



Implication de l'intégrine alpha2beta1 liant le collagène dans la survie et la chimiorésistance des leucémies aiguës

Thèse

Dalila Naci

Doctorat en microbiologie-immunologie
Philosophiae doctor (Ph.D.)

Québec, Canada

© Dalila Naci, 2014

Résumé

Le rôle de la matrice extracellulaire (MEC) du microenvironnement médullaire dans la chimiorésistance des leucémies lymphoblastiques aiguës de type T (T-ALL) n'est pas encore établi. Nos travaux ont permis de démontrer que le collagène, mais pas la fibronectine, induit la résistance des cellules T-ALL contre l'apoptose induite par la chimiothérapie. L'effet anti-apoptotique du collagène est induit par l'intégrine $\alpha 2\beta 1$. L'activation par le collagène de la voie MAPK/ERK mais pas PI3K/AKT est requise pour l'inhibition de l'apoptose mitochondriale induite par la doxorubicine et ceci grâce au maintien de la stabilité de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 et à l'augmentation de l'expression du transporteur d'efflux des drogues ABCC1 (MRP-1). Le maintien de Mcl-1 par le collagène est dû à l'inhibition de la voie pro-apoptotique Rac1/ JNK induite par la doxorubicine. L'activation de la voie $\alpha 2\beta 1$ /ERK/Mcl-1 permet également la survie des cellules T-ALL en absence de facteurs de croissance. En conclusion, nos données suggèrent que l'intégrine **$\alpha 2\beta 1$** serait une voie importante dans l'induction de la chimiorésistance et la progression des leucémies T-ALL.

Abstract

The role of the extracellular matrix (ECM) of the tumor microenvironment in the chemoresistance of T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) is not yet established. Through our results, we demonstrate that collagen, but not fibronectin, induces the resistance of T-ALL cells against apoptosis induced by chemotherapy. The anti-apoptotic effect of collagen is mediated by $\alpha 2\beta 1$ integrin and is dependent on the activation of the MAPK/ERK pro-survival pathway but not of the PI3K/AKT pathway. Collagen induced MAPK/ERK pathway is required for the inhibition of the mitochondrial apoptosis induced by doxorubicin through the maintenance of the stability of the anti-apoptotic protein Mcl-1 and the up-regulation of doxorubicin efflux by the drug transporter ABCC1. Mcl-1 stabilization by collagen is due to the inhibition of Rac1/JNK pro-apoptotic pathway induced by doxorubicin. In addition to its role in chemoresistance, $\alpha 2\beta 1$ integrin ligation allows the survival of T-ALL cells in the absence of growth factors via ERK/Mcl-1 pathway. In conclusion, our data indicate that **$\alpha 2\beta 1$** integrin may constitute an important pathway favoring T-ALL leukemia chemoresistance and progression.

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	v
Table des matières	vii
Liste des tableaux	xv
Chapitre I	xv
Chapitre III.....	xv
Liste des figures	xvii
Chapitre I	xvii
Chapitre II	xvii
Chapitre III.....	xviii
Chapitre IV	xviii
Chapitre V.....	xix
Liste des abréviations.....	xxi
Remerciements.....	xxvii
Avant-propos	xxix
Chapitre II: The alpha2beta1 integrin promotes chemoresistance against doxorubicin in cancer cells through the extracellular-signal-regulated kinase (ERK).....	xxix
Chapitre III: Collagen/beta1 integrin signaling up-regulates the ABCC1/MRP-1 transporter in an ERK/MAPK-dependent manner.	xxix
Chapitre IV: Alpha2beta1 integrin promotes resistance to topoisomerase inhibitors by inhibiting the Rac1/JNK pro-apoptotic pathway.	xxix
Chapitre V: Alpha2beta1 integrin promotes malignant T cell survival and migration through the concomitant activation of ERK/Mcl-1 and p38 MAPK pathways.....	xxx
Chapitre I.....	1
Introduction	1
1.1 Leucémies aiguës	1
1.1.1 Définition et prévalence.....	1
1.1.2 Développement des leucémies.....	2
1.1.3 Structure de la moelle osseuse	4
1.1.4 Traitement des leucémies.....	9
1.1.5 Fréquence des rechutes	11
1.1.6 Implication de la moelle osseuse dans l'induction des rechutes post-thérapeutiques.....	11

1.2 Apoptose	13
1.2.1 Définition	13
1.2.2 La voie intrinsèque d'apoptose	14
1.2.3 Régulation de l'apoptose mitochondriale par les protéines de la famille Bcl-2.....	16
1.2.3.1 Structure et fonctions des protéines de la famille Bcl-2	16
1.2.3.2 La régulation de l'expression des protéines Bcl-2	21
1.2.4 La voie extrinsèque d'apoptose	22
1.2.5 L'activation des caspases d'exécution	23
1.2.6 L'apoptose induite par la chimiothérapie	24
1.2.6.1 Voies de signalisation pro-apoptotiques activées par la chimiothérapie	25
1.2.7 Mécanismes de résistance à l'apoptose induite par la chimiothérapie	29
1.2.7.1 Blocage de l'apoptose	29
1.2.7.2 Résistance à la chimiothérapie par les pompes ABC	33
1.2.8 La chimiorésistance induite par l'adhésion cellulaire.....	38
1.3 Les intégrines	41
1.3.1 Structure et classification des intégrines.....	41
1.3.2 Mécanismes d'activation des intégrines	45
1.3.3 La signalisation par les intégrines	48
1.3.4 Rôles des intégrines dans la régulation de la survie cellulaire	51
1.3.5 Rôle des intégrines dans la survie et la résistance des tumeurs solides à la thérapie	53
1.3.6 Rôle des intégrines dans la survie et la chimiorésistance des hémopathies malignes.....	57
1.3.6.1 Expression des intégrines par les cellules leucémiques	57
1.3.6.2 Rôle des intégrines dans la survie des hémopathies malignes	58
1.3.6.3 Rôle des intégrines dans la chimiorésistance des hémopathies malignes	60
1.4 Problématique, hypothèse et objectifs	65
1.4.1 Problématique.....	65
1.4.2 Hypothèse.....	66
1.4.3 Objectifs	66
Chapitre II	67
L'intégrine alpha2beta1 favorise la chimiorésistance des cellules cancéreuses contre la doxorubicine via la voie ERK (<i>Extracellulaire-signal-Regulated Kinase</i>)	67
2.1 Résumé	67
Alpha2beta1 integrin inhibits doxorubicin-induced apoptosis of T cell acute lymphoblastic leukemia by maintaining Mcl-1 levels in a MAPK/ERK-dependent manner*	69

Dalila Naci¹, Mohammed-Amine El Azreq¹, Nizar Chetoui¹, Laura Lauden², François Sigaux³, Dominique Charron², Reem Al-Daccak² and Fawzi Aoudjit¹.....	69
2.2 Abstract.....	70
2.3 Introduction.....	71
2.4 Experimental procedures.....	73
2.4.1 Reagents and Antibodies.....	73
2.4.2 Cell culture and primary T-ALL blasts	73
2.4.3 Determination of apoptosis and clonogenic survival.....	74
2.4.4 Co-culture of Jurkat cells with bone marrow stromal cells.....	74
2.4.5 Caspase activation, expression of Bcl-2 proteins, activation of ERK, AKT and JNK .	75
2.4.6 Mitochondrial depolarization and cytochrome C release.....	75
2.4.7 Plasmids and Cell Transfection.....	75
2.4.8 RNA Interference	75
2.4.9 Statistical analysis.....	76
2.5 Results.....	77
2.5.1 Collagen type I- $\alpha 2\beta 1$ integrin inhibits doxorubicin-induced apoptosis.....	77
2.5.2 Coll I inhibits doxorubicin-induced mitochondria depolarization, cytochrome C release, caspase activation, and maintains Mcl-1 protein levels	78
2.5.3 Coll I inhibits doxorubicin-induced JNK activation	79
2.5.4 Coll I-mediated cell survival is MAPK/ERK dependent	80
2.5.5 Coll I protects T-ALL blasts from doxorubicin-induced apoptosis.....	81
2.6 Discussion	83
2.7 References	88
2.8 Acknowledgements.....	91
2.9 Footnotes	91
2.10 Figures and legends	92
2.11 Supplementary figures and legends.....	103
Chapitre III.....	107
La signalisation via l'interaction collagène/beta1 intégrine augmente l'expression du transporteur d'efflux ABCC1/MRP-1 par la voie MAPK/ERK.....	107
3.1 Résumé	107
Collagen/beta1 integrin signaling upregulates the ABCC1/MRP-1 transporter in an ERK/MAPK-dependent manner.....	109
Mohammed-Amine El Azreq*, Dalila Naci*, Fawzi Aoudjit*†.	109

3.2 Abstract.....	110
3.3 Introduction.....	111
3.4 Results.....	113
3.4.1 Collagen, but not fibronectin reduces intracellular doxorubicin content.	113
3.4.2 Collagen increases the expression of ABCC1.....	114
3.4.3 The reduction of intracellular doxorubicin content and doxorubicin-induced apoptosis by collagen involves the ABCC1 drug transporter.....	115
3.4.4 ERK signaling is required for collagen-induced effects on ABCC1 activity, expression, and cell survival.	116
3.4.5 Actin polymerization is required for collagen-induced doxorubicin efflux.	117
3.5 Discussion	118
3.6 Materials and methods.....	121
3.6.1 Reagents and antibodies.....	121
3.6.2 Cell culture.....	121
3.6.3 Flow cytometry and fluorescence microscopy analysis of intracellular drug content.....	121
3.6.4 RT-PCR analysis	122
3.6.5 ABCC1 expression by flow cytometry.....	123
3.6.6 Immunoblot analysis.	123
3.6.7 ABCC1 siRNA and silencing.	124
3.6.8 Plasmid transfection.....	124
3.6.9 Determination of apoptosis.....	124
3.6.10 Determination of intracellular F-actin content.....	125
3.6.11 Statistical analysis.....	125
3.7 Acknowledgements.....	125
3.8 References	126
3.9 Figures and legends.....	132
3.10 Supplementary figures and legends.....	145
Chapitre IV	151
L'intégrine alpha2beta1 promeut la résistance à la doxorubicine via l'inhibition de la voie pro-apoptotique Rac1/JNK.....	151
4.1 Résumé :	151
Alpha2beta1 integrin promotes resistance to doxorubicin by inhibiting the Rac1/JNK pro-apoptotic pathway.	153
Dalila Naci and Fawzi Aoudjit*	153

4.2 Abstract.....	154
4.3 Introduction.....	155
4.4 Experimental procedures.....	157
4.4.1 Reagents and Antibodies.....	157
4.4.2 Leukemia cell lines and cell culture	157
4.4.3 Matrix coating and determination of apoptosis.....	157
4.4.4 Immunoblot analysis of Caspase activation, Bcl-2 proteins expression, JNK phosphorylation	158
4.4.5 RNA isolation and analysis	158
4.4.6 Cell surface expression of integrin subunits.....	158
4.4.7 Plasmids and transient cell transfection.....	158
4.4.8 Generation of MOLT-3 cells overexpressing $\alpha 2\beta 1$ integrin	159
4.4.9 Mcl-1 knockdown by RNA interference.....	159
4.4.10 Measurement of Rac1 activity.....	159
4.4.11 Statistical analysis.....	159
4.5 Results.....	160
4.5.1 $\alpha 2\beta 1$ integrin protects AML cell lines from doxorubicin-induced apoptosis.....	160
4.5.2 Collagen promotes doxorubicin chemoresistance by inhibiting Rac1 activation	161
4.5.3 Collagen promotes doxorubicin chemoresistance by inhibiting Rac1/JNK pathway	161
4.5.4 Collagen downregulates Rac1 activation in MAPK/ERK dependent-manner	162
4.5.5 Collagen reduces Rac1-dependent DNA damage response	162
4.6 Discussion	164
4.7 Acknowledgments.....	167
4.8 Footnotes	167
4.9 References	168
4.10 Figures and legends	172
4.11 Supplementary figures and legends.....	184
Chapitre V.....	191
L'intégrine Alpha2beta1 favorise la survie des lymphocytes T malins et leur migration via l'activation concomitante des voies ERK/Mcl-1 et p38 MAPK.....	191
5.1 Résumé :	191
Alpha2beta1 integrin promotes malignant T cell survival and migration through the concomitant activation of ERK/Mcl-1 and p38 MAPK pathways	192
Dalila Naci and Fawzi Aoudjit*	192

5.2 Abstract.....	193
5.3 Introduction.....	194
5.4 Material and methods	196
5.4.1 Reagents and antibodies.....	196
5.4.2 T-ALL cell lines and Cell culture.....	196
5.4.3 Serum starvation and apoptosis determination.....	196
5.4.4 Clonogenic survival assay	197
5.4.5 Co-culture of Jurkat cells with bone marrow stromal cells.....	197
5.4.6 Immunoblot analysis of caspase activation, Bcl-2 proteins levels and MAPK activation.....	197
5.4.7 RNA Interference	197
5.4.8 Plasmids and transient transfections	198
5.4.9 Cell migration assay	198
5.4.10 Statistical analysis.....	198
5.5 Results.....	199
5.5.1 Collagen protects T-ALL cell lines from serum starvation-induced apoptosis via $\alpha 2\beta 1$ integrin.	199
5.5.2 Collagen inhibits serum withdrawal-induced caspase activation and maintains Mcl-1 levels.....	200
5.5.3 Collagen promotes T-ALL cell survival in MAPK/ERK dependent manner.....	201
5.5.4 Activation of p38 MAPK in T-ALL cell lines is dispensable for collagen-induced survival.	202
5.5.6 $\alpha 2\beta 1$ integrin mediates T-ALL cell migration through collagen in ERK and p38 MAPKs-dependent manner.....	202
5.6 Discussion	204
5.7 Conclusions.....	207
5.8 Disclosure.....	208
5.9 Author contributions.....	208
5.10 Acknowledgments.....	208
5.11 References.....	209
5.12 Figures and legends	214
5.13 Supplementary figures and legends.....	224
Chapitre VI	227
Discussion.....	227
Annexe	243

Figures supplémentaires 243
Bibliographie..... 247

Liste des tableaux

Chapitre I

Tableau 1: Les drogues fréquemment utilisées dans les protocoles de la chimiothérapie anti-leucémique.	10
Tableau 2: Les différents transporteurs ABC impliqués dans la chimiorésistance cancéreuse	35
Tableau 3: Les intégrines les plus communes et leurs ligands.....	44
Tableau 4: Les essais cliniques visant l'inhibition des intégrines dans le traitement des tumeurs solides.....	56

Chapitre III

Table 1 : Primer sequences used for RT-PCR analysis of ABCC1, ABCC2, ABCC6, ABCB1, ABCG2 and actin expression.	123
---	-----

Liste des figures

Chapitre I

Figure 1 : L'hématopoïèse normale et leucémique.....	3
Figure 2 : Architecture de la moelle osseuse.....	5
Figure 3 : Expression du collagène et de la fibronectine au niveau médullaire.....	8
Figure 4 : Mécanismes moléculaires d'induction des deux voies apoptotiques; intrinsèque (mitochondriale) et extrinsèque (assurée par les récepteurs de mort).....	15
Figure 5 : Structure et classification des protéines de la famille Bcl-2.....	17
Figure 6 : La régulation de la perméabilisation de la membrane mitochondriale par les membres de la famille Bcl-2.....	18
Figure 7 : Spécificité des interactions entre les protéines anti-apoptotiques et pro-apoptotiques de la famille Bcl-2.....	19
Figure 8 : Régulation de l'apoptose par la voie MAPK/JNK.....	27
Figure 9 : Différents mécanismes de résistance des cancers à l'apoptose induite par la chimiothérapie.....	30
Figure 10 : Structure simplifiée et fonctions des transporteurs ABC.....	34
Figure 11 : Implication du microenvironnement tumoral dans l'induction de la résistance des cancers à la thérapie.....	39
Figure 12 : Structure hétérodimérique des intégrines.....	42
Figure 13 : Classification des intégrines.....	45
Figure 14 : Les mécanismes d'activation des intégrines.....	47
Figure 15 : Voies de signalisation et fonctions des intégrines.....	49
Figure 16 : Mécanismes moléculaires de la résistance à la thérapie des hémopathies malignes induite par l'intégrine $\alpha 4\beta 1$	64

Chapitre II

Figure 1: Coll I inhibits doxorubicin-induced apoptosis.....	97
Figure 2: Coll I inhibits doxorubicin-induced apoptosis by maintaining the levels of Mcl-1.....	98
Figure 3: Coll I inhibits doxorubicin-induced JNK activation.....	99
Figure 4: The protective effect of Coll I is dependent on MAPK/ERK but not on PI3Kinase/AKT pathway.....	100
Figure 5: Coll I/ $\alpha 2\beta 1$ integrin inhibits doxorubicin-induced apoptosis in primary T-ALL blasts.....	101
Figure 6: Proposed model by which $\alpha 2\beta 1$ integrin mediates doxorubicin resistance in T-ALL cells.....	102

Figure S1: Coll I inhibits doxorubicin-induced caspase activation in HSB-2 T cell line	103
Figure S2 : Coll I restores Mcl-1 levels in HSB-2 T cell line	104
Figure S3 : An additional Mcl-1 siRNA sequence abolishes the protective effect of Coll I	105
Figure S4 : Implication of JNK in doxorubicin-induced apoptosis	106

Chapitre III

Figure 1 : Collagen/ β 1 integrin reduces intracellular amounts of doxorubicin.....	136
Figure 2 : Fibronectin had no effect on intracellular doxorubicin content.....	137
Figure 3 : Collagen but not fibronectin also reduces intracellular doxorubicin content as measured by fluorescence microscopy	138
Figure 4 : ABCC1 is the major ABC transporter expressed in leukemic T-cell lines	139
Figure 5 : Collagen but not fibronectin upregulates ABCC1 protein levels through β 1-integrin	140
Figure 6 : Collagen downregulates the intracellular accumulation of calcein-AM	141
Figure 7: ABCC1 inhibition abrogates collagen-induced drug efflux and protection against doxorubicin-mediated apoptosis	142
Figure 8 : ERK inhibition abrogates collagen-induced drug efflux, ABCC1 expression and resistance against doxorubicin-mediated apoptosis	143
Figure 9 : Actin polymerization is required for collagen-induced drug efflux and ABCC1 expression.....	144
Figure S1 : Kinetic effect of collagen on intracellular doxorubicin accumulation	145
Figure S2 : Sustained expression of ABCC1 by collagen.....	146
Figure S3 : ABCC1 siRNA silencing in leukemic T cells	147
Figure S4 : ABCC1 silencing abrogated the collagen-mediated escape from apoptosis induced by a 48 h exposure to doxorubicin	148
Figure S5: DN-MEK-1 expression in transfected cells.....	149

Chapitre IV

Figure 1 : The collagen binding integrin α 2 β 1 but not α 1 β 1 integrin is expressed by U937 and HL-60 AML cell lines	176
Figure 2 : Collagen protects AML cell lines from doxorubicin-induced apoptosis via α 2 β 1 integrin	177
Figure 3 : α 2 β 1 integrin overexpression in MOLT-3 cells induces their protection by collagen against doxorubicin-induced apoptosis	178

Figure 4 : Collagen protects leukemic cells by inhibiting Rac1 activation, which is necessary for doxorubicin-induced apoptosis	179
Figure 5 : Collagen-mediated chemoresistance in AML cells is associated with the inhibition of doxorubicin-induced JNK activation	180
Figure 6 : Rac1 activity is necessary for doxorubicin-induced JNK activation and Mcl-1 downregulation.....	181
Figure 7 : Collagen-induced chemoresistance and Rac1 inhibition are dependent on the MAPK/ERK pathway.....	182
Figure 8 : Collagen inhibits H2AX phosphorylation	183
Figure S1: Collagen promotes myeloid cell line PLB-985 protection against doxorubicin induced apoptosis.....	184
Figure S2: Collagen inhibits doxorubicin-induced mitochondrial apoptosis by inhibiting Mcl-1 downregulation.....	186
Figure S3	188
Figure S4: PI3K/AKT pathway is dispensable for collagen-induced protective effect of AML cell lines	189

Chapitre V

Figure 1: Collagen inhibits serum starvation-induced apoptosis of T-ALL cells.....	218
Figure 2 : Bone marrow derived mesenchymal stem cells (BMSCs) protect Jurkat cells from serum starvation-induced apoptosis via $\alpha 2\beta 1$ integrin.....	219
Figure 3 : Collagen inhibits serum-starvation induced caspase activation, which is associated with maintenance of Mcl-1 levels	220
Figure 4 : Collagen anti-apoptotic effect is dependent on the MAPK/ERK pathway	221
Figure 5 : Collagen-induced p38 activation is not involved in T-ALL cell survival	222
Figure 6 : $\alpha 2\beta 1$ integrin mediates HSB2 cell migration through collagen via ERK and p38.....	223
Figure S1: Soluble collagen protects Jurkat and HSB2 cells against serum starvation-induced apoptosis.....	224
Figure S2	225

Chapitre VI :

Figure 17 : Régulation de la chimiorésistance des leucémies T-ALL et AML par la voie collagène/ $\alpha 2\beta 1$	237
---	-----

Annexe :

Figure S1 : Le collagène de type I protège les cellules T leucémiques contre l'apoptose induite par le méthotrexate et la vincristine243

Figure S2 : L'effet protecteur du collagène de type I contre l'apoptose induite par la doxorubicine est indépendant de la voie p38 MAPK.....244

Figure S3 : Le collagène inhibe l'activation de JNK induite par la doxorubicine et cet effet n'est pas altéré par l'inhibition de l'expression du transporteur ABCC1245

Liste des abréviations

A1: BCL-2-related gene A1

AICD: Activation Induced Cell Death

ABC: ATP Binding Cassettes

Abl: Abelson murine leukemia viral oncogene homolog

AIF: Apoptosis-Inducing Factor

AKT: V-akt murine thymoma viral oncogene homolog

AML: Acute Myeloid Leukemia

Ara-C: Cytarabine

AP-1: Activator Protein-1

Apaf-1: Apoptotic protease activating factor-1

ASK-1: Apoptosis Signal-regulating Kinase-1

ATM: Ataxia Telangiectasia Mutated

ATR: ATM and Rad3-Related

B-ALL: B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia

Bad: BCL-2 antagonist of cell death

Bak: BCL-2 antagonist killer-1

Bax: BCL-2-associated X protein

Bcl-2: B- Cell lymphoma-2

Bcl2-A1: Bcl-2-related protein A1

Bcl-xL: B-cell lymphoma-extra large

Bcl-w: Bcl-2-like protein 2 or Bcl-2L2 découvert à l'institut de recherche médical Walter and Eliza Hall.

CLL: Chronic Lymphoblastic Leukemia

BCRP: Breast Cancer Resistance Protein

BH3: Bcl-2 Homology domain-3

Bid: BH3 interacting-domain death agonist

Bik: BCL-2 interacting killer

Bim: BCL-2 interacting mediator of cell death

BimEL: Extra-Long BCL-2 interacting mediator of cell death

BIR: Baculovirus IAP Repeat domain.

Bmf: BCL-2 modifying factor
BMSC: Bone Marrow Stromal Cells
Bok: BCL-2-related ovarian killer
BCR–ABL1: Breakpoint Cluster Region protein- ABelson murine Leukemia viral oncogene fusion protein-1
CAM-DR: Cell Adhesion Mediated Drug Resistance
Caspase: Cysteine-dependent aspartate-directed protease
CCL-25: Chemokine (C-C motif) Ligand-25
CCR-9: C-C chemokine Receptor type-9
CD: Classe of Differentiation
Cdc25: Cell division cycle-25
Cdc42: Cell division cycle 42
Cdk1/2: Cyclin-dependent kinase-1/2
c-FLIP: cellular FLICE Inhibitory Protein
Chk1: Checkpoint kinase-1/2
CHO: Chinese Hamster Ovary cells
c-IAP1/2: Cellular inhibitor of apoptosis-1
CK2: Casein Kinase-2
CML: Chronic Myeloid Leukemia
CrkL: V-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)-Like protein
CREB: cyclic-AMP Response Element-Binding protein
CSH: Cellules Souches Hématopoïétiques
CSL: Cellules Souches Leucémiques
CXCL-12: C-X-C motif chemokine Ligand-12
CXCR-4: C-X-C chemokine Receptor type-4
DR: Death Receptor
DISC: Death Inducing Signaling Complex
EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor
Elk-1: ETS domain-containing protein
ERK: Extracellular-signal-Regulated Kinase
ERM: Ezrin-Radixin-Moesin

Ets-1: V-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog-1

FADD: Fas-Associated protein with Death Domain

FAK: Focal Adhesion Kinase

Fas: Apoptosis Stimulating Fragment

FasR: Fas Receptor

FasL: Fas Ligand

FOXO3a: FORkhead boX O3a

Fyn: FYN oncogene related to SRC, FGR, YES

eIF4E: Eukaryotic initiation factor-4E

GEF: Guanine Exchange Factor

Grb2: Growth factor receptor-bound protein-2

GSK-3 β : Glycogen Synthase Kinase-3 β

H2XA: H2A histone family, member X

HIF-1 α : Hypoxia-Induced Factor-1 α

HER-2: Human Epidermal growth factor Receptor-2

Hrk: Harakiri

HUVEC: Human Umbilical Vein Endothelial Cells

IAPs: Inhibitor of Apoptosis Proteins

ICAM: InterCellular Adhesion Molecule

IFN- γ : Interferon- γ

IGF-1: Insulin Growth Factor-1

IL: Interleukin

ILK: Integrin- Linked Kinase.

IP3R: Inositol trisPhosphate Receptor

IR: Insulin Receptor

IRES: Internal Ribosome Entry Site

JAK: JANus Kinase

JNK: c-Jun N-terminal Kinase

LFA-1: Lymphocyte Function-associated Antigen-1

LLC: Chronic Lymphoid Leukemia

MAP2Ks: Mitogen-Activated Protein Kinase Kinases

MAP3Ks: MAP Kinase Kinase Kinases
MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase
Mcl-1: myeloid cell leukemia -1
MDM- 2 : Murin Deux Minutes-2
MDR-1: Multi-Drug Resistance protein-1
MEC: Matrice Extra-Cellulaire.
Mek-1/2: Mitogen-activated kinase/ERK kinase-1/2
MKK: Mitogen-activated protein Kinase Kinase.
MNK-1/2: MAP kinase-interacting Kinase-1/2.
MMP : Matrix Métallo-Protéinases
MOMP: Mitochondrial Outer Membrane Perméabilisation
MRM: Maladie Résiduelle Minimale.
MRP-1: Multidrug Resistance Protein-1
mTOR: mammalian Target Of Rapamycin
Myc: V-myc Myelocytomatosis viral oncogene homolog
NADPH: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (sous la forme réduite)
NF- κ B: Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
Noxa: Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein-1
p21Cip1: CDK-interacting protein-1, polypeptide 21 Kda
p27Kip1: Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B, polypeptide 27 Kda
p70^{S6K}: Ribosomal protein S6 kinase, polypeptide 70kDa
p130Cas: Crk-associated substrate, 130kda
PARP: Poly (ADP-ribose) Polymerase
PDK1: Phosphoinositide-3 Dependant Kinase -1
PEST: Peptide sequence that is rich in proline (P), glutamic acid (E), serine (S), and threonine (T)
P-gp: P-glycoprotein
Ph+ALL: Philadelphia positive Acute Lymphoblastic Leukemia
PI3K: Phosphatidyl-Inositol-4,5-bisphosphate3-Kinase
PIDD: p53-induced protein with a Death Domain
Pim-1: Proto-oncogene proviral integration site for moloney murine leukemia virus kinases
PIP2: Phosphatidyl-Inositol-4,5-bi-Phosphate

PIP3: Phosphatidyl-Inositol-3,4,5-tri-Phosphate
PKA: Protein Kinase A
PKB: Protein Kinase B
PKC: Protein Kinase C
PLC γ : Phospholipase C γ
PMA: Phorbol Myristate Acetate
PP2A: Protein Phosphate-2A
PTEN: Phosphatase and TENsin homolog.
PUMA: P53 Upregulated Mediator of Apoptosis
Rac1: Ras-related C3 botulinum toxin substrate
Raf1: V-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog-1
RAIDD: RIP associated ICH-1/CED-3-homologous protein with Death Domain
RalB: Ras-related protein B
Rap-1: Ras-proximate-1 or Ras-related protein-1
Ras: Rat sarcoma
RIAM: RAP1-Interacting Adaptor Molecule
RE: Reticulum Endoplasmique
RICTOR or mTOR Complex-2 (mTORC2)
RhoA: Ras homolog family member A
ROS: Reactive Oxygen Species
RSK: Ribosomal S6 Kinase
SCID: Severe Combined Immunodeficiency Disease
SDF-1 α : Stromal cell-Derived Factor -1 α
Shc: Src homology 2 domain containing transforming protein
SCF: Stem Cell Factor
sFRP-1: secreted Frizzled-Related Protein-1
Smac/ Diablo: Second mitochondria-derived activator of caspases
SP-1: Specificity Protein-1
SPARC: Secreted Protein Acidic, and Rich in Cysteine
Sos: Son of sevenless
Src: v-src avian sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog

STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription
SYK: Spleen tyrosine Kinase
T-ALL: T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia
TCR: T-Cell Receptor
Tiam: T-lymphoma invasion and metastasis gene
TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α
TNFR1: Tumor Necrosis Factor Receptor
TORC2: Transducers Of Regulated CREB activity-2
TRAIL: Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand
VCAM-1: Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor
XIAP: X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein
Wnt: Wingless-type MMTV integration site family
Zap70: Zeta-chain (TCR) associated protein kinase 70kd

Remerciements

Je commence par remercier profondément mon grand Dieu qui m'a procuré toutes les conditions de la réussite. J'exprime ma profonde reconnaissance pour mon directeur de recherche, Dr Fawzi Aoudjit qui m'a permis de travailler sur ce sujet si important du domaine de la biologie des cancers. Je ne pourrais jamais le remercier assez pour l'excellente qualité de sa supervision. Merci à tous les membres de l'équipe du Dr. Aoudjit, particulièrement Dr. Nizar Chetoui et Dr. Marc Boivert pour leurs conseils. J'exprime ma reconnaissance profonde pour Mr. Chentir Amar, Dr. Jean Sévigny et Dr. Jacques Huot pour leurs échanges et encouragements. Merci également à tous les membres du CRRI et à toutes mes amies sur le campus de l'université Laval.

Un grand merci pour tous les membres de ma famille particulièrement mes frères et sœurs pour leur soutien et affection. J'exprime ma gratitude éternelle à mes très chers parents Amar et Ouiza et je leur dédie le fruit de mes 4 ans de travail soutenu.

Avant-propos

La présente thèse contient la majeure partie de mes travaux de doctorat relatif au sujet abordé dans le résumé. Ces travaux sont contenus dans trois articles publiés et un quatrième en préparation.

Chapitre II: The alpha2beta1 integrin promotes chemoresistance against doxorubicin in cancer cells through the extracellular-signal-regulated kinase (ERK)

Auteurs: **Dalila Naci**, Mohammed-Amine El Azreq, Nizar Chetoui, Laura Lauden, François Sigaux, Dominique Charron, Reem Al-Daccak and Fawzi Aoudjit.

Publié dans : [J.Biol.Chem.](#) 2012 May 18;287(21):17065-76. doi: 10.1074/jbc.M112.349365

Contribution: Dans cet article, j'ai effectué les manipulations relatives aux figures 1, 2, 4, S1, S2 et S3. J'ai réalisé le modèle présenté sur la figure 6. J'ai participé à la planification des expériences, à l'analyse et l'interprétation des résultats. J'ai contribué à la rédaction et à la révision du manuscrit.

Chapitre III: Collagen/beta1 integrin signaling up-regulates the ABCC1/MRP-1 transporter in an ERK/MAPK-dependent manner.

Les auteurs: Mohammed-Amine El Azreq, **Dalila Naci**, Fawzi Aoudjit.

Paru dans: [Mol.Biol.Cell.](#) 2012 Sep;23(17):3473-84. doi: 10.1091/mbc.E12-02-0132

Contribution: Dans cet article, j'ai effectué les expériences relatives à la lignée leucémique HSB2. J'ai participé à la planification des expériences, l'analyse et l'interprétation des résultats ainsi qu'à la révision du manuscrit.

Chapitre IV: Alpha2beta1 integrin promotes resistance to topoisomerase inhibitors by inhibiting the Rac1/JNK pro-apoptotic pathway.

Les auteurs: **Dalila Naci** et Fawzi Aoudjit

Non encore publié (en préparation)

Contribution: Dans cet article, j'ai effectué l'ensemble des manipulations qui ont mené aux figures présentées. J'ai contribué à la planification des expériences, l'analyse et l'interprétation des résultats ainsi qu'à la rédaction du manuscrit.

Chapitre V: Alpha2beta1 integrin promotes malignant T cell survival and migration through the concomitant activation of ERK/Mcl-1 and p38 MAPK pathways.

Les auteurs: Dalila Naci et Fawzi Aoudjit

Publié dans : [Cell.Signal.](#) 2014 May 29;26(9):2008-2015.

doi:10.1016/j.cellsig.2014.05.016.

Contribution: Pour cet article, j'ai réalisé l'ensemble des manipulations qui ont mené aux figures présentées. J'ai participé à la planification des expériences, à l'analyse et l'interprétation des résultats ainsi qu'à la rédaction et la correction du manuscrit.

Chapitre I

Introduction

Les leucémies T-ALL et AML sont des leucémies agressives qui se développent essentiellement dans la moelle osseuse^{1,2}. Les rechutes post-thérapeutiques des patients leucémiques demeurent fréquentes et sont particulièrement liées à la résistance des cellules malignes résiduelles à l'apoptose induite par la chimiothérapie³⁻⁶. La moelle osseuse est le site majeur de la maladie résiduelle minimale qui est fortement associé aux rechutes subséquentes des patients^{7,8}. La moelle osseuse est riche en différents éléments de la matrice extracellulaire (MEC), essentiellement en collagène de type I qui est l'élément le plus abondant^{9,10}. La MEC, via l'activation des récepteurs de la famille des intégrines $\beta 1$, peut réguler différents processus malins dont celui de la survie cellulaire¹¹. Le rôle des intégrines dans la chimiorésistance des leucémies aiguës n'est pas encore clairement établi. Dans cette perspective, notre projet de thèse doctorale a porté sur l'étude du rôle des intégrines liant la MEC, particulièrement le collagène, dans la chimiorésistance des leucémies aiguës lymphoïdes de type T (T-ALL) et myéloïdes (AML). En lien avec nos objectifs de recherche, nous avons mis l'emphase, dans cette introduction, sur la description des leucémies aiguës, le rôle de l'apoptose dans la régulation de la réponse des cancers à la thérapie, ainsi que sur le rôle des intégrines liant la MEC dans la régulation de la survie et la chimiorésistance tumorale.

