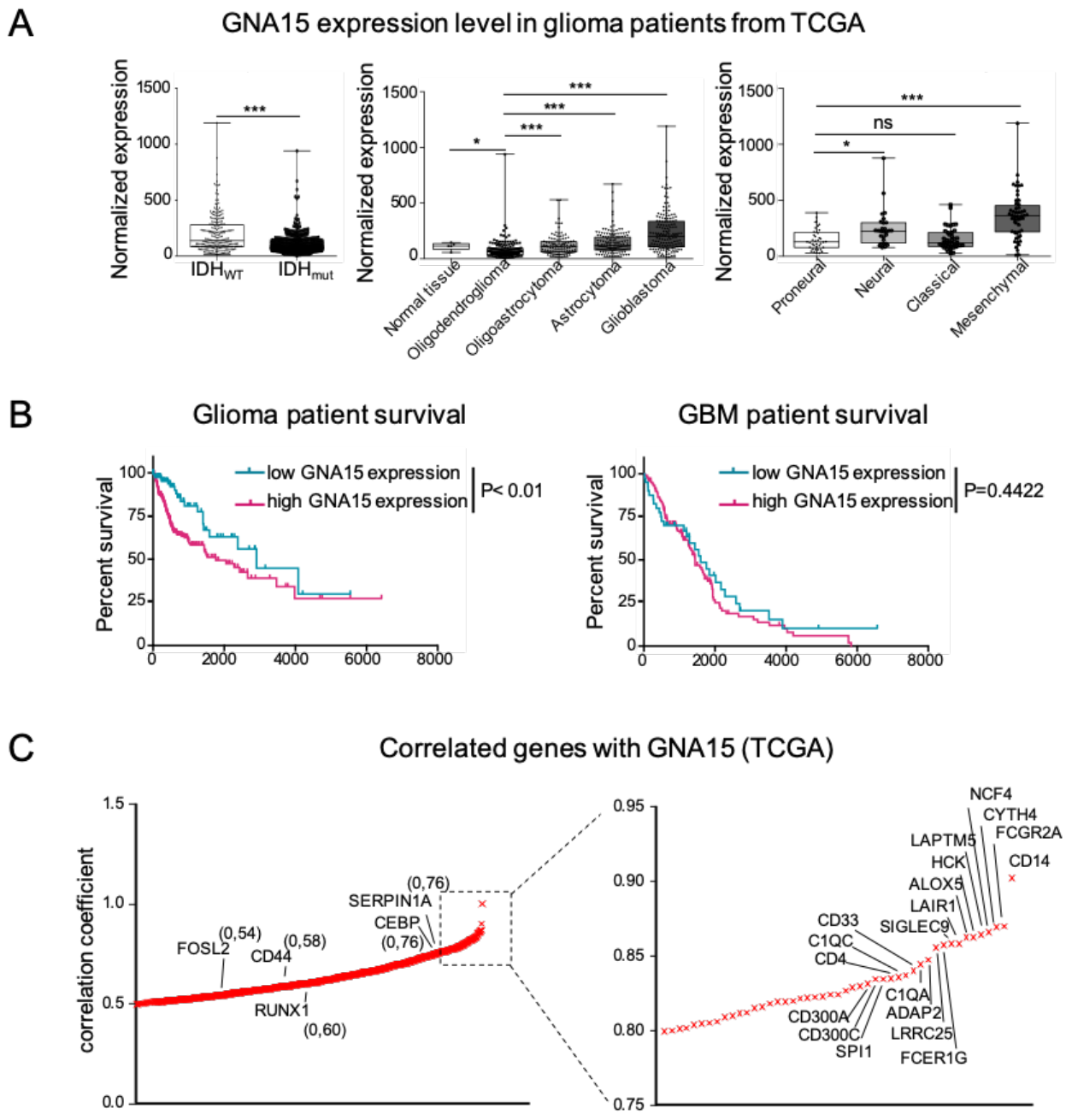


Figure 3, Dembélé et *al.*

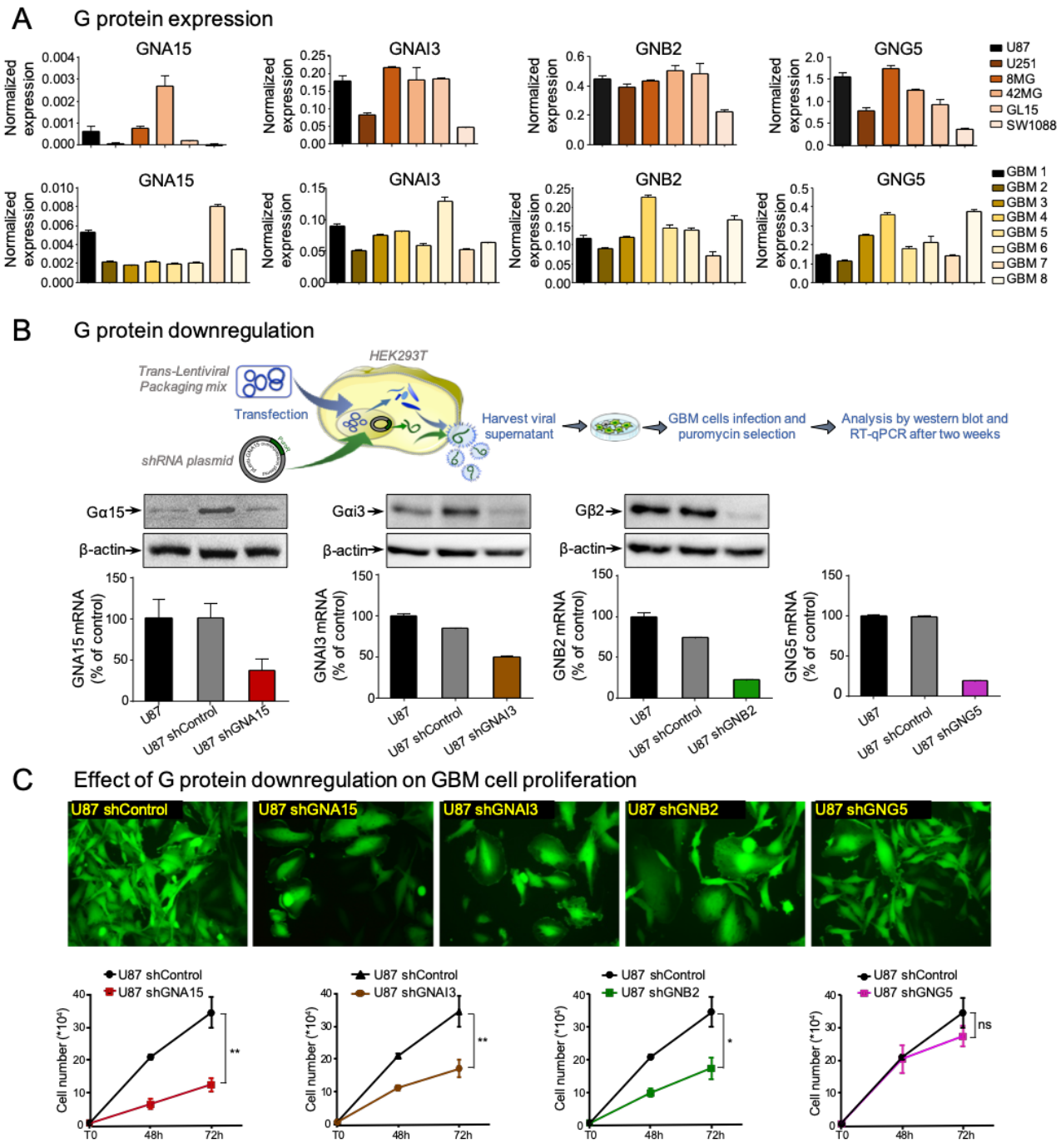


Figure 4, Dembélé et *al.*

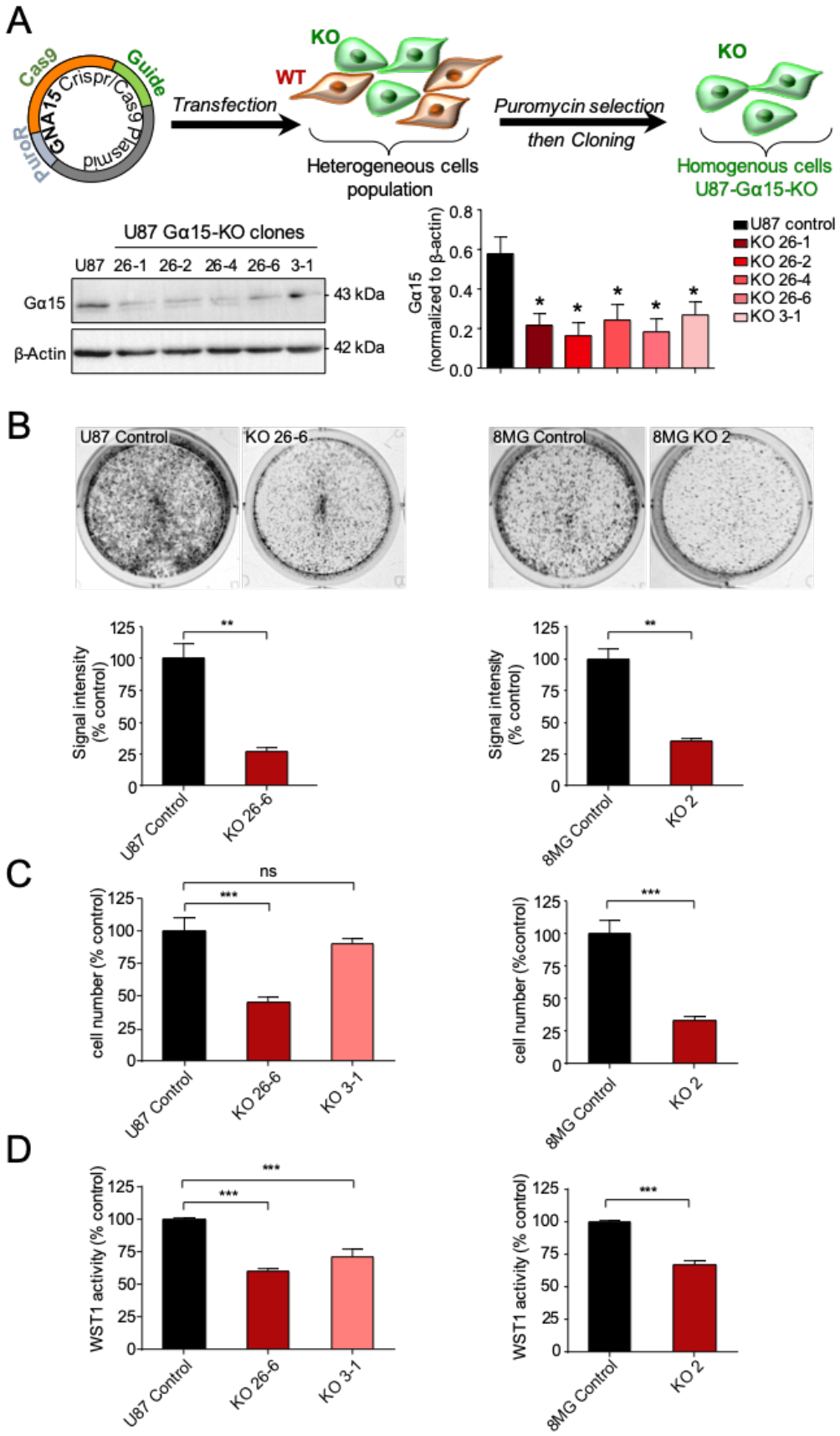


Figure 5, Dembélé et *al.*

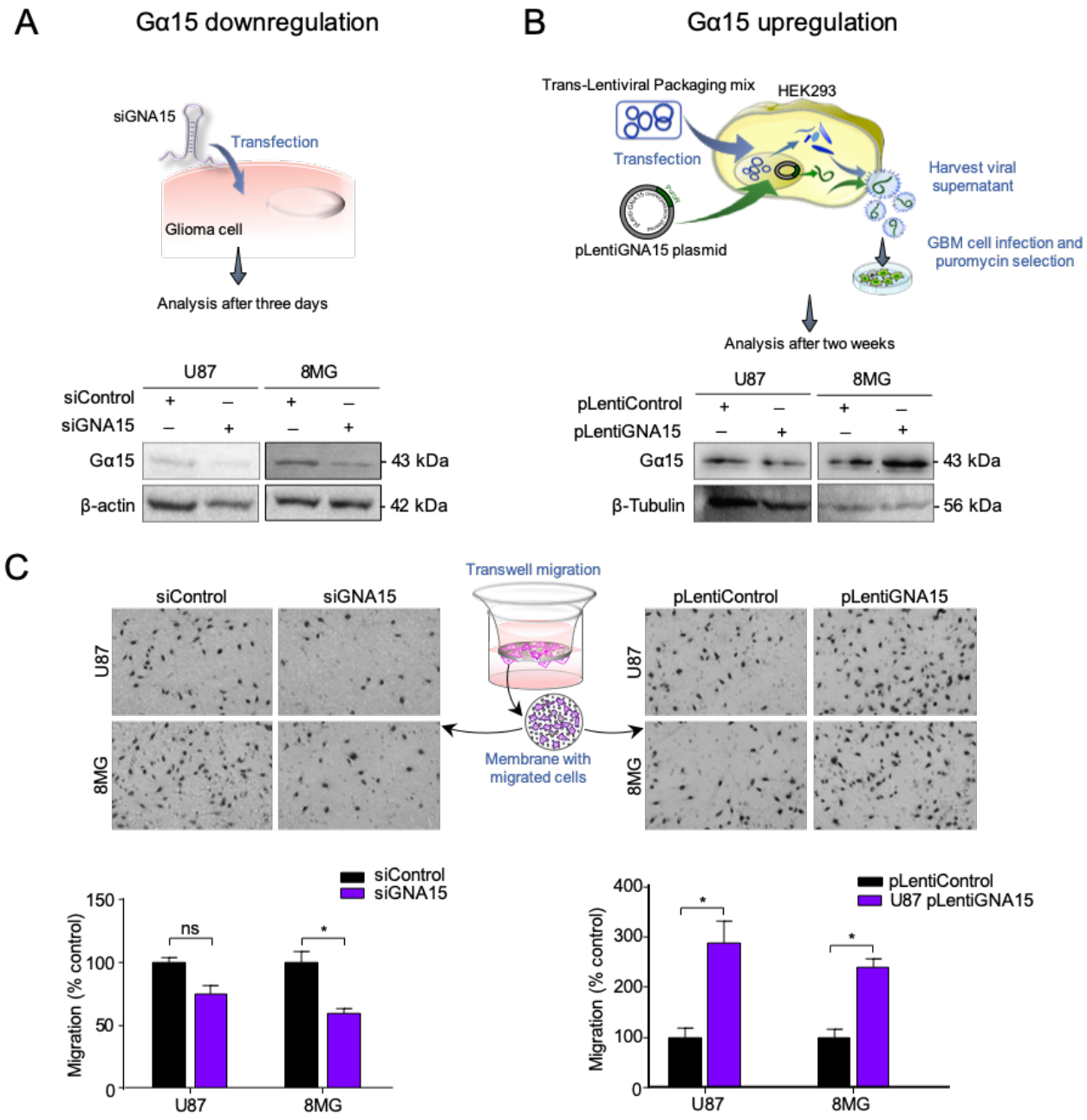


Figure 6, Dembélé et *al.*

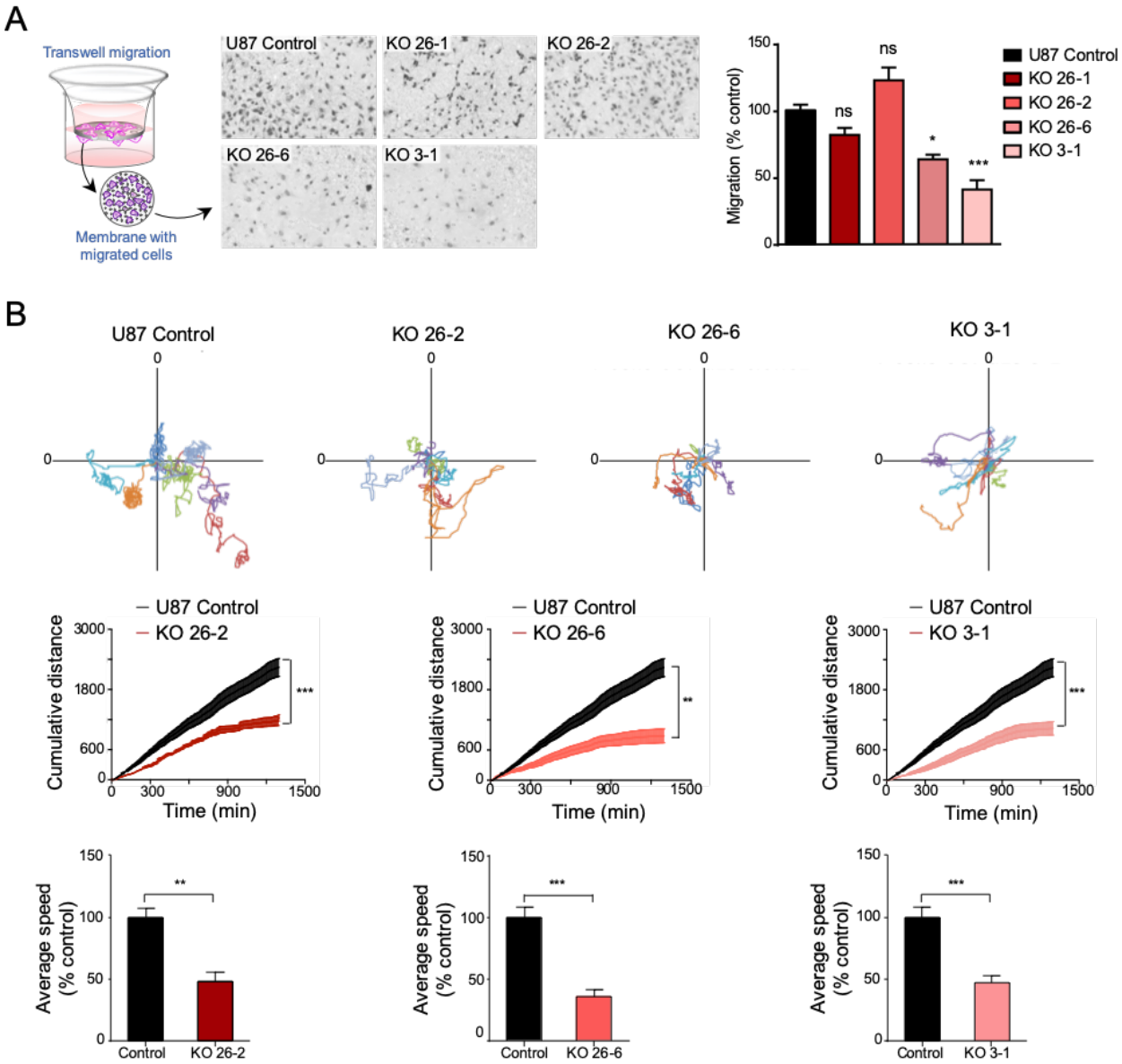


Figure 7, Dembélé et *al.*

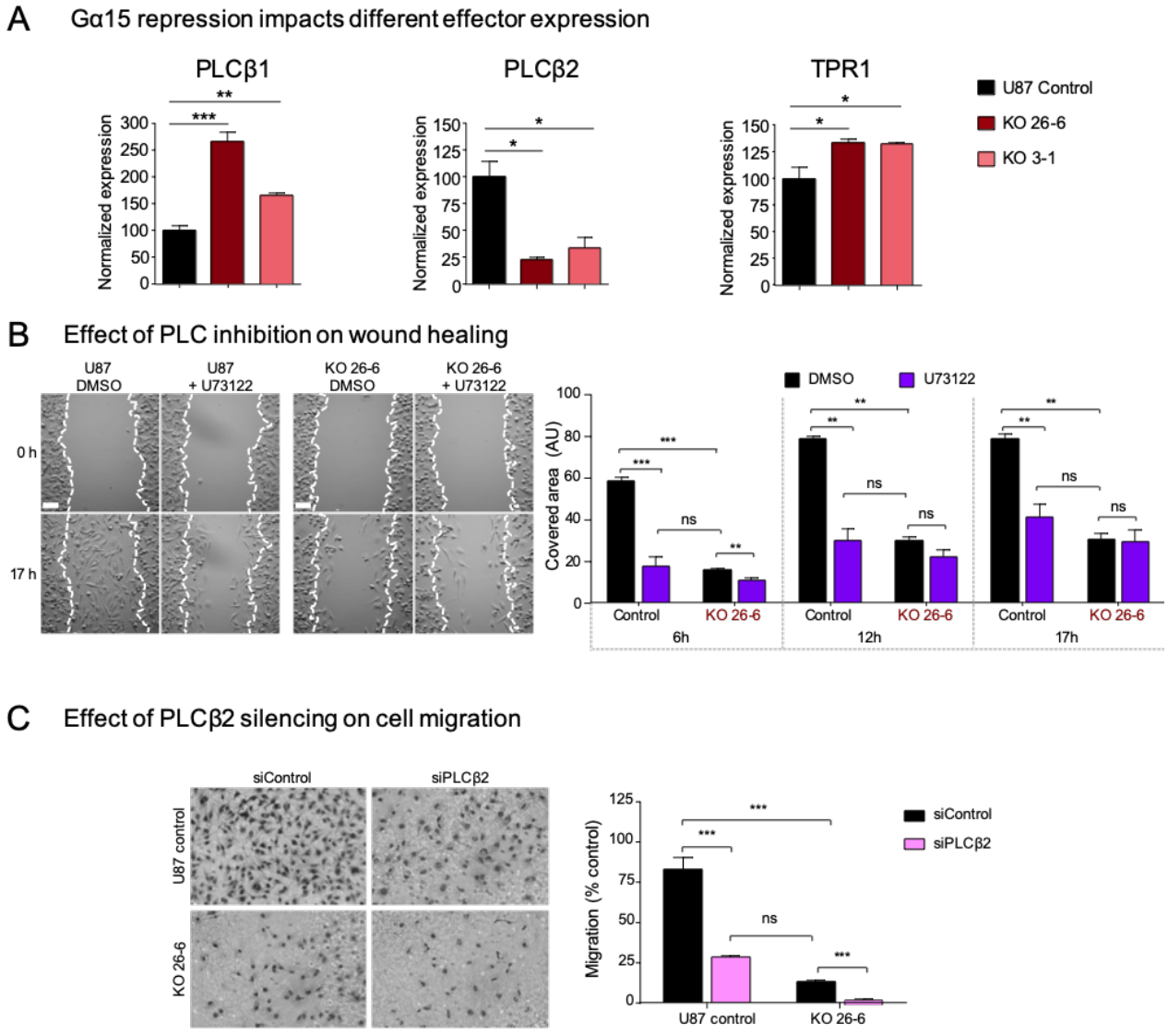


Figure 8, Dembélé et *al.*

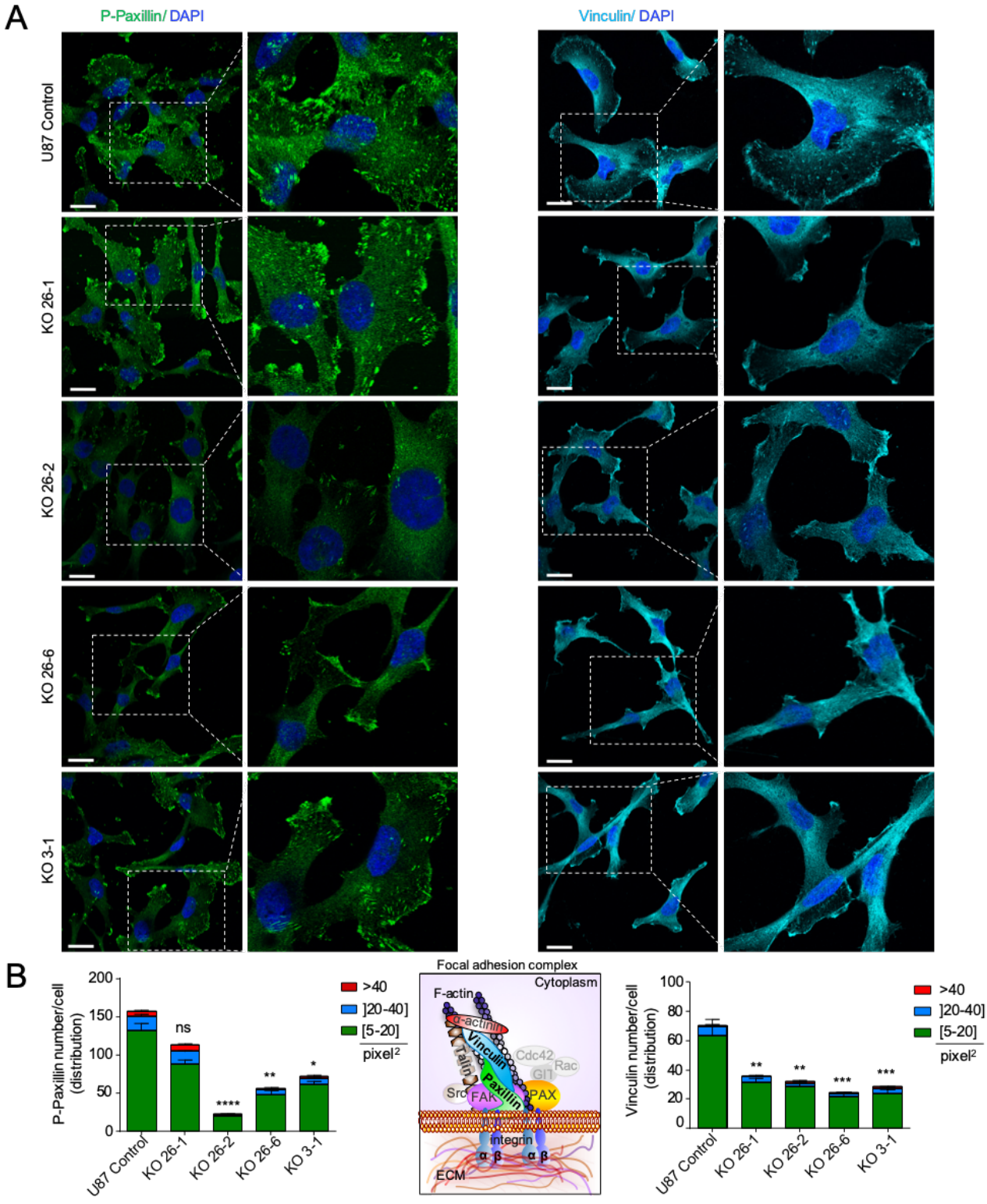


Figure 9, Dembélé et *al.*

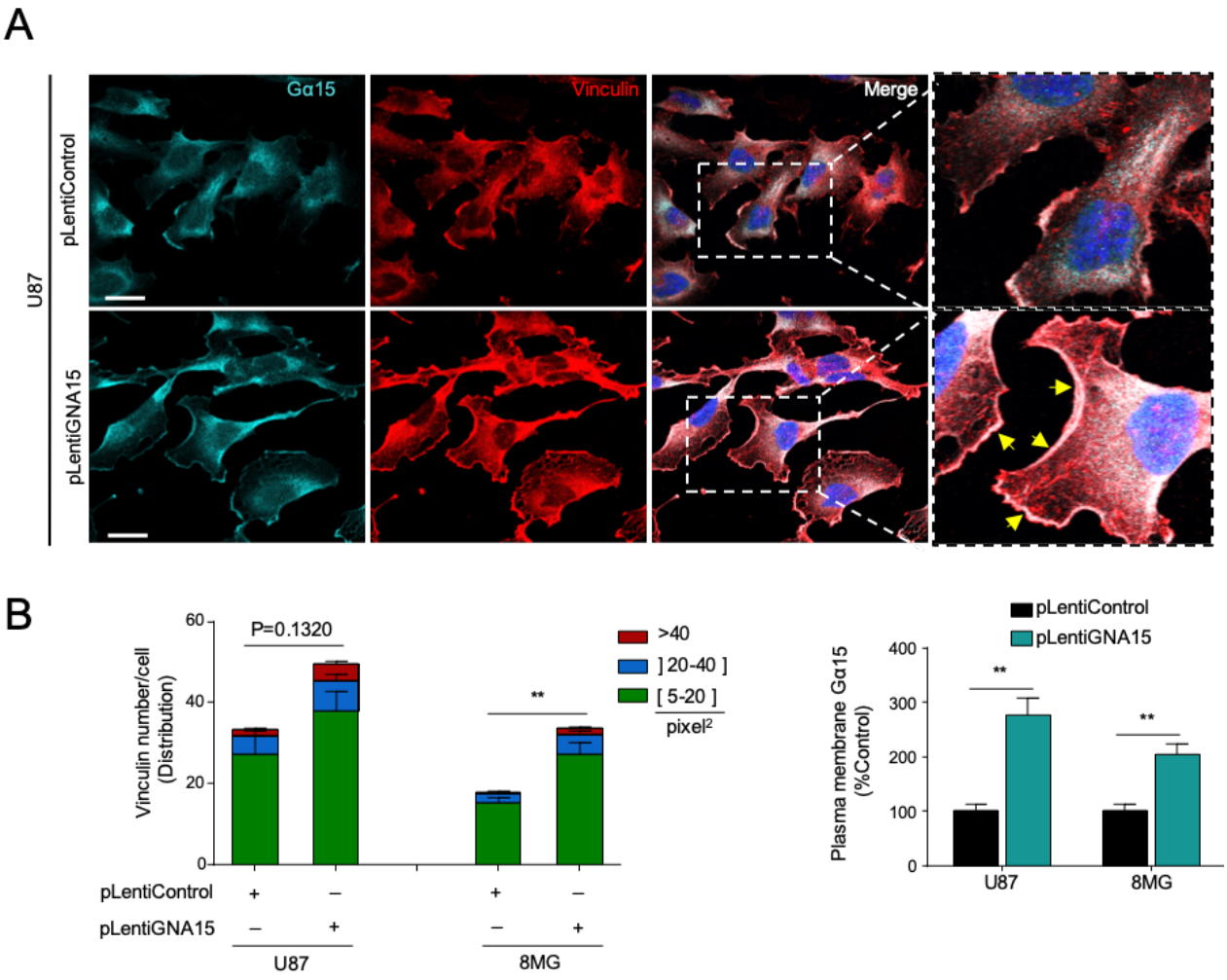


Figure 10, Dembélé et *al.*

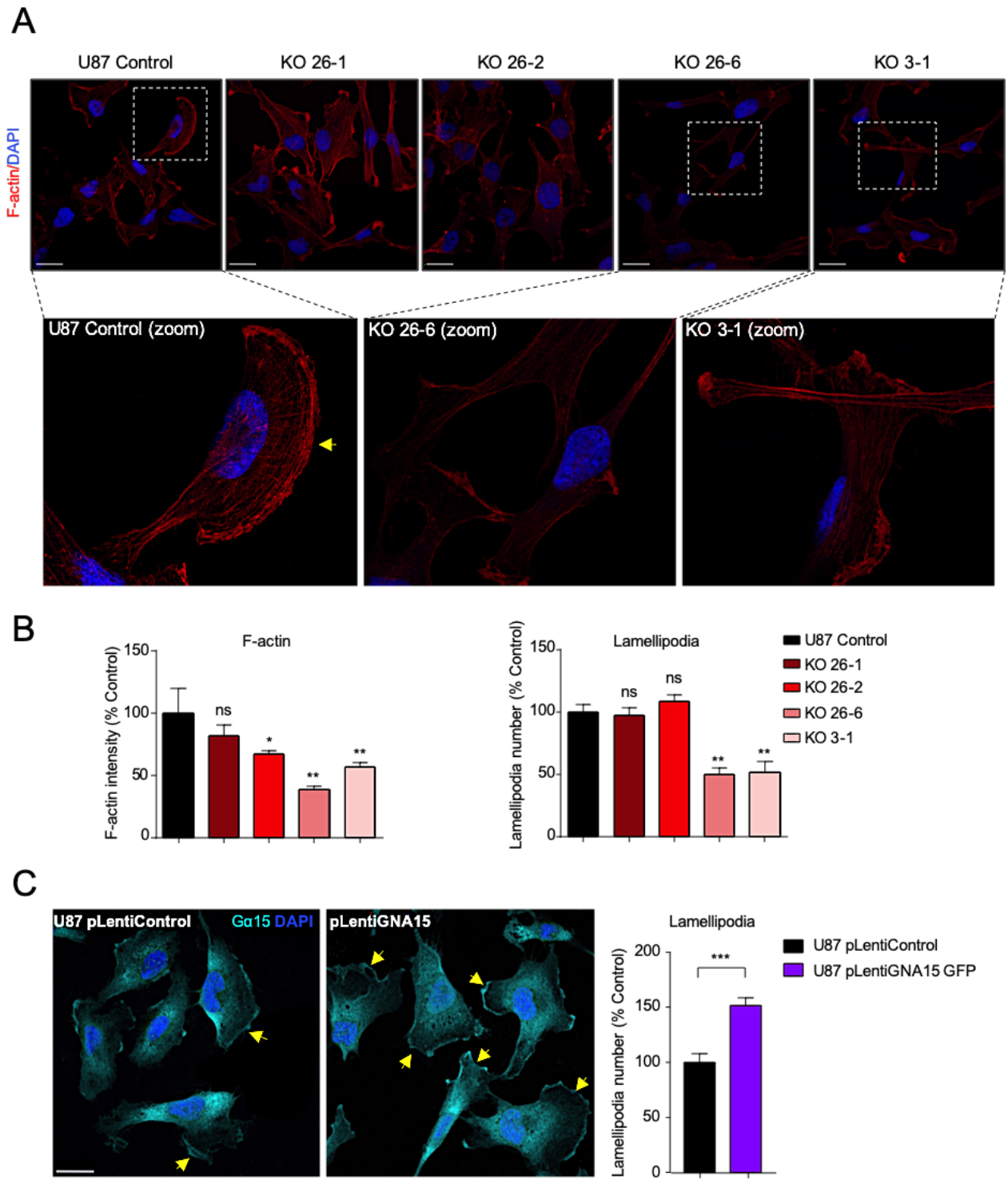


Figure 11, Dembélé et *al.*

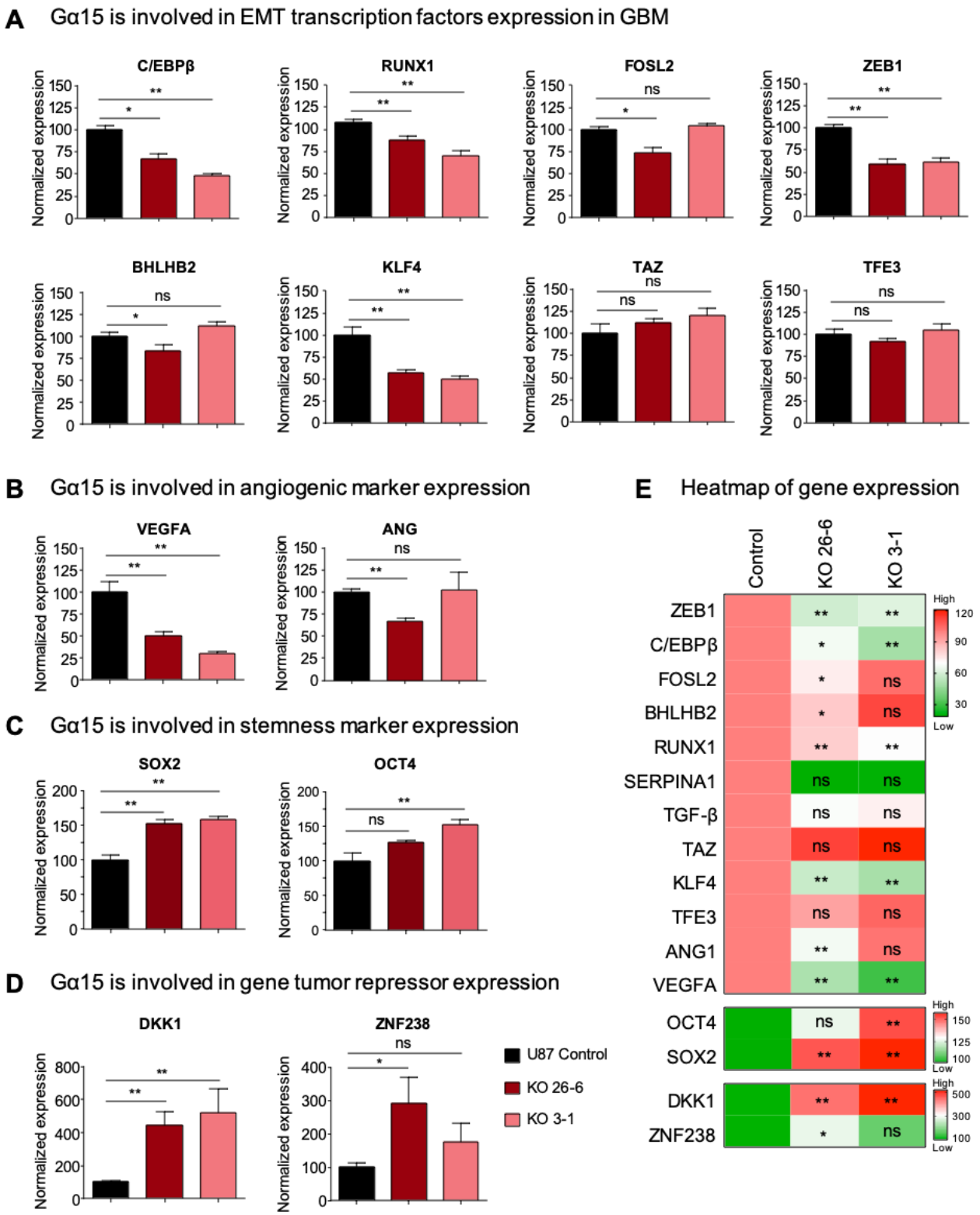


Figure 12, Dembélé et *al.*

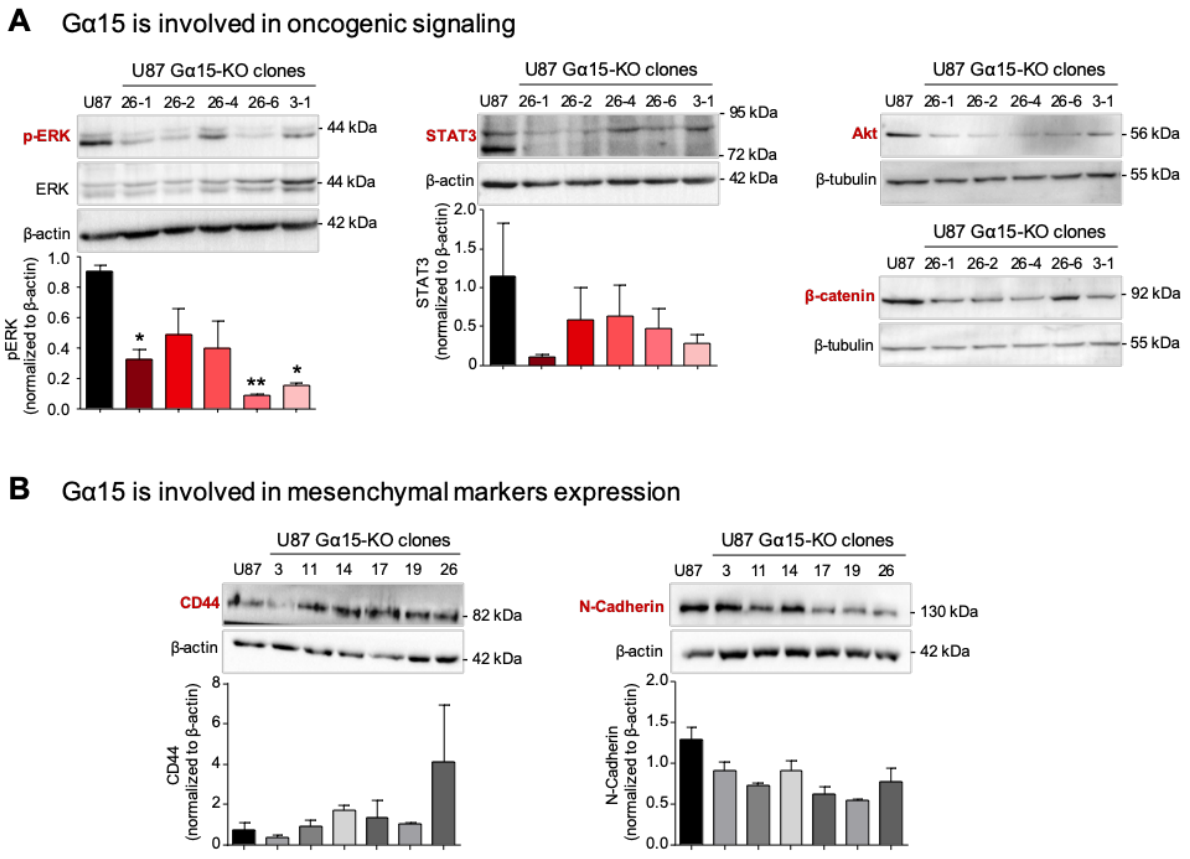


Figure 13, Dembélé *et al.*

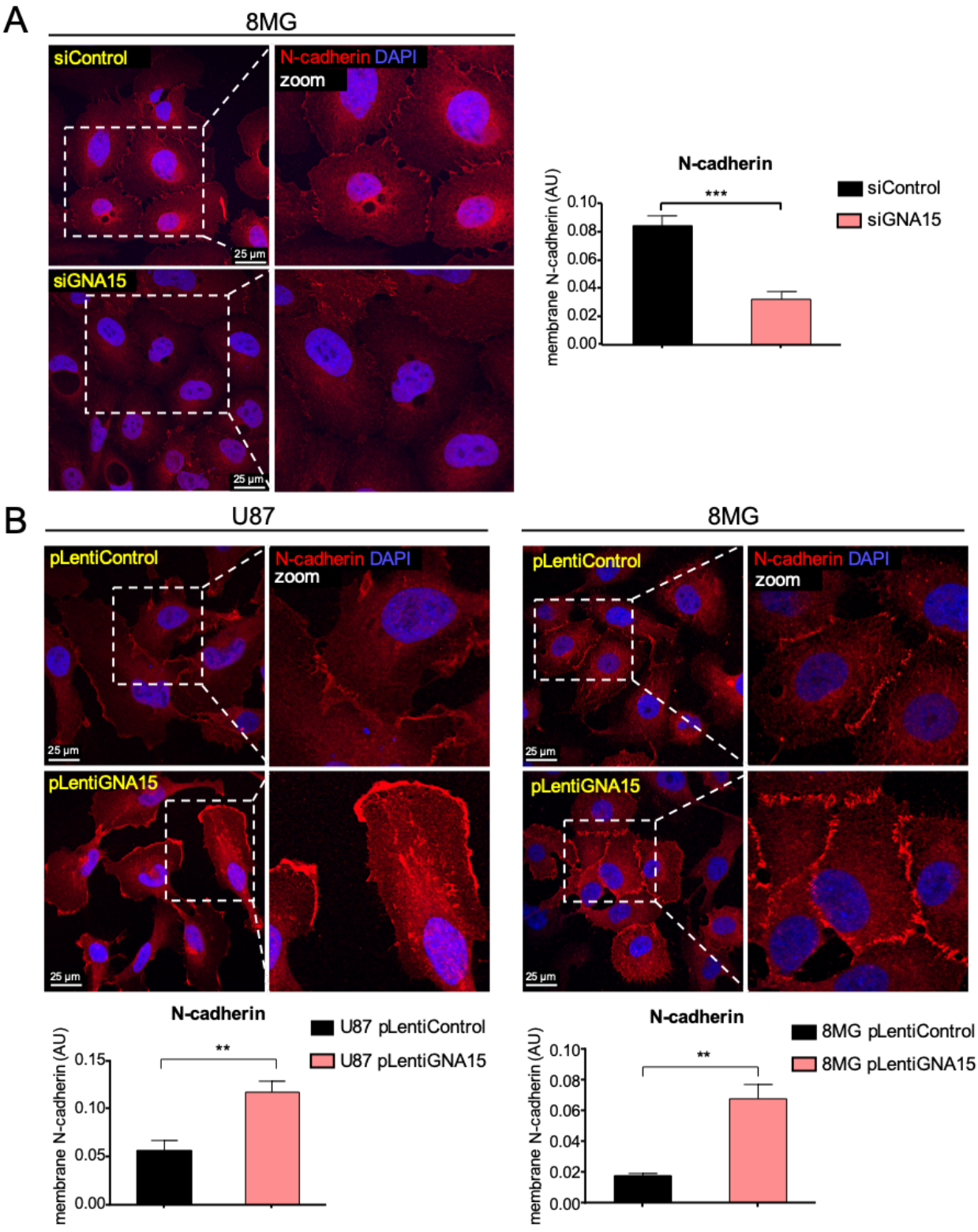
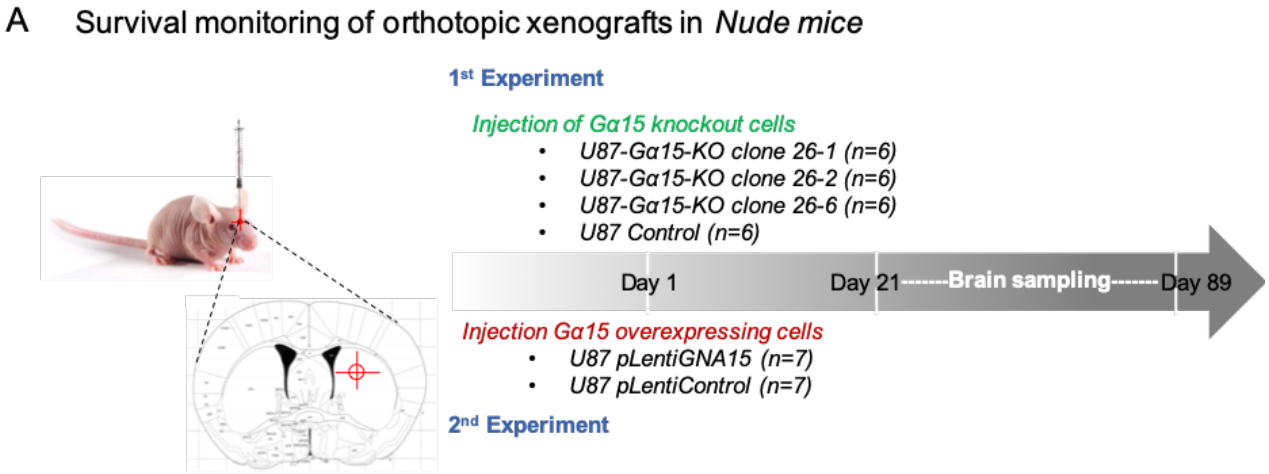
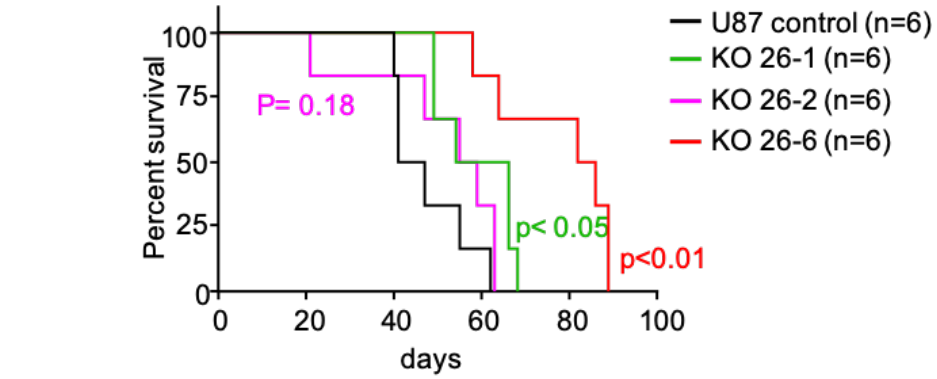