1.1 Leucémies aiguës

1.1.1 Définition et prévalence

Les leucémies aiguës constituent un sous-groupe d'hémopathies malignes dérivant de la transformation oncogénique des cellules souches ou des progénitures hématopoïétiques lymphoïdes ou myéloïdes à différents stades de développement (**Figure 1**)^{12,13}. Ce sont des maladies hétérogènes au niveau génétique, biologique, clinique et pronostique^{14,15}. Elles sont subdivisées en fonction de critères immuno-phénotypiques et cytogénétiques en quatre grands groupes ; les leucémies lymphoblastiques aiguës de type T ou B (T-ALL, B-ALL),

les leucémies myéloïdes aiguës (AML), les leucémies lymphoïdes chroniques T ou B (CLL) et les leucémies myéloïdes chroniques (CML)¹⁶. Les leucémies aiguës ALL et AML sont plus agressives que les leucémies chroniques à cause de leur croissance et évolution plus rapide.

Selon les statistiques de la société américaine du cancer, une augmentation d'incidence annuelle de 1% de leucémies aiguës a été notée au cours des dix dernières années¹⁷. L'AML est la leucémie la plus prévalente, avec 48 610 nouveaux cas enregistrés en 2013, comparativement à 6 070 cas de ALL. Au Canada, 5 800 patients ont reçu un diagnostic de leucémies selon les statistiques récentes de la société canadienne sur le cancer, dont 27% de AML et 10% de ALL. Malgré l'augmentation de la qualité des procédures diagnostiques et thérapeutiques, les taux de mortalité demeurent élevés ; 14 590 cas de décès par la leucémie AML et 1 430 cas de décès par la leucémie ALL sont estimés annuellement aux USA. Les leucémies ALL et AML peuvent atteindre les deux tranches d'âges; enfants et adultes^{12,13,16}. L'ALL est plus fréquente chez les enfants de bas âge (2-10 ans) où elle représente 34% des cancers pédiatriques selon les statistiques canadiennes sur le cancer. Par contre, l'AML survient le plus souvent chez les adultes de plus de 60 ans. Les T-ALL sont peu communes comparativement aux B-ALL (1/3 des cas) mais l'immuno-phénotype T est le plus fréquemment associé au mauvais pronostic des patients.

1.1.2 Développement des leucémies

Le développement leucémique inspire plusieurs de ses aspects de la hiérarchie de l'hématopoïèse ou de la thymopoïèse normale (**Figure 1**)^{18,19}. Il est induit par une accumulation séquentielle et à long terme d'un ensemble de lésions génétiques et épigénétiques qui affectent les progéniteurs hématopoïétiques normaux^{15,20}. La moelle osseuse est considérée comme l'organe primaire impliqué dans la transformation maligne des progéniteurs lymphoïdes B et myéloïdes et l'induction des leucémies B-ALL et AML^{1,2,13,21}. Dans le cas des leucémies T-ALL, il a été suggéré que les progéniteurs lymphoïdes de type T deviennent malins dans le thymus qui est l'organe primaire de la maturation des lymphocytes T²¹⁻²³. En plus de son rôle dans le développement leucémique,

la moelle osseuse est l'un des sites primordiaux favorisant l'évolution des leucémies ALL et AML^{1,2}.

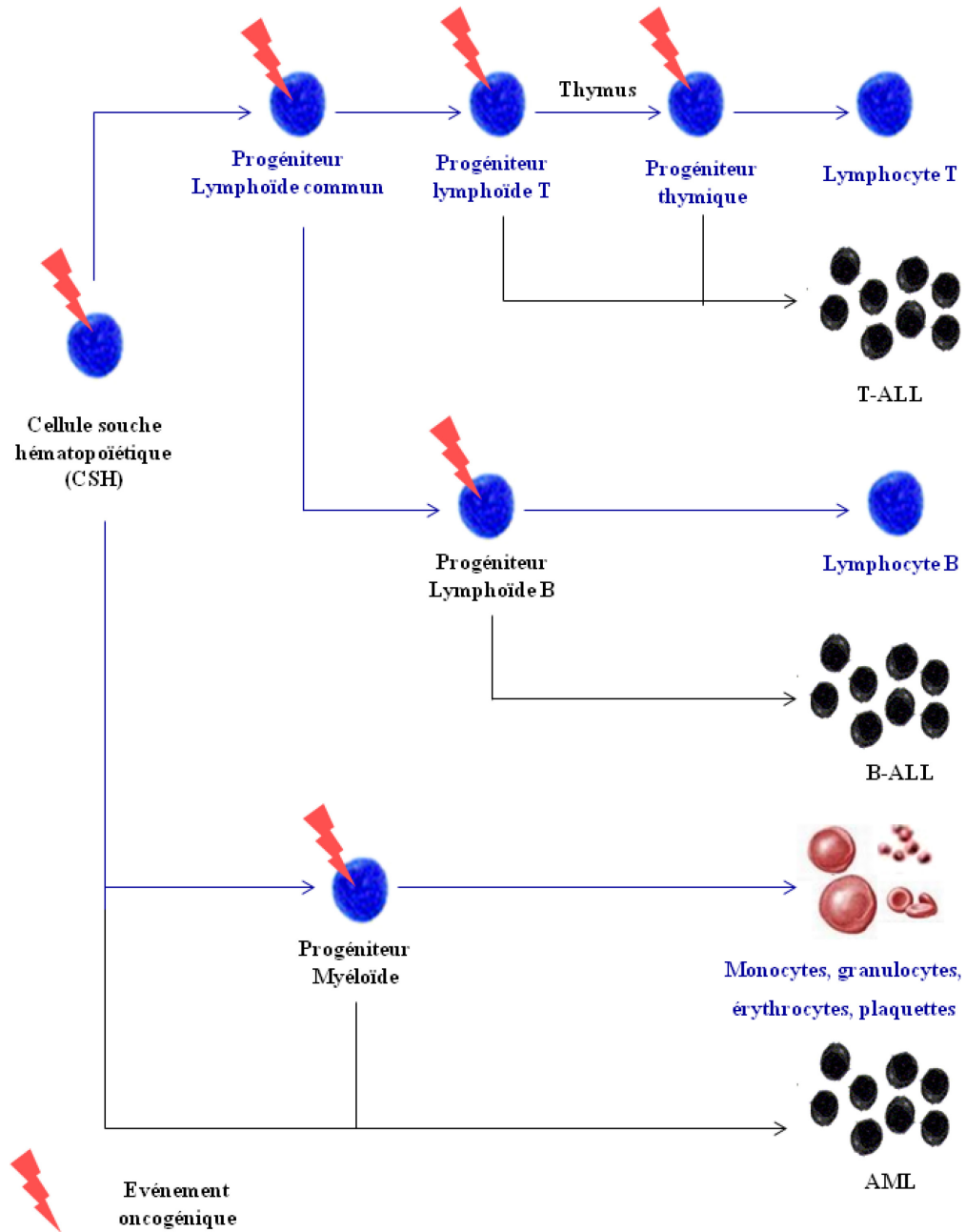


Figure 1 :L'hématopoïèse normale et leucémique (Inspirée de Wang *et al.* 2005)²⁴

Les leucémies aiguës sont des pathologies rapidement fatales si elles ne sont pas maîtrisées thérapeutiquement. Les cellules leucémiques ont tendance à se greffer au niveau de la moelle osseuse rouge médullaire, site actif de l'hématopoïèse²⁵. A ce niveau, elles entrent en compétition avec les cellules hématopoïétiques normales pour les nutriments, l'oxygène et les facteurs de croissance causant, par leur prolifération anarchique, une répression de la genèse des leucocytes, des érythrocytes et des plaquettes^{25,26}. En conséquence, des déficits dans les différents types de cellules sanguines apparaissent et sont à l'origine des infections répétitives, de l'anémie et des saignements qui surviennent chez les patients. Ces symptômes sont les signes majeurs révélateurs de la croissance leucémique.

À des stades avancés de la maladie et en absence d'une thérapie efficace, les cellules malignes peuvent se disséminer par voie sanguine et lymphatique et coloniser d'autres sites extra-médullaires²⁷⁻²⁹. Ces derniers sont généralement des organes hautement vascularisés, de type lymphoïde tels que les ganglions lymphatiques et la rate, ou parenchymateux tels que les reins, les poumons et le foie. L'invasion du système nerveux central (SNC) est la complication la plus redoutable sur le plan thérapeutique à cause de la faible distribution des molécules médicamenteuses à travers la barrière hémato-encéphalique^{13,30}.

1.1.3 Structure de la moelle osseuse

La moelle osseuse est l'organe primaire d'initiation, de développement et de progression des hémopathies malignes^{2,31,32}. Elle est localisée au niveau de la zone trabéculaire des os longs et plats (**Figure 2A**)³³. Les niches médullaires sont des régions dites endovasculaires, subdivisées en deux niches relativement intriquées, la niche endostéale et la niche vasculaire (**Figure 2B**). Les cellules leucémiques adoptent un comportement similaire à celui des cellules hématopoïétiques^{34,35}. Elles sont principalement localisées au niveau des niches vasculaires, où leurs contacts avec les cellules endothéliales, l'oxygène, les facteurs nutritifs et de croissance garantissent leur survie et prolifération. Une fraction minoritaire se loge en état de quiescence au niveau des niches endostéales.

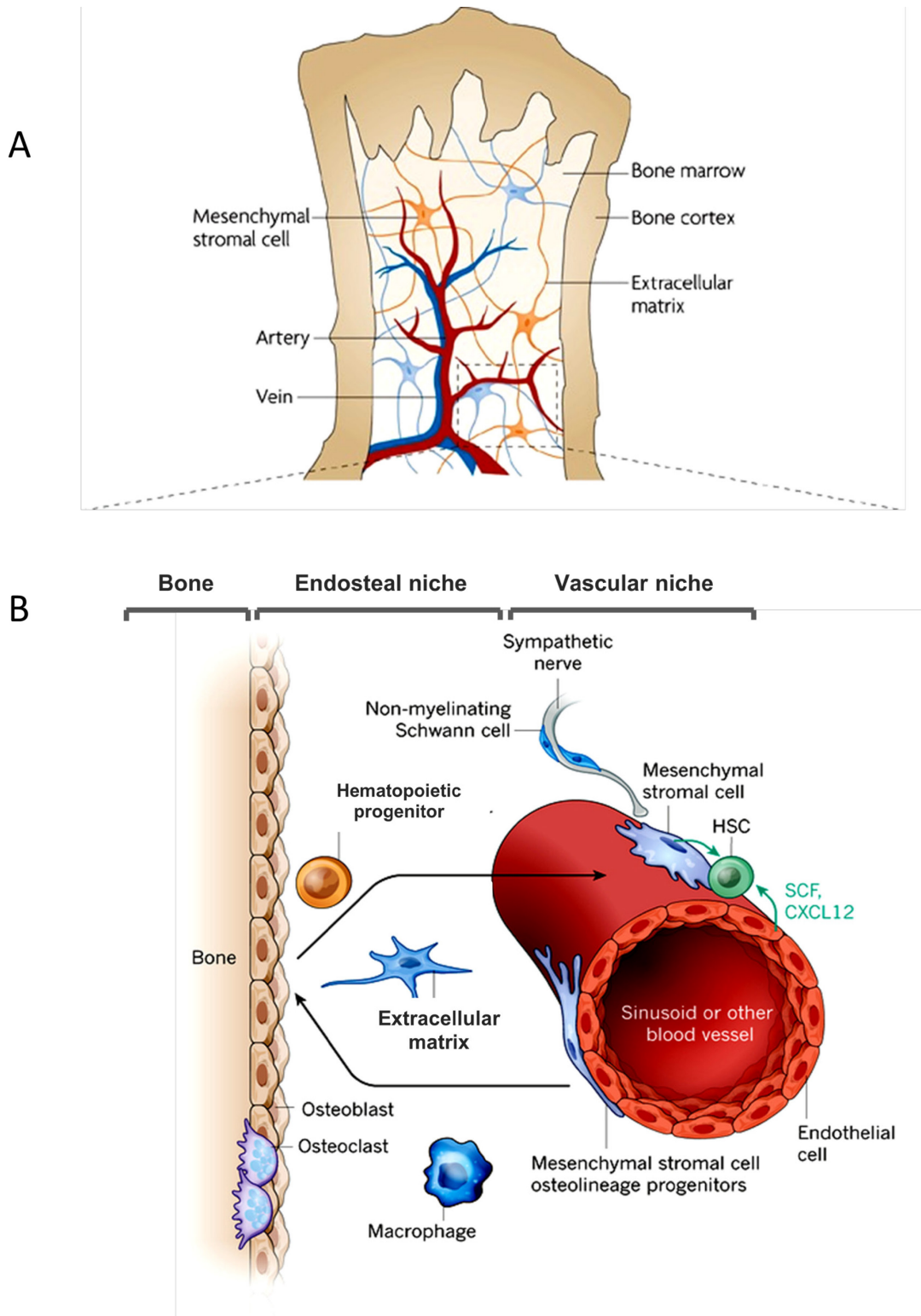


Figure 2 : Architecture de la moelle osseuse. (A) La structure de l'os trabéculaire (Tokoyoda *et al.* 2010)³⁶ (B) L'organisation des niches médullaires (Morrison *et al.* 2014)³³.

On distingue trois types de cellules au sein de la moelle : les cellules mésenchymateuses, endothéliales et immunitaires^{35,37}. Les cellules souches mésenchymateuses médullaires (bone marrow mesenchymal stem cells ou BMSC) sont les principales cellules capables de reproduire l'architecture du microenvironnement hématopoïétique *ex vivo*³⁸⁻⁴⁰. Ces cellules jouent un rôle important dans la progression des tumeurs solides et des hémopathies malignes⁴¹. Comparativement aux BMSC provenant de donneurs sains, les cellules BMSC de patients leucémiques sont caractérisées par plusieurs anomalies génétiques et fonctionnelles qui favorisent la croissance et la chimiorésistance leucémique⁴². Ce sont des cellules multi-potentes, à partir desquelles dérivent les autres types cellulaires ostéoblastiques, adipocytaires et fibroblastiques⁴³. Ces cellules peuvent sécréter différents facteurs solubles (hormones, facteurs de croissances, cytokines et chimiokines). Comme les cellules fibroblastiques, les cellules BMSC sont une source majeure des protéines de la matrice extracellulaire (MEC)^{9,37,44} (**Figure 2B**). Ensemble, les facteurs solubles et la MEC jouent un rôle crucial dans les communications intercellulaires et dans la régulation autocrine et paracrine de la survie, la croissance, la différenciation et la migration intra- et extra-médullaire des progénitures hématopoïétiques normaux et malins.

Le stroma médullaire est d'architecture complexe dont la charpente est formée par les différents éléments de la MEC^{9,45,46}. Ces derniers sont distribués au niveau des deux zones vasculaire et endostéale de la moelle osseuse. Le collagène de type I est parmi les constituants les plus abondamment produits par les cellules BMSC^{10,44,46}. L'analyse de la distribution de la MEC sur des biopsies de moelle osseuse murine, démontre que le collagène de type I est principalement localisé au niveau de la région endostéale et péri-osseuse mais qu'il est peu retrouvé au niveau de la région vasculaire⁴⁵. Il adopte au niveau des cavités hématopoïétiques une structure fibrillaire généralement en association avec les autres éléments matriciels tels que la fibronectine, l'ostéopontine et SPARC (Secreted Protein Acidic, and Rich in Cysteine) (**Figure 3A**)⁴⁷⁻⁵². Le collagène existe aussi sous forme soluble, dérivant du processus du remodelage de la MEC assuré par les métalloprotéinases (MMP) produites par les leucocytes malins et les cellules stromales⁵³⁻⁵⁵. La dégradation du collagène médullaire peut être potentialisée sous l'effet de certaines drogues telles que les glucocorticoïdes, drogues fréquemment utilisées dans le traitement des ALL^{56,57}. Dans ce contexte, une augmentation des niveaux de fragments de collagène de type I peut

favoriser la croissance tumorale du myélome multiple au niveau médullaire et des lymphomes au niveau des ganglions lymphatiques^{52,58}. Le collagène de type IV est un autre type de collagène non fibrillaire qui est plus abondant au niveau de la membrane basale des vaisseaux sanguins, où il forme un réseau non fibrillaire avec les laminine-8 et-10 (**Figure 3B**)¹⁰. Contrairement au collagène de type I, le collagène de type IV est particulièrement abondant au niveau de la zone vasculaire des niches médullaires. La fibronectine peut exister sous deux formes ; une forme fibrillaire dans les tissus conjonctifs et médullaire et une forme soluble au niveau du plasma (**Figure 3C**)^{59,60}. Elle est distribuée dans des zones vasculaires et endostéales.

La moelle osseuse subit plusieurs changements structuraux et fonctionnels au cours de l'évolution leucémique^{37,61-64}. L'analyse de biopsies médullaires de patients AML montre fréquemment une augmentation du nombre des fibroblastes associée à une augmentation de la synthèse et de la déposition aberrante du collagène de type I et de la fibronectine⁶⁵. Ces dépôts peuvent être à l'origine du développement d'une myélofibrose osseuse.

La myélofibrose osseuse est l'une des complications rares mais de mauvais pronostic pour les patients AML^{66,67}. Ces dépôts sont similaires à ceux notés sur les ganglions lymphatiques et de la rate de patients atteints de lymphomes non hodgkiniens⁶⁸. Une synthèse et une localisation aberrante du collagène de type IV et de la fibronectine ont été également mises en évidence sur les biopsies de moelle dérivant de patients atteints de myélome multiple⁶⁹. Ces données soulignent l'abondance du collagène au niveau médullaire dont la production peut être potentialisée par les processus leucémiques. Cependant, le rôle de cette matrice dans la pathogénèse des hémopathies malignes n'est pas encore établi.

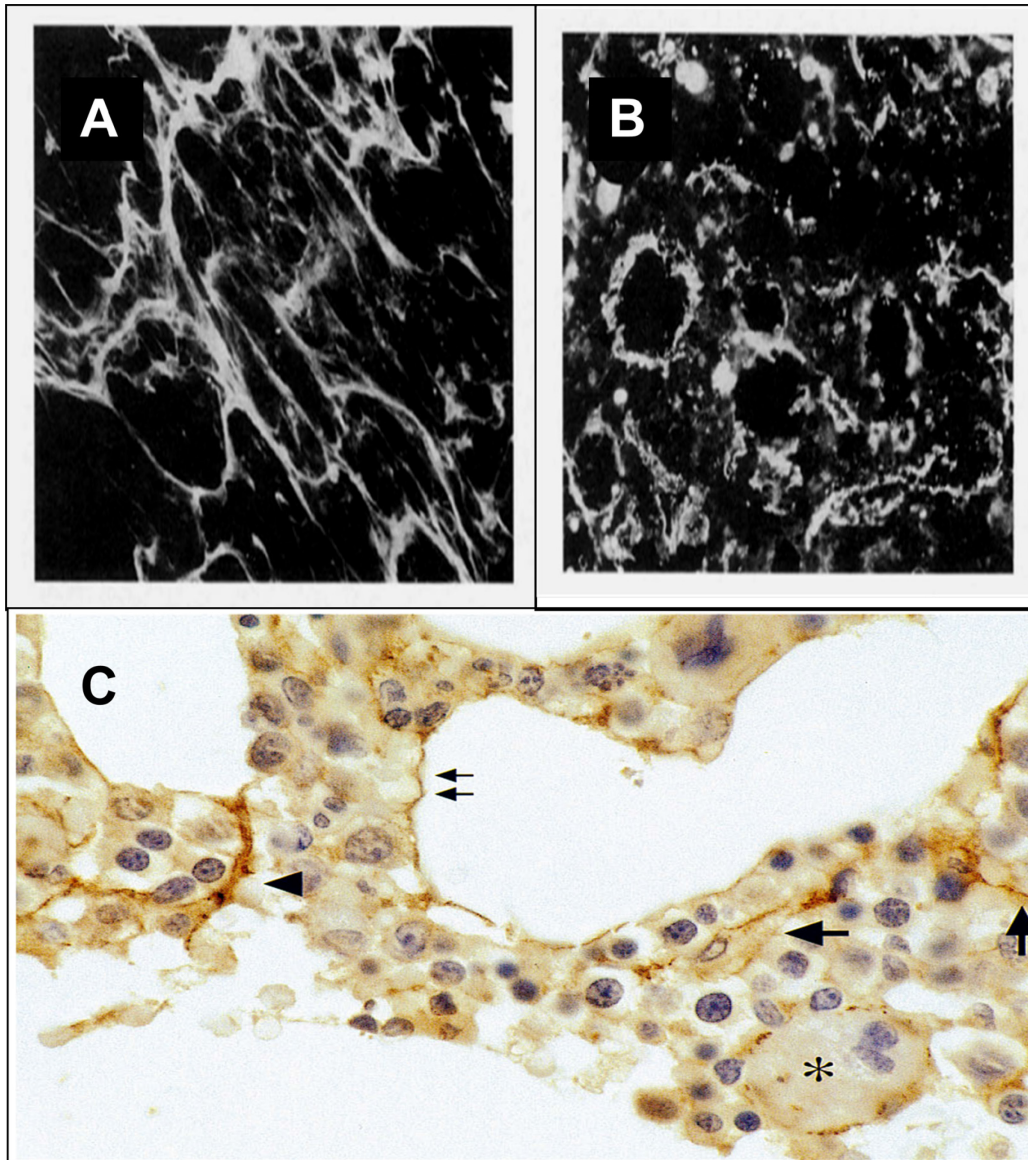


Figure 3 : Expression du collagène et de la fibronectine au niveau médullaire. (A-B) Analyse par radio-immunofluorescence (A-B) de la distribution du collagène de type I filamenteux (A) et du collagène de type IV localisé au niveau vasculaire de structure non filamenteuse (B). (C) Analyse par immunohistochimie de la localisation de la fibronectine (flèches). Les biopsies de la moelle osseuse proviennent de volontaires sains (Klein *et al.* 1995 et Van der Velde-Zimmermann *et al.* 1997^{10,60}).

1.1.4 Traitement des leucémies

Les protocoles utilisés en chimiothérapie anti-leucémique sont basés sur l'administration concomitante de différentes drogues cytotoxiques ciblant majoritairement les cellules en division (**Tableau 1**). Parmi les drogues fréquemment utilisées pour le traitement des leucémies ALL, on distingue les glucocorticoïdes (prednisone, dexaméthasone), les dérivés alcaloïdes de la Vinca (vincristine, vinblastine), la L-asparaginase, les anthracyclines (doxorubicine, daunorubicine, idarubine) et les anti-métabolites (méthotrexate)¹³. Pour les AML, les protocoles thérapeutiques incluent, à ce jour, l'utilisation de l'analogue nucléosidique cytarabine C (Ara-C) en combinaison avec une anthracycline (doxorubicine, daunorubicine ou idarubine)^{70,71}. Certains cas cliniques nécessitent un recours supplémentaire à la radiothérapie et au méthotrexate.

Les traitements sont donnés en deux phases; une phase d'induction-rémission visant l'élimination de la majorité des cellules leucémiques sanguines et tissulaires^{13,70,71}.

Une deuxième phase dite de consolidation qui consiste en un ensemble de cures programmées ciblant l'éradication des cellules résiduelles séquestrées au niveau tissulaire.

En outre, de nouvelles thérapies anti-leucémiques sont actuellement introduites. Les inhibiteurs des tyrosine kinases (imatinib et dasatinib) sont utilisés chez les patients CML et ALL positifs pour le chromosome Philadelphia (fusion BCR-ABL1)^{13,72}. La FDA (Food and Drug Administration) a récemment autorisée l'utilisation de certains analogues nucléosidiques (Cloféramide et Nélaramide) pour le traitement des patients leucémiques T-ALL réfractaires à la chimiothérapie classique⁷³.

En cas d'inefficacité de la chimiothérapie, la transplantation de la moelle osseuse demeure le remède anti-leucémique ultime^{13,73,74}. Les transplantations allogéniques et autologues ont permis une nette amélioration de la survie à long terme des patients, soit de 30-40 et 25-30%, respectivement⁷⁴. Cependant, ce traitement est souvent limité par le manque de donneurs compatibles et il est souvent compliqué par la réaction du greffon contre l'hôte (graft versus host disease ou GVHD).

Tableau 1: Les drogues fréquemment utilisées dans les protocoles de la chimiothérapie anti-leucémique. (d'après Inaba *et al.*, 2013¹³, Lin *et al.* 2012⁷⁰, Peloquin *et al.* 2013⁷¹)

Classe	Drogues communément utilisées	Mécanismes d'action
Corticostéroïdes	Prednisone, Methylprednisolone (Solumedrol®), Dexamethasone (Decadron®)	Induction de l'expression des protéines pro-apoptotiques, d'une façon dépendante ou indépendante du récepteur aux glucocorticoïdes..
Anthracyclines	Daunorubicine Doxorubicine (Adriamycine®) Epirubicine Idarubicine	Inhibiteurs des Topoisomérases II Cassures de l'ADN simple ou double brin.
Antimetabolites	Cytarabine (Ara-C®) Methotrexate	Inhibition de la synthèse de l'ADN
Agents alkylants	cyclophosphamide melphalan	Cassures de l'ADN simple ou double brin.
Drogues dérivées du Platine	cisplatine, carboplatine, oxaloplatine	Cassures de l'ADN simple ou double brin.
Dérivés alcaloïdes de la Vinca	Vinblastine (Velban®), vincristine (Oncovin®),	Inhibition de la polymérisation des microtubules et de la mitose des cellules.

1.1.5 Fréquence des rechutes

L'application des protocoles de la chimiothérapie intensive a permis une amélioration considérable de la survie des patients leucémiques. Ceci a été noté essentiellement chez les enfants de bas âge où les remissions à long terme ont atteint des pourcentages de près de 80%^{73,75}. Cependant, les niveaux de rechutes restent alarmants surtout chez la population adulte où les pourcentages de rechutes chez les patients AML et ALL peuvent atteindre 40-60%. La fréquence des rechutes chez les enfants est aussi remarquable et elle est de l'ordre de 20-25%. Généralement, ces récurrences surviennent au cours des deux premières années post-rémission.

La cause majeure de ces rechutes est la chimiorésistance des cellules leucémiques^{76,77}. En effet, les protocoles chimio-thérapeutiques arrivent à éliminer la majorité des blastes. Cependant, une population minoritaire de cellules, dites résiduelles, demeure séquestrée au niveau tissulaire. Ces cellules peuvent survivre et croître lorsque les conditions environnementales deviennent favorables, redonnant ainsi la maladie chez les patients. Les leucémies qui apparaissent après rechutes sont habituellement plus agressives que les leucémies primaires^{76,78}. En effet, les clones malins secondaires responsables des rechutes sont caractérisés par différentes altérations génétiques et épigénétiques favorisant leur croissance, leur dissémination et leur résistance à la thérapie¹³. Ces propriétés entravent l'élimination de ces clones par la thérapie classique, d'où la nécessité de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques plus spécifiques.

1.1.6 Implication de la moelle osseuse dans l'induction des rechutes post-thérapeutiques

Malgré leur importance dans le développement leucémique, les lésions génétiques ne seraient pas, à elles seules suffisantes pour l'induction de la chimiorésistance des leucémies^{79,80}. Il est de plus en plus évident que la localisation tissulaire des cellules leucémiques est importante pour leur protection contre la chimiothérapie et pour la persistance de la maladie résiduelle minimale.

La maladie résiduelle minimale (MRM) est détectée le plus souvent au niveau de la moelle osseuse mais peut être retrouvée dans d'autres organes tels que le système nerveux central^{7,8,37,81}. La maladie résiduelle minimale est un paramètre permettant la mesure de la réponse des patients à la thérapie et consiste à l'évaluation du nombre de cellules leucémiques résiduelles au niveau de la moelle osseuse après quelques jours à quelques semaines suivant la fin de l'administration de la thérapie^{13,82}. La cytométrie en flux multiparamétrique et la PCR sont parmi les outils sensibles les plus utilisés pour la détection du nombre infime des cellules restantes. L'importance de la mesure du MRM se révèle par le fait que c'est un facteur de risque indépendant de l'incidence des rechutes chez les patients leucémiques^{3,7}. Un pourcentage de MRM supérieur ou égal à 0.01% indique une probabilité de 70% d'incidence de rechutes précoces qui apparaissent dans les deux ans, comparativement à une possibilité de 28% chez les personnes avec une MRM inférieure à 0.01%^{3,13}. Selon ces constats, le défi actuel demeure l'éradication de la maladie résiduelle au niveau médullaire, surtout que le pronostic vital des patients après récives est défavorable en raison de l'absence de thérapies alternatives efficaces^{4,73}.

A l'état actuel des connaissances, la moelle osseuse est considérée comme étant le site principal favorisant la séquestration et le maintien de la survie des cellules leucémiques résiduelles^{8,32,37}. Certaines études ont montré que la zone endostéale est une zone de quiescence des cellules leucémiques favorisant leur échappement aux cures chimiothérapeutiques. En effet, par l'utilisation d'un modèle *in vivo*, le groupe du Dr. Sipkins a montré que l'adhésion des cellules B-ALL de la lignée Nalm-6 à l'ostéopontine de la région endostéale induit l'arrêt de cycle cellulaire et la protection de ces cellules contre l'apoptose induite par la cytarabine⁵¹. Des résultats similaires ont été trouvés par Ishikawa *et al.* et Wu *et al.* dans le cadre des leucémies AML^{83,84}. D'autres travaux ont montré que la zone vasculaire est aussi importante dans l'induction de la chimiorésistance des cellules résiduelles^{85,86}. Ce constat est expliqué par la capacité des cellules endothéliales et mésenchymateuses, abondantes à ce niveau, à promouvoir l'expression de facteurs de survie par les cellules leucémiques.

Cependant, les mécanismes par lesquels le microenvironnement médullaire protège les cellules leucémiques contre l'action génotoxique et cytotoxique de la chimiothérapie ne

sont pas encore bien établis. Comme les autres cellules malignes, les cellules leucémiques sont caractérisées par leur résistance à l'apoptose^{87,88}. Cette propriété joue un rôle crucial dans le développement et la progression des leucémies en dépit des conditions limitantes du microenvironnement tumoral (déficit en nutriments, en facteurs de croissance, en oxygène, acidité lactique et défenses immunitaires). Également, la résistance à l'apoptose est l'une des causes majeures expliquant la maladie résiduelle minimale et les rechutes post-thérapeutiques des patients leucémiques⁸⁹⁻⁹¹. En effet, l'apoptose est le mécanisme majeur d'induction de la mort cellulaire par les différentes drogues utilisées en chimiothérapie anticancéreuse⁹². La capacité des cellules leucémiques à inhiber l'apoptose explique en partie leur résistance aux différentes drogues thérapeutiques^{89,93}. Nous traiterons dans la section suivante, du concept de l'apoptose et de la résistance des cellules leucémiques à l'apoptose induite par la chimiothérapie.

1.2 Apoptose

1.2.1 Définition

La mort cellulaire programmée de type I ou l'apoptose, est un programme de suicide cellulaire destiné à éliminer les cellules inutiles ou malsaines de l'organisme en développement ou celles subissant un stress cellulaire⁹⁴. L'apoptose joue un rôle essentiel dans la régulation de nombreux processus biologiques, tels que le développement embryonnaire, la réponse immunitaire, l'homéostasie tissulaire et hématopoïétique. Le défaut d'induction de l'apoptose est l'une des caractéristiques majeures permettant le développement et la progression des cancers^{87,95}.

L'initiation et l'exécution de l'apoptose sont assurées par deux voies principales ; la voie intrinsèque dite aussi mitochondriale et la voie extrinsèque qui fait intervenir l'activation des récepteurs de mort de la famille du TNFR (Fas, TRAIL-R et TNFR) (**Figure 4**)^{94,95}. Ces deux voies sont connues pour dépendre de l'activité protéolytique des caspases (ou cysteine-dépendent aspartate-directed proteases) qui sont les protéases responsables de la désintégration et de la mort cellulaire.

Bien qu'il existe d'autres voies d'induction de la mort cellulaire et qui peuvent être indépendantes des caspases comme la nécrose ou la mitose catastrophique⁹⁶, elles ne seront pas développées dans cette thèse puisque l'apoptose est la voie majeure qui est activée par la chimiothérapie⁹⁷⁻⁹⁹.

1.2.2 La voie intrinsèque d'apoptose

La voie intrinsèque d'apoptose s'initie par la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie et la libération au niveau cytoplasmique des différentes protéines pro-apoptotiques dont principalement le cytochrome C, les peptides Smac/Diablo et AIF (Apoptosis inducing factor)^{94,95}. Dans le cytosol, le cytochrome C se lie aux protéines Apaf-1 et pro-caspase-9, menant ainsi à la formation du complexe multimoléculaire dit apoptosome.

La disposition des molécules caspases-9 natives au sein de ce complexe, favorise leur dimérisation et auto-activation¹⁰⁰. La caspase-9 est la caspase d'initiation de la voie mitochondriale qui une fois activée, va assurer l'activation protéolytique des caspases effectrices comme les caspases-3, -7 et -6 (**Figure 4**).

En plus du cytochrome C, les peptides Smac/Diablo sont importants pour l'activation des caspases *via* leur habilité à se lier et à bloquer les protéines inhibitrices des caspases (IAPs)¹⁰¹. Par ailleurs, le relargage du facteur AIF de la mitochondrie induit une altération du métabolisme énergétique et une augmentation de la synthèse des radicaux oxygénés (ROS) au niveau mitochondrial¹⁰². Ces derniers favorisent la perméabilisation de la mitochondrie. De plus, il a été démontré que l'AIF peut se lier directement à l'ADN et aux protéines; la cyclophiline A et l'histone H2AX, contribuant de cette façon à la condensation de la chromatine et la fragmentation subséquente de l'ADN^{102,103}.

Dans certains contextes, la caspase-2 peut agir comme une caspase d'initiation de la voie intrinsèque et induire *via* sa localisation mitochondriale et le clivage de Bid, la perte de l'intégrité de la mitochondrie et ainsi, l'activation de la caspase-9¹⁰⁴⁻¹⁰⁸. Les mécanismes régulant l'activation et l'activité de la caspase-2 ne sont pas encore bien établis. Dans ce

contexte, il a été démontré que les protéines RAIDD et PIDD sont parmi les protéines impliquées dans la régulation de l'activation de la caspase-2¹⁰⁹.