Figure 14, Dembélé et *al.*





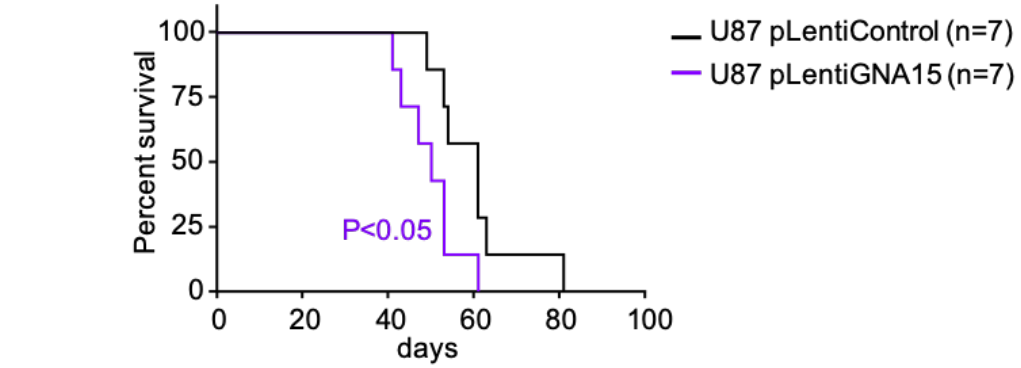


Figure 15, Dembélé *et al.*

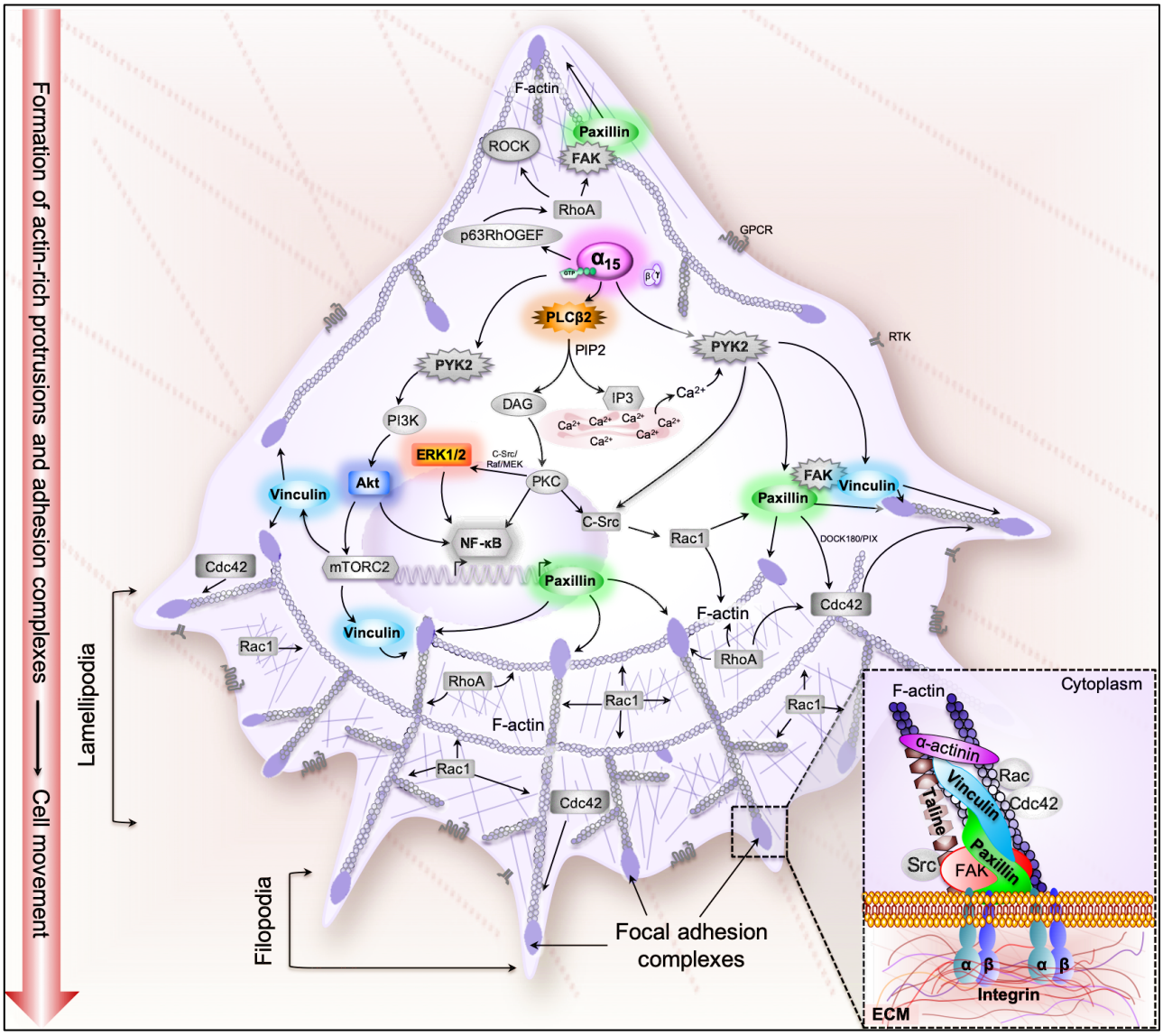


Figure 16, Dembélé et *al.*

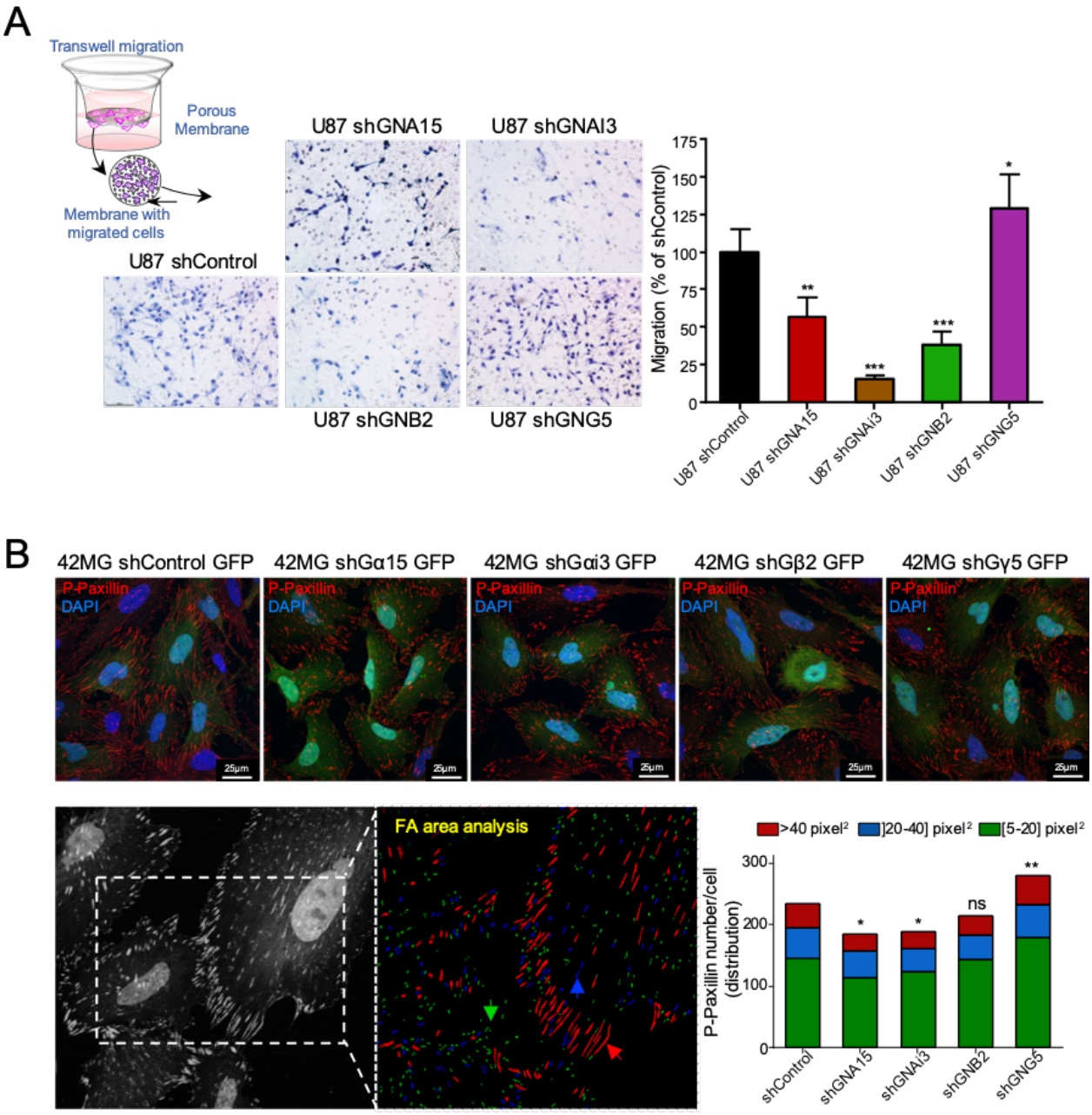
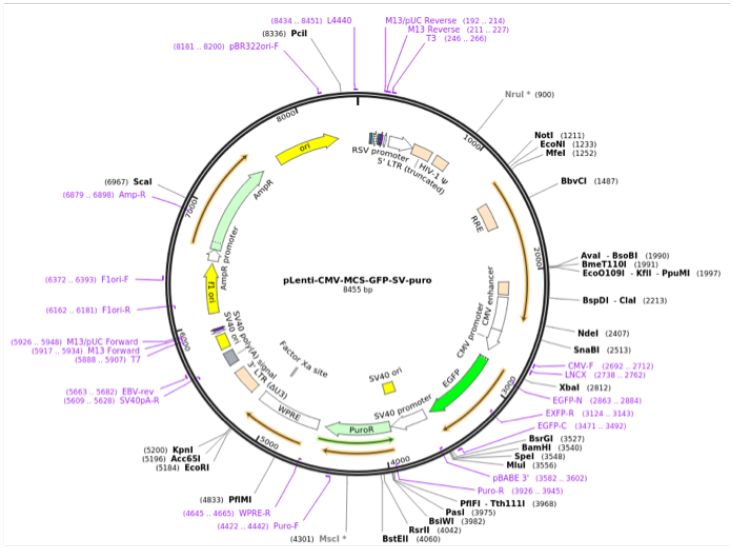


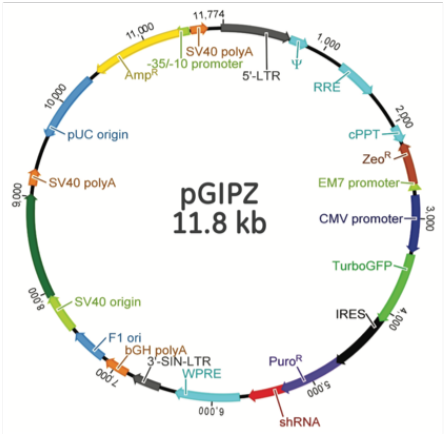
Figure S1, Dembélé *et al.*

Appendix

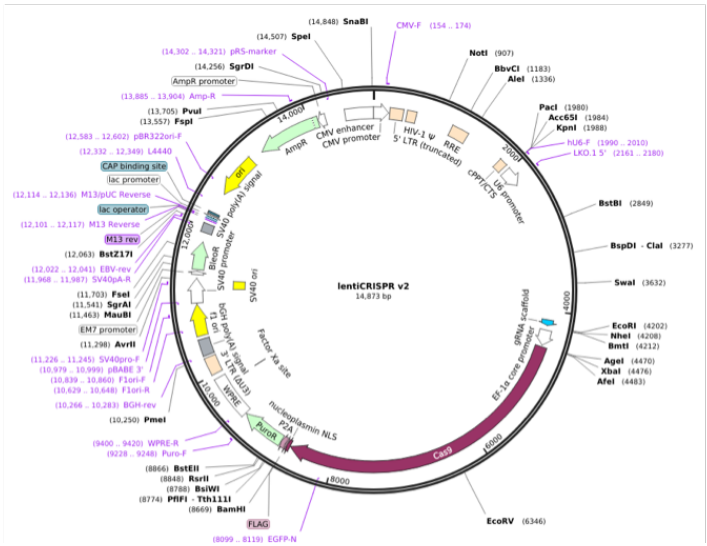
A



B



C



Appendix, Dembélé et *al.*

Discussion

Un nombre limité de recherches antérieures a porté sur l'étude des niveaux d'expression et/ou de la fonction des sous-unités Gα mais surtout Gβγ, dans des conditions physiologiques et pathologiques, en particulier dans le cancer. Il a été démontré que certains RCPGs sont largement impliqués dans la tumorigenèse, l'angiogenèse et les processus métastasiques, ainsi que dans le développement des gliomes (Castel et al., 2017; De Francesco et al., 2017; Wu et al., 2019), soulignant que l'expression et l'activation aberrantes des RCPGs ainsi que de leurs principaux effecteurs intracellulaires constituent de potentielles cibles thérapeutiques pour le développement de nouvelles thérapies contre la résistance aux traitements et les mécanismes d'invasion/métastase. Dans le GBM, les RCPGs et en particulier les RCPGs chimiotactiques et leurs ligands respectifs, par exemple les récepteurs CXCR4/SDF-1, mais aussi UII/UT ou LPA1/LPA jouent un rôle majeur dans l'acquisition d'un phénotype agressif conduisant à la migration in vitro et/ou à l'invasion du parenchyme cérébral in vivo dans des modèles précliniques (Yadav et al., 2015; Malchinkhuu et al., 2005; Le Joncour et al., submitted). Aussi, les niveaux d'expression de CCR5 sont corrélés au grade des gliomes, et sa surexpression est associée à de faibles taux de survie pour les patients atteints de GBM (Zhao et al., 2015). Beaucoup d'autres RCPGs de chimiokines sont également surexprimés dans les GBMs, tels que CCR2A (Vakilian et al., 2017), CCR3 (Kouno et al., 2004), CX3CR1 (Sciumè et al., 2010), CXCR1 et CXCR2 (Desbaillets et al., 1997), et leur surexpression est généralement associée à l'exacerbation des propriétés invasives des cellules de GBM. Il a été démontré que d'une part, ces types de récepteurs chimiotactiques via le couplage à la sous-unité Gαi, activent les voies de signalisation PI3K et MAPK contribuant ainsi au chimiotactisme, à la migration cellulaire ou à la sécrétion de diverses MMPs conduisant à l'invasion (Otsuka and Bebb, 2008; Lecointre et al., 2015; Le Joncour et al., submitted) et que d'autre part, ces RCPGs couplent les sous-unités Gα12/13 pour activer la kinase Rho/ROCK conduisant à la contraction membranaire et au mouvement cellulaire (Yagi et al., 2011; O'Hayre et al., 2014; Lecointre et al., 2015). De fait, il existe un large éventail d'outils pharmacologiques ciblant les RCPGs de chimiokines tels que des inhibiteurs/antagonistes de CXCR4 pour contrecarrer le développement d'un certain nombre de cancers, mais à l'heure actuelle leur efficacité n'est pas prouvée. En particulier, des inhibiteurs/antagonistes du CXCR4 sont testés dans plusieurs essais cliniques chez des patients atteints de GBM nouvellement diagnostiqués ou récurrents (Access Number: NCI2013-02012) et son association à une chimiothérapie est aussi proposée dans le cadre d'un essai clinique de

phase I/II sur des GBM récidivants (*Access number: NCT02765165*), mais jusqu'à présent, aucune amélioration majeure n'a été décrite.

La redondance d'expression des RCPG chimiokines permettant l'activation des mêmes voies de malignités dans les GBMs, suggère que le ciblage d'un de ces RCPGs ne serait pas suffisant pour inhiber le caractère invasif et résistant des GBMs.

1. Les RCPGs de chimiokines et protéines Gα, β ou γ dans les GBMs

La redondance de l'expression et des fonctions des RCPGs observée dans de nombreux cancers en général, et dans les GBMs en particulier, nous a incité à rechercher le rôle des principaux premiers effecteurs relayant la signalisation des RCPGs, que sont les protéines Gα, Gβ and Gγ dans les gliomes. Ainsi, nous avons d'abord analysé à partir de la base de données américaine *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), le profil d'expression des 31 sous-unités de types Gα, Gβ and Gγ humaines à partir des données quantitatives de RNAseq disponibles dans la base et pour les différents grades de gliome. La distribution relative de ces sous-unités au sein des différents groupes révélée sous forme de *Heatmap* et en composante principale (PCA, *Principal Composant Analysis*), a permis d'établir que ces différentes classes de sous-unités peuvent constituer des signatures clés du grade des gliomes et de malignité. Il a été déjà rapporté des dérégulations du niveau d'expression de certaines protéines G dans un nombre limité de cancers, qui sont souvent associées à un processus oncogénique et une progression tumorale comme présentés dans l'introduction (Chapitre 2, § 7) (O'Hayre et al., 2014; Iglesias-Bartolome et al., 2015; Syrovatkina et al., 2016; Z Zhang et al., 2018). Ici, les données d'expression des 31 protéines G dans du tissu cérébral humain normal et dans des gliomes de différents grades, associées aux informations cliniques des patients, révèlent un panel de protéines G spécifiquement associé au tissu cérébral sain et aux gliomes de bas grade principalement oligodendrogliomes, ainsi qu'aux gliomes de haut-grade, avec les niveaux d'expression les plus élevés pour les gènes des sous-unités GNA15 (Gα15), GNA12 (Gα13), GNAI3 (Gαi3), GNB2 (Gβ2), GNG5 (Gγ5), GNG10 (Gγ10), GNG11 (Gγ11) and GNG12 (Gγ12) dans les GBMs. Ces données sont retrouvées dans l'analyse par PCA, qui montre que les gènes codant les sous-unités Gα15, Gαi3, Gβ2, Gγ5, Gγ10, Gγ11 et Gγ12, constituent une signature spécifique des GBMs, suggérant leur rôle plus spécifique dans la malignité et l'agressivité des gliomes. On peut remarquer que les gènes GNA15, GNAI3 et dans une moindre mesure GNB2 et GNG5 apparaissent préférentiellement exprimés (*de novo*) dans le GBM par rapport aux autres gliomes, alors que GNB3 semble particulièrement spécifique des oligodendrogliomes.

Certaines de ces sous-unités surexprimées dans les GBMs pourraient en effet exercer des actions oncogéniques puisque qu'une étude a déjà montré que l'expression de mutants constitutivement actifs de GNA12 et GNA13, peut conduire à une transformation cellulaire (Ha et al., 2014; Muppidi et al., 2014). Plus spécifiquement, la sous-expression de Gα12 atténue radicalement la phosphorylation de CREB stimulée par le LPA, *via* un mécanisme dépendant de la voie Ras-ERK, conduisant à la prolifération de cellules cancéreuses de l'ovaire (Goldsmith et al., 2011; Ha et al., 2014). De plus, la sous-unité Gαi3 a déjà été décrite comme étant significativement surexprimée dans des prélèvements de gliomes humains et que son expression est associée à des surexpressions de l'EGFR, FGFR ou PDGFRα et à une hyperactivité de la voie Akt-mTOR (Z Li et al., 2016). Cette voie Gαi3/Akt-mTOR joue probablement un rôle dans la viabilité cellulaire, la capacité clonogénique des cellules de GBM et la résistance à l'irradiation (Z Li et al., 2016), suggérant un rôle oncogénique majeur de Gαi3 dans les GBMs. En revanche, l'expression et le rôle potentiel de certaines sous-unités Gβ or Gγ dans le cancer est moins clair mais fait l'objet de quelques études. Récemment, Yoda et al., (2015) ont démontré que de multiples mutations dans les sous-unités Gβ1 ou Gβ2 affectent l'interface de liaison à la sous-unité Gα ainsi qu'avec les effecteurs en aval, notamment les voies PI3K et mTOR, et confèrent une résistance aux inhibiteurs sélectifs des kinases dans les tumeurs myéloïdes (Yoda et al., 2015). Puisqu'un traitement *in vivo* avec double inhibiteur de PI3K/mTOR, inhibe la signalisation induite par les Gβ1 mutées et augmente considérablement la survie de souris dont la moelle osseuse est transplantée avec le mutant Gβ1, il est proposé que ce sont bien les complexes Gβ1/β2/γ qui relayent directement l'activation de la voie PI3k/mTOR tumorigène. En effet, l'implication du dimère Gβγ dans l'agressivité tumorale a été confortée récemment à travers les rôles de PI3K et P-REX1, un GEF spécifique de Rac (RacGEF) dans les voies contrôlant la motilité et la migration directionnelle dans la progression tumorale. De plus, la spécificité des complexes Gβγ issus de la sous-unité Gαi dans la réorganisation du cytosquelette, les protrusions cellulaires et la migration est maintenant fortement suggérée (Smrcka, 2008; Kehrl, 2016). En accord avec ces données, dans notre étude, nous confirmons la signature d'expression des protéines G spécifiques des GBMs, notamment Gα15, Gαi3, Gβ2 et Gγ5, dans différents échantillons de GBM et des lignées cellulaires de GBM, ainsi que la fonction fondamentale de ces protéines *via* des stratégies de sous-expression stable à l'aide de shRNAs, dans des lignées de GBM (U87 principalement). Nous démontrons que la surexpression des sous-unités de la signature en PCA des GBMs, et notamment Gαi3, constituent un marqueur de mauvais pronostic en termes de survie et de récidive. La sous-

expression de Gα15, Gαi3 ou Gβ2 réduit significativement la croissance et la migration en chambre de Boyden des cellules de GBM, associée à une diminution du nombre de points focaux d'adhésion démontrant le rôle majeur de ces sous-unités dans la migration directionnelle en l'absence des stimuli chimiotactiques. Ces résultats soutiennent fortement que les protéines G surexprimées, sont des nœuds clés contrôlant des voies de signalisation impliquées dans la croissance et la migration des GBMs de haut grade. En particulier, il faut repréciser que Gαi3 mais aussi Gαi1 sont significativement surexprimées dans les tissus de gliomes, et que l'expression de Gαi1 est corrélée à la sous-expression d'un miRNA anti-Gαi1 (miR-200a) qui en condition normale cible le 3'UTR de Gαi pour sous-exprimer cette GNAI, inactive Akt-mTOR et inhibe la prolifération des cellules de gliome (Y-Y Liu et al., 2018). De manière intéressante, nous observons une diminution drastique de l'expression de la sous-unité Gαs dans les gliomes de haut-grade. Or, l'une des protéines G les plus fréquemment mutées dans les cancers est la sous-unité Gα, responsable de l'inactivation de cette protéine G (O'Hayre et al., 2013). La suppression de Gαs dans les kératinocytes chez la souris est suffisante pour induire une carcinome basocellulaire *via* l'activation non canonique de GLI et de YAP-1 (Iglesias-Bartolome et al., 2015). Comme précédemment mentionné, cette fonction suppresseur de tumeurs de $G\alpha_S$ a aussi été décrite dans le médulloblastome dans lequel Gαs agit en inhibant la voie Shh *via* l'augmentation de l'AMPc (He et al., 2014). Ces données indiquent que la voie Gαi/βγ/PI3K joue un rôle déterminant dans l'agressivité des tumeurs cérébrales.

Ce domaine de recherche ouvre des perspectives importantes en termes d'élaboration d'inhibiteurs spécifiques de certaines sous-unités de protéines Gαi par exemple, Gβ et également Gγ, surexprimées dans les gliomes de haut grade, mais également dans d'autres cancers agressifs et métastatiques. Chez les patients atteints de gliomes de tout grade, nous avons établi à partir de courbes de survie globale (informations cliniques TCGA) que le niveau d'expression élevé des sous-unités Gαi3, Gβ2, Gγ5, Gγ10, Gγ11, Gγ12 et dans une moindre mesure Gα15, est un facteur significatif de mauvais pronostic. Le(s) rôle(s) de l'ensemble de ces sous-unités concomitamment surexprimées dans le GBM au détriment d'autres protéines G, soulève(nt) plusieurs questions. En effet, *i*) le rôle de Gα15 en général et vis-à-vis de l'activation des RCPGs n'est pas pleinement compris, en particulier dans le cancer, *ii*) des études fragmentaires suggèrent que toutes les combinaisons de sous-unités Gαβγ ne sont pas possibles et retrouvées et que *iii*) les protéines G ne sont pas seulement associées à la membrane plasmique, mais également à des composants intracellulaires, y compris le cytosquelette suggérant des rôles pléiotropes des protéines G. Ainsi, leurs mécanismes d'activation et

fonctions combinatoires dans le cancer et plus particulièrement dans le GBM restent à déterminer.

Notre attention s'est spécifiquement portée sur la sous-unité de la protéine G non-ubiquiste Gα15, un potentiel marqueur spécifique des GBMs puisqu'en effet, elle semble s'exprimer *de novo* dans les GBMs, et pourrait être impliquée dans leur agressivité et constituer une nouvelle cible thérapeutique. Comme pour les autres sous-unités de protéines G décrites précédemment, l'ARNm de la sous-unité Gα15 apparaît surexprimée ou nouvellement exprimée dans les GBMs d'après la classification anatomocytopathologique, et dans les gliomes IDHwt par rapport aux gliomes IDHmut si l'on tient compte de la classification moléculaire. Selon la classification de Verhaak qui distingue 4 sous-groupes de GBM, *i.e.* Neural (N), Proneural (PN), Classique (CL) et Mésenchymateux (MES), il apparait que c'est le sous-type de GBM MES qui montre plus spécifiquement une (sur)expression de Gα15, ainsi que le sous-type N, alors que ces niveaux de Gα15 ne permettent pas de distinguer l'ensemble des patients atteints de GBM, en termes de survie globale. De plus, il est intéressant de noter que les gènes dont la surexpression est corrélée à l'expression de Gα15 dans les GBMs sont pour beaucoup des marqueurs de transition mésenchymateuse, tels que les facteurs de transcription FOSL2, RUNX1, C/EBPβ, SERPINA1 ou des marqueurs de cellules souches de gliome (GSCs) tels que CD44, indiquant ainsi de potentielles voies de signalisation régulées ou associant Gα15, liées à la transformation mésenchymateuse des gliomes et, par conséquent, à l'invasivité et la résistance aux traitements des GBMs. Cette observation originale est en accord avec les observations d'une expression sélective de Gα15 dans les cellules hématopoïétiques murines au stade précurseur, bien que des études récentes montrent que l'expression de Gα15 ne peut pas être généralisée à toutes les cellules souches, mais peut chevaucher la présence du marqueur CD34 des populations de cellules souches et progénitrices hématopoïétiques (Giannone et al., 2010), puis semble disparaitre lors de la différenciation cellulaire. Son rôle dans la tumorigenèse est sous-tendu par des données de criblage fonctionnel à l'échelle du génome qui ont révélé que GNA15 est un important régulateur négatif de P53 (suppresseur de tumeurs) dans les leucémies (Kim et al., 2016). De même GNA15 s'est révélé, avec de nombreuses chimiokines pro-inflammatoires, comme étant l'un des gènes régulateurs du cancer de l'ovaire (Lu et al., 2017) et a été montré ainsi que 7 autres gènes CXCL5, CCL20, NMU, F2R, ANXA1, EDNRA, LPAR6, surexprimé dans des adénocarcinomes pancréatiques (Gu et al., 2019). Ces données suggèrent un rôle original et essentiel de Gα15 dans la progression tumorale associée à la prolifération et au statut souche des cellules tumorales et aux systèmes ligand/RCPG chimiokines.

Même si le mécanisme fonctionnel n'est pas toujours bien décrit dans ces cancers, globalement, les études proposent que l'expression ectopique de Gα15 dans des systèmes non hématopoïétiques doit être considérée comme un signe pathologique. Ainsi, il a été démontré que l'ARNm ainsi que la protéine de Gα15 sont fortement exprimés dans les cellules de tumeurs neuroendocrines gastro-entéro-pancréatique (GEP-NEN) et sont aussi détectables dans les échantillons cliniques (Zanini et al., 2015). En revanche, Gα15 est sous-exprimée dans de nombreuses lignées cellulaires de cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC) (Avasarala et al., 2013) et sa surexpression fonctionnelle à l'aide du mutant actif Gα15QL diminue significativement la prolifération cellulaire. Avasarala et ses collègues ont aussi établi l'importance de Gα15 en tant qu'effecteur essentiel en aval de la voie de signalisation non canonique de Wnt (Avasarala et al., 2013), suggérant des effets distincts en fonction du type de cancer étudié. Mais globalement, de nombreuses études ont démontré que l'expression de Gα15QL dans différentes lignées cellulaires induit d'abord l'activation de la PLCβ qui déclenche le clivage de PIP2 en IP3 et DAG, puis le recrutement de cascades de signalisation impliquant les voies PKC, ERK, STAT3 et NF-κB (Lo et al., 2003; Lo and Wong, 2006; Yang et al., 2001; Liu and Wong, 2004). Aussi, dans les GBMs, le degré d'agressivité est associé aux voies de la transition mésenchymateuse NF-κB et STAT3 (Carro et al., 2010), qui contrôlent l'angiogenèse, la résistance aux traitements et l'invasivité. Rappelons que Gα15 est capable d'interagir avec de nombreux RCPGs (Offermanns and Simon, 1995) tels que les récepteurs opioïdes DOR et KOR (δ- et *κ-opioid receptors*), dopamine D2, adénosine A1, α2-adrénergiques, de somatostatine SSTR-1 et SSTR-2, avec une perte de sélectivité combinée à une affinité élevée et la résistance atypique à la désensibilisation de ces RCPGs (Innamorati et al., 2009). Dans ce contexte, il est essentiel d'évaluer le rôle original de Gα15 dans les GBMs, et l'impact sur la signalisation de certains RCPGs, pour ouvrir la recherche vers de nouvelles stratégies de ciblage des GBM MES, voire des gliosarcomes.

2. La fonction pro-prolifération de Gα15

Les capacités prolifératives accrues sont des propriétés récurrentes des processus néoplasiques des tumeurs solides y compris les GBMs. Ici, nous avons établi que la sous-expression stable de Gα15 à l'aide de shRNA et le *knockout* (KO) avec la technologie CRISPR/Cas9 (U87 Gα15-KO clones 26-6, 3-1 ou 8MG clone 2) diminuent significativement le nombre et la viabilité des cellules de GBM en l'absence d'activation exogène des RCPGs. Cette observation *in vitro* expliquerait au moins en partie la survie prolongée importante de souris *Nude* xénogreffées avec les clones Gα15-KO 26-6 et 26-1 tandis que les souris

xénogreffées avec les cellules U87 exprimant Gα15 présentent une survie réduite. Des études antérieures ont déjà montré une régulation de la prolifération dépendante de Gα15 dans diverses situations physiologiques et pathologiques. L'expression de Gα15 dans les cellules hématopoïétiques par exemple, semble permettre une prolifération continue (Amatruda et al., 1991), alors qu'une diminution spécifique de son expression est associée à la différenciation granulocytaire et érythroïde (Tenailleau et al., 1997). Cet effet sur la prolifération semble être lié à la survie cellulaire, puisque parmi les membres de la famille Gαq/11, seule la surexpression de Gα15 favorise plus spécifiquement la survie des cellules vasculaires du muscle lisse vasculaire (Peavy et al., 2005), et favorise la prolifération en inhibant l'apoptose cellulaire dans les cellules cancéreuses SI-NEN (*small intestinal neuroendocrine neoplasia*) (Zanini et al., 2015). Ces mécanismes relayés par Gα15 dans cette lignée dépendent de l'activation de ERK1/2, couramment associé aux voies de signalisation de Gα15 (Lo et al., 2003; Su et al., 2009; Giannone et al., 2010) et de Akt dont la voie est également associée à la survie cellulaire et classiquement dérégulée chez les patients atteints de GBM de plus mauvais pronostic (X Li et al., 2016; Langhans et al., 2017; Lombardi and Assem, 2017). Nos résultats permettent ici de montrer que la régulation négative de Gα15 dans les cellules U87 de GBM entraîne une diminution de la forme activée de ERK1/2 (P-ERK1/2) ainsi que de l'expression de Akt dans des conditions basales de culture, suggérant que cette protéine Gα est un facteur clé contrôlant directement ou indirectement les cascades de signalisation impliquées au moins en partie dans la survie des cellules de GBM. En effet, la prolifération et le cycle cellulaire testés dans notre étude sur les lignées U87 et U87 KO pour Gα15, ne montrent pas de modifications de la proportion des cellules en phase G1, S ou G2/M, ni de phénomène d'apoptose (données non présentées).

En plus des voies ERK et Akt, la forme constitutivement active de Gα15 (Gα15QL), active PLCβ dans les cellules HEK293 ou COS7 conduisant à l'activation de la CaM-KII (*calmoduline-kinase II dépendante du* Ca^{2+}), mais également des voies PKC (ou TPR1)/Raf-1/MEK ou PKC/c-Src/Rac1/JAK, ajoutant ainsi des mécanismes potentiellement impliqués dans la survie cellulaire mais aussi potentiellement dans la transition MES et l'invasion cellulaire (Giannone et al., 2010; Su et al., 2009; Lo and Wong, 2006; Liu and Wong, 2004; Lo et al., 2003; Yang et al., 2001). Dans notre étude, nous observons une sous-expression de PLCβ2 et la surexpression de PLCβ1 et TPR1 dans les cellules Gα15-U87-KO. Cette observation suggère une association préférentielle de PLCβ2 avec Gα15 dans des cellules U87, qui serait responsable, au moins en partie, de la croissance et la survie des GBMs. En accord

avec la littérature, il a été rapporté que Gα15 active plus efficacement PLCβ2 et peut avoir une affinité plus grande pour cette isoforme que n'importe quelle autre protéine G (Lee et al., 1992) dans les cellules hématopoïétiques. De plus, nos données montrent aussi que PLCβ1 est surexprimée dans les cellules Gα15-KO par rapport aux cellules de GBM contrôle. De manière intéressante, il a été montré une corrélation inverse entre la forte expression de PLCβ1 et l'agressivité des GBMs (Lu et al., 2016), la PLCβ1 étant surexprimée dans des cellules de GBM de type N présentant un meilleur pronostic. Ainsi, l'inactivation de Gα15 dans les GBMs semble non seulement réduire le taux de survie potentiellement associé à PLCβ2, mais favorise également l'expression de PLCβ1 renforçant le lien capital entre l'expression de Gα15, la signature MES et l'agressivité des GBM.

Les voies de signalisation associées aux PLCs, notamment les voies PKC/Raf/MEK/ERK ou la voie des MAPKs, fréquemment activées par les récepteurs de facteurs de croissance comme les RTKs ou les RCPGs, sont classiquement impliquées dans la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire (Belcheva and Coscia, 2002; See and Mukherjee, 2018; Zhou et al., 2019). Dans les GBMs, nous pouvons émettre l'hypothèse que la phosphorylation de Raf induite par Ras puisse effectivement activer MEK1/2 (Roberts and Der, 2007), responsable de l'activation de ERK1/2, qui pourrait ensuite phosphoryler de multiples substrats cytoplasmiques et nucléaires, y compris les facteurs de transcription mésenchymateux STAT3, NF-κB, ou bien CREB et SRE (*serum response element*), contrôlant principalement la croissance cellulaire (See and Mukherjee, 2018). A partir de la base de données TCGA et COSMIC, il a été démontré que 73% des gliomes, plus particulièrement les GBMs IDHwt portent des mutations dans les composants qui maintiennent l'activation de ces voies (Ceccarelli et al., 2016). Ces dernières seraient bien oncogéniques puisque l'activation de Ras associée à la voie Akt dans des progéniteurs neuraux ou astrocytomes anaplasiques (grade III) semble suffisante pour induire le développement d'un GBM secondaire chez la souris (Holland et al., 2000; Sonoda et al., 2001). Nous confirmons dans notre étude que l'expression de STAT3, un des *drivers* de la transformation mésenchymateuse des GBMs, est associée à la présence de Gα15. Combinées à l'expression de Akt, ces données renforcent l'impact potentiel de Gα15 sur la survie des GBMs et ce, en l'absence de stimuli extracellulaires et de l'activation de récepteurs. Différents signaux activateurs de l'expression de STAT3 ont déjà été décrits, notamment le facteur de croissance EGF ou la cytokine IL-6 (Wendt et al., 2014), des facteurs particulièrement abondants dans les niches inflammatoires et hypoxiques de GBM (Hambardzumyan and Bergers, 2015; Quail and Joyce, 2017). Il a été démontré dans les cellules cancéreuses de mélanome et de prostate que STAT3 est le principal facteur de transcription

(FT) responsable de l'activation constitutive du NF-κB (Lee et al., 2009), dont le rôle dans la stimulation de l'expression de nombreux autres FTs, tels que Snail, Twist1, ZEB1 ou C/EBPβ est maintenant démontré (Bhat et al., 2013; Yamini, 2018). Par qPCR, nous avons confirmé ici que ZEB1, RUNX1 ainsi que C/EBPβ sont sous-exprimés en l'absence de Gα15 dans les cellules de GBM, supportant fortement la régulation de la cascade de signalisation STAT3/NF-κB par Gα15, possiblement responsable de la transition MES des GBMs. Par ailleurs, l'activation de NF-κB joue un rôle majeur dans la production d'IL-6, qui peut également activer STAT3 et conduire ainsi à une boucle de signalisation Il6-STAT3-NF-κB dans le développement de tumeurs (Wendt et al., 2014). Dans l'ensemble, et en accord avec la littérature, nous avons émis l'hypothèse que la présence de Gα15 dans des cellules de GBM stimule probablement la voie PLCβ2/PKC qui déclenche au moins en partie l'activation des voies ERK, Akt, STAT3 et potentiellement NF-κB, aboutissant à une meilleure survie des cellules de GBM (Figure 49).

Cependant le mécanisme par lequel Gα15 régule Akt et tous ces facteurs restent à établir dans les GBMs. Il est intéressant de noter que l'activation de Akt consécutive de l'activation du récepteur ADGRE2 (*Adhesion G protein-coupled receptor E2*) *via* Gα15 dans les macrophages au cours de l'inflammation pourrait être liée aux sous-unités Gβγ, dissociées de Gα15, capables de lier directement et d'activer PI3K, mais aussi à l'augmentation de la $[Ca^{2+}]c$ résultant de l'activité de la PLCβ stimulée par Gα15 (New et al., 2007; I et al., 2017). Dans notre étude, nous n'avons détecté aucune stimulation du $[Ca^{2+}]c$ dans les différentes lignées cellulaires, en l'absence ou la présence du RCPGs de la chimiokine UT exposée ou non au ligand peptidique UII, suggérant qu'une telle hypothèse n'est pas à privilégier dans le GBM. En revanche, une étude récente a mis en évidence l'activation de PYK2 (*Protein Y Kinase 2 Beta*) par Gα15 dans des cas d'hépatite alcoolique (HA) (Afifiyan et al., 2017). PYK2, également connue sous le nom de PTK2B (*Protein Tyrosine Kinase 2 Beta*), est un membre de la famille des tyrosine kinases non-récepteur FAK (*focal adhesion kinase*) (Shen and Guo, 2018). Cette kinase est préférentiellement exprimée dans les cellules neuronales et hématopoïétiques comme Gα15 et stimule la migration des macrophages et des neutrophiles (Wang et al., 2010; Z Zhang et al., 2014; Y Zhang et al., 2014). Son niveau d'expression élevé dans les tumeurs est corrélé à un mauvais pronostic dans le cancer du sein et du poumon non à petites cellules (Zhang et al., 2008; Wendt et al., 2013; Al-Juboori et al., 2019). De plus, la surexpression de PYK2 est positivement associée à la malignité des gliomes et observée dans 84,1% des GBMs (Shen and Guo, 2018), et son implication a été suggérée dans l'agressivité de nombreux cancers, y compris

les gliomes (Lipinski et al., 2005; Shen and Guo, 2018; Zhu et al., 2018). En particulier, l'expression de PYK2 favorise la prolifération de cellules cancéreuses et la survie dans le carcinome de l'ovaire (Lim et al., 2010; Zhu et al., 2018), mais contribue également à la migration, l'invasion et aux métastases dans de nombreux autres cancers, notamment les cancers du poumon, du sein, du foie, le cancer colorectal, le myélome, ainsi que les gliomes (Lipinski et al., 2005; Y Zhang et al., 2014; Shen and Guo, 2018; Zhu et al., 2018). PYK2 peut également réguler la prolifération, la motilité et l'invasion cellulaire dans le carcinome hépatocellulaire *via* l'activation des voies c-Src et ERK/MAPK (Cao et al., 2017) ou amplifie l'activation de STAT3 induite par EGF, tandis que la forme activée de STAT3 peut directement se lier au promoteur de PYK2 et régule sa transcription dans le cancer du sein (Verma et al., 2015), suggérant une mécanisme bidirectionnel entre ces facteurs pour réguler la croissance et l'invasion cellulaire. Dans l'ensemble et en accord avec nos résultats suggérant que l'inactivation de Gα15 diminue l'activation de ERK associée à l'inhibition de l'expression STAT3 et Akt, nous émettons l'hypothèse que, dans les GBMs, Gα15 pourrait réguler PYK2 pour contrôler Akt contribuant ainsi à la survie des cellules de GBM.

Cependant, d'autres mécanismes supplémentaires peuvent être suspectés. En effet, nous avons observé que la répression de l'expression de Gα15 est associée à une augmentation du niveau d'expression du suppresseur de tumeur tel que DKK1 habituellement réprimé dans les GBMs et précédemment décrit comme capable de perturber la croissance cellulaire des GBMs et de sensibiliser les cellules à l'apoptose (Foltz et al., 2010; McCord et al., 2017), *via* l'inhibition de la voie de signalisation Wnt/β-caténine. Dans notre travail, ce mécanisme est confirmé par une diminution relative de l'expression de la β-caténine dans les cellules U87 Gα15-KO, suggérant que la présence de Gα15 dans les GBMs, entraîne la sous-expression de DKK1, l'activation de la voie Wnt associée à l'expression élevée de la β-caténine. Dans le même contexte, il a été signalé que PYK2, dans les cellules de myélome ou de carcinome colorectal, induit l'activation de la voie de signalisation Wnt/β-caténin, ce qui entraîne la surexpression de proto-oncogènes associés à la prolifération cellulaire ou à l'adhésion (Y Zhang et al., 2014; Gao et al., 2015). Dans l'ensemble, la répression de DKK1 et le niveau stabilisé de β-caténine dans les cellules de GBM indiquent que Gα15 pourrait également activer la voie Wnt/β-caténine *via* au moins PYK2 (Figure 49). Cette voie peut également être associée à Akt qui peut phosphoryler GSK3β, l'inactivant et conduisant à la stabilisation de la β-caténine et à sa translocation dans le noyau où elle pourrait se lier au complexe TCF/LEF (*T-cell factor/lymphoid enhancing factor*) initiant l'expression de gènes impliqués dans la prolifération, la différenciation et la survie cellulaires (Majewska and Szeliga, 2017). En

conclusion, nos données supportent fortement l'implication de Gα15 dans l'activation des voies PLCβ2/ERK/STAT3 et Akt ainsi que la voie Wnt/β-caténine pour la survie et la progression des GBMs.

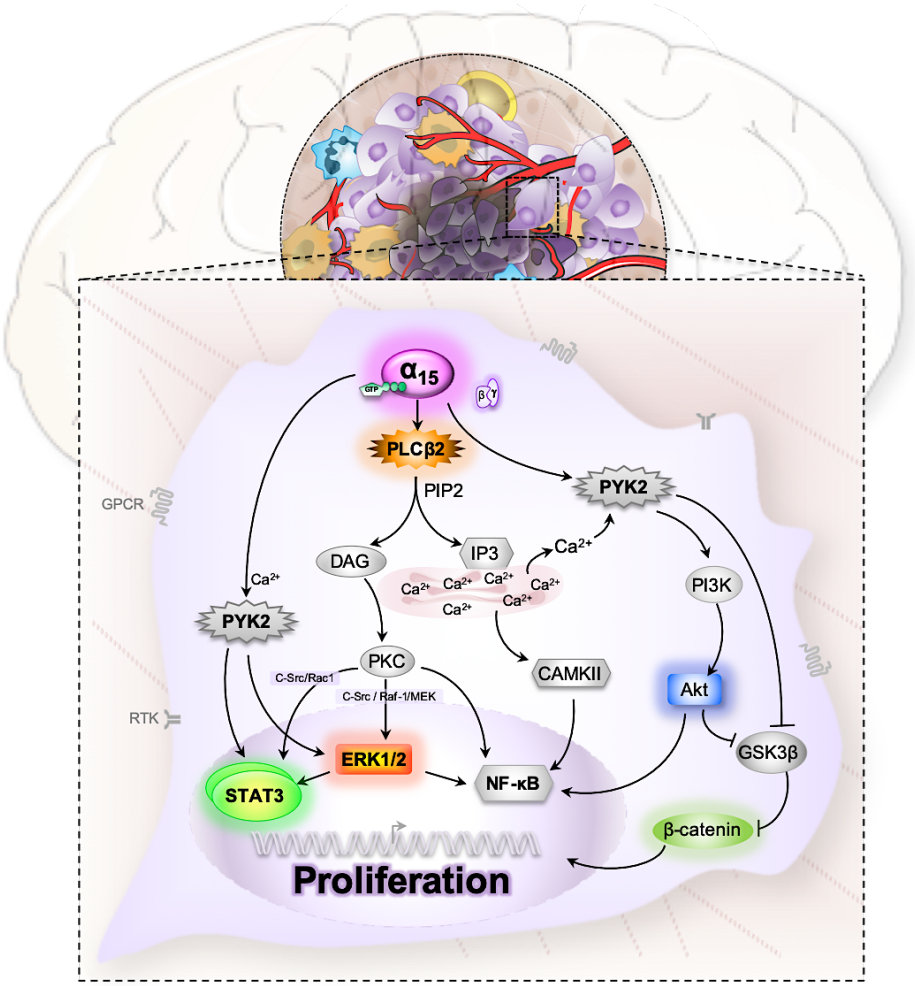


Figure 49. Schéma hypothétique de la croissance des cellules de GBM induite par Gα15. Différentes voies de signalisation sont régulées par Gα15 pour induire la prolifération/survie des cellules de GBM. L'activation de Gα15 pourrait induire le recrutement de PLCβ2 qui stimule à la fois l'activation de CaM-KII et de PKC déclenchant ensuite des cascades de signalisation favorisant en partie l'activation de ERK, STAT3 et NF-κB principalement *via* les voies de signalisation PKC/Raf-1/MEK, PKC/c-Src/Rac1 et PLCβ/Ca^{2+}/CaM-KII respectivement. ERK activé pourrait également à son tour stimuler STAT3 et NF-κB, ce qui favoriserait la croissance cellulaire. L'activation de PYK2 dépendante du Ca^{2+}, stimulée par Gα15, pourrait potentiellement activer à la fois ERK, STAT3, Akt, NF-κB et contribuer également à l'activation de la voie de la β-caténine par inhibition de GSK3β conduisant à la translocation de la β-caténine dans le noyau favorisant la croissance cellulaire. Akt : ou PKB, protéine kinase B ; CaM-KII : Calmoduline-kinase II dépendante du Ca^{2+} ; DAG : diacylglycerol ; ERK : *Extracellular signal-regulated kinase* ; GSK3β: *glycogen synthase kinase 3β* ; IP3: *inositol trisphosphate* ; MEK : *MAPK/ERK kinase*; NF-κB: *Nuclear factor-kappa B*; PI3K *phosphatidylinositol 3-kinase*; PIP2: phosphatidylinositol bisphosphate; PLC: Phospholipase C; PKC : Protéine kinase C; PYK2 : *Proline-rich tyrosine kinase-2* ; Rac1 : *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1* ; Raf-1 : *V-raf-1 murine leukemia viral oncogene* homolog 1 ; STAT : *signal transducers and activators of transcription.*

3. La migration mésenchymateuse dépendante de Gα15 dans les GBMs

Les cellules de GBM se caractérisent par leurs capacités fortement migratoire et invasive, qui contribuent à la récurrence quasi-systématique de ces tumeurs et au mauvais pronostic de ce cancer. La migration et l'invasion des cellules tumorales sont des processus coordonnés en plusieurs étapes comprenant la réorganisation dynamique du cytosquelette d'actine, l'émission des protrusions nommées lamellipodes, la formation de nouveaux complexes d'adhésion, la contraction du corps cellulaire et le détachement de la queue à l'arrière pour une migration mésenchymateuse (Pollard and Borisy, 2003; Nürnberg et al., 2011; Tang and Gerlach, 2017). De nombreuses protéines importantes ont été décrites, en particulier les petites GTPases telles que RhoA, Rac, Cdc42 et Arp2/3 (*actin-related protein 2/3*), comme régulateurs majeurs de ces étapes clés (Sit and Manser, 2011; Spiering and Hodgson, 2011; Ridley, 2015; Swaney and Li, 2016; Lawson and Ridley, 2018). Au cours de la migration qui implique des cycles consécutifs de protrusion, d'adhésion, de dé-adhésion et de contraction, les cellules émettent de manière cyclique des lamellipodes et/ou des filopodes grâce à la polymérisation de l'actine spécifiquement stimulée par Rac1 et Cdc42. Au niveau de ces protrusions membranaires à l'avant de la cellule, se forment de nouvelles adhésions cellulaires qui adhèrent à la MEC *via* des récepteurs d'intégrine inclus dans des complexes macromoléculaires appelés « adhésions naissantes », puis progressent ensuite en complexes focaux d'adhésion (FA) en réponse à des forces locales. L'adhésion cellulaire à l'arrière de la cellule diminue à mesure que les FA se désassemblent et que l'arrière de la cellule se rétracte activement en utilisant la contractilité de l'actomyosine qui est stimulée par RhoA *via* ROCK (*Rho-associated protein kinase*) (Reig et al., 2014; Petrie and Yamada, 2016; Yamada and Sixt, 2019). En plus d'induire la contraction des fibres d'actomyosine, RhoA est généralement associée aux événements précoces de la polymérisation des filaments d'actine. Bien que RhoA soit principalement impliquée dans la rétraction de la « queue » cellulaire en migration (Ridley, 2015; Petrie and Yamada, 2016), elle est également active à l'avant des lamellipodes où elle stimule la polymérisation de l'actine *via* mDia1 (*mammalian Diaphanous 1*) (Pertz, 2010; Petrie and Yamada, 2016). Rac1 contribue à la mise en place et à l'expansion des lamellipodes *via* le complexe WAVE, qui active à son tour la nucléation de nouveaux réseaux ramifiés d'actine filamenteuse par Arp2/3, entraînant l'expansion du lamellipode. Enfin, la protéine Cdc42 est principalement impliquée dans la formation et l'extension des filopodes en stimulant la polymérisation de l'actine relayée par WASP et mDia2 (Huveneers and Danen, 2009; Ridley, 2011).

L'implication des protéines G dans la migration, l'adhésion et la motilité cellulaires a déjà été étudiée. Par exemple, Svensson et al., ont déjà démontré que Gαq/11 est essentielle pour

stimuler la migration aléatoire ou directionnelle des cellules HSB2 (Lymphocyte T isolés d'une leucémie lymphoblastique aiguë), alors que Gαi2 favorise également la migration des cellules T relayée par le RCPG chimiotactique CXCR4 (Svensson et al., 2012). De même, à partir de lignées de GBMs (U87, SW1088) et HEK293 exprimant le RCPG recombinant UT, il a été démontré que le système chimiokine pro-angiogénique UII/UT stimule l'adhésion et la migration chimiotactiques par activation de la polymérisation d'actine *via* Gα13/Rho/ROCK, par formation des lamellipodes et des complexes FA riches en vinculine principalement *via* la voie Gαi/PI3K (Lecointre et al., 2015; Coly et al., 2016). Dans notre étude, en l'absence de stimulation exogène des RCPGs de chimiokine, nous avons démontré que l'expression de Gα15 dans les cellules de GBM est très efficace pour favoriser (1) le remodelage du cytosquelette d'actine *via* la formation de fibres de stress d'actine, (2) l'expansion des lamellipodes, (3) l'adhésion par l'augmentation du nombre de complexes FA enrichis en Phospho-paxilline et en vinculine et (4) la motilité/migration cellulaire tout en favorisant l'expression des marqueurs MES. Cependant, le mécanisme moléculaire par lequel Gα15 régule ces processus dans le GBM n'a pas encore été complètement clarifié et nécessite des études supplémentaires. Par des études d'immunoprécipitation ou immunocytochimiques, il a été montré que dans des cellules glomérulaires ou des lignées de cellules tumorales mammaires de Rat, la sous-unité Gαq/11 peut être associée à la formation des filaments d'actine (Ibarrondo et al., 1995; Côté et al., 1997). Plus récemment, le rôle des membres de la famille Gαq/11 dans l'activation des kinases Rho/Rac pour stimuler la polymérisation de l'actine dans les cellules de mélanome a été suggéré (Feng et al., 2014). Ces travaux, et l'activation de RhoA par Gα15 déjà suggérée (Yeung and Wong, 2009; Giannone et al., 2010; Su et al., 2009), nous permettent de proposer que dans les GBMs, Gα15, un membre de la famille Gαq/11, favorise la polymérisation de l'actine *via* l'activation de Rho/Rac de manière constitutive, en l'absence d'activation de RCPG. En effet, Yeung et al., ont démontré que p63RhoGEF (*p63 Rho guanine nucleotide exchange factor*) peut former un complexe stable avec le mutant constitutivement actif de Gα15, conduisant ainsi à l'activation de RhoA (Yeung and Wong, 2009). Cependant, dans leur étude, la surexpression de p63RhoGEF et Gα15 dans les cellules HEK293 semble plutôt inhiber l'activation de PLCβ2 et de TPR1 et leur signalisation en aval, impliquant les facteurs de transcription STAT3 et NF-κB ou ERK (Su et al., 2009; Yeung and Wong, 2009). Ils ont aussi suggéré que p63RhoGEF interagit avec une forte affinité avec le mutant constitutivement actif Gα15, entrant ainsi en compétition avec les effecteurs canoniques que sont PLCβ2 et TPR1, décrits précédemment comme étant impliqués dans la prolifération cellulaire soutenue par Gα15. La question ici est de comprendre quelles voies de signalisation sont activées et quand, dans le GBM, pour induire

la migration et à l'adhésion. Lorsque que Gα15 se trouve ré-exprimée au cours de la transition mésenchymateuse du GBM, les voies de signalisation essentielles à la survie notamment les voies Gα15/PLCβ/ERK/STAT3 ou Akt sont aussi sollicitées pour migrer en dehors des niches vasculaires, migration qui requière éventuellement les voies Gα15/p63RhoGEF/RhoA permettant la polymérisation des fibres d'actine et l'émission de lamellipodes (Figure 50).

Récemment, un lien entre Gαq, Cdc42 et la polymérisation de l'actine en réponse à l'activation du récepteur muscarinique M3R a été démontré dans les cellules musculaires lisses gastriques (Mahavadi et al., 2018). Mahavadi et al., ont observé que le traitement de ces cellules avec l'acétylcholine (Ach/M3R) peut entraîner la contraction et la polymérisation de l'actine dépendante de PLCβ1 et du Ca^2, et l'activation de PYK2. La contraction prolongée et la polymérisation de l'actine indépendantes du Ca^{2+} sont relayées par l'activation de RhoA qui phosphoryle FAK. Une fois activés, PYK2 et FAK induisent la phosphorylation de la paxilline et son association à des GEF. Ces GEF stimulent ensuite la Rho GTPase Cdc42 pour induire la polymérisation de l'actine et la contraction musculaire. De ce fait, l'appartenance de Gα15 à la famille Gαq/11 laisse supposer que Gα15 pourrait potentiellement réguler cette Rho GTPase Cdc42 afin de promouvoir la polymérisation de la F-actine dans les filopodes. Il est évident que des expériences supplémentaires sont nécessaires pour évaluer la régulation du Cdc42 par Gα15 dans les filopodes, au niveau du front des lamellipodes, avec ou sans stimulation de RCPG. Cependant, ici, l'originalité provient de la nature atypique de Gα15, dans la mesure où cette protéine G entre en compétition avec d'autres protéines G pour leur capacité à interagir avec les RCPGs, induisant principalement des couplages à la PLCβ et une résistance à la désensibilisation relayée par les β-arrestines (Lee et al., 1995; Wu et al., 1995; Innamorati et al., 2009).

Comme précédemment mentionné, la forme activée de Gα15 dans les cellules HEK293 stimule les voies de la PLCβ/PKC et l'activation de la cascade de signalisation c-Src (Lee and Wong, 2009; Giannone et al., 2010). Un des effecteurs bien connus en aval de c-Src est Rac1, en particulier dans de nombreux cancers, notamment dans les gliomes, le cancer de la prostate et du colon, pour induire la migration et les métastases (Servitja et al., 2003; Feng et al., 2011; W Liu et al., 2015). De plus, des études antérieures sur les cellules PC12 ont proposé Gα15QL comme activateur de la voie JNK (*NH_2-terminal kinases*) (Heasley et al., 1996; Higashita et al., 1997) qui peut être activée par Rac1 pour renforcer non seulement la polymérisation de F-actine mais aussi l'activation de la paxilline associée à la migration et la motilité cellulaires (Servitja et al., 2003; Huang et al., 2004; Goldsmith and Dhanasekaran, 2007). Collectivement, nous spéculons que Gα15 pourrait également réguler la polymérisation de F-actine dans les cellules

de GBM, l'expansion des lamellipodes associée au recrutement de la paxilline dans les complexes FA, au moins par la voie PLCβ/PKC/c-Src/Rac-1 (Figure 50).

Toutefois, une autre hypothèse peut être proposée en considérant PYK2, l'effecteur potentiel de Gα15, qui a été démontré comme étant un régulateur positif de certaines protéines associées à FAK telles que Src et la paxilline (Y Zhang et al., 2014). En accord avec cette étude, Genna *et al.,* ont caractérisé dans les cellules MDA-MB-231 de cancer du sein, que PYK2 se localise dans les invadopodes et recrute la kinase Src ainsi que dans les FA riches en vinculine avec FAK, régulant ainsi la dégradation de la MEC *via* les MMPs lors de l'invasion de cellules cancéreuses en réponse à l'EGF (Genna et al., 2018). A partir de ces données et de nos résultats, nous proposons que PYK2 puisse contribuer également à l'augmentation, induite par Gα15 de la formation des complexes FA enrichis en paxilline/vinculine associée à une forte capacité migratoire des cellules de GBM.

Parmi les caractéristiques de la migration cellulaire, la formation de complexes FA au niveau des bords des lamellipodes est l'une des plus remarquables. Ces complexes FA sont essentiels pour générer la force de traction requise pour le mouvement de la cellule vers l'avant. En effet, lors de la migration cellulaire, des contacts d'adhésion transitoire se forment et se concentrent à la périphérie des lamellipodes où les intégrines recrutent des protéines telles que la paxilline ou la vinculine pour former des FA immatures et la transition vers des FA matures, marquée par une augmentation de leur taille (Jarjour et al., 2011; Kuo et al., 2011). La microscopie de super-résolution a récemment permis d'identifier et de classer les protéines de FA en fonction de leur comportement dynamique en corrélation avec leurs compartiments (Kanchanawong et al., 2010; J Liu et al., 2015; Stutchbury et al., 2017; Stubb et al., 2019) : on note i) la couche de signalisation composée des intégrines (contenant les intégrines αv et β5, FAK et paxilline), la couche de transduction de force (*Force transduction layer*) composée de protéines telles que la taline ou la vinculine situées au-dessus de la couche précédente, puis la couche régulatrice de l'actine composée principalement de zyxine, VASP, α-actinine et l'actine. Nous avons démontré dans les cellules de GBM que la suppression du Gα15 réduit significativement le nombre et la taille des FA enrichis en paxilline et en vinculine, et perturbe la motilité et les propriétés migratoires des cellules. Ces données démontrent clairement que le Gα15 est impliquée dans la formation du complexe FA, nécessaire au mouvement des cellules et impliquant probablement la signalisation des intégrines.

Comme précédemment mentionné en association avec la polymérisation de l'actine, Gα15 peut induire l'activation de la paxilline *via* au moins deux voies de signalisation, la voie PLCβ2/PKC/c-Src/Rac-1 et/ou PLCβ2/Ca^{2+}/PYK2. De plus, il a été décrit que la paxilline

présente de nombreux sites de phosphorylation par la PKC ainsi que par JNK (López-Colomé et al., 2017), favorisant ainsi son ancrage à la membrane plasmique et son ciblage aux complexes FA. Concernant la paxilline, son niveau d'expression est faible dans les tissus cérébraux normaux mais surexprimée dans de nombreux cancers, et montre une corrélation entre son niveau d'expression élevé et le potentiel très invasif et migratoire des cellules. Elle est même considérée comme un biomarqueur potentiel car elle est négativement corrélée à la survie des patients atteints de GBM (Chandrika et al., 2016; Sun et al., 2017; Zepecki et al., 2019). Nomura *et al.,* ont démontré que, dans les GBMs, la paxilline est une cible critique en aval des intégrines et module la formation adéquate du complexe FA impliqué dans la migration de cellules de GBM stimulées par le PMA (*Phorbol-12-Myristate-13-Acetate*) (Nomura et al., 2008). Le PMA, un puissant stimulateur de PKC et promoteur de tumeur, peut stimuler Rac1 favorisant l'expression et l'activation de la paxilline au niveau des lamellipodes des cellules de GBM, suggérant que les cascades de signalisation impliquant la PKC, comme pour Gα15, peuvent induire le recrutement de la paxilline et l'expansion des lamellipodes.

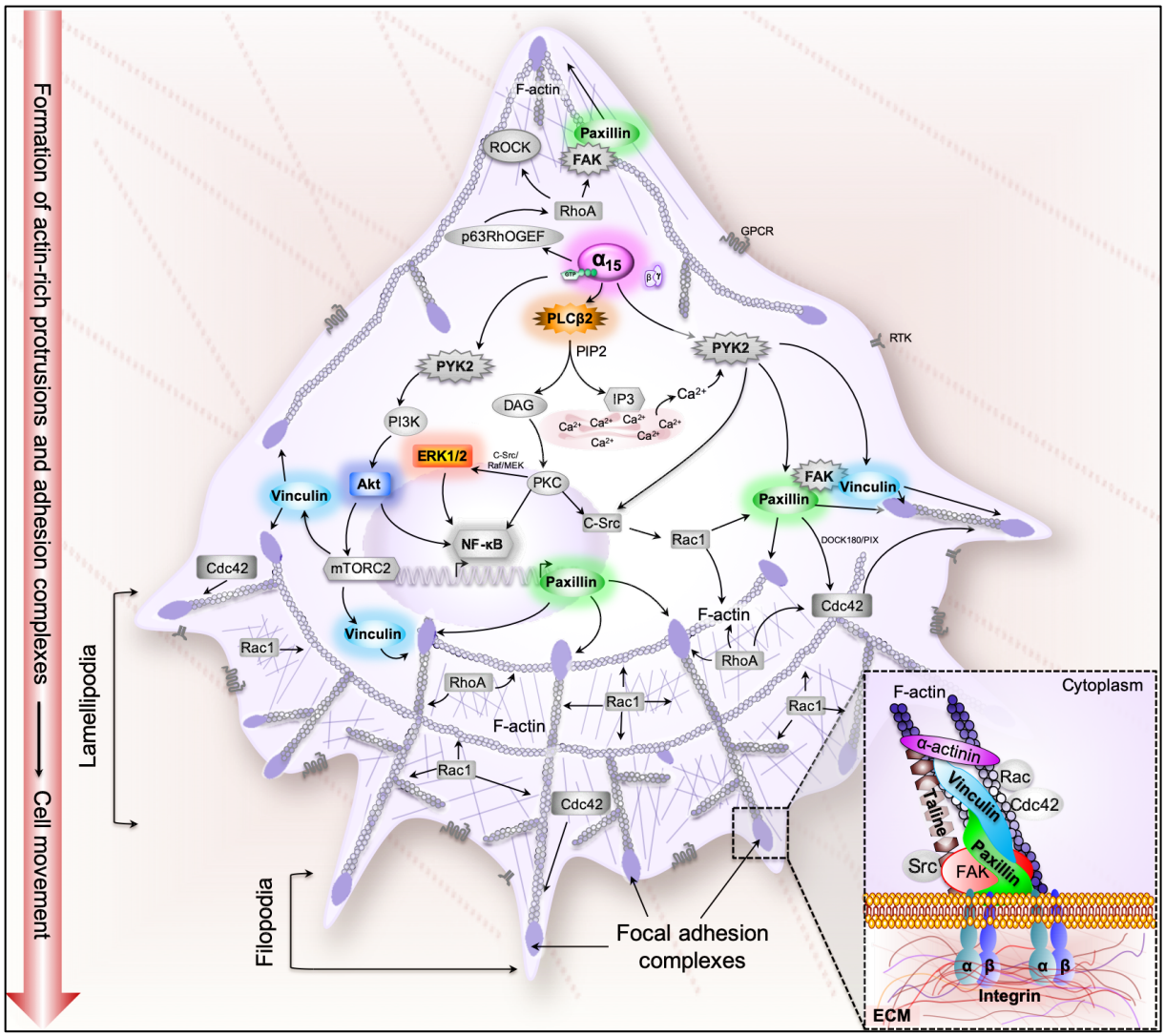


Figure 50. Gα15 régule la migration des cellules de GBM par stimulation de la formation de complexes d'adhésion focale et par remodelage du cytosquelette d'actine. Ce schéma hypothétique résume les profils de signalisation régulés par Gα15 pour stimuler la polymérisation de l'actine et les complexe d'adhésion focale principalement à l'arrière de la cellule, dans les lamellipodes et les filopodes à l'avant des cellules migrantes. Les petites GTPases RhoA, Rac et Cdc42 ainsi que les protéines des adhésions focales (paxilline et vinculine) sont les principaux acteurs régulés positivement par Gα15 *via* différentes voies potentielles (voir la discussion et la figure pour plus de détails) favorisant la motilité/migration des cellules de GBM. Akt : ou PKB, protéine kinase B ; Cdc42 : *cell division cycle 42* ; DAG : *diacylglycerol* ; DOCK180 : ou DOCK1, *dedicator of cytokinesis 1* ; ERK : extracellular signal-regulated kinases ; IP3 : inositol trisphosphate ; MEK : MAPK/ERK kinase ; mTORC2 : *mammalian target of rapamycin complex 2* ; FAK : focal adhesion kinase; NF-κB : Nuclear factor-kappa B; PKC: protein kinase C ; PIP2: phosphatidylinositol bisphosphate ; PI3K : Phosphoinositide 3-kinase; PIX : *proteins p21-activated kinase interacting exchange factor α, β* ; PLC : Phospholipase C ; PYK2 : *proline-rich tyrosine kinase-2 ;* p63RhoGEF : *p63 Rho G protein exchange factor* ; Rac1 : Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 ; Raf-1: *V-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1* ; RhoA : *Ras homolog gene family, member A* ; ROCK : *Rho-associated protein kinase* ; STAT : *signal transducers and activators of transcription.*

De plus, il est intéressant d'évoquer la voie PI3k/PTEN, car PTEN semble être impliquée dans la régulation négative de l'expression de la paxilline *via* l'inhibition de la voie de signalisation PI3K/Akt/NF-κB dans trois lignées cellulaires du cancer du côlon (Lovo, HT-19,

and HCT-116). Le gène PTEN (*the human phosphatase and tensin homolog*) étant fréquemment muté dans un grand nombre de cancers et plus particulièrement dans les GBMs (Verhaak et al., 2010; Kim et al., 2015; Mansouri et al., 2017), et sachant que trois sites de liaison de NF-κB sur le promoteur de la paxilline ont été identifiés (Zhang et al., 2015), nous proposons que la paxilline soit une cible transcriptionnelle directe de la voie de signalisation Akt/NF-κB, positivement activée en présence de Gα15 dans les cellules de GBM pour promouvoir l'invasion, la migration et la progression tumorale. Cette activation par Gα15 pourrait potentiellement être relayée par les voies PLCβ2/PKC et/ou PLCβ2/PYK2/Akt (Figure 50).

Par ailleurs, le cycle d'assemblage/désassemblage des complexes FA est très dynamique et ces processus coordonnés sont essentiels lors de la migration cellulaire. Il a été démontré que la voie MEK/ERK est impliquée dans le désassemblage des FA lors de la migration (Choi et al., 2008; Coló et al., 2012). Dans ce contexte, la phosphorylation par ERK des sérines 106, 231 et 290 régule le désassemblage de la paxilline des complexes FA et favorise la migration cellulaire (López-Colomé et al., 2017). Ainsi, Gα15 pourrait réguler l'activation à la fois de ERK et de NF-κB pour contrôler la cinétique de la formation des complexes FA et de leur désassemblage lors de la migration de cellules de GBM.

Il a également été démontré que la vinculine était associée à un grand nombre de protéines du cytosquelette d'actine et du FA telles que la paxilline, la taline et Arp2/3 (Turner et al., 1990; Carisey and Ballestrem, 2011; Peng et al., 2011). Considéré comme étant activé par PIP2, le rôle de la vinculine dans les processus cellulaires tels que la motilité, la migration et la survie est très controversé et complexe (Coll et al., 1995; Critchley, 2004; Subauste et al., 2004; Magro et al., 2007; Goldmann et al., 2013; Yu et al., 2019). En accord avec nos données, la contribution des complexes FA riches en vinculine dans la migration cellulaire a déjà été mise en évidence dans les gliomes (Chantaravisoot et al., 2015; Lecointre et al., 2015). Par immunocytochimie, Chantaravisoot et *al.,* ont démontré que l'inhibition spécifique de mTORC2 (à l'aide de PP242) dans les cellules U87 de GBM altère de manière significative le cytosquelette d'actine et la formation de complexes FA riches en vinculine, mais inhibe également d'autres fonctions protéiques telle que la Filamine A (Chantaravisoot et al., 2015). Ces données suggèrent un lien régulateur entre la vinculine et la voie PI3K/Akt/mTORC2, une voie de signalisation principalement sous le contrôle de la stimulation des RCPGs de chimiokines couplés à Gαi dans les GBMs (Lombardi and Assem, 2017), mais proposée ici comme pouvant être stimulée par Gα15 probablement *via* PYK2. La vinculine semble être capable de coupler des filaments d'actine aux intégrines induisant des adhésions cellule-matrice d'une part, et aux jonctions

intercellulaires riches en cadhérines d'autre part (Lausecker et al., 2018). Son domaine N-terminal se lie à la taline lors des adhésions cellule-matrice et principalement à l'α-caténine dans les jonctions cellule-cellule (Peng et al., 2012). Il a été démontré que son domaine C-terminal se lie à la paxilline, à la F-actine et à PIP2 (Hemmings et al., 1996; Carisey and Ballestrem, 2011; Peng et al., 2011). Aussi, la vinculine a aussi été proposée comme contrôlant la formation des FA par interaction directe avec la taline et la F-actine tout en régulant le recrutement de la paxilline aux complexes FA (Humphries et al., 2007; Dumbauld et al., 2013). La régulation coordonnée entre ces protéines peut expliquer pourquoi elles sont modifiées simultanément lorsque Gα15 est inactivée dans notre étude.

Ensemble, nous proposons que l'activation de PLCβ2 par Gα15 puisse stimuler la transformation de PIP2 en IP3 et DAG, modulant de nombreuses cascades de signalisation, telles que l'activation PKC, ERK, STAT3 et NF-κB. Nous ne pouvons pas exclure que Gα15 puisse également interagir avec le facteur de transcription E3 (TFE3) permettant la translocation nucléaire de Gα15 et la régulation positive de certains gènes précédemment observée dans les cardiomyocytes (Sato et al., 2011). Quoi qu'il en soit, nous avons montré ici le rôle potentiel de Gα15 dans la formation de points FA pour la migration MES, même en l'absence de signalisation associées à l'activation d'un RCPG.

4. La sous-unité Gα15, régulatrice du phénotype mésenchymateux des GBMs

L'EMT est reconnue comme l'événement crucial au cours duquel les cellules tumorales acquièrent un phénotype invasif suite à l'activation de FTs spécifiques. Même si les cellules gliales présentent déjà un phénotype MES, un processus de transition MES tend à exacerber ce phénotype pendant la gliomagenèse, entrainant la progression vers des stades encore plus agressifs (Colella et al., 2019). La transition MES dans le GBM est caractérisée par le détachement cellulaire de la masse tumorale, l'adhésion à la MEC, la dégradation des composants de la MEC et l'invasion du tissu cérébral à travers des branches vasculaires ou des fibres de la substance blanche. Cette transition MES est particulièrement associée au microenvironnement inflammatoire et hypoxique, qui stimulent la transcription d'un grand nombre de gènes codant pour des FTs et des facteurs angiogéniques (Joseph et al., 2015; Iwadate, 2016), contrôlant ainsi la survie des cellules de GBM, leur migration et invasion. Malgré de nombreuses thérapies multimodales agressives (chirurgie, radiothérapie, TMZ, lomustine, bevacizumab, ré-irradiation, etc.) administrées aux patients atteints de GBM, le taux de survie reste extrêmement faible (Stupp et al., 2017: 2017; Stepanenko and Chekhonin, 2018).

Ainsi, la compréhension des signatures et mécanismes de la transition MES constituent de potentielles cibles thérapeutiques.

Dans notre étude, une corrélation positive (coefficient de Pearson supérieur à 0,5) entre l'expression de Gα15 et certains principaux gènes MES dont C/EBPβ, RUNX1, FOSL2, CD44, SERPINEA1 a été démontrée. Nous avons ensuite validé que la délétion du gène codant Gα15 dans des cellules de GBM U87 est suffisante pour (1) diminuer significativement l'expression d'ARNm de plusieurs FTs MES tels que C/EBPβ, RUNX1, FOSL2, BHLHB2, ZEB1 ou KLF4, l'expression protéique de la N-cadhérine et sa translocation à la membrane plasmatique, (2) diminuer significativement l'expression de marqueurs angiogéniques comme l'angiogénine (ANG) et le VEGFA, (3) au contraire promouvoir l'expression d'ARNm de marqueurs du phenotype souche de GSCs comme SOX2 ou OCT4, et (4) stimuler l'expression d'ARNm d'un suppresseur de tumeurs, ZNF238. Ces résultats révèlent pour la première fois l'association positive entre la sous-unité Gα15, l'expression de gènes MES et de facteurs pro-tumorigènes favorisant l'agressivité des GBMs. De manière interessante, l'étude du groupe de recherche de Lavarone a souligné que les FTs surexprimées ou sous-exprimé dans les gliomes de haut grade incluant STAT3, C/EBPβ, bHLHB2, RUNX1, FOSL2 et ZNF238, sont nécessaires et suffisants pour maintenir la signature mésenchymateuse des gliomes de haut-grade (Carro et al., 2010). En effet, l'utilisation de shARNs spécifiques pour réprimer le niveau d'expression de C/EBPβ et de STAT3 dans la lignée cellulaire de gliome SNB19, a montré une réduction significative des niveaux d'expression d'ARNm de bHLHB2, FOSL2 et RUNX1, ce qui suggère que STAT3 et C/EBPβ sont les principaux regulateurs MES. STAT3 et NF-κB, tous les deux activés par Gα15 comme précédemment mentionné, agissent ensemble pour induire l'angiogenèse et l'infiltration de cellules inflammatoires (Grivennikov and Karin, 2010), des processus clés du phénotype MES. Il est intéressant de noter que NF-κB favorise également la transition MES des GBMs en induisant l'expression de STAT3, C/EBPβ et TAZ (Bhat et al., 2013; Yamini, 2018). Dans les GBMs, nous proposons que Gα15 régule positivement l'expression des FTs MES dont RUNX1, FOSL2, BHLHB2, ZEB1 en régulant C/EBPβ et STAT3 *via* NF-κB, impliquant une inter-regulation positive entre ces facteurs clés (Figure 51).

Les molécules du microenvironement tumoral inflammatoire et hypoxique comme les chimiokines et les cytokines, dont IL-6 ; IL-8, TGFβ, SDF-1, stimulent de nombreux facteurs des cellules souches (OCT4, SOX2, KLF4, Nanog, Nestin, CD44 ou CD133), qui favorisent l'auto-renouvellement et la survie des GSCs (Wang et al., 2015; Carnero and Lleonart, 2016; Ray, 2016; Roos et al., 2017). Dans ce contexte, en analysant le statut souche de nos cellules de GBMs, il apparait que le FTs KLF4 (*Krüppel-like factor 4*) est le seul marqueur souche de

GBM dont l'expression est réduite lorsque Gα15 est supprimée des cellules U87 de GBM, contrairement aux marqueurs bien connus que sont SOX2 ou OCT4. En effet, SOX2, OCT4, ou KLF4 ont été décrits comme permettant l'induction de la pluripotence dans des cellules de fibroblastes embryonnaires et adultes différenciées, conduisant à la génération de cellules souches pluripotentes (Li et al., 2019). Dans le cancer, différentes études suggèrent que le KLF4 présente un potentiel oncogénique dans les GBMs et contribue significativement à la survie des GSCs et à la récurrence du GBM. Dans des conditions hypoxiques (2% O_2), HIF-1α est stabilisé et favorise l'expression des gènes KLF4, c-Myc, Nanog, OCT4 et SOX2 dans onze lignées cellulaires cancéreuses, notamment dans les gliomes, les tumeurs rénales et pulmonaires (Mathieu et al., 2011). KLF4 peut également supprimer les voie apoptotiques dépendantes de p53 en agissant directement sur le promoteur TP53 et en inhibant son expression dans cellules tumorales (Rowland et al., 2005). Bien que ces aspects n'aient pas été évalués dans nos études, la diminution de l'expression de l'ARNm de KLF4 dans les cellules de GBM Gα15-KO renforce l'idée de la fonction oncogénique importante de Gα15 dans les GBMs. Sachant que l'expression de KLF4 semble deprendre de STAT3 (Ray, 2016; Riddick et al., 2017; Li et al., 2019), nous proposons que dans notre étude, Gα15 régule positivement la voie STAT3 pour favoriser la survie cellulaire et les propriétés de cellules souches MES.

Même si nous n'expliquons pas l'augmentation de l'expression OCT4 et SOX2 en absence de Gα15, il est intéressant de noter que SOX2 et OCT4 ont été décrits comme pouvant se fixer au promoteur et réguler l'expression de DKK1 ; pendant que SOX2 semble activer l'expression de DKK1 dans les cellules souches MES (Park et al., 2012), OCT4 réprime son expression dans les cellules souches embryonnaires (Babaie et al., 2007; Kunarso et al., 2010). L'expression ectopique de DKK1 diminue significativement la formation de colonies et sensibilise les cellules T98 de GBM aux stimuli apoptotiques (camptothécine et étoposide) mais inhibe également la migration de deux lignées cellulaires de GBM (U87 et cellules primaires de GBM) et de cellules souches MES issues de la moelle osseuse, ce qui détermine l'intérêt d'inhiber la voie Wnt (inhibée par DKK1) pour traiter le GBM (Foltz et al., 2010; Guo et al., 2014; McCord et al., 2017). Notre travail montre que le represseur DKK1 est surexprimé lorsque Gα15 est délétée, ce qui suggère que dans les cellules de GBM MES exprimant Gα15, les facteurs SOX2, OCT4 et DKK1 sont faiblement exprimés, tandis que KLF4 en tant que marqueur du caractère souche et MES, est surexprimé, maintenant ainsi la voie Wnt/β-caténine activable constitutivement pour favoriser la survie et la migration des cellules de GBM.

De manière intéressante, cette hypothèse est en accord avec la stabilisation de la β-caténine ainsi que de l'un de ses gènes cibles, ZEB1, qui est également un des principaux FTs initiant

l'expression de marqueurs MES, comme la N-cadhérine, la vimentine, la fibronectine et inversement, inhibant l'expression des marqueurs épithéliaux tel que la E-cadhérine, et le marqueur de cellules souches SOX2 (Edwards et al., 2017; Colella et al., 2019). En effet, l'analyse de nombreux échantillons de patients atteints de GBM a suggéré que la perte d'expression de ZEB1 entraîne l'expression des marqueurs de cellules souches SOX2, OLIG2 et CD133, et ces résultats ont été confirmés *in vitro* par la sous-expression de ZEB1 dans les GSCs isolées de gliomes de patients (Edwards et al., 2017).

Les principaux marqueurs épithéliaux et MES qui définissent les phénotypes respectifs sont les cadhérines épithéliales (E) et neuronales (N), et ce changement de cadhérine coïncide souvent avec la transition d'un cancer bénin à un cancer malin (Cui and Yamada, 2013). L'expression de la E-cadhérine est presque absente dans les tissus neuronaux, où son expression semble limitée aux GSCs et à une population de cellules de GBM très agressives. Par ailleurs, la N-cadhérine est absente dans les tumeurs épithéliales avant la mise en place de l'EMT, alors qu'elle est fortement exprimée dans les astrocytes, où elle contribue à réguler la polarité et la migration cellulaire (Colella et al., 2019), et son expression augmente avec le grade du gliome (J Zhang et al., 2018). Des études ont d'ailleurs démontré sa surexpression dans les marges invasives des tissus de gliomes humain. Le lien avec la voie ERK a été démontré puique le traitement de deux lignées de GSCs, U251 et 5310, par l'U0126, un inhibiteur de la voie MEK/ERK, réduit l'expression et la co-localisation de la N-cadhérine avec l'intégrine α6, un marqueur de GSCs (Velpula et al., 2012). L'activation de la β-caténine peut également stimuler l'expression de la N-cadhérine dans les cellules de GBM (Mrozik et al., 2018; J Zhang et al., 2018). De plus, la sous-expression de la N-cadhérine et de l'intégrine α6 à l'aide de shRNAs diminue significativement la migration des GSCs et l'invasion dans du matrigel, ce qui demontre leur contribution dans l'invasion des GSCs (Velpula et al., 2012). En particulier, il a été démontré que des différences dans la distribution cellulaire de la N-cadhérine plutôt que son niveau d'expression dans la cellule sont responsables de differents comportements dans la mobilité cellulaire (Colella et al., 2019). Dans la présente étude, nous avons detecté par Western Blot une légère diminution de l'expression de N-cadhérine dans certains clones U87 Gα15-KO. De plus, nous avons demontré que la sous-expression de Gα15 inhibe significativement la localisation transmembranaire de la N-cadhérine, alors que la surexpression de Gα15 entraîne une augmentation significative du marquage de la N-cadhérine à la membrane plasmatique, indiquant un rôle essential de Gα15 dans la localisation transmembranaire de la N-cadhérine.

Collectivement (Figure 51), nous proposons que dans notre étude, Gα15 stimule l'expression et/ou l'activation de STAT3, MEK/ERK et de la β-caténine (comme suggéré ci-dessus) qui

favorise en partie l'expression de ZEB1 pour bloquer la voie de signalisation SOX2/DKK1, renforçant l'agressivité du GBMs MES, tout en stimulant l'expression et la translocation membranaire du marqueur MES N-cadhérine, aboutissant ainsi à la migration/invasion des cellules de GBM (Figure 51).

5. Expression de Gα15 dans les cellules de gliome et le statut inflammatoire du GBM

Gα15 a longtemps été décrit comme étant spécifique des cellules hématopoïétiques et de leurs cellules immunitaires dérivées telles que les lymphocytes et les macrophages (Su et al., 2009; Giannone et al., 2010). De études récentes ont montré que le statut inflammatoire entretient une relation étroite, bien que toujours mal comprise, avec le développement des cancers. Plus particulièrement, le GBM est reconnu comme étant une tumeur hautement inflammatoire avec environ 40% de la masse tumorale composée au moins de macrophages tumoraux infiltrants ou TAMs (Quail and Joyce, 2017; S Zhang et al., 2018; Perrin et al., 2019). Cette inflammation est favorisée par les facteurs sécrétés d'abord par les cellules de gliome, telles que les chimiokines et les cytokines, dont l'expression peut être stimulée en partie par HIF-1α, responsable du recrutement des TAMs, ces derniers contribuent ensuite à l'angiogenèse et à l'agressivité tumorale (Triner and Shah, 2016; Matias et al., 2018; Roesch et al., 2018). De manière intéressante, l'expression du gène GNA15 a été significativement retrouvée dans le sous-type MES de la classification de Verhaak, associée à la mutation ou à la suppression de NF1, à la mutation de TP53 et/ou de PTEN, à la surexpression du gène TNF-α et la voie NF-κB (Verhaak et al., 2010), potentiellement à cause d'une nécrose globale plus élevée et d'infiltrats inflammatoires associés à ce sous-type. D'autres altérations de marqueurs MES ou inflammatoires tels que CHI3L1, cMET ou le proto-oncogène CD44 sont également observées (Phillips et al., 2006; Agnihotri et al., 2013), suggérant que Gα15 accompagne le caractère inflammatoire des GBMs MES. Nous avons donc étudié l'expression de deux facteurs inflammatoires SERPINA1 codant pour la protéine alpha 1 antitrypsine, un inhibiteur majeur de peptidases, produit principalement par les hépatocytes, les neutrophiles ou les monocytes et important lors de l'inflammation et des modifications de la MEC (Askew and Silverman, 2008; Greene et al., 2016), ainsi que du TGF-β, pour lesquels la surexpression dans les GBMs a été démontrée comme étant associée à un faible taux de survie des patients (Caja et al., 2015; Seystahl et al., 2017; Ookawa et al., 2018), ainsi que des acteurs pro-angiogéniques VEGFA et ANG. Bien que l'expression d'ARNm du TGF-β ne soit pas modifiée dans les U87 Gα15-KO par rapport aux cellules contrôles, l'expression de SERPINA1 semble diminuée dans les U87 Gα15-KO. Pour rappel, l'expression de SERPINA1 était retrouvée positivement corrélée avec

celle de GNA15 dans notre analyse du TCGA. Comme précédemment mentionné, SERPINA1 est un important inhibiteur de peptidases, connu pour sa fonction protectrice, au moins des cellules cancéreuses, de l'action d'autre protéases inductrices de l'apoptose (Hunt and Tuder, 2012; Gollapalli et al., 2017), et favorise la migration de certaines cellules tumorales (Ercetin et al., 2019). En effet, dans une étude récente utilisant différentes cellules cancéreuses du poumon (H1975 et H661), cinq principaux gènes apparentés à SERPINA1 ont été identifiés (Ercetin et al., 2019), notamment SERPINE1 (PAI-1, *Plasminogen activator inhibitor-1*), l'inhibiteur principal de tPA (*tissue-type plasminogen activator*) et uPA (*Urokinase-type Plasminogen Activator*), dont la surexpression est aussi corrélée à un faible taux de survie des patients atteints de gliome (Roy et al., 2015). Dans le GBM, il a été démontré que S1P, IL-1 et l'EGF stimulent l'expression d'ARNm et protéique de PAI-1, pour stimuler le caractère invasif des GBMs et l'infiltration des mastocytes (Bryan et al., 2008; Paugh et al., 2008; Roy et al., 2015). De manière intéressante, le FT ZNF238 est décrit comme capable de se lier aux promoteurs des gènes codant pour PAI-1 ainsi qu'à celui de l'α-actinine pour réprimer leurs expressions dans les gliomes (Fedele et al., 2017). Ainsi, la surexpression de ZNF238, un des principaux FTs MES répresseur des GBMs (Carro et al., 2010) dans les cellules Gα15-KO, pourrait probablement expliquer la sous-expression observée de SERPINA1 et potentiellement celle de PAI-1, bien que cela reste à confirmer.

Nous proposons que dans les GBMs plus spécifiquement mésenchymateux, en l'absence de l'action répressive de ZNF238, Gα15 en activant des voies dépendantes de PLCβ2 ou ERK, peut d'une part recruter la voie STAT3-NF-κB, stimuler la migration mésenchymateuse *via* la régulation des FA et la migration directionnelle associée à la polymérisation des fibres de stress d'actine, et d'autre part participer à la mise en place d'un microenvironnement inflammatoire par surexpression et libération de SERPINA1 et PAI-1 ainsi que de facteurs pro-angiogéniques tels que VEGFA ou ANG1 voire éventuellement certaines cytokines chimiotactiques, notamment IL-8 ou C5a mais le rôle de ces dernières reste à démontrer (Figure 51) (Norgauer et al., 1996; Davignon et al., 2000).

Gα15 pourrait aussi être impliquée dans une boucle de signalisation STAT3→NF-κB→IL-6 importante dans les processus inflammatoires de la tumeur et son développement (Wendt et al., 2014; Yamini, 2018). Il a également été démontré que C/EBPβ, l'autre principal FT du statut MES, peut stimuler l'angiogenèse en se liant au promoteur de l'IL-6 pour induire son expression dans des cellules U87 de GBM sur-exprimant EGFRvIII (X Liu et al., 2015). En effet, l'angiogenèse tumorale correspond à la prolifération et l'organisation aberrante des vaisseaux

sanguins généralement inefficaces pour l'apport en nutriments et en oxygène aux cellules tumorales, contribuant ainsi à l'hypoxie, aux métastases ou à l'invasion (Yadav et al., 2015). Ici, Gα15 est également associée à la surexpression de VEGFA et ANG bien connus pour leur implication dans l'agressivité des GBMs (Zhao and Adjei, 2015; Mondal et al., 2017; Treps et al., 2017; Tan et al., 2018; Hu et al., 2019). Et ces facteurs, peuvent stimuler les voies de signalisation intracellulaires telles que ERK, Akt, NF-κB, afin d'assurer la croissance et la survie des tumeurs telles que les GBMs (Gao and Xu, 2008; Goel and Mercurio, 2013; Sheng and Xu, 2016). Ainsi, Gα15 pourrait également réguler l'activation de la transcription de VEGFA et ANG *via* la voie Akt/mTOR, déjà décrite comme stabilisant l'expression de HIF-1α et favorisant l'angiogenèse (C-A Liu et al., 2018). De plus, les voies STAT3 et Wnt/β-caténine ont également été proposées comme activatrices de la sécrétion de VEGFA (Ashizawa et al., 2013; Olsen et al., 2017).

Dans l'ensemble, la sous-unité Gα15 pourrait exploiter ces différentes voies (STAT3, NF-κB, ERK, Akt, C/EBPβ) pour favoriser l'agressivité du GBM et l'acquisition du phénotype MES, associées à l'angiogenèse et au statut inflammatoire. Dans un contexte physiopathologique, les cellules inflammatoires attirées telles que les macrophages, exprimeraient également Gα15 et pourraient favoriser un microenvironnement immunosuppresseur tout en contribuant au développement de la tumeur par la sécrétion de nombreux facteurs favorisant le développement tumoral (IL-8, IL-6, IL-1β, IL-10, TGF-β, EGF, VEGFA) (Karsy et al., 2016; Roesch et al., 2018). De fait, le ciblage de cette sous-unité Gα15 non ubiquiste, dans le GBM devrait constituer une stratégie thérapeutique prometteuse.

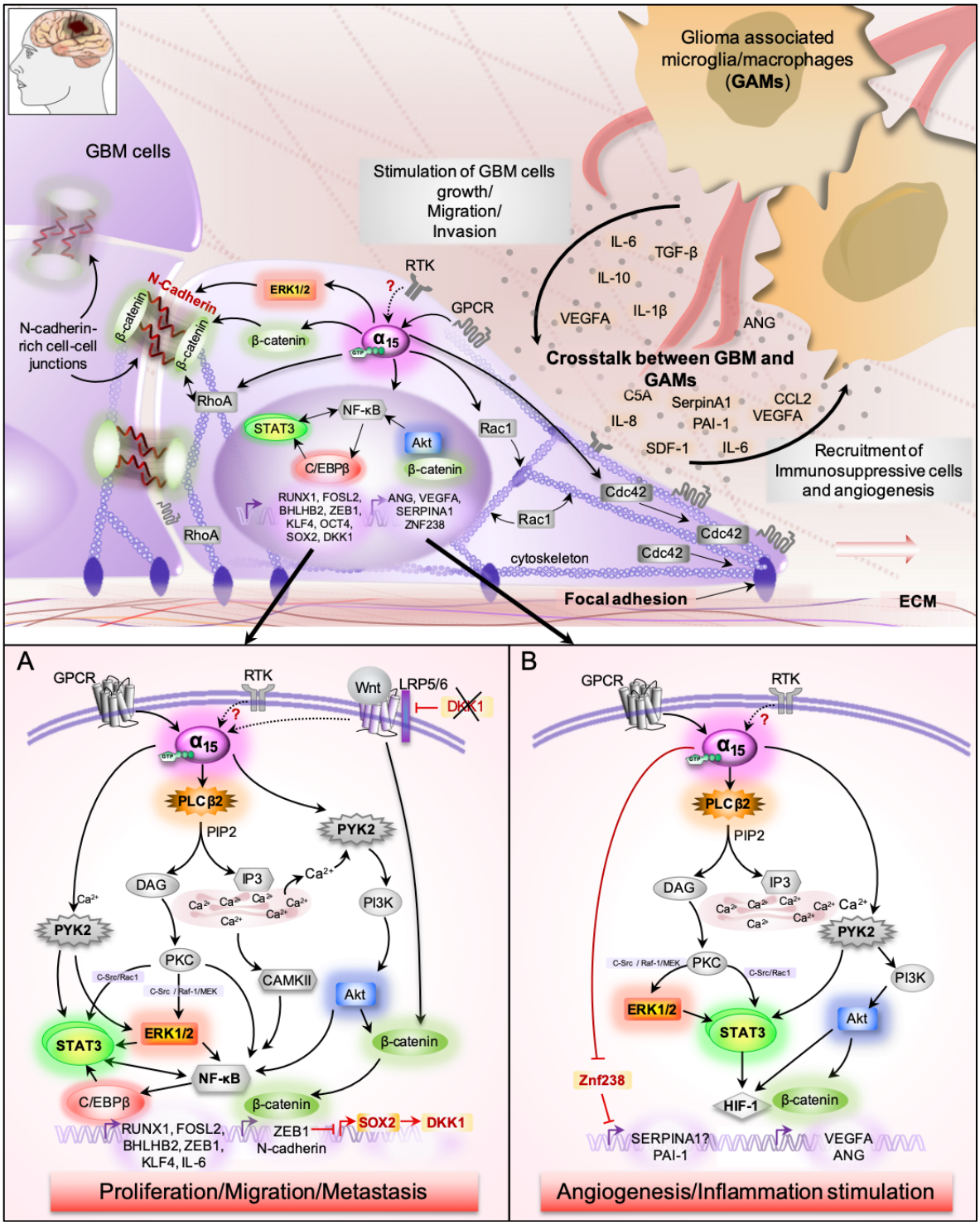


Figure 51. Schéma hypothétique résumant les potentielles voies de signalisation régulées par Gα15 pour favoriser l'agressivité des GBMs. Représentation schématique du microenvironnement du GBM montrant les interactions entre les cellules de GBM et les GAMs (*Glioma associated microglia/macrophages*). Dans des conditions physiopathologiques, nous supposons que la surexpression et l'activation de Gα15 (probablement par les RCPGs et d'autres facteurs, pas encore identifiés) régulent différents signaux oncogéniques conduisant à l'expression de principaux marqueurs mésenchymateux et potentiellement de marqueurs de cellules souches de gliome. D'une part, ces marqueurs favorisent le phénotype mésenchymateux agressif du GBM caractérisé par l'exacerbation de la capacité prolifératives, migratoire et invasive (**A**), et d'autre part, permettent l'établissement d'un microenvironnement inflammatoire et angiogenique favorisé par l'expression de facteurs

chimioattractants et angiogéniques (**B**) associés au panel des facteurs solubles secrétés par les cellules de GBM (comme SDF-1, CCL2) pour stimuler le recrutement des GAMs. Les GAMs produisent en retour des facteurs (tels que IL-10, IL-6, TGFβ, VEGFA) pour soutenir la croissance et l'invasion des GBMs. Les voies de signalisation de Gα15 proposées pour stimuler ces processus sont illustrées en **A** et **B**. Les preuves expérimentales à l'appui de ces voies sont discutées dans le texte. Les flèches indiquent l'activation et/ou l'expression. Les gènes régulés négativement par Gα15 sont indiqués en rouge. Les motifs en couleur vive/lumineuse indiquent les facteurs mis en évidence dans cette étude. ANG : angiogenin; Akt: ou PKB, proteine kinase B; BHLHB2 : Basic domain helix loop helix protein class B 1 (aussi appelé OLIG2 : Oligodendrocyte transcription factor) ; CCL2 : chemokine ligand 2; C/EBP: CCAAT-enhancer-binding proteins ; Cdc42: cell division cycle 42; DAG: diacylglycerol; DKK1 : Dickkopf-related protein 1 ; DOCK180: or DOCK1, dedicator of cytokinesis 1; ERK: extracellular signal-regulated kinases; FAK: focal adhesion kinase; HIF : hypoxia inducible factors; IL : interleukins; IP3: inositol trisphosphate; KLF4 : Kruppel-like factor 4 ; LRP5/6 : lipoprotein receptor–related proteins 5 and 6 ; MEK : MAPK/ERK kinase ; mTORC2 : *mammalian target of rapamycin complex 2* ; NF-κB : *Nuclear factor-kappa B* ; OCT4 : *octamer-binding transcription factor* 4 ; PAI-1 : *plasminogen activator inhibitor 1* ; PKC : *protein kinase C* ; PIP2 : *phosphatidylinositol bisphosphate* ; PI3K : Phosphoinositide 3-kinase ; PIX : *proteins p21-activated kinase interacting exchange factor α, β*; PLC : Phospholipase C; PYK2 : proline-rich tyrosine kinase-2 ; p63RhoGEF : p63 Rho G protein exchange factor; Rac1*: Ras-related C3 botulinum toxin substrate* 1; Raf-1 : *V-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1* ; RhoA : *Ras homolog gene* family, member A; ROCK : *Rho-associated protein kinase* ; RTK : *receptor tyrosine kinase* ; RUNX1 : *Runt-related transcription factor 1* ; SDF-1 : *stromal cell-derived factor 1* ; STAT : *signal transducers and activators of transcription* ; SOX2 : *SRY (sex determining region Y)-box 2*; TGF : *transforming growth factors* ; VEGFA : *vascular endothelial growth factor A* ; ZEB1 : *Zinc finger E-box-binding homeobox 1* ; ZNF238 : *Zinc finger protein 238*.

Conclusion et perspectives

Les GBMs sont des cancers très hétérogènes, non seulement en raison des nombreuses et différentes voies de signalisation qui contrôlent les mécanismes d'invasion et de résistance aux traitements, mais également en fonction de la localisation cérébrale de cette tumeur qui rend l'exérèse totale délicate, et des composants du microenvironnement tumoral qui favorisent un environnement immunosuppressif. Depuis une trentaine d'année, aucun traitement du GBM n'a montré un progrès très significatif en termes de survie globale pour les patients, malgré leur stratification sur la base du statut moléculaire de leur tumeur (Perrin et al., 2019). La plupart des options thérapeutiques actuelles pour le GBM ne prolonge la survie que de 2 mois par rapport à la moyenne de 14,6 mois dans le cadre du protocole de Stupp, et les défis à relever pour améliorer la survie et la qualité de vie des patients restent immenses. Ainsi, l'identification de marqueurs/cibles moléculaires exprimés de manière différentielle, qui pourrait mieux définir le comportement biologique des GBMs, fournirait une base pour le développement de thérapies innovantes et peut être plus efficaces. Dans ce contexte, nous avons identifié une signature d'expression des protéines G dans les GBMs qui contient les protéines Gαi3 et Gα15, cette dernière présentant la particularité de ne pas ou très peu être exprimée dans le tissu sain cérébral ou les gliomes de bas grade.

Nous avons donc dans cette première approche, choisi d'évaluer l'implication de la sous-unité Gα15 dans l'acquisition du phénotype MES, la prolifération et la migration de lignées de GBM, qui signent l'agressivité de ces tumeurs. Nos résultats montrent d'une part que l'expression de Gα15 est suffisante pour augmenter la capacité proliférative et migratoire des cellules *in vitro*, et d'autre part que cette sous-unité favorise l'expression et/ou l'activation de nombreux biomarqueurs primordiaux pour la transition MES, l'angiogenèse, le statut souche et potentiellement l'inflammation de deux lignées de GBM. L'inactivation de cette sous-unité dans la lignée U87 est suffisante pour améliorer la survie de souris *Nude* xénogreffées par ces lignées dans le striatum, alors que son expression exacerbée accélère la croissance tumorale et la mortalité des animaux, soulignant le rôle majeur de Gα15 dans la croissance du GBM ; et confirmant son potentiel diagnostique et thérapeutique.