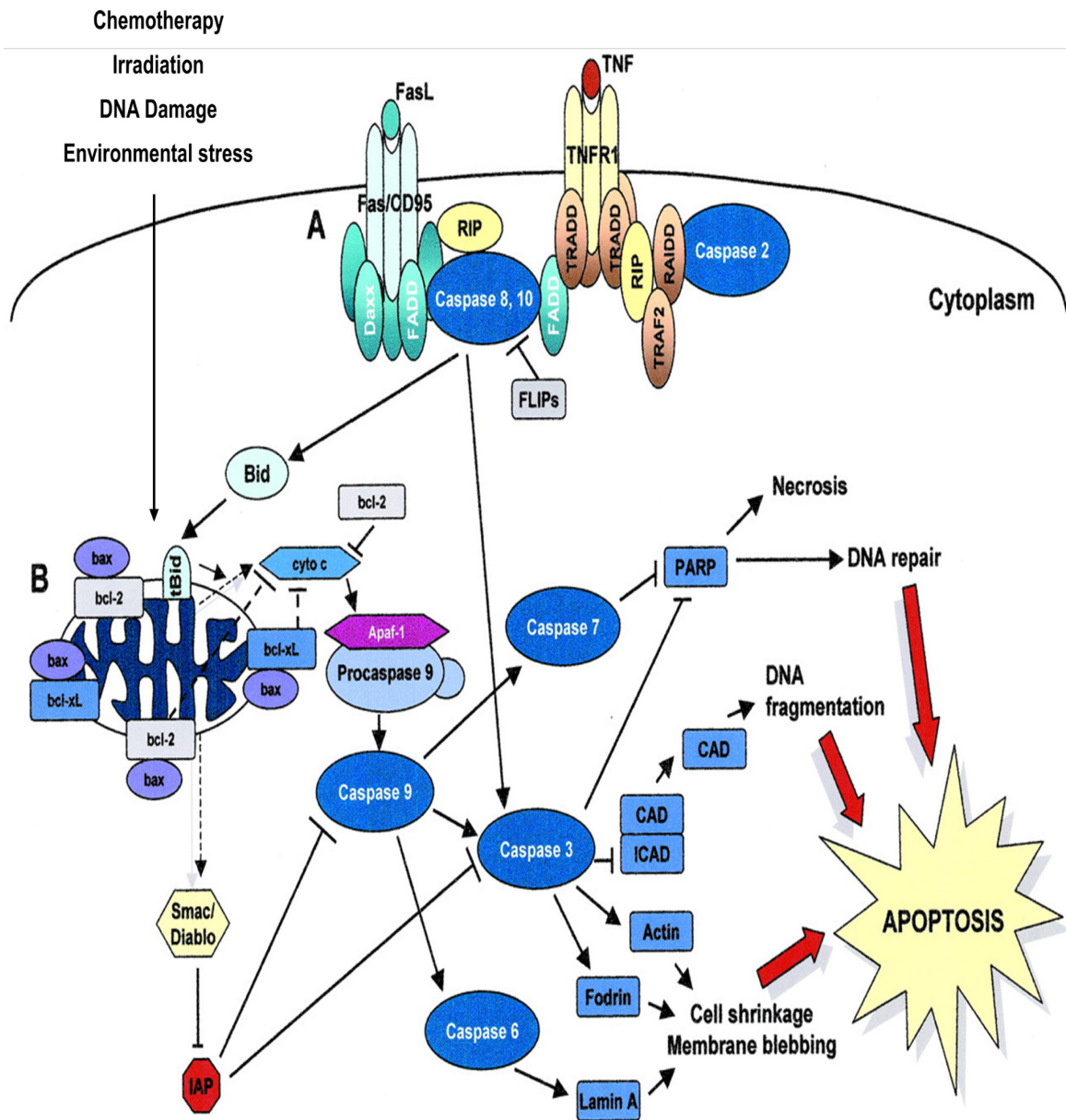


Figure 4 : Mécanismes moléculaires d'induction des deux voies apoptotiques; intrinsèque (mitochondriale) et extrinsèque (assurée par les récepteurs de mort). (Tirée de Greenstein *et al.* 2002)¹¹⁰.

1.2.3 Régulation de l'apoptose mitochondriale par les protéines de la famille Bcl-2

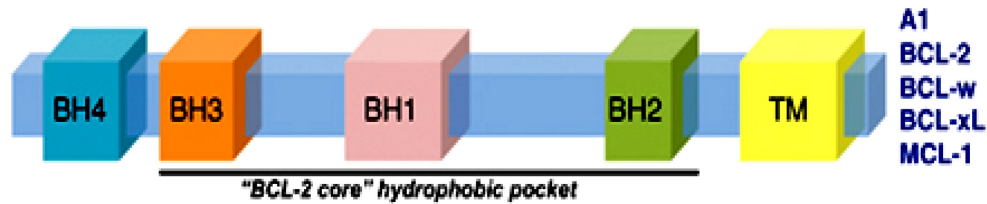
1.2.3.1 Structure et fonctions des protéines de la famille Bcl-2

L'apoptose intrinsèque peut être régulée à différents niveaux; cytoplasmique, mitochondrial et nucléaire^{111,112}. Les protéines de la famille Bcl-2 sont les acteurs principaux contrôlant la perméabilisation de la mitochondrie^{113,114}. Ces protéines sont caractérisées par la possession d'un ou de plusieurs domaines α -hélicoïdaux dit BH (Bcl-2 homology domain). Ces domaines régissent l'établissement d'interactions homotypiques et hétérotopiques entre les protéines de cette famille. D'un point de vue structurel et fonctionnel, les protéines de la famille Bcl-2 sont subdivisées en trois groupes (**Figure 5**); les protéines anti-apoptotiques à 3-4 domaines BH (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W, Mcl-1 et Bcl2A1) qui maintiennent l'intégrité de la mitochondrie en bloquant l'activité des membres pro-apoptotiques, les protéines pro-apoptotiques effectrices ayant de 3 à 4 domaines BH (Bax, Bak et Bok) qui peuvent, à l'état actif, se polymériser et induire la perforation de la membrane mitochondriale et le 3^{ème} groupe des protéines à domaine BH3 ou les « BH3 only » qui partagent le troisième domaine d'homologie (BH3)¹¹⁵.

Les protéines BH3 assurent la régulation du fonctionnement des deux autres groupes de la famille Bcl-2, soit en activant directement les effecteurs pro-apoptotiques Bak et Bax (cas des protéines BID, BIM et PUMA dites les protéines à domaine BH3 activatrices), soit en inhibant l'activité des protéines anti-apoptotiques sans s'engager directement avec les effecteurs pro-apoptotiques (cas des protéines BAD, BIK, BMF, HRK et Noxa)¹¹⁶.

Les protéines à domaine BH3 de ce dernier sous-groupe sont connues comme étant des protéines à domaine BH3 sensibilisatrices car elles n'interviennent pas directement dans l'exécution de la perméabilisation mitochondriale ni dans l'activation de Bak et Bax mais elles assurent la perturbation des complexes existants des protéines anti-apoptotiques avec les protéines pro-apoptotiques et le blocage des protéines anti-apoptotiques libres (**Figure 6**)^{113,115,116}.

Anti-apoptotic BCL-2 proteins



Pro-apoptotic BCL-2 proteins

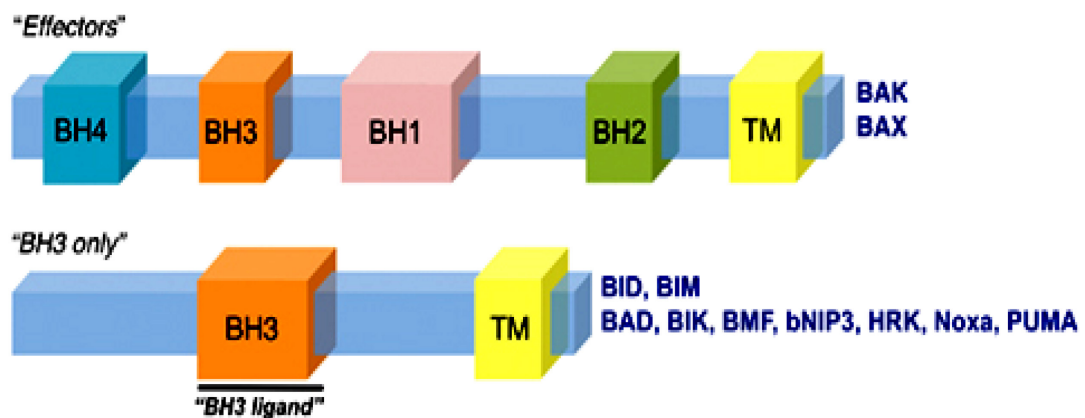


Figure 5 : Structure et classification des protéines de la famille Bcl-2 (Anvekar *et al.* 2011)¹¹⁷

Au cours de la mort cellulaire par apoptose, les signaux de stress induisent une augmentation de la synthèse et de l'activité des protéines Bcl-2 pro-apoptotiques et une diminution des protéines Bcl-2 anti-apoptotiques. En effet, les déficits en nutriments ou en facteurs de croissance, de même que les drogues endommageant l'ADN causent une augmentation des niveaux d'expression et d'activité des protéines Bim, Bid, Puma et Noxa et une diminution de celles des protéines Bcl-2 et Mcl-1¹¹⁸⁻¹²⁰. De ce fait, l'accumulation des protéines à domaine BH3 mène à l'inhibition des protéines Bcl-2 anti-apoptotiques et à l'activation des protéines effectrices Bak et Bax. Une fois activées, les protéines Bak et Bax forment des oligomères ou des pores transmembranaires qui vont perméabiliser la membrane mitochondriale induisant ainsi la libération des protéines pro-apoptotiques; le

cytochrome C, Smac/Diablo et AIF au niveau du cytoplasme (**Figure 6**)¹¹³. La perméabilisation de la mitochondrie est considérée par certains auteurs comme étant un point de non-retour lors des processus d'autodestruction cellulaire. Elle peut toutefois être renversée dans les cellules cancéreuses par une augmentation des niveaux d'expression des protéines Bcl-2 anti-apoptotiques¹²¹.

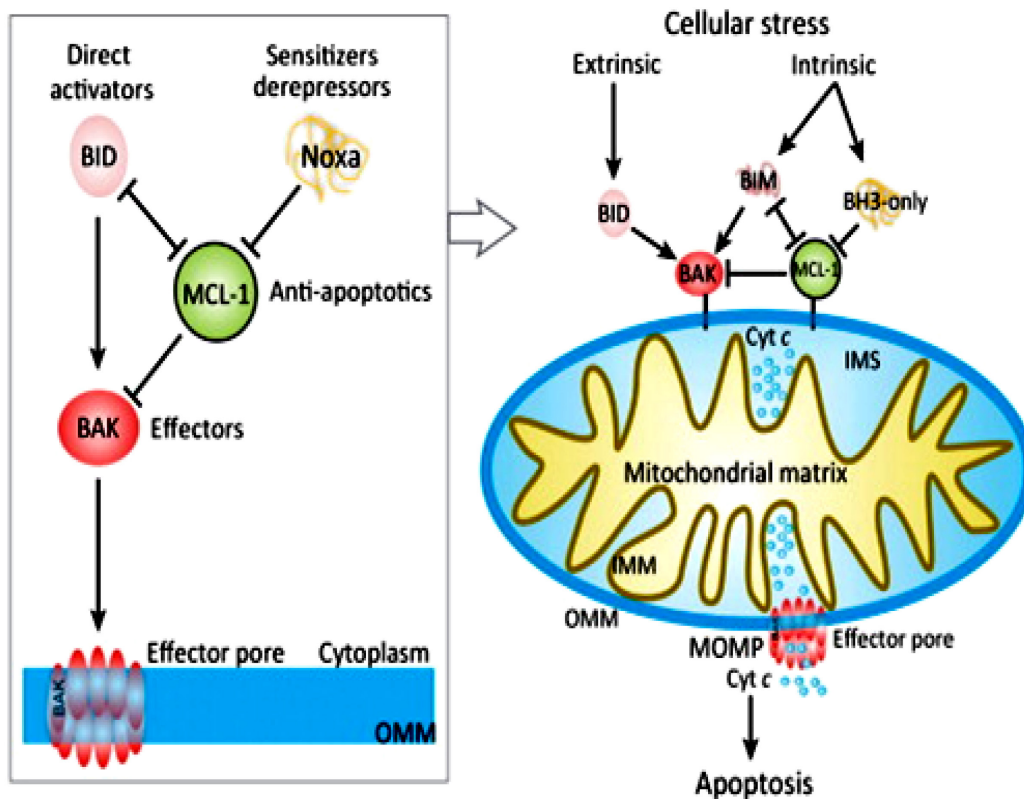


Figure 6 : La régulation de la perméabilisation de la membrane mitochondriale par les membres de la famille Bcl-2 (Moldoveanu *et al.* 2014)¹¹³. Les agents de stress peuvent induire la mort cellulaire via l'induction des protéines Bcl-2 à domaine BH3. Ces derniers assurent une inhibition des membres Bcl-2 anti-apoptotiques et l'activation des protéines pro-apoptotiques Bak et Bax. L'activation et la polymérisation de Bax et Bak mène à la libération des facteurs pro-apoptotiques, comme le cytochrome C qui joue un rôle important dans l'exécution de l'apoptose mitochondriale.

Les protéines de la famille Bcl-2 démontrent une certaine spécificité d'interactions entre elles, liée en partie à la structure moléculaire du domaine BH3, au type et au contexte cellulaire (**Figure 7**)^{122,123}. Contrairement aux protéines Bim, Bid et Puma qui peuvent interagir avec toutes les protéines Bcl-2 anti-apoptotiques, l'action inhibitrice des autres protéines à domaine BH3 est plus restreinte. Par exemple, Bad interagit essentiellement avec les protéines Bcl-2, Bcl-xL alors que Noxa se lie presque exclusivement aux protéines Mcl-1 et Bcl-2A1. Dans le même ordre, Bax peut interagir avec Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1, alors que Bak démontre plus d'affinité pour Mcl-1, Bcl-2A1 et Bcl-xL.

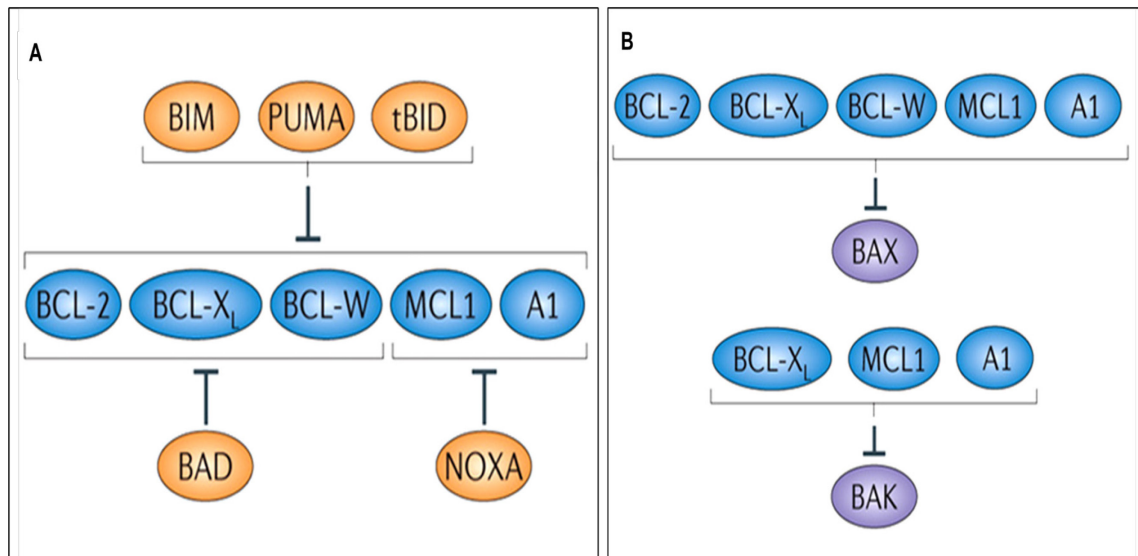


Figure 7 : Spécificité des interactions entre les protéines anti-apoptotiques et pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Czabotar *et al.* 2014)¹²².

En plus de leur rôle dans la perméabilisation mitochondriale, les formes actives de Bak et Bax peuvent promouvoir l'apoptose des cellules *via* l'induction de la division des mitochondries, processus nommé fission mitochondriale¹²⁴. L'exécution de ce processus est inhibée en présence des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 dont la protéine Mcl-1 qui, en coopération avec la protéine Bcl-2, peut favoriser la fusion entre les mitochondries, l'augmentation de la respiration énergétique et ainsi de la survie cellulaire¹²⁵.

Par ailleurs, en plus de leur localisation cytosolique et mitochondriale, les protéines de la famille Bcl-2 sont largement détectées à la surface du réticulum endoplasmique (RE)¹²⁶. Cette position leur donne l'opportunité de réguler le fonctionnement des récepteurs IP3 (IP3R) et la libération du Ca²⁺ dans le cytoplasme. En effet, à l'état basal, les récepteurs IP3R sont inhibés *via* leurs interactions avec les protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1. Cependant, en présence d'un agent de stress affectant le RE, ces récepteurs sont activés en partie *via* l'action des protéines Bcl-2 pro-apoptotiques (Bak, Bax et Bim). Cette activation engendre la libération du Ca²⁺ au niveau cytoplasmique et son accumulation subséquente au niveau du stroma mitochondriale. Cet évènement potentialise la perméabilisation de la paroi mitochondriale. Selon certains travaux, l'augmentation des niveaux du Ca²⁺ dans le cytosol contribue également à l'activation des caspases-9 et -3 et de la calpaïne¹²⁷.

Les protéines de la famille Bcl-2 se localisent également au niveau de la membrane ou de la matrice nucléaire mais leur rôle à ces niveaux n'est pas encore clairement établi¹²⁸. Des interactions directes sont observées entre la protéine Bcl-2 et les facteurs P53 et PARP^{129,130}. Une accumulation des protéines Mcl-1 et du phospho-Bcl-xL (serine 62) au niveau nucléaire a aussi été notée en réponse des cellules aux dommages de l'ADN^{128,131}. Dans ce contexte, Mcl-1 et phospho-Bcl-xL (ser62) semblent jouer un rôle dans l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire *via* la régulation de l'activation de la checkpoint kinase-1 (Chk1) et de la kinase dépendante de la cycline-1 (Cdk1) respectivement. Selon ces études, les protéines Bcl-2 anti-apoptotiques seraient impliquées dans la régulation des processus de réparations de l'ADN.

Les protéines de la famille Bcl-2 sont importantes pour le développement et la progression des tumeurs solides et leucémiques⁹⁵. En plus de leur rôle dans la survie, ces protéines peuvent réguler divers autres processus de survie, de prolifération, de métabolisme et de migration^{132,133}. L'augmentation de la synthèse des protéines Bcl-xL et Mcl-1 et l'inhibition de Bim et Puma sont des observations courantes dans les cancers, favorisant la survie à long terme des tumeurs et leur évolution génétique sous les différentes conditions de stress environnementales¹²¹. Comme nous le verrons plus loin, les protéines Bcl-2 sont également importantes pour l'induction de la chimiorésistance leucémique.

1.2.3.2 La régulation de l'expression des protéines Bcl-2

En réponse aux conditions environnementales, les protéines de la famille Bcl-2 peuvent être régulées à plusieurs niveaux soit transcriptionnel, post-transcriptionnel et post-traductionnel¹³⁴. Sur le plan transcriptionnel, les facteurs de transcription NF- κ B, STAT-3, STAT-5, CREB, HIF-1 α sont parmi les facteurs majeurs augmentant les niveaux d'expression des protéines Bcl-2 anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-2A). Ces facteurs de transcription sont généralement activés par les voies de survie JAK/STAT, PI3K/AKT et MAPK/ERK. Le facteur de transcription P53 est l'un des facteurs principaux activant l'apoptose mitochondriale et extrinsèque. A l'état actif, il réprime la transcription de la protéine Bcl-2 et augmente celles de Fas, Bax, Puma et Noxa¹³⁵. De plus, les facteurs de transcription FOXOs sont souvent activés par les voies de stress MAPK/JNK et p38 et sont impliqués dans l'induction de l'apoptose en partie via l'augmentation des niveaux de Bim et de Puma¹³⁶.

Sur le plan post-transcriptionnel, les ribonucléo-protéines et les micro-ARN jouent un rôle important dans la régulation de la stabilité de l'ARNm des membres de la famille Bcl-2. Dans ce contexte, il a été démontré que les niveaux de la protéine Bcl-2 peuvent être augmentés par l'action de la nucléoline, qui est une ribonucléo-protéine stabilisant l'ARNm de Bcl-2¹³⁷. La perte du micro-ARN miR-29 favorise l'augmentation de l'expression de Mcl-1 dans les leucémies AML et les tumeurs solides^{138,139}. Le micro-ARN miR17-92 assure la répression de l'expression de Bim dans les cellules de lymphomes de type B¹⁴⁰.

Par ailleurs, la régulation de la stabilité des protéines de la famille Bcl-2 est l'un des mécanismes les plus investigués et elle est assurée par l'action de différentes protéines kinases¹³⁴. Mcl-1 est une protéine à demi-vie courte (1-3 h) dont la stabilité est augmentée par la voie MAPK/ERK qui induit la phosphorylation du domaine PEST du Mcl-1 au niveau des sites Thréonine-92 et Thréonine-163¹⁴¹. Ces modifications sont importantes pour le blocage de l'ubiquitination et la dégradation protéosomale de Mcl-1. Contrairement à Mcl-1, la voie ERK peut augmenter la dégradation protéosomale de la protéine BimEL (la forme de Bim extralongue) à travers sa phosphorylation au niveau du site serine-69¹⁴².

Les caspases sont aussi impliquées dans le control post-traductionnel des niveaux des protéines de la famille Bcl-2. Les caspases-8 et -2 peuvent induire le clivage Bid en tBid favorisant sa translocation au niveau mitochondrial et l'activation de Bak et Bax^{143,144}. La caspase-3 peut aussi amplifier le signal pro-apoptotique *via* le clivage des protéines Mcl-1, Bcl-2 et Bcl-xL et la libération de leurs fragments à propriétés pro-apoptotiques^{145,146}.

1.2.4 La voie extrinsèque d'apoptose

La voie extrinsèque est activée suite à l'engagement des récepteurs de mort de la famille TNFR ; Fas, DR4/DR5 et TNFR1 (p55) avec leurs ligands respectifs FasL, TRAIL et TNF- α ^{94,95}. Cette liaison conduit à l'assemblage d'un complexe membranaire de signalisation pro-apoptotique appelé le DISC (Death Inducing Signaling Complex). Ce dernier est formé de plusieurs protéines adaptatrices dont la protéine FADD (Fas-Associated protein with Death Domain). Cette dernière recrute *via* son domaine de mort DD (Death Domain) les molécules caspase-8 et/ou caspase-10 natives, qui sont les caspases d'initiation de la voie extrinsèque. Les interactions homotypiques des caspases-8 et -10 au sein du DISC entraînent leur activation et l'enchaînement du reste du processus protéolytique d'activation des caspases-3,-6 et-7 (**Figure 4**).

Les cellules des mammifères présentent différents niveaux de sensibilité à la voie d'apoptose extrinsèque, ce qui semble être lié principalement aux niveaux d'expression et d'activation de la caspase-8^{147,148}. Suivant cette logique, les cellules sont réparties en deux types, soit I et II. Dans les cellules de type I, les niveaux d'expression et d'activation de la

caspase-8 sont optimaux pour engendrer l'activation des caspases effectrices et ainsi la mort cellulaire. Par contre, pour les cellules de type II telles que les cellules leucémiques de la lignée Jurkat, l'activation de la caspase-8 uniquement est insuffisante pour déclencher l'apoptose et nécessite l'activation concomitante de la voie mitochondriale. Dans ce contexte, l'action protéolytique de la caspase-8 va promouvoir le clivage de Bid en tBid et la libération de BIM et du BMF du cytosquelette tubulaire^{144,149,150}. Ces protéines vont à leur tour promouvoir l'activation de Bak et Bax, l'induction de la perméabilisation mitochondriale et l'activation sous-jacente de la voie intrinsèque d'apoptose.

De ce fait, la régulation de l'apoptose dans les cellules de type I est indépendante des protéines Bcl-2, contrairement aux cas des cellules de type II¹⁵¹. Quoiqu'il en soit, dans les deux types de cellules I et II, l'activation de la caspase-8 est importante pour l'exécution de l'apoptose extrinsèque. Cette étape est fortement régulée par la protéine c-FLIP (FLICE inhibitory protein) qui est l'homologue structural inactif de la caspase-8^{152,153}. Lorsque les concentrations de c-FLIP sont suffisantes, il peut entrer en compétition avec la caspase-8 pour sa liaison au FADD, inhibant le recrutement et l'activation de la caspase-8 au niveau du DISC.

1.2.5 L'activation des caspases d'exécution

Les deux voies apoptotiques intrinsèque et extrinsèque convergent vers la voie commune d'apoptose caractérisée par l'activation des caspases effectrices ou d'exécution (caspases-3,-6 et -7)¹⁵⁴. Ces enzymes existent dans la cellule à l'état de zymogènes ou pro-caspases. Leur activation survient suite à leur clivage par les caspases d'initiation de la voie mitochondriale (la caspase-9 ou la caspase-2) ou de la voie extrinsèque (la caspase-8 ou la caspase-10). Ces caspases sont des enzymes protéolytiques à large spectre de spécificité. La caspase-3 semble être l'enzyme la plus puissante qui assure l'activation en aval des caspases-6 et -7. Ces enzymes sont responsables de la dégradation des différents substrats impliqués dans la réparation de l'ADN et la survie cellulaire¹⁵⁵. Dans les cellules leucémiques des lignées Jurkat et U937, l'activation des caspases d'exécution par l'anticorps anti-Fas (CH11) ou par les agents génotoxiques; la lumière UV, l'étoposide ou la doxorubicine, induit la dégradation des protéines PARP, Raf1, AKT1, ERK, FAK, Bcl-2,

Mcl-1 et Bcl-xL^{156,157}. Par ailleurs, l'action protéolytique des caspases sur l'activation des endonucléases et la destruction du cytosquelette d'actine et des lamines est à l'origine des différents signes caractérisant la mort cellulaire par apoptose dont la fragmentation d'ADN, la condensation de la chromatine et la formation de corps apoptotiques (**Figure 4**)¹⁵⁵.

La survie cellulaire peut être maintenue grâce à l'action des protéines de la famille des IAP (protéines inhibitrices de l'apoptose) dont principalement XIAP, c-IAP1, c-IAP2¹⁵⁸. Ces dernières peuvent se lier directement aux caspases, via leur domaine BIR (baculovirus IAP repeat domain) et bloquer tant l'activation des pro-caspases que l'activité des caspases. XIAP est l'IAP la plus puissante pouvant inhiber les caspases-3, -7 et -9. De plus, XIAP est parmi les protéines de survie les plus facilement induites en cas d'une stimulation pro-apoptotique à cause de son ARNm qui contient des motifs IRES (internal ribosome entry site), empêchant l'inhibition de la traduction de l'ARNm de XIAP sous les conditions de stress¹⁵⁹. Dans la famille IAPs, on retrouve également la survivine¹⁶⁰. Cependant, cette dernière est plus impliquée dans la régulation du processus mitotique. En cas de stress, elle agit comme un cofacteur potentialisant l'activité anti-apoptotique des autres protéines IAPs (XIAP, cIAP-1/2)^{161,162}.

1.2.6 L'apoptose induite par la chimiothérapie

L'apoptose est la voie majeure assurant la mort des cellules malignes par les différentes drogues utilisées dans les protocoles de chimiothérapie anticancéreuse (**Tableau 1**)^{97,98}. En parallèle, d'autres voies non apoptotiques peuvent être activées telles que l'autophagie, la nécrose, l'échec mitotique ou la sénescence^{163,164}. Cependant, ces dernières semblent jouer un rôle auxiliaire et potentialisateur à celui induit par l'apoptose^{98,165,166}. Par ailleurs, les drogues anti-cancéreuses activent principalement la voie intrinsèque de l'apoptose^{92,99}. La voie extrinsèque peut être induite par certaines molécules qui activent l'expression des récepteurs de mort de la famille du TNFR, de leurs ligands ou de la caspase-8, telles que la doxorubicine, le 5-Fluouracile (5-FU), l'étoposide et le méthotrexate¹⁶⁷⁻¹⁷⁰. Cependant, plusieurs travaux démontrent que la voie extrinsèque n'est pas requise pour induire l'apoptose des cellules leucémiques T-ALL et AML par la chimiothérapie qui est plutôt dépendante de la voie mitochondriale^{92,169,171}. Par contre, la voie extrinsèque peut agir en

synergie avec la voie mitochondriale et augmenter la sensibilité des cellules à la chimiothérapie, d'où l'intérêt grandissant visant l'introduction du TRAIL recombinant dans les protocoles de chimiothérapie anti-leucémique¹⁶⁸.

L'augmentation des niveaux des protéines Bcl-2 pro-apoptotiques à domaine BH3 est l'un des déterminants majeurs de la sensibilité des cellules cancéreuses à l'apoptose mitochondriale induite par la chimiothérapie¹⁷². En l'occurrence, Bid est impliqué dans l'apoptose des cellules de cancers solides et lymphomateux induites par les anthracyclines^{173,174}. Bim est aussi l'une des protéines le plus souvent augmentée et qui est importante pour l'apoptose induite par les agents endommageant l'ADN, les glucocorticoïdes, les inhibiteurs tubulaires et les inhibiteurs des kinases (imatinib et gefitinib)¹⁷⁵. Puma est également induit par certaines drogues ciblant l'ADN et par les glucocorticoïdes et agit en synergie avec Bim¹⁷⁶. Noxa est augmentée spécifiquement par certaines drogues génotoxiques telles que l'étoposide et par l'inhibiteur du protéasome S26; le bortezomib^{177,178}. Une diminution des niveaux d'expression et/ou d'activité des protéines Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1 est également notée dans plusieurs contextes d'apoptose induite par les anthracyclines, les inhibiteurs des kinases^{157,179}. L'effet de la chimiothérapie sur la balance des protéines Bcl-2 est aussi dépendant de l'administration séparée ou simultanée des différentes drogues. En effet, le traitement concomitant des cellules T-ALL (Jurkat, CEM et lymphoblastes primaires) avec la doxorubicine, la vincristine et l'acide butylique induit l'apoptose des cellules *via* l'activation de la voie P53/Noxa qui n'est pas activée par ces drogues lorsqu'utilisées séparément¹⁸⁰.

1.2.6.1 Voies de signalisation pro-apoptotiques activées par la chimiothérapie

1.2.6.1.1 Activation de la réponse aux dommages à l'ADN

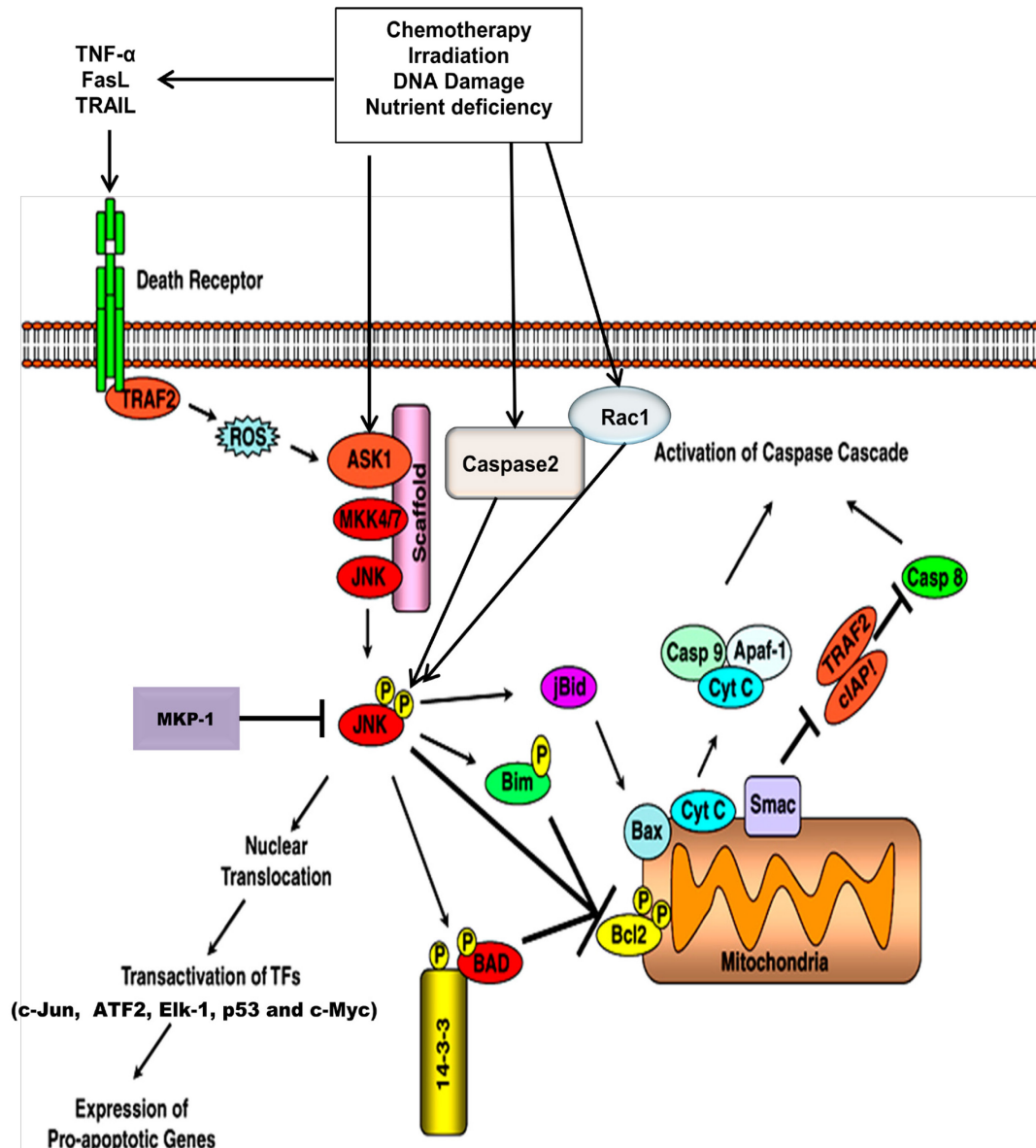
La majorité des drogues utilisées en chimiothérapie anticancéreuse induisent des cassures simple ou double brin, au niveau de la double hélice d'ADN^{181,182}. Ces cassures s'effectuent suite à la liaison directe des drogues à l'ADN (agents alkylants), leurs attachements covalents aux protéines enzymatiques interagissant avec l'ADN (inhibiteurs des topoisomérases I et II) ou par la production des radicaux oxygénés (ROS) (méthotrexate) qui peuvent modifier les bases nucléotidiques de l'ADN. La perte de

l'intégrité de l'ADN est à l'origine du déclenchement d'une réponse aux dommages de l'ADN (DNA damage response) qui fait intervenir un réseau complexe de protéines effectrices dont les protéines serine/thréonine kinases (ATM et ATR), les protéines checkpoint kinases (Chk-1 et Chk-2), le facteur de transcription P53, et la phosphatase Cdc25¹⁸². L'action coordonnée de ces protéines entraîne l'arrêt du cycle cellulaire et l'activation des systèmes de réparation de l'ADN. Les voies PI3K/AKT/mTOR et MAPK/ERK sont impliquées dans la régulation de la réponse aux dommages de l'ADN mais leurs mécanismes de fonctionnement ne sont pas encore bien élucidés¹⁸³⁻¹⁸⁵.

En cas de l'incapacité des cellules à réparer leur ADN, leur apoptose est activée¹¹². La transition des réponses aux dommages à l'ADN vers l'apoptose est régie par plusieurs mécanismes dont l'inhibition de la transcription des protéines de survie, l'induction de l'expression des protéines pro-apoptotiques par le facteur de transcription P53 ou son homologue P73 et par l'activation soutenue des voies MAPK pro-apoptotiques JNK et p38^{186,187}.

1.2.6.1.2 Activation et rôle de la voie de stress pro-apoptotique MAPK/JNK

En réactions aux dommages à l'ADN induites par la chimiothérapie ou la radiothérapie, les cellules cancéreuses déclenchent une cascade de réactions de phosphorylation/déphosphorylation, menant à la stimulation des voies de stress de la famille des MAPKs dont les voies JNK, p38 et plus occasionnellement ERK¹⁸⁸⁻¹⁹⁰. La voie JNK est fréquemment activée par différents types de stress, tels que la lumière UV, le choc thermique, les rayonnements ionisants et le traitement avec des agents anticancéreux, comme les anthracyclines, les anti-métabolites, et les agents anti-microtubules¹⁹¹⁻¹⁹⁴. La stimulation de la voie JNK est régulée par la cascade des kinases MAP3Ks, MAP2Ks (**Figure 8**)¹⁹⁵. Les deux MAP2Ks impliquées dans la stimulation directe de la kinase JNK sont les kinases MKK4 et MKK7. Ces dernières agissent en phosphorylant les résidus Thr183 et Tyr185 du domaine d'activation de la kinase JNK.



(FasL, FasR, Bim, Puma, Noxa, Apaf-1, Bax, PIDD)

Figure 8 : Régulation de l'apoptose par la voie MAPK/JNK (Adaptée de Dhanasekaran *et al.* 2008)¹⁹⁵. JNK peut favoriser l'apoptose mitochondriale des cellules en agissant aussi bien au niveau nucléaire que mitochondrial. La translocation de la JNK vers le noyau induit une augmentation de l'expression des gènes pro-apoptotiques et ceci via la trans-activation de plusieurs facteurs de transcription dont AP1 et P53. Au niveau mitochondrial, la JNK peut phosphoryler différentes protéines de la famille Bcl-2, favorisant ainsi la libération du cytochrome C dans le cytosol et l'activation des caspases.

La double phosphorylation de la JNK est requise pour son activation complète. La kinase MKK7 est plus spécifique pour la kinase JNK alors que MKK4 peut activer également la kinase p38. Il existe plusieurs MAP3Ks qui peuvent induire la stimulation de la JNK, ce qui semble être étroitement lié au contexte cellulaire. Parmi les plus étudiées, on retrouve ASK-1 (Apoptosis signal-regulating kinase-1)^{195,196}. Cette kinase induit une activation retardée de quelques heures suite au stimulus apoptotique mais plus intense et durable de la voie JNK, ce qui est associé à l'activité pro-apoptotique de la JNK¹⁹⁷. En effet, il a été démontré que certains facteurs de croissance peuvent induire une activation rapide et transitoire de la voie MAPK/JNK qui favorise la survie et la prolifération cellulaire alors que l'activation soutenue de JNK est pro-apoptotique^{198,199}. En plus de la kinase ASK1, il a été démontré que la caspase-2 et les kinases ATM et PKC δ peuvent agir comme activateurs de la voie JNK dans les cellules hépatocytaires et leucémiques^{187,200-202}. En outre, Rac1, une petite protéine de la famille des Rho GTPases est connue pour son rôle dans la régulation de l'organisation du cytosquelette d'actine, le contrôle de la morphologie et la migration cellulaire²⁰³. On lui a identifié récemment un rôle pro-apoptotique²⁰⁴. En effet, elle peut être induite par différentes drogues telles que la doxorubicine²⁰⁵ et la simvastatine²⁰⁶ ainsi que les récepteurs de mort (Fas et TNFR)²⁰⁷ et son activation assure la stimulation de la voie JNK dans les cellules normales et cancéreuses. Les mécanismes d'activation de la JNK par Rac1 ne sont pas encore complètement élucidés mais seraient partiellement dépendants de l'activation de la NADPH oxydase et de la production des ROS²⁰⁸⁻²¹¹.

Il a été démontré que la JNK est impliquée dans l'induction de l'apoptose extrinsèque et intrinsèque, où elle peut agir à différents niveaux (**Figure 8**)^{212,213}. Lorsqu'activée, elle peut se localiser au niveau nucléaire et induire la phosphorylation et la trans-activation de différents facteurs de transcription. Le c-Jun est parmi les substrats connus de la JNK. Sa phosphorylation par la JNK conduit à la formation du facteur de transcription AP-1 (Activator protein-1)¹⁹³. Ce dernier est important pour l'expression de plusieurs protéines pro-apoptotiques dont FasL, TNF- α et Bak. La JNK peut aussi activer les facteurs de transcription P53 et P73 qui augmentent la transcription de Bax, Puma et Noxa^{195,214-216}.

En plus de son rôle dans l'expression des facteurs apoptotiques, JNK contribue au relâchement du cytochrome C et du Smac/Diablo dans le cytosol *via* la régulation de

l'activité des différentes protéines de la famille Bcl-2. En effet, la JNK peut induire la phosphorylation et le détachement des protéines Bim, Bmf du complexe microtubulaire dynéine-myosine cytosolique²¹⁷. La phosphorylation de Bad par la JNK induit également sa libération des protéines 14.3.3²¹⁸. En plus, une activation prolongée de la JNK induit le clivage et l'activation de Bid²¹⁹. La JNK peut aussi par phosphorylation inhiber l'activité des protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1^{192,220,221}. Finalement, en coopération avec la kinase GSK-3 β , elle peut promouvoir l'ubiquitination et la dégradation protéosomale de Mcl-1²²².

1.2.7 Mécanismes de résistance à l'apoptose induite par la chimiothérapie

La résistance à l'apoptose est l'une des caractéristiques majeures des cellules cancéreuses, expliquant leur chimiorésistance⁸⁷. Plusieurs mécanismes peuvent favoriser la résistance des cancers contre l'apoptose induite par la chimiothérapie²²³. Parmi les plus étudiés, on distingue l'induction des réparations de l'ADN, l'activation des systèmes de détoxification enzymatiques, l'induction de la quiescence cellulaire, l'efflux des drogues *via* les transporteurs transmembranaires ABC et le blocage direct des voies de signalisation pro-apoptotiques (**Figure 9**). Le blocage direct de l'apoptose et l'exclusion des drogues par les transporteurs ABC sont parmi les mécanismes majeurs de la chimiorésistance leucémique²²⁴⁻²²⁶ que nous avons abordé dans nos travaux de recherche et détaillé dans la sous-section suivante.

1.2.7.1 Blocage de l'apoptose

Dans son étude clinique, le groupe Stankovic a montré que la résistance des patients B-ALL à la thérapie ainsi que la maladie résiduelle minimale étaient liées à la réduction du clivage des caspases-9, -3 et -7 et à une augmentation de l'activation des voies de survie IGF, IP3, MAPK/ERK, PI3K/AKT et Wnt/ β -caténine⁹⁰. Des données similaires ont été mises en évidence par Maha *et al.* dans le contexte des leucémies AML. Ces travaux suggèrent que l'inhibition de l'apoptose mitochondriale est l'un des déterminants de la résistance des cellules leucémiques à la thérapie *in vivo*^{89,90}. L'activation de la voie PI3K/AKT et celle des kinases ERK et FAK sont souvent associées à la faible réponse des patients ALL et AML à la chimiothérapie et à leur mauvais pronostic²²⁷⁻²³¹. La résistance

des cellules leucémiques ALL et AML *in vitro* et *in vivo* est renversée en présence d'inhibiteurs des voies PI3K/AKT et MAPK/ERK^{232,233}. En plus des dérégulations génétiques (amplifications, délétions, mutations), ces voies de survie jouent un rôle primordial dans la régulation de l'expression génique des protéines de la famille Bcl-2 et IAPs²²⁴. Pour ceci, les voies MAPK/ERK et PI3K/AKT peuvent agir à trois niveaux non exclusifs; transcriptionnel, post-transcriptionnel et post traductionnel²³⁴.

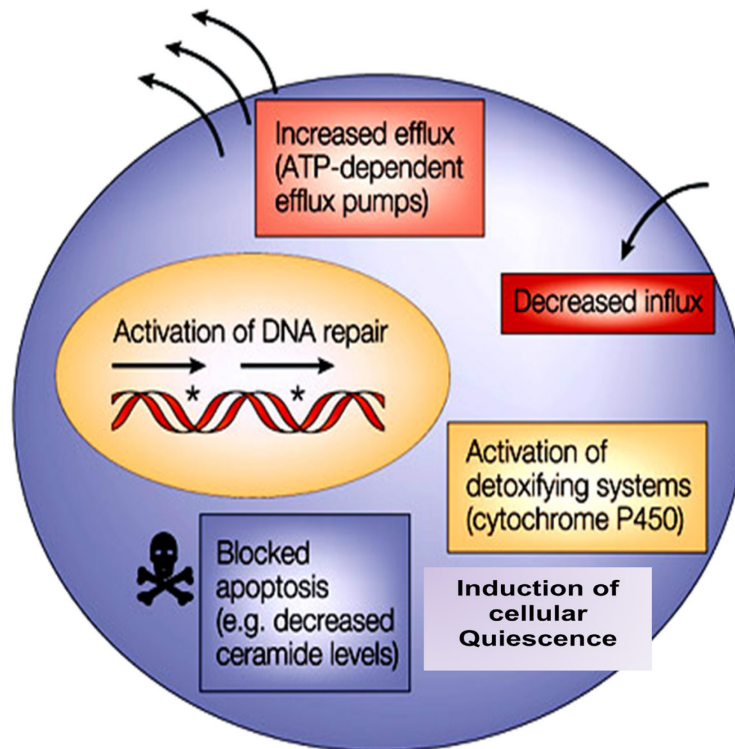


Figure 9 : Différents mécanismes de résistance des cancers à l'apoptose induite par la chimiothérapie (Gottesman *et al.* 2002)²³⁵

Tel que démontré dans plusieurs travaux *in vitro* et *in vivo*, la chimiorésistance leucémique est souvent associée à l'augmentation des niveaux d'expression et d'activité des protéines anti-apoptotiques (Mcl-1, Bcl-xL et Bcl-2) et à la répression des membres pro-apoptotiques (Bim, Puma, Noxa, Bax et Bak)⁹³. L'inactivation du facteur de transcription P53 contribue à la création de ce déséquilibre entre les protéines de la famille Bcl-2²³⁶. En effet, des mutations ou des délétions inactivatrices du facteur P53 sont fréquemment observées dans les leucémies T-ALL et AML et sont associées à la mauvaise réponse des patients ALL à la thérapie²³⁷⁻²³⁹. En accord avec ces données, les travaux du groupe du Dr. Letai ont démontré que les niveaux d'induction de la perméabilisation des mitochondries par les drogues est en corrélation avec la réponse clinique des patients AML et ALL à la chimiothérapie^{240,241}, ce qui reflète l'importance des niveaux d'expression mitochondriale des protéines Bcl-2 pro- et anti-apoptotiques dans ce processus. De même, certaines données cliniques démontrent l'existence d'une association entre le ratio Bcl-2/Bax et l'apparition de la MRM chez les patients AML⁸⁸ et que les niveaux de Bcl-2 corrélaient avec la réponse des patients AML à la thérapie d'induction²⁴²⁻²⁴⁴. Toutefois, il a été démontré que Mcl-1 est la protéine majeure impliquée dans le développement des leucémies et leur chimiorésistance²⁴⁵⁻²⁴⁷. Selon différentes études ayant porté sur de larges cohortes, les niveaux de Mcl-1, avant ou après thérapie, corrélaient avec les rechutes des patients ALL et AML^{5,248}.

Cependant, le blocage de la perméabilisation mitochondriale par les protéines de la famille Bcl-2 anti-apoptotiques est insuffisant pour garantir la survie cellulaire, ce qui nécessite également le blocage de l'activité des caspases en partie *via* l'action des protéines IAPs¹⁵⁴. Ainsi, des niveaux élevés de protéines IAPs (XIAP, cIAP-1, cIAP-2, apollon) sont observés chez les patients leucémiques T-ALL et AML et sont associés, selon certaines études, à la faible réponse thérapeutique des patients^{93,249,250}.

Étant donné l'importance des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 dans la résistance leucémique, plusieurs inhibiteurs de ces protéines sont en cours d'essais cliniques dont Oblimersen, un oligonucléotide antisens inhibant l'expression de la protéine Bcl-2 et les molécules ABT-737 et ABT-263, des agonistes du domaine BH3 (molécules dites aussi BH3 mimétiques), bloquant l'activité des protéines Bcl-2, Bcl-xL et Bcl-W²⁵¹.

Les travaux sur ces molécules ont été récemment suspendus à cause du faible impact thérapeutique qu'elles avaient ou pourraient avoir en clinique et de leur faible effet sur l'inhibition de Mcl-1^{123,251}. Alternativement, les inhibiteurs pan-Bcl-2 (Gossypol, Obatoclax) peuvent bloquer simultanément toutes les protéines Bcl-2 anti-apoptotiques dont principalement Mcl-1. L'association de la molécule Obatoclax avec le bortezomib a démontré une activité clinique prometteuse, lors de l'étude clinique de phase I/II réalisée chez les patients atteints de CML et de myélome multiple²⁵². Malgré la prédominance de Mcl-1 dans la chimiorésistance et le développement tumoral, son ciblage tissulaire non spécifique pourrait avoir des effets néfastes chez les patients à cause de l'importance de cette protéine en physiologie. En effet, les travaux du groupe Opferman démontrent que Mcl-1 est une protéine requise pour la respiration mitochondriale et que son absence cause une défaillance cardiaque dans des modèles murins^{125,253}. Alternativement, les travaux du groupe Ricci sur des modèles murins de lymphomes ont montré la possibilité du ciblage indirect et non pathologique de Mcl-1 via la diminution des apports quotidiens en glucose²⁵⁴. Également, il a été démontré que le traitement des cellules CLL réfractaires au bortezomib induit une augmentation de Noxa qui inhibe l'interaction entre Mcl-1 et Bak¹⁷⁷.

En outre, plusieurs antagonistes des IAPs (dit également Smac mimétiques) sont en cours d'études précliniques pour le traitement des cancers solides et des leucémies^{250,255}. Ces inhibiteurs démontrent une très bonne activité pro-apoptotique aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* surtout en combinaison avec les ligands TRAIL, FasL ou bien TNF- α ²⁵⁶⁻²⁵⁸. L'induction de la mort nécrotique est l'une des alternatives thérapeutiques prometteuses pour dépasser la résistance à l'apoptose induite par les protéines Bcl-2 anti-apoptotiques²⁵⁹. La nécrose peut être stimulée par la combinaison de la chimiothérapie avec les Smac mimétiques. En effet, il a été démontré dans ce contexte que le traitement simultané des cellules leucémiques avec la cytarabine en combinaison avec le BV6, un inhibiteur des protéines XIAP, cIAP1 et cIAP2, induit la mort nécrotique des lignées AML et des myéloblastes malins de patients²⁶⁰.

1.2.7.2 Résistance à la chimiothérapie par les pompes ABC

1.2.7.2.1 Structure et fonctions des transporteurs ABC

La superfamille des transporteurs ABC (ATP binding cassettes) est un large groupe de pompes transmembranaires exprimées aussi bien par les cellules procaryotes qu'eucaryotes²⁶¹. 49 membres sont actuellement connus et séquencés sur le génome humain. En fonction des similitudes de séquences nucléotidiques et peptidiques, les transporteurs ABC sont subdivisés en 7 sous familles (de A à G). Ces transporteurs sont constitués d'au moins quatre domaines, dont deux transmembranaires liant le ligand et deux autres à activité ATPase (connus sous le nom de motifs Walker A et B) (**Figure 10.A**)^{261,262}. Ils sont capables de lier différentes molécules et d'induire leur efflux des cellules. L'exclusion de ces molécules s'effectue contre le gradient de concentration et nécessite une consommation considérable d'ATP (2 molécules d'ATP pour chaque molécule transportée) (**Figure 10**). Parmi les molécules fréquemment transportées, on distingue des sucres, des acides aminés, des lipides, des stérols, des nucléotides, des métabolites endogènes, des ions, des antibiotiques et des drogues thérapeutiques (agents alkylants, anthracyclines, méthotrexate, taxanes et des inhibiteurs des kinases)²⁶³.

Les pompes ABC sont exprimées par les cellules normales de l'organisme, jouant un rôle important dans leur détoxification. Cependant, leurs niveaux d'expression sont encore plus augmentés dans différents contextes pathologiques, tels que ceux des maladies auto-immunes et cancéreuses (**Figure 10B**)^{223,263}.

L'efflux des drogues *via* les pompes ABC sont parmi les causes identifiées en premier pour la chimiorésistance des cancers²⁶⁴. La majorité des transporteurs de cette famille est capable d'induire l'efflux de plusieurs molécules médicamenteuses appartenant à des classes pharmacologiques distinctes, favorisant de cette façon la multi-résistance des cellules cancéreuses (**Tableau 2**)^{225,265}. Différemment des autres transporteurs, l'efflux des drogues *via* les pompes ABCC1 et 2 nécessite le co-transport simultané du glutathion pour des raisons encore incomprises²⁶⁶. Par ailleurs, les transporteurs ABC sont abondamment exprimés sur les cellules souches hématopoïétiques et mésenchymateuses et contribuent au maintien de leur survie contre le stress causé par différents agents chimiques^{267,268}. Le

transporteur ABCG2 est l'un des marqueurs caractérisant les cellules souches hématopoïétiques et leucémiques^{269,270}. En plus de son effet sur l'exclusion des drogues, il inhibe l'accumulation intracellulaire des porphyrines cytotoxiques lors d'hypoxie²⁷¹.

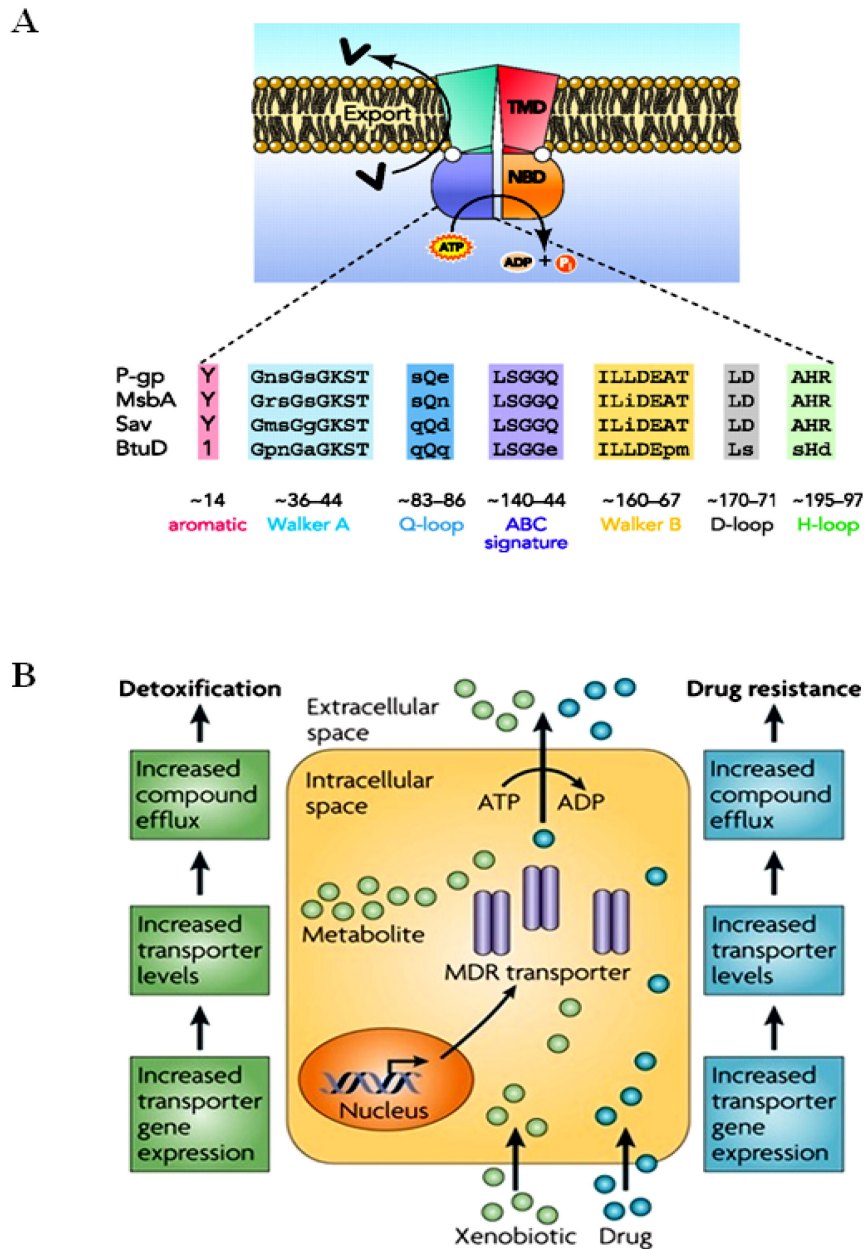


Figure 10 : Structure simplifiée et fonctions des transporteurs ABC (A) Structure simplifiée d'un transporteur ABC (Linton, 2007)²⁶¹. (B) Fonctions des transporteurs ABC en physiologie et en pathologie (Holohan *et al.* 2013²²³).

Tableau 2: Les différents transporteurs ABC impliqués dans la chimiorésistance cancéreuse (tiré de Xia *et al.* 2012 et Kunická *et al.* 2014)^{225,265}

Gene	Protein	Roles in Drug Resistance	Anticancer Drug Substrates/ Inducers
ABCA2	ABC2	Drug transport	Estramustine, mitoxantrone
ABCA3	ABC3	Surfactant lipid transporter, lysosomal drug sequestration	Doxorubicin, daunorubicin, imatinib.
ABCB1	P-gp MDR1	Drug transport	Multiple, including <i>Vinca</i> alkaloids, anthracyclines, etoposide, taxanes, imatinib, irinotecan, methotrexate, mitoxantrone
ABCB4	PGY3 MDR3	Phosphatidylcholine and drug transport, bile acid secretion	Vinblastine, doxorubicin
ABCB5	ABC19	Drug transport	5-Fluorouracil, doxorubicin
ABCB11	SPGP	Bile salt and drug transport	Paclitaxel
ABCC1	MRP1	Drug transport	Multiple, including <i>Vinca</i> alkaloids, anthracyclines, etoposide, imatinib, irinotecan, methotrexate, mitoxantrone
ABCC2	MRP2	Organic anion efflux, drug transport	Multiple, including <i>Vinca</i> alkaloids, anthracyclines, etoposide, taxanes, irinotecan, cisplatin, methotrexate, mitoxantrone
ABCC3	MRP3	Drug transport	Etoposide
ABCC4	MRP4	Nucleoside and drug transport	Irinotecan, thiopurines, methotrexate
ABCC5	MRP5	Nucleoside and drug transport	Thiopurines, cisplatin, methotrexate
ABCC6	MRP6	Drug transport	Anthracyclines, etoposide, cisplatin, gemcitabine.
ABCC10	MRP7	Drug transport	<i>Vinca</i> alkaloids, taxanes
ABCC11	MRP8	Drug transport	5-Fluorouracil
ABCC12	MRP9	Drug transport	None identified
ABCG2	ABCP BCRP1	Toxin efflux, drug transport	Multiple, including anthracyclines, etoposide, imatinib, flavopiridol, irinotecan, methotrexate, mitoxantrone
LRP	LRP	Major vault transporter protein	AML induction chemotherapy

1.2.7.2.2 Prévalence des transporteurs ABC et leur implication dans la chimiorésistance leucémique

Une augmentation des niveaux des transporteurs ABCB1 (P-gp, MDR-1), ABCC1 (MRP-1) et ABCG2 (BCRP) est souvent constatée sur les blastes de patients atteints de leucémies ALL, AML^{225,272}. Cette augmentation est encore plus accentuée au cours des périodes post-chimio-thérapeutiques²⁷³. Plusieurs données cliniques démontrent l'existence d'une forte corrélation entre les niveaux d'expression élevés de ces transporteurs et la faible réponse des patients à la chimiothérapie, l'incidence de rechutes et le mauvais pronostic vital des patients.

Les niveaux d'expression élevés du transporteur ABCB1, seul ou en combinaison avec ABCC1 ou ABCG2, corrént avec les rechutes des patients AML surtout d'âge adulte²⁷⁴. Par contre, ABCC1 semble être plus associé aux rechutes des patients B-ALL et T-ALL que celles des patients AML^{242,265,275,276}. Plusieurs inhibiteurs des transporteurs ABC ont démontré au préalable une efficacité significative lors de test préclinique^{277,278}. Cependant, ils ont montré une faible efficacité thérapeutique lors des essais cliniques^{278,279}, ce qui peut être lié à la redondance fonctionnelle entre les transporteurs ABC ou à l'implication d'autres voies de résistance à l'apoptose telles que celles assurées par les protéines Bcl-2 et IAPs anti-apoptotiques^{77,275,280-282}.

1.2.7.2.3 Régulation de l'expression et de l'activité des transporteurs ABC

L'expression des pompes ABC est régulée par différentes voies dont les voies PI3K/AKT, MAPK/ERK et P53. La voie PI3K/AKT induit la transcription des récepteurs d'efflux ABCB1, ABCC1, ABCG2²⁸³. L'activation de la voie PI3K/AKT corréle avec les niveaux d'expression du transporteur ABCC1 chez les patients AML²⁸⁴. Dans ce contexte, l'induction du transporteur ABCC1 est due à l'inhibition de l'activité du facteur de transcription P53 par la voie PI3K/AKT. En effet, P53 contribue à la répression du promoteur du transporteur ABCC1²⁸⁵. En corrélation, les mutations in-activatrices de P53 dans les tumeurs solides favorisent l'augmentation de l'expression du transporteur ABCC1²⁸⁶

La régulation de l'expression du transporteur ABCB1 dans les lymphoblastes malins et dans les cellules des lignées SW620-14, MCF-7/MDR et MDA-MB-231/MDR, est assurée

par la voie MAPK/ERK²⁸⁷. Cette augmentation est renversée en présence de l'inhibiteur U0126 de la kinase Mek-1, en amont de la kinase ERK. De plus, une étude sur les biopsies de 15 patients atteints de carcinome hépatocellulaire a montré une corrélation entre le niveau d'activation de la voie MAPK/ERK et l'expression du transporteur ABCC1^{288,289}. L'utilisation, dans ce contexte, des inhibiteurs des kinases Raf-1 ou Mek-1 renverse l'expression du transporteur ABCC1 par ces cellules. L'activation des promoteurs des transporteurs ABCB1 et ABCC1 est dépendante de l'action des facteurs de transcription AP1, NF-κB, SP1 et Notch-1^{285,290-293} dont l'activation peut être induite par la voie MAPK/ERK²⁹⁴⁻²⁹⁸.

Les transporteurs ABC sont caractérisés par plusieurs sites de phosphorylation dont l'altération par l'introduction de mutations altère la capacité de ces pompes à exclure les drogues²⁹⁹. Cependant, le rôle des modifications post-traductionnelles, telle la phosphorylation dans la régulation du fonctionnement des protéines ABC est peu étudié. Dans ce contexte, il a été démontré que les voies ERK, Pim-1, PKC, CK2 et PKA sont impliquées dans le maintien de la stabilité membranaire et de la fonction d'efflux du transporteur ABCB1²⁹⁹⁻³⁰¹. De plus, la Caséine kinase 2 (CK2) interagit directement avec le transporteur ABCC1 et induit sa phosphorylation au niveau du site Thréonine-249 dans les cellules cancéreuses des lignées MCF7, A549 et Hela³⁰². La mutation du site Thréonine 249 abroge l'activité du transporteur ABCC1 et augmente la sensibilité des cellules à la doxorubicine. Le transporteur ABCG2 peut être phosphorylé par la kinase Pim-1, ce qui induit sa multi-mérisation au niveau membranaire et stimule son activité d'efflux dans les cellules du cancer de la prostate³⁰³.

La stabilité et l'activité des pompes ABC sont également garanties par la liaison de leurs domaines intra-cytoplasmiques au cytosquelette d'actine³⁰⁴⁻³⁰⁶. Certains récepteurs transmembranaires contribuent à la stabilisation des transporteurs ABC tels que les récepteurs CD44 et CCR-9, récepteurs de l'acide hyaluronique et de la chimiokine CCL-25, respectivement^{307,308}. En effet, la polymérisation du cytosquelette d'actine induite par l'engagement du CD44 et du CCR-9 favorise la stabilité membranaire et donc fonctionnelle du transporteur ABCB1. Les protéines ERM (Ezrin-Radixin-Moesin) à l'état actif favorisent les interactions entre le transporteur ABCB1 et l'actine polymérisée dans les

cellules leucémiques MOLT-4³⁰⁸. L'inhibition de l'expression des protéines ERM altère l'organisation du cytosquelette d'actine et la stabilité membranaire du transporteur ABCB1, causant ainsi l'accumulation de la doxorubicine dans les cellules MOLT-4.

1.2.8 La chimiorésistance induite par l'adhésion cellulaire

La résistance à la thérapie anticancéreuse est subdivisée en deux grandes catégories: la résistance acquise et la résistance *de novo*⁹¹. La résistance acquise se développe au fil du temps en raison des changements génétiques et épigénétiques séquentiels qui aboutissent à la fin à des phénotypes intrinsèquement résistants à l'apoptose induite par les drogues et qui sont responsables des rechutes des patients.^{78,309,310} La résistance acquise représente un stade tardif du développement de la chimiorésistance des cancers. À l'inverse, la résistance *de novo* est une forme de résistance précoce et rapide caractérisant les cellules cancéreuses avant leur exposition aux drogues. Cette forme de résistance peut être induite par le microenvironnement tumoral, par laquelle les cellules tumorales sont transitoirement protégées contre l'apoptose induite par la chimio et radiothérapie (**Figure 11**)³¹¹. Le maintien de la survie des cellules cancéreuses durant la phase thérapeutique est à l'origine de la maladie résiduelle minimale.

Jusqu'à présent, la moelle osseuse est considérée comme le site majeur favorisant la chimio-protection des blastes résiduels et est considérée comme le site majeur de détection de la maladie résiduelle minimale chez les patients leucémiques^{8,37,78}.

La résistance induite par le microenvironnement est subdivisée en la résistance induite par les facteurs solubles tels que les cytokines, les chimiokines et les facteurs de croissance et la résistance induite par l'adhésion cellulaire (ou cell adhesion mediated drug resistance; CAM-DR) qui est dépendante de l'adhésion des cellules tumorales aux cellules stromales ou aux protéines de la MEC (**Figure 11**)^{91,312}. Comparativement à la résistance acquise qui implique des événements génétiques d'amplifications, de délétions ou de mutations, la CAM-DR est plus dépendante de modifications épigénétiques, de l'activation des voies de survie et de la régulation des niveaux d'expression, de stabilité ou de localisation subcellulaire des protéines de survie^{78,91}. À ce jour, les deux mécanismes majeurs

expliquant la CAM-DR sont l'inhibition de l'apoptose et la régulation du cycle cellulaire^{91,313}.