Bien que ces résultats originaux ouvrent des pistes et perspectives, nos résultats actuels soulèvent plusieurs questions non élucidées, et un certain nombre d'études restent encore à être menées. La première étape pour compléter ces travaux serait de confirmer le couplage associé à l'expression de Gα15. Notamment, grâce à une protéine recombinante Gα15-YFP nous

souhaiterions mieux caractériser la localisation subcellulaire de cette sous-unité dans diverses lignées de GBM, ainsi que dans des lignées issues de patients (PDCLs) obtenues en collaboration avec le Pr Ahmed Idbai (ICM, Paris), et vérifier sa possible association à des complexes βγ par des méthodes BRET en l'absence de stimulation d'un RCPG en collaboration avec le Dr Laurent Prézeau (IGF, Montpellier). Dans ce contexte, une expression croissante de Gα15 pourrait être responsable d'activation de voies de signalisation en aval, que nous tenterons de mettre en évidence par des mesures de la production d'IP1 (Voies PLC), d'AMPc (Voies AC) et NF-κB (Kits FRET-HTRF de Cisbio International). En particulier, nous vérifierons l'implication de la PLCβ2, potentiellement la principale voie de signalisation utilisée par Gα15, mais aussi de PYK2 qui pourrait s'avérer spécifique de Gα15. Nous envisageons de sous-exprimer spécifiquement ces effecteurs (aux moins PLCβ1, PLCβ2, TPR1, PYK2) dans deux lignées de GBM (U87 et 8MG) dans lesquelles Gα15 est délétée ou surexprimée stablement puis vérifier la cascade de signalisation en aval (p-ERK, p-Akt, NF-κB-P65) et évaluer les processus cellulaires modulés par Gα15, i.e. la prolifération, l'invasion, l'adhésion et l'expression de marqueurs MES. La diminution du niveau d'expression de STAT3 en particulier dans la lignée U87 délétée du gène GNA15, suppose un rôle potentiellement oncogénique de Gα15, ou au moins transcriptionnel. Une autre possibilité d'activation de Gα15 pourrait venir des AGS indépendamment des RCPGs. A ce jour, seulement 3 AGS (AGS11-13) ont été identifiées pour Gα15 (Blumer and Lanier, 2014). La découverte d'un partenaire de liaison de Gα15, le TPR1 a permis d'ouvrir de nouvelles possibilités de régulation de la signalisation cellulaire par des protéines G en l'absence d'activation par des RCPGs. Ainsi, Gα15 peut faciliter la signalisation Ras/Raf-1/MEK/ERK et d'autre effecteurs en aval (Marty et al., 2003). De plus, la formation des complexes TFE3-Gα15 entraîne la translocation nucléaire de Gα15 et la régulation positive de protéines dans des cardiomyocytes (Sato et al., 2011). Ainsi, nous proposons de réaliser des études de co-immunoprécipitation de la sous-unité Gα15 dans les lignées U87 et 8MG et de tenter d'identifier des partenaires protéiques de cette dernière par des technique de protéomique (LS-MS) disponibles sur la plate-forme PISSARO (Rouen). Ces informations permettraient une meilleure compréhension du rôle et des mécanismes relayés par Gα15 en condition non stimulée par un RCPG.

Il apparait que l'expression de Gα15 est associée à des niveaux d'expression modifiés de marqueurs MES, et nos études de prolifération, migration et invasion ont été réalisée dans des conditions non stimulées par un ligand exogène. En situation physiopathologique de développement tumoral, le microenvironnement du GBM montre la possible présence et

influence de chimiokines et cytokines, ainsi que l'expression de leurs récepteurs incluant CXCR4, C5aR, CCR1, CCR2b ou UT qui pourraient coupler, comme d'autres RCPGs, la sous-unité Gα15. Dans ce contexte, nous planifions d'évaluer le rôle de Gα15 dans l'expression certaines cytokines/chimiokines et les mécanismes cellulaires relayés par les récepteurs chimiotactiques de type CXCR4 et UT Pour cela nous avons déjà commencé à tester l'implication de Gα15 dans l'adhésion cellulaire stimulée en réponse au SDF-1α ou l'UII dans des lignées de GBM. Comme le montrent nos résultats d'immunohistochimie révélant les protéines d'adhésion (Figure 52), la surexpression de Gα15 dans 3 lignées de GBM (U87, 8MG, 42MG) augmente significativement le nombre de complexe FA riches en paxilline après stimulation cellulaire par SDF-1 ou UII comparativement aux cellules contrôles exprimant Gα15 de manière basale. Ces résultats préliminaires suggèrent que Gα15 influence la signalisation de CXCR4 et UT permettant potentiellement un couplage additionnel et non un switch de signalisation vers Gα15 pour favoriser l'adhésion/migration cellulaire. En accord avec cette observation, une première étude réalisée en collaboration avec L. Prézeau à Montpellier, semble suggérer que la surexpression de Gα15 dans les lignées HEK-293 exprimant l'UT recombinant, diminue l'affinité et l'activation de Gαq stimulée par UII mais n'interfère pas avec les couplages de l'UT aux sous-unités Gαi et Gαo. En effet, la diminution du signal BRET telle qu'illustrée sur la figure 53 signifie l'activation de la protéine G correspondante. Ces données devront bien sûr être confortées.

Afin de mieux démontrer la boucle de signalisation STAT3-NF-κB-IL6 et le statut inflammatoire instauré par les gliomes exprimant Gα15, nous allons analyser par qPCR et Western blot l'effet de la modulation du niveau d'expression de Gα15 sur la production de cytokines/chimiokines dans les cellules de GBM et notamment IL-6, IL-8 et TNF-α ainsi que de facteurs angiogéniques. En particulier, les lignées de GBM, délétées ou sur-exprimant la sous-unité Gα15, seront testées pour leur capacités à sécréter ces facteurs dans le milieu par l'utilisation de membrane *arrays* spécifiques sur lesquelles seront déposées des lysats cellulaires ainsi que les surnageants de culture cellulaire. Dans ce contexte, les voies de signalisation citées précédemment seront évaluées afin de comprendre le rôle clé de Gα15 dans le potentiel inflammatoire des GBMs de type MES.

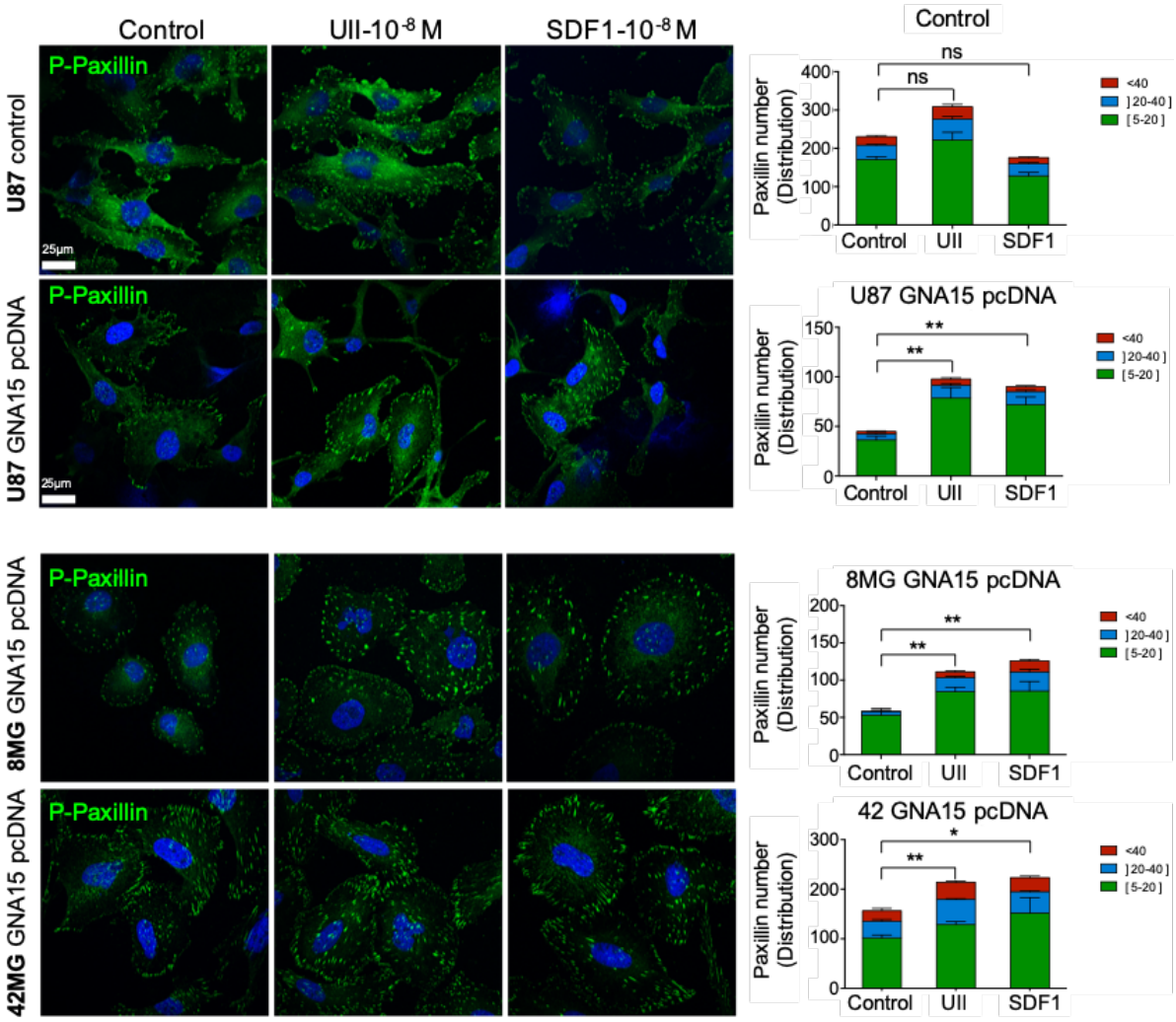


Figure 52. Gα15 favorise la formation des complexes d'adhésion focale (FA) riches en paxilline stimulée par l'UII ou SDF-1α. Après 24h d'ensemencement, les cellules ont été privées de sérum pendant 2 h puis traitées avec 10^{-8}M de SDF-1α ou UII avant immunocytochimie. La P-paxilline a été marquée avec un anticorps spécifique et les noyaux (bleus) ont été contre-colorés avec du DAPI. Les images correspondent aux acquisitions réalisées par microscopie confocale. Les complexes FA ont été divisés en trois groupes en fonction de leur taille (vert, 5 à 20 pixels^2; bleu, 20 à 40 pixels^2; rouge,> 40 pixels^2). Les histogrammes empilés représentent le nombre de complexes FA par intervalle de taille pour une expérience représentative. La signification statistique a été évaluée à l'aide du test de Mann et Whitney ; ns, non significatif ; * p <0,05 ; ** p <0,01.

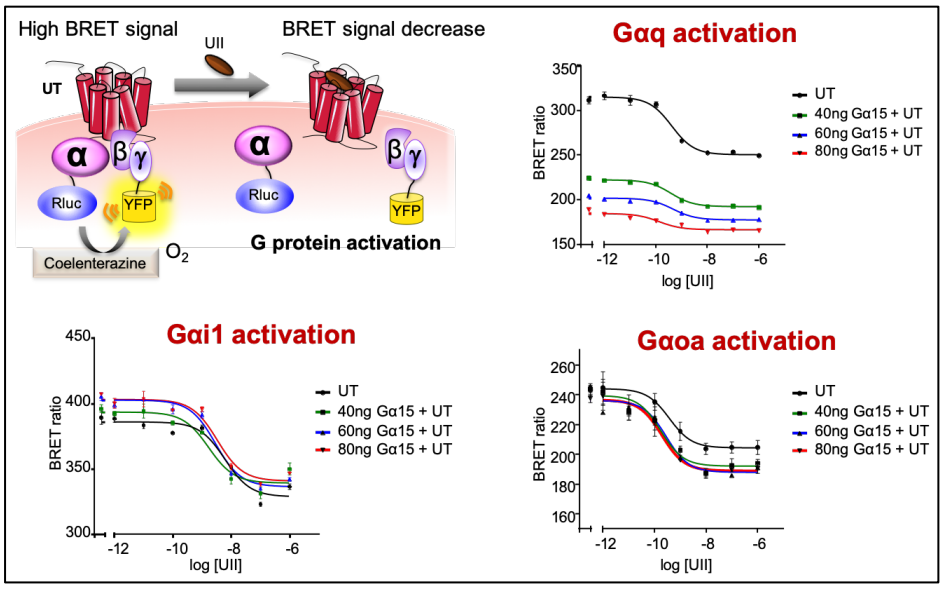


Figure 53. Effet de la surexpression de Gα15 sur l'activation de protéines G par l'UII. Les cellules HEK293 sont transfectées avec un vecteur codant le récepteur UT (40 ng) et différentes quantités de vecteur codant Gα15 (0, 40, 60 ou 80 ng) et un vecteur codant la sous-unités Gα d'intérêt (Gαq, Gαi, Gαoa) fusionnée à Rluc (*Renilla reniformis luciferase*), ainsi que Gβ2-Flag et Gγ2-YFP puis 50,000 cellules sont ensemencées par puits dans des plaques à 96 puits adaptées. 24 h après, les cellules sont rincées et traitées avec la coelenterazine et le signal basal (haut) est mesuré. Le traitement avec l'UII est appliqué et le signal BRET (qui diminue au cours du temps en cas d'activation de la protéine G d'intérêt) est exprimé sous forme de rapport de la différence d'émission YFP(530nm)/Rluc(485 nm).

L'un des aspects qui reste encore mal compris est l'implication de Gα15 dans le caractère souche des cellules de GBM. Ainsi, nous analyserons, à partir de lignées commerciales cultivées en condition souches (gliomasphères) ainsi que de PDCLs qui ont pu conserver leur statut transcriptionnel et mutationnel d'origine et cultivées sous forme de gliomasphères, le rôle des variations du niveau d'expression de Gα15 (siRNA ou surexpression) dans l'expression d'un grand panel de marqueurs de GSC incluant les marqueurs souches membranaires (CD133, CD44, A2B5, Notch1, intégrine α6) et les marqueurs souches intracellulaires (Nestine, Nanog, C-myc en plus de SOX2 et OCT4). Nous avons déjà tenté d'évaluer la capacité des cellules Gα15-KO (U87) à former des gliomasphères en culture à partir de cellules adhérentes. Nos premiers résultats suggèrent que le nombre de sphères de taille moyenne et grande est significativement plus faible lorsque Gα15 est inactivée alors que les gliomasphères de petite taille sont par contre très nombreuses par rapport aux cellules contrôles (Figure 54) suggérant que Gα15 favorise le phénotype de GSC ainsi que leur prolifération. Nous devons poursuivre afin de vérifier si Gα15 constitue un marqueur de GSC et si cette sous-unité joue un rôle essentiel dans la migration et la résistance aux traitements des GSCs métamorphiques.

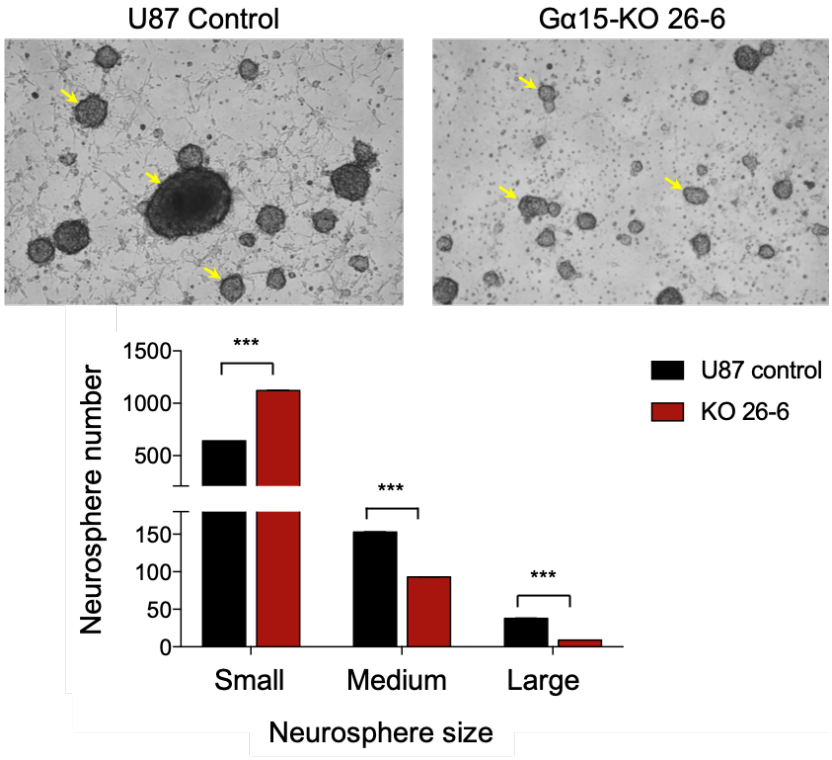


Figure 54. Gα15 semble favoriser le phénotype souche des GBMs en stimulant la croissance en gliomasphères. Brièvement, les cellules ont été comptées et ensemencées (400000 cellules) dans du milieu de culture de neurosphères (DMEM-F12, 2% du supplément B27, 20 ng/mL de bFGF et EGF). La formation des neurosphères a été suivie pendant 20 jours puis le nombre de neurosphères dans chaque interval de taille a été évalué sur Image J. Small size : ≤109876 pixel^2 ; Large size : ≥542172 pixel^2. Les histogrammes représentent la moyenne ± SEM du nombre de neurosphères à partir d'une expérience (55 acquisitions différentes par condition).

Enfin, dans le cadre de ce travail, l'analyse des cerveaux de souris *Nudes* xenogreffées de manière orthotopique avec des cellules de GBM sur-exprimant ou délétées du gène GNA15 n'a pu être réalisée. Pour comprendre les mécanismes relayés par Gα15, en plus de la série menée pour évaluer la survie des animaux, j'ai déjà réalisé une série d'injection de lignées U87 sauvage, KO-Gα15 et pLenti-Gα15 dans le cerveau de souris *Nude*, mais réalisé le sacrifice des animaux à 15 jours post-injection. Des études d'immunohistochimie sur ces cerveaux permettront de déterminer l'effet de la sur- et sous-expression de Gα15 *in vivo*, sur l'expansion tumorale, le niveau de prolifération (Ki67), l'expression de marqueurs MES (N-cadhérine, β-caténine, MMP-9) l'hypoxie (CAIX, HIF-1), l'angiogenèse (VEGFA, Serpines) avec le statut vasculaire à l'aide d'un anti-CD31, ainsi que des marqueurs de cellules souches (Nanog, Nestin, CD44, CD133, Integrin-α6, OCT4, SOX2, KLF4). L'inflammation sera aussi évaluée avec l'expression de marqueurs CD4+, CD8+ CD34, IL-8, IL-6, ou TNF-α, et l'invasion macrophagique et microgliale, ainsi que par les astrocytes réactifs. Ensemble, ces données nous

permettront de révéler les mécanismes induits par Gα15 qui contrôlent la croissance des GBMs et impactent la survie des animaux.

A ce jour, ce travail original met en évidence le rôle d'une protéine G dans le développement de GBMs, et indique le rôle majeur de Gα15 dans le caractère MES et l'agressivité des GBMs. Cette étude propose de placer cette sous-unité comme un potentiel marqueur diagnostic du statut inflammatoire d'un GBM, et en tant que potentielle cible thérapeutique des GBMs mésenchymateux.

Références bibliographiques

Abu-Taha IH, Heijman J, Feng Y, Vettel C, Dobrev D, Wieland T. 2018. Regulation of heterotrimeric G-protein signaling by NDPK/NME proteins and caveolins: an update. *Lab Invest* **98**(2): 190–197. doi: 10.1038/labinvest.2017.103

Afifiyan N, Tillman B, French BA, Sweeny O, Masouminia M, Samadzadeh S, French SW. 2017. The role of Tec kinase signaling pathways in the development of Mallory Denk Bodies in balloon cells in alcoholic hepatitis. *Exp Mol Pathol* **103**(2): 191–199. doi: 10.1016/j.yexmp.2017.09.001

Agnihotri S, Burrell KE, Wolf A, Jalali S, Hawkins C, Rutka JT, Zadeh G. 2013. Glioblastoma, a brief review of history, molecular genetics, animal models and novel therapeutic strategies. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **61**(1): 25–41. doi: 10.1007/s00005-012-0203-0

Aittaleb M, Boguth CA, Tesmer JJG. 2010. Structure and function of heterotrimeric G protein-regulated Rho guanine nucleotide exchange factors. *Mol Pharmacol* **77**(2): 111–125. doi: 10.1124/mol.109.061234

Albarrán-Juárez J, Gilsbach R, Piekorz RP, Pexa K, Beetz N, Schneider J, Nürnberg B, Birnbaumer L, Hein L. 2009. Modulation of α2-Adrenoceptor Functions by Heterotrimeric Gαi Protein Isoforms. *J Pharmacol Exp Ther* **331**(1): 35–44. doi: 10.1124/jpet.109.157230

Albini A, Bruno A, Noonan DM, Mortara L. 2018. Contribution to Tumor Angiogenesis From Innate Immune Cells Within the Tumor Microenvironment: Implications for Immunotherapy. *Front Immunol* **9**: 527. doi: 10.3389/fimmu.2018.00527

Aldape K, Brindle KM, Chesler L, Chopra R, Gajjar A, Gilbert MR, Gottardo N, Gutmann DH, Hargrave D, Holland EC, et al. 2019. Challenges to curing primary brain tumours. *Nat Rev Clin Oncol* **16**(8): 509–520. doi: 10.1038/s41571-019-0177-5

Al-Juboori SI, Vadakekolathu J, Idri S, Wagner S, Zafeiris D, Pearson JR, Almshayakhchi R, Caraglia M, Desiderio V, Miles AK, et al. 2019. PYK2 promotes HER2-positive breast cancer invasion. *J Exp Clin Cancer Res* **38**(1): 210. doi: 10.1186/s13046-019-1221-0

Amatruda TT, Steele DA, Slepak VZ, Simon MI. 1991. G alpha 16, a G protein alpha subunit specifically expressed in hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**(13): 5587–5591.

Amirian ES, Armstrong GN, Zhou R, Lau CC, Claus EB, Barnholtz-Sloan JS, Il'yasova D, Schildkraut J, Ali-Osman F, Sadetzki S, et al. 2016. The Glioma International Case-Control Study: A Report From the Genetic Epidemiology of Glioma International Consortium. *Am J Epidemiol* **183**(2): 85–91. doi: 10.1093/aje/kwv235

Aoki T, Narumiya S. 2017. Prostaglandin E2-EP2 signaling as a node of chronic inflammation in the colon tumor microenvironment. *Inflamm Regen* **37**: 4. doi: 10.1186/s41232-017-0036-7

Appin CL, Brat DJ. 2015. Molecular pathways in gliomagenesis and their relevance to neuropathologic diagnosis. *Adv Anat Pathol* **22**(1): 50–58. doi: 10.1097/PAP.0000000000000048

Aragay AM, Quick MW. 1999. Functional regulation of Galpha16 by protein kinase C. *J Biol Chem* **274**(8): 4807–4815.

Ardito F, Giuliani M, Perrone D, Troiano G, Lo Muzio L. 2017. The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review). *Int J Mol Med* **40**(2): 271–280. doi: 10.3892/ijmm.2017.3036

Armento A, Ehlers J, Schötterl S, Naumann U. 2017. Molecular Mechanisms of Glioma Cell Motility. In: De Vleeschouwer S, editor. *Glioblastoma*. Brisbane (AU): Codon Publications. Available at http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470001/. Accessed 2019 Sep 10.

Ashizawa T, Miyata H, Iizuka A, Komiyama M, Oshita C, Kume A, Nogami M, Yagoto M, Ito I, Oishi

T, et al. 2013. Effect of the STAT3 inhibitor STX-0119 on the proliferation of cancer stem-like cells derived from recurrent glioblastoma. *Int J Oncol* **43**(1): 219–227. doi: 10.3892/ijo.2013.1916

Askew DJ, Silverman GA. 2008. Intracellular and extracellular serpins modulate lung disease. *J Perinatol* **28 Suppl 3**: S127-135. doi: 10.1038/jp.2008.150

Atherton P, Stutchbury B, Wang D-Y, Jethwa D, Tsang R, Meiler-Rodriguez E, Wang P, Bate N, Zent R, Barsukov IL, et al. 2015. Vinculin controls talin engagement with the actomyosin machinery. *Nat Commun* **6**: 10038. doi: 10.1038/ncomms10038

Attwood TK, Findlay JB. 1994. Fingerprinting G-protein-coupled receptors. *Protein Eng* **7**(2): 195–203. doi: 10.1093/protein/7.2.195

Aubry M, de Tayrac M, Etcheverry A, Clavreul A, Saikali S, Menei P, Mosser J. 2015. From the core to beyond the margin: a genomic picture of glioblastoma intratumor heterogeneity. *Oncotarget* **6**(14): 12094–12109. doi: 10.18632/oncotarget.3297

Audet M, Bouvier M. 2012. Restructuring G-protein- coupled receptor activation. *Cell* **151**(1): 14–23. doi: 10.1016/j.cell.2012.09.003

Avasarala S, Bikkavilli RK, Van Scoyk M, Zhang W, Lapite A, Hostetter L, Byers JT, Heasley LE, Sohn JW, Winn RA. 2013. Heterotrimeric G-Protein, Gα16, Is a Critical Downstream Effector of Non-Canonical Wnt Signaling and a Potent Inhibitor of Transformed Cell Growth in Non Small Cell Lung Cancer. Deb S, editor. *PLoS ONE* **8**(10): e76895. doi: 10.1371/journal.pone.0076895

Ayoub MA, Damian M, Gespach C, Ferrandis E, Lavergne O, De Wever O, Banères J-L, Pin J-P, Prévost GP. 2009. Inhibition of heterotrimeric G protein signaling by a small molecule acting on Galpha subunit. *J Biol Chem* **284**(42): 29136–29145. doi: 10.1074/jbc.M109.042333

Ayoub MA, Trinquet E, Pfleger KDG, Pin J-P. 2010. Differential association modes of the thrombin receptor PAR1 with Galphai1, Galpha12, and beta-arrestin 1. *FASEB J* **24**(9): 3522–3535. doi: 10.1096/fj.10-154997

Azpiazu I, Cruzblanca H, Li P, Linder M, Zhuo M, Gautam N. 1999. A G protein gamma subunit-specific peptide inhibits muscarinic receptor signaling. *J Biol Chem* **274**(50): 35305–35308. doi: 10.1074/jbc.274.50.35305

Baan R, Grosse Y, Lauby-Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Islami F, Galichet L, Straif K, et al. 2011. Carcinogenicity of radiofrequency electromagnetic fields. *Lancet Oncol* **12**(7): 624–626.

Babaie Y, Herwig R, Greber B, Brink TC, Wruck W, Groth D, Lehrach H, Burdon T, Adjaye J. 2007. Analysis of Oct4-dependent transcriptional networks regulating self-renewal and pluripotency in human embryonic stem cells. *Stem Cells* **25**(2): 500–510. doi: 10.1634/stemcells.2006-0426

Bach TL, Chen Q-M, Kerr WT, Wang Y, Lian L, Choi JK, Wu D, Kazanietz MG, Koretzky GA, Zigmond S, et al. 2007. Phospholipase cbeta is critical for T cell chemotaxis. *J Immunol* **179**(4): 2223–2227. doi: 10.4049/jimmunol.179.4.2223

Bajetto A, Barbieri F, Dorcaratto A, Barbero S, Daga A, Porcile C, Ravetti JL, Zona G, Spaziante R, Corte G, et al. 2006. Expression of CXC chemokine receptors 1-5 and their ligands in human glioma tissues: role of CXCR4 and SDF1 in glioma cell proliferation and migration. *Neurochem Int* **49**(5): 423–432. doi: 10.1016/j.neuint.2006.03.003

Baltensperger K, Porzig H. 1997. The P2U purinoceptor obligatorily engages the heterotrimeric G protein G16 to mobilize intracellular Ca2+ in human erythroleukemia cells. *J Biol Chem* **272**(15): 10151–10159.

Baltoumas FA, Theodoropoulou MC, Hamodrakas SJ. 2013. Interactions of the α-subunits of heterotrimeric G-proteins with GPCRs, effectors and RGS proteins: a critical review and analysis of interacting surfaces, conformational shifts, structural diversity and electrostatic potentials. *J Struct Biol* **182**(3): 209–218. doi: 10.1016/j.jsb.2013.03.004

Barnes JM, Przybyla L, Weaver VM. 2017. Tissue mechanics regulate brain development, homeostasis and disease. *J Cell Sci* **130**(1): 71–82. doi: 10.1242/jcs.191742

Basheer HA, Pakanavicius E, Cooper PA, Shnyder SD, Martin L, Hunter KD, Vinader V, Afarinkia K. 2018. Hypoxia modulates CCR7 expression in head and neck cancers. *Oral Oncol* **80**: 64–73. doi: 10.1016/j.oraloncology.2018.03.014

Basu A, Pal D. 2010. Two faces of protein kinase Cδ: the contrasting roles of PKCδ in cell survival and cell death. *ScientificWorldJournal* **10**: 2272–2284. doi: 10.1100/tsw.2010.214

Basu A, Sivaprasad U. 2007. Protein kinase Cepsilon makes the life and death decision. *Cell Signal* **19**(8): 1633–1642. doi: 10.1016/j.cellsig.2007.04.008

Batchelor TT, Mulholland P, Neyns B, Nabors LB, Campone M, Wick A, Mason W, Mikkelsen T, Phuphanich S, Ashby LS, et al. 2013. Phase III randomized trial comparing the efficacy of cediranib as monotherapy, and in combination with lomustine, versus lomustine alone in patients with recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol* **31**(26): 3212–3218. doi: 10.1200/JCO.2012.47.2464

Bayin NS, Frenster JD, Kane JR, Rubenstein J, Modrek AS, Baitalmal R, Dolgalev I, Rudzenski K, Scarabottolo L, Crespi D, et al. 2016. GPR133 (ADGRD1), an adhesion G-protein-coupled receptor, is necessary for glioblastoma growth. *Oncogenesis* **5**(10): e263. doi: 10.1038/oncsis.2016.63

Beier D, Schulz JB, Beier CP. 2011. Chemoresistance of glioblastoma cancer stem cells--much more complex than expected. *Mol Cancer* **10**: 128. doi: 10.1186/1476-4598-10-128

Belcheva MM, Coscia CJ. 2002. Diversity of G protein-coupled receptor signaling pathways to ERK/MAP kinase. *Neurosignals* **11**(1): 34–44. doi: 10.1159/000057320

Benson VS, Pirie K, Schüz J, Reeves GK, Beral V, Green J, Million Women Study Collaborators. 2013. Mobile phone use and risk of brain neoplasms and other cancers: prospective study. *Int J Epidemiol* **42**(3): 792–802. doi: 10.1093/ije/dyt072

Berridge MJ. 2014. Module 2: Cell Signalling Pathways. *Cell Signalling Biology* **6**: csb0001002. doi: 10.1042/csb0001002

Bertagnolo V, Benedusi M, Brugnoli F, Lanuti P, Marchisio M, Querzoli P, Capitani S. 2007. Phospholipase C-beta 2 promotes mitosis and migration of human breast cancer-derived cells. *Carcinogenesis* **28**(8): 1638–1645. doi: 10.1093/carcin/bgm078

Bertagnolo V, Benedusi M, Querzoli P, Pedriali M, Magri E, Brugnoli F, Capitani S. 2006. PLC-beta2 is highly expressed in breast cancer and is associated with a poor outcome: a study on tissue microarrays. *Int J Oncol* **28**(4): 863–872.

Bertaut A, Truntzer C, Madkouri R, Kaderbhai CG, Derangère V, Vincent J, Chauffert B, Aubriot-Lorton MH, Farah W, Mourier KL, et al. 2016. Blood baseline neutrophil count predicts bevacizumab efficacy in glioblastoma. *Oncotarget* **7**(43): 70948–70958. doi: 10.18632/oncotarget.10898

Bessa C, Soares J, Raimundo L, Loureiro JB, Gomes C, Reis F, Soares ML, Santos D, Dureja C, Chaudhuri SR, et al. 2018. Discovery of a small-molecule protein kinase Cδ-selective activator with promising application in colon cancer therapy. *Cell Death Dis* **9**(2): 23. doi: 10.1038/s41419-017-0154-9

Bhat KPL, Balasubramaniyan V, Vaillant B, Ezhilarasan R, Hummelink K, Hollingsworth F, Wani K, Heathcock L, James JD, Goodman LD, et al. 2013. Mesenchymal differentiation mediated

by NF-κB promotes radiation resistance in glioblastoma. *Cancer Cell* **24**(3): 331–346. doi: 10.1016/j.ccr.2013.08.001

Bian D, Mahanivong C, Yu J, Frisch SM, Pan ZK, Ye RD, Huang S. 2006. The G12/13-RhoA signaling pathway contributes to efficient lysophosphatidic acid-stimulated cell migration. *Oncogene* **25**(15): 2234–2244. doi: 10.1038/sj.onc.1209261

Bickler SW, Lizardo E, Cauvi DM, De Maio A. 2016. The transition from a rural to an urban environment in Africa alters G protein-coupled receptor signaling. *Med Hypotheses* **95**: 49–53. doi: 10.1016/j.mehy.2016.08.004

van Biesen T, Luttrell LM, Hawes BE, Lefkowitz RJ. 1996. Mitogenic signaling via G protein-coupled receptors. *Endocr Rev* **17**(6): 698–714. doi: 10.1210/edrv-17-6-698

Birnbaumer L. 2007. Expansion of signal transduction by G proteins. The second 15 years or so: from 3 to 16 alpha subunits plus betagamma dimers. *Biochim Biophys Acta* **1768**(4): 772–793. doi: 10.1016/j.bbamem.2006.12.002

Blahos J, Fischer T, Brabet I, Stauffer D, Rovelli G, Bockaert J, Pin JP. 2001. A novel site on the Galpha -protein that recognizes heptahelical receptors. *J Biol Chem* **276**(5): 3262–3269. doi: 10.1074/jbc.M004880200

Block H, Stadtmann A, Riad D, Rossaint J, Sohlbach C, Germena G, Wu D, Simon SI, Ley K, Zarbock A. 2016. Gnb isoforms control a signaling pathway comprising Rac1, Plcβ2, and Plcβ3 leading to LFA-1 activation and neutrophil arrest in vivo. *Blood* **127**(3): 314–324. doi: 10.1182/blood-2015-06-651034

Blumer JB, Lanier SM. 2014. Activators of G protein signaling exhibit broad functionality and define a distinct core signaling triad. *Mol Pharmacol* **85**(3): 388–396. doi: 10.1124/mol.113.090068

Blumer JB, Smrcka AV, Lanier SM. 2007. Mechanistic pathways and biological roles for receptor-independent activators of G-protein signaling. *Pharmacol Ther* **113**(3): 488–506. doi: 10.1016/j.pharmthera.2006.11.001

Boissan M, Dabernat S, Peuchant E, Schlattner U, Lascu I, Lacombe M-L. 2009. The mammalian Nm23/NDPK family: from metastasis control to cilia movement. *Mol Cell Biochem* **329**(1–2): 51–62. doi: 10.1007/s11010-009-0120-7

Bondar A, Lazar J. 2014. Dissociated GαGTP and Gβγ protein subunits are the major activated form of heterotrimeric Gi/o proteins. *J Biol Chem* **289**(3): 1271–1281. doi: 10.1074/jbc.M113.493643

Boussiotis VA, Charest A. 2018. Immunotherapies for malignant glioma. *Oncogene* **37**(9): 1121–1141. doi: 10.1038/s41388-017-0024-z

Boyer JL, Waldo GL, Harden TK. 1992. Beta gamma-subunit activation of G-protein-regulated phospholipase C. *J Biol Chem* **267**(35): 25451–25456.

Brandes AA, Carpentier AF, Kesari S, Sepulveda-Sanchez JM, Wheeler HR, Chinot O, Cher L, Steinbach JP, Capper D, Specenier P, et al. 2016. A Phase II randomized study of galunisertib monotherapy or galunisertib plus lomustine compared with lomustine monotherapy in patients with recurrent glioblastoma. *Neuro-oncology* **18**(8): 1146–1156. doi: 10.1093/neuonc/now009

Brandes AA, Tosoni A, Basso U, Reni M, Valduga F, Monfardini S, Amistà P, Nicolardi L, Sotti G, Ermani M. 2004. Second-line chemotherapy with irinotecan plus carmustine in glioblastoma recurrent or progressive after first-line temozolomide chemotherapy: a phase II study of the Gruppo Italiano Cooperativo di Neuro-Oncologia (GICNO). *J Clin Oncol* **22**(23): 4779–4786. doi: 10.1200/JCO.2004.06.181

Bravo-Cordero JJ, Magalhaes MAO, Eddy RJ, Hodgson L, Condeelis J. 2013. Functions of cofilin in cell locomotion and invasion. *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**(7): 405–415. doi: 10.1038/nrm3609

Brugnera E, Haney L, Grimsley C, Lu M, Walk SF, Tosello-Trampont A-C, Macara IG, Madhani H, Fink GR, Ravichandran KS. 2002. Unconventional Rac-GEF activity is mediated through the Dock180-ELMO complex. *Nat Cell Biol* **4**(8): 574–582. doi: 10.1038/ncb824

Brugnoli F, Grassilli S, Al-Qassab Y, Capitani S, Bertagnolo V. 2016. PLC-β2 is modulated by low oxygen availability in breast tumor cells and plays a phenotype dependent role in their hypoxia-related malignant potential. *Mol Carcinog* **55**(12): 2210–2221. doi: 10.1002/mc.22462

Bryan L, Paugh BS, Kapitonov D, Wilczynska KM, Alvarez SM, Singh SK, Milstien S, Spiegel S, Kordula T. 2008. Sphingosine-1-phosphate and interleukin-1 independently regulate plasminogen activator inhibitor-1 and urokinase-type plasminogen activator receptor expression in glioblastoma cells: implications for invasiveness. *Mol Cancer Res* **6**(9): 1469–1477. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-08-0082

Bu X, Zhao C, Dai X. 2011. Involvement of COX-2/PGE(2) Pathway in the Upregulation of MMP-9 Expression in Pancreatic Cancer. *Gastroenterol Res Pract* **2011**: 214269. doi: 10.1155/2011/214269

Buck E, Iyengar R. 2001. Modular design of Gbeta as the basis for reversible specificity in effector stimulation. *J Biol Chem* **276**(38): 36014–36019. doi: 10.1074/jbc.M103228200

Buck E, Li J, Chen Y, Weng G, Scarlata S, Iyengar R. 1999. Resolution of a signal transfer region from a general binding domain in gbeta for stimulation of phospholipase C-beta2. *Science* **283**(5406): 1332–1335. doi: 10.1126/science.283.5406.1332

Buck E, Schatz P, Scarlata S, Iyengar R. 2002. Role of dynamic interactions in effective signal transfer for Gbeta stimulation of phospholipase C-beta 2. *J Biol Chem* **277**(51): 49707–49715. doi: 10.1074/jbc.M205553200

Buckner J, Giannini C, Eckel-Passow J, Lachance D, Parney I, Laack N, Jenkins R. 2017. Management of diffuse low-grade gliomas in adults - use of molecular diagnostics. *Nat Rev Neurol* **13**(6): 340–351. doi: 10.1038/nrneurol.2017.54

Buhl AM, Johnson NL, Dhanasekaran N, Johnson GL. 1995. G alpha 12 and G alpha 13 stimulate Rho-dependent stress fiber formation and focal adhesion assembly. *J Biol Chem* **270**(42): 24631–24634. doi: 10.1074/jbc.270.42.24631

Bunce CM, Khanim FL. 2018. The “known-knowns”, and “known-unknowns” of extracellular Nm23-H1/NDPK proteins. *Lab Invest* **98**(5): 602–608. doi: 10.1038/s41374-017-0012-5

Bünemann M, Frank M, Lohse MJ. 2003. Gi protein activation in intact cells involves subunit rearrangement rather than dissociation. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**(26): 16077–16082. doi: 10.1073/pnas.2536719100

Cacace AM, Ueffing M, Philipp A, Han EK, Kolch W, Weinstein IB. 1996. PKC epsilon functions as an oncogene by enhancing activation of the Raf kinase. *Oncogene* **13**(12): 2517–2526.

Caja L, Bellomo C, Moustakas A. 2015. Transforming growth factor β and bone morphogenetic protein actions in brain tumors. *FEBS Lett* **589**(14): 1588–1597. doi: 10.1016/j.febslet.2015.04.058

Cameron AJ, Procyk KJ, Leitges M, Parker PJ. 2008. PKC alpha protein but not kinase activity is critical for glioma cell proliferation and survival. *Int J Cancer* **123**(4): 769–779. doi: 10.1002/ijc.23560

Cancer Genome Atlas Research Network, Brat DJ, Verhaak RGW, Aldape KD, Yung WKA, Salama SR, Cooper LAD, Rheinbay E, Miller CR, Vitucci M, et al. 2015. Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas. *N Engl J Med* **372**(26): 2481–2498. doi: 10.1056/NEJMoa1402121

Cao J, Liu J, Long J, Fu J, Huang L, Li J, Liu C, Zhang X, Yan Y. 2017. microRNA-23b suppresses epithelial-mesenchymal transition (EMT) and metastasis in hepatocellular carcinoma via targeting Pyk2. *Biomed Pharmacother* **89**: 642–650. doi: 10.1016/j.biopha.2017.02.030

Carisey A, Ballestrem C. 2011. Vinculin, an adapter protein in control of cell adhesion signalling. *Eur J Cell Biol* **90**(2–3): 157–163. doi: 10.1016/j.ejcb.2010.06.007

do Carmo A, Balça-Silva J, Matias D, Lopes MC. 2013. PKC signaling in glioblastoma. *Cancer Biol Ther* **14**(4): 287–294. doi: 10.4161/cbt.23615

Carnero A, Lleonart M. 2016. The hypoxic microenvironment: A determinant of cancer stem cell evolution. *Bioessays* **38 Suppl 1**: S65-74. doi: 10.1002/bies.201670911

Carro MS, Lim WK, Alvarez MJ, Bollo RJ, Zhao X, Snyder EY, Sulman EP, Anne SL, Doetsch F, Colman H, et al. 2010. The transcriptional network for mesenchymal transformation of brain tumours. *Nature* **463**(7279): 318–325. doi: 10.1038/nature08712

Castel H, Desrues L, Joubert J-E, Tonon M-C, Prézeau L, Chabbert M, Morin F, Gandolfo P. 2017. The G Protein-Coupled Receptor UT of the Neuropeptide Urotensin II Displays Structural and Functional Chemokine Features. *Front Endocrinol (Lausanne)* **8**: 76. doi: 10.3389/fendo.2017.00076

Castellone MD, Teramoto H, Williams BO, Druey KM, Gutkind JS. 2005. Prostaglandin E2 promotes colon cancer cell growth through a Gs-axin-beta-catenin signaling axis. *Science* **310**(5753): 1504–1510. doi: 10.1126/science.1116221

Ceccarelli M, Barthel FP, Malta TM, Sabedot TS, Salama SR, Murray BA, Morozova O, Newton Y, Radenbaugh A, Pagnotta SM, et al. 2016. Molecular Profiling Reveals Biologically Discrete Subsets and Pathways of Progression in Diffuse Glioma. *Cell* **164**(3): 550–563. doi: 10.1016/j.cell.2015.12.028

Cervantes-Villagrana RD, Adame-García SR, García-Jiménez I, Color-Aparicio VM, Beltrán-Navarro YM, König GM, Kostenis E, Reyes-Cruz G, Gutkind JS, Vázquez-Prado J. 2019. Gβγ signaling to the chemotactic effector P-REX1 and mammalian cell migration is directly regulated by Gαq and Gα13 proteins. *J Biol Chem* **294**(2): 531–546. doi: 10.1074/jbc.RA118.006254

Chakrabarti S, Gintzler AR. 2003. Phosphorylation of Gbeta is augmented by chronic morphine and enhances Gbetagamma stimulation of adenylyl cyclase activity. *Brain Res Mol Brain Res* **119**(2): 144–151.

Chakravorty D, Assmann SM. 2018. G protein subunit phosphorylation as a regulatory mechanism in heterotrimeric G protein signaling in mammals, yeast, and plants. *Biochem J* **475**(21): 3331–3357. doi: 10.1042/BCJ20160819

Chandrika G, Natesh K, Ranade D, Chugh A, Shastry P. 2016. Suppression of the invasive potential of Glioblastoma cells by mTOR inhibitors involves modulation of NFκB and PKC-α signaling. *Sci Rep* **6**: 22455. doi: 10.1038/srep22455

Chang AL, Miska J, Wainwright DA, Dey M, Rivetta CV, Yu D, Kanojia D, Pituch KC, Qiao J, Pytel P, et al. 2016. CCL2 Produced by the Glioma Microenvironment Is Essential for the Recruitment of Regulatory T Cells and Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Res* **76**(19): 5671–5682. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0144

Chang L, Su J, Jia X, Ren H. 2014. Treating malignant glioma in Chinese patients: update on temozolomide. *Onco Targets Ther* **7**: 235–244. doi: 10.2147/OTT.S41336

Chang N, Ahn SH, Kong D-S, Lee HW, Nam D-H. 2017. The role of STAT3 in glioblastoma progression through dual influences on tumor cells and the immune microenvironment. *Mol Cell Endocrinol* **451**: 53–65. doi: 10.1016/j.mce.2017.01.004

Chantaravisoot N, Wongkongkathep P, Loo JA, Mischel PS, Tamanoi F. 2015. Significance of filamin A in mTORC2 function in glioblastoma. *Mol Cancer* **14**: 127. doi: 10.1186/s12943-015-0396-z

Chen CA, Manning DR. 2001. Regulation of G proteins by covalent modification. *Oncogene* **20**(13): 1643–1652. doi: 10.1038/sj.onc.1204185

Chen Z, Hambardzumyan D. 2018. Immune Microenvironment in Glioblastoma Subtypes. *Front Immunol* **9**: 1004. doi: 10.3389/fimmu.2018.01004

Cherfils J, Chabre M. 2003. Activation of G-protein Galpha subunits by receptors through Galpha-Gbeta and Galpha-Ggamma interactions. *Trends Biochem Sci* **28**(1): 13–17.