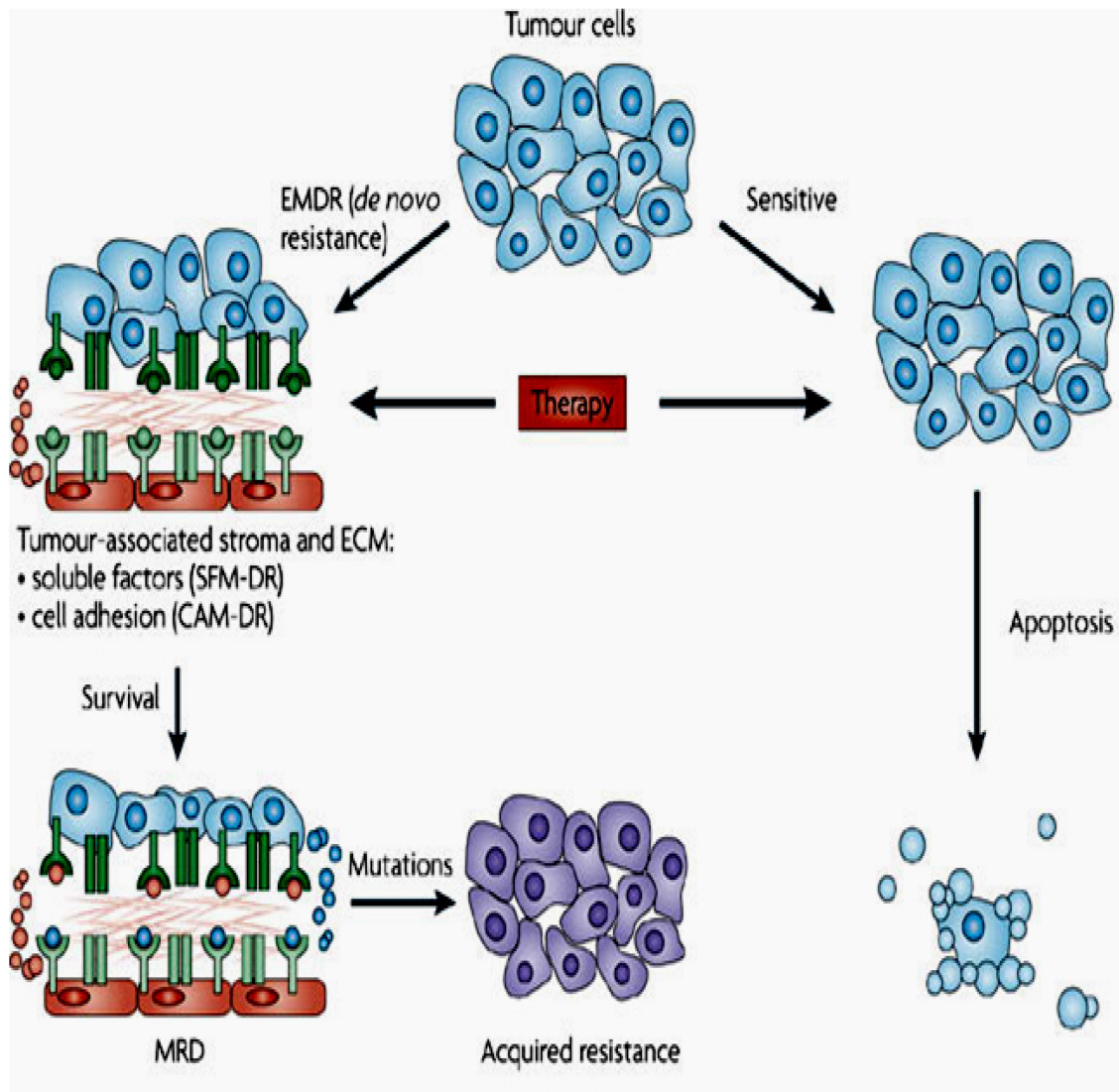


Figure 11 : Implication du microenvironnement tumoral dans l'induction de la résistance des cancers à la thérapie (Meads *et al.* 2009)⁹¹. MRD: Minimal residual disease.

En outre, la résistance induite par le microenvironnement favoriserait le développement de la résistance acquise. En effet, les cellules qui survivent durant la phase thérapeutique vont se développer et acquérir de nouvelles altérations génétiques menant à l'apparition de nouveaux clones plus réfractaires à la thérapie (**Figure 11**)⁹¹. Dans ce contexte, certains travaux ont démontré l'implication additionnelle de la moelle osseuse dans l'induction de l'évolution génétique et le développement de la résistance acquise des leucémies T-ALL. En comparant le profil génétique des lymphoblastes T primaires dérivant de 18 cas de T-ALL au stade de diagnostic et après leur transplantation *in vivo* dans des souris immuno-déficientes SCID, Clappier et *al* ont trouvé que le microenvironnement médullaire murin favorise l'acquisition de lésions génétiques par les blastes T-ALL résiduels et l'apparition de nouveaux clones leucémiques³¹⁴. Ces lésions génétiques étaient similaires à celles retrouvées chez les patients respectifs au stade de rechute et elles confèreraient aux cellules sélectionnées des propriétés plus accentuées de colonisation médullaire, de croissance et de résistance aux drogues. De plus, le groupe de Dalton a montré, dans l'un de ses travaux, que le nombre de lésions génétiques acquises par les cellules leucémiques U937 cultivées à long terme en présence de mitoxantrone et de fibronectine est supérieur à celui des cellules cultivées en suspension en présence uniquement de mitoxantrone, ce qui suggère l'implication des protéines de la MEC dans l'induction de la résistance acquise des cellules leucémiques résiduelles³¹⁵.

Par ailleurs, le stroma médullaire est riche en éléments de la MEC⁹. Les travaux pionniers du groupe Dalton ont révélé aussi que l'adhésion des cellules du myélome multiple à la fibronectine du stroma médullaire favorise leur résistance contre l'apoptose induite par le melphalan³¹⁶. Des résultats similaires ont été reproduits avec les autres types de leucémies (B-ALL, AML, CML et CLL)^{317,318}. Ensemble, ces travaux ont démontré clairement le rôle crucial que peut occuper la MEC dans l'induction de la chimiorésistance des hémopathies malignes. Les intégrines sont les récepteurs principaux assurant l'adhésion des cellules aux éléments de la MEC et peuvent réguler différents processus physiologiques et malins dont la survie cellulaire¹¹. Nous traiterons dans la section suivante, de la biologie des intégrines et de ce qui a été établi jusqu'à présent de leur rôle dans la progression et la chimiorésistance des cancers en général et des hémopathies malignes en particulier.

1.3 Les intégrines

1.3.1 Structure et classification des intégrines

Les cellules peuvent communiquer avec leur microenvironnement *via* les molécules d'adhésion cellulaire qui sont réparties en 4 grandes familles; les cadhérines, les intégrines, les sélectines et les membres de la superfamille des immunoglobulines³¹⁹. L'ensemble de ces récepteurs sont impliqués dans l'établissement des interactions directes cellule-cellule. Cependant, les intégrines constituent la seule famille de récepteurs permettant aux cellules d'adhérer aux éléments de la MEC.

Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires hétéro-dimériques constitués d'une chaîne α et d'une chaîne β ^{320,321} (**Figure 12**). Jusqu'à maintenant, 18 sous-unités α et 8 sous-unités β sont connues dont l'appariement non covalent $\alpha\beta$ forment 24 récepteurs exprimés par les cellules de mammifères. Chaque chaîne α ou β contient trois domaines; extracellulaire, transmembranaire et intracellulaire (**Figure 12**). La région extracellulaire est la plus longue permettant à la cellule d'interagir avec son ligand. Le domaine transmembranaire est court et contient des séquences impliquées dans la régulation de la conformation et de l'affinité du récepteur. Le domaine intracellulaire est constitué d'uniquement 20 à 70 acides aminés et est dénué d'activité enzymatique.

Les intégrines présentent une spécificité plus ou moins restreinte vis-à-vis de leurs ligands (**Tableau 3**)^{322,323}. Cette spécificité est déterminée par l'interaction des deux domaines extracellulaires des chaînes α et β qui ensemble forment une fente pour la liaison de leur ligand. Les 9 chaînes α ($\alpha1$, $\alpha2$, $\alpha10$, $\alpha11$, αE , αL , αM , αX et αD) contiennent, au niveau de

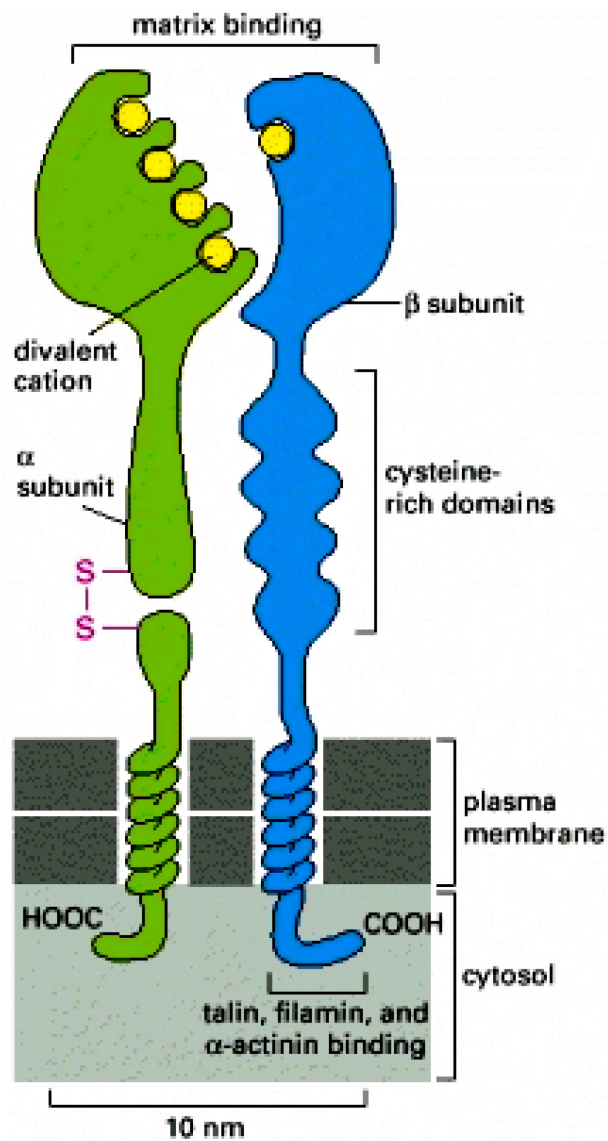


Figure 12 : Structure hétérodimérique des intégrines
 (Alberts *et al.* 2002, Molecular Biology of the Cell. Book 4th edition)

leur région extracellulaire, un domaine I (pour inserted domain) ou le domaine I α (**Figure 12**)^{324,325,326}. Ce dernier permet la reconnaissance directe des ligands par la seule sous unité α de ces intégrines, indépendamment de la chaîne β . Le domaine I α est caractérisé par un site particulier, dit le site MIDAS (Metal-Ion Dependent Adhesion Site), qui peut recruter les ions métalliques Mg²⁺ et Mn²⁺ et induire, par le biais de changement conformationnel, une augmentation de l'affinité des intégrines à leurs substrats. Parallèlement aux chaînes α , les chaînes β possèdent un domaine nommé « I like domain » ou le domaine I β qui contient le site ADMIDAS (ADJacent Metal-Ion Dependent Adhesion Site) qui est similaire au site MIDAS mais contenant en plus, deux sites supplémentaires pour la liaison du Ca²⁺ (**Figure 12**). Le domaine I β peut potentialiser la fonction de reconnaissance des chaînes α ayant le domaine I α ³²⁷, mais il est surtout requis pour la reconnaissance des ligands par les intégrines à chaînes α dépourvues du domaine I α (exemple des intégrines à chaîne $\alpha 4$, $\alpha 5$ ou αV)³²⁸.

La majorité des récepteurs intégrines peuvent interagir avec plusieurs matrices (**Tableau 3**)^{322,323}. Cependant, ils présentent une affinité particulière pour certains ligands. Selon leur ligand principal, les intégrines sont classées en 4 groupes; les récepteurs liant les séquences GFOGER sur le collagène ($\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 10\beta 1$, $\alpha 11\beta 1$), les récepteurs aux séquences RGD de la fibronectine et la vitronectine ($\alpha 5\beta 1$, $\alpha V\beta 1$, $\alpha V\beta 3$, $\alpha V\beta 5$), les récepteurs à la laminine ($\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$) et les récepteurs à chaîne $\beta 2$ exprimés spécifiquement par les leucocytes ($\alpha L\beta 2$, $\alpha M\beta 2$, $\alpha X\beta 2$) (**Figure 13**)^{323,325}. L'intégrine $\alpha 2\beta 1$ a comme ligand principal le collagène de type I alors que l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ lie principalement le collagène de type IV retrouvé au niveau de la membrane basale de l'endothélium vasculaire.

L'intégrine $\alpha 4\beta 1$ permet l'adhésion des cellules à la fibronectine à travers son interaction avec le domaine CS1 de cette matrice. L'intégrine $\alpha 4\beta 1$ est aussi impliquée dans les interactions intercellulaires par sa liaison au VCAM-1, récepteur de la famille des immunoglobulines³²⁹.

Tableau 3: Les intégrines les plus communes et leurs ligands (Stupack *et al.* 2002³²²)

Integrin	Synonyms	ECM ligands	Notes
$\alpha 1\beta 1$	CD49a VLA 1	Collagens	Binds to fibrillar collagen domains
		Laminins	
$\alpha 2\beta 1$	CD49b	Collagens	Binds to fibrillar collagen domains
	VLA-2	Laminins	Binding dependent on increased activation state
$\alpha 3\beta 1$	CD49c	Collagens	Binding to NC1 domains, possibly fibrillar forms
	VLA-3	Laminins	Binds to the Laminin 'Toe', GD6 peptide
		Thrombospondin	Binds to TSP-678 peptide
$\alpha 4\beta 1$	CD49d	Fibronectin	
	VLA-4	VCAM-1	Binding to CS1 domain of fibronectin.
$\alpha 5\beta 1$	CD49e	Fibronectin	Binds to RGD site in the cell-binding domain
	VLA-5	Fibrin	Binds to cryptic sites in polymerized fibrin
$\alpha 6\beta 1$	CD49f	Laminins	May bind several sites in laminin
	VLA-6		
$\alpha 6\beta 4$		Laminins	May bind several sites in laminin
$\alpha v\beta 3$		Vitronectin	Binds to RGD sequence near PEX
		Fibronectin	Binds to the RGD site in tenth FN-III (CBD)
		Laminin	Binds in an activation-dependent manner
		Thrombospondin	Cryptic RGD site
		Tenascin	Binds RGD in a FN-III domain
		Osteopontin	RGD near a thrombin cleavage site
		Bone Sialoprotein	RGD-dependent and independent binding
		Nonfibrillar collagen	RGD-independent binding to NC1 domains
		Denatured collagen	RGD-dependent binding to a cryptic epitope
		MMP2	RGD-independent binding to PEX domain
		bFGF	Binds to a DGR motif
		von Willebrand's Factor	RGD-dependent binding
thrombin	RGD-dependent binding		
$\alpha v\beta 5$		Vitronectin	Binds to RGD and KKQRFRRHRNRKG

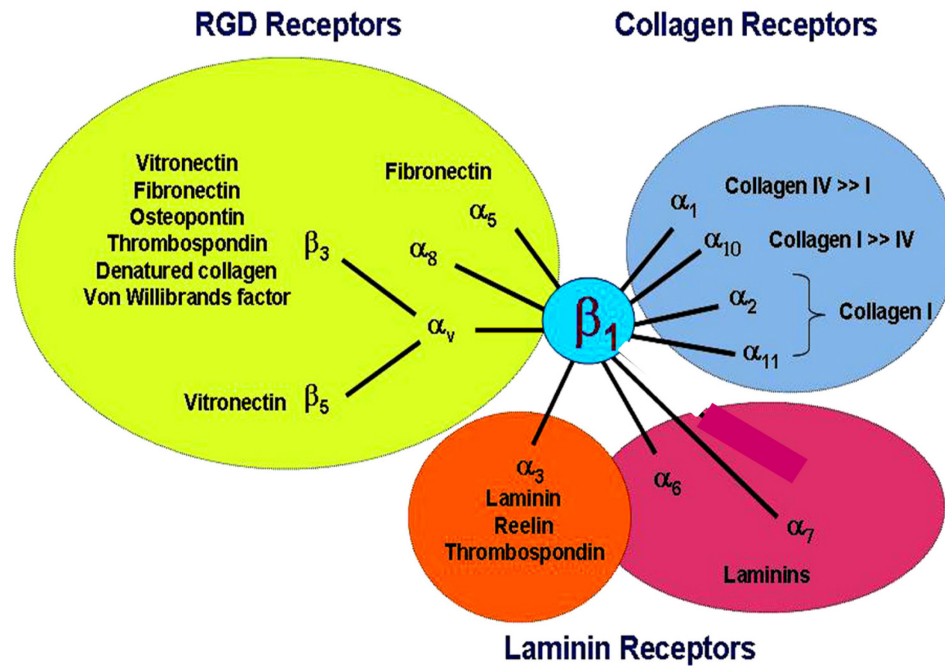


Figure 13 : Classification des intégrines (Lal *et al.* 2009)³²³.

1.3.2 Mécanismes d'activation des intégrines

Le fonctionnement physiologique des systèmes biologiques nécessite une régulation étroite des niveaux d'activité des intégrines³²¹. Des études réalisées sur les plaquettes et les lymphocytes T ont montré qu'à l'état basal, les intégrines $\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 3$ adoptent une faible affinité pour leur ligand à cause de l'association des deux chaînes α et β au niveau transmembranaire et l'adoption d'une configuration dite fermée ou coudée. Sous cette position, le domaine extracellulaire de l'intégrine est dirigé vers la membrane cytoplasmique, empêchant son interaction avec son ligand^{330,331}. Pour que les intégrines puissent lier leurs ligands avec une forte affinité, elles doivent être activées^{321,332}. Le processus d'activation des intégrines est induit par des signaux intracellulaires générés par

des oncogènes tels que BCR-ABL³³³, des chimiokines comme le SDF-1 α ³³⁴⁻³³⁷ et des facteurs de croissance³³⁸ ou encore en réponse à la stimulation des récepteurs aux antigènes TCR et BCR exprimés par les lymphocytes T et B^{339,340} (**Figure 14**).

L'augmentation de l'affinité des intégrines est liée aux changements conformationnels qui affectent le récepteur suite à la liaison de la molécule taline, des kindlines et de la GTPase Rap1 aux domaines intra-cytoplasmiques de la chaîne β pour la taline et les kindlines et de la chaîne α pour Rap1^{339,341-343}. On parle dans ce cas de la signalisation de l'intérieur vers l'extérieur ou « Inside-out » des intégrines. Tel que démontré par les études *in vitro* et *in vivo*, l'inhibition de l'expression ou de l'activité de la taline, des kindlines ou de Rap1 diminue considérablement l'adhésion des plaquettes, des lymphocytes T et des cellules CHO à leurs ligands *via* les intégrines $\beta 1$, $\beta 2$ ou $\beta 3$ ³⁴⁴⁻³⁴⁶. En effet, la molécule taline et les kindlines se lient aux deux séquences NPxY et aux motifs riches en serine/thréonine du domaine intra-cytoplasmique de la chaîne $\beta 1$, alors que les complexes Rap1-RapL ou Rap1-Tiam interagissent avec des motifs lysine de la chaîne α ^{347,348}. L'activation préalable de la taline et de Rap-1 est nécessaire à leurs interactions activatrices avec les chaînes α et β . Les mécanismes régulant l'activation de la taline ne sont pas tous encore déterminés mais impliquent en partie son clivage par la calpaïne et son association au phosphatidylinositol-4,5- bi-phosphate (PIP2)^{349,350}. La stimulation de la GTPase Rap1 peut être induite par différentes voies telles que PLC γ , PKC, Fyn, CrkL et R-Ras activées par les récepteurs tyrosine kinases, les récepteurs aux chimiokines couplés à la protéine G ou les oncogènes^{351,352}. L'activation de Rap1 est aussi dépendante des facteurs échangeurs de nucléotides CALDAG-GEFs et C3G^{351,353}.

Le recrutement de la taline, des kindlines et de Rap-1 au niveau des domaines intra-cytoplasmiques des chaînes α et β , induit la séparation des deux sous unités, le redressement de l'intégrine et ainsi l'augmentation de son accessibilité et de son affinité pour son ligand^{321,354}. Ces molécules sont également importantes pour l'augmentation de l'avidité des intégrines et leur regroupement au niveau de la membrane plasmique pour former le complexe d'adhésion focale³⁵⁵. D'autres protéines liant le cytosquelette comme l' α -actinine, la vinculine et la paxilline viennent se lier aux domaines intra-cytoplasmiques des intégrines et permettent l'interaction de l'intégrine avec le cytosquelette d'actine, ce qui

renforce l'adhésion cellulaire^{342,356}. Les forces de pressions extérieures de type mécanique ou fluïdique appliquées sur les intégrines peuvent également renforcer l'affinité et l'avidité des intégrines^{357,358}.

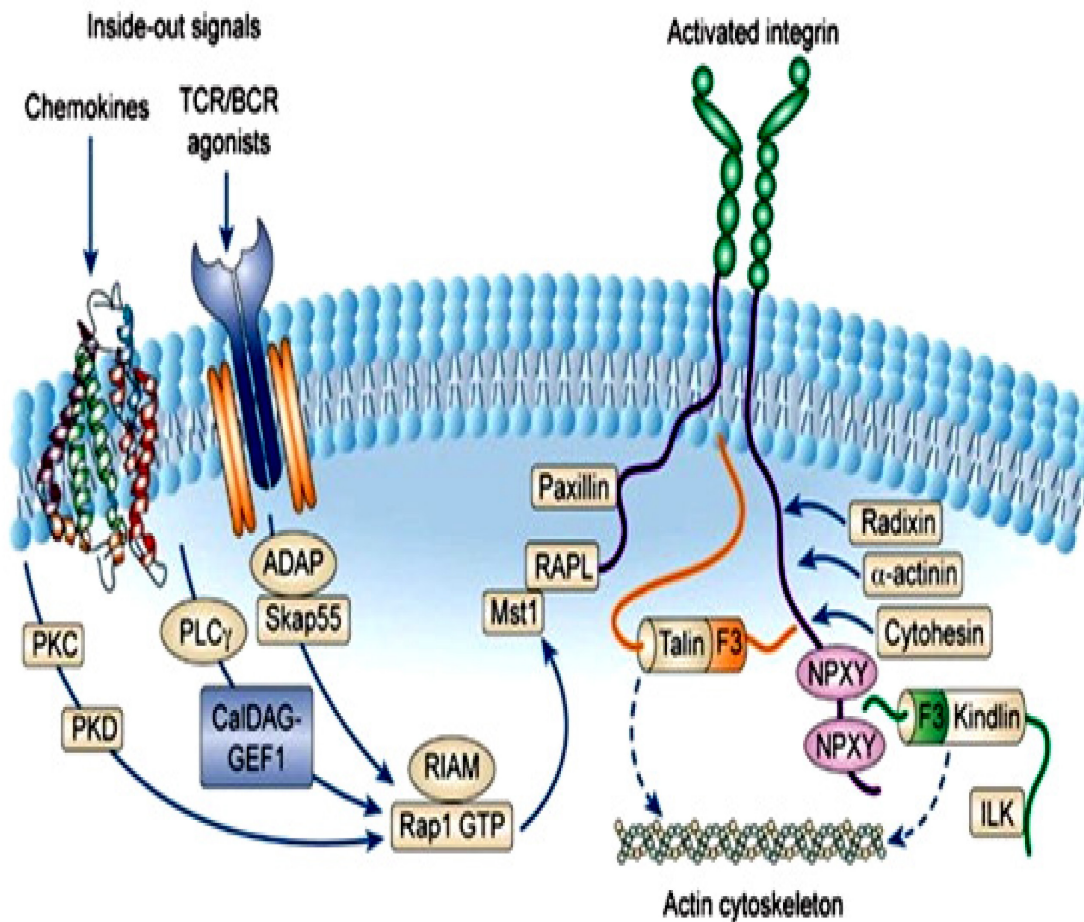


Figure 14 : Les mécanismes d'activation des intégrines (Kinashi, 2005)³³⁹.

1.3.3 La signalisation par les intégrines

La liaison de l'intégrine à son ligand induit à son tour une signalisation intracellulaire connue sous le nom de la signalisation de l'extérieur vers l'intérieur ou « Outside-In »³⁵⁹. Malgré que les domaines intra-cytoplasmiques des intégrines soient courts et dépourvus d'activité catalytique, ces récepteurs peuvent s'associer à plusieurs molécules adaptatrices permettant leur connexion au cytosquelette d'actine et leur interaction avec les différentes protéines intracellulaires de signalisation. Ces rassemblements moléculaires ou complexes d'adhésion focaux, sont surtout observés au niveau de radeaux lipidiques, riches en cholestérol et en sphingolipides³⁶⁰. Ces structures lipidiques sont importantes pour maintenir la stabilité de ces complexes et la transduction subséquente de la signalisation activée par les intégrines. Les radeaux lipidiques favorisent aussi l'interaction des intégrines avec d'autres récepteurs transmembranaires tels que les récepteurs liant les facteurs de croissance et les canaux ioniques^{361,362}. La formation des complexes d'adhésions focaux permet aux intégrines de contrôler les réarrangements du cytosquelette d'actine, la signalisation intracellulaire et l'expression génique³⁶³⁻³⁶⁵. De cette façon, les intégrines peuvent réguler les différents processus cellulaires de métabolisme, de survie, de prolifération, de migration et de différenciation (**Figure 15**).

La réponse des cellules à l'engagement des intégrines est variable d'une cellule à une autre et en fonction du ligand activateur et du contexte cellulaire³⁶⁶. La structure des intégrines est également importante pour la détermination des fonctions cellulaires étant donné l'implication concomitante des deux chaînes α et β dans la formation des complexes d'adhésion focaux et la signalisation cellulaire^{367,368}.

La voie FAK/Src est activée par la plupart des intégrines et joue un rôle central dans la formation du complexe d'adhésion focal et dans la transduction de la signalisation induite par les intégrines³⁶⁹. La kinase FAK est la première des tyrosine kinases identifiées dans la cascade des protéines tyrosine phosphorylées par les intégrines^{370,371}. Le recrutement de FAK au niveau de la chaîne $\beta 1$, induit sa dimérisation et son autophosphorylation au niveau du site Y397, ce qui permet le recrutement et l'activation de la tyrosine kinase Src *via* son domaine SH2³⁷². Src phosphoryle à son tour la FAK sur des sites additionnels assurant l'activation complète de la kinase FAK. La structure multi-domaine de FAK et sa co-

localisation avec Src permettent le recrutement de différentes molécules de signalisation comme la PI3K, la PLC γ , la paxilline, la tensine et la p130Cas. Ces protéines sont importantes pour l'activation subséquente des voies MAPKs, AKT et NF κ B³⁷³⁻³⁷⁵.

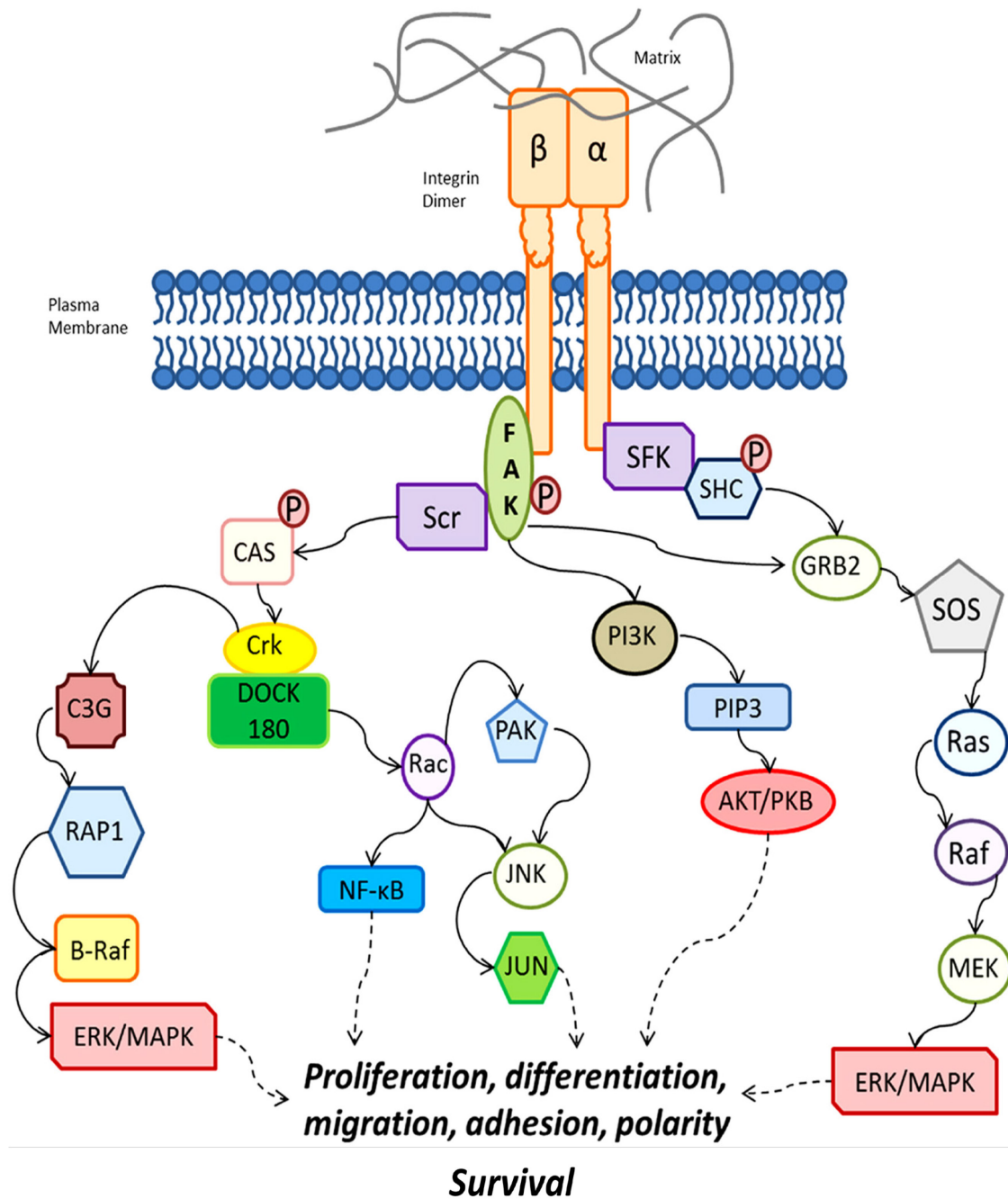


Figure 15 : Voies de signalisation et fonctions des intégrines (Shishido et al. 2014)³¹⁷.

Le recrutement des protéines paxilline, vinculine et α -actinine par la voie FAK/Src renforce la connexion des intégrines au cytosquelette d'actine et la régulation de sa polymérisation par l'action des petites protéines Rho GTPases Rac1, Cdc42 et RhoA^{376,377,371,378}. Les voies RhoGTPases induites par les intégrines ne sont pas uniquement impliquées dans la régulation de la migration cellulaire³⁷⁹ mais jouent également un rôle dans la régulation de la prolifération et de la survie cellulaire à travers la stimulation des voies MAPKs et PI3K **(Figure 15)**³⁸⁰⁻³⁸².

La phosphorylation de FAK par Src au site Tyr925 permet la liaison de la protéine adaptatrice Grb2 qui recrute à son tour, son partenaire Sos³⁸³. Sos est une protéine d'échange de guanine (GEF) qui recrute et active la GTPase Ras au niveau membranaire^{384,385}. Ras déclenche la cascade de phosphorylation des kinases Raf, MEK et ERK qui représentent les kinases de la voie MAPK/ERK classique. Cependant, la voie MAPK/ERK peut être activée par certaines intégrines ($\alpha1\beta1$, $\alpha5\beta1$, $\alpha v\beta3$) indépendamment de la kinase FAK^{386,387}. Ce mode d'activation est dépendant des protéines; la cavéoline-1, la tyrosine kinase Fyn et la protéine adaptatrice Shc³⁸⁸. L'activation de Shc par Fyn induit le recrutement ultérieur du complexe GRB2/Sos et le déclenchement de la cascade Ras/Raf/MEK/ERK. Selon certains travaux, la voie Shc/Ras/ERK serait plus impliquée dans la régulation de la prolifération que dans l'induction de la survie cellulaire³⁸⁹. Par ailleurs, certaines études rapportent la possibilité de l'activation des kinases ERK indépendamment de Ras. Dans un modèle murin d'ostéoblastes et de mélanome humain métastatique, l'induction de la voie ERK par l'intégrine $\alpha v\beta3$ est abrogée par les inhibiteurs des kinases Src et PKC α mais pas par ceux de Ras, Raf ou MEK³⁹⁰.

En outre, l'activation de FAK induit le recrutement au niveau membranaire de la sous unité régulatrice p85 de la PI3K *via* ses domaines SH2^{391,392}. La phosphorylation de p85 par FAK permet sa liaison avec la sous unité p100 catalytique, formant ainsi la PI3K active. Cette dernière agit au niveau membranaire en augmentant les concentrations locales du phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3) suite à la phosphorylation du dérivé lipidique PIP2^{393,394}. Le PIP3 permet à son tour le recrutement au niveau membranaire, de différentes molécules de signalisation à domaine PH (pleckstrin domain) dont la sérine thréonine kinase AKT (appelée aussi la protéine kinase B ou PKB)³⁹³. Cette dernière

représente le substrat majeur de la PI3K. AKT est phosphorylée au niveau des deux sites ; thréonine-308 par la kinase PDK1 (phosphoinositide-3 dépendant kinase -1) et le site sérine-473 par les kinases PDK-1 ou le complexe RIPTOR-mTOR (TORC2)^{395,396}. La phosphorylation du site sérine 473 est importante pour l'activation complète de l'AKT et pour l'induction de son effet anti-apoptotique³⁹⁵. Dans certains contextes, l'activation de la voie PI3K/AKT par les intégrines est indépendante du complexe FAK/Src et passe plutôt par la voie ILK^{317,397,398}.

1.3.4 Rôles des intégrines dans la régulation de la survie cellulaire

Les cellules de l'organisme sont soumises, au cours de leur développement, à différents stimuli physiologiques et pathologiques. Les intégrines sont des récepteurs sensoriels majeurs impliqués dans l'adaptation du comportement cellulaire en fonction du contexte environnemental^{399,400}.

Les intégrines jouent un rôle crucial dans la préservation de l'architecture et de l'homéostasie tissulaire via la régulation de la survie et de la prolifération des cellules stromales. Le bon emplacement tissulaire des cellules épithéliales, fibroblastiques et endothéliales est majoritairement déterminé par leur attachement approprié aux éléments de la MEC. Dans ce contexte, l'engagement des intégrines n'assure pas uniquement une fonction d'adhésion mais également de transmission de signaux de survie *via* l'activation des voies anti-apoptotiques MAPK/ERK et PI3K/AKT⁴⁰¹. Le détachement des cellules adhérentes ou l'altération de la constitution de leur matrice physiologique active la mort des cellules *via* le processus apoptotique nommé anoïkose. En effet, le désengagement des intégrines conduit à l'inhibition des voies de survie MAPK/ERK et PI3K/AKT et à l'activation des voies d'apoptose extrinsèque et intrinsèque. Il est bien établi que la culture des cellules épithéliales et endothéliales en suspension active la voie des récepteurs de mort, dont Fas, qui induit à son tour l'activation de l'apoptose mitochondriale⁴⁰². Ainsi, le détachement des cellules épithéliales induit la translocation de Bax vers la mitochondrie alors que le détachement des cellules endothéliales active le facteur de transcription P53 et augmente le ratio Bax/Bcl-2⁴⁰³. Également, le détachement des cellules endothéliales est associé à une diminution de c-Flip, l'inhibiteur de la caspase-8⁴⁰².

En plus de leur rôle dans l'anoïkose, les intégrines peuvent protéger les cellules contre d'autres types de stress tels que les radiations UV, les agents chimiques, l'absence ou le déficit en nutriments, en facteurs de croissance ou en oxygène³²². Les intégrines peuvent agir à différents niveaux afin d'inhiber l'apoptose mitochondriale induite sous ses conditions. En effet, l'activation des intégrines $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha v\beta 3$ par la fibronectine protège les cellules CHO contre la privation de sérum *via* l'induction de la transcription de Bcl-2 suite à l'inhibition du facteur de transcription FKHR par la voie FAK/AKT et l'activation des facteurs de transcription NF- κ B et CREB par la kinase Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase type IV (CaMK IV)⁴⁰⁴. En absence de sérum, l'action anti-apoptotique des intégrines peut être également dépendante de l'activation des récepteurs tyrosine kinase en absence de leur ligand tel que démontré dans le contexte du récepteur EGFR⁴⁰⁵. L'engagement de l'intégrine $\alpha 7\beta 1$ prévient la mort ischémique des cardiomyocytes en diminuant l'accumulation intra-mitochondriale du Ca^{2+} ⁴⁰⁶. Cet effet peut être lié à l'inhibition de l'activité des canaux calciques IP3-R situés sur le réticulum endoplasmique (RE) par les protéines de survie de la famille Bcl-2.

Les intégrines sont aussi abondamment exprimées par les cellules immunitaires et contribuent à leur ancrage au niveau des tissus périphériques au cours des réactions inflammatoires⁴⁰⁷. En plus de leur rôle pro-inflammatoire, ces récepteurs sont impliqués dans la protection des cellules immunitaires contre l'apoptose induite par l'épuisement en facteurs de croissance ou par les récepteurs de mort. Ainsi, l'engagement de l'intégrine $\alpha 9\beta 1$ ou des intégrines à chaîne $\beta 3$ ou $\beta 5$ liant la vitronectine, inhibe l'apoptose spontanée et induite par TRAIL des neutrophiles *via* l'augmentation des niveaux des protéines anti-apoptotiques Mcl-1 et Bcl-xL par l'intermédiaire des voies PI3K/AKT et MAPK/ERK⁴⁰⁸. En outre, la réactivation du récepteur à l'antigène TCR (T-Cell Receptor) des lymphocytes T induit leur apoptose par l'activation de la voie extrinsèque assurée par le système Fas/FasL^{409,410}. Cette forme d'apoptose dite aussi Activation Induced Cell Death ou AICD est inhibée lorsque les lymphocytes T effecteurs sont adhérents au collagène de type I *via* l'intégrine $\alpha 2\beta 1$. Dans ce contexte, l'effet anti-apoptotique de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ est dû à l'activation de la voie FAK/MAPK/ERK qui bloque l'expression de FasL et l'activation de la caspase-8 au sein du DISC. Contrairement au collagène, l'activation de l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ par son ligand VCAM-1 favorise la mort par AICD des lymphocytes T effecteurs⁴¹¹.

1.3.5 Rôle des intégrines dans la survie et la résistance des tumeurs solides à la thérapie

Les intégrines sont des médiateurs importants qui favorisent la progression des tumeurs solides¹¹. Les expressions aberrantes des récepteurs à chaînes $\beta 1$, $\beta 3$ et $\beta 5$ et des constituants de la MEC, dont le collagène et la fibronectine, sont souvent liées au processus malin^{358,412-414}. L'expression élevée des intégrines $\beta 1$ est associée au mauvais pronostic des patients atteints du cancer mammaire, gastrique ou du cancer pulmonaire dit « non small cell lung cancer »⁴¹⁵⁻⁴¹⁷. En plus de leur rôle dans la régulation de la croissance et l'induction des métastases tumorales, les intégrines sont importantes pour la survie et la résistance des tumeurs solides à la thérapie^{418,419}.

Les cellules tumorales sont généralement résistantes à l'anoïkose, ce qui leur permet de survivre en circulation et leur donne le temps de s'établir dans leurs nouveaux sites métastatiques⁴²⁰. Cependant, les intégrines demeurent des récepteurs importants pour la survie et la croissance de cellules malignes aussi bien dans leurs niches primaires que secondaires. L'analyse de biopsies de mélanomes démontre une co-localisation étroite des mélanocytes malins et du collagène au niveau cutané⁴²¹. L'activation de l'intégrine $\alpha\beta 3$ par le collagène préserve la survie des cellules du mélanome par l'inhibition de la translocation de P53 au noyau et l'augmentation des ratios Bcl-2/Bax⁴²².

De plus, les intégrines favorisent le maintien de la survie des cellules cancéreuses contre différents types de stress environnementaux tels que les déficits en facteurs de croissance. L'activation des intégrines liant la laminine et la fibronectine favorise la protection des cellules du cancer pulmonaire de la lignée A549 contre l'apoptose induite par la privation de sérum et ce à travers l'activation des voies MAPK/ERK et PI3K/AKT⁴²³. La voie AKT/mTOR activée par l'interaction laminine/intégrine $\alpha\beta 4$ maintient la survie des cellules du carcinome mammaire en absence de sérum par l'inhibition du facteur 4E-BP1 et l'activation de la machinerie traductionnelle⁴²⁴. Dans ce contexte, Mcl-1 est l'une des protéines majeures assurant la survie des tumeurs solides, dont la traduction peut être augmentée par la voie mTOR^{245,425}. Par ailleurs, la liaison des intégrines $\beta 3$ mais pas des intégrines $\beta 1$ à la fibronectine, préserve la survie des cellules du cancer pancréatique PaCa

en absence de sérum à travers la Trans-activation du récepteur IGF-1R et l'augmentation des niveaux de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL⁴²⁶.

Les intégrines favorisent également l'échappement des cellules malignes aux défenses immunitaires. En effet, l'adhésion des cellules PC3 du cancer de la prostate à la fibronectine *via* l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ induit leur protection contre l'apoptose activée par le TNF- α en activant la voie PI3K/AKT/survivine⁴²⁷. L'augmentation des niveaux de c-Flip suite à l'activation de l'intégrine $\alpha v\beta 3$ est également impliquée dans la protection des cellules du cancer ovarien contre l'apoptose induite par TRAIL⁴²⁸.

En outre, les intégrines sont des molécules importantes impliquées dans la chimio et la radiorésistance des cancers solides^{429,430}. Des travaux récents ont montré leur implication dans l'induction de la résistance des cancers épithéliaux contre les nouvelles thérapies ciblées telles que les inhibiteurs des récepteurs tyrosines kinases dont HER-2 (trastuzumab), les modulateurs des récepteurs aux œstrogènes (tamoxifène), IGFR (cixutumumab), EGFR (cetuximab), et VEGF (bevacizumab)^{415,431,432}.

L'adhésion des cellules des lignées MDA-MB-231 et MDA-MB-435 du cancer du sein aux éléments de la MEC (fibronectine, laminine, collagène), par les intégrines $\beta 1$, induisent leur résistance à l'apoptose mitochondriale causées par les inhibiteurs micro-tubulaires (paclitaxel et vincristine), en stimulant la voie PI3K/AKT et en augmentant les niveaux de Bcl-2⁴³³. Également, l'attachement des cellules du cancer pancréatique à la laminine et l'induction de la voie FAK diminue la sensibilité de ces cellules à la gemcitabine *via* l'augmentation des niveaux de la survivine et l'inactivation de Bad^{434,435}. L'effet anti-apoptotique induit par la voie FAK peut être amplifié, dans ce contexte, par l'activation de la voie ILK/AKT⁴³⁶. Les kinases activées par les intégrines, telles que FAK, Src, ERK et AKT, peuvent aussi promouvoir la survie cellulaire *via* la phosphorylation et l'activation des récepteurs tyrosine kinase. Ainsi, l'induction de la phosphorylation du récepteur EGFR par les intégrines $\beta 1$ favorise la résistance des cellules du cancer du sein et des cellules A549 du cancer pulmonaire contre le cisplatine et les inhibiteurs des kinases (trastuzumab, lapatinib et gefitinib)^{431,432,437}. L'adhésion des cellules du carcinome hépatocellulaire à la laminine-5 abroge l'effet anti-prolifératif et anti-invasif induit par l'inhibiteur du VEGF

(ZD6474)⁴³⁸. Dans ce contexte, l'effet oncogénique de la laminine-5 est dû à l'activation de la voie ERK et du récepteur EGFR.

En plus de leur effet anti-apoptotique direct, les intégrines peuvent entraver l'accumulation des drogues au niveau intracellulaire *via* l'induction de l'expression des transporteurs d'efflux ABC. Ainsi, l'engagement de l'intégrine $\alpha\beta3$ protège les cellules du carcinome rénal et du cancer de la prostate contre l'apoptose induite par la vinblastine et la daunorubicine en augmentant les niveaux de la pompe ABCB1 par la voie PI3K/AKT^{439,440}. Les intégrines peuvent également inhiber l'apoptose induite par les drogues en causant l'arrêt du cycle cellulaire. En outre, la stimulation de la voie KRas-RalB/ NF κ B par l'intégrine $\alpha\beta3$ induit la quiescence des cellules de cancer du sein, pulmonaire et pancréatique, ce qui les protège de l'apoptose induite par les inhibiteurs des tyrosine kinases Erlotinib et lapatinib⁴⁴¹. Certaines données récentes postulent que les modifications épigénétiques induites par les intégrines sont importantes pour la régulation de la résistance *de novo* des cancers. En effet, la chimiorésistance des cellules du cancer pancréatique induite par l'intégrine $\alpha2\beta1$ est dépendante de l'induction des histone acétyltransférases par la voie MAPK/ERK⁴⁴². Cependant, le mécanisme d'action de ces enzymes dans la régulation de la résistance tumorale reste à étudier.

Étant donné l'importance des intégrines à chaîne $\beta1$, $\beta3$ et $\beta5$ dans la progression et la résistance des cancers solides⁴⁴³, l'inhibition de ces récepteurs est l'une des perspectives thérapeutiques majeures. Plusieurs essais cliniques (de phase I à III) sont en cours afin de déterminer le potentiel thérapeutique du blocage des intégrines $\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$, $\alpha5\beta1$ et $\alpha2\beta1$ (**Tableau 4**)^{444,445}.

Tableau 4: Les essais cliniques visant l'inhibition des intégrines dans le traitement des tumeurs solides (Danen, 2013)⁴⁴³

Compound	Sponsor	Target	Cancer type	Stage
Vitaxin/ etaracizumab	MedImmune Inc., NCI	v3	Solid tumors, melanoma, colorectal cancer, small intestine cancer, lymphoma, prostate cancer, and renal cell cancer	Phase I, II
CTNO 95	Centocor Inc.	v integrins	Solid tumors, melanoma, and prostate cancer	Phase I, II
Cilengitide (cyclic RGD)	EMD Pharmaceuticals, Merck	v3, v5	Lung cancer, prostate cancer, melanoma, glioblastoma, leukemia, brain and CNS tumors, breast cancer, and squamous cell cancer	Phase I, II
Volociximab	Protein Design Labs	$\alpha 5\beta 1$	Solid tumors, melanoma, ovarian cancer, renal cancer, pancreatic cancer, and lung cancer	Phase I, II
ATN-161 PHSRN mimetic	Attenuon	$\alpha 5\beta 1$ and other fibronectin- binding integrins	Solid tumors, renal cell carcinoma, and brain and CNS tumors	Phase I
E7820 Sulfonamide derivative		$\alpha 2\beta 1$ integrin	Metastatic colon /rectal, renal non small lung, head and neck, bladder, ovary, pancreatic, prostate cancers, lymphoma	Phase I, II

Le Cilengitide (EMD 121974, Merck), analogue cyclique des séquences RGD inhibant particulièrement les intégrines à chaîne αV , a atteint la phase III d'essais cliniques pour le traitement du glioblastome, en combinaison avec la chimio ou la radiothérapie et il est en cours d'essais cliniques de phase II pour les autres types de tumeurs solides⁴⁴⁶. Le Volociximab est un anticorps monoclonal spécifique de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ (PDL BioPharma et Biogen Idec). Il a atteint récemment la phase II d'essais cliniques pour le traitement de différents types de tumeurs solides, en combinaison avec la chimiothérapie^{447,448}. L'E7820 est un dérivé sulfonamide aromatique qui interfère avec la synthèse de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$. Il a atteint la phase II d'essais cliniques pour le traitement des métastases médullaires en conjugaison avec la chimiothérapie et l'immunothérapie⁴⁴⁹⁻⁴⁵².

1.3.6 Rôle des intégrines dans la survie et la chimiorésistance des hémopathies malignes

1.3.6.1 Expression des intégrines par les cellules leucémiques

L'analyse par la cytométrie en flux des blastes malins prélevés à partir du sang périphérique et de biopsies médullaires a démontré une prévalence de l'expression des intégrines liant la fibronectine ($\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$) et la laminine (intégrine $\alpha 3\beta 1$ et $\alpha 6\beta 1$) sur les cellules leucémiques myéloïdes et lymphoïdes de type B (aiguës et chroniques)^{62,453,454}. Par contre, l'expression de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ liant le collagène de type I, varie selon les cohortes étudiées et peuvent atteindre 20% pour les leucémies AML et pré-B-ALL^{62,455}. Concernant l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ liant le collagène de type IV, son expression est faible ou absente sur les leucémies aiguës AML et B-ALL. Par contre, elle est fréquemment exprimée, jusqu'à 70%, par les lymphomes de type T⁴⁵⁶. Le profil d'expression des intégrines obtenu dans ces travaux est consolidé par la capacité des cellules leucémiques à adhérer aux matrices correspondantes; la fibronectine, la laminine et le collagène. En corrélation avec le profil des leucémies AML et B-ALL, différentes études ont montré que les intégrines $\alpha 4\beta 1$ et $\alpha 5\beta 1$ sont abondamment exprimées sur les lignées T-ALL alors que celles liant le collagène ($\alpha 1\beta 1$ et $\alpha 2\beta 1$) et la laminine ($\alpha 3\beta 1$ et $\alpha 6\beta 1$) varient d'une lignée à l'autre^{332,370,457,458}. Cependant, l'expression des intégrines sur les blastes primaires T-ALL n'a été étudiée que sur le plan d'ARNm²²⁸

Les intégrines $\alpha 4\beta 1$ et $\alpha 5\beta 1$ liant la fibronectine sont parmi les récepteurs les plus investigués dans le contexte de la pathogénèse des leucémies myéloïde et lymphoïde de type B. Tel que démontré par les tests d'adhésion *in vitro* et les analyses microscopiques, les lignées leucémiques myéloïdes et lymphoïdes ainsi que les blastes primaires sont capables d'adhérer fortement et de s'étaler au contact de la fibronectine ou de VCAM-1 immobilisé ou exprimé par les cellules stromales et endothéliales^{335,336,459}. *In vivo*, les clones B-ALL et myélomateux fortement positifs pour l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ démontrent une plus grande habilité d'ancrage, de survie et de croissance dans la moelle osseuse et les organes extra-médullaires^{460,461}. De plus, l'utilisation d'anticorps bloquants anti- $\alpha 4$ augmente la mobilisation au niveau sanguin des cellules des xénogreffes du myélome multiple et des leucémies B-ALL et AML et inhibe leur recrutement au niveau de la moelle osseuse et des organes lymphoïdes et parenchymateux⁴⁶²⁻⁴⁶⁴. L'activation des intégrines $\alpha 4\beta 1$ et $\alpha 5\beta 1$ à travers le stroma médullaire est impliquée dans la régulation de différents processus biologiques nécessaires à la progression leucémique dont la croissance, la dissémination et la survie^{335,465-467}.

1.3.6.2 Rôle des intégrines dans la survie des hémopathies malignes

Les intégrines jouent un rôle important pour la survie des cellules leucémiques. La culture en suspension des blastes primaires dérivant de patients ALL ou AML est accompagnée d'une mort spontanée et rapide des cellules, même en présence de forte concentration de sérum ou de facteurs de croissances (IL-7, IL-3, SCF, IGF). Par contre, leur mise en contact avec les cellules stromales ou la fibronectine, diminue considérablement leur sensibilité à l'apoptose⁴⁶⁸⁻⁴⁷⁰.

In vitro, les lignées ALL et AML sont hautement sensibles à l'apoptose induite par les déficits en facteurs de croissance. Cette condition de stress est fréquemment rencontrée par les cellules tumorales en croissance à cause de la dynamique de divisions cellulaires illimitées et les altérations vasculaires associées. Cette condition induit la mort des cellules leucémiques par l'activation simultanée des voies extrinsèque et intrinsèque d'apoptose^{471,472}. En effet, la privation de sérum induit une augmentation des protéines pro-apoptotiques (Bim, Puma, Bid) et une diminution de l'expression des protéines de survie dont ERK dans les blastes AML et T-ALL^{119,473,474}. Dans ce contexte, la survie des cellules

Jurkat et des blastes T-ALL primaires est préservée lorsqu'elles sont en contact avec les cellules BMSC, ce qui est dépendant de l'engagement des intégrines $\alpha 4\beta 1$ et $\alpha L\beta 2$ liant leurs ligands respectifs VCAM-1 et ICAM sur les cellules BMSC⁴⁷⁵. L'engagement de l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ favorise également la protection des cellules des lignées B-ALL contre l'apoptose induite en absence de sérum mais pas contre l'apoptose induite par les anticorps anti-Fas (CH11) ou anti-IgM⁴⁷⁰. L'effet anti-apoptotique de l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ est dépendant de l'activation persistante de la kinase FAK qui induit, à travers la voie PI3K/AKT, une augmentation des niveaux de la protéine anti-apoptotique Bcl-2³³⁴. L'adhésion à la fibronectine augmente également la résistance à l'apoptose des cellules myélomateuses par l'activation du facteur de transcription NF- κ B constitué de l'hétérodimère RelB-p50 mais pas de l'hétérodimère P65-P50 activé généralement par la cytokine TNF- α pro-apoptotique⁴⁷⁶.

En plus du rôle central de FAK dans l'activation de la voie PI3K/AKT par les intégrines et l'induction de la survie des cellules leucémiques, la voie ILK est également induite par le contact des cellules AML avec les cellules stromales et les protège contre l'apoptose induite en absence de sérum⁴⁷⁷. L'ILK est une serine thréonine kinase qui se lie à la chaîne β des intégrines suite à son activation par la kinase PI3K³⁹⁸. L'ILK peut induire la survie des cellules AML *via* la stimulation des voies AKT, Notch et ERK. Il a également été démontré que la GSK3 β est activée par l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans les myéloblastes, favorisant leur survie contre l'apoptose induite en absence de sérum et par le TNF- α ⁴⁷⁸. Dans ce contexte, l'activité anti-apoptotique de la GSK3 β est dépendante du recrutement simultané et de l'activation de la protéine adaptatrice RACK1 et de la phosphatase PP2A. Cependant, l'activation de GSK3 β par l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ n'a pas été décelée dans les cellules AML des lignées HL-60 et KG1. L'ensemble de ces données suggèrent un rôle anti-apoptotique de la fibronectine dans la progression leucémique. Cependant, certains travaux rapportent un effet pro-apoptotique de la fibronectine dans le contexte des leucémies T-ALL et AML. Dans l'étude de Sugahara et *al.*, l'incubation des lignées AML et T-ALL en contact de la fibronectine immobilisée ou soluble inhibe leur croissance et induit leur apoptose⁴⁷⁹. Des résultats similaires ont été démontrés par le équipes Fukai et Huberman^{480,481}. La raison de ces controverses n'est pas encore comprise.

Par ailleurs, les intégrines sont également impliquées dans la protection des cellules des hémopathies malignes contre les défenses immunitaires. Ainsi le contact physique des cellules myélomateuses U266 et UM9 avec les cellules stromales ou l'une des matrices; fibronectine, vitronectine ou laminine, inhibent leur apoptose induite par les lymphocytes T cytotoxiques T-CD4+/CD8+⁴⁸². Cet effet est dû au blocage de l'expression de Fas et l'augmentation des niveaux de survivine. Également, le contact des plasmoblastes malins avec les BMSC favorise leur protection contre l'apoptose induite par TRAIL et FasL recombinants, ce qui est lié à la régulation des niveaux d'expression de la caspase-8 et de son activation par la protéine c-FLIP au sein du DISC⁴⁸³. Également, notre laboratoire a démontré que l'activation de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ par le collagène protège les cellules T leucémiques Jurkat contre l'apoptose extrinsèque induite par les récepteurs de mort (FAS et TRAIL)⁴¹⁰. L'engagement de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ avec le collagène active la voie de survie FAK/ RAS/ERK qui, à son tour, diminue l'expression de FasL, inhibant ainsi l'activation de la caspase-8. Contrairement au collagène, la fibronectine n'induit pas la protection des cellules Jurkat contre l'apoptose induite par le récepteur de mort Fas⁴¹⁰.

1.3.6.3 Rôle des intégrines dans la chimiorésistance des hémopathies malignes

En plus de leur implication dans la croissance et la survie, les intégrines sont importants pour la modulation de la réponse des hémopathies malignes contre la chimiothérapie. Certains travaux soulignent l'existence d'une corrélation entre les propriétés adhésives des cellules leucémiques AML et ALL au niveau médullaire et la résistance à la thérapie^{484,485}. Dans l'état actuel des connaissances, le rôle chimio-protecteur de l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ est celui le plus étudié. Les travaux de plusieurs groupes ont clairement démontré que l'adhésion à la fibronectine ou à VCAM-1 *via* l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ protège les cellules du myélome multiple, des leucémies lymphoblastiques B et myéloïdes contre l'apoptose induite par la chimiothérapie^{312,463,486,487}. L'effet de l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ n'est pas restreint à une seule classe pharmacologique de drogues mais s'étend à plusieurs molécules dont les agents alkylants (melphalan, cisplatine), les anthracyclines (doxorubicine, daunorubicine, mitoxantrone), les analogues nucléosidiques (cytarabine, fludarabine), les inhibiteurs des tyrosine kinases BCR-ABL (imatinib) et les radiations ionisantes.

La résistance à la thérapie anti-leucémique induite par les intégrines est liée à l'activation de plusieurs voies de survie (**Figure 16**)^{91,317}. L'activation de la voie de survie PI3K/AKT et l'induction des protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-xL et XIAP sont parmi les mécanismes majeurs impliqués dans la protection des cellules AML et B-ALL par l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ ³¹⁸. Dans les cellules AML, l'engagement de l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ avec la fibronectine induit la dégradation protéosomale de Bim indépendamment de l'activation de la voie MAPK/ERK⁴⁸⁸. Par ailleurs, il a été démontré que l'adhésion aux cellules stromales par l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ favorise l'exclusion du mitoxantrone des blastes AML primaires²⁶⁹. L'induction des transporteurs ABCB1 et ABCC1 par l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ peut être liée à l'activation de la voie PI3K/AKT. En effet, l'analyse des blastes primaires AML montre l'existence d'une corrélation positive entre les niveaux d'activation de la voie PI3K/AKT et l'expression du transporteur ABCC1²⁸⁴. Contrairement au cas des cellules AML, la protection des cellules du myélome multiple *via* l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ semble être indépendante de l'efflux des drogues et de l'expression des transporteurs ABCB1, ABCC1 et ABCG2³¹⁶. L'induction de la quiescence est aussi l'un des mécanismes favorisant la résistance des cellules leucémiques contre l'action apoptotique des drogues génotoxiques⁴⁸⁹. Dans les cellules du myélome multiple, l'action anti-apoptotique de l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ est liée à l'arrêt du cycle cellulaire via l'inhibition de la dégradation protéosomale de la protéine P27, un des inhibiteurs de la Cycline dependent kinases (Cdk)⁴⁹⁰.

L'adhésion des cellules leucémiques K562 à la fibronectine inhibe l'apoptose induite par les inhibiteurs de la kinase BCR-ABL (imatinib et dasatinib)^{491,492}. Le mécanisme anti-apoptotique induit par la fibronectine est indépendant de la signalisation induite par la kinase BCR-ABL et il implique l'activation d'une tyrosine kinase de 80kDa non encore identifiée. Par ailleurs, dans les cellules leucémiques AML, les intégrines $\alpha 4\beta 1$ et $\alpha 5\beta 1$ liant la fibronectine seules n'activent pas la voie Wnt mais peuvent agir en coopération avec le sFRP-1, antagoniste de la voie Wnt, pour induire l'inhibition de l'apoptose des cellules AML par la daunorubicine⁴⁹³. Dans ce contexte, l'effet de survie induit par le facteur sFRP-1 passe par la voie GSK- β /NF κ B. Contrairement aux cellules AML, l'adhésion des cellules des lignées myélomateuses aux cellules stromales par l'intégrine $\alpha 6\beta 1$ induit l'activation directe et autocrine de la voie Wnt/RhoA/ROCK, favorisant de cette façon, la protection de ces cellules contre l'apoptose induite par la doxorubicine⁴⁹⁴.

Les intégrines peuvent coopérer avec les facteurs solubles afin d'induire la chimiorésistance des cellules des hémopathies malignes. Il a été démontré que l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ potentialise la chimiorésistance des cellules du myélome multiple induite par l'IL-6 en co-stimulant l'activation de STAT-3 induite par cette cytokine⁴⁹⁵. De plus, la chimiokine SDF-1 α (CXCL-12) est l'un des facteurs solubles abondamment produits au niveau de la moelle osseuse par les BMSC et les cellules leucémiques⁴⁹⁶. Le CXCR-4, récepteur pour la chimiokine SDF-1 α , joue un rôle primordial dans la pathogénèse des leucémies aiguës⁴⁹⁷. Le contact des cellules leucémiques et lymphomateuses avec les cellules stromales induit l'association au niveau membranaire de CXCR-4 et de l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ ^{335,498,499}. La liaison de SDF-1 à CXCR-4 augmente l'adhésion des cellules hématopoïétiques et des cellules des lignées myélomateuses et AML à la fibronectine et à VCAM-1 en induisant l'activation des intégrines $\alpha 4\beta 1$ et $\alpha 5\beta 1$. L'inhibition de CXCR-4 ou de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ diminue considérablement l'adhésion des cellules leucémiques et diminue considérablement leur chimio-protection induite par l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ ^{486,487,500,501}. Concernant les cellules des leucémies lymphoïdes chroniques (CLL), l'activation de la voie SYK-AKT par la co-signalisation $\alpha 4\beta 1$ /CXCR-4 favorise la protection des cellules CLL contre l'effet cytotoxique induit par la fludarabine suite à l'augmentation des niveaux de la protéine anti-apoptotique Mcl-1⁵⁰².

Damiano et *al.* ont postulé que l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ pourrait avoir un rôle primordial dans la chimiorésistance et l'agressivité des hémopathies malignes comparativement à celui de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ faiblement retrouvé sur les clones résistants⁴⁶⁰. Ces suggestions ont été vérifiées à la lumière des données cliniques récentes montrant la forte corrélation entre les niveaux d'expression (ARNm ou protéique) de l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ et les rechutes des patients atteints de myélome multiple et des leucémies B-ALL et CLL^{503,504}. L'augmentation des niveaux d'expression de l'intégrine $\alpha 4$ est associée dans les cellules B-ALL à une élévation concomitante de l'expression des gènes impliqués dans l'activation de la voie de survie PI3K/AKT⁵⁰³. L'expression de l'intégrine $\alpha 4$ est aussi en corrélation avec celles des gènes impliqués dans la régulation des voies Ephrine, Rho GTPases et de la chaîne intégrine αL . Cependant, le rôle de ces voies dans la régulation de l'activité anti-apoptotique de l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ n'est pas encore élucidé. Par ailleurs, dans le cadre des leucémies CLL, l'expression de l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ est simultanée à celle d'autres facteurs pronostic tel que la

kinase Zap70, CD38 et le CXCR-4⁵⁰⁵. L'ensemble de ces données cliniques ont suggéré l'importance du ciblage thérapeutique de l'intégrine $\alpha4\beta1$ afin d'augmenter l'efficacité de la chimiothérapie chez les patients et pour éviter l'émergence de la résistance acquise. Dans cette perspective, l'anticorps dirigé contre l'intégrine $\alpha4\beta1$ (Natalizumab, Biogen IDEC), est en cours d'études cliniques pour le traitement du myélome multiple⁵⁰⁶⁻⁵⁰⁸, ce qui est également prévu dans un avenir proche pour les leucémies B-ALL et B-CLL^{317,486,509}.

Contrairement aux leucémies lymphoïdes B, le rôle des intégrines liant la fibronectine dans la survie et la chimiorésistance des leucémies AML demeure peu évident. En effet, certaines travaux réalisés *in vitro* et *in vivo* ont démontré l'implication des intégrines $\alpha4\beta1$ et $\alpha5\beta1$ dans la résistance des myéloblastes contre la chimiothérapie et la radiothérapie^{463,487,510}. Cependant, les analyses cliniques ont souligné la présence d'une très bonne corrélation entre l'expression de $\alpha4\beta1$ et la meilleure réponse à la chimiothérapie ainsi qu'au meilleur pronostic vital des patients AML^{511,512}. De plus, une étude récente n'a pas observé d'association entre l'expression de l'intégrine $\alpha5\beta1$ et les rechutes des patients AML⁵¹³. Ensemble, ces données suggèrent l'implication d'autres facteurs dans la régulation de la réponse des cellules AML au VCAM-1 et la fibronectine, tels que la co-activation des autres récepteurs intégrines⁵¹⁴.

Contrairement aux leucémies myéloïdes et lymphoïdes de type B, le rôle des intégrines et de la MEC dans la régulation de la réponse des lymphoblastes T malins à la chimiothérapie n'est pas encore établi.

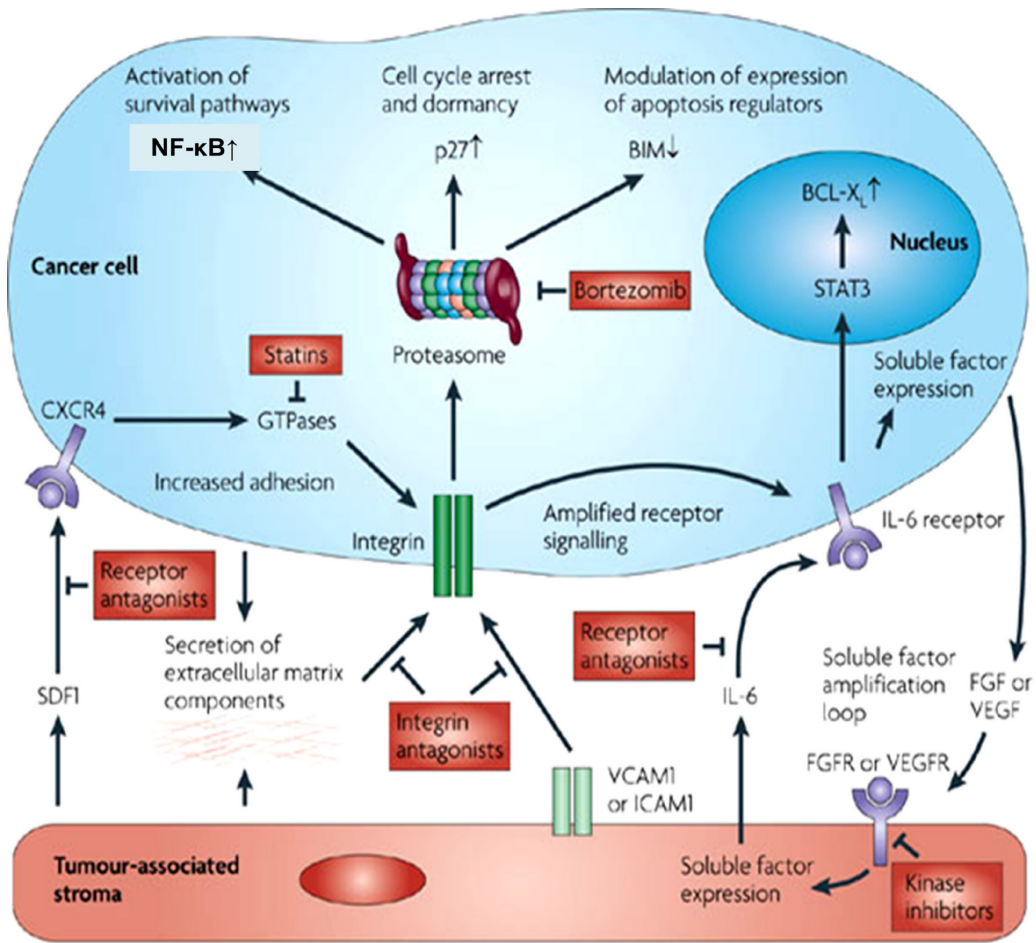


Figure 16 : Mécanismes moléculaires de la résistance à la thérapie des hémopathies malignes induite par l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ (Meads *et al.* 2009)⁹¹.

1.4 Problématique, hypothèse et objectifs

1.4.1 Problématique

Les intégrines $\beta 1$ sont importantes pour la survie et la progression des hémopathies malignes. Les intégrines liant la fibronectine ($\alpha 4\beta 1$ et $\alpha 5\beta 1$) sont impliquées dans l'inhibition de la réponse à la thérapie du myélome multiple et des leucémies B-ALL et AML³¹⁷. Contrairement à la fibronectine, le rôle des autres matrices constituant le stroma médullaire dans la chimiorésistance des hémopathies malignes est peu étudié. Le collagène est la matrice la plus abondante au niveau médullaire^{9,10,45}. Les travaux de notre laboratoire ont précédemment démontré que l'adhésion des cellules T effectrices au collagène *via* l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ augmente leur protection contre l'apoptose induite par la réactivation du TCR (AICD)^{409,410}. Nous avons également démontré que l'interaction du collagène de type I avec l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ favorise la protection des cellules T leucémiques Jurkat contre l'apoptose extrinsèque induite par le récepteur de mort Fas⁴¹⁰. Contrairement au collagène, la fibronectine ne protégeait pas les lymphocytes T normaux et malins contre l'apoptose induite par Fas. Par contre, il a été démontré que la fibronectine peut induire l'apoptose de certaines lignées T-ALL et AML⁴⁷⁹. Ces données suggèrent que le collagène *via* l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ peut jouer un rôle plus important dans la promotion de la survie des leucémies T-ALL comparativement à celui induit par les intégrines liant la fibronectine. Ivanoff *et al.* ont démontré précédemment que les intégrines $\beta 1$ liant le collagène ($\alpha 2\beta 1$) et la fibronectine ($\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$) sont exprimées sur les lymphoblastes T malins des lignées T-ALL (Jurkat, HSB2 et CEM)^{370,458}. L'intégrine $\alpha 2\beta 1$ est également détectée à la surface de blastes primaires AML^{62,455}. Comme les leucémies AML, les leucémies T-ALL se développent au niveau de la moelle osseuse riche en collagène de type I^{1,515}. La liaison au collagène par

l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ est impliquée dans l'induction de la survie et de la chimiorésistance des tumeurs pancréatiques et mammaires^{433,516}. Cependant, le rôle de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ et du collagène dans la régulation de la réponse à la chimiothérapie des leucémies aiguës T-ALL et AML n'est pas encore étudié.