Cherry AE, Stella N. 2014. G protein-coupled receptors as oncogenic signals in glioma: emerging therapeutic avenues. *Neuroscience* **278**: 222–236. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.08.015

Chinot OL, Wick W, Mason W, Henriksson R, Saran F, Nishikawa R, Carpentier AF, Hoang-Xuan K, Kavan P, Cernea D, et al. 2014. Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med* **370**(8): 709–722. doi: 10.1056/NEJMoa1308345

Chittaranjan S, Chan S, Yang C, Yang KC, Chen V, Moradian A, Firme M, Song J, Go NE, Blough MD, et al. 2014. Mutations in CIC and IDH1 cooperatively regulate 2-hydroxyglutarate levels and cell clonogenicity. *Oncotarget* **5**(17): 7960–7979. doi: 10.18632/oncotarget.2401

Choe H-W, Kim YJ, Park JH, Morizumi T, Pai EF, Krauss N, Hofmann KP, Scheerer P, Ernst OP. 2011. Crystal structure of metarhodopsin II. *Nature* **471**(7340): 651–655. doi: 10.1038/nature09789

Choi CK, Vicente-Manzanares M, Zareno J, Whitmore LA, Mogilner A, Horwitz AR. 2008. Actin and alpha-actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner. *Nat Cell Biol* **10**(9): 1039–1050. doi: 10.1038/ncb1763

Chow CR, Ebine K, Knab LM, Bentrem DJ, Kumar K, Munshi HG. 2016. Cancer Cell Invasion in Three-dimensional Collagen Is Regulated Differentially by Gα13 Protein and Discoidin Domain Receptor 1-Par3 Protein Signaling. *J Biol Chem* **291**(4): 1605–1618. doi: 10.1074/jbc.M115.669606

Chow K-H, Park HJ, George J, Yamamoto K, Gallup AD, Graber JH, Chen Y, Jiang W, Steindler DA, Neilson EG, et al. 2017. S100A4 Is a Biomarker and Regulator of Glioma Stem Cells That Is Critical for Mesenchymal Transition in Glioblastoma. *Cancer Res* **77**(19): 5360–5373. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-1294

Chuang Y-Y, Tran NL, Rusk N, Nakada M, Berens ME, Symons M. 2004. Role of synaptojanin 2 in glioma cell migration and invasion. *Cancer Res* **64**(22): 8271–8275. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-2097

Ciarkowski J, Witt M, Slusarz R. 2005. A hypothesis for GPCR activation. *J Mol Model* **11**(4–5): 407–415. doi: 10.1007/s00894-005-0270-9

Cismowski MJ, Lanier SM. 2005. Activation of heterotrimeric G-proteins independent of a G-protein coupled receptor and the implications for signal processing. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **155**: 57–80. doi: 10.1007/s10254-005-0042-z

Civciristov S, Ellisdon AM, Suderman R, Pon CK, Evans BA, Kleifeld O, Charlton SJ, Hlavacek WS, Canals M, Halls ML. 2018. Preassembled GPCR signaling complexes mediate distinct cellular responses to ultralow ligand concentrations. *Sci Signal* **11**(551). doi: 10.1126/scisignal.aan1188

Clapham DE, Neer EJ. 1993. New roles for G-protein beta gamma-dimers in transmembrane signalling. *Nature* **365**(6445): 403–406. doi: 10.1038/365403a0

Clapham DE, Neer EJ. 1997. G protein beta gamma subunits. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **37**: 167–203. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.37.1.167

Clark MJ, Harrison C, Zhong H, Neubig RR, Traynor JR. 2003. Endogenous RGS protein action modulates mu-opioid signaling through Galphao. Effects on adenylyl cyclase, extracellular signal-regulated kinases, and intracellular calcium pathways. *J Biol Chem* **278**(11): 9418–9425. doi: 10.1074/jbc.M208885200

Clynes D, Higgs DR, Gibbons RJ. 2013. The chromatin remodeller ATRX: a repeat offender in human disease. *Trends Biochem Sci* **38**(9): 461–466. doi: 10.1016/j.tibs.2013.06.011

Cocco L, Follo MY, Manzoli L, Suh P-G. 2015. Phosphoinositide-specific phospholipase C in health and disease. *J Lipid Res* **56**(10): 1853–1860. doi: 10.1194/jlr.R057984

Cocco L, Rubbini S, Manzoli L, Billi AM, Faenza I, Peruzzi D, Matteucci A, Artico M, Gilmour RS, Rhee SG. 1999. Inositides in the nucleus: presence and characterisation of the isozymes of phospholipase beta family in NIH 3T3 cells. *Biochim Biophys Acta* **1438**(2): 295–299. doi: 10.1016/s1388-1981(99)00061-x

Coffino P, Bourne HR, Tomkins GM. 1975. Somatic genetic analysis of cyclic AMP action: selection of unresponsive mutants. *J Cell Physiol* **85**(3): 603–610. doi: 10.1002/jcp.1040850312

Cohen EEW, Zhu H, Lingen MW, Martin LE, Kuo W-L, Choi EA, Kocherginsky M, Parker JS, Chung CH, Rosner MR. 2009. A feed-forward loop involving protein kinase Calpha and microRNAs regulates tumor cell cycle. *Cancer Res* **69**(1): 65–74. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0377

Colella B, Faienza F, Di Bartolomeo S. 2019. EMT Regulation by Autophagy: A New Perspective in Glioblastoma Biology. *Cancers (Basel)* **11**(3). doi: 10.3390/cancers11030312

Coleman BD, Marivin A, Parag-Sharma K, DiGiacomo V, Kim S, Pepper JS, Casler J, Nguyen LT, Koelle MR, Garcia-Marcos M. 2016. Evolutionary Conservation of a GPCR-Independent Mechanism of Trimeric G Protein Activation. *Mol Biol Evol* **33**(3): 820–837. doi: 10.1093/molbev/msv336

Coll JL, Ben-Ze'ev A, Ezzell RM, Rodríguez Fernández JL, Baribault H, Oshima RG, Adamson ED. 1995. Targeted disruption of vinculin genes in F9 and embryonic stem cells changes cell morphology, adhesion, and locomotion. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**(20): 9161–9165. doi: 10.1073/pnas.92.20.9161

Coló GP, Hernández-Varas P, Lock J, Bartolomé RA, Arellano-Sánchez N, Strömblad S, Teixidó J. 2012. Focal adhesion disassembly is regulated by a RIAM to MEK-1 pathway. *J Cell Sci* **125**(Pt 22): 5338–5352. doi: 10.1242/jcs.105270

Coly P-M, Perzo N, Le Joncour V, Lecointre C, Schouft M-T, Desrues L, Tonon M-C, Wurtz O, Gandolfo P, Castel H, et al. 2016. Chemotactic G protein-coupled receptors control cell migration by repressing autophagosome biogenesis. *Autophagy* **12**(12): 2344–2362. doi: 10.1080/15548627.2016.1235125

Conklin BR, Farfel Z, Lustig KD, Julius D, Bourne HR. 1993. Substitution of three amino acids switches receptor specificity of Gq alpha to that of Gi alpha. *Nature* **363**(6426): 274–276. doi: 10.1038/363274a0

Cooke M, Magimaidas A, Casado-Medrano V, Kazanietz MG. 2017. Protein kinase C in cancer: The top five unanswered questions. *Mol Carcinog* **56**(6): 1531–1542. doi: 10.1002/mc.22617

Côté M, Payet MD, Dufour MN, Guillon G, Gallo-Payet N. 1997. Association of the G protein alpha(q)/alpha11-subunit with cytoskeleton in adrenal glomerulosa cells: role in receptor-effector coupling. *Endocrinology* **138**(8): 3299–3307. doi: 10.1210/endo.138.8.5319

Côté J-F, Vuori K. 2007. GEF what? Dock180 and related proteins help Rac to polarize cells in new ways. *Trends Cell Biol* **17**(8): 383–393. doi: 10.1016/j.tcb.2007.05.001

Crespo I, Vital AL, Gonzalez-Tablas M, Patino M del C, Otero A, Lopes MC, de Oliveira C, Domingues P, Orfao A, Tabernero MD. 2015. Molecular and Genomic Alterations in Glioblastoma Multiforme. *Am J Pathol* **185**(7): 1820–1833. doi: 10.1016/j.ajpath.2015.02.023

Critchley DR. 2004. Cytoskeletal proteins talin and vinculin in integrin-mediated adhesion. *Biochem Soc Trans* **32**(Pt 5): 831–836. doi: 10.1042/BST0320831

Cuddapah VA, Turner KL, Seifert S, Sontheimer H. 2013. Bradykinin-induced chemotaxis of human gliomas requires the activation of KCa3.1 and ClC-3. *J Neurosci* **33**(4): 1427–1440. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3980-12.2013

Cui Y, Yamada S. 2013. N-cadherin dependent collective cell invasion of prostate cancer cells is regulated by the N-terminus of α-catenin. *PLoS ONE* **8**(1): e55069. doi: 10.1371/journal.pone.0055069

Daaka Y, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. 1997. Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* **390**(6655): 88–91. doi: 10.1038/36362

Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM, Fantin VR, Jang HG, Jin S, Keenan MC, et al. 2010. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* **465**(7300): 966. doi: 10.1038/nature09132

Davignon I, Catalina MD, Smith D, Montgomery J, Swantek J, Croy J, Siegelman M, Wilkie TM. 2000. Normal hematopoiesis and inflammatory responses despite discrete signaling defects in Galpha15 knockout mice. *Mol Cell Biol* **20**(3): 797–804.

Davis ME. 2016. Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. *Clin J Oncol Nurs* **20**(5 Suppl): S2-8. doi: 10.1188/16.CJON.S1.2-8

De Francesco EM, Sotgia F, Clarke RB, Lisanti MP, Maggiolini M. 2017. G Protein-Coupled Receptors at the Crossroad between Physiologic and Pathologic Angiogenesis: Old Paradigms and Emerging Concepts. *Int J Mol Sci* **18**(12). doi: 10.3390/ijms18122713

De Vleeschouwer S, Bergers G. 2017. Glioblastoma: To Target the Tumor Cell or the Microenvironment? In: De Vleeschouwer S, editor. *Glioblastoma*. Brisbane (AU): Codon Publications. Available at http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK469984/. Accessed 2019 Aug 22.

Debray C, Vereecken P, Belot N, Teillard P, Brion J-P, Pandolfo M, Pochet R. 2004. Multifaceted role of galectin-3 on human glioblastoma cell motility. *Biochem Biophys Res Commun* **325**(4): 1393–1398. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.10.181

Dehal P, Boore JL. 2005. Two rounds of whole genome duplication in the ancestral vertebrate. *PLoS Biol* **3**(10): e314. doi: 10.1371/journal.pbio.0030314

von Deimling A, Korshunov A, Hartmann C. 2011. The next generation of glioma biomarkers: MGMT methylation, BRAF fusions and IDH1 mutations. *Brain Pathol* **21**(1): 74–87. doi: 10.1111/j.1750-3639.2010.00454.x

Demuth T, Rennert JL, Hoelzinger DB, Reavie LB, Nakada M, Beaudry C, Nakada S, Anderson EM, Henrichs AN, McDonough WS, et al. 2008. Glioma cells on the run - the migratory transcriptome of 10 human glioma cell lines. *BMC Genomics* **9**: 54. doi: 10.1186/1471-2164-9-54

Denis C, Saulière A, Galandrin S, Sénard J-M, Galés C. 2012. Probing heterotrimeric G protein activation: applications to biased ligands. *Curr Pharm Des* **18**(2): 128–144.

Desbaillets I, Diserens AC, Tribolet N, Hamou MF, Van Meir EG. 1997. Upregulation of interleukin 8 by oxygen-deprived cells in glioblastoma suggests a role in leukocyte activation, chemotaxis, and angiogenesis. *J Exp Med* **186**(8): 1201–1212. doi: 10.1084/jem.186.8.1201

Desjardins A, Gromeier M, Herndon JE, Beaubier N, Bolognesi DP, Friedman AH, Friedman HS, McSherry F, Muscat AM, Nair S, et al. 2018. Recurrent Glioblastoma Treated with Recombinant Poliovirus. *N Engl J Med* **379**(2): 150–161. doi: 10.1056/NEJMoa1716435

Detjen KM, Brembeck FH, Welzel M, Kaiser A, Haller H, Wiedenmann B, Rosewicz S. 2000. Activation of protein kinase Calpha inhibits growth of pancreatic cancer cells via p21(cip)-mediated G(1) arrest. *J Cell Sci* **113 (Pt 17)**: 3025–3035.

Dieudonné N, De Micheli R, Hottinger A. 2016. [Palliative care for glioblastoma]. *Rev Med Suisse* **12**(516): 853–856.

Digby GJ, Lober RM, Sethi PR, Lambert NA. 2006. Some G protein heterotrimers physically dissociate in living cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**(47): 17789–17794. doi: 10.1073/pnas.0607116103

DiGiacomo V, Marivin A, Garcia-Marcos M. 2018. When Heterotrimeric G Proteins Are Not Activated by G Protein-Coupled Receptors: Structural Insights and Evolutionary Conservation. *Biochemistry* **57**(3): 255–257. doi: 10.1021/acs.biochem.7b00845

Dimitrov L, Hong CS, Yang C, Zhuang Z, Heiss JD. 2015. New developments in the pathogenesis and therapeutic targeting of the IDH1 mutation in glioma. *Int J Med Sci* **12**(3): 201–213. doi: 10.7150/ijms.11047

Dingus J, Hildebrandt JD. 2012. Synthesis and assembly of G protein βγ dimers: comparison of in vitro and in vivo studies. *Subcell Biochem* **63**: 155–180. doi: 10.1007/978-94-007-4765-4_9

Dissanayake SK, Wade M, Johnson CE, O'Connell MP, Leotlela PD, French AD, Shah KV, Hewitt KJ, Rosenthal DT, Indig FE, et al. 2007. The Wnt5A/protein kinase C pathway mediates motility in melanoma cells via the inhibition of metastasis suppressors and initiation of an epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem* **282**(23): 17259–17271. doi: 10.1074/jbc.M700075200

Divecha N, Irvine RF. 1995. Phospholipid signaling. *Cell* **80**(2): 269–278. doi: 10.1016/0092-8674(95)90409-3

Diwanji TP, Engelman A, Snider JW, Mohindra P. 2017. Epidemiology, diagnosis, and optimal management of glioma in adolescents and young adults. *Adolesc Health Med Ther* **8**: 99–113. doi: 10.2147/AHMT.S53391

Dong D-D, Zhou H, Li G. 2016. GPR78 promotes lung cancer cell migration and metastasis by activation of Gαq-Rho GTPase pathway. *BMB Rep* **49**(11): 623–628.

Dongre A, Weinberg RA. 2019. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* **20**(2): 69–84. doi: 10.1038/s41580-018-0080-4

Dorsam RT, Gutkind JS. 2007. G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat Rev Cancer* **7**(2): 79–94. doi: 10.1038/nrc2069

Downes GB, Gautam N. 1999. The G protein subunit gene families. *Genomics* **62**(3): 544–552. doi: 10.1006/geno.1999.5992

Du R, Lu KV, Petritsch C, Liu P, Ganss R, Passegué E, Song H, Vandenberg S, Johnson RS, Werb Z, et al. 2008. HIF1alpha induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. *Cancer Cell* **13**(3): 206–220. doi: 10.1016/j.ccr.2008.01.034

Duc NM, Kim HR, Chung KY. 2015. Structural mechanism of G protein activation by G protein-coupled receptor. *Eur J Pharmacol* **763**(Pt B): 214–222. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.05.016

Dumbauld DW, Lee TT, Singh A, Scrimgeour J, Gersbach CA, Zamir EA, Fu J, Chen CS, Curtis JE, Craig SW, et al. 2013. How vinculin regulates force transmission. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**(24): 9788–9793. doi: 10.1073/pnas.1216209110

Dupré DJ, Robitaille M, Richer M, Ethier N, Mamarbachi AM, Hébert TE. 2007. Dopamine receptor-interacting protein 78 acts as a molecular chaperone for Ggamma subunits before assembly with Gbeta. *J Biol Chem* **282**(18): 13703–13715. doi: 10.1074/jbc.M608846200

Edwards LA, Li A, Berel D, Madany M, Kim N-H, Liu M, Hymowitz M, Uy B, Jung R, Xu M, et al. 2017. ZEB1 regulates glioma stemness through LIF repression. *Sci Rep* **7**(1): 69. doi: 10.1038/s41598-017-00106-x

Ehtesham M, Min E, Issar NM, Kasl RA, Khan IS, Thompson RC. 2013. The role of the CXCR4 cell surface chemokine receptor in glioma biology. *J Neurooncol* **113**(2): 153–162. doi: 10.1007/s11060-013-1108-4

Engelhard HH. 2000. The role of interstitial BCNU chemotherapy in the treatment of malignant glioma. *Surg Neurol* **53**(5): 458–464. doi: 10.1016/s0090-3019(00)00211-1

Entschladen F, Zänker KS, Powe DG. 2011. Heterotrimeric G protein signaling in cancer cells with regard to metastasis formation. *Cell Cycle* **10**(7): 1086–1091. doi: 10.4161/cc.10.7.15208

Epstein RJ. 2004. The CXCL12-CXCR4 chemotactic pathway as a target of adjuvant breast cancer therapies. *Nat Rev Cancer* **4**(11): 901–909. doi: 10.1038/nrc1473

Ercetin E, Richtmann S, Delgado BM, Gomez-Mariano G, Wrenger S, Korenbaum E, Liu B, DeLuca D, Kühnel MP, Jonigk D, et al. 2019. Clinical Significance of SERPINA1 Gene and Its Encoded Alpha1-antitrypsin Protein in NSCLC. *Cancers (Basel)* **11**(9). doi: 10.3390/cancers11091306

Euskirchen P, Radke J, Schmidt MS, Schulze Heuling E, Kadikowski E, Maricos M, Knab F, Grittner U, Zerbe N, Czabanka M, et al. 2017. Cellular heterogeneity contributes to subtype-specific expression of ZEB1 in human glioblastoma. *PLoS ONE* **12**(9): e0185376. doi: 10.1371/journal.pone.0185376

Faenza I, Matteucci A, Manzoli L, Billi AM, Aluigi M, Peruzzi D, Vitale M, Castorina S, Suh PG, Cocco L. 2000. A role for nuclear phospholipase Cbeta 1 in cell cycle control. *J Biol Chem* **275**(39): 30520–30524. doi: 10.1074/jbc.M004630200

Fan Q-W, Cheng C, Knight ZA, Haas-Kogan D, Stokoe D, James CD, McCormick F, Shokat KM, Weiss WA. 2009. EGFR signals to mTOR through PKC and independently of Akt in glioma. *Sci Signal* **2**(55): ra4. doi: 10.1126/scisignal.2000014

Fedele M, Cerchia L, Pegoraro S, Sgarra R, Manfioletti G. 2019. Proneural-Mesenchymal Transition: Phenotypic Plasticity to Acquire Multitherapy Resistance in Glioblastoma. *Int J Mol Sci* **20**(11). doi: 10.3390/ijms20112746

Fedele V, Dai F, Masilamani AP, Heiland DH, Kling E, Gätjens-Sanchez AM, Ferrarese R, Platania L, Soroush D, Kim H, et al. 2017. Epigenetic Regulation of ZBTB18 Promotes Glioblastoma Progression. *Mol Cancer Res* **15**(8): 998–1011. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-16-0494

Federico A, Zappavigna S, Dallio M, Misso G, Merlino F, Loguercio C, Novellino E, Grieco P, Caraglia M. 2017. Urotensin-II Receptor: A Double Identity Receptor Involved in Vasoconstriction and in the Development of Digestive Tract Cancers and other Tumors. *Curr Cancer Drug Targets* **17**(2): 109–121. doi: 10.2174/1568009616666160621101248

Federico A, Zappavigna S, Romano M, Grieco P, Luce A, Marra M, Gravina AG, Stiuso P, D'Armiento FP, Vitale G, et al. 2014. Urotensin-II receptor is over-expressed in colon cancer cell lines and in colon carcinoma in humans. *Eur J Clin Invest* **44**(3): 285–294. doi: 10.1111/eci.12231

Federman AD, Conklin BR, Schrader KA, Reed RR, Bourne HR. 1992. Hormonal stimulation of adenylyl cyclase through Gi-protein beta gamma subunits. *Nature* **356**(6365): 159–161. doi: 10.1038/356159a0

Feng E, Sui C, Wang T, Sun G. 2017. Temozolomide with or without Radiotherapy in Patients with Newly Diagnosed Glioblastoma Multiforme: A Meta-Analysis. *Eur Neurol* **77**(3–4): 201–210. doi: 10.1159/000455842

Feng H, Hu B, Jarzynka MJ, Li Y, Keezer S, Johns TG, Tang CK, Hamilton RL, Vuori K, Nishikawa R, et al. 2012. Phosphorylation of dedicator of cytokinesis 1 (Dock180) at tyrosine residue

Y722 by Src family kinases mediates EGFRvIII-driven glioblastoma tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**(8): 3018–3023. doi: 10.1073/pnas.1121457109

Feng H, Hu B, Liu K-W, Li Y, Lu X, Cheng T, Yiin J-J, Lu S, Keezer S, Fenton T, et al. 2011. Activation of Rac1 by Src-dependent phosphorylation of Dock180(Y1811) mediates PDGFRα-stimulated glioma tumorigenesis in mice and humans. *J Clin Invest* **121**(12): 4670–4684. doi: 10.1172/JCI58559

Feng X, Arang N, Rigiracciolo DC, Lee JS, Yeerna H, Wang Z, Lubrano S, Kishore A, Pachter JA, König GM, et al. 2019 Feb 4. A Platform of Synthetic Lethal Gene Interaction Networks Reveals that the GNAQ Uveal Melanoma Oncogene Controls the Hippo Pathway through FAK. *Cancer Cell*, in press. doi: 10.1016/j.ccell.2019.01.009

Feng X, Degese MS, Iglesias-Bartolome R, Vaque JP, Molinolo AA, Rodrigues M, Zaidi MR, Ksander BR, Merlino G, Sodhi A, et al. 2014. Hippo-independent activation of YAP by the GNAQ uveal melanoma oncogene through a trio-regulated rho GTPase signaling circuitry. *Cancer Cell* **25**(6): 831–845. doi: 10.1016/j.ccr.2014.04.016

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* **136**(5): E359-386. doi: 10.1002/ijc.29210

Fernandes C, Costa A, Osório L, Lago RC, Linhares P, Carvalho B, Caeiro C. 2017. Current Standards of Care in Glioblastoma Therapy. In: De Vleeschouwer S, editor. *Glioblastoma*. Brisbane (AU): Codon Publications. Available at http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK469987/. Accessed 2019 Aug 26.

Fève M, Saliou J-M, Zeniou M, Lennon S, Carapito C, Dong J, Van Dorsselaer A, Junier M-P, Chneiweiss H, Cianférani S, et al. 2014. Comparative expression study of the endo-G protein coupled receptor (GPCR) repertoire in human glioblastoma cancer stem-like cells, U87-MG cells and non malignant cells of neural origin unveils new potential therapeutic targets. *PLoS ONE* **9**(3): e91519. doi: 10.1371/journal.pone.0091519

Fields TA, Casey PJ. 1995. Phosphorylation of Gz alpha by protein kinase C blocks interaction with the beta gamma complex. *J Biol Chem* **270**(39): 23119–23125. doi: 10.1074/jbc.270.39.23119

Filley AC, Henriquez M, Dey M. 2017. Recurrent glioma clinical trial, CheckMate-143: the game is not over yet. *Oncotarget* **8**(53): 91779–91794. doi: 10.18632/oncotarget.21586

Fiume R, Ramazzotti G, Teti G, Chiarini F, Faenza I, Mazzotti G, Billi AM, Cocco L. 2009. Involvement of nuclear PLCbeta1 in lamin B1 phosphorylation and G2/M cell cycle progression. *FASEB J* **23**(3): 957–966. doi: 10.1096/fj.08-121244

Flock T, Hauser AS, Lund N, Gloriam DE, Balaji S, Babu MM. 2017. Selectivity determinants of GPCR-G-protein binding. *Nature* **545**(7654): 317–322. doi: 10.1038/nature22070

Follo MY, Faenza I, Piazzi M, Blalock WL, Manzoli L, McCubrey JA, Cocco L. 2014. Nuclear PI-PLCβ1: an appraisal on targets and pathology. *Adv Biol Regul* **54**: 2–11. doi: 10.1016/j.jbior.2013.11.003

Fortin Ensign SP, Mathews IT, Symons MH, Berens ME, Tran NL. 2013. Implications of Rho GTPase Signaling in Glioma Cell Invasion and Tumor Progression. *Front Oncol* **3**: 241. doi: 10.3389/fonc.2013.00241

Fortin SP, Ennis MJ, Schumacher CA, Zylstra-Diegel CR, Williams BO, Ross JTD, Winkles JA, Loftus JC, Symons MH, Tran NL. 2012. Cdc42 and the guanine nucleotide exchange factors Ect2 and trio mediate Fn14-induced migration and invasion of glioblastoma cells. *Mol Cancer Res* **10**(7): 958–968. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-11-0616

Foltz G, Yoon J-G, Lee H, Ma L, Tian Q, Hood L, Madan A. 2010. Epigenetic regulation of wnt pathway antagonists in human glioblastoma multiforme. *Genes Cancer* **1**(1): 81–90. doi: 10.1177/1947601909356103

Franco R, Martínez-Pinilla E, Navarro G, Zamarbide M. 2017. Potential of GPCRs to modulate MAPK and mTOR pathways in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* **149–150**: 21–38. doi: 10.1016/j.pneurobio.2017.01.004

Frank M, Thümer L, Lohse MJ, Bünemann M. 2005. G Protein activation without subunit dissociation depends on a G{alpha}(i)-specific region. *J Biol Chem* **280**(26): 24584–24590. doi: 10.1074/jbc.M414630200

Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin L-G, Schiöth HB. 2003. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* **63**(6): 1256–1272. doi: 10.1124/mol.63.6.1256

Friedmann-Morvinski D. 2014. Glioblastoma Heterogeneity and Cancer Cell Plasticity. *CRO* **19**(5). doi: 10.1615/CritRevOncog.2014011777

Frielle T, Collins S, Daniel KW, Caron MG, Lefkowitz RJ, Kobilka BK. 1987. Cloning of the cDNA for the human beta 1-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**(22): 7920–7924. doi: 10.1073/pnas.84.22.7920

Fuchs D, Metzig M, Bickeböller M, Brandel C, Roth W. 2015. The Gβ5 protein regulates sensitivity to TRAIL-induced cell death in colon carcinoma. *Oncogene* **34**(21): 2753–2763. doi: 10.1038/onc.2014.213

Fukaya M, Uchigashima M, Nomura S, Hasegawa Y, Kikuchi H, Watanabe M. 2008. Predominant expression of phospholipase Cbeta1 in telencephalic principal neurons and cerebellar interneurons, and its close association with related signaling molecules in somatodendritic neuronal elements. *Eur J Neurosci* **28**(9): 1744–1759. doi: 10.1111/j.1460-9568.2008.06495.x

Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, Hahn WC, Ligon KL, Louis DN, Brennan C, et al. 2007. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev* **21**(21): 2683–2710. doi: 10.1101/gad.1596707

Gabay M, Pinter ME, Wright FA, Chan P, Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Tall GG. 2011. Ric-8 proteins are molecular chaperones that direct nascent G protein α subunit membrane association. *Sci Signal* **4**(200): ra79. doi: 10.1126/scisignal.2002223

Gabrusiewicz K, Rodriguez B, Wei J, Hashimoto Y, Healy LM, Maiti SN, Thomas G, Zhou S, Wang Q, Elakkad A, et al. 2016. Glioblastoma-infiltrated innate immune cells resemble M0 macrophage phenotype. *JCI Insight* **1**(2). doi: 10.1172/jci.insight.85841

Galés C, Bouvier M. 2007. [New talk between receptor and trimeric G proteins: "an intertwined body dance"]. *Med Sci (Paris)* **23**(11): 1031–1034. doi: 10.1051/medsci/200723111031

Galés C, Rebois RV, Hogue M, Trieu P, Breit A, Hébert TE, Bouvier M. 2005. Real-time monitoring of receptor and G-protein interactions in living cells. *Nat Methods* **2**(3): 177–184. doi: 10.1038/nmeth743

Gallo S, Vitacolonna A, Bonzano A, Comoglio P, Crepaldi T. 2019. ERK: A Key Player in the Pathophysiology of Cardiac Hypertrophy. *Int J Mol Sci* **20**(9). doi: 10.3390/ijms20092164

Gao C, Chen G, Kuan S-F, Zhang DH, Schlaepfer DD, Hu J. 2015. FAK/PYK2 promotes the Wnt/β-catenin pathway and intestinal tumorigenesis by phosphorylating GSK3β. *Elife* **4**. doi: 10.7554/eLife.10072

Gao X, Xu Z. 2008. Mechanisms of action of angiogenin. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **40**(7): 619–624. doi: 10.1111/j.1745-7270.2008.00442.x

Gao X, Sinha S, Belcastro M, Woodard C, Ramamurthy V, Stoilov P, Sokolov M. 2013. Splice isoforms of phosducin-like protein control the expression of heterotrimeric G proteins. *J Biol Chem* **288**(36): 25760–25768. doi: 10.1074/jbc.M113.486258

García-Nafría J, Tate CG. 2019 Mar 28. Cryo-EM structures of GPCRs coupled to Gs, Gi and Go. *Mol Cell Endocrinol*, in press. doi: 10.1016/j.mce.2019.02.006

Gardner JA, Ha JH, Jayaraman M, Dhanasekaran DN. 2013. The gep proto-oncogene Gα13 mediates lysophosphatidic acid-mediated migration of pancreatic cancer cells. *Pancreas* **42**(5): 819–828. doi: 10.1097/MPA.0b013e318279c577

Garg AD, Vandenberk L, Koks C, Verschuere T, Boon L, Van Gool SW, Agostinis P. 2016. Dendritic cell vaccines based on immunogenic cell death elicit danger signals and T cell-driven rejection of high-grade glioma. *Sci Transl Med* **8**(328): 328ra27. doi: 10.1126/scitranslmed.aae0105

Garzon-Muvdi T, Schiapparelli P, ap Rhys C, Guerrero-Cazares H, Smith C, Kim D-H, Kone L, Farber H, Lee DY, An SS, et al. 2012. Regulation of brain tumor dispersal by NKCC1 through a novel role in focal adhesion regulation. *PLoS Biol* **10**(5): e1001320. doi: 10.1371/journal.pbio.1001320

Genna A, Lapetina S, Lukic N, Twafra S, Meirson T, Sharma VP, Condeelis JS, Gil-Henn H. 2018. Pyk2 and FAK differentially regulate invadopodia formation and function in breast cancer cells. *J Cell Biol* **217**(1): 375–395. doi: 10.1083/jcb.201702184

Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Math M, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, Martinez P, Matthews N, Stewart A, et al. 2012. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* **366**(10): 883–892. doi: 10.1056/NEJMoa1113205

Ghil S, McCoy KL, Hepler JR. 2014. Regulator of G protein signaling 2 (RGS2) and RGS4 form distinct G protein-dependent complexes with protease activated-receptor 1 (PAR1) in live cells. *PLoS ONE* **9**(4): e95355. doi: 10.1371/journal.pone.0095355

Ghosh D, Nandi S, Bhattacharjee S. 2018. Combination therapy to checkmate Glioblastoma: clinical challenges and advances. *Clin Transl Med* **7**(1): 33. doi: 10.1186/s40169-018-0211-8

Giannone F, Malpeli G, Lisi V, Grasso S, Shukla P, Ramarli D, Sartoris S, Monsurro V, Krampera M, Amato E, et al. 2010. The puzzling uniqueness of the heterotrimeric G15 protein and its potential beyond hematopoiesis. *Journal of Molecular Endocrinology* **44**(5): 259–269. doi: 10.1677/JME-09-0134

Gilbert MR, Dignam JJ, Armstrong TS, Wefel JS, Blumenthal DT, Vogelbaum MA, Colman H, Chakravarti A, Pugh S, Won M, et al. 2014. A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med* **370**(8): 699–708. doi: 10.1056/NEJMoa1308573

Gilbert MR, Wang M, Aldape KD, Stupp R, Hegi ME, Jaeckle KA, Armstrong TS, Wefel JS, Won M, Blumenthal DT, et al. 2013. Dose-dense temozolomide for newly diagnosed glioblastoma: a randomized phase III clinical trial. *J Clin Oncol* **31**(32): 4085–4091. doi: 10.1200/JCO.2013.49.6968

Gillespie S, Zhang XD, Hersey P. 2005. Variable expression of protein kinase C epsilon in human melanoma cells regulates sensitivity to TRAIL-induced apoptosis. *Mol Cancer Ther* **4**(4): 668–676. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-04-0332

Gilman AG. 1987. G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem* **56**: 615–649. doi: 10.1146/annurev.bi.56.070187.003151

Giovinazzo F, Malpeli G, Zanini S, Parenti M, Piemonti L, Colombatti M, Valenti MT, Carbonare LD, Scarpa A, Sinnett-Smith J, et al. 2013. Ectopic expression of the heterotrimeric G15 protein in pancreatic carcinoma and its potential in cancer signal transduction. *Cellular Signalling* **25**(3): 651–659. doi: 10.1016/j.cellsig.2012.11.018

Glass R, Synowitz M. 2014. CNS macrophages and peripheral myeloid cells in brain tumours. *Acta Neuropathol* **128**(3): 347–362. doi: 10.1007/s00401-014-1274-2

Goel HL, Mercurio AM. 2013. VEGF targets the tumour cell. *Nat Rev Cancer* **13**(12): 871–882. doi:

10.1038/nrc3627

Gohla A, Harhammer R, Schultz G. 1998. The G-protein G13 but not G12 mediates signaling from lysophosphatidic acid receptor via epidermal growth factor receptor to Rho. *J Biol Chem* **273**(8): 4653–4659. doi: 10.1074/jbc.273.8.4653

Goldmann WH, Auernheimer V, Thievessen I, Fabry B. 2013. Vinculin, cell mechanics and tumour cell invasion. *Cell Biol Int* **37**(5): 397–405. doi: 10.1002/cbin.10064

Goldsmith ZG, Dhanasekaran DN. 2007. G protein regulation of MAPK networks. *Oncogene* **26**(22): 3122–3142. doi: 10.1038/sj.onc.1210407

Goldsmith ZG, Ha JH, Jayaraman M, Dhanasekaran DN. 2011. Lysophosphatidic Acid Stimulates the Proliferation of Ovarian Cancer Cells via the gep Proto-Oncogene Gα(12). *Genes Cancer* **2**(5): 563–575. doi: 10.1177/1947601911419362

Gollapalli K, Ghantasala S, Kumar S, Srivastava R, Rapole S, Moiyadi A, Epari S, Srivastava S. 2017. Subventricular zone involvement in Glioblastoma - A proteomic evaluation and clinicoradiological correlation. *Sci Rep* **7**(1): 1449. doi: 10.1038/s41598-017-01202-8

Gomel R, Xiang C, Finniss S, Lee HK, Lu W, Okhrimenko H, Brodie C. 2007. The localization of protein kinase Cdelta in different subcellular sites affects its proapoptotic and antiapoptotic functions and the activation of distinct downstream signaling pathways. *Mol Cancer Res* **5**(6): 627–639. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-06-0255

Gong H, Gao X, Feng S, Siddiqui MR, Garcia A, Bonini MG, Komarova Y, Vogel SM, Mehta D, Malik AB. 2014. Evidence of a common mechanism of disassembly of adherens junctions through Gα13 targeting of VE-cadherin. *J Exp Med* **211**(3): 579–591. doi: 10.1084/jem.20131190

Gonzalez-Guerrico AM, Kazanietz MG. 2005. Phorbol ester-induced apoptosis in prostate cancer cells via autocrine activation of the extrinsic apoptotic cascade: a key role for protein kinase C delta. *J Biol Chem* **280**(47): 38982–38991. doi: 10.1074/jbc.M506767200

de Gooijer MC, Guillén Navarro M, Bernards R, Wurdinger T, van Tellingen O. 2018. An Experimenter's Guide to Glioblastoma Invasion Pathways. *Trends Mol Med* **24**(9): 763–780. doi: 10.1016/j.molmed.2018.07.003

Graff JR, McNulty AM, Hanna KR, Konicek BW, Lynch RL, Bailey SN, Banks C, Capen A, Goode R, Lewis JE, et al. 2005. The protein kinase Cbeta-selective inhibitor, Enzastaurin (LY317615.HCl), suppresses signaling through the AKT pathway, induces apoptosis, and suppresses growth of human colon cancer and glioblastoma xenografts. *Cancer Res* **65**(16): 7462–7469. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0071

Grant KR, Harnett W, Milligan G, Harnett MM. 1997. Differential G-protein expression during B- and T-cell development. *Immunology* **90**(4): 564–571.

Greene CM, Marciniak SJ, Teckman J, Ferrarotti I, Brantly ML, Lomas DA, Stoller JK, McElvaney NG. 2016. α1-Antitrypsin deficiency. *Nat Rev Dis Primers* **2**: 16051. doi: 10.1038/nrdp.2016.51

Gresset A, Sondek J, Harden TK. 2012. The phospholipase C isozymes and their regulation. *Subcell Biochem* **58**: 61–94. doi: 10.1007/978-94-007-3012-0_3

Grinberg S, Hasko G, Wu D, Leibovich SJ. 2009. Suppression of PLCbeta2 by endotoxin plays a role in the adenosine A(2A) receptor-mediated switch of macrophages from an inflammatory to an angiogenic phenotype. *Am J Pathol* **175**(6): 2439–2453. doi: 10.2353/ajpath.2009.090290

Griner EM, Kazanietz MG. 2007. Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. *Nat Rev Cancer* **7**(4): 281–294. doi: 10.1038/nrc2110

Grishina G, Berlot CH. 2000. A surface-exposed region of G(salpha) in which substitutions decrease receptor-mediated activation and increase receptor affinity. *Mol Pharmacol* **57**(6): 1081–1092.

Grivennikov SI, Karin M. 2010. Dangerous liaisons: STAT3 and NF-kappaB collaboration and crosstalk in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* **21**(1): 11–19. doi: 10.1016/j.cytogfr.2009.11.005

Gronseth E, Wang L, Harder DR, Ramchandran R. 2018 Mar 21. The Role of Astrocytes in Tumor Growth and Progression. *Astrocyte - Physiology and Pathology*, in press. doi: 10.5772/intechopen.72720

Gu JL, Lu W, Xia C, Wu X, Liu M. 2003. Regulation of hematopoietic-specific G-protein Galpha15 and Galpha16 by protein kinase C. *J Cell Biochem* **88**(6): 1101–1111. doi: 10.1002/jcb.10455

Gu Y, Feng Q, Liu H, Zhou Q, Hu A, Yamaguchi T, Xia S, Kobayashi H. 2019. Bioinformatic evidences and analysis of putative biomarkers in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Heliyon* **5**(8): e02378. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e02378

Guo K-T, Fu P, Juerchott K, Motaln H, Selbig J, Lah T, Tonn J-C, Schichor C. 2014. The expression of Wnt-inhibitor DKK1 (Dickkopf 1) is determined by intercellular crosstalk and hypoxia in human malignant gliomas. *J Cancer Res Clin Oncol* **140**(8): 1261–1270. doi: 10.1007/s00432-014-1642-2

Ha JH, Radhakrishnan R, Jayaraman M, Yan M, Ward JD, Fung K-M, Moxley K, Sood AK, Isidoro C, Mukherjee P, et al. 2018. LPA Induces Metabolic Reprogramming in Ovarian Cancer via a Pseudohypoxic Response. *Cancer Res* **78**(8): 1923–1934. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-1624

Ha JH, Ward JD, Varadarajalu L, Kim SG, Dhanasekaran DN. 2014. The gep proto-oncogene Gα12 mediates LPA-stimulated activation of CREB in ovarian cancer cells. *Cell Signal* **26**(1): 122–132. doi: 10.1016/j.cellsig.2013.08.012

Habela CW, Ernest NJ, Swindall AF, Sontheimer H. 2009. Chloride accumulation drives volume dynamics underlying cell proliferation and migration. *J Neurophysiol* **101**(2): 750–757. doi: 10.1152/jn.90840.2008

Hambardzumyan D, Bergers G. 2015. Glioblastoma: Defining Tumor Niches. *Trends Cancer* **1**(4): 252–265. doi: 10.1016/j.trecan.2015.10.009

Hambardzumyan D, Gutmann DH, Kettenmann H. 2016. The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression. *Nat Neurosci* **19**(1): 20–27. doi: 10.1038/nn.4185

Han S-P, Kim J-H, Han M-E, Sim H-E, Kim K-S, Yoon S, Baek S-Y, Kim B-S, Oh S-O. 2011. SNAI1 is involved in the proliferation and migration of glioblastoma cells. *Cell Mol Neurobiol* **31**(3): 489–496. doi: 10.1007/s10571-010-9643-4

Hanoune J, Defer N. 2001. Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**: 145–174. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.41.1.145

Hansen C, Howlin J, Tengholm A, Dyachok O, Vogel WF, Nairn AC, Greengard P, Andersson T. 2009. Wnt-5a-induced phosphorylation of DARPP-32 inhibits breast cancer cell migration in a CREB-dependent manner. *J Biol Chem* **284**(40): 27533–27543. doi: 10.1074/jbc.M109.048884

Hansen CA, Schroering AG, Carey DJ, Robishaw JD. 1994. Localization of a heterotrimeric G protein gamma subunit to focal adhesions and associated stress fibers. *J Cell Biol* **126**(3): 811–819. doi: 10.1083/jcb.126.3.811

Hardell L, Carlberg M, Söderqvist F, Mild KH. 2013. Case-control study of the association between malignant brain tumours diagnosed between 2007 and 2009 and mobile and cordless phone use. *Int J Oncol* **43**(6): 1833–1845. doi: 10.3892/ijo.2013.2111

Harden TK, Waldo GL, Hicks SN, Sondek J. 2011. Mechanism of activation and inactivation of Gq/phospholipase C-β signaling nodes. *Chem Rev* **111**(10): 6120–6129. doi: 10.1021/cr200209p

Harris AW. 1970. Differentiated functions expressed by cultured mouse lymphoma cells. I. Specificity and kinetics of cell responses to corticosteroids. *Exp Cell Res* **60**(3): 341–353. doi: 10.1016/0014-4827(70)90527-6

Hart MG, Garside R, Rogers G, Stein K, Grant R. 2013. Temozolomide for high grade glioma. *Cochrane Database Syst Rev*(4): CD007415. doi: 10.1002/14651858.CD007415.pub2

Hart MJ, Jiang X, Kozasa T, Roscoe W, Singer WD, Gilman AG, Sternweis PC, Bollag G. 1998. Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by Galpha13. *Science* **280**(5372): 2112–2114. doi: 10.1126/science.280.5372.2112

Hausdorff WP, Pitcher JA, Luttrell DK, Linder ME, Kurose H, Parsons SJ, Caron MG, Lefkowitz RJ. 1992. Tyrosine phosphorylation of G protein alpha subunits by pp60c-src. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**(13): 5720–5724. doi: 10.1073/pnas.89.13.5720

Hayward BE, Moran V, Strain L, Bonthron DT. 1998. Bidirectional imprinting of a single gene: GNAS1 encodes maternally, paternally, and biallelically derived proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**(26): 15475–15480.

He X, Zhang L, Chen Y, Remke M, Shih D, Lu F, Wang H, Deng Y, Yu Y, Xia Y, et al. 2014. The G protein α subunit Gαs is a tumor suppressor in Sonic hedgehog-driven medulloblastoma. *Nat Med* **20**(9): 1035–1042. doi: 10.1038/nm.3666

Heasley LE, Storey B, Fanger GR, Butterfield L, Zamarripa J, Blumberg D, Maue RA. 1996. GTPase-deficient G alpha 16 and G alpha q induce PC12 cell differentiation and persistent activation of cJun NH2-terminal kinases. *Mol Cell Biol* **16**(2): 648–656.

Hegi ME, Diserens A-C, Gorlia T, Hamou M-F, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, et al. 2005. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* **352**(10): 997–1003. doi: 10.1056/NEJMoa043331

Heiland DH, Haaker G, Delev D, Mercas B, Masalha W, Heynckes S, Gäbelein A, Pfeifer D, Carro MS, Weyerbrock A, et al. 2017. Comprehensive analysis of PD-L1 expression in glioblastoma multiforme. *Oncotarget* **8**(26): 42214–42225. doi: 10.18632/oncotarget.15031

Hemmings L, Rees DJ, Ohanian V, Bolton SJ, Gilmore AP, Patel B, Priddle H, Trevithick JE, Hynes RO, Critchley DR. 1996. Talin contains three actin-binding sites each of which is adjacent to a vinculin-binding site. *J Cell Sci* **109 (Pt 11)**: 2715–2726.

Henrik Heiland D, Ravi VM, Behringer SP, Frenking JH, Wurm J, Joseph K, Garrelfs NWC, Strähle J, Heynckes S, Grauvogel J, et al. 2019. Tumor-associated reactive astrocytes aid the evolution of immunosuppressive environment in glioblastoma. *Nat Commun* **10**(1): 2541. doi: 10.1038/s41467-019-10493-6

Hepler JR. 2014. G protein coupled receptor signaling complexes in live cells. *Cell Logist* **4**: e29392. doi: 10.4161/cl.29392

Herlitze S, Garcia DE, Mackie K, Hille B, Scheuer T, Catterall WA. 1996. Modulation of Ca2+ channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature* **380**(6571): 258–262. doi: 10.1038/380258a0

Higashita R, Li L, Van Putten V, Yamamura Y, Zarinetchi F, Heasley L, Nemenoff RA. 1997. Galpha16 mimics vasoconstrictor action to induce smooth muscle alpha-actin in vascular smooth muscle cells through a Jun-NH2-terminal kinase-dependent pathway. *J Biol Chem* **272**(41): 25845–25850.

Hilger D, Masureel M, Kobilka BK. 2018. Structure and dynamics of GPCR signaling complexes. *Nat Struct Mol Biol* **25**(1): 4–12. doi: 10.1038/s41594-017-0011-7

Hill SJ, Baker JG. 2003. The ups and downs of Gs- to Gi-protein switching. *Br J Pharmacol* **138**(7): 1188–1189. doi: 10.1038/sj.bjp.0705192

Hille B. 1992. G protein-coupled mechanisms and nervous signaling. *Neuron* **9**(2): 187–195. doi: 10.1016/0896-6273(92)90158-a

Hino S, Tanji C, Nakayama KI, Kikuchi A. 2005. Phosphorylation of beta-catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase stabilizes beta-catenin through inhibition of its ubiquitination. *Mol Cell Biol* **25**(20): 9063–9072. doi: 10.1128/MCB.25.20.9063-9072.2005

Hippe H-J, Luedde M, Lutz S, Koehler H, Eschenhagen T, Frey N, Katus HA, Wieland T, Niroomand F. 2007. Regulation of cardiac cAMP synthesis and contractility by nucleoside diphosphate kinase B/G protein beta gamma dimer complexes. *Circ Res* **100**(8): 1191–1199. doi: 10.1161/01.RES.0000264058.28808.cc

Ho MK, Wong YH. 1998. Structure and function of the pertussis-toxin-insensitive Gz protein. *Biol Signals Recept* **7**(2): 80–89. doi: 10.1159/000014533

Ho MKC, Chan JHP, Wong CSS, Wong YH. 2004. Identification of a stretch of six divergent amino acids on the alpha5 helix of Galpha16 as a major determinant of the promiscuity and efficiency of receptor coupling. *Biochem J* **380**(Pt 2): 361–369. doi: 10.1042/BJ20040231

Holbrook SR, Kim SH. 1989. Molecular model of the G protein alpha subunit based on the crystal structure of the HRAS protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**(6): 1751–1755.

Holland EC, Celestino J, Dai C, Schaefer L, Sawaya RE, Fuller GN. 2000. Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice. *Nat Genet* **25**(1): 55–57. doi: 10.1038/75596

Hollinger S, Hepler JR. 2002. Cellular regulation of RGS proteins: modulators and integrators of G protein signaling. *Pharmacol Rev* **54**(3): 527–559.

Horibata K, Harris AW. 1970. Mouse myelomas and lymphomas in culture. *Exp Cell Res* **60**(1): 61–77. doi: 10.1016/0014-4827(70)90489-1

Hornia A, Lu Z, Sukezane T, Zhong M, Joseph T, Frankel P, Foster DA. 1999. Antagonistic effects of protein kinase C alpha and delta on both transformation and phospholipase D activity mediated by the epidermal growth factor receptor. *Mol Cell Biol* **19**(11): 7672–7680. doi: 10.1128/mcb.19.11.7672

Hou Y, Azpiazu I, Smrcka A, Gautam N. 2000. Selective role of G protein gamma subunits in receptor interaction. *J Biol Chem* **275**(50): 38961–38964. doi: 10.1074/jbc.C000604200

Hsia JA, Moss J, Hewlett EL, Vaughan M. 1984. ADP-ribosylation of adenylate cyclase by pertussis toxin. Effects on inhibitory agonist binding. *J Biol Chem* **259**(2): 1086–1090.

Hu J, Wang Y, Zhang X, Lloyd JR, Li JH, Karpiak J, Costanzi S, Wess J. 2010. Structural basis of G protein-coupled receptor-G protein interactions. *Nat Chem Biol* **6**(7): 541–548. doi: 10.1038/nchembio.385

Hu J-G, Wang X-F, Zhou J-S, Wang F-C, Li X-W, Lü H-Z. 2010. Activation of PKC-alpha is required for migration of C6 glioma cells. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* **70**(3): 239–245.

Hu J-L, Luo W-J, Wang H. 2019. Angiogenin Upregulation Independently Predicts Unfavorable Overall Survival in Proneural Subtype of Glioblastoma. *Technol Cancer Res Treat* **18**: 1533033819846636. doi: 10.1177/1533033819846636

Huang C, Jacobson K, Schaller MD. 2004. A role for JNK-paxillin signaling in cell migration. *Cell Cycle* **3**(1): 4–6.

Huang Y, Shen XJ, Zou Q, Wang SP, Tang SM, Zhang GZ. 2011. Biological functions of microRNAs: a review. *J Physiol Biochem* **67**(1): 129–139. doi: 10.1007/s13105-010-0050-6

Huang Y-S, Hu C-H, Tseng W-Y, Cheng C-H, Stacey M, Gordon S, Chang G-W, Lin H-H. 2017.

Activation of Adhesion GPCR EMR2/ADGRE2 Induces Macrophage Differentiation and Inflammatory Responses via Gα16/Akt/MAPK/NF-κB Signaling Pathways. *Front Immunol* **8**: 373. doi: 10.3389/fimmu.2017.00373

Hull MA, Ko SCW, Hawcroft G. 2004. Prostaglandin EP receptors: targets for treatment and prevention of colorectal cancer? *Mol Cancer Ther* **3**(8): 1031–1039.

Humphries JD, Wang P, Streuli C, Geiger B, Humphries MJ, Ballestrem C. 2007. Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin. *J Cell Biol* **179**(5): 1043–1057. doi: 10.1083/jcb.200703036(

Hunt JM, Tuder R. 2012. Alpha 1 anti-trypsin: one protein, many functions. *Curr Mol Med* **12**(7): 827–835. doi: 10.2174/1566524128013187 5Hurley JB, Fong HK, Teplow DB, Dreyer WJ, Simon MI. 1984. Isolation and characterization of a cDNA clone for the gamma subunit of bovine retinal transducin. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**(22): 6948–6952.

Hurowitz EH, Melnyk JM, Chen YJ, Kouros-Mehr H, Simon MI, Shizuya H. 2000. Genomic characterization of the human heterotrimeric G protein alpha, beta, and gamma subunit genes. *DNA Res* **7**(2): 111–120.

Hurst JH, Hooks SB. 2009. Regulator of G-protein signaling (RGS) proteins in cancer biology. *Biochem Pharmacol* **78**(10): 1289–1297. doi: 10.1016/j.bcp.2009.06.028

Hussain SF, Yang D, Suki D, Aldape K, Grimm E, Heimberger AB. 2006. The role of human glioma-infiltrating microglia/macrophages in mediating antitumor immune responses. *Neuro-oncology* **8**(3): 261–279. doi: 10.1215/15228517-2006-008

Huveneers S, Danen EHJ. 2009. Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho. *J Cell Sci* **122**(Pt 8): 1059–1069. doi: 10.1242/jcs.039446

Ibarrondo J, Joubert D, Dufour MN, Cohen-Solal A, Homburger V, Jard S, Guillon G. 1995. Close association of the alpha subunits of Gq and G11 G proteins with actin filaments in WRK1 cells: relation to G protein-mediated phospholipase C activation. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**(18): 8413–8417. doi: 10.1073/pnas.92.18.8413

Iglesias-Bartolome R, Torres D, Marone R, Feng X, Martin D, Simaan M, Chen M, Weinstein LS, Taylor SS, Molinolo AA, et al. 2015. Inactivation of a Gα(s)-PKA tumour suppressor pathway in skin stem cells initiates basal-cell carcinogenesis. *Nat Cell Biol* **17**(6): 793–803. doi: 10.1038/ncb3164

Iguchi T, Sakata K, Yoshizaki K, Tago K, Mizuno N, Itoh H. 2008. Orphan G protein-coupled receptor GPR56 regulates neural progenitor cell migration via a G alpha 12/13 and Rho pathway. *J Biol Chem* **283**(21): 14469–14478. doi: 10.1074/jbc.M708919200

Iiri T, Farfel Z, Bourne HR. 1998. G-protein diseases furnish a model for the turn-on switch. *Nature* **394**(6688): 35–38. doi: 10.1038/27831

Illenberger D, Schwald F, Pimmer D, Binder W, Maier G, Dietrich A, Gierschik P. 1998. Stimulation of phospholipase C-beta2 by the Rho GTPases Cdc42Hs and Rac1. *EMBO J* **17**(21): 6241–6249. doi: 10.1093/emboj/17.21.6241

Illenberger D, Walliser C, Nurnberg B, Diaz Lorente M, Gierschik P. 2003a. Specificity and structural requirements of phospholipase C-beta stimulation by Rho GTPases versus G protein beta gamma dimers. *J Biol Chem* **278**(5): 3006–3014. doi: 10.1074/jbc.M208282200

Illenberger D, Walliser C, Nurnberg B, Diaz Lorente M, Gierschik P. 2003b. Specificity and structural requirements of phospholipase C-beta stimulation by Rho GTPases versus G protein beta gamma dimers. *J Biol Chem* **278**(5): 3006–3014. doi: 10.1074/jbc.M208282200

Im D-S. 2013. Intercellular Lipid Mediators and GPCR Drug Discovery. *Biomol Ther (Seoul)* **21**(6): 411–422. doi: 10.4062/biomolther.2013.080

Innamorati G, Giannone F, Guzzi F, Rovati GE, Accomazzo MR, Chini B, Bianchi E, Schiaffino MV, Tridente G, Parenti M. 2009. Heterotrimeric G proteins demonstrate differential sensitivity to β-arrestin dependent desensitization. *Cellular Signalling* **21**(7): 1135–1142. doi: 10.1016/j.cellsig.2009.03.002

Inoue A, Raimondi F, Kadji FMN, Singh G, Kishi T, Uwamizu A, Ono Y, Shinjo Y, Ishida S, Arang N, et al. 2019 May 21. Illuminating G-Protein-Coupling Selectivity of GPCRs. *Cell*, in press. doi: 10.1016/j.cell.2019.04.044

Iwadate Y. 2016. Epithelial-mesenchymal transition in glioblastoma progression. *Oncol Lett* **11**(3): 1615–1620. doi: 10.3892/ol.2016.4113

Jain KK. 2018. A Critical Overview of Targeted Therapies for Glioblastoma. *Front Oncol* **8**: 419. doi: 10.3389/fonc.2018.00419

Janetopoulos C, Jin T, Devreotes P. 2001. Receptor-mediated activation of heterotrimeric G-proteins in living cells. *Science* **291**(5512): 2408–2411. doi: 10.1126/science.1055835

Janz JM, Farrens DL. 2004. Rhodopsin activation exposes a key hydrophobic binding site for the transducin alpha-subunit C terminus. *J Biol Chem* **279**(28): 29767–29773. doi: 10.1074/jbc.M402567200

Jarjour AA, Durko M, Luk TL, Marçal N, Shekarabi M, Kennedy TE. 2011. Autocrine netrin function inhibits glioma cell motility and promotes focal adhesion formation. *PLoS ONE* **6**(9): e25408. doi: 10.1371/journal.pone.0025408

Jarry M, Diallo M, Lecointre C, Desrues L, Tokay T, Chatenet D, Leprince J, Rossi O, Vaudry H, Tonon M-C, et al. 2010. The vasoactive peptides urotensin II and urotensin II-related peptide regulate astrocyte activity through common and distinct mechanisms: involvement in cell proliferation. *Biochem J* **428**(1): 113–124. doi: 10.1042/BJ20090867

Jastrzebska B, Tsybovsky Y, Palczewski K. 2010. Complexes between photoactivated rhodopsin and transducin: progress and questions. *Biochem J* **428**(1): 1–10. doi: 10.1042/BJ20100270

Jelsema CL, Axelrod J. 1987. Stimulation of phospholipase A2 activity in bovine rod outer segments by the beta gamma subunits of transducin and its inhibition by the alpha subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**(11): 3623–3627.

Jian X, Clark WA, Kowalak J, Markey SP, Simonds WF, Northup JK. 2001. Gbetagamma affinity for bovine rhodopsin is determined by the carboxyl-terminal sequences of the gamma subunit. *J Biol Chem* **276**(51): 48518–48525. doi: 10.1074/jbc.M107129200

Jiang H, Kuang Y, Wu Y, Xie W, Simon MI, Wu D. 1997. Roles of phospholipase C beta2 in chemoattractant-elicited responses. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**(15): 7971–7975. doi: 10.1073/pnas.94.15.7971

Jiang X-H, Tu S-P, Cui J-T, Lin MCM, Xia HHX, Wong WM, Chan AO-O, Yuen MF, Jiang S-H, Lam S-K, et al. 2004. Antisense targeting protein kinase C alpha and beta1 inhibits gastric carcinogenesis. *Cancer Res* **64**(16): 5787–5794. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-03-1172

Jiao Y, Killela PJ, Reitman ZJ, Rasheed AB, Heaphy CM, de Wilde RF, Rodriguez FJ, Rosemberg S, Oba-Shinjo SM, Nagahashi Marie SK, et al. 2012. Frequent ATRX, CIC, FUBP1 and IDH1 mutations refine the classification of malignant gliomas. *Oncotarget* **3**(7): 709–722. doi: 10.18632/oncotarget.588

Johansson BB, Minsaas L, Aragay AM. 2005. Proteasome involvement in the degradation of the G(q) family of Galpha subunits. *FEBS J* **272**(20): 5365–5377. doi: 10.1111/j.1742-4658.2005.04934.x

Joseph JV, Conroy S, Pavlov K, Sontakke P, Tomar T, Eggens-Meijer E, Balasubramaniyan V, Wagemakers M, den Dunnen WFA, Kruyt FAE. 2015. Hypoxia enhances migration and invasion in glioblastoma by promoting a mesenchymal shift mediated by the HIF1α-ZEB1 axis. *Cancer Lett* **359**(1): 107–116. doi: 10.1016/j.canlet.2015.01.010

Kaafarani I, Fernandez-Sauze S, Berenguer C, Chinot O, Delfino C, Dussert C, Metellus P, Boudouresque F, Mabrouk K, Grisoli F, et al. 2009. Targeting adrenomedullin receptors with systemic delivery of neutralizing antibodies inhibits tumor angiogenesis and suppresses growth of human tumor xenografts in mice. *FASEB J* **23**(10): 3424–3435. doi: 10.1096/fj.08-127852

Kahana S, Finniss S, Cazacu S, Xiang C, Lee H-K, Brodie S, Goldstein RS, Roitman V, Slavin S, Mikkelsen T, et al. 2011. Proteasome inhibitors sensitize glioma cells and glioma stem cells to TRAIL-induced apoptosis by PKCε-dependent downregulation of AKT and XIAP expressions. *Cell Signal* **23**(8): 1348–1357. doi: 10.1016/j.cellsig.2011.03.017

Kahlert UD, Maciaczyk D, Doostkam S, Orr BA, Simons B, Bogiel T, Reithmeier T, Prinz M, Schubert J, Niedermann G, et al. 2012. Activation of canonical WNT/β-catenin signaling enhances in vitro motility of glioblastoma cells by activation of ZEB1 and other activators of epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Lett* **325**(1): 42–53. doi: 10.1016/j.canlet.2012.05.024

Kahlert UD, Nikkhah G, Maciaczyk J. 2013. Epithelial-to-mesenchymal(-like) transition as a relevant molecular event in malignant gliomas. *Cancer Lett* **331**(2): 131–138. doi: 10.1016/j.canlet.2012.12.010

Kalluri R, Weinberg RA. 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* **119**(6): 1420–1428. doi: 10.1172/JCI39104

Kalogriopoulos NA, Rees SD, Ngo T, Kopcho NJ, Ilatovskiy AV, Sun N, Komives EA, Chang G, Ghosh P, Kufareva I. 2019 Jul 30. Structural basis for GPCR-independent activation of heterotrimeric Gi proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, in press. doi: 10.1073/pnas.1906658116

Kanchanawong P, Shtengel G, Pasapera AM, Ramko EB, Davidson MW, Hess HF, Waterman CM. 2010. Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. *Nature* **468**(7323): 580–584. doi: 10.1038/nature09621

Karsy M, Guan J, Jensen R, Huang LE, Colman H. 2016. The Impact of Hypoxia and Mesenchymal Transition on Glioblastoma Pathogenesis and Cancer Stem Cells Regulation. *World Neurosurg* **88**: 222–236. doi: 10.1016/j.wneu.2015.12.032

Kaslow HR, Burns DL. 1992. Pertussis toxin and target eukaryotic cells: binding, entry, and activation. *FASEB J* **6**(9): 2684–2690.

Kato K, Yamanouchi D, Esbona K, Kamiya K, Zhang F, Kent KC, Liu B. 2009. Caspase-mediated protein kinase C-delta cleavage is necessary for apoptosis of vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **297**(6): H2253-2261. doi: 10.1152/ajpheart.00274.2009

Katoh H, Aoki J, Yamaguchi Y, Kitano Y, Ichikawa A, Negishi M. 1998. Constitutively active Galpha12, Galpha13, and Galphaq induce Rho-dependent neurite retraction through different signaling pathways. *J Biol Chem* **273**(44): 28700–28707.

Katoh H, Hiramoto K, Negishi M. 2006. Activation of Rac1 by RhoG regulates cell migration. *J Cell Sci* **119**(Pt 1): 56–65. doi: 10.1242/jcs.02720

Kaul S, Anantharam V, Yang Y, Choi CJ, Kanthasamy A, Kanthasamy AG. 2005. Tyrosine phosphorylation regulates the proteolytic activation of protein kinase Cdelta in dopaminergic neuronal cells. *J Biol Chem* **280**(31): 28721–28730. doi: 10.1074/jbc.M501092200

Kawakami T, Xiao W. 2013. Phospholipase C-β in immune cells. *Adv Biol Regul* **53**(3): 249–257. doi: 10.1016/j.jbior.2013.08.001

Kehlenbach RH, Matthey J, Huttner WB. 1994. XL alpha s is a new type of G protein. *Nature* **372**(6508): 804–809.

Kehrl JH. 2016. The impact of RGS and other G-protein regulatory proteins on Gαi-mediated signaling in immunity. *Biochem Pharmacol* **114**: 40–52. doi: 10.1016/j.bcp.2016.04.005

Kelly P, Moeller BJ, Juneja J, Booden MA, Der CJ, Daaka Y, Dewhirst MW, Fields TA, Casey PJ. 2006. The G12 family of heterotrimeric G proteins promotes breast cancer invasion and metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**(21): 8173–8178. doi: 10.1073/pnas.0510254103

Kelly P, Stemmle LN, Madden JF, Fields TA, Daaka Y, Casey PJ. 2006. A role for the G12 family of heterotrimeric G proteins in prostate cancer invasion. *J Biol Chem* **281**(36): 26483–26490. doi: 10.1074/jbc.M604376200

Khan SM, Sleno R, Gora S, Zylbergold P, Laverdure J-P, Labbé J-C, Miller GJ, Hébert TE. 2013. The expanding roles of Gβγ subunits in G protein-coupled receptor signaling and drug action. *Pharmacol Rev* **65**(2): 545–577. doi: 10.1124/pr.111.005603

Kim CG, Park D, Rhee SG. 1996. The role of carboxyl-terminal basic amino acids in Gqalpha-dependent activation, particulate association, and nuclear localization of phospholipase C-beta1. *J Biol Chem* **271**(35): 21187–21192. doi: 10.1074/jbc.271.35.21187

Kim H, Zheng S, Amini SS, Virk SM, Mikkelsen T, Brat DJ, Grimsby J, Sougnez C, Muller F, Hu J, et al. 2015. Whole-genome and multisector exome sequencing of primary and post-treatment glioblastoma reveals patterns of tumor evolution. *Genome Res* **25**(3): 316–327. doi: 10.1101/gr.180612.114

Kim DM, Choi S-H, Yeom YI, Min S-H, Kim I-C. 2016. Genome-scale functional analysis of the human genes modulating p53 activity by regulating MDM2 expression in a p53-independent manner. *Biochem Biophys Res Commun* **478**(2): 976–981. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.08.063

Kim J, Lee I-H, Cho HJ, Park C-K, Jung Y-S, Kim Y, Nam SH, Kim BS, Johnson MD, Kong D-S, et al. 2015. Spatiotemporal Evolution of the Primary Glioblastoma Genome. *Cancer Cell* **28**(3): 318–328. doi: 10.1016/j.ccell.2015.07.013

Kimple AJ, Soundararajan M, Hutsell SQ, Roos AK, Urban DJ, Setola V, Temple BRS, Roth BL, Knapp S, Willard FS, et al. 2009. Structural determinants of G-protein alpha subunit selectivity by regulator of G-protein signaling 2 (RGS2). *J Biol Chem* **284**(29): 19402–19411. doi: 10.1074/jbc.M109.024711

Klein S, Reuveni H, Levitzki A. 2000. Signal transduction by a nondissociable heterotrimeric yeast G protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**(7): 3219–3223. doi: 10.1073/pnas.050015797

Koh H-Y. 2013. Phospholipase C-β1 and schizophrenia-related behaviors. *Adv Biol Regul* **53**(3): 242–248. doi: 10.1016/j.jbior.2013.08.002

Koh I, Cha J, Park J, Choi J, Kang S-G, Kim P. 2018. The mode and dynamics of glioblastoma cell invasion into a decellularized tissue-derived extracellular matrix-based three-dimensional tumor model. *Sci Rep* **8**(1): 4608. doi: 10.1038/s41598-018-22681-3

Kohutek ZA, diPierro CG, Redpath GT, Hussaini IM. 2009. ADAM-10-mediated N-cadherin cleavage is protein kinase C-alpha dependent and promotes glioblastoma cell migration. *J Neurosci* **29**(14): 4605–4615. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5126-08.2009

Konishi M, Hayakawa Y, Koike K. 2019a. Role of Muscarinic Acetylcholine Signaling in Gastrointestinal Cancers. *Biomedicines* **7**(3). doi: 10.3390/biomedicines7030058

Konishi M, Hayakawa Y, Koike K. 2019b. Role of Muscarinic Acetylcholine Signaling in Gastrointestinal Cancers. *Biomedicines* **7**(3). doi: 10.3390/biomedicines7030058

Kouno J, Nagai H, Nagahata T, Onda M, Yamaguchi H, Adachi K, Takahashi H, Teramoto A, Emi M. 2004. Up-regulation of CC chemokine, CCL3L1, and receptors, CCR3, CCR5 in human glioblastoma that promotes cell growth. *J Neurooncol* **70**(3): 301–307. doi: 10.1007/s11060-004-9165-3

Koukourakis GV, Kouloulias V, Zacharias G, Papadimitriou C, Pantelakos P, Maravelis G, Fotineas A, Beli I, Chaldeopoulos D, Kouvaris J. 2009. Temozolomide with radiation therapy in high grade brain gliomas: pharmaceuticals considerations and efficacy; a review article. *Molecules* **14**(4): 1561–1577. doi: 10.3390/molecules14041561

Kozasa T, Hepler JR, Smrcka AV, Simon MI, Rhee SG, Sternweis PC, Gilman AG. 1993. Purification and characterization of recombinant G16 alpha from Sf9 cells: activation of purified phospholipase C isozymes by G-protein alpha subunits. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**(19): 9176–9180.

Krishnan A, Mustafa A, Almén MS, Fredriksson R, Williams MJ, Schiöth HB. 2015. Evolutionary hierarchy of vertebrate-like heterotrimeric G protein families. *Mol Phylogenet Evol* **91**: 27–40. doi: 10.1016/j.ympev.2015.05.009

Krupinski J, Coussen F, Bakalyar HA, Tang WJ, Feinstein PG, Orth K, Slaughter C, Reed RR, Gilman AG. 1989. Adenylyl cyclase amino acid sequence: possible channel- or transporter-like structure. *Science* **244**(4912): 1558–1564. doi: 10.1126/science.2472670

Kühl M, Sheldahl LC, Park M, Miller JR, Moon RT. 2000. The Wnt/Ca2+ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet* **16**(7): 279–283.

Kumar V, Jong Y-JI, O'Malley KL. 2008. Activated nuclear metabotropic glutamate receptor mGlu5 couples to nuclear Gq/11 proteins to generate inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated nuclear Ca2+ release. *J Biol Chem* **283**(20): 14072–14083. doi: 10.1074/jbc.M708551200

Kunarso G, Chia N-Y, Jeyakani J, Hwang C, Lu X, Chan Y-S, Ng H-H, Bourque G. 2010. Transposable elements have rewired the core regulatory network of human embryonic stem cells. *Nat Genet* **42**(7): 631–634. doi: 10.1038/ng.600

Kuo J-C, Han X, Hsiao C-T, Yates JR, Waterman CM. 2011. Analysis of the myosin-II-responsive focal adhesion proteome reveals a role for β-Pix in negative regulation of focal adhesion maturation. *Nat Cell Biol* **13**(4): 383–393. doi: 10.1038/ncb2216

Kurayoshi M, Oue N, Yamamoto H, Kishida M, Inoue A, Asahara T, Yasui W, Kikuchi A. 2006. Expression of Wnt-5a is correlated with aggressiveness of gastric cancer by stimulating cell migration and invasion. *Cancer Res* **66**(21): 10439–10448. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2359

Kwiatkowska A, Didier S, Fortin S, Chuang Y, White T, Berens ME, Rushing E, Eschbacher J, Tran NL, Chan A, et al. 2012. The small GTPase RhoG mediates glioblastoma cell invasion. *Mol Cancer* **11**: 65. doi: 10.1186/1476-4598-11-65

Lachance M, Ethier N, Wolbring G, Schnetkamp PP, Hébert TE. 1999. Stable association of G proteins with beta 2AR is independent of the state of receptor activation. *Cell Signal* **11**(7): 523–533. doi: 10.1016/s0898-6568(99)00024-8

Lacroix M, Abi-Said D, Fourney DR, Gokaslan ZL, Shi W, DeMonte F, Lang FF, McCutcheon IE, Hassenbusch SJ, Holland E, et al. 2001. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg* **95**(2): 190–198. doi: 10.3171/jns.2001.95.2.0190

Lai FPL, Szczodrak M, Oelkers JM, Ladwein M, Acconcia F, Benesch S, Auinger S, Faix J, Small JV, Polo S, et al. 2009. Cortactin promotes migration and platelet-derived growth factor-induced actin reorganization by signaling to Rho-GTPases. *Mol Biol Cell* **20**(14): 3209–3223. doi: 10.1091/mbc.e08-12-1180

Lambert NA. 2008. Dissociation of heterotrimeric g proteins in cells. *Sci Signal* **1**(25): re5. doi: 10.1126/scisignal.125re5

Lambright DG, Noel JP, Hamm HE, Sigler PB. 1994. Structural determinants for activation of the alpha-subunit of a heterotrimeric G protein. *Nature* **369**(6482): 621–628. doi: 10.1038/369621a0

Lambright DG, Sondek J, Bohm A, Skiba NP, Hamm HE, Sigler PB. 1996. The 2.0 A crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature* **379**(6563): 311–319. doi: 10.1038/379311a0

LaMorte VJ, Harootunian AT, Spiegel AM, Tsien RY, Feramisco JR. 1993. Mediation of growth factor induced DNA synthesis and calcium mobilization by Gq and Gi2. *J Cell Biol* **121**(1): 91–99.

Lan F, Yang Y, Han J, Wu Q, Yu H, Yue X. 2016. Sulforaphane reverses chemo-resistance to temozolomide in glioblastoma cells by NF-κB-dependent pathway downregulating MGMT expression. *Int J Oncol* **48**(2): 559–568. doi: 10.3892/ijo.2015.3271

Langhans J, Schneele L, Trenkler N, von Bandemer H, Nonnenmacher L, Karpel-Massler G, Siegelin MD, Zhou S, Halatsch M-E, Debatin K-M, et al. 2017. The effects of PI3K-mediated signalling on glioblastoma cell behaviour. *Oncogenesis* **6**(11): 398. doi: 10.1038/s41389-017-0004-8

Lappano R, Maggiolini M. 2011. G protein-coupled receptors: novel targets for drug discovery in cancer. *Nat Rev Drug Discov* **10**(1): 47–60. doi: 10.1038/nrd3320

Lappano R, Rigiracciolo D, De Marco P, Avino S, Cappello AR, Rosano C, Maggiolini M, De Francesco EM. 2016. Recent Advances on the Role of G Protein-Coupled Receptors in Hypoxia-Mediated Signaling. *AAPS J* **18**(2): 305–310. doi: 10.1208/s12248-016-9881-6

Latorraca NR, Venkatakrishnan AJ, Dror RO. 2017. GPCR Dynamics: Structures in Motion. *Chem Rev* **117**(1): 139–155. doi: 10.1021/acs.chemrev.6b00177

Lau J, Ilkhanizadeh S, Wang S, Miroshnikova YA, Salvatierra NA, Wong RA, Schmidt C, Weaver VM, Weiss WA, Persson AI. 2015. STAT3 Blockade Inhibits Radiation-Induced Malignant Progression in Glioma. *Cancer Res* **75**(20): 4302–4311. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3331

Lau WW, Chan AS, Poon LS, Zhu J, Wong YH. 2013a. Gβγ-mediated activation of protein kinase D exhibits subunit specificity and requires Gβγ-responsive phospholipase Cβ isoforms. *Cell Commun Signal* **11**(1): 22. doi: 10.1186/1478-811X-11-22

Lau WW, Chan AS, Poon LS, Zhu J, Wong YH. 2013b. Gβγ-mediated activation of protein kinase D exhibits subunit specificity and requires Gβγ-responsive phospholipase Cβ isoforms. *Cell Commun Signal* **11**(1): 22. doi: 10.1186/1478-811X-11-22

Lausecker F, Tian X, Inoue K, Wang Z, Pedigo CE, Hassan H, Liu C, Zimmer M, Jinno S, Huckle AL, et al. 2018. Vinculin is required to maintain glomerular barrier integrity. *Kidney Int* **93**(3): 643–655. doi: 10.1016/j.kint.2017.09.021

LaValle CR, George KM, Sharlow ER, Lazo JS, Wipf P, Wang QJ. 2010. Protein kinase D as a potential new target for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta* **1806**(2): 183–192. doi: 10.1016/j.bbcan.2010.05.003

Lavon I, Zrihan D, Zelikovitch B, Fellig Y, Fuchs D, Soffer D, Siegal T. 2007. Longitudinal assessment of genetic and epigenetic markers in oligodendrogliomas. *Clin Cancer Res* **13**(5): 1429–1437. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2050

Lawson CD, Ridley AJ. 2018. Rho GTPase signaling complexes in cell migration and invasion. *J Cell Biol* **217**(2): 447–457. doi: 10.1083/jcb.201612069

Le Mercier M, Mathieu V, Haibe-Kains B, Bontempi G, Mijatovic T, Decaestecker C, Kiss R, Lefranc F. 2008. Knocking down galectin 1 in human hs683 glioblastoma cells impairs both angiogenesis and endoplasmic reticulum stress responses. *J Neuropathol Exp Neurol* **67**(5): 456–469. doi: 10.1097/NEN.0b013e318170f892

Le Rhun E, Rhun EL, Taillibert S, Chamberlain MC. 2015. The future of high-grade glioma: Where we are and where are we going. *Surg Neurol Int* **6**(Suppl 1): S9–S44. doi: 10.4103/2152-7806.151331

Lecointre C, Desrues L, Joubert JE, Perzo N, Guichet P-O, Le Joncour V, Brulé C, Chabbert M, Leduc R, Prézeau L, et al. 2015. Signaling switch of the urotensin II vasosactive peptide GPCR: prototypic chemotaxic mechanism in glioma. *Oncogene* **34**(39): 5080–5094. doi: 10.1038/onc.2014.433

Lee CH, Katz A, Simon MI. 1995. Multiple regions of G alpha 16 contribute to the specificity of activation by the C5a receptor. *Mol Pharmacol* **47**(2): 218–223.

Lee CH, Park D, Wu D, Rhee SG, Simon MI. 1992. Members of the Gq alpha subunit gene family activate phospholipase C beta isozymes. *J Biol Chem* **267**(23): 16044–16047.

Lee H, Herrmann A, Deng J-H, Kujawski M, Niu G, Li Z, Forman S, Jove R, Pardoll DM, Yu H. 2009. Persistently activated Stat3 maintains constitutive NF-kappaB activity in tumors. *Cancer Cell* **15**(4): 283–293. doi: 10.1016/j.ccr.2009.02.015

Lee J-J, Kim HS, Lee J-S, Park J, Shin SC, Song S, Lee E, Choi J-E, Suh J-W, Lee H, et al. 2018. Small molecule activator of Nm23/NDPK as an inhibitor of metastasis. *Sci Rep* **8**(1): 10909. doi: 10.1038/s41598-018-29101-6

Lee MMK, Wong YH. 2009. CCR1-mediated activation of Nuclear Factor-kappaB in THP-1 monocytic cells involves Pertussis Toxin-insensitive Galpha(14) and Galpha(16) signaling cascades. *J Leukoc Biol* **86**(6): 1319–1329. doi: 10.1189/jlb.0209052

Leirdal M, Sioud M. 2000. Protein kinase Calpha isoform regulates the activation of the MAP kinase ERK1/2 in human glioma cells: involvement in cell survival and gene expression. *Mol Cell Biol Res Commun* **4**(2): 106–110. doi: 10.1006/mcbr.2000.0259

Lemée J-M, Clavreul A, Menei P. 2015. Intratumoral heterogeneity in glioblastoma: don't forget the peritumoral brain zone. *Neuro-oncology* **17**(10): 1322–1332. doi: 10.1093/neuonc/nov119

Li F, De Godoy M, Rattan S. 2004. Role of adenylate and guanylate cyclases in beta1-, beta2-, and beta3-adrenoceptor-mediated relaxation of internal anal sphincter smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* **308**(3): 1111–1120. doi: 10.1124/jpet.103.060145

Li G, Wei H, Chen Z, Lv S, Yin C, Wang D. 2009. STAT3 silencing with lentivirus inhibits growth and induces apoptosis and differentiation of U251 cells. *J Neurooncol* **91**(2): 165–174. doi: 10.1007/s11060-008-9696-0

Li H, Yang L, Fu H, Yan J, Wang Y, Guo H, Hao X, Xu X, Jin T, Zhang N. 2013. Association between Gαi2 and ELMO1/Dock180 connects chemokine signalling with Rac activation and metastasis. *Nat Commun* **4**: 1706. doi: 10.1038/ncomms2680

Li Z, Cai S, Liu Y, Yang C, Tian Y, Chen G, Cao C. 2016. Over-expression of Gαi3 in human glioma is required for Akt-mTOR activation and cell growth. *Oncotarget* **5**(0). doi: 10.18632/oncotarget.10995

Li X, Wu C, Chen N, Gu H, Yen A, Cao L, Wang E, Wang L. 2016. PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and targeted therapy for glioblastoma. *Oncotarget* **7**(22): 33440–33450. doi: 10.18632/oncotarget.7961

Li Z, Jiang H, Xie W, Zhang Z, Smrcka AV, Wu D. 2000. Roles of PLC-beta2 and -beta3 and PI3Kgamma in chemoattractant-mediated signal transduction. *Science* **287**(5455): 1046–1049. doi: 10.1126/science.287.5455.1046

Li Z, Chen Y, An T, Liu P, Zhu J, Yang H, Zhang W, Dong T, Jiang J, Zhang Y, et al. 2019. Nuciferine inhibits the progression of glioblastoma by suppressing the SOX2-AKT/STAT3-Slug signaling pathway. *J Exp Clin Cancer Res* **38**(1): 139. doi: 10.1186/s13046-019-1134-y

Liang H, Chen G, Li J, Yang F. 2019. Snail expression contributes to temozolomide resistance in glioblastoma. *Am J Transl Res* **11**(7): 4277–4289.

Liang J, Piao Y, Holmes L, Fuller GN, Henry V, Tiao N, de Groot JF. 2014. Neutrophils promote the malignant glioma phenotype through S100A4. *Clin Cancer Res* **20**(1): 187–198. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-1279

Liau LM, Ashkan K, Tran DD, Campian JL, Trusheim JE, Cobbs CS, Heth JA, Salacz M, Taylor S, D'Andre SD, et al. 2018. First results on survival from a large Phase 3 clinical trial of an autologous dendritic cell vaccine in newly diagnosed glioblastoma. *J Transl Med* **16**(1): 142. doi: 10.1186/s12967-018-1507-6

Liberti MV, Locasale JW. 2016. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci* **41**(3): 211–218. doi: 10.1016/j.tibs.2015.12.001

Lim S-T, Miller NLG, Nam J-O, Chen XL, Lim Y, Schlaepfer DD. 2010. Pyk2 inhibition of p53 as an adaptive and intrinsic mechanism facilitating cell proliferation and survival. *J Biol Chem* **285**(3): 1743–1753. doi: 10.1074/jbc.M109.064212

Lipinski CA, Tran NL, Menashi E, Rohl C, Kloss J, Bay RC, Berens ME, Loftus JC. 2005. The tyrosine kinase pyk2 promotes migration and invasion of glioma cells. *Neoplasia* **7**(5): 435–445. doi: 10.1593/neo.04712

Lisi L, Ciotti GMP, Braun D, Kalinin S, Currò D, Dello Russo C, Coli A, Mangiola A, Anile C, Feinstein DL, et al. 2017. Expression of iNOS, CD163 and ARG-1 taken as M1 and M2 markers of microglial polarization in human glioblastoma and the surrounding normal parenchyma. *Neurosci Lett* **645**: 106–112. doi: 10.1016/j.neulet.2017.02.076

Liu J, Wang Y, Goh WI, Goh H, Baird MA, Ruehland S, Teo S, Bate N, Critchley DR, Davidson MW, et al. 2015. Talin determines the nanoscale architecture of focal adhesions. *Proc Natl Acad Sci USA* **112**(35): E4864-4873. doi: 10.1073/pnas.1512025112

Liu W, Yue F, Zheng M, Merlot A, Bae D-H, Huang M, Lane D, Jansson P, Lui GYL, Richardson V, et al. 2015. The proto-oncogene c-Src and its downstream signaling pathways are inhibited by the metastasis suppressor, NDRG1. *Oncotarget* **6**(11): 8851–8874. doi: 10.18632/oncotarget.3316

Liu AMF, Wong YH. 2004. G16-mediated activation of nuclear factor kappaB by the adenosine A1 receptor involves c-Src, protein kinase C, and ERK signaling. *J Biol Chem* **279**(51): 53196–53204. doi: 10.1074/jbc.M410196200

Liu C-A, Chang C-Y, Hsueh K-W, Su H-L, Chiou T-W, Lin S-Z, Harn H-J. 2018. Migration/Invasion of Malignant Gliomas and Implications for Therapeutic Treatment. *Int J Mol Sci* **19**(4). doi: 10.3390/ijms19041115

Liu Che, Pham K, Luo D, Reynolds BA, Hothi P, Foltz G, Harrison JK. 2013. Expression and functional heterogeneity of chemokine receptors CXCR4 and CXCR7 in primary patient-derived glioblastoma cells. *PLoS ONE* **8**(3): e59750. doi: 10.1371/journal.pone.0059750

Liu WW, Mattingly RR, Garrison JC. 1996. Transformation of Rat-1 fibroblasts with the v-src oncogene increases the tyrosine phosphorylation state and activity of the alpha subunit of Gq/G11. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**(16): 8258–8263. doi: 10.1073/pnas.93.16.8258

Liu X, Yu J, Song S, Yue X, Li Q. 2017. Protease-activated receptor-1 (PAR-1): a promising molecular target for cancer. *Oncotarget* **8**(63): 107334–107345. doi: 10.18632/oncotarget.21015

Liu Xujie, Liu K, Qin J, Hao L, Li X, Liu Y, Zhang X, Liu Xiuxiu, Li P, Han S, et al. 2015. C/EBPβ promotes angiogenesis through secretion of IL-6, which is inhibited by genistein, in EGFRvIII-positive glioblastoma. *Int J Cancer* **136**(11): 2524–2534. doi: 10.1002/ijc.29319

Liu Yawei, Carlsson R, Ambjørn M, Hasan M, Badn W, Darabi A, Siesjö P, Issazadeh-Navikas S. 2013. PD-L1 expression by neurons nearby tumors indicates better prognosis in glioblastoma patients. *J Neurosci* **33**(35): 14231–14245. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5812-12.2013

Liu Yan, Kosaka A, Ikeura M, Kohanbash G, Fellows-Mayle W, Snyder LA, Okada H. 2013. Premetastatic soil and prevention of breast cancer brain metastasis. *Neuro-oncology* **15**(7): 891–903. doi: 10.1093/neuonc/not031

Liu Y-Y, Chen M-B, Cheng L, Zhang Z-Q, Yu Z-Q, Jiang Q, Chen G, Cao C. 2018. microRNA-200a downregulation in human glioma leads to Gαi1 over-expression, Akt activation, and cell proliferation. *Oncogene* **37**(21): 2890–2902. doi: 10.1038/s41388-018-0184-5

Liu Zhifeng, Yang X, Chen C, Liu B, Ren B, Wang L, Zhao K, Yu S, Ming H. 2013. Expression of the Arp2/3 complex in human gliomas and its role in the migration and invasion of glioma cells. *Oncol Rep* **30**(5): 2127–2136. doi: 10.3892/or.2013.2669

Lo RKH, Cheung H, Wong YH. 2003. Constitutively active Galpha16 stimulates STAT3 via a c-Src/JAK- and ERK-dependent mechanism. *J Biol Chem* **278**(52): 52154–52165. doi: 10.1074/jbc.M307299200

Lo RKH, Liu AMF, Wise H, Wong YH. 2008. Prostacyclin receptor-induced STAT3 phosphorylation in human erythroleukemia cells is mediated via Galpha(s) and Galpha(16) hybrid signaling. *Cell Signal* **20**(11): 2095–2106. doi: 10.1016/j.cellsig.2008.08.003

Lo RKH, Wong YH. 2006. Transcriptional activation of c-Fos by constitutively active Galpha(16)QL through a STAT1-dependent pathway. *Cell Signal* **18**(12): 2143–2153. doi: 10.1016/j.cellsig.2006.04.004

Lochrie MA, Hurley JB, Simon MI. 1985. Sequence of the alpha subunit of photoreceptor G protein: homologies between transducin, ras, and elongation factors. *Science* **228**(4695): 96–99.

Lochrie MA, Simon MI. 1988. G protein multiplicity in eukaryotic signal transduction systems. *Biochemistry* **27**(14): 4957–4965.

Logothetis DE, Kurachi Y, Galper J, Neer EJ, Clapham DE. 1987. The beta gamma subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K+ channel in heart. *Nature* **325**(6102): 321–326. doi: 10.1038/325321a0

Lokits AD, Indrischek H, Meiler J, Hamm HE, Stadler PF. 2018. Tracing the evolution of the heterotrimeric G protein α subunit in Metazoa. *BMC Evol Biol* **18**(1): 51. doi: 10.1186/s12862-018-1147-8

Lombard A, Goffart N, Rogister B. 2015. Glioblastoma Circulating Cells: Reality, Trap or Illusion? *Stem Cells Int* **2015**: 182985. doi: 10.1155/2015/182985

Lombardi MY, Assem M. 2017. Glioblastoma Genomics: A Very Complicated Story. In: De Vleeschouwer S, editor. *Glioblastoma*. Brisbane (AU): Codon Publications. Available at http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470004/. Accessed 2019 Aug 20.

Longo DL, Baden LR. 2018. Exploiting Viruses to Treat Diseases. *N Engl J Med* **379**(2): 194–196. doi: 10.1056/NEJMe1807181

Lønne GK, Cornmark L, Zahirovic IO, Landberg G, Jirström K, Larsson C. 2010. PKCalpha expression is a marker for breast cancer aggressiveness. *Mol Cancer* **9**: 76. doi: 10.1186/1476-4598-9-76

Lopes IC, de Oliveira SCB, Oliveira-Brett AM. 2013. Temozolomide chemical degradation to 5-aminoimidazole-4-carboxamide – Electrochemical study. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **704**: 183–189. doi: 10.1016/j.jelechem.2013.07.011

López-Colomé AM, Lee-Rivera I, Benavides-Hidalgo R, López E. 2017. Paxillin: a crossroad in pathological cell migration. *J Hematol Oncol* **10**(1): 50. doi: 10.1186/s13045-017-0418-y

LoPiccolo J, Blumenthal GM, Bernstein WB, Dennis PA. 2008. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations. *Drug Resist Updat* **11**(1–2): 32–50. doi: 10.1016/j.drup.2007.11.003

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. 2007. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* **114**(2): 97–109. doi: 10.1007/s00401-007-0243-4

Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. 2016. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol* **131**(6): 803–820. doi: 10.1007/s00401-016-1545-1

Louis LM, Lerro CC, Friesen MC, Andreotti G, Koutros S, Sandler DP, Blair A, Robson MG, Beane Freeman LE. 2017. A prospective study of cancer risk among Agricultural Health Study farm spouses associated with personal use of organochlorine insecticides. *Environ Health* **16**(1): 95. doi: 10.1186/s12940-017-0298-1

Lu G, Chang JT, Liu Z, Chen Y, Li M, Zhu J-J. 2016. Phospholipase C Beta 1: a Candidate Signature Gene for Proneural Subtype High-Grade Glioma. *Mol Neurobiol* **53**(9): 6511–6525. doi: 10.1007/s12035-015-9518-2

Lu W, Lee H-K, Xiang C, Finniss S, Brodie C. 2007. The phosphorylation of tyrosine 332 is necessary for the caspase 3-dependent cleavage of PKCdelta and the regulation of cell apoptosis. *Cell Signal* **19**(10): 2165–2173. doi: 10.1016/j.cellsig.2007.06.015

Lu X, Lu J, Liao B, Li X, Qian X, Li K. 2017. Driver pattern identification over the gene co-expression of drug response in ovarian cancer by integrating high throughput genomics data. *Sci Rep* **7**(1): 16188. doi: 10.1038/s41598-017-16286-5

Lu Z, Hornia A, Jiang YW, Zang Q, Ohno S, Foster DA. 1997. Tumor promotion by depleting cells of protein kinase C delta. *Mol Cell Biol* **17**(6): 3418–3428. doi: 10.1128/mcb.17.6.3418

Lukov GL, Baker CM, Ludtke PJ, Hu T, Carter MD, Hackett RA, Thulin CD, Willardson BM. 2006. Mechanism of assembly of G protein betagamma subunits by protein kinase CK2-phosphorylated phosducin-like protein and the cytosolic chaperonin complex. *J Biol Chem* **281**(31): 22261–22274. doi: 10.1074/jbc.M601590200

Luo R, Jeong S-J, Jin Z, Strokes N, Li S, Piao X. 2011. G protein-coupled receptor 56 and collagen III, a receptor-ligand pair, regulates cortical development and lamination. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**(31): 12925–12930. doi: 10.1073/pnas.1104821108

Lutz S, Freichel-Blomquist A, Rümenapp U, Schmidt M, Jakobs KH, Wieland T. 2004. p63RhoGEF and GEFT are Rho-specific guanine nucleotide exchange factors encoded by the same gene. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **369**(5): 540–546. doi: 10.1007/s00210-004-0926-5

Lutz S, Freichel-Blomquist A, Yang Y, Rümenapp U, Jakobs KH, Schmidt M, Wieland T. 2005. The guanine nucleotide exchange factor p63RhoGEF, a specific link between Gq/11-coupled receptor signaling and RhoA. *J Biol Chem* **280**(12): 11134–11139. doi: 10.1074/jbc.M411322200

Luwor RB, Stylli SS, Kaye AH. 2013. The role of Stat3 in glioblastoma multiforme. *J Clin Neurosci* **20**(7): 907–911. doi: 10.1016/j.jocn.2013.03.006

Lynes JP, Sanchez VE, Nwankwo AK, Dominah GA, Nduom EK. 2019. Immune checkpoint modulation: Tenets and implications in glioblastoma. *Glioma* **2**(1): 20. doi: 10.4103/glioma.glioma_47_18

Lyon AM, Tesmer JJG. 2013. Structural insights into phospholipase C-β function. *Mol Pharmacol* **84**(4): 488–500. doi: 10.1124/mol.113.087403

Ma H, Li T, Tao Z, Hai L, Tong L, Yi L, Abeysekera IR, Liu P, Xie Y, Li J, et al. 2019. NKCC1 promotes EMT-like process in GBM via RhoA and Rac1 signaling pathways. *J Cell Physiol* **234**(2): 1630–1642. doi: 10.1002/jcp.27033

Ma X, Aoki T, Tsuruyama T, Narumiya S. 2015. Definition of Prostaglandin E2-EP2 Signals in the Colon Tumor Microenvironment That Amplify Inflammation and Tumor Growth. *Cancer Res* **75**(14): 2822–2832. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0125

Magro AM, Magro AD, Cunningham C, Miller MR. 2007. Down-regulation of vinculin upon MK886-induced apoptosis in LN18 glioblastoma cells. *Neoplasma* **54**(6): 517–526.

Mahajan-Thakur S, Bien-Möller S, Marx S, Schroeder H, Rauch BH. 2017. Sphingosine 1-phosphate (S1P) signaling in glioblastoma multiforme-A systematic review. *Int J Mol Sci* **18**(11). doi: 10.3390/ijms18112448

Mahavadi S, Nalli AD, Wang H, Kendig DM, Crowe MS, Lyall V, Grider JR, Murthy KS. 2018. Regulation of gastric smooth muscle contraction via Ca2+-dependent and Ca2+-independent actin polymerization. *PLoS ONE* **13**(12): e0209359. doi: 10.1371/journal.pone.0209359

Mair DB, Zhu J, Weinberg SH, Li R. 2018. The Arp2/3 Complex is Necessary for Migration of Glioblastoma Cells on Compliant Substrates due to a Lamellipodia-Provided Mechanical Advantage. *Biophysical Journal* **114**(3): 17a. doi: 10.1016/j.bpj.2017.11.136

Majewska E, Szeliga M. 2017. AKT/GSK3β Signaling in Glioblastoma. *Neurochem Res* **42**(3): 918–924. doi: 10.1007/s11064-016-2044-4

Malchinkhuu E, Sato K, Horiuchi Y, Mogi C, Ohwada S, Ishiuchi S, Saito N, Kurose H, Tomura H, Okajima F. 2005. Role of p38 mitogen-activated kinase and c-Jun terminal kinase in migration response to lysophosphatidic acid and sphingosine-1-phosphate in glioma cells. *Oncogene* **24**(44): 6676–6688. doi: 10.1038/sj.onc.1208805

Malchinkhuu E, Sato K, Maehama T, Mogi C, Tomura H, Ishiuchi S, Yoshimoto Y, Kurose H, Okajima F. 2008. S1P(2) receptors mediate inhibition of glioma cell migration through Rho signaling pathways independent of PTEN. *Biochem Biophys Res Commun* **366**(4): 963–968. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.12.054

Malric L, Monferran S, Gilhodes J, Boyrie S, Dahan P, Skuli N, Sesen J, Filleron T, Kowalski-Chauvel A, Cohen-Jonathan Moyal E, et al. 2017. Interest of integrins targeting in glioblastoma according to tumor heterogeneity and cancer stem cell paradigm: an update. *Oncotarget* **8**(49): 86947–86968. doi: 10.18632/oncotarget.20372

Malta TM, de Souza CF, Sabedot TS, Silva TC, Mosella MS, Kalkanis SN, Snyder J, Castro AVB, Noushmehr H. 2018. Glioma CpG island methylator phenotype (G-CIMP): biological and clinical implications. *Neuro-oncology* **20**(5): 608–620. doi: 10.1093/neuonc/nox183

Manglik A, Kruse AC, Kobilka TS, Thian FS, Mathiesen JM, Sunahara RK, Pardo L, Weis WI, Kobilka BK, Granier S. 2012. Crystal structure of the μ-opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature* **485**(7398): 321–326. doi: 10.1038/nature10954

Mangmool S, Kurose H. 2011. Gi/o Protein-Dependent and -Independent Actions of Pertussis Toxin (PTX). *Toxins (Basel)* **3**(7): 884–899. doi: 10.3390/toxins3070884

Mansouri A, Karamchandani J, Das S. 2017. Molecular Genetics of Secondary Glioblastoma. In: De Vleeschouwer S, editor. *Glioblastoma*. Brisbane (AU): Codon Publications. Available at http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK469981/. Accessed 2019 Aug 19.

Manzoli L, Billi AM, Rubbini S, Bavelloni A, Faenza I, Gilmour RS, Rhee SG, Cocco L. 1997. Essential role for nuclear phospholipase C beta1 in insulin-like growth factor I-induced mitogenesis. *Cancer Res* **57**(11): 2137–2139.

Mapara MY, Bommert K, Bargou RC, Leng C, Beck C, Ludwig WD, Gierschik P, Dörken B. 1995. G protein subunit G alpha 16 expression is restricted to progenitor B cells during human B-cell differentiation. *Blood* **85**(7): 1836–1842.

Marinissen MJ, Servitja J-M, Offermanns S, Simon MI, Gutkind JS. 2003. Thrombin protease-activated receptor-1 signals through Gq- and G13-initiated MAPK cascades regulating c-Jun

expression to induce cell transformation. *J Biol Chem* **278**(47): 46814–46825. doi: 10.1074/jbc.M305709200

Marivin A, Morozova V, Walawalkar I, Leyme A, Kretov DA, Cifuentes D, Dominguez I, Garcia-Marcos M. 2019. GPCR-independent activation of G proteins promotes apical cell constriction in vivo. *J Cell Biol* **218**(5): 1743–1763. doi: 10.1083/jcb.201811174

Martiny-Baron G, Fabbro D. 2007. Classical PKC isoforms in cancer. *Pharmacol Res* **55**(6): 477–486. doi: 10.1016/j.phrs.2007.04.001

Marty C, Browning DD, Ye RD. 2003. Identification of tetratricopeptide repeat 1 as an adaptor protein that interacts with heterotrimeric G proteins and the small GTPase Ras. *Mol Cell Biol* **23**(11): 3847–3858.

Massara M, Persico P, Bonavita O, Mollica Poeta V, Locati M, Simonelli M, Bonecchi R. 2017. Neutrophils in Gliomas. *Front Immunol* **8**: 1349. doi: 10.3389/fimmu.2017.01349

Mathieu J, Zhang Z, Zhou W, Wang AJ, Heddleston JM, Pinna CMA, Hubaud A, Stadler B, Choi M, Bar M, et al. 2011. HIF induces human embryonic stem cell markers in cancer cells. *Cancer Res* **71**(13): 4640–4652. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3320

Matias D, Balça-Silva J, da Graça GC, Wanjiru CM, Macharia LW, Nascimento CP, Roque NR, Coelho-Aguiar JM, Pereira CM, Dos Santos MF, et al. 2018. Microglia/Astrocytes-Glioblastoma Crosstalk: Crucial Molecular Mechanisms and Microenvironmental Factors. *Front Cell Neurosci* **12**: 235. doi: 10.3389/fncel.2018.00235

Maus A, Peters GJ. 2017. Glutamate and α-ketoglutarate: key players in glioma metabolism. *Amino Acids* **49**(1): 21–32. doi: 10.1007/s00726-016-2342-9

Mayor R, Carmona-Fontaine C. 2010. Keeping in touch with contact inhibition of locomotion. *Trends Cell Biol* **20**(6): 319–328. doi: 10.1016/j.tcb.2010.03.005

McCord M, Mukouyama Y-S, Gilbert MR, Jackson S. 2017. Targeting WNT Signaling for Multifaceted Glioblastoma Therapy. *Front Cell Neurosci* **11**: 318. doi: 10.3389/fncel.2017.00318

McCrea PD, Gottardi CJ. 2016. Beyond β-catenin: prospects for a larger catenin network in the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol* **17**(1): 55–64. doi: 10.1038/nrm.2015.3

McIntire WE, MacCleery G, Garrison JC. 2001. The G protein beta subunit is a determinant in the coupling of Gs to the beta 1-adrenergic and A2a adenosine receptors. *J Biol Chem* **276**(19): 15801–15809. doi: 10.1074/jbc.M011233200

McJilton MA, Van Sikes C, Wescott GG, Wu D, Foreman TL, Gregory CW, Weidner DA, Harris Ford O, Morgan Lasater A, Mohler JL, et al. 2003. Protein kinase Cepsilon interacts with Bax and promotes survival of human prostate cancer cells. *Oncogene* **22**(39): 7958–7968. doi: 10.1038/sj.onc.1206795

McKenzie GAG, Hinsley EE, Hunter K, Lambert DW. 2014. The endothelin axis in head and neck cancer: a promising therapeutic opportunity? *J Oral Pathol Med* **43**(6): 395–404. doi: 10.1111/jop.12108

Medynski DC, Sullivan K, Smith D, Van Dop C, Chang FH, Fung BK, Seeburg PH, Bourne HR. 1985. Amino acid sequence of the alpha subunit of transducin deduced from the cDNA sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**(13): 4311–4315.