1.4.2 Hypothèse

En se basant sur l'ensemble de ces données, nous avons émis l'hypothèse que l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ liant le collagène favorise la résistance des cellules leucémiques T-ALL et AML contre l'apoptose induite par la chimiothérapie.

1.4.3 Objectifs

Pour répondre à notre hypothèse, nous avons investigué les trois objectifs suivants :

Objectif 1 : Étudier le rôle du collagène et de la fibronectine dans la chimiorésistance des leucémies T-ALL et AML et identifier les intégrines impliquées.

Objectif 2 : Déterminer le rôle de l'interaction collagène/ intégrine $\alpha 2\beta 1$ dans la survie des leucémies T-ALL en absence de sérum.

Objectif 3: Déterminer les mécanismes anti-apoptotiques et les voies de survie intracellulaires activés par l'intégrine $\alpha 2\beta 1$.

Chapitre II

L'intégrine $\alpha2\beta1$ favorise la chimiorésistance des cellules cancéreuses contre la doxorubicine via la voie ERK (*Extracellulaire-signal-Regulated Kinase*)

2.1 Résumé

Le rôle des intégrines $\beta1$ dans la chimiorésistance des cellules de la leucémie lymphoblastique aiguë de type T (T-ALL) n'est pas encore établi. Dans cette étude, nous avons démontré que le collagène (Coll I) *via* l'intégrine $\alpha2\beta1$, mais pas la fibronectine, réduit l'apoptose mitochondriale induite par la doxorubicine. L'effet anti-apoptotique du Coll I est lié à l'inhibition de la diminution des niveaux d'expression de la protéine anti-apoptotique Mcl-1, induite par la doxorubicine. Le maintien des niveaux de Mcl-1 est essentiel pour la survie des cellules T-ALL induite par le Coll I et il est dû à l'inhibition de l'activation de la voie c-Jun N-terminal kinase (JNK) induite par la doxorubicine. En outre, l'activation de la voie MAPK/ERK, mais pas de PI3 kinase/AKT, est requise pour l'effet anti-apoptotique du Coll I. Ainsi, les résultats de notre étude suggèrent que l'interaction Coll I/ $\alpha2\beta1$ intégrine pourrait contribuer à l'émergence de la chimiorésistance des leucémies T-ALL.

Alpha2beta1 integrin inhibits doxorubicin-induced apoptosis of T cell acute lymphoblastic leukemia by maintaining Mcl-1 levels in a MAPK/ERK-dependent manner*

Dalila Naci¹, Mohammed-Amine El Azreq¹, Nizar Chetoui¹, Laura Laudén², François Sigaux³, Dominique Charron², Reem Al-Daccak² and Fawzi Aoudjit¹.

¹ From the Centre de recherche en Rhumatologie/ immunologie, Centre hospitalier Universitaire de Québec, Pavillon CHUL, and Faculté de médecine, Université Laval, 2705 Blvd Laurier, Local T1-49, Québec, QC, Canada G1V4G2.

² Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) UMRS940, Institut Universitaire d'Hématologie Université Paris Denis Diderot, Hôpital Saint Louis, 75010, Paris, France.

³ INSERM U944, Institut Universitaire d'Hématologie Université Paris Denis Diderot, Hôpital Saint Louis, 75010, Paris, France.

To whom correspondence should be addressed: Fawzi Aoudjit, Centre de recherche en Rhumatologie et Immunologie CHUQ, Pavillon CHUL, 2705 Blvd Laurier, local T1-49, Ste-Foy, Québec, G1V4G2 Canada. Tel: (418) 656-4141 (ext. 46071), Fax :(418) 654-2765, E-mail: fawzi.aoudjit@crchul.ulaval.ca

***Running title:** Alpha2beta1 integrin in T-ALL survival.

Background: Mechanisms by which $\beta 1$ integrins regulate resistance of cancer cells to chemotherapy.

Result: $\alpha 2\beta 1$ integrin, but not fibronectin-binding integrins, inhibits doxorubicin-induced apoptosis of leukemic T cells via JNK inhibition, and Mcl-1 upregulation in a MAPK/ERK-dependent pathway.

Conclusion: $\alpha 2\beta 1$ integrin/ERK pathway promotes chemoresistance of cancer cells.

Significance: Activation of this pathway can contribute to the appearance of the drug resistance phenotype.

2.2 Abstract

The role and the mechanisms by which $\beta 1$ integrins regulate the survival and chemoresistance of T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) are still poorly addressed. In this study, we demonstrate in T-ALL cell lines and primary blasts, that engagement of $\alpha 2\beta 1$ integrin with its ligand collagen I (Coll I), reduces doxorubicin-induced apoptosis, whereas fibronectin (Fbn) had no effect. Coll I but not Fbn inhibited doxorubicin-induced mitochondrial depolarization, cytochrome c release and activation of caspase-9 and -3. Coll I but not Fbn also prevented doxorubicin from downregulating the levels of the prosurvival Bcl-2 protein family member Mcl-1. The effect of Coll I on Mcl-1 occurred through the inhibition of doxorubicin-induced activation of c-Jun-N-terminal Kinase (JNK). Mcl-1 knockdown experiments showed that the maintenance of Mcl-1 levels is essential for Coll I-mediated T-ALL cell survival. Furthermore, activation of MAPK/ERK, but not PI3 kinase/AKT, is required for Coll I-mediated inhibition of doxorubicin-induced JNK activation and apoptosis, and for Coll I-mediated maintenance of Mcl-1 levels. Thus, our study identifies $\alpha 2\beta 1$ integrin as an important survival pathway in drug-induced apoptosis of T-ALL cells and suggests that its activation can contribute to the generation of drug resistance.

Key words: T cell leukemia, $\alpha 2\beta 1$ integrin, collagen I, JNK, MAPK/ERK, Mcl-1

2.3 Introduction

Integrins are α/β heterodimeric membrane proteins that mediate cell adhesion to the surrounding extracellular matrix (ECM). In addition to their anchoring function, integrins induce several intracellular signals that modulate cell behavior (1). Normal epithelial and endothelial cells depend on integrin signals for cell cycle progression and disruption of matrix attachment induces their apoptosis, a process termed anoikis (2). We and others have shown that integrins can also protect the cells against cytokine withdrawal (3,4), activation-induced cell death in T lymphocytes (5), and ligation of death receptors in endothelial cells (6). Integrin-mediated cell survival has been associated with the activation of the two major cell survival pathways, the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3 kinase)/serine/threonine kinase (AKT) and the MAPK/ERK pathways (1).

Growing evidence suggests that tumor cell interactions with ECM of their microenvironment are important for tumor resistance against chemotherapy-induced apoptosis. However, the mechanisms by which integrins promote chemoresistance in cancer cells are still not fully understood. The $\alpha4\beta1$ integrin, which binds fibronectin (Fbn) protects hematopoietic malignancies including myeloma (7) B cell leukemia (8), and myeloid leukemia cell lines (9) from the apoptotic effects of melphalan and Ara-C, and from radiation-induced apoptosis (10).

Malignant T cells such as T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) cell lines express several $\beta1$ integrins, which serve as receptors for collagens, fibronectin and laminin (11). T-ALL is a hematopoietic malignancy, which also grows in the bone marrow that is rich in ECM (12). We have previously demonstrated that collagen type I (Coll I) inhibited Fas-induced apoptosis of the Jurkat T-ALL cell line (13). Coll I was also shown to protect Jurkat cells from serum starvation-induced apoptosis (14). In contrast, Fbn has been shown to induce apoptosis of some leukemic T cell lines (15). Whether ECM proteins regulate the response of T-ALL cells to chemotherapy is currently unclear. Resistance of cancer cells to apoptosis is a major hurdle in anti-cancer therapies, and understanding how these cells escape apoptosis is likely to lead to new therapeutical avenues.

Chemotherapy-induced apoptosis involves the activation of the mitochondrial death pathway (16), which is tightly regulated by the balance between pro- and anti-apoptotic Bcl-2 family proteins (17,18). Activation of Bcl-2 pro-apoptotic proteins lead to the permeabilization of the mitochondria, and to the release into the cytosol of apoptogenic factors such as cytochrome c. Cytochrome c, then participates in the activation of caspase-9, which in turn activates executioner caspases.

In this study, we investigated the regulation of doxorubicin-induced apoptosis of T-ALL cells by $\beta 1$ integrin signaling. Doxorubicin is a drug widely used in anti-cancer therapy including in T cell malignancies. We show that engagement of $\alpha 2\beta 1$ integrin by its ligand Coll I, inhibited doxorubicin-induced apoptosis of T-ALL cells by inhibiting activation of the c-Jun-N-terminal-2 Kinase (JNK). This resulted in the maintenance of the prosurvival Mcl-1 levels. The protective effect of Coll I is mediated through the activation of the MAPK/ERK survival pathway. In contrast to Coll I, Fbn previously shown to be a weak inducer of MAPK/ERK in Jurkat cells (13,19), had no effect on doxorubicin-induced JNK activation, did not maintain Mcl-1 levels and thereby did not protect T-ALL cells from doxorubicin-induced apoptosis. Our study demonstrates an important survival role for $\alpha 2\beta 1$ integrin and its ligand Coll I in drug-induced apoptosis of T-ALL cells and suggests that its activation can contribute to the generation of drug resistance.

2.4 Experimental procedures

2.4.1 Reagents and Antibodies

Collagen type I and doxorubicin were from Sigma (St-Louis, MO, USA). Human fibronectin was purchased from Millipore (Bellerica, MA, USA). The inhibitors of PI3 Kinase/AKT (LY294002), JNK (SP600125) and MEK-1 (U0126) were from Calbiochem (San Diego, CA, USA). Antibodies were obtained as follows: anti-phospho- p44/42 MAPK (E-4), anti-ERK2 (C-14), anti-caspase 3 that detects the native and the active fragments of caspase-3, anti-Mcl-1, anti-Bcl-2 and anti- β -actin (C-2) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA); anti-phospho-AKT (Ser-473), anti-AKT, anti-caspase-9, which detects the native and active fragments of caspase-9, anti-Bcl-xL, anti-phospho-JNK1/2 (G9) and anti-JNK-2 (#9252) were from Cell Signaling Technologies (Beverly, MA, USA). PE-conjugated anti-human CD49b (α 2 integrin) and APC-conjugated anti-CD29 (β 1 integrin) and isotypic control antibodies were from BD Biosciences/Pharmingen (San Diego, CA, USA). The anti- β 1 (4B4) and anti- α 2 (P1E6) integrin blocking antibodies were purchased from Beckman Coulter (Brea, CA, USA) and Millipore (Bellerica, MA, USA) respectively.

2.4.2 Cell culture and primary T-ALL blasts

The human T-ALL cell lines Jurkat (E6.1) and HSB-2 were obtained from ATCC (Manhasset, VA, USA) and were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS), 2mmol/L glutamine and 100 units/mL penicillin and streptomycin (complete medium). T-ALL patients were diagnosed and treated at Hôpital Saint-Louis (Paris, France). Informed consent was obtained from the patients or relatives in accordance with the Declaration of Helsinki and the study was approved by the Hôpital Saint-Louis and Institut Universitaire d'Hematologie Institutional Review Board. The study was carried out with cryopreserved leukemic cells from the bone marrow of patients at diagnosis. Two patients were diagnosed as stage III (Cortical immature TL) and one patient as stage IV (mature TL). The expression of α 2 and β 1 integrin chains on these T-ALL blasts was determined by the use of PE-conjugated anti- α 2 (CD49b) and APC-conjugated

anti- β 1 (CD29) specific antibodies. Samples were analyzed by Canto II flow cytometer (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France).

2.4.3 Determination of apoptosis and clonogenic survival

T-ALL cells were resuspended at 1×10^6 /ml in RPMI 1640 medium containing 2.5% serum. The cells were then seeded in 24-well plates (5×10^5 /well) and activated or not for 4 h with 100 μ g/ml of ECMp (Coll I, Fbn). The cell cultures were then treated with doxorubicin at 250 ng/ml for Jurkat and HSB-2 T cell lines, and at 600 ng/ml for T-ALL primary blasts. After 16 to 24 h of drug treatment, apoptosis was determined by annexin V staining and flow cytometry analysis using the FACSCalibur cytometer (BD Biosciences) as we previously described (13). Apoptosis was also determined by a cell death detection ELISA kit measuring DNA fragmentation (Roche Applied Science) as we previously described (13).

For clonogenic survival assays, the cells were activated or not with ECMp for 4 hours and then treated with doxorubicin for 24 h. The cells were then washed and seeded in complete RPMI medium containing 1% methylcellulose (StemCell Technologies, Vancouver, BC) at 1×10^4 cells/ml. After 21 days, colonies with more than 40 cells were counted.

2.4.4 Co-culture of Jurkat cells with bone marrow stromal cells

Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) were a generous gift from Dr Nicholas Pineault (Hema-Québec, Québec) and were previously described (20). The co-culture of Jurkat cells with MSCs and drug treatment was carried out as previously described (21,22). MSCs at passage 2 or 3 were seeded in 24 well-plates for 24 h to form a monolayer. Jurkat cells (5×10^5 in 500 μ l of RPMI medium) were kept in suspension or co-cultured with the monolayer of MSCs for 24 h. The cultures were then treated with doxorubicin (250 ng/ml) for 24 h. Jurkat cells were separated from MSCs by pipetting with ice-cold PBS. This treatment did not affect the MSC monolayer nor did it result in the detachment of MSCs. Apoptosis of Jurkat cells in suspension or cocultured with MSCs was then evaluated as described above.

2.4.5 Caspase activation, expression of Bcl-2 proteins, activation of ERK, AKT and JNK

Activation of caspase-9 and caspase-3, expression of Mcl-1, Bcl-2 and Bcl-xL and phosphorylation of ERK1/2, JNK1/2 and AKT were determined by immunoblot analysis using specific antibodies as we previously described (23).

2.4.6 Mitochondrial depolarization and cytochrome C release

Loss of the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) was measured by staining the cells with DioC6(3) (Molecular Probes, Eugene, OR) and flow cytometry analysis as previously described (24). Cytochrome C release was determined by immunoblot analysis of cytosolic fractions with an anti-cytochrome C antibody (clone 7H8.2C12; BD Pharmingen) as we previously described (25). The purity of the cytosolic fractions was verified by immunoblot analysis using an antibody against the mitochondrial cytochrome C oxidase (antibody 20E8-C12, Molecular probes, Eugene, OR) as we previously described (25). We found that only the unbroken cell fraction, which contains the mitochondria, and not the cytosolic fraction, contains cytochrome C oxidase (data not shown).

2.4.7 Plasmids and Cell Transfection

The plasmids encoding the dominant-negative forms of MEK-1 (DN-MEK-1) and AKT (DN-AKT) were used in our previous studies (13,23,25). Jurkat cells were transfected by electroporation as we previously described (13).

2.4.8 RNA Interference

Silencer Validated siRNA specific for Mcl-1 (siRNA ID 120644 sense 5'GGACUUUUAUACCUGUUAUtt3', antisense 5'AUAACAGGUAUAAAAGUCctg3') and Silencer Negative Control siRNA were from Ambion and were used in our previous study (23). A second Silencer Validated siRNA sequence targeting Mcl-1 (siRNA ID 4170 sense 5'CCAGUAUACUUCUAGAAAtt3', antisense 5'UUUCUAAGAAGUAUACUGGga 3') and its Silencer Negative control sequence were also from Ambion.

5×10^6 Jurkat cells were transfected with 200 nmol/L of Mcl-1 specific siRNA or Negative Control siRNA using the nucleofector method from Amaxa according to the manufacturer's instructions. Jurkat cells were mixed with siRNA in the T cell nucleofector solution (solution 5) and transfected using the C016 program. The cells were then cultured in RPMI supplemented with 10% of fetal bovine serum for 6 h. Viable cells were recovered by Ficoll-hypaque density gradient centrifugation and used in subsequent apoptosis experiments. The inhibition of Mcl-1 protein expression was assessed by immunoblot analysis using Mcl-1 specific antibody.

2.4.9 Statistical analysis

Statistical analysis was performed by the Student's t-test. Results with $p < 0.05$ were considered significant.

2.5 Results

2.5.1 Collagen type I- $\alpha 2\beta 1$ integrin inhibits doxorubicin-induced apoptosis

The effects of Coll I and Fbn, two major matrix proteins of the bone marrow microenvironment, on doxorubicin-induced apoptosis were examined in two established T-ALL cell lines, Jurkat and HSB-2. We found that preactivation of Jurkat and HSB-2 cells for 3-4 h with Coll I but not with Fbn inhibited doxorubicin-induced apoptosis; the percentage of annexin V-positive cells was decreased by 30% (Figure 1a) and DNA fragmentation was inhibited by approximately 38% (Figure 1b). Preactivation of the cells for more than 4 h with Coll I but not with Fbn also inhibited doxorubicin-induced apoptosis, whereas treatment of the cells with poly-L-Lysine; a non-integrin binding ligand, did not modulate doxorubicin-induced apoptosis (data not shown).

We then tested if the combination of both matrix proteins would lead to a synergistic cell survival. Preactivation of the cells simultaneously with Fbn and Coll I only slightly decreased doxorubicin-induced apoptosis in comparison to cells preactivated with Coll I alone, however, this did not reach statistical significance (Figure 1c). Changing the concentrations of Coll I or Fbn or varying the time of cellular preactivation did not lead to a further decrease in doxorubicin-induced apoptosis of cells preactivated with both Coll I and Fbn in comparison to cells preactivated only with Coll I (data not shown).

Several studies have previously shown that $\alpha 2\beta 1$ integrin is the major Coll I receptor expressed on T cells including T cell lines (5,26,27). Herein, we found that blocking anti- $\alpha 2$ and anti- $\beta 1$ integrin antibodies but not control isotypic antibody significantly block the ability of Coll I to reduce doxorubicin-induced apoptosis (Figure 1d). The blocking antibodies had no effect on doxorubicin-induced apoptosis (data not shown). Together, these results indicate that the protective effect of Coll I involves $\alpha 2\beta 1$ integrin.

Bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs), which are the producers of ECM in the hematopoietic microenvironment, have previously been shown to protect B cell and myeloid leukemia from chemotherapy (21,22). Therefore, we evaluated the role of MSCs and of $\alpha 2\beta 1$ integrin in the protection of Jurkat cells from doxorubicin-induced apoptosis.

In agreement (28), we found that co-culture of Jurkat cells with MSCs resulted in a reduction of doxorubicin-induced apoptosis compared to cells grown in suspension (Figure 1e). In addition, we found that anti- $\alpha 2$ and anti- $\beta 1$ integrin blocking antibodies but not control antibodies also abolished the protective effect of MSCs on Jurkat cells (Figure 1e).

We then carried out clonogenic survival assays to assess if Coll I promoted long-term survival. As shown in figure 1f, treatment with doxorubicin led to the formation of very few colonies in both T cell lines. However, treatment with doxorubicin in the presence of Coll I but not of Fbn, led to significantly higher number of colonies in Jurkat and HSB-2 T cell lines. Taken together, these results indicate that Coll I via $\alpha 2\beta 1$ integrin could constitute a major pathway contributing to T-ALL drug resistance.

2.5.2 Coll I inhibits doxorubicin-induced mitochondria depolarization, cytochrome C release, caspase activation, and maintains Mcl-1 protein levels

Mitochondria death pathway plays a critical role in drug-induced apoptosis including in doxorubicin-induced apoptosis of T-ALL cell lines (29,30). Thus, we examined if Coll I modulates this apoptotic pathway. Treatment of Jurkat cells with doxorubicin induces the loss of mitochondrial membrane potential, which is reduced by Coll I but not by Fbn (Figure 2a). Similarly, Coll I but not Fbn also reduces doxorubicin-induced cytochrome C release (Figure 2b). We then examined the regulation of caspase activation. Doxorubicin induces the activation of both caspase-9 and caspase-3 as determined by the reduction in the levels of procaspase forms, and in the appearance of caspase-9 and caspase-3 active fragments (Figure 2c). The presence of Coll I reduces the capacity of doxorubicin to activate both caspases, whereas Fbn, which had no effect on doxorubicin-induced apoptosis, did not modulate doxorubicin-induced caspase activation (Figure 2c). Coll I but not Fbn also reduced doxorubicin-induced caspase activation in HSB-2 cells (Figure S1, supplemental data). These results indicate that the prosurvival effect of Coll I occurs at the level of the mitochondria.

The balance between pro- and anti-apoptotic Bcl-2 proteins regulates the mitochondria death pathway and some studies have suggested that integrins can regulate Bcl-2 prosurvival proteins (31,32). Accordingly, we studied the regulation of the three major Bcl-

2 prosurvival proteins. Treatment of Jurkat cells with doxorubicin in the presence or absence of Coll I had no effect on the protein levels of Bcl-2 and Bcl-xL (Figure 2d). However, doxorubicin treatment dramatically decreased the levels of Mcl-1, and Coll I but not Fbn, restored those levels (Figure 2d). Coll I restored Mcl-1 levels up to 80% in doxorubicin-treated cells (average of three independent experiments). The maintenance of Mcl-1 protein levels by Coll I/ $\alpha 2\beta 1$ integrin signaling also occurs in HSB-2 cells (Figure S2, supplemental data). Together these results suggest that Coll I can inhibit doxorubicin-induced mitochondria signaling and apoptosis by maintaining the levels of Mcl-1.

To test this possibility, we performed a Mcl-1 knockdown by RNA interference and tested the ability of Coll I to protect against doxorubicin-induced apoptosis. Transfection of Jurkat cells with Mcl-1 specific siRNA (ID 120644) but not with control siRNA drastically reduced Mcl-1 protein levels (reduction of 85 to 90%; average of three experiments) (Figure 2e; left panel). As expected, Coll I restored Mcl-1 levels upon doxorubicin treatment in control siRNA-transfected cells but not in Mcl-1 siRNA-transfected cells. In addition, Mcl-1 siRNA enhances doxorubicin-induced mitochondrial membrane depolarization, and more importantly, the protective effect of Coll I observed in control siRNA-transfected cells is abrogated in Mcl-1 siRNA-transfected cells (Figure 2e; right panel). Similar findings were obtained when apoptosis was measured by annexin V binding (data not shown). For more specificity, we used a second siRNA sequence targeting Mcl-1 (ID 4170). We found that this sequence also drastically reduces the levels of Mcl-1 and abolishes the protective effect of Coll I (Figure S3, supplemental data). Together these results demonstrate that the protective effect of Coll I on doxorubicin-induced mitochondrial membrane depolarization and apoptosis occurs through the maintenance of Mcl-1 protein levels. It is noteworthy, knockdown of Mcl-1 by itself led to an increase in mitochondrial depolarization, which is in line with Mcl-1 as being a major regulator of mitochondrial integrity and survival of leukemic cells.

2.5.3 Coll I inhibits doxorubicin-induced JNK activation

Previous studies have shown that JNK is involved in doxorubicin-induced apoptosis of T-ALL cells (29,33), and that Mcl-1 stability and levels can be regulated by JNK (34). Thus, we considered the possibility that doxorubicin reduces Mcl-1 levels through a mechanism

involving JNK, and that Coll I could restore Mcl-1 levels by blocking JNK activation. In agreement, we found that treatment of T-ALL cell lines with doxorubicin increases the phosphorylation of JNK (Figure 3a) and the JNK inhibitor SP600125 reduces doxorubicin-induced apoptosis by approximately 50-60% and also reduces doxorubicin-induced caspase-9 activation (Figure S4, supplemental data). We then examined the role of JNK in the regulation of Mcl-1 protein levels in doxorubicin-treated cells. The results show that the JNK inhibitor SP600125 inhibits the ability of doxorubicin to downregulate Mcl-1 protein levels in Jurkat and HSB-2 cells (Figure 3b left and right panel, respectively) indicating that JNK activation is essential for the downmodulating effect of doxorubicin on Mcl-1 levels. Finally, we found that Coll I but not Fbn inhibited the ability of doxorubicin to activate JNK in T-ALL cell lines (Figure 3c). Together these results indicate that doxorubicin reduces Mcl-1 protein levels through JNK, and Coll I could restore these levels by preventing activation of JNK.

2.5.4 Coll I-mediated cell survival is MAPK/ERK dependent

Integrin-mediated signaling results in many cell types into the activation of the PI3 kinase/AKT and MAPK/ERK survival pathways. We have previously shown in T cell lines that engagement of $\alpha 2\beta 1$ integrin with Coll I activated the MAPK/ERK but not the PI3 kinase/AKT pathway (13,19). Herein, we found that treatment of Jurkat cells with doxorubicin had no effect on ERK phosphorylation, and Coll I induced a significant increase in ERK phosphorylation both in the absence and in the presence of doxorubicin (Figure 4a). In contrast, doxorubicin or Coll I did not regulate AKT, which is constitutively phosphorylated in Jurkat cells (Figure 4b). These results suggest that the protective effect of Coll I could be mediated via the activation of the MAPK/ERK survival pathway.

To test this possibility, we examined the effect of the MEK-1/ERK inhibitor U0126 on Coll I-mediated cell survival. Treatment of T-ALL cell lines with U0126 but not with LY294002 (PI3 kinase/AKT inhibitor) abolished the ability of Coll I to protect the cells from doxorubicin-induced apoptosis (Figure 4c). As a control, treatment of the cells with U0126 abolished Coll I-induced ERK phosphorylation, and treatment of the cells with LY294002 abolished AKT phosphorylation (data not shown). We also studied the implication of ERK and AKT using a genetic approach. Expression in Jurkat cells of a

dominant-negative form of MEK-1 (DN-MEK-1) but not of AKT (DN-AKT) partially reduced the protective effect of Coll I. We found that Coll I reduced doxorubicin-induced apoptosis by approximately 40% in control transfected cells and only by 15 % in DN-MEK-1 transfected cells (Figure 4d). As we previously found (13,25,35), expression of DN-AKT and DN-MEK-1 also respectively diminished phosphorylations of AKT and ERK (data not shown). Although chemical inhibitors could possess off-target effects, data obtained with genetic approach confirm the implication of MAPK/ERK in Coll I-mediated cell survival.

We then assessed if the effects of Coll I on the maintenance of Mcl-1 levels and on the inhibition of JNK activation (see Figure 2d and Figure 3c) were also dependent on MAPK/ERK. The results show that the MEK-1 inhibitor but not the PI3 kinase/AKT inhibitor reduced the ability of Coll I to restore Mcl-1 levels in doxorubicin-treated cells (Figure 4e) and abolished the ability of Coll I to inhibit doxorubicin-induced JNK activation (Figure 4f). Together these results indicate that $\alpha 2\beta 1$ integrin promotes resistance to doxorubicin by activating the MAPK/ERK signaling pathway.

2.5.5 Coll I protects T-ALL blasts from doxorubicin-induced apoptosis

To assess if our findings could have a clinical significance, we examined the expression and the function of $\alpha 2\beta 1$ integrin in primary T-ALL blasts isolated from the human bone marrow. Three different patient samples were obtained and analyzed in our study. The three samples express significant levels of $\alpha 2$ integrin chain. Between 49 to 58% of the total cells express $\alpha 2$ integrin; although with different MFI (high levels of $\alpha 2$ integrin are detected on samples #1 and #2, whereas sample#3 expresses lower levels). However, all samples express high levels of the $\beta 1$ integrin chain (Figure 5a). Having established the expression of $\alpha 2\beta 1$ integrin, we tested if Coll I would protect these primary T cell blasts from doxorubicin-induced apoptosis. Preactivation of all three primary T-ALL blasts samples with Coll I reduced doxorubicin-induced apoptosis whereas Fbn had no significant effect (Figure 5b). Doxorubicin-induced apoptosis was reduced by 27% in sample #1, 25% in sample #2 and by 15% in sample#3. Finally, the MEK-1 inhibitor U0126 but not the PI3 kinase/AKT inhibitor LY294002 also abolished Coll I-mediated cell survival in primary T-ALL blasts (Figure 5c). Together these results demonstrate that the protective effect of Coll

I is not restricted only to T-ALL cell lines, and that the Coll I- $\alpha 2\beta 1$ interaction could be an important cell survival pathway in the resistance of T-ALL towards doxorubicin-induced apoptosis.

2.6 Discussion

The tumor microenvironment is recognized as a critical factor promoting tumor progression and survival. The bone marrow, which is rich in ECM proteins is the growth site for the development of hematological malignancies (12). However, the role of $\beta 1$ integrin signaling in the resistance of malignant T cells to apoptosis is still poorly addressed. In this study, we demonstrate that Coll I through its receptor $\alpha 2\beta 1$ integrin inhibits apoptosis of T-ALL cells that is induced by doxorubicin; a chemotherapeutic drug widely used in anti-cancer therapy.

In contrast to Coll I, Fbn did not protect T-ALL cells from doxorubicin-induced apoptosis despite the fact that malignant T cells express Fbn-binding integrins $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha 5\beta 1$ (11). However, Fbn, through $\alpha 4\beta 1$ integrin, has been shown to reduce drug-induced apoptosis in other hematological malignancies such as myeloma and myeloid leukemia (7,9). This suggests that hematological tumors could respond differently to their tissue microenvironment depending on the integrin expression profile and on the signaling events active in the cells. The fact that Fbn does not protect T-ALL cells from doxorubicin-induced apoptosis is reminiscent to previous studies. We have previously demonstrated that in contrast to Coll I, Fbn did not protect Jurkat cells from Fas-induced apoptosis (13). Engagement of $\alpha 4\beta 1$ integrin with its ligand VCAM-1 has also been shown to enhance TCR-induced apoptosis of antigen-specific T cell clones (36), and Fbn via its $\alpha 5\beta 1$ integrin receptor, can induce significant apoptosis in some myeloid and leukemia T cell lines (15). Together these studies indicate that $\alpha 2\beta 1$ integrin could constitute the major $\beta 1$ integrin survival pathway operating in T-ALL cells.

Coll I/ $\alpha 2\beta 1$ integrin interaction not only inhibited doxorubicin-induced apoptosis but also promoted clonogenic growth of T-ALL cells. Taken together with our previous study that has shown that $\alpha 2\beta 1$ integrin reduces chemotherapy-induced apoptosis in breast cancer cells (25), our results strongly suggest that $\alpha 2\beta 1$ integrin can be an important pathway contributing to the development of drug resistance in T-ALL and other cancer cells.

In our study, we used soluble Coll I to ligate $\alpha 2\beta 1$ integrin since T-ALL cell lines attach poorly to immobilized ECM. We and others have reported that in Jurkat cells, soluble Coll

I binds to $\alpha 2\beta 1$ integrin and induces intracellular signaling (13,14,19,27,37). Soluble ECM ligands also induce intracellular signaling and modulate cell behavior in solid tumors. Soluble Coll I has been shown to influence TGF β receptor signaling and gene expression in breast cancer cells (38,39), and soluble integrin ligands such as Coll I also rescue neuroblastoma cells from apoptosis under nonadherent conditions (40). ECM remodelling and degradation by metalloproteinases, which is associated with cancer growth and invasion, is likely to lead to the release of ECM components that can act as “soluble” peptides within the tumor microenvironment. T cell malignancies are also associated with metalloproteinases and ECM remodeling as well as dissemination (41-44). Thus, our study suggests that the Coll I released from tissue ECM can bind to $\alpha 2\beta 1$ integrin, and provides T-ALL cells with a survival advantage against the cytotoxic effect of doxorubicin. In addition to soluble Coll I, we found that co-culture of Jurkat cells with MSCs protected them from doxorubicin-induced apoptosis, which is in agreement with a previous report (28). Moreover, our results showed that the protective effect of MSCs also involves $\alpha 2\beta 1$ integrin. Interestingly, the study of Guo et al reported that the effect of MSCs on Jurkat cell resistance to doxorubicin involves Notch1 signaling (28). Together these studies suggest that MSCs are likely to activate several signaling pathways to support T-ALL resistance to chemotherapy. Although it remains to be tested, it is also possible that a crosstalk exists between Notch1 and $\alpha 2\beta 1$ integrin pathways in T-ALL chemoresistance. Since MSCs are known to produce and to express at their cell surface various ECM proteins including type I collagen ($\alpha 2\beta 1$ integrin ligand) (45), our study indicates that interactions of T-ALL cells with MSCs via $\alpha 2\beta 1$ integrin can constitute one important signaling pathway in their resistance against doxorubicin-induced apoptosis.

Mitochondria death pathway plays a critical role in drug-induced apoptosis including in doxorubicin-induced apoptosis (29,30). Our results demonstrate that the protective effect of Coll I occurs at the level of the mitochondria. We found that Coll I reduces mitochondrial membrane depolarization, cytochrome C release, activation of caspase-9 and caspase-3, and maintained the levels of prosurvival Mcl-1 levels in doxorubicin-treated cells. Coll I signaling had no effect on the basal levels of Bcl-xL, Bcl-2 and Mcl-1, but it prevented doxorubicin from downregulating Mcl-1 protein levels. In agreement with our results, doxorubicin-induced apoptosis in leukemic cell lines has recently been associated with the

downmodulation of Mcl-1 levels and the subsequent activation of the mitochondria death pathway (30). Knockdown experiments showed that the maintenance of Mcl-1 levels by Coll I is necessary for the inhibition of doxorubicin-induced mitochondrial membrane depolarization and apoptosis. Together, these results indicate that Coll I/ $\alpha 2\beta 1$ integrin signaling regulates doxorubicin-induced apoptosis of T-ALL cells by maintaining Mcl-1 levels; which contributes to the protection of mitochondria. Interestingly, Mcl-1 knockdown in T-ALL cells led to an increase in basal cell apoptosis. This effect has also been observed in different tumor cells including melanoma (23) and myeloma (46), further emphasizing the importance of Mcl-1 in regulating mitochondria integrity and cell survival.

We also demonstrated that the maintenance of Mcl-1 levels by Coll I signaling in doxorubicin-treated cells could be attributed to the inhibition of doxorubicin-induced JNK activation. Indeed, we found that doxorubicin-induced downregulation of Mcl-1 levels is mediated via JNK, and that Coll I inhibited doxorubicin-induced JNK activation. Our results showed that JNK is important for doxorubicin-induced caspase activation and apoptosis in T-ALL cells, which is in line with previous studies (29,33). In addition, JNK has also been involved in the degradation of Mcl-1 through its phosphorylation and ubiquitination; a pathway that has recently been shown to play a key role in the sensitization of breast cancer cells to TRAIL by antimicrotubules agents (47) and in the synergy between the Bcl-2 pan-inhibitor ABT-737 and retinamide in the apoptosis of lymphoblastic leukemia cells (48). Thus, our study showed that inhibiting activation of JNK; which led to the maintenance of Mcl-1 levels, is one important mechanism accounting for $\alpha 2\beta 1$ integrin-mediated doxorubicin resistance. Our results demonstrated that the prosurvival effect of Coll I is mediated through the activation of the MAPK/ERK but not the PI3 kinase/AKT survival pathway. In agreement with our previous report (13), we found that Coll I increases the phosphorylation of ERK but not AKT. We also show that activation of MAPK/ERK is required for the inhibitory effect of Coll I on doxorubicin-induced JNK activation. In agreement with our results, activation of MAPK/ERK has been reported to negatively affect the activation of the JNK pathway in leukemic cell lines treated with the proteasome inhibitor bortezomib (49).