Mehta A, Orchard S. 2009. Nucleoside diphosphate kinase (NDPK, NM23, AWD): recent regulatory advances in endocytosis, metastasis, psoriasis, insulin release, fetal erythroid lineage and heart failure; translational medicine exemplified. *Mol Cell Biochem* **329**(1–2): 3–15. doi: 10.1007/s11010-009-0114-5

Meigs TE, Fedor-Chaiken M, Kaplan DD, Brackenbury R, Casey PJ. 2002. Galpha12 and Galpha13 negatively regulate the adhesive functions of cadherin. *J Biol Chem* **277**(27): 24594–24600. doi: 10.1074/jbc.M201984200

Meigs TE, Fields TA, McKee DD, Casey PJ. 2001. Interaction of Galpha 12 and Galpha 13 with the cytoplasmic domain of cadherin provides a mechanism for beta -catenin release. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**(2): 519–524. doi: 10.1073/pnas.021350998

Melien O. 2007. Heterotrimeric G proteins and disease. *Methods Mol Biol* **361**: 119–144. doi: 10.1385/1-59745-208-4:119

Meng W, Xue S, Chen Y. 2018. The role of CXCL12 in tumor microenvironment. *Gene* **641**: 105–110. doi: 10.1016/j.gene.2017.10.015

Metellus P, Voutsinos-Porche B, Nanni-Metellus I, Colin C, Fina F, Berenguer C, Dussault N, Boudouresque F, Loundou A, Intagliata D, et al. 2011. Adrenomedullin expression and regulation in human glioblastoma, cultured human glioblastoma cell lines and pilocytic astrocytoma. *Eur J Cancer* **47**(11): 1727–1735. doi: 10.1016/j.ejca.2011.02.021

Metz C, Döger R, Riquelme E, Cortés P, Holmes C, Shaughnessy R, Oyanadel C, Grabowski C, González A, Soza A. 2016. Galectin-8 promotes migration and proliferation and prevents apoptosis in U87 glioblastoma cells. *Biol Res* **49**(1): 33. doi: 10.1186/s40659-016-0091-6

Michaelson D, Ahearn I, Bergo M, Young S, Philips M. 2002. Membrane trafficking of heterotrimeric G proteins via the endoplasmic reticulum and Golgi. *Mol Biol Cell* **13**(9): 3294–3302. doi: 10.1091/mbc.e02-02-0095

Mikheev AM, Mikheeva SA, Severs LJ, Funk CC, Huang L, McFaline-Figueroa JL, Schwensen J, Trapnell C, Price ND, Wong S, et al. 2018. Targeting TWIST1 through loss of function inhibits tumorigenicity of human glioblastoma. *Mol Oncol* **12**(7): 1188–1202. doi: 10.1002/1878-0261.12320

Mikheeva SA, Mikheev AM, Petit A, Beyer R, Oxford RG, Khorasani L, Maxwell J-P, Glackin CA, Wakimoto H, González-Herrero I, et al. 2010. TWIST1 promotes invasion through mesenchymal change in human glioblastoma. *Mol Cancer* **9**: 194. doi: 10.1186/1476-4598-9-194

Miller K, Dixit S, Bredlau A-L, Moore A, McKinnon E, Broome A-M. 2016. Delivery of a drug cache to glioma cells overexpressing platelet-derived growth factor receptor using lipid nanocarriers. *Nanomedicine (Lond)* **11**(6): 581–595. doi: 10.2217/nnm.15.218

Milligan G, Kostenis E. 2006. Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1: S46-55. doi: 10.1038/sj.bjp.0706405

Milon L, Rousseau-Merck MF, Munier A, Erent M, Lascu I, Capeau J, Lacombe ML. 1997. nm23-H4, a new member of the family of human nm23/nucleoside diphosphate kinase genes localised on chromosome 16p13. *Hum Genet* **99**(4): 550–557. doi: 10.1007/s004390050405

Minata M, Audia A, Shi J, Lu S, Bernstock J, Pavlyukov MS, Das A, Kim S-H, Shin YJ, Lee Y, et al. 2019. Phenotypic Plasticity of Invasive Edge Glioma Stem-like Cells in Response to Ionizing Radiation. *Cell Rep* **26**(7): 1893-1905.e7. doi: 10.1016/j.celrep.2019.01.076

Miroshnikova YA, Mouw JK, Barnes JM, Pickup MW, Lakins JN, Kim Y, Lobo K, Persson AI, Reis GF, McKnight TR, et al. 2016. Tissue mechanics promote IDH1-dependent HIF1α-tenascin C feedback to regulate glioblastoma aggression. *Nat Cell Biol* **18**(12): 1336–1345. doi: 10.1038/ncb3429

Mischak H, Goodnight JA, Kolch W, Martiny-Baron G, Schaechtle C, Kazanietz MG, Blumberg PM, Pierce JH, Mushinski JF. 1993. Overexpression of protein kinase C-delta and -epsilon in NIH 3T3 cells induces opposite effects on growth, morphology, anchorage dependence, and tumorigenicity. *J Biol Chem* **268**(9): 6090–6096.

Mitchell DA, Batich KA, Gunn MD, Huang M-N, Sanchez-Perez L, Nair SK, Congdon KL, Reap EA, Archer GE, Desjardins A, et al. 2015. Tetanus toxoid and CCL3 improve dendritic cell vaccines in mice and glioblastoma patients. *Nature* **519**(7543): 366–369. doi: 10.1038/nature14320

Mitra SK, Hanson DA, Schlaepfer DD. 2005. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(1): 56–68. doi: 10.1038/nrm1549

Moers A, Nürnberg A, Goebbels S, Wettschureck N, Offermanns S. 2008. Galpha12/Galpha13 deficiency causes localized overmigration of neurons in the developing cerebral and cerebellar cortices. *Mol Cell Biol* **28**(5): 1480–1488. doi: 10.1128/MCB.00651-07

Mondal A, Kumari Singh D, Panda S, Shiras A. 2017. Extracellular Vesicles As Modulators of Tumor Microenvironment and Disease Progression in Glioma. *Front Oncol* **7**: 144. doi: 10.3389/fonc.2017.00144

Moreira IS. 2014. Structural features of the G-protein/GPCR interactions. *Biochim Biophys Acta* **1840**(1): 16–33. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.08.027

Motz GT, Coukos G. 2013. Deciphering and reversing tumor immune suppression. *Immunity* **39**(1): 61–73. doi: 10.1016/j.immuni.2013.07.005

Mrozik KM, Blaschuk OW, Cheong CM, Zannettino ACW, Vandyke K. 2018. N-cadherin in cancer metastasis, its emerging role in haematological malignancies and potential as a therapeutic target in cancer. *BMC Cancer* **18**(1): 939. doi: 10.1186/s12885-018-4845-0

Mueller WM, Yetkin FZ, Hammeke TA, Morris GL, Swanson SJ, Reichert K, Cox R, Haughton VM. 1996. Functional magnetic resonance imaging mapping of the motor cortex in patients with cerebral tumors. *Neurosurgery* **39**(3): 515–520; discussion 520-521. doi: 10.1097/00006123-199609000-00015

Mughal AA, Zhang L, Fayzullin A, Server A, Li Y, Wu Y, Glass R, Meling T, Langmoen IA, Leergaard TB, et al. 2018. Patterns of Invasive Growth in Malignant Gliomas-The Hippocampus Emerges as an Invasion-Spared Brain Region. *Neoplasia* **20**(7): 643–656. doi: 10.1016/j.neo.2018.04.001

Mukhopadhyay S, Ross EM. 1999. Rapid GTP binding and hydrolysis by G(q) promoted by receptor and GTPase-activating proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**(17): 9539–9544. doi: 10.1073/pnas.96.17.9539

Mullin JM, Laughlin KV, Ginanni N, Marano CW, Clarke HM, Peralta Soler A. 2000. Increased tight junction permeability can result from protein kinase C activation/translocation and act as a tumor promotional event in epithelial cancers. *Ann N Y Acad Sci* **915**: 231–236. doi: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb05246.x

Muppidi JR, Schmitz R, Green JA, Xiao W, Larsen AB, Braun SE, An J, Xu Y, Rosenwald A, Ott G, et al. 2014. Loss of signalling via Gα13 in germinal centre B-cell-derived lymphoma. *Nature* **516**(7530): 254–258. doi: 10.1038/nature13765

Murga C, Arcones AC, Cruces-Sande M, Briones AM, Salaices M, Mayor Jr. F. 2019. G Protein-Coupled Receptor Kinase 2 (GRK2) as a Potential Therapeutic Target in Cardiovascular and Metabolic Diseases. *Front Pharmacol* **10**. doi: 10.3389/fphar.2019.00112

Mut M, Amos S, Hussaini IM. 2010. PKC alpha phosphorylates cytosolic NF-kappaB/p65 and PKC delta delays nuclear translocation of NF-kappaB/p65 in U1242 glioblastoma cells. *Turk Neurosurg* **20**(3): 277–285. doi: 10.5137/1019-5149.JTN.3008-10.1

Myung JK, Choi SA, Kim S-K, Wang K-C, Park S-H. 2014. Snail plays an oncogenic role in glioblastoma by promoting epithelial mesenchymal transition. *Int J Clin Exp Pathol* **7**(5): 1977–1987.

Nakamura M, Watanabe T, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. 2001. Promoter methylation of the DNA repair gene MGMT in astrocytomas is frequently associated with G:C --> A:T mutations of the TP53 tumor suppressor gene. *Carcinogenesis* **22**(10): 1715–1719. doi: 10.1093/carcin/22.10.1715

Nanoff C, Stiles GL. 1993. Solubilization and characterization of the A2-adenosine receptor. *J Recept Res* **13**(6): 961–973. doi: 10.3109/10799899309073703

Neer EJ. 1995. Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* **80**(2): 249–257.

Neftel C, Laffy J, Filbin MG, Hara T, Shore ME, Rahme GJ, Richman AR, Silverbush D, Shaw ML, Hebert CM, et al. 2019. An Integrative Model of Cellular States, Plasticity, and Genetics for Glioblastoma. *Cell* **178**(4): 835-849.e21. doi: 10.1016/j.cell.2019.06.024

Neuberger G, Schneider G, Eisenhaber F. 2007. pkaPS: prediction of protein kinase A phosphorylation sites with the simplified kinase-substrate binding model. *Biol Direct* **2**: 1. doi: 10.1186/1745-6150-2-1

Neubig RR, Siderovski DP. 2002. Regulators of G-protein signalling as new central nervous system drug targets. *Nat Rev Drug Discov* **1**(3): 187–197. doi: 10.1038/nrd747

Neves SR, Ram PT, Iyengar R. 2002. G protein pathways. *Science* **296**(5573): 1636–1639. doi: 10.1126/science.1071550

New DC, Wu K, Kwok AWS, Wong YH. 2007. G protein-coupled receptor-induced Akt activity in cellular proliferation and apoptosis. *FEBS J* **274**(23): 6025–6036. doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.06116.x

Nieto Gutierrez A, McDonald PH. 2018. GPCRs: Emerging anti-cancer drug targets. *Cell Signal* **41**: 65–74. doi: 10.1016/j.cellsig.2017.09.005

Nikitenko LL, Fox SB, Kehoe S, Rees MCP, Bicknell R. 2006. Adrenomedullin and tumour angiogenesis. *Br J Cancer* **94**(1): 1–7. doi: 10.1038/sj.bjc.6602832

Nishimura T, Yamaguchi T, Kato K, Yoshizawa M, Nabeshima Y, Ohno S, Hoshino M, Kaibuchi K. 2005. PAR-6-PAR-3 mediates Cdc42-induced Rac activation through the Rac GEFs STEF/Tiam1. *Nat Cell Biol* **7**(3): 270–277. doi: 10.1038/ncb1227

Nishizuka Y. 1984. Turnover of inositol phospholipids and signal transduction. *Science* **225**(4668): 1365–1370. doi: 10.1126/science.6147898

Nitta Y, Shimizu S, Shishido-Hara Y, Suzuki K, Shiokawa Y, Nagane M. 2016. Nimotuzumab enhances temozolomide-induced growth suppression of glioma cells expressing mutant EGFR in vivo. *Cancer Med* **5**(3): 486–499. doi: 10.1002/cam4.614

Noel JP, Hamm HE, Sigler PB. 1993. The 2.2 A crystal structure of transducin-alpha complexed with GTP gamma S. *Nature* **366**(6456): 654–663. doi: 10.1038/366654a0

Nomura N, Nomura M, Mizuki N, Hamada J-I. 2008. Rac1 mediates phorbol 12-myristate 13-acetate-induced migration of glioblastoma cells via paxillin. *Oncol Rep* **20**(4): 705–711.

Nonnenmacher L, Westhoff M-A, Fulda S, Karpel-Massler G, Halatsch M-E, Engelke J, Simmet T, Corbacioglu S, Debatin K-M. 2015. RIST: a potent new combination therapy for glioblastoma. *Int J Cancer* **136**(4): E173-187. doi: 10.1002/ijc.29138

Norgauer J, Metzner B, Czech W, Schraufstatter I. 1996. Reconstitution of chemokine-induced actin polymerization in undifferentiated human leukemia cells (HL-60) by heterologous expression of interleukin-8 receptors. *Inflamm Res* **45**(3): 127–131.

Nordström K, Larsson TA, Larhammar D. 2004. Extensive duplications of phototransduction genes in early vertebrate evolution correlate with block (chromosome) duplications. *Genomics* **83**(5): 852–872. doi: 10.1016/j.ygeno.2003.11.008

Northup JK, Sternweis PC, Smigel MD, Schleifer LS, Ross EM, Gilman AG. 1980. Purification of the regulatory component of adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**(11): 6516–6520.

Nürnberg A, Kitzing T, Grosse R. 2011. Nucleating actin for invasion. *Nat Rev Cancer* **11**(3): 177–187. doi: 10.1038/nrc3003

Ockenga W, Kühne S, Bocksberger S, Banning A, Tikkanen R. 2013. Non-Neuronal Functions of the M2 Muscarinic Acetylcholine Receptor. *Genes (Basel)* **4**(2): 171–197. doi: 10.3390/genes4020171

Offermanns S, Simon MI. 1995. Gα $_{15}$ and Gα $_{16}$ Couple a Wide Variety of Receptors to Phospholipase C. *Journal of Biological Chemistry* **270**(25): 15175–15180. doi: 10.1074/jbc.270.25.15175

O'Hayre M, Degese MS, Gutkind JS. 2014. Novel insights into G protein and G protein-coupled receptor signaling in cancer. *Curr Opin Cell Biol* **27**: 126–135. doi: 10.1016/j.ceb.2014.01.005

O'Hayre M, Vázquez-Prado J, Kufareva I, Stawiski EW, Handel TM, Seshagiri S, Gutkind JS. 2013. The emerging mutational landscape of G proteins and G-protein-coupled receptors in cancer. *Nat Rev Cancer* **13**(6): 412–424. doi: 10.1038/nrc3521

Ohta M, Mimori K, Fukuyoshi Y, Kita Y, Motoyama K, Yamashita K, Ishii H, Inoue H, Mori M. 2008. Clinical significance of the reduced expression of G protein gamma 7 (GNG7) in oesophageal cancer. *Br J Cancer* **98**(2): 410–417. doi: 10.1038/sj.bjc.6604124

Oka Y, Saraiva LR, Kwan YY, Korsching SI. 2009. The fifth class of Galpha proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**(5): 1484–1489. doi: 10.1073/pnas.0809420106

Oksdath M, Perrin SL, Bardy C, Hilder EF, DeForest CA, Arrua RD, Gomez GA. 2018. Review: Synthetic scaffolds to control the biochemical, mechanical, and geometrical environment of stem cell-derived brain organoids. *APL Bioeng* **2**(4): 041501. doi: 10.1063/1.5045124

Okura H, Golbourn BJ, Shahzad U, Agnihotri S, Sabha N, Krieger JR, Figueiredo CA, Chalil A, Landon-Brace N, Riemenschneider A, et al. 2016. A role for activated Cdc42 in glioblastoma multiforme invasion. *Oncotarget* **7**(35): 56958–56975. doi: 10.18632/oncotarget.10925

Olar A, Aldape KD. 2014. Using the molecular classification of glioblastoma to inform personalized treatment. *J Pathol* **232**(2): 165–177. doi: 10.1002/path.4282

Oldham WM, Hamm HE. 2006. Structural basis of function in heterotrimeric G proteins. *Q Rev Biophys* **39**(2): 117–166. doi: 10.1017/S0033583506004306

Oldham WM, Hamm HE. 2008. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(1): 60–71. doi: 10.1038/nrm2299

Olsen JJ, Pohl SÖ-G, Deshmukh A, Visweswaran M, Ward NC, Arfuso F, Agostino M, Dharmarajan A. 2017. The Role of Wnt Signalling in Angiogenesis. *Clin Biochem Rev* **38**(3): 131–142.

Ookawa S, Wanibuchi M, Kataoka-Sasaki Y, Sasaki M, Oka S, Ohtaki S, Noshiro S, Komatsu K, Akiyama Y, Mikami T, et al. 2018. Digital Polymerase Chain Reaction Quantification of SERPINA1 Predicts Prognosis in High-Grade Glioma. *World Neurosurg* **111**: e783–e789. doi: 10.1016/j.wneu.2017.12.166

Ostrom QT, Gittleman H, Fulop J, Liu M, Blanda R, Kromer C, Wolinsky Y, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. 2015. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro-oncology* **17 Suppl 4**: iv1–iv62. doi: 10.1093/neuonc/nov189

Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, Rouse C, Chen Y, Dowling J, Wolinsky Y, Kruchko C, Barnholtz-Sloan J. 2014. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007-2011. *Neuro-oncology* **16 Suppl 4**: iv1-63. doi: 10.1093/neuonc/nou223

Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, Vecchione-Koval T, Wolinsky Y, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. 2017. CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010-2014. *Neuro-oncology* **19**(suppl_5): v1–v88. doi: 10.1093/neuonc/nox158

Ostrom QT, Gittleman H, Stetson L, Virk S, Barnholtz-Sloan JS. 2018. Epidemiology of Intracranial Gliomas. *Prog Neurol Surg* **30**: 1–11. doi: 10.1159/000464374

Ostrovskaya A, Hick C, Hutchinson DS, Stringer BW, Wookey PJ, Wootten D, Sexton PM, Furness SGB. 2019. Expression and activity of the calcitonin receptor family in a sample of primary human high-grade gliomas. *BMC Cancer* **19**(1): 157. doi: 10.1186/s12885-019-5369-y

Otsuka S, Bebb G. 2008. The CXCR4/SDF-1 chemokine receptor axis: a new target therapeutic for non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* **3**(12): 1379–1383. doi: 10.1097/JTO.0b013e31818dda9d

Ouafik L, Sauze S, Boudouresque F, Chinot O, Delfino C, Fina F, Vuaroqueaux V, Dussert C, Palmari J, Dufour H, et al. 2002. Neutralization of adrenomedullin inhibits the growth of human glioblastoma cell lines in vitro and suppresses tumor xenograft growth in vivo. *Am J Pathol* **160**(4): 1279–1292. doi: 10.1016/S0002-9440(10)62555-2

Ozawa T, Riester M, Cheng Y-K, Huse JT, Squatrito M, Helmy K, Charles N, Michor F, Holland EC. 2014. Most human non-GCIMP glioblastoma subtypes evolve from a common proneural-like precursor glioma. *Cancer Cell* **26**(2): 288–300. doi: 10.1016/j.ccr.2014.06.005

Pala A, Karpel-Massler G, Wirtz CR, Halatsch M-E. 2013 Apr 10. Epithelial to Mesenchymal Transition and Progression of Glioblastoma. *Clinical Management and Evolving Novel Therapeutic Strategies for Patients with Brain Tumors*, in press. doi: 10.5772/53183

Pallud J, Rigaux-Viode O, Corns R, Muto J, Lopez Lopez C, Mellerio C, Sauvageon X, Dezamis E. 2017. Direct electrical bipolar electrostimulation for functional cortical and subcortical cerebral mapping in awake craniotomy. Practical considerations. *Neurochirurgie* **63**(3): 164–174. doi: 10.1016/j.neuchi.2016.08.009

Panchenko MP, Saxena K, Li Y, Charnecki S, Sternweis PM, Smith TF, Gilman AG, Kozasa T, Neer EJ. 1998. Sites important for PLCbeta2 activation by the G protein betagamma subunit map to the sides of the beta propeller structure. *J Biol Chem* **273**(43): 28298–28304. doi: 10.1074/jbc.273.43.28298

Park SB, Seo KW, So AY, Seo MS, Yu KR, Kang SK, Kang KS. 2012. SOX2 has a crucial role in the lineage determination and proliferation of mesenchymal stem cells through Dickkopf-1 and c-MYC. *Cell Death Differ* **19**(3): 534–545. doi: 10.1038/cdd.2011.137

Park D, Jhon DY, Lee CW, Lee KH, Rhee SG. 1993. Activation of phospholipase C isozymes by G protein beta gamma subunits. *J Biol Chem* **268**(7): 4573–4576.

Park F. 2015. Activators of G protein signaling in the kidney. *J Pharmacol Exp Ther* **353**(2): 235–245. doi: 10.1124/jpet.115.222695

Park JB, Lee CS, Jang J-H, Ghim J, Kim Y-J, You S, Hwang D, Suh P-G, Ryu SH. 2012. Phospholipase signalling networks in cancer. *Nat Rev Cancer* **12**(11): 782–792. doi: 10.1038/nrc3379

Park S-H, Won J, Kim S-I, Lee Y, Park C-K, Kim S-K, Choi S-H. 2017. Molecular Testing of Brain Tumor. *J Pathol Transl Med* **51**(3): 205–223. doi: 10.4132/jptm.2017.03.08

Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC-H, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu I-M, Gallia GL, et al. 2008. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* **321**(5897): 1807–1812. doi: 10.1126/science.1164382

Patel AP, Tirosh I, Trombetta JJ, Shalek AK, Gillespie SM, Wakimoto H, Cahill DP, Nahed BV, Curry WT, Martuza RL, et al. 2014. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science* **344**(6190): 1396–1401. doi: 10.1126/science.1254257

Patel M, Kawano T, Suzuki N, Hamakubo T, Karginov AV, Kozasa T. 2014. Gα13/PDZ-RhoGEF/RhoA signaling is essential for gastrin-releasing peptide receptor-mediated colon cancer cell migration. *Mol Pharmacol* **86**(3): 252–262. doi: 10.1124/mol.114.093914

Paugh BS, Paugh SW, Bryan L, Kapitonov D, Wilczynska KM, Gopalan SM, Rokita H, Milstien S, Spiegel S, Kordula T. 2008. EGF regulates plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) by a pathway involving c-Src, PKCdelta, and sphingosine kinase 1 in glioblastoma cells. *FASEB J* **22**(2): 455–465. doi: 10.1096/fj.07-8276com

Payne LS, Huang PH. 2013. The pathobiology of collagens in glioma. *Mol Cancer Res* **11**(10): 1129–1140. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-13-0236

Peavy RD, Hubbard KB, Lau A, Fields RB, Xu K, Lee CJ, Lee TT, Gernert K, Murphy TJ, Hepler JR. 2005. Differential effects of Gq alpha, G14 alpha, and G15 alpha on vascular smooth muscle cell survival and gene expression profiles. *Mol Pharmacol* **67**(6): 2102–2114. doi: 10.1124/mol.104.007799

Pedone KH, Hepler JR. 2007. The importance of N-terminal polycysteine and polybasic sequences for G14alpha and G16alpha palmitoylation, plasma membrane localization, and signaling function. *J Biol Chem* **282**(35): 25199–25212. doi: 10.1074/jbc.M610297200

Peng X, Maiers JL, Choudhury D, Craig SW, DeMali KA. 2012. α-Catenin uses a novel mechanism to activate vinculin. *J Biol Chem* **287**(10): 7728–7737. doi: 10.1074/jbc.M111.297481

Peng X, Nelson ES, Maiers JL, DeMali KA. 2011. New insights into vinculin function and regulation. *Int Rev Cell Mol Biol* **287**: 191–231. doi: 10.1016/B978-0-12-386043-9.00005-0

Pereira MSL, Klamt F, Thomé CC, Worm PV, de Oliveira DL. 2017. Metabotropic glutamate receptors as a new therapeutic target for malignant gliomas. *Oncotarget* **8**(13): 22279–22298. doi: 10.18632/oncotarget.15299

Pertz O. 2010. Spatio-temporal Rho GTPase signaling - where are we now? *J Cell Sci* **123**(Pt 11): 1841–1850. doi: 10.1242/jcs.064345

Perrin SL, Samuel MS, Koszyca B, Brown MP, Ebert LM, Oksdath M, Gomez GA. 2019. Glioblastoma heterogeneity and the tumour microenvironment: implications for preclinical research and development of new treatments. *Biochem Soc Trans* **47**(2): 625–638. doi: 10.1042/BST20180444

Petrie RJ, Yamada KM. 2016. Multiple mechanisms of 3D migration: the origins of plasticity. *Curr Opin Cell Biol* **42**: 7–12. doi: 10.1016/j.ceb.2016.03.025

Pfeilstöcker M, Karlic H, Salamon J, Krömer E, Mühlberger H, Pavlova B, Selim U, Tüchler H, Fritsch G, Kneissl S, et al. 1996. Expression of G alpha 16, a G-protein alpha subunit specific for hematopoiesis in acute leukemia. *Leukemia* **10**(7): 1117–1121.

Phillips E, Lang V, Bohlen J, Bethke F, Puccio L, Tichy D, Herold-Mende C, Hielscher T, Lichter P, Goidts V. 2016. Targeting atypical protein kinase C iota reduces viability in glioblastoma stem-like cells via a notch signaling mechanism. *Int J Cancer* **139**(8): 1776–1787. doi: 10.1002/ijc.30234

Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, Misra A, Nigro JM, Colman H, Soroceanu L, et al. 2006. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* **9**(3): 157–173. doi: 10.1016/j.ccr.2006.02.019

Phuphanich S, Wheeler CJ, Rudnick JD, Mazer M, Wang H, Nuño MA, Richardson JE, Fan X, Ji J, Chu RM, et al. 2013. Phase I trial of a multi-epitope-pulsed dendritic cell vaccine for patients with newly diagnosed glioblastoma. *Cancer Immunol Immunother* **62**(1): 125–135. doi: 10.1007/s00262-012-1319-0

Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ. 2002. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(9): 639–650. doi: 10.1038/nrm908

Pitcher JA, Inglese J, Higgins JB, Arriza JL, Casey PJ, Kim C, Benovic JL, Kwatra MM, Caron MG, Lefkowitz RJ. 1992. Role of beta gamma subunits of G proteins in targeting the beta-adrenergic receptor kinase to membrane-bound receptors. *Science* **257**(5074): 1264–1267.

Pitcher JA, Touhara K, Payne ES, Lefkowitz RJ. 1995. Pleckstrin homology domain-mediated membrane association and activation of the beta-adrenergic receptor kinase requires coordinate interaction with G beta gamma subunits and lipid. *J Biol Chem* **270**(20): 11707–11710. doi: 10.1074/jbc.270.20.11707

Pollard TD, Borisy GG. 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* **112**(4): 453–465.

Popescu AM, Purcaru SO, Alexandru O, Dricu A. 2016. New perspectives in glioblastoma antiangiogenic therapy. *Contemp Oncol (Pozn)* **20**(2): 109–118. doi: 10.5114/wo.2015.56122

Pouratian N, Asthagiri A, Jagannathan J, Shaffrey ME, Schiff D. 2007. Surgery Insight: the role of surgery in the management of low-grade gliomas. *Nat Clin Pract Neurol* **3**(11): 628–639. doi: 10.1038/ncpneuro0634

Prados MD, Yung WKA, Fine HA, Greenberg HS, Junck L, Chang SM, Nicholas MK, Robins HI, Mehta MP, Fink KL, et al. 2004. Phase 2 study of BCNU and temozolomide for recurrent glioblastoma multiforme: North American Brain Tumor Consortium study. *Neuro-oncology* **6**(1): 33–37. doi: 10.1215/S1152851703000309

Prévost GP, Lonchampt MO, Holbeck S, Attoub S, Zaharevitz D, Alley M, Wright J, Brezak MC, Coulomb H, Savola A, et al. 2006. Anticancer activity of BIM-46174, a new inhibitor of the heterotrimeric Galpha/Gbetagamma protein complex. *Cancer Res* **66**(18): 9227–9234. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4205

Prins RM, Soto H, Konkankit V, Odesa SK, Eskin A, Yong WH, Nelson SF, Liau LM. 2011. Gene expression profile correlates with T-cell infiltration and relative survival in glioblastoma patients vaccinated with dendritic cell immunotherapy. *Clin Cancer Res* **17**(6): 1603–1615. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2563

Qazi MA, Vora P, Venugopal C, Sidhu SS, Moffat J, Swanton C, Singh SK. 2017. Intratumoral heterogeneity: pathways to treatment resistance and relapse in human glioblastoma. *Ann Oncol* **28**(7): 1448–1456. doi: 10.1093/annonc/mdx169

Qi C, Sorrentino S, Medalia O, Korkhov VM. 2019. The structure of a membrane adenylyl cyclase bound to an activated stimulatory G protein. *Science* **364**(6438): 389–394. doi: 10.1126/science.aav0778

Quail DF, Joyce JA. 2017. The Microenvironmental Landscape of Brain Tumors. *Cancer Cell* **31**(3): 326–341. doi: 10.1016/j.ccell.2017.02.009

Rajesh Y, Pal I, Banik P, Chakraborty S, Borkar SA, Dey G, Mukherjee A, Mandal M. 2017. Insights into molecular therapy of glioma: current challenges and next generation blueprint. *Acta Pharmacol Sin* **38**(5): 591–613. doi: 10.1038/aps.2016.167

Rasheed SAK, Teo CR, Beillard EJ, Voorhoeve PM, Casey PJ. 2013. MicroRNA-182 and microRNA-200a control G-protein subunit α-13 (GNA13) expression and cell invasion synergistically in prostate cancer cells. *J Biol Chem* **288**(11): 7986–7995. doi: 10.1074/jbc.M112.437749

Rasheed SAK, Teo CR, Beillard EJ, Voorhoeve PM, Zhou W, Ghosh S, Casey PJ. 2015. MicroRNA-31 controls G protein alpha-13 (GNA13) expression and cell invasion in breast cancer cells. *Mol Cancer* **14**: 67. doi: 10.1186/s12943-015-0337-x

Rasmussen SGF, DeVree BT, Zou Y, Kruse AC, Chung KY, Kobilka TS, Thian FS, Chae PS, Pardon E, Calinski D, et al. 2011. Crystal structure of the β2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* **477**(7366): 549–555. doi: 10.1038/nature10361

Ray SK. 2016. The Transcription Regulator Krüppel-Like Factor 4 and Its Dual Roles of Oncogene in Glioblastoma and Tumor Suppressor in Neuroblastoma. *For Immunopathol Dis Therap* **7**(1–2): 127–139. doi: 10.1615/ForumImmunDisTher.2016017227

Reardon DA, Desjardins A, Peters KB, Gururangan S, Sampson JH, McLendon RE, Herndon JE, Bulusu A, Threatt S, Friedman AH, et al. 2012. Phase II study of carboplatin, irinotecan, and bevacizumab for bevacizumab naïve, recurrent glioblastoma. *J Neurooncol* **107**(1): 155–164. doi: 10.1007/s11060-011-0722-2

Reardon DA, Egorin MJ, Quinn JA, Rich JN, Rich JN, Gururangan S, Gururangan I, Vredenburgh JJ, Desjardins A, Sathornsumetee S, et al. 2005. Phase II study of imatinib mesylate plus hydroxyurea in adults with recurrent glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol* **23**(36): 9359–9368. doi: 10.1200/JCO.2005.03.2185

Reig G, Pulgar E, Concha ML. 2014. Cell migration: from tissue culture to embryos. *Development* **141**(10): 1999–2013. doi: 10.1242/dev.101451

Reithmeier T, Graf E, Piroth T, Trippel M, Pinsker MO, Nikkhah G. 2010. BCNU for recurrent glioblastoma multiforme: efficacy, toxicity and prognostic factors. *BMC Cancer* **10**: 30. doi: 10.1186/1471-2407-10-30

Rhee SG. 2001. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu Rev Biochem* **70**: 281–312. doi: 10.1146/annurev.biochem.70.1.281

van Rheenen J, Condeelis J, Glogauer M. 2009. A common cofilin activity cycle in invasive tumor cells and inflammatory cells. *J Cell Sci* **122**(Pt 3): 305–311. doi: 10.1242/jcs.031146

Ribatti D. 2017. The Contribution of Immune Cells to Angiogenesis in Inflammation and Tumor Growth. In: Ribatti D, editor. *Inflammation and Angiogenesis*. Cham: Springer International Publishing. p. 27–84. doi: 10.1007/978-3-319-68448-2_7

Riddick G, Kotliarova S, Rodriguez V, Kim HS, Linkous A, Storaska AJ, Ahn S, Walling J, Belova G, Fine HA. 2017. A Core Regulatory Circuit in Glioblastoma Stem Cells Links MAPK Activation to a Transcriptional Program of Neural Stem Cell Identity. *Sci Rep* **7**: 43605. doi: 10.1038/srep43605

Ridley AJ. 2015. Rho GTPase signalling in cell migration. *Curr Opin Cell Biol* **36**: 103–112. doi: 10.1016/j.ceb.2015.08.005

Ridley AJ. 2011. Life at the leading edge. *Cell* **145**(7): 1012–1022. doi: 10.1016/j.cell.2011.06.010

Rivera LB, Bergers G. 2015. Intertwined regulation of angiogenesis and immunity by myeloid cells. *Trends Immunol* **36**(4): 240–249. doi: 10.1016/j.it.2015.02.005

Roberts PJ, Der CJ. 2007. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* **26**(22): 3291–3310. doi: 10.1038/sj.onc.1210422

Rock BM, Xin L, Wilcox JN. 1997. Two Gq class G proteins are expressed in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* **109**(5): 645–649. doi: 10.1111/1523-1747.ep12337646

Rodbell M, Birnbaumer L, Pohl SL, Krans HM. 1971. The glucagon-sensitive adenyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. V. An obligatory role of guanylnucleotides in glucagon action. *J Biol Chem* **246**(6): 1877–1882.

Roesch S, Rapp C, Dettling S, Herold-Mende C. 2018. When Immune Cells Turn Bad-Tumor-Associated Microglia/Macrophages in Glioma. *Int J Mol Sci* **19**(2). doi: 10.3390/ijms19020436

Rojas RJ, Yohe ME, Gershburg S, Kawano T, Kozasa T, Sondek J. 2007. Galphaq directly activates p63RhoGEF and Trio via a conserved extension of the Dbl homology-associated pleckstrin homology domain. *J Biol Chem* **282**(40): 29201–29210. doi: 10.1074/jbc.M703458200

Rollins BJ. 2006. Inflammatory chemokines in cancer growth and progression. *Eur J Cancer* **42**(6): 760–767. doi: 10.1016/j.ejca.2006.01.002

Rondard P, Iiri T, Srinivasan S, Meng E, Fujita T, Bourne HR. 2001. Mutant G protein alpha subunit activated by Gbeta gamma: a model for receptor activation? *Proc Natl Acad Sci USA* **98**(11): 6150–6155. doi: 10.1073/pnas.101136198

Roos A, Ding Z, Loftus JC, Tran NL. 2017. Molecular and Microenvironmental Determinants of Glioma Stem-Like Cell Survival and Invasion. *Front Oncol* **7**: 120. doi: 10.3389/fonc.2017.00120

Rosenbaum DM, Rasmussen SGF, Kobilka BK. 2009. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* **459**(7245): 356–363. doi: 10.1038/nature08144

Ross EM. 2008. Coordinating speed and amplitude in G-protein signaling. *Curr Biol* **18**(17): R777–R783. doi: 10.1016/j.cub.2008.07.035

Ross EM, Gilman AG. 1977. Resolution of some components of adenylate cyclase necessary for catalytic activity. *J Biol Chem* **252**(20): 6966–6969.

Rowland BD, Bernards R, Peeper DS. 2005. The KLF4 tumour suppressor is a transcriptional repressor of p53 that acts as a context-dependent oncogene. *Nat Cell Biol* **7**(11): 1074–1082. doi: 10.1038/ncb1314

Roy A, Ye J, Deng F, Wang QJ. 2017. Protein kinase D signaling in cancer: A friend or foe? *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* **1868**(1): 283–294. doi: 10.1016/j.bbcan.2017.05.008

Roy A, Coum A, Marinescu VD, Põlajeva J, Smits A, Nelander S, Uhrbom L, Westermark B, Forsberg-Nilsson K, Pontén F, et al. 2015. Glioma-derived plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) regulates the recruitment of LRP1 positive mast cells. *Oncotarget* **6**(27): 23647–23661. doi: 10.18632/oncotarget.4640

Ruat M, Traiffort E, Arrang JM, Tardivel-Lacombe J, Diaz J, Leurs R, Schwartz JC. 1993. A novel rat serotonin (5-HT6) receptor: molecular cloning, localization and stimulation of cAMP accumulation. *Biochem Biophys Res Commun* **193**(1): 268–276. doi: 10.1006/bbrc.1993.1619

Rubashkin MG, Cassereau L, Bainer R, DuFort CC, Yui Y, Ou G, Paszek MJ, Davidson MW, Chen Y-Y, Weaver VM. 2014. Force engages vinculin and promotes tumor progression by enhancing PI3K activation of phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate. *Cancer Res* **74**(17): 4597–4611. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-3698

Rubin JB, Kung AL, Klein RS, Chan JA, Sun Y, Schmidt K, Kieran MW, Luster AD, Segal RA. 2003. A small-molecule antagonist of CXCR4 inhibits intracranial growth of primary brain tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**(23): 13513–13518. doi: 10.1073/pnas.2235846100

Sadok A, Marshall CJ. 2014. Rho GTPases: masters of cell migration. *Small GTPases* **5**: e29710. doi: 10.4161/sgtp.29710

Sahm F, Koelsche C, Meyer J, Pusch S, Lindenberg K, Mueller W, Herold-Mende C, von Deimling A, Hartmann C. 2012. CIC and FUBP1 mutations in oligodendrogliomas, oligoastrocytomas and astrocytomas. *Acta Neuropathol* **123**(6): 853–860. doi: 10.1007/s00401-012-0993-5

Samara GJ, Lawrence DM, Chiarelli CJ, Valentino MD, Lyubsky S, Zucker S, Vaday GG. 2004. CXCR4-mediated adhesion and MMP-9 secretion in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Lett* **214**(2): 231–241. doi: 10.1016/j.canlet.2004.04.035

Samaradivakara S, Kankanamge D, Senarath K, Ratnayake K, Karunarathne A. 2018. G protein γ (Gγ) subtype dependent targeting of GRK2 to M3 receptor by Gβγ. *Biochem Biophys Res Commun* **503**(1): 165–170. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.05.204

Sanai N, Berger MS. 2010. Intraoperative stimulation techniques for functional pathway preservation and glioma resection. *Neurosurg Focus* **28**(2): E1. doi: 10.3171/2009.12.FOCUS09266

Satagopam VP, Theodoropoulou MC, Stampolakis CK, Pavlopoulos GA, Papandreou NC, Bagos PG, Schneider R, Hamodrakas SJ. 2010. GPCRs, G-proteins, effectors and their interactions: human-gpDB, a database employing visualization tools and data integration techniques. *Database (Oxford)* **2010**: baq019. doi: 10.1093/database/baq019

Sato M, Hiraoka M, Suzuki H, Bai Y, Kurotani R, Yokoyama U, Okumura S, Cismowski MJ, Lanier SM, Ishikawa Y. 2011. Identification of transcription factor E3 (TFE3) as a receptor-

independent activator of Gα16: gene regulation by nuclear Gα subunit and its activator. *J Biol Chem* **286**(20): 17766–17776. doi: 10.1074/jbc.M111.219816

Scheerer P, Park JH, Hildebrand PW, Kim YJ, Krauss N, Choe H-W, Hofmann KP, Ernst OP. 2008. Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation. *Nature* **455**(7212): 497–502. doi: 10.1038/nature07330

Sciumè G, Soriani A, Piccoli M, Frati L, Santoni A, Bernardini G. 2010. CX3CR1/CX3CL1 axis negatively controls glioma cell invasion and is modulated by transforming growth factor-β1. *Neuro-oncology* **12**(7): 701–710. doi: 10.1093/neuonc/nop076

See WL, Mukherjee J. 2018. Chapter 22 - Targeting the RAS-RAF-MEK-ERK Signaling Pathway in Gliomas. In: Newton HB, editor. *Handbook of Brain Tumor Chemotherapy, Molecular Therapeutics, and Immunotherapy (Second Edition)*. Academic Press. p. 323–332. doi: 10.1016/B978-0-12-812100-9.00022-X

Seidel S, Garvalov BK, Wirta V, von Stechow L, Schänzer A, Meletis K, Wolter M, Sommerlad D, Henze A-T, Nistér M, et al. 2010. A hypoxic niche regulates glioblastoma stem cells through hypoxia inducible factor 2 alpha. *Brain* **133**(Pt 4): 983–995. doi: 10.1093/brain/awq042

Seifert S, Sontheimer H. 2014. Bradykinin enhances invasion of malignant glioma into the brain parenchyma by inducing cells to undergo amoeboid migration. *J Physiol (Lond)* **592**(22): 5109–5127. doi: 10.1113/jphysiol.2014.274498

Sen S, Ng WP, Kumar S. 2012. Contributions of talin-1 to glioma cell-matrix tensional homeostasis. *J R Soc Interface* **9**(71): 1311–1317. doi: 10.1098/rsif.2011.0567

Sensoy O, Weinstein H. 2015. A mechanistic role of Helix 8 in GPCRs: Computational modeling of the dopamine D2 receptor interaction with the GIPC1-PDZ-domain *Biochim Biophys Acta* **1848**(4): 976–983. doi: 10.1016/j.bbamem.2014.12.002

Servitja J-M, Marinissen MJ, Sodhi A, Bustelo XR, Gutkind JS. 2003. Rac1 function is required for Src-induced transformation. Evidence of a role for Tiam1 and Vav2 in Rac activation by Src. *J Biol Chem* **278**(36): 34339–34346. doi: 10.1074/jbc.M302960200

Seystahl K, Papachristodoulou A, Burghardt I, Schneider H, Hasenbach K, Janicot M, Roth P, Weller M. 2017. Biological Role and Therapeutic Targeting of TGF-β3 in Glioblastoma. *Mol Cancer Ther* **16**(6): 1177–1186. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0465

Seystahl K, Wick W, Weller M. 2016. Therapeutic options in recurrent glioblastoma--An update. *Crit Rev Oncol Hematol* **99**: 389–408. doi: 10.1016/j.critrevonc.2016.01.018

Shangary S, Wang S. 2009. Small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 protein-protein interaction to reactivate p53 function: a novel approach for cancer therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **49**: 223–241. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.48.113006.094723

Shankar E, Krishnamurthy S, Paranandi R, Basu A. 2010. PKCepsilon induces Bcl-2 by activating CREB. *Int J Oncol* **36**(4): 883–888. doi: 10.3892/ijo_00000566

Shao J, Jung C, Liu C, Sheng H. 2005. Prostaglandin E2 Stimulates the beta-catenin/T cell factor-dependent transcription in colon cancer. *J Biol Chem* **280**(28): 26565–26572. doi: 10.1074/jbc.M413056200

Sharif TR, Sharif M. 1999. Overexpression of protein kinase C epsilon in astroglial brain tumor derived cell lines and primary tumor samples. *Int J Oncol* **15**(2): 237–243.

Shashidhar S, Lorente G, Nagavarapu U, Nelson A, Kuo J, Cummins J, Nikolich K, Urfer R, Foehr ED. 2005. GPR56 is a GPCR that is overexpressed in gliomas and functions in tumor cell adhesion. *Oncogene* **24**(10): 1673–1682. doi: 10.1038/sj.onc.1208395

Shen T, Guo Q. 2018. Role of Pyk2 in Human Cancers. *Med Sci Monit* **24**: 8172–8182. doi: 10.12659/MSM.913479

Sheng J, Xu Z. 2016. Three decades of research on angiogenin: a review and perspective. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **48**(5): 399–410. doi: 10.1093/abbs/gmv131

Shindoh N, Yoda A, Yoda Y, Sullivan TJ, Weigert O, Lane AA, Kopp N, Bird L, Rodig SJ, Fox EA, et al. 2012. Next-generation cDNA screening for oncogene and resistance phenotypes. *PLoS ONE* **7**(11): e49201. doi: 10.1371/journal.pone.0049201

Shinojima N, Tada K, Shiraishi S, Kamiryo T, Kochi M, Nakamura H, Makino K, Saya H, Hirano H, Kuratsu J-I, et al. 2003. Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer Res* **63**(20): 6962–6970.

Shukla AK, Xiao K, Lefkowitz RJ. 2011. Emerging paradigms of β-arrestin-dependent seven transmembrane receptor signaling. *Trends Biochem Sci* **36**(9): 457–469. doi: 10.1016/j.tibs.2011.06.003

Siebzehnrubl FA, Silver DJ, Tugertimur B, Deleyrolle LP, Siebzehnrubl D, Sarkisian MR, Devers KG, Yachnis AT, Kupper MD, Neal D, et al. 2013. The ZEB1 pathway links glioblastoma initiation, invasion and chemoresistance. *EMBO Mol Med* **5**(8): 1196–1212. doi: 10.1002/emmm.201302827

Sierra DA, Gilbert DJ, Householder D, Grishin NV, Yu K, Ukidwe P, Barker SA, He W, Wensel TG, Otero G, et al. 2002. Evolution of the regulators of G-protein signaling multigene family in mouse and human. *Genomics* **79**(2): 177–185. doi: 10.1006/geno.2002.6693

Simon MI, Strathmann MP, Gautam N. 1991. Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* **252**(5007): 802–808.

Sit S-T, Manser E. 2011. Rho GTPases and their role in organizing the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* **124**(Pt 5): 679–683. doi: 10.1242/jcs.064964

Sivaprasad U, Shankar E, Basu A. 2007. Downregulation of Bid is associated with PKCepsilon-mediated TRAIL resistance. *Cell Death Differ* **14**(4): 851–860. doi: 10.1038/sj.cdd.4402077

Sjögren B. 2017. The evolution of regulators of G protein signalling proteins as drug targets - 20 years in the making: IUPHAR Review 21. *Br J Pharmacol* **174**(6): 427–437. doi: 10.1111/bph.13716

Slep KC, Kercher MA, He W, Cowan CW, Wensel TG, Sigler PB. 2001. Structural determinants for regulation of phosphodiesterase by a G protein at 2.0 A. *Nature* **409**(6823): 1071–1077. doi: 10.1038/35059138

Slosberg ED, Klein MG, Yao Y, Han EK, Schieren I, Weinstein IB. 1999. The alpha isoform of protein kinase C mediates phorbol ester-induced growth inhibition and p21cip1 induction in HC11 mammary epithelial cells. *Oncogene* **18**(48): 6658–6666. doi: 10.1038/sj.onc.1203083

Smrcka AV. 2008. G protein βγ subunits: central mediators of G protein-coupled receptor signaling. *Cell Mol Life Sci* **65**(14): 2191–2214. doi: 10.1007/s00018-008-8006-5

Smrcka AV. 2015. Regulation of phosphatidylinositol-specific phospholipase C at the nuclear envelope in cardiac myocytes. *J Cardiovasc Pharmacol* **65**(3): 203–210. doi: 10.1097/FJC.0000000000000195

Smrcka AV, Hepler JR, Brown KO, Sternweis PC. 1991. Regulation of polyphosphoinositide-specific phospholipase C activity by purified Gq. *Science* **251**(4995): 804–807.

Smrcka AV, Sternweis PC. 1993. Regulation of purified subtypes of phosphatidylinositol-specific phospholipase C beta by G protein alpha and beta gamma subunits. *J Biol Chem* **268**(13): 9667–9674.

Soda Y, Marumoto T, Friedmann-Morvinski D, Soda M, Liu F, Michiue H, Pastorino S, Yang M, Hoffman RM, Kesari S, et al. 2011. Transdifferentiation of glioblastoma cells into vascular

endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**(11): 4274–4280. doi: 10.1073/pnas.1016030108

Soda Y, Myskiw C, Rommel A, Verma IM. 2013. Mechanisms of neovascularization and resistance to anti-angiogenic therapies in glioblastoma multiforme. *J Mol Med* **91**(4): 439–448. doi: 10.1007/s00109-013-1019-z

Sonoda Y, Ozawa T, Aldape KD, Deen DF, Berger MS, Pieper RO. 2001. Akt pathway activation converts anaplastic astrocytoma to glioblastoma multiforme in a human astrocyte model of glioma. *Cancer Res* **61**(18): 6674–6678.

Sottoriva A, Spiteri I, Piccirillo SGM, Touloumis A, Collins VP, Marioni JC, Curtis C, Watts C, Tavaré S. 2013. Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**(10): 4009–4014. doi: 10.1073/pnas.1219747110

Spiering D, Hodgson L. 2011. Dynamics of the Rho-family small GTPases in actin regulation and motility. *Cell Adh Migr* **5**(2): 170–180. doi: 10.4161/cam.5.2.14403

Sprang SR. 2016. Invited review: Activation of G proteins by GTP and the mechanism of Gα-catalyzed GTP hydrolysis. *Biopolymers* **105**(8): 449–462. doi: 10.1002/bip.22836

Sprang SR, Chen Z, Du X. 2007. Structural basis of effector regulation and signal termination in heterotrimeric Galpha proteins. *Adv Protein Chem* **74**: 1–65. doi: 10.1016/S0065-3233(07)74001-9

Stancheva G, Goranova T, Laleva M, Kamenova M, Mitkova A, Velinov N, Poptodorov G, Mitev V, Kaneva R, Gabrovsky N. 2014. IDH1/IDH2 but not TP53 mutations predict prognosis in Bulgarian glioblastoma patients. *Biomed Res Int* **2014**: 654727. doi: 10.1155/2014/654727

Steeg PS. 2006. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med* **12**(8): 895–904. doi: 10.1038/nm1469

Steinberg SF. 2004. Distinctive activation mechanisms and functions for protein kinase Cdelta. *Biochem J* **384**(Pt 3): 449–459. doi: 10.1042/BJ20040704

Steinke D, Hoegg S, Brinkmann H, Meyer A. 2006. Three rounds (1R/2R/3R) of genome duplications and the evolution of the glycolytic pathway in vertebrates. *BMC Biol* **4**: 16. doi: 10.1186/1741-7007-4-16

Stepanenko AA, Chekhonin VP. 2018a. Recent Advances in Oncolytic Virotherapy and Immunotherapy for Glioblastoma: A Glimmer of Hope in the Search for an Effective Therapy? *Cancers (Basel)* **10**(12). doi: 10.3390/cancers10120492

Stepanenko AA, Chekhonin VP. 2018b. A compendium of adenovirus genetic modifications for enhanced replication, oncolysis, and tumor immunosurveillance in cancer therapy. *Gene* **679**: 11–18. doi: 10.1016/j.gene.2018.08.069

Stieber D, Golebiewska A, Evers L, Lenkiewicz E, Brons NHC, Nicot N, Oudin A, Bougnaud S, Hertel F, Bjerkvig R, et al. 2014. Glioblastomas are composed of genetically divergent clones with distinct tumourigenic potential and variable stem cell-associated phenotypes. *Acta Neuropathol* **127**(2): 203–219. doi: 10.1007/s00401-013-1196-4

Stokoe D. 2001. PTEN. *Curr Biol* **11**(13): R502. doi: 10.1016/s0960-9822(01)00303-7

Stoyanov B, Volinia S, Hanck T, Rubio I, Loubtchenkov M, Malek D, Stoyanova S, Vanhaesebroeck B, Dhand R, Nürnberg B. 1995. Cloning and characterization of a G protein-activated human phosphoinositide-3 kinase. *Science* **269**(5224): 690–693.

Strathmann M, Simon MI. 1990. G protein diversity: a distinct class of alpha subunits is present in vertebrates and invertebrates. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**(23): 9113–9117.

Strathmann MP, Simon MI. 1991. G alpha 12 and G alpha 13 subunits define a fourth class of G protein alpha subunits. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**(13): 5582–5586.

Strik HM, Kolodziej M, Oertel W, Basecke J. 2012. Glycobiology in malignant gliomas: expression and functions of galectins and possible therapeutic options. *Curr Pharm Biotechnol* **13**(11): 2299–2307. doi: 10.2174/138920112802502051

Stubb A, Guzmán C, Närvä E, Aaron J, Chew T-L, Saari M, Miihkinen M, Jacquemet G, Ivaska J. 2019. Superresolution architecture of cornerstone focal adhesions in human pluripotent stem cells. *Nat Commun* **10**(1): 1–15. doi: 10.1038/s41467-019-12611-w

Stupp R, Pavlidis N, Jelic S, ESMO Guidelines Task Force. 2005. ESMO Minimum Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up of malignant glioma. *Ann Oncol* **16 Suppl 1**: i64-65. doi: 10.1093/annonc/mdi834

Stupp R, Taillibert S, Kanner A, Read W, Steinberg D, Lhermitte B, Toms S, Idbaih A, Ahluwalia MS, Fink K, et al. 2017. Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* **318**(23): 2306–2316. doi: 10.1001/jama.2017.18718

Stupp R, Taillibert S, Kanner AA, Kesari S, Steinberg DM, Toms SA, Taylor LP, Lieberman F, Silvani A, Fink KL, et al. 2015. Maintenance Therapy With Tumor-Treating Fields Plus Temozolomide vs Temozolomide Alone for Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* **314**(23): 2535–2543. doi: 10.1001/jama.2015.16669

Stutchbury B, Atherton P, Tsang R, Wang D-Y, Ballestrem C. 2017. Distinct focal adhesion protein modules control different aspects of mechanotransduction. *J Cell Sci* **130**(9): 1612–1624. doi: 10.1242/jcs.19536206

Su Y, Ho MKC, Wong YH. 2009. A hematopoietic perspective on the promiscuity and specificity of Galpha16 signaling. *Neurosignals* **17**(1): 71–81. doi: 10.1159/000186691

Subauste MC, Pertz O, Adamson ED, Turner CE, Junger S, Hahn KM. 2004. Vinculin modulation of paxillin-FAK interactions regulates ERK to control survival and motility. *J Cell Biol* **165**(3): 371–381. doi: 10.1083/jcb.200308011

Suga H, Chen Z, de Mendoza A, Sebé-Pedrós A, Brown MW, Kramer E, Carr M, Kerner P, Vervoort M, Sánchez-Pons N, et al. 2013. The Capsaspora genome reveals a complex unicellular prehistory of animals. *Nat Commun* **4**: 2325. doi: 10.1038/ncomms3325

Suh P-G, Park J-I, Manzoli L, Cocco L, Peak JC, Katan M, Fukami K, Kataoka T, Yun S, Ryu SH. 2008. Multiple roles of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *BMB Rep* **41**(6): 415–434. doi: 10.5483/bmbrep.2008.41.6.415

Sun L-H, Yang F-Q, Zhang C-B, Wu Y-P, Liang J-S, Jin S, Wang Z, Wang H-J, Bao Z-S, Yang Z-X, et al. 2017. Overexpression of Paxillin Correlates with Tumor Progression and Predicts Poor Survival in Glioblastoma. *CNS Neurosci Ther* **23**(1): 69–75. doi: 10.1111/cns.126

Sunahara RK, Dessauer CW, Gilman AG. 1996. Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **36**: 461–480. doi: 10.1146/annurev.pa.36.040196.002333

Suzuki K, Kawataki T, Endo K, Miyazawa K, Kinouchi H, Saitoh M. 2018. Expression of ZEBs in gliomas is associated with invasive properties and histopathological grade. *Oncol Lett* **16**(2): 1758–1764. doi: 10.3892/ol.2018.8852

Suzuki N, Nakamura S, Mano H, Kozasa T. 2003. Galpha 12 activates Rho GTPase through tyrosine-phosphorylated leukemia-associated RhoGEF. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**(2): 733–738. doi: 10.1073/pnas.0234057100

Svensson L, Stanley P, Willenbrock F, Hogg N. 2012. The Gαq/11 proteins contribute to T lymphocyte migration by promoting turnover of integrin LFA-1 through recycling. *PLoS ONE* **7**(6): e38517. doi: 10.1371/journal.pone.0038517

Swaney KF, Li R. 2016. Function and regulation of the Arp2/3 complex during cell migration in diverse environments. *Curr Opin Cell Biol* **42**: 63–72. doi: 10.1016/j.ceb.2016.04.005

Syrovatkina V, Alegre KO, Dey R, Huang X-Y. 2016. Regulation, Signaling, and Physiological Functions of G-Proteins. *J Mol Biol* **428**(19): 3850–3868. doi: 10.1016/j.jmb.2016.08.002

Szczepanek D, Marchel A, Moskała M, Krupa M, Kunert P, Trojanowski T. 2013. Efficacy of concomitant and adjuvant temozolomide in glioblastoma treatment. A multicentre randomized study. *Neurol Neurochir Pol* **47**(2): 101–108.

Takano S, Ishikawa E, Sakamoto N, Matsuda M, Akutsu H, Noguchi M, Kato Y, Yamamoto T, Matsumura A. 2016. Immunohistochemistry on IDH 1/2, ATRX, p53 and Ki-67 substitute molecular genetic testing and predict patient prognosis in grade III adult diffuse gliomas. *Brain Tumor Pathol* **33**(2): 107–116. doi: 10.1007/s10014-016-0260-x

Takesono A, Cismowski MJ, Ribas C, Bernard M, Chung P, Hazard S, Duzic E, Lanier SM. 1999. Receptor-independent activators of heterotrimeric G-protein signaling pathways. *J Biol Chem* **274**(47): 33202–33205. doi: 10.1074/jbc.274.47.33202

Takuwa N, Du W, Kaneko E, Okamoto Y, Yoshioka K, Takuwa Y. 2011. Tumor-suppressive sphingosine-1-phosphate receptor-2 counteracting tumor-promoting sphingosine-1-phosphate receptor-1 and sphingosine kinase 1 - Jekyll Hidden behind Hyde. *Am J Cancer Res* **1**(4): 460–481.

Tan W, Martin D, Gutkind JS. 2006. The Galpha13-Rho signaling axis is required for SDF-1-induced migration through CXCR4. *J Biol Chem* **281**(51): 39542–39549. doi: 10.1074/jbc.M609062200

Tan Z, Chen K, Wu W, Zhou Y, Zhu J, Wu G, Cao L, Zhang X, Guan H, Yang Y, et al. 2018. Overexpression of HOXC10 promotes angiogenesis in human glioma via interaction with PRMT5 and upregulation of VEGFA expression. *Theranostics* **8**(18): 5143–5158. doi: 10.7150/thno.27310

Tanaka S, Louis DN, Curry WT, Batchelor TT, Dietrich J. 2013. Diagnostic and therapeutic avenues for glioblastoma: no longer a dead end? *Nat Rev Clin Oncol* **10**(1): 14–26. doi: 10.1038/nrclinonc.2012.204

Tang DD, Gerlach BD. 2017. The roles and regulation of the actin cytoskeleton, intermediate filaments and microtubules in smooth muscle cell migration. *Respir Res* **18**(1): 54. doi: 10.1186/s12931-017-0544-7

Tang X, Jin R, Qu G, Wang X, Li Z, Yuan Z, Zhao C, Siwko S, Shi T, Wang P, et al. 2013. GPR116, an adhesion G-protein-coupled receptor, promotes breast cancer metastasis via the Gαq-p63RhoGEF-Rho GTPase pathway. *Cancer Res* **73**(20): 6206–6218. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1049

Taussig R, Iñiguez-Lluhi JA, Gilman AG. 1993. Inhibition of adenylyl cyclase by Gi alpha. *Science* **261**(5118): 218–221. doi: 10.1126/science.8327893

Taylor SJ, Smith JA, Exton JH. 1990. Purification from bovine liver membranes of a guanine nucleotide-dependent activator of phosphoinositide-specific phospholipase C. Immunologic identification as a novel G-protein alpha subunit. *J Biol Chem* **265**(28): 17150–17156.

Tekin C, Shi K, Daalhuisen JB, Ten Brink MS, Bijlsma MF, Spek CA. 2018. PAR1 signaling on tumor cells limits tumor growth by maintaining a mesenchymal phenotype in pancreatic cancer. *Oncotarget* **9**(62): 32010–32023. doi: 10.18632/oncotarget.25880

Temple BRS, Jones CD, Jones AM. 2010. Evolution of a signaling nexus constrained by protein interfaces and conformational States. *PLoS Comput Biol* **6**(10): e1000962. doi: 10.1371/journal.pcbi.1000962

Tenailleau S, Corre I, Hermouet S. 1997. Specific expression of heterotrimeric G proteins G12 and G16 during human myeloid differentiation. *Exp Hematol* **25**(9): 927–934.

Teo M, Martin S, Owusu-Agyemang K, Nowicki S, Clark B, Mackinnon M, Stewart W, Paul J, St George J. 2014. A survival analysis of GBM patients in the West of Scotland pre- and post-

introduction of the Stupp regime. *Br J Neurosurg* **28**(3): 351–355. doi: 10.3109/02688697.2013.847170

Teoh J, Park K, Wang Y, Hu Q, Kim S, Wu G, Huang S, Maihle N, Kim I. 2014. Endothelin-1/endothelin A receptor-mediated biased signaling is a new player in modulating human ovarian cancer cell tumorigenesis. *Cell Signal* **26**(12): 2885–2895. doi: 10.1016/j.cellsig.2014.08.024

Tesmer JJ, Berman DM, Gilman AG, Sprang SR. 1997. Structure of RGS4 bound to AlF4--activated G(i alpha1): stabilization of the transition state for GTP hydrolysis. *Cell* **89**(2): 251–261. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80204-4

Thiery JP. 2002. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* **2**(6): 442–454. doi: 10.1038/nrc822

Thijssen VL, Barkan B, Shoji H, Aries IM, Mathieu V, Deltour L, Hackeng TM, Kiss R, Kloog Y, Poirier F, et al. 2010. Tumor cells secrete galectin-1 to enhance endothelial cell activity. *Cancer Res* **70**(15): 6216–6224. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-4150

Tinker A. 2006. The selective interactions and functions of regulators of G-protein signalling. *Semin Cell Dev Biol* **17**(3): 377–382. doi: 10.1016/j.semcdb.2006.03.007

Toussaint LG, Nilson AE, Goble JM, Ballman KV, James CD, Lefranc F, LGR R, Uhm JH. 2012. Galectin-1, a gene preferentially expressed at the tumor margin, promotes glioblastoma cell invasion. *Mol Cancer* **11**: 32. doi: 10.1186/1476-4598-11-32

Treps L, Perret R, Edmond S, Ricard D, Gavard J. 2017. Glioblastoma stem-like cells secrete the pro-angiogenic VEGF-A factor in extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* **6**(1): 1359479. doi: 10.1080/20013078.2017.1359479

Triner D, Shah YM. 2016. Hypoxia-inducible factors: a central link between inflammation and cancer. *J Clin Invest* **126**(10): 3689–3698. doi: 10.1172/JCI84430

Tsutsumi R, Fukata Y, Noritake J, Iwanaga T, Perez F, Fukata M. 2009. Identification of G protein alpha subunit-palmitoylating enzyme. *Mol Cell Biol* **29**(2): 435–447. doi: 10.1128/MCB.01144-08

Turcan S, Rohle D, Goenka A, Walsh LA, Fang F, Yilmaz E, Campos C, Fabius AWM, Lu C, Ward PS, et al. 2012. IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature* **483**(7390): 479–483. doi: 10.1038/nature10866

Turcotte M, Tang W, Ross EM. 2008. Coordinate regulation of G protein signaling via dynamic interactions of receptor and GAP. *PLoS Comput Biol* **4**(8): e1000148. doi: 10.1371/journal.pcbi.1000148

Turner CE, Glenney JR, Burridge K. 1990. Paxillin: a new vinculin-binding protein present in focal adhesions. *J Cell Biol* **111**(3): 1059–1068.

Turner MC, Krewski D, Armstrong BK, Chetrit A, Giles GG, Hours M, McBride ML, Parent M-É, Sadetzki S, Siemiatycki J, et al. 2013. Allergy and brain tumors in the INTERPHONE study: pooled results from Australia, Canada, France, Israel, and New Zealand. *Cancer Causes Control* **24**(5): 949–960. doi: 10.1007/s10552-013-0171-7

Twizere J-C, Springael J-Y, Boxus M, Burny A, Dequiedt F, Dewulf J-F, Duchateau J, Portetelle D, Urbain P, Van Lint C, et al. 2007. Human T-cell leukemia virus type-1 Tax oncoprotein regulates G-protein signaling. *Blood* **109**(3): 1051–1060. doi: 10.1182/blood-2006-06-026781

Tyler JJ, Allwood EG, Ayscough KR. 2016. WASP family proteins, more than Arp2/3 activators. *Biochem Soc Trans* **44**(5): 1339–1345. doi: 10.1042/BST20160176

Ueda H, Saga S, Shinohara H, Morishita R, Kato K, Asano T. 1997. Association of the gamma12 subunit of G proteins with actin filaments. *J Cell Sci* **110 (Pt 13)**: 1503–1511.

Ueno H, Tomiyama A, Yamaguchi H, Uekita T, Shirakihara T, Nakashima K, Otani N, Wada K, Sakai R, Arai H, et al. 2015. Augmentation of invadopodia formation in temozolomide-resistant or adopted glioma is regulated by c-Jun terminal kinase-paxillin axis. *Biochem Biophys Res Commun* **468**(1–2): 240–247. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.10.122

Uhm JH, Ballman KV, Wu W, Giannini C, Krauss JC, Buckner JC, James CD, Scheithauer BW, Behrens RJ, Flynn PJ, et al. 2011. Phase II evaluation of gefitinib in patients with newly diagnosed Grade 4 astrocytoma: Mayo/North Central Cancer Treatment Group Study N0074. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **80**(2): 347–353. doi: 10.1016/j.ijrobp.2010.01.070

Umemori H, Inoue T, Kume S, Sekiyama N, Nagao M, Itoh H, Nakanishi S, Mikoshiba K, Yamamoto T. 1997. Activation of the G protein Gq/11 through tyrosine phosphorylation of the alpha subunit. *Science* **276**(5320): 1878–1881. doi: 10.1126/science.276.5320.1878

Upadhyay N, Waldman AD. 2011. Conventional MRI evaluation of gliomas. *Br J Radiol* **84 Spec No 2**: S107-111. doi: 10.1259/bjr/65711810

Vakilian A, Khorramdelazad H, Heidari P, Sheikh Rezaei Z, Hassanshahi G. 2017. CCL2/CCR2 signaling pathway in glioblastoma multiforme. *Neurochem Int* **103**: 1–7. doi: 10.1016/j.neuint.2016.12.013

Van Eps N, Altenbach C, Caro LN, Latorraca NR, Hollingsworth SA, Dror RO, Ernst OP, Hubbell WL. 2018. Gi- and Gs-coupled GPCRs show different modes of G-protein binding. *Proc Natl Acad Sci USA* **115**(10): 2383–2388. doi: 10.1073/pnas.1721896115

Van Eps N, Oldham WM, Hamm HE, Hubbell WL. 2006. Structural and dynamical changes in an alpha-subunit of a heterotrimeric G protein along the activation pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**(44): 16194–16199. doi: 10.1073/pnas.0607972103

Van Meir EG, Hadjipanayis CG, Norden AD, Shu H-K, Wen PY, Olson JJ. 2010. Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. *CA Cancer J Clin* **60**(3): 166–193. doi: 10.3322/caac.20069

Van Raamsdonk CD, Bezrookove V, Green G, Bauer J, Gaugler L, O'Brien JM, Simpson EM, Barsh GS, Bastian BC. 2009. Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi. *Nature* **457**(7229): 599–602. doi: 10.1038/nature07586

Van Raamsdonk CD, Griewank KG, Crosby MB, Garrido MC, Vemula S, Wiesner T, Obenauf AC, Wackernagel W, Green G, Bouvier N, et al. 2010. Mutations in GNA11 in uveal melanoma. *N Engl J Med* **363**(23): 2191–2199. doi: 10.1056/NEJMoa1000584

Vandael DHF, Mahapatra S, Calorio C, Marcantoni A, Carbone E. 2013. Cav1.3 and Cav1.2 channels of adrenal chromaffin cells: emerging views on cAMP/cGMP-mediated phosphorylation and role in pacemaking. *Biochim Biophys Acta* **1828**(7): 1608–1618. doi: 10.1016/j.bbamem.2012.11.013

Vaqué JP, Dorsam RT, Feng X, Iglesias-Bartolome R, Forsthoefel DJ, Chen Q, Debant A, Seeger MA, Ksander BR, Teramoto H, et al. 2013. A genome-wide RNAi screen reveals a Trio-regulated Rho GTPase circuitry transducing mitogenic signals initiated by G protein-coupled receptors. *Mol Cell* **49**(1): 94–108. doi: 10.1016/j.molcel.2012.10.018

Vázquez-Prado J, Bracho-Valdés I, Cervantes-Villagrana RD, Reyes-Cruz G. 2016. Gβγ Pathways in Cell Polarity and Migration Linked to Oncogenic GPCR Signaling: Potential Relevance in Tumor Microenvironment. *Mol Pharmacol* **90**(5): 573–586. doi: 10.1124/mol.116.105338

Velásquez C, Mansouri S, Mora C, Nassiri F, Suppiah S, Martino J, Zadeh G, Fernández-Luna JL. 2019. Molecular and Clinical Insights into the Invasive Capacity of Glioblastoma Cells. *J Oncol* **2019**: 1740763. doi: 10.1155/2019/1740763

Velpula KK, Rehman AA, Chelluboina B, Dasari VR, Gondi CS, Rao JS, Veeravalli KK. 2012. Glioma stem cell invasion through regulation of the interconnected ERK, integrin α6 and N-

cadherin signaling pathway. *Cell Signal* **24**(11): 2076–2084. doi: 10.1016/j.cellsig.2012.07.002

Venkatakrishnan AJ, Deupi X, Lebon G, Heydenreich FM, Flock T, Miljus T, Balaji S, Bouvier M, Veprintsev DB, Tate CG, et al. 2016. Diverse activation pathways in class A GPCRs converge near the G-protein-coupling region. *Nature* **536**(7617): 484–487. doi: 10.1038/nature19107

Venkatakrishnan AJ, Flock T, Prado DE, Oates ME, Gough J, Madan Babu M. 2014. Structured and disordered facets of the GPCR fold. *Curr Opin Struct Biol* **27**: 129–137. doi: 10.1016/j.sbi.2014.08.002

Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP, et al. 2010. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* **17**(1): 98–110. doi: 10.1016/j.ccr.2009.12.020

Verma N, Keinan O, Selitrennik M, Karn T, Filipits M, Lev S. 2015. PYK2 sustains endosomal-derived receptor signalling and enhances epithelial-to-mesenchymal transition. *Nat Commun* **6**: 6064. doi: 10.1038/ncomms7064

Vidal M, Wieland T, Lohse MJ, Lorenz K. 2012. β-Adrenergic receptor stimulation causes cardiac hypertrophy via a Gβγ/Erk-dependent pathway. *Cardiovasc Res* **96**(2): 255–264. doi: 10.1093/cvr/cvs249

van der Vlis TAMB, Hoeben A, Beckervordersandforth JC, Ackermans L, Eekers DBP, Wennekes RMJ, Schijns OEMG. 2017. Impact of the revised WHO classification of diffuse low-grade glioma on clinical decision making: A case report. *Surg Neurol Int* **8**: 223. doi: 10.4103/sni.sni_166_17

Vogt S, Grosse R, Schultz G, Offermanns S. 2003. Receptor-dependent RhoA activation in G12/G13-deficient cells: genetic evidence for an involvement of Gq/G11. *J Biol Chem* **278**(31): 28743–28749. doi: 10.1074/jbc.M304570200

van der Voorn L, Ploegh HL. 1992. The WD-40 repeat. *FEBS Lett* **307**(2): 131–134.

Waldo GL, Ricks TK, Hicks SN, Cheever ML, Kawano T, Tsuboi K, Wang X, Montell C, Kozasa T, Sondek J, et al. 2010. Kinetic scaffolding mediated by a phospholipase C-beta and Gq signaling complex. *Science* **330**(6006): 974–980. doi: 10.1126/science.1193438

Wall MA, Coleman DE, Lee E, Iñiguez-Lluhi JA, Posner BA, Gilman AG, Sprang SR. 1995. The structure of the G protein heterotrimer Gi alpha 1 beta 1 gamma 2. *Cell* **83**(6): 1047–1058.

Wang L, Learoyd J, Duan Y, Leff AR, Zhu X. 2010. Hematopoietic Pyk2 regulates migration of differentiated HL-60 cells. *J Inflamm (Lond)* **7**: 26. doi: 10.1186/1476-9255-7-26

Wang Z, Yang J, Xu G, Wang W, Liu C, Yang H, Yu Z, Lei Q, Xiao L, Xiong J, et al. 2015. Targeting miR-381-NEFL axis sensitizes glioblastoma cells to temozolomide by regulating stemness factors and multidrug resistance factors. *Oncotarget* **6**(5): 3147–3164. doi: 10.18632/oncotarget.3061

Wang CC, Li J, Teo CS, Lee T. 1999. The delivery of BCNU to brain tumors. *J Control Release* **61**(1–2): 21–41. doi: 10.1016/s0168-3659(99)00098-x

Wang L, Zhao K, Ren B, Zhu M, Zhang C, Zhao P, Zhou H, Chen L, Yu S, Yang X. 2015. Expression of cortactin in human gliomas and its effect on migration and invasion of glioma cells. *Oncol Rep* **34**(4): 1815–1824. doi: 10.3892/or.2015.4156

Wang L, Jin G, He C, Guo X, Zhou X, Li M, Ying X, Wang Le, Wu H, Zhu Q. 2014. Gαs protein expression is an independent predictor of recurrence in prostate cancer. *J Immunol Res* **2014**: 301376. doi: 10.1155/2014/301376

Wang Q, Hu B, Hu X, Kim H, Squatrito M, Scarpace L, deCarvalho AC, Lyu S, Li P, Li Y, et al. 2017. Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment. *Cancer Cell* **32**(1): 42-56.e6. doi: 10.1016/j.ccell.2017.06.003

Wang QJ. 2006. PKD at the crossroads of DAG and PKC signaling. *Trends Pharmacol Sci* **27**(6): 317–323. doi: 10.1016/j.tips.2006.04.003

Wang R, Chadalavada K, Wilshire J, Kowalik U, Hovinga KE, Geber A, Fligelman B, Leversha M, Brennan C, Tabar V. 2010. Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. *Nature* **468**(7325): 829–833. doi: 10.1038/nature09624

Wang X, Guo G, Guan H, Yu Y, Lu J, Yu J. 2019. Challenges and potential of PD-1/PD-L1 checkpoint blockade immunotherapy for glioblastoma. *J Exp Clin Cancer Res* **38**(1): 87. doi: 10.1186/s13046-019-1085-3

Wang X, Tan C, Wang G, Cai J-J, Wang L-P, Imperato-McGinley J, Zhu Y-S. 2017. Dual action of NSC606985 on cell growth and apoptosis mediated through PKCδ in prostatic cancer cells. *Int J Oncol* **51**(5): 1601–1610. doi: 10.3892/ijo.2017.4138

Wang Y, Ho G, Zhang JJ, Nieuwenhuijsen B, Edris W, Chanda PK, Young KH. 2002. Regulator of G protein signaling Z1 (RGSZ1) interacts with Galpha i subunits and regulates Galpha i-mediated cell signaling. *J Biol Chem* **277**(50): 48325–48332. doi: 10.1074/jbc.M206116200

Wang Y, Xu X, Pan M, Jin T. 2016. ELMO1 Directly Interacts with Gβγ Subunit to Transduce GPCR Signaling to Rac1 Activation in Chemotaxis. *J Cancer* **7**(8): 973–983. doi: 10.7150/jca.15118

Wang Z, Dela Cruz R, Ji F, Guo S, Zhang J, Wang Y, Feng G-S, Birnbaumer L, Jiang M, Chu W-M. 2014. G(i)α proteins exhibit functional differences in the activation of ERK1/2, Akt and mTORC1 by growth factors in normal and breast cancer cells. *Cell Commun Signal* **12**: 10. doi: 10.1186/1478-811X-12-10

Wang Z, Liu B, Wang P, Dong X, Fernandez-Hernando C, Li Zhong, Hla T, Li Zihai, Claffey K, Smith JD, et al. 2008. Phospholipase C beta3 deficiency leads to macrophage hypersensitivity to apoptotic induction and reduction of atherosclerosis in mice. *J Clin Invest* **118**(1): 195–204. doi: 10.1172/JCI33139

Watanabe M, Nakamura M, Sato K, Kano M, Simon MI, Inoue Y. 1998. Patterns of expression for the mRNA corresponding to the four isoforms of phospholipase Cbeta in mouse brain. *Eur J Neurosci* **10**(6): 2016–2025.

Watanabe T, Nobusawa S, Kleihues P, Ohgaki H. 2009. IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. *Am J Pathol* **174**(4): 1149–1153. doi: 10.2353/ajpath.2009.080958

Watkins S, Robel S, Kimbrough IF, Robert SM, Ellis-Davies G, Sontheimer H. 2014. Disruption of astrocyte-vascular coupling and the blood-brain barrier by invading glioma cells. *Nat Commun* **5**: 4196. doi: 10.1038/ncomms5196

Watkins S, Sontheimer H. 2011. Hydrodynamic cellular volume changes enable glioma cell invasion. *J Neurosci* **31**(47): 17250–17259. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3938-11.2011

Weinstein LS, Liu J, Sakamoto A, Xie T, Chen M. 2004. Minireview: GNAS: normal and abnormal functions. *Endocrinology* **145**(12): 5459–5464. doi: 10.1210/en.2004-0865

Welch HCE, Coadwell WJ, Ellson CD, Ferguson GJ, Andrews SR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Hawkins PT, Stephens LR. 2002. P-Rex1, a PtdIns(3,4,5)P3- and Gbetagamma-regulated guanine-nucleotide exchange factor for Rac. *Cell* **108**(6): 809–821.

Weller M, Butowski N, Tran DD, Recht LD, Lim M, Hirte H, Ashby L, Mechtler L, Goldlust SA, Iwamoto F, et al. 2017. Rindopepimut with temozolomide for patients with newly

diagnosed, EGFRvIII-expressing glioblastoma (ACT IV): a randomised, double-blind, international phase 3 trial. *Lancet Oncol* **18**(10): 1373–1385. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30517-X

Wells CD, Liu M-Y, Jackson M, Gutowski S, Sternweis PM, Rothstein JD, Kozasa T, Sternweis PC. 2002. Mechanisms for reversible regulation between G13 and Rho exchange factors. *J Biol Chem* **277**(2): 1174–1181. doi: 10.1074/jbc.M105274200

Wendt MK, Balanis N, Carlin CR, Schiemann WP. 2014. STAT3 and epithelial-mesenchymal transitions in carcinomas. *JAKSTAT* **3**(1): e28975. doi: 10.4161/jkst.28975

Wendt MK, Schiemann BJ, Parvani JG, Lee Y-H, Kang Y, Schiemann WP. 2013. TGF-β stimulates Pyk2 expression as part of an epithelial-mesenchymal transition program required for metastatic outgrowth of breast cancer. *Oncogene* **32**(16): 2005–2015. doi: 10.1038/onc.2012.230

Wenzel-Seifert K, Seifert R. 2000. Molecular analysis of beta(2)-adrenoceptor coupling to G(s)-, G(i)-, and G(q)-proteins. *Mol Pharmacol* **58**(5): 954–966. doi: 10.1124/mol.58.5.954

Wettschureck N, Offermanns S. 2005. Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev* **85**(4): 1159–1204. doi: 10.1152/physrev.00003.2005

Whiteway M, Hougan L, Dignard D, Bell L, Saari G, Grant F, O'Hara P, MacKay VL, Thomas DY. 1988. Function of the STE4 and STE18 genes in mating pheromone signal transduction in Saccharomyces cerevisiae. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **53 Pt 2**: 585–590.

Wick W, Gorlia T, Bendszus M, Taphoorn M, Sahm F, Harting I, Brandes AA, Taal W, Domont J, Idbaih A, et al. 2017. Lomustine and Bevacizumab in Progressive Glioblastoma. *N Engl J Med* **377**(20): 1954–1963. doi: 10.1056/NEJMoa1707358

Wick W, Platten M, Weller M. 2009. New (alternative) temozolomide regimens for the treatment of glioma. *Neuro-oncology* **11**(1): 69–79. doi: 10.1215/15228517-2008-078

Wick W, Puduvalli VK, Chamberlain MC, van den Bent MJ, Carpentier AF, Cher LM, Mason W, Weller M, Hong S, Musib L, et al. 2010. Phase III study of enzastaurin compared with lomustine in the treatment of recurrent intracranial glioblastoma. *J Clin Oncol* **28**(7): 1168–1174. doi: 10.1200/JCO.2009.23.2595

Wickman KD, Clapham DE. 1995. G-protein regulation of ion channels. *Curr Opin Neurobiol* **5**(3): 278–285.

Wigerup C, Påhlman S, Bexell D. 2016. Therapeutic targeting of hypoxia and hypoxia-inducible factors in cancer. *Pharmacol Ther* **164**: 152–169. doi: 10.1016/j.pharmthera.2016.04.009

Wilkie TM, Gilbert DJ, Olsen AS, Chen XN, Amatruda TT, Korenberg JR, Trask BJ, de Jong P, Reed RR, Simon MI. 1992. Evolution of the mammalian G protein alpha subunit multigene family. *Nat Genet* **1**(2): 85–91. doi: 10.1038/ng0592-85

Wilkie TM, Scherle PA, Strathmann MP, Slepak VZ, Simon MI. 1991. Characterization of G-protein alpha subunits in the Gq class: expression in murine tissues and in stromal and hematopoietic cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**(22): 10049–10053.

Willardson BM, Tracy CM. 2012. Chaperone-mediated assembly of G protein complexes. *Subcell Biochem* **63**: 131–153. doi: 10.1007/978-94-007-4765-4_8

Williams SL, Lutz S, Charlie NK, Vettel C, Ailion M, Coco C, Tesmer JJG, Jorgensen EM, Wieland T, Miller KG. 2007. Trio's Rho-specific GEF domain is the missing Galpha q effector in C. elegans. *Genes Dev* **21**(21): 2731–2746. doi: 10.1101/gad.1592007

Willoughby D, Cooper DMF. 2007. Organization and Ca2+ regulation of adenylyl cyclases in cAMP microdomains. *Physiol Rev* **87**(3): 965–1010. doi: 10.1152/physrev.00049.2006

Wolbers JG. 2014. Novel strategies in glioblastoma surgery aim at safe, supra-maximum resection in conjunction with local therapies. *Chin J Cancer* **33**(1): 8–15. doi: 10.5732/cjc.013.10219

Woo PYM, Li Y, Chan AHY, Ng SCP, Loong HHF, Chan DTM, Wong GKC, Poon W-S. 2019. A multifaceted review of temozolomide resistance mechanisms in glioblastoma beyond O-6-methylguanine-DNA methyltransferase. *Glioma* **2**(2): 68. doi: 10.4103/glioma.glioma_3_19

Wu V, Yeerna H, Nohata N, Chiou J, Harismendy O, Raimondi F, Inoue A, Russell RB, Tamayo P, Gutkind JS. 2019. Illuminating the Onco-GPCRome: Novel G protein-coupled receptor-driven oncocrine networks and targets for cancer immunotherapy. *J Biol Chem* **294**(29): 11062–11086. doi: 10.1074/jbc.REV119.005601

Wu D, Kuang Y, Wu Y, Jiang H. 1995. Selective coupling of beta 2-adrenergic receptor to hematopoietic-specific G proteins. *J Biol Chem* **270**(27): 16008–16010.

Wu D, LaRosa GJ, Simon MI. 1993. G protein-coupled signal transduction pathways for interleukin-8. *Science* **261**(5117): 101–103.

Wu DQ, Lee CH, Rhee SG, Simon MI. 1992. Activation of phospholipase C by the alpha subunits of the Gq and G11 proteins in transfected Cos-7 cells. *J Biol Chem* **267**(3): 1811–1817.

Wu EHT, Lo RKH, Wong YH. 2003. Regulation of STAT3 activity by G16-coupled receptors. *Biochem Biophys Res Commun* **303**(3): 920–925.

Wu J, Qu J, Cao H, Jing C, Wang Z, Xu H, Ma R. 2019. Monoclonal antibody AC10364 inhibits cell proliferation in 5-fluorouracil resistant hepatocellular carcinoma via apoptotic pathways. *Onco Targets Ther* **12**: 5053–5067. doi: 10.2147/OTT.S206517

Wu J, Xie N, Zhao X, Nice EC, Huang C. 2012. Dissection of aberrant GPCR signaling in tumorigenesis--a systems biology approach. *Cancer Genomics Proteomics* **9**(1): 37–50.

Wu Y, Wang S, Farooq SM, Castelvetere MP, Hou Y, Gao J-L, Navarro JV, Oupicky D, Sun F, Li C. 2012. A chemokine receptor CXCR2 macromolecular complex regulates neutrophil functions in inflammatory diseases. *J Biol Chem* **287**(8): 5744–5755. doi: 10.1074/jbc.M111.315762

Würth R, Bajetto A, Harrison JK, Barbieri F, Florio T. 2014. CXCL12 modulation of CXCR4 and CXCR7 activity in human glioblastoma stem-like cells and regulation of the tumor microenvironment. *Front Cell Neurosci* **8**: 144. doi: 10.3389/fncel.2014.00144

Xie T, Plagge A, Gavrilova O, Pack S, Jou W, Lai EW, Frontera M, Kelsey G, Weinstein LS. 2006. The alternative stimulatory G protein alpha-subunit XLalphas is a critical regulator of energy and glucose metabolism and sympathetic nerve activity in adult mice. *J Biol Chem* **281**(28): 18989–18999. doi: 10.1074/jbc.M511752200

Xu Y, Li X, Zhang S, Shen D, Li H, Wu Y, Qiu Y, Ji Y, Chen F. 2012. Targeting Stat3 suppresses growth of U251 cell-derived tumours in nude mice. *J Clin Neurosci* **19**(3): 443–446. doi: 10.1016/j.jocn.2011.04.017

Xu Y, Li Z, Zhang C, Zhang S, Ji Y, Chen F. 2015. Knockdown of PKCε expression inhibits growth, induces apoptosis and decreases invasiveness of human glioma cells partially through Stat3. *J Mol Neurosci* **55**(1): 21–31. doi: 10.1007/s12031-014-0341-4

Yadav L, Puri N, Rastogi V, Satpute P, Sharma V. 2015. Tumour Angiogenesis and Angiogenic Inhibitors: A Review. *J Clin Diagn Res* **9**(6): XE01–XE05. doi: 10.7860/JCDR/2015/12016.6135

Yadav VN, Zamler D, Baker GJ, Kadiyala P, Erdreich-Epstein A, DeCarvalho AC, Mikkelsen T, Castro MG, Lowenstein PR. 2016. CXCR4 increases in-vivo glioma perivascular invasion, and reduces radiation induced apoptosis: A genetic knockdown study. *Oncotarget* **7**(50): 83701–83719. doi: 10.18632/oncotarget.13295

Yagi H, Tan W, Dillenburg-Pilla P, Armando S, Amornphimoltham P, Simaan M, Weigert R, Molinolo AA, Bouvier M, Gutkind JS. 2011. A synthetic biology approach reveals a CXCR4-G13-

Rho signaling axis driving transendothelial migration of metastatic breast cancer cells. *Sci Signal* **4**(191): ra60. doi: 10.1126/scisignal.2002221

Yamada KM, Sixt M. 2019 Oct 3. Mechanisms of 3D cell migration. *Nat Rev Mol Cell Biol*, in press. doi: 10.1038/s41580-019-0172-9

Yamaguchi H, Condeelis J. 2007. Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. *Biochim Biophys Acta* **1773**(5): 642–652. doi: 10.1016/j.bbamcr.2006.07.001

Yamini B. 2018. NF-κB, Mesenchymal Differentiation and Glioblastoma. *Cells* **7**(9). doi: 10.3390/cells7090125

Yang H, Ye D, Guan K-L, Xiong Y. 2012. IDH1 and IDH2 mutations in tumorigenesis: mechanistic insights and clinical perspectives. *Clin Cancer Res* **18**(20): 5562–5571. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1773

Yang HW, Menon LG, Black PM, Carroll RS, Johnson MD. 2010. SNAI2/Slug promotes growth and invasion in human gliomas. *BMC Cancer* **10**: 301. doi: 10.1186/1471-2407-10-301

Yang L, Jackson E, Woerner BM, Perry A, Piwnica-Worms D, Rubin JB. 2007. Blocking CXCR4-mediated cyclic AMP suppression inhibits brain tumor growth in vivo. *Cancer Res* **67**(2): 651–658. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2762

Yang M, Sang H, Rahman A, Wu D, Malik AB, Ye RD. 2001. G alpha 16 couples chemoattractant receptors to NF-kappa B activation. *J Immunol* **166**(11): 6885–6892.

Yang W, Hildebrandt JD. 2006. Genomic analysis of G protein gamma subunits in human and mouse - the relationship between conserved gene structure and G protein betagamma dimer formation. *Cell Signal* **18**(2): 194–201. doi: 10.1016/j.cellsig.2005.04.011

Yao J, Liang L, Huang S, Ding J, Tan N, Zhao Y, Yan M, Ge C, Zhang Z, Chen T, et al. 2010. MicroRNA-30d promotes tumor invasion and metastasis by targeting Galphai2 in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **51**(3): 846–856. doi: 10.1002/hep.23443

Yasuda H, Lindorfer MA, Myung CS, Garrison JC. 1998. Phosphorylation of the G protein gamma12 subunit regulates effector specificity. *J Biol Chem* **273**(34): 21958–21965. doi: 10.1074/jbc.273.34.21958

Yatsunami K, Pandya BV, Oprian DD, Khorana HG. 1985. cDNA-derived amino acid sequence of the gamma subunit of GTPase from bovine rod outer segments. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**(7): 1936–1940.

Yeung WWS, Wong YH. 2009. The RhoA-specific guanine nucleotide exchange factor p63RhoGEF binds to activated Galpha(16) and inhibits the canonical phospholipase Cbeta pathway. *Cell Signal* **21**(8): 1317–1325. doi: 10.1016/j.cellsig.2009.03.017

Yin L, Bennani-Baiti N, Powell CT. 2005. Phorbol ester-induced apoptosis of C4-2 cells requires both a unique and a redundant protein kinase C signaling pathway. *J Biol Chem* **280**(7): 5533–5541. doi: 10.1074/jbc.M405266200

Yin M, Ma W, An L. 2017. Cortactin in cancer cell migration and invasion. *Oncotarget* **8**(50): 88232–88243. doi: 10.18632/oncotarget.21088

Yoda A, Adelmant G, Tamburini J, Chapuy B, Shindoh N, Yoda Y, Weigert O, Kopp N, Wu S-C, Kim SS, et al. 2015. Mutations in G protein β subunits promote transformation and kinase inhibitor resistance. *Nat Med* **21**(1): 71–75. doi: 10.1038/nm.3751

Young N, Pearl DK, Van Brocklyn JR. 2009. Sphingosine-1-phosphate regulates glioblastoma cell invasiveness through the urokinase plasminogen activator system and CCN1/Cyr61. *Mol Cancer Res* **7**(1): 23–32. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-08-0061

Young N, Van Brocklyn JR. 2007. Roles of sphingosine-1-phosphate (S1P) receptors in malignant behavior of glioma cells. Differential effects of S1P2 on cell migration and invasiveness. *Exp Cell Res* **313**(8): 1615–1627. doi: 10.1016/j.yexcr.2007.02.009

Yu MY, Ho MK, Liu AM, Wong YH. 2008. Mutations on the Switch III region and the alpha3 helix of Galpha16 differentially affect receptor coupling and regulation of downstream effectors. *J Mol Signal* **3**: 17. doi: 10.1186/1750-2187-3-17

Yu Q, Xu L, Chen L, Sun B, Yang Zhiyun, Lu K, Yang Zhiyong. 2019 Apr 5. Vinculin expression in non-small cell lung cancer. *J Int Med Res*: 300060519839523. doi: 10.1177/0300060519839523

Yuan C, Sato M, Lanier SM, Smrcka AV. 2007. Signaling by a non-dissociated complex of G protein βγ and α subunits stimulated by a receptor-independent activator of G protein signaling, AGS8. *J Biol Chem* **282**(27): 19938–19947. doi: 10.1074/jbc.M700396200

Yule DI, Baker CW, Williams JA. 1999. Calcium signaling in rat pancreatic acinar cells: a role for Galphaq, Galpha11, and Galpha14. *Am J Physiol* **276**(1 Pt 1): G271-279.

Zanini S, Giovinazzo F, Alaimo D, Lawrence B, Pfragner R, Bassi C, Modlin I, Kidd M. 2015. GNA15 expression in small intestinal neuroendocrine neoplasia: Functional and signalling pathway analyses. *Cellular Signalling* **27**(5): 899–907. doi: 10.1016/j.cellsig.2015.02.001

Zepecki JP, Snyder KM, Moreno MM, Fajardo E, Fiser A, Ness J, Sarkar A, Toms SA, Tapinos N. 2019. Regulation of human glioma cell migration, tumor growth, and stemness gene expression using a Lck targeted inhibitor. *Oncogene* **38**(10): 1734–1750. doi: 10.1038/s41388-018-0546-z

Zhang J, Cai H, Sun L, Zhan P, Chen M, Zhang F, Ran Y, Wan J. 2018. LGR5, a novel functional glioma stem cell marker, promotes EMT by activating the Wnt/β-catenin pathway and predicts poor survival of glioma patients. *J Exp Clin Cancer Res* **37**(1): 225. doi: 10.1186/s13046-018-0864-6

Zhang J, Liu C, Mo X, Shi H, Li S. 2018. Mechanisms by which CXCR4/CXCL12 cause metastatic behavior in pancreatic cancer. *Oncol Lett* **15**(2): 1771–1776. doi: 10.3892/ol.2017.7512

Zhang J, Sarkar S, Yong VW. 2005. The chemokine stromal cell derived factor-1 (CXCL12) promotes glioma invasiveness through MT2-matrix metalloproteinase. *Carcinogenesis* **26**(12): 2069–2077. doi: 10.1093/carcin/bgi183

Zhang L-L, Mu G-G, Ding Q-S, Li Y-X, Shi Y, Dai J-F, Yu H-G. 2015. Phosphatase and Tensin Homolog (PTEN) Represses Colon Cancer Progression through Inhibiting Paxillin Transcription via PI3K/AKT/NF-κB Pathway. *J Biol Chem* **290**(24): 15018–15029. doi: 10.1074/jbc.M115.641407

Zhang P, Kofron CM, Mende U. 2015. Heterotrimeric G protein-mediated signaling and its non-canonical regulation in the heart. *Life Sci* **129**: 35–41. doi: 10.1016/j.lfs.2015.02.029

Zhang S, Qiu X, Gu Y, Wang E. 2008. Up-regulation of proline-rich tyrosine kinase 2 in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* **62**(3): 295–301. doi: 10.1016/j.lungcan.2008.05.008

Zhang S, Yang X, Wang L, Zhang C. 2018. Interplay between inflammatory tumor microenvironment and cancer stem cells. *Oncol Lett* **16**(1): 679–686. doi: 10.3892/ol.2018.8716

Zhang Y, Moschetta M, Huynh D, Tai Y-T, Zhang Yong, Zhang W, Mishima Y, Ring JE, Tam WF, Xu Q, et al. 2014. Pyk2 promotes tumor progression in multiple myeloma. *Blood* **124**(17): 2675–2686. doi: 10.1182/blood-2014-03-563981

Zhang Z, Tan X, Luo J, Cui B, Lei S, Si Z, Shen L, Yao H. 2018. GNA13 promotes tumor growth and angiogenesis by upregulating CXC chemokines via the NF-κB signaling pathway in colorectal cancer cells. *Cancer Med* **7**(11): 5611–5620. doi: 10.1002/cam4.1783

Zhang Z, Zhang Y, Mou Z, Chu S, Chen X, He W, Guo X, Yuan Y, Takahashi M, Chen N. 2014. Tyrosine 402 phosphorylation of Pyk2 is involved in ionomycin-induced neurotransmitter release. *PLoS ONE* **9**(4): e94574. doi: 10.1371/journal.pone.0094574

Zhang Y-M, Zhang Z-Q, Liu Y-Y, Zhou X, Shi X-H, Jiang Q, Fan D-L, Cao C. 2015. Requirement of Gαi1/3-Gab1 signaling complex for keratinocyte growth factor-induced PI3K-AKT-mTORC1 activation. *J Invest Dermatol* **135**(1): 181–191. doi: 10.1038/jid.2014.326

Zhao L, Wang Y, Xue Y, Lv W, Zhang Y, He S. 2015. Critical roles of chemokine receptor CCR5 in regulating glioblastoma proliferation and invasion. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **47**(11): 890–898. doi: 10.1093/abbs/gmv095

Zhao Y, Adjei AA. 2015. Targeting Angiogenesis in Cancer Therapy: Moving Beyond Vascular Endothelial Growth Factor. *Oncologist* **20**(6): 660–673. doi: 10.1634/theoncologist.2014-0465

Zhong J, Paul A, Kellie SJ, O'Neill GM. 2010. Mesenchymal migration as a therapeutic target in glioblastoma. *J Oncol* **2010**: 430142. doi: 10.1155/2010/430142

Zhou T, Wang C-H, Yan H, Zhang R, Zhao J-B, Qian C-F, Xiao H, Liu H-Y. 2016. Inhibition of the Rac1-WAVE2-Arp2/3 signaling pathway promotes radiosensitivity via downregulation of cofilin-1 in U251 human glioma cells. *Mol Med Rep* **13**(5): 4414–4420. doi: 10.3892/mmr.2016.5088

Zhou G, Yang J, Song P. 2019. Correlation of ERK/MAPK signaling pathway with proliferation and apoptosis of colon cancer cells. *Oncol Lett* **17**(2): 2266–2270. doi: 10.3892/ol.2018.9857

Zhu P, Zhu J-J. 2017. Tumor treating fields: a novel and effective therapy for glioblastoma: mechanism, efficacy, safety and future perspectives. *Chin Clin Oncol* **6**(4): 41. doi: 10.21037/cco.2017.06.29

Zhu X, Bao Y, Guo Y, Yang W. 2018. Proline-Rich Protein Tyrosine Kinase 2 in Inflammation and Cancer. *Cancers (Basel)* **10**(5). doi: 10.3390/cancers10050139

Zylbergold P, Sleno R, Khan SM, Jacobi AM, Belhke MA, Hébert TE. 2014. Kir3 channel ontogeny – the role of Gβγ subunits in channel assembly and trafficking. *Front Cell Neurosci* **8**. doi: 10.3389/fncel.2014.00108