We found that Fbn, which did not activate the MAPK/ERK pathway (13,19), had no effect on apoptosis, or on Mcl-1 levels or JNK activation. This suggests that the differential ability of $\beta 1$ integrins to regulate doxorubicin-induced apoptosis could be due, at least in part, to their differential ability to activate the MAPK/ERK survival pathway. These results further support the role of Coll I/ $\alpha 2\beta 1$ integrin signaling pathway in the resistance of T-ALL cells to drug-induced apoptosis, and suggest that targeting $\alpha 2\beta 1$ integrin/MAPK/ERK pathway can be beneficial for the treatment of T-ALL.

Our study reported for the first time that $\alpha 2\beta 1$ integrin can be expressed on primary T-leukemic blasts obtained from patients with T-ALL. We showed that Coll I but not Fbn protected T-ALL blasts from doxorubicin-induced apoptosis. These results indicate that the prosurvival function of $\alpha 2\beta 1$ is not restricted to T cell lines but could have a clinical implication as well. Analysis of a larger number of samples will be necessary to establish if $\alpha 2\beta 1$ integrin expression and function correlate with drug resistance and patient relapse. In support of our findings, Cleaver et al recently reported in three different cohorts that $\alpha 2\beta 1$ integrin (VLA-2) mRNA expression levels correlated with the resistance of pediatric T-ALL to the treatment with glucocorticoids (50), suggesting that $\alpha 2\beta 1$ can represent an important survival pathway contributing to drug resistance of T-ALL cells. Because of the limited availability of T-ALL samples, we did not examine in details the mechanisms by which Coll I protected primary T-ALL blasts from doxorubicin-induced apoptosis. However, the fact that JNK has been involved in doxorubicin-induced apoptosis of T-ALL blasts (29), and that we found that the MEK-1/ERK inhibitor abrogated the protective effect of Coll I in primary T-ALL blasts, argues in favor of the possibility that Coll I-mediated protection in primary T cell blasts, occurs through the same mechanism demonstrated in T-ALL cell lines.

Thus, our study has unraveled a $\beta 1$ integrin survival signaling pathway operating in T-ALL cells in which ligation of $\alpha 2\beta 1$ integrin with Coll I inhibits doxorubicin-induced apoptosis (depicted in Figure 6). Doxorubicin activates JNK, which induces the downmodulation of Mcl-1 levels; thus allowing the activation of the mitochondria death pathway (cytochrome C release and caspase activation). Ligation of $\alpha 2\beta 1$ integrin with Coll I activates the MAPK/ERK survival pathway, which inhibits doxorubicin-induced JNK activation, leading

to the maintenance of Mcl-1 levels. In turn, Mcl-1 protects the cells from doxorubicin-induced mitochondria cell death, thus promoting doxorubicin resistance. The mechanisms by which Coll I inhibits doxorubicin-induced JNK activation are not clear but a previous study reported that in Jurkat T cells, doxorubicin-induced JNK activation is dependent on caspase-2 and PKC δ activities (29). Thus, it is tempting to speculate that the inhibitory effect of Coll I could be at the level of either caspase-2 or PKC δ . These studies are currently underway in our laboratory.

Further elucidation of the mechanisms by which $\alpha 2\beta 1$ integrin signaling regulates drug-induced apoptosis in T-ALL cells and other cancer cells is likely to lead to new therapeutic avenues.

2.7 References

1. Desgrosellier, J. S., and Cheresch, D. A. (2010) *Nat Rev Cancer* 10, 9-22
2. Frisch, S. M., and Ruoslahti, E. (1997) *Curr Opin Cell Biol* 9, 701-706
3. Carlson, T. R., Hu, H., Braren, R., Kim, Y. H., and Wang, R. A. (2008) *Development* 135, 2193-2202
4. Manohar, A., Shome, S. G., Lamar, J., Stirling, L., Iyer, V., Pumiglia, K., and DiPersio, C. M. (2004) *J Cell Sci* 117, 4043-4054
5. Aoudjit, F., and Vuori, K. (2000) *Blood* 95, 2044-2051
6. Aoudjit, F., and Vuori, K. (2001) *J Cell Biol* 152, 633-643
7. Damiano, J. S., Cress, A. E., Hazlehurst, L. A., Shtil, A. A., and Dalton, W. S. (1999) *Blood* 93, 1658-1667.
8. Mudry, R. E., Fortney, J. E., York, T., Hall, B. M., and Gibson, L. F. (2000) *Blood* 96, 1926-1932
9. Hazlehurst, L. A., Argilagos, R. F., Emmons, M., Boulware, D., Beam, C. A., Sullivan, D. M., and Dalton, W. S. (2006) *Cancer Res* 66, 2338-2345
10. Estrugo, D., Fischer, A., Hess, F., Scherthan, H., Belka, C., and Cordes, N. (2007) *PLoS One* 2, e269
11. Ivanoff, J., Talme, T., and Sundqvist, K. G. (2005) *Immunology* 114, 53-62
12. Meads, M. B., Hazlehurst, L. A., and Dalton, W. S. (2008) *Clin Cancer Res* 14, 2519-2526
13. Gendron, S., Couture, J., and Aoudjit, F. (2003) *J Biol Chem* 278, 48633-48643
14. Bijian, K., Zhang, L., and Shen, S. H. (2007) *Mol Immunol* 44, 3682-3690
15. Sugahara, H., Kanakura, Y., Furitsu, T., Ishihara, K., Oritani, K., Ikeda, H., Kitayama, H., Ishikawa, J., Hashimoto, K., Kanayama, Y., and et al. (1994) *J Exp Med* 179, 1757-1766
16. Fulda, S., and Debatin, K. M. (2006) *Oncogene* 25, 4798-4811
17. Kelly, P. N., and Strasser, A. (2011) *Cell Death Differ* 18, 1414-1424
18. Lindsay, J., Esposti, M. D., and Gilmore, A. P. (2011) *Biochim Biophys Acta* 1813, 532-539

19. Chetoui, N., Gendron, S., Chamoux, E., and Aoudjit, F. (2006) *Mol Immunol* 43, 1687-1693
20. Celebi, B., Mantovani, D., and Pineault, N. (2011) *J Immunol Methods* 370, 93-103
21. Pillozzi, S., Masselli, M., De Lorenzo, E., Accordi, B., Cilia, E., Crociani, O., Amedei, A., Veltroni, M., D'Amico, M., Basso, G., Becchetti, A., Campana, D., and Arcangeli, A. (2011) *Blood* 117, 902-914
22. Weisberg, E., Wright, R. D., McMillin, D. W., Mitsiades, C., Ray, A., Barrett, R., Adamia, S., Stone, R., Galinsky, I., Kung, A. L., and Griffin, J. D. (2008) *Mol Cancer Ther* 7, 1121-1129
23. Chetoui, N., Sylla, K., Gagnon-Houde, J. V., Alcaide-Loridan, C., Charron, D., Al-Daccak, R., and Aoudjit, F. (2008) *Mol Cancer Res* 6, 42-52
24. Ozgen, U., Savasan, S., Buck, S., and Ravindranath, Y. (2000) *Cytometry* 42, 74-78
25. Aoudjit, F., and Vuori, K. (2001) *Oncogene* 20, 4995-5004
26. Chan, B. M., Wong, J. G., Rao, A., and Hemler, M. E. (1991) *J Immunol* 147, 398-404
27. Van de Walle, G. R., Vanhoorelbeke, K., Majer, Z., Illyes, E., Baert, J., Pareyn, I., and Deckmyn, H. (2005) *J Biol Chem* 280, 36873-36882
28. Guo, D., Ye, J., Li, L., Dai, J., Ma, D., and Ji, C. (2009) *Leuk Lymphoma* 50, 270-278
29. Panaretakis, T., Laane, E., Pokrovskaja, K., Bjorklund, A. C., Moustakas, A., Zhivotovsky, B., Heyman, M., Shoshan, M. C., and Grander, D. (2005) *Mol Biol Cell* 16, 3821-3831
30. Lopez-Royuela, N., Perez-Galan, P., Galan-Malo, P., Yuste, V. J., Anel, A., Susin, S. A., Naval, J., and Marzo, I. (2010) *Biochem Pharmacol* 79, 1746-1758
31. Matter, M. L., and Ruoslahti, E. (2001) *J Biol Chem* 276, 27757-27763
32. Saldanha-Gama, R. F., Moraes, J. A., Mariano-Oliveira, A., Coelho, A. L., Walsh, E. M., Marcinkiewicz, C., and Barja-Fidalgo, C. (2010) *Biochim Biophys Acta* 1803, 848-857
33. Krilleke, D., Ucur, E., Pulte, D., Schulze-Osthoff, K., Debatin, K. M., and Herr, I. (2003) *Int J Cancer* 107, 520-527
34. Thomas, L. W., Lam, C., and Edwards, S. W. (2010) *FEBS Lett* 584, 2981-2989
35. Aoudjit, F., Guo, W., Gagnon-Houde, J. V., Castaigne, J. G., Alcaide-Loridan, C., Charron, D., and Al-Daccak, R. (2004) *Exp Cell Res* 299, 79-90

36. Damle, N. K., Klussman, K., Leytze, G., Aruffo, A., Linsley, P. S., and Ledbetter, J. A. (1993) *J Immunol* 151, 2368-2379
37. Holleran, B. J., Barbar, E., Payet, M. D., and Dupuis, G. (2003) *J Leukoc Biol* 73, 243-252
38. Garamszegi, N., Garamszegi, S. P., Samavarchi-Tehrani, P., Walford, E., Schneiderbauer, M. M., Wrana, J. L., and Scully, S. P. (2010) *Oncogene* 29, 2368-2380
39. Garamszegi, N., Garamszegi, S. P., Shehadeh, L. A., and Scully, S. P. (2009) *Mol Cancer Res* 7, 319-329
40. Bozzo, C., Bellomo, G., Silengo, L., Tarone, G., and Altruda, F. (1997) *Exp Cell Res* 237, 326-337.
41. Aoudjit, F., Masure, S., Opdenakker, G., Potworowski, E. F., and St-Pierre, Y. (1999) *Int J Cancer* 82, 743-747
42. Bouchard, F., Belanger, S. D., Biron-Pain, K., and St-Pierre, Y. (2010) *Blood* 116, 759-766
43. Ishihara, M., Nishida, C., Tashiro, Y., Gritli, I., Rosenkvist, J., Koizumi, M., Okaji, Y., Yamamoto, R., Yagita, H., Okumura, K., Nishikori, M., Wanaka, K., Tsuda, Y., Okada, Y., Nakauchi, H., Heissig, B., and Hattori, K. (2011) *Leukemia*
44. Vacca, A., Ribatti, D., Ria, R., Pellegrino, A., Bruno, M., Merchionne, F., and Dammacco, F. (2000) *Dev Immunol* 7, 77-88
45. Juneja, H. S., Rajaraman, S., Gay, R. E., Gay, S., and Schmalsteig, F. C. (1992) *Exp Hematol* 20, 1263-1270
46. Derenne, S., Monia, B., Dean, N. M., Taylor, J. K., Rapp, M. J., Harousseau, J. L., Bataille, R., and Amiot, M. (2002) *Blood* 100, 194-199
47. Sanchez-Perez, T., Ortiz-Ferron, G., and Lopez-Rivas, A. (2010) *Cell Death Differ* 17, 883-894
48. Kang, M. H., Wan, Z., Kang, Y. H., Sposto, R., and Reynolds, C. P. (2008) *J Natl Cancer Inst* 100, 580-595
49. Yu, C., Rahmani, M., Dent, P., and Grant, S. (2004) *Exp Cell Res* 295, 555-566
50. Cleaver, A. L., Beesley, A. H., Firth, M. J., Sturges, N. C., O'Leary, R. A., Hunger, S. P., Baker, D. L., and Kees, U. R. (2010) *Mol Cancer* 9, 105

2.8 Acknowledgements

The authors are grateful to Drs. Jean Charron (Laval University, Canada), Kristiina Vuori (The Burnham Institute, CA) and Shaomeng Wang (University of Michigan, MI) for providing the plasmids; to Dr Nicholas Pineault (Hema-Québec; Québec, Canada) for providing us with human bone marrow mesenchymal cells; to Drs Jean Soulier (INSERM U944) and Daniela Geromin (Saint-Louis Hospital's Tumor Biobank) Hôpital Saint Louis, Paris, France for their help in obtaining the T-ALL blasts.

2.9 Footnotes

*This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research to FA (MOP-98005).

¹To whom correspondence should be addressed: Centre de recherche en Rhumatologie/immunologie, Centre hospitalier Universitaire de Québec, Pavillon CHUL, and Faculté de médecine, Université Laval, 2705 Blvd Laurier, Local T1-49, Québec, QC, Canada G1V4G2

¹DN is a recipient of a doctoral fellowship from Université Laval

²LL is a recipient of a doctoral fellowship from the French Ministry of Education.

2.10 Figures and legends

Figure 1: Coll I inhibits doxorubicin-induced apoptosis. The T cell lines Jurkat (a) and HSB-2 (b) were preactivated or not for 4 h with Coll I or with Fbn, after which they were treated or not for 16 h with doxorubicin. At the end of cell culture, cell apoptosis was determined by Annexin V staining and flow cytometry analysis (Jurkat) or by DNA fragmentation ELISA assay (HSB-2) as described under “Experimental Procedures” section. Similar results were obtained when apoptosis was measured after 24 h of doxorubicin treatment (data not shown). (c) Jurkat cells were preactivated for 4 h with Coll I, Fbn, or with Coll I+Fbn. The cells were then treated or not for 16 h with doxorubicin, and apoptosis was determined by Annexin V staining and flow cytometry analysis. (d) Jurkat cells were preincubated or not for 1 h with 10 μ g/ml of control (IgG), anti- α 2, or anti- β 1 integrin blocking antibodies before being activated with Coll I for 4 h. The cells were then treated or not with doxorubicin for 16 h, and apoptosis was determined by DNA fragmentation ELISA assay. The results in the four panels are presented as mean values from three independent experiments with S.D. as indicated. * p <0.05 between doxorubicin+Coll I and doxorubicin samples. ** p <0.05 between doxorubicin+Coll I and doxorubicin samples, and between doxorubicin+Coll I and doxorubicin+anti- α 2- or doxorubicin+anti- β 1 samples. (e) MSCs inhibit doxorubicin-induced apoptosis of Jurkat cells via α 2 β 1 integrin. Jurkat cells were cultured in suspension or with a monolayer of MSCs as described under “Experimental Procedures” section. Twenty four hours after doxorubicin treatment, Jurkat cells were separated from MSCs by pipetting with ice-cold PBS. As indicated, Jurkat cells were preincubated for 1 h with 10 μ g/ml of anti- α 2 or anti- β 1 integrin blocking antibodies or control isotypic antibody (IgG), washed with PBS and then co-cultured with MSCs. Apoptosis was determined by annexin V staining and FACS analysis. The results are presented as mean values from two independent experiments. * p <0.05 between samples of Jurkat cells co-cultured with MSCs treated with doxorubicin and samples of Jurkat cells cultured in suspension treated with doxorubicin, or with samples of Jurkat cells co-cultured with MSCs treated with doxorubicin in the presence of anti- α 2- and anti- β 1 antibodies, (f) Clonogenic survival of the T-ALL cell lines Jurkat (left panel) and HSB-2 (right panel) was determined as described under “Experimental Procedures” section. The results represent mean values of two independent experiments

with SD as indicated. * $p < 0.05$ between doxorubicin+Coll I samples and doxorubicin+Fbn or doxorubicin samples.

Figure 2: Coll I inhibits doxorubicin-induced mitochondria apoptosis by maintaining the levels of Mcl-1. (a) Coll I inhibits doxorubicin-induced loss of mitochondrial membrane potential. Jurkat cells were preactivated for 4 h with Coll I or Fbn, after which they were treated for 16 h with doxorubicin (Dox). The loss of the mitochondrial membrane potential (low $\Delta\Psi_m$) was measured by DioC6(3) staining and flow cytometry analysis. The results represent mean values of three independent experiments with SD as indicated. * $p < 0.05$ between Dox+Coll I and Dox samples. (b) Coll I inhibits doxorubicin-induced cytochrome C release. After activation, the cytosolic fractions were prepared and analyzed by immunoblotting using anti-cytochrome C (cyt C) Ab. The blot was stripped and reprobbed with anti-($\Delta\Psi_m$). β -actin Ab to confirm equal loadings. (c) Coll I inhibits doxorubicin-induced caspase activation. The cells were activated as in (a) and after cell lysis, activation of caspase-9 and -3 was determined by immunoblot analysis using specific anti-caspase-9 and anti-caspase-3 antibodies that recognize the native forms and the active fragments of caspases. The membrane was stripped and reprobbed with anti-b-actin antibody to confirm equal loading. The results in (b) and (c) are representative of three independent experiments. (d) Coll I maintains Mcl-1 levels in doxorubicin-treated cells. The cells were preactivated with Coll I or Fbn, after which they were treated for 12 h with doxorubicin (Dox). After treatment, the cells were lysed and the expression of Mcl-1, Bcl-2 and Bcl-xL was determined by immunoblot analysis using specific antibodies. The blots were stripped and reprobbed with anti- β -actin antibody to ensure equal loading. The results are representative of three independent experiments. (e) Mcl-1 siRNA abolishes the protective effect of Coll I. Jurkat cells were transfected with control siRNA or with Mcl-1 siRNA. After transfection, the cells were activated with Coll I and treated or not with doxorubicin (Dox). Expression of Mcl-1 protein in control and in Mcl-1 siRNA transfected cells was assessed by immunoblot analysis, and β -actin levels were determined as control to ensure equal loading (left panel). Apoptosis of cells transfected with control and Mcl-1 siRNA was determined after 16 h of treatment with doxorubicin by measuring the loss of the mitochondrial membrane potential (right panel). The results represent mean values of three

independent experiments with SD as indicated. * $p < 0.05$ between Dox+Coll I and Dox samples in control siRNA-transfected cells.

Figure 3: Coll I inhibits doxorubicin-induced JNK activation. (a) Doxorubicin activates JNK in Jurkat cells. The cells were treated with doxorubicin for the indicated periods of time and JNK activation was determined by immunoblot analysis using a specific antibody recognizing the phosphorylated forms of JNK1/2. The blot was stripped and reprobed with anti-JNK-2 antibody to ensure equal loading. (b) Activation of JNK is necessary for doxorubicin-induced Mcl-1 downregulation. The cells were treated for 12 h with doxorubicin (Dox) in the absence or in the presence of 10 μM of the JNK inhibitor SP600125. The cells were lysed and expression of Mcl-1 protein was determined by immunoblot analysis. The blot was stripped and reprobed with anti- β -actin antibody to ensure equal loading. (c) Coll I but not Fbn blocks the ability of doxorubicin to activate JNK. The cells were preactivated or not with Coll I or Fbn and then treated for 12 h with doxorubicin (Dox). JNK activation was determined by immunoblot analysis as described above. The results shown in the three panels are representative of three independent experiments. Non-specific bands are indicated as “NS” (Panel a and c).

Figure 4: The protective effect of Coll I is dependent on MAPK/ERK but not on PI3 Kinase /AKT pathway. Jurkat cells were activated for 4 h with Coll I in the presence or absence of doxorubicin (Dox) and activation of ERK (a) and AKT (b) was determined by immunoblot analysis using specific antibodies recognizing the phosphorylated forms of ERK1/2 and AKT. The blots were stripped and reprobed with anti-ERK2 and anti-AKT antibodies to ensure equal loadings. Similar results were found with HSB-2 cells (data not shown) (c) HSB-2 cells were pretreated or not with 10 μM of the MEK-1 inhibitor (U0126) or with 10 μM of the PI3 Kinase/AKT inhibitor (LY294002) for 1 h before being activated with Coll I for 4 h. The cells were then treated or not with doxorubicin and cell apoptosis was evaluated by DNA fragmentation ELISA assay. The results represent mean values from three independent experiments with SD as indicated. * $p < 0.05$ between doxorubicin+Coll I or doxorubicin+Coll I+LY294002 and doxorubicin samples. Similar results were found with Jurkat cells (data not shown) (d) Jurkat cells were transfected with control plasmid or with plasmids encoding dominant-negative forms of MEK-1 (DN-MEK-

1) and AKT (DN-AKT). After transfection, the cells were activated with Coll I for 4 h and then treated with doxorubicin (Dox). Apoptosis was then determined by annexin V staining and flow cytometry analysis. The results represent mean values from three independent experiments with SD as indicated. * $p < 0.05$ between Dox+Coll I and Dox samples in control and in DN-AKT-transfected cells. (e) Jurkat cells were pretreated with U0126 or with LY294002 inhibitors prior to their activation with Coll I. The cells were then treated for 12 h with doxorubicin (Dox) and the expression of Mcl-1 was determined by immunoblot analysis. The blot was stripped and reprobbed with anti- β -actin antibody to ensure equal loading. The results are representative of three independent experiments. (f) The cells were treated and activated as described in panel (e) and activation of JNK was determined by immunoblot analysis as described above. The results are representative of three independent experiments. Non-specific bands are indicated as “NS”.

Figure 5: Coll I/ $\alpha 2\beta 1$ integrin inhibits doxorubicin-induced apoptosis in primary T-ALL blasts. (a) Expression of $\alpha 2$ and $\beta 1$ integrin chains on primary T-ALL blasts was determined by immunostaining and flow cytometry analysis. The number of positive cells (%) and the mean fluorescence intensity (MFI) values are indicated. (b) Coll I reduces doxorubicin-induced apoptosis of primary T-ALL blasts. The cells were preactivated or not for 4 h with Coll I or Fbn, after which they were treated for 24 h with doxorubicin. Apoptosis was then determined by annexin V staining and flow cytometry analysis. The results represent mean values of triplicates with SD as indicated. * $p < 0.05$ between doxorubicin+Coll I and doxorubicin samples. (c) Coll I-mediated inhibition of doxorubicin-induced apoptosis in primary T-ALL blasts (patient #2) is MAPK/ERK-dependent. The cells were pretreated or not with 10 μ M of the MEK-1 inhibitor (U0126) or with 10 μ M of the PI3 kinase/AKT inhibitor (LY294002) for 1 h before being activated with Coll I for 4 h. The cells were then treated or not for 24 h with doxorubicin (Dox), and cell apoptosis was evaluated by DNA fragmentation ELISA assay. The results represent mean values of triplicates with SD as indicated. * $p < 0.05$ between Dox+Coll I and Dox samples.

Figure 6: Proposed model by which $\alpha 2\beta 1$ integrin mediates doxorubicin resistance in T-ALL cells. Doxorubicin activates JNK, which induces the downmodulation of Mcl-1 levels, thus allowing activation of the mitochondria death pathway. Ligation of $\alpha 2\beta 1$

integrin with Coll I activates the MAPK/ERK survival pathway, which inhibits the ability of doxorubicin to activate JNK and subsequently to downregulate the levels of prosurvival Mcl-1. Maintenance of Mcl-1 levels leads to the protection of mitochondria and to the inhibition of cytochrome C release and caspase activation, and subsequently to the decrease in doxorubicin-induced apoptosis.

Figure 1: Coll I inhibits doxorubicin-induced apoptosis

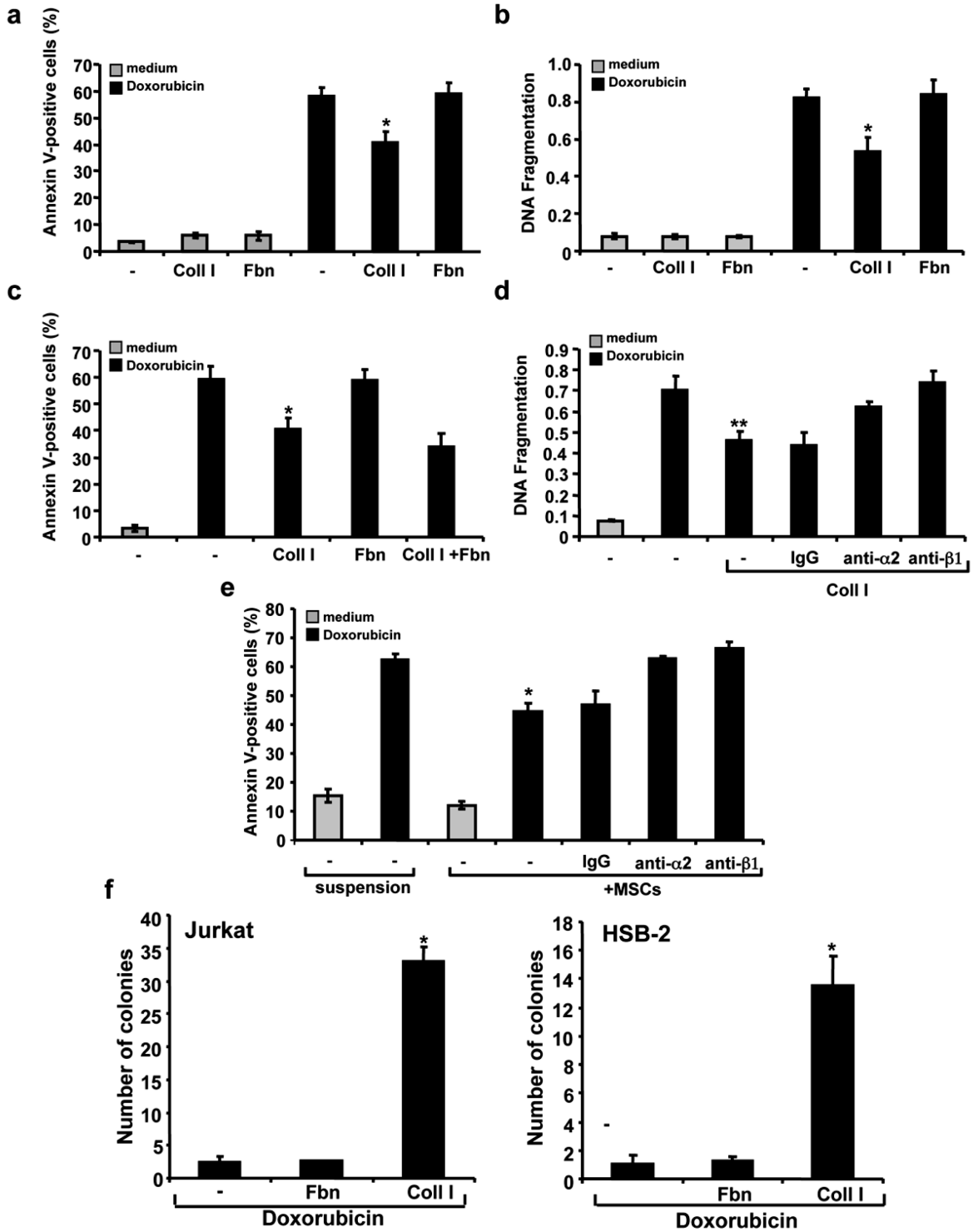


Figure 2: Coll I inhibits doxorubicin-induced apoptosis by maintaining the levels of Mcl-1

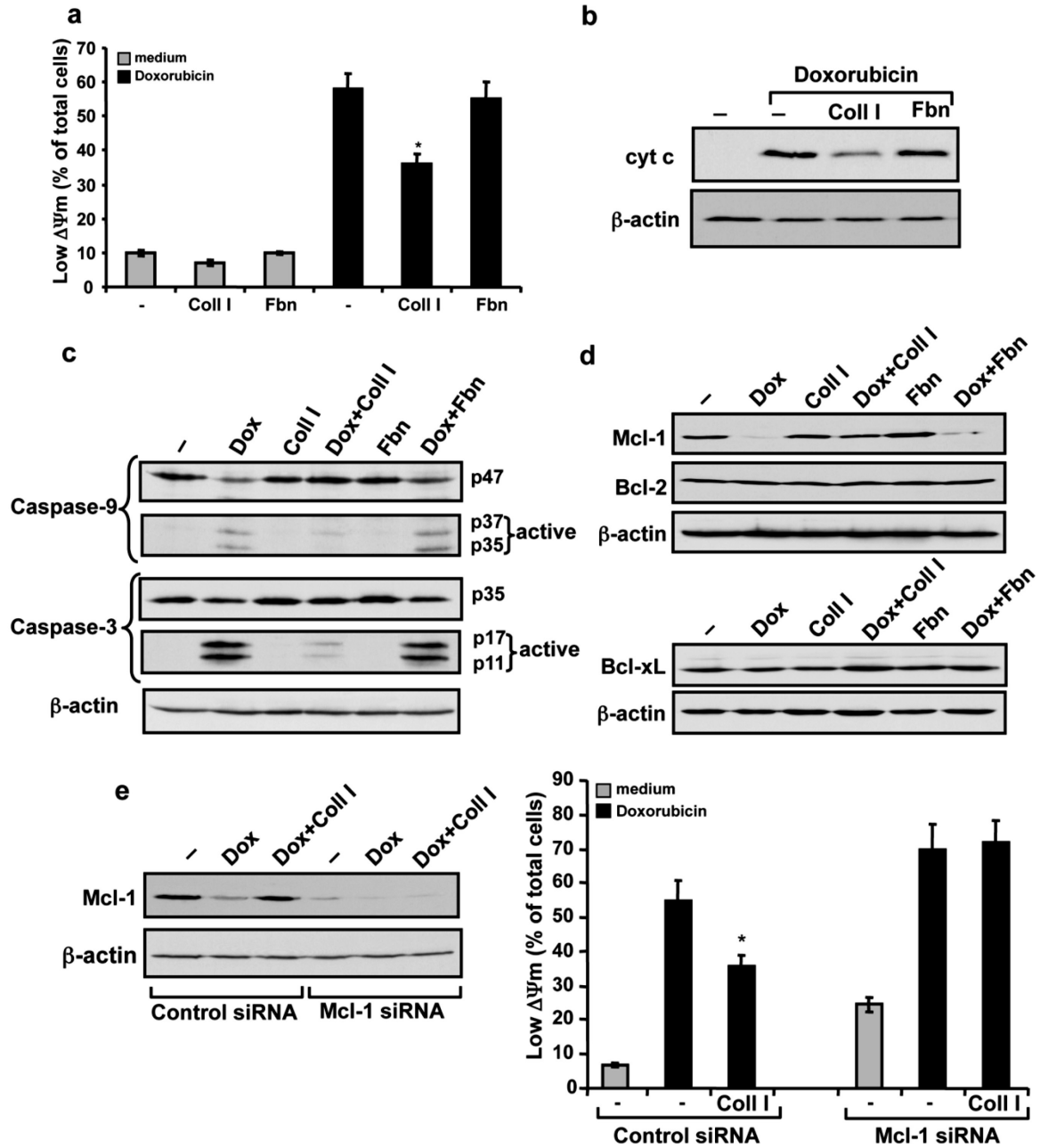


Figure 3: Coll I inhibits doxorubicin-induced JNK activation

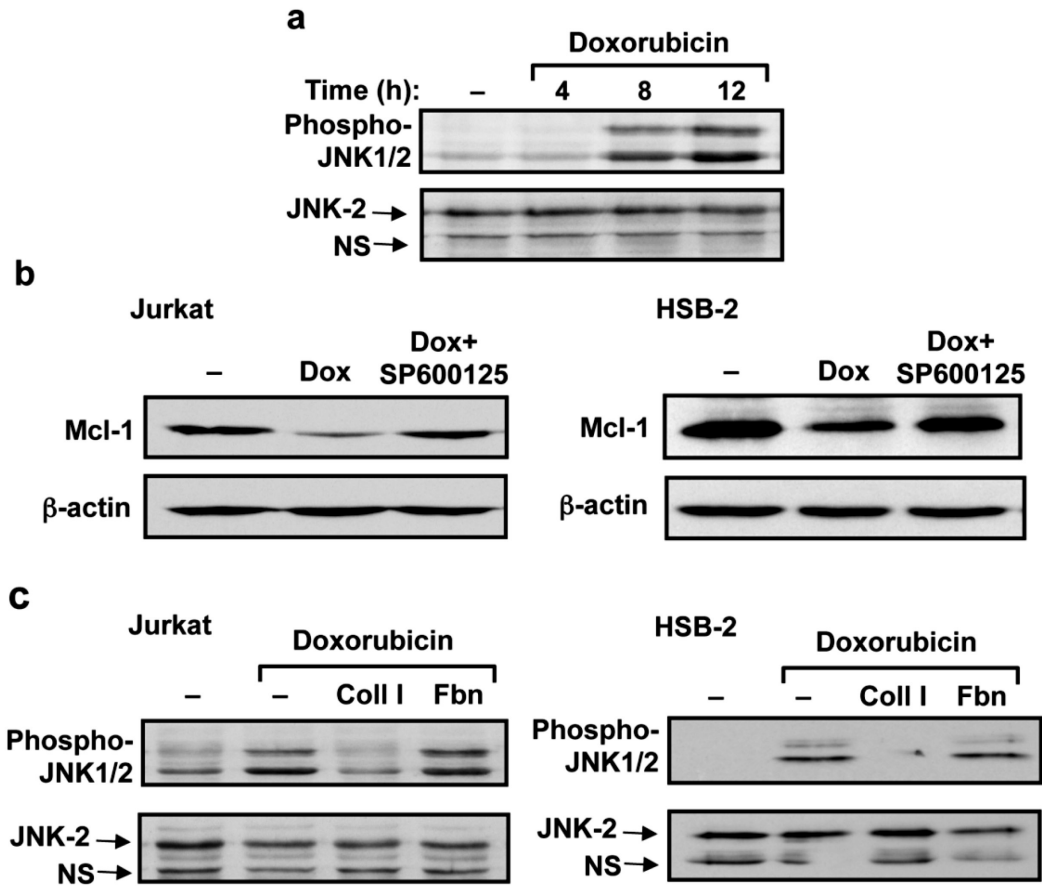


Figure 4: The protective effect of Coll I is dependent on MAPK/ERK but not on PI3Kinase/AKT pathway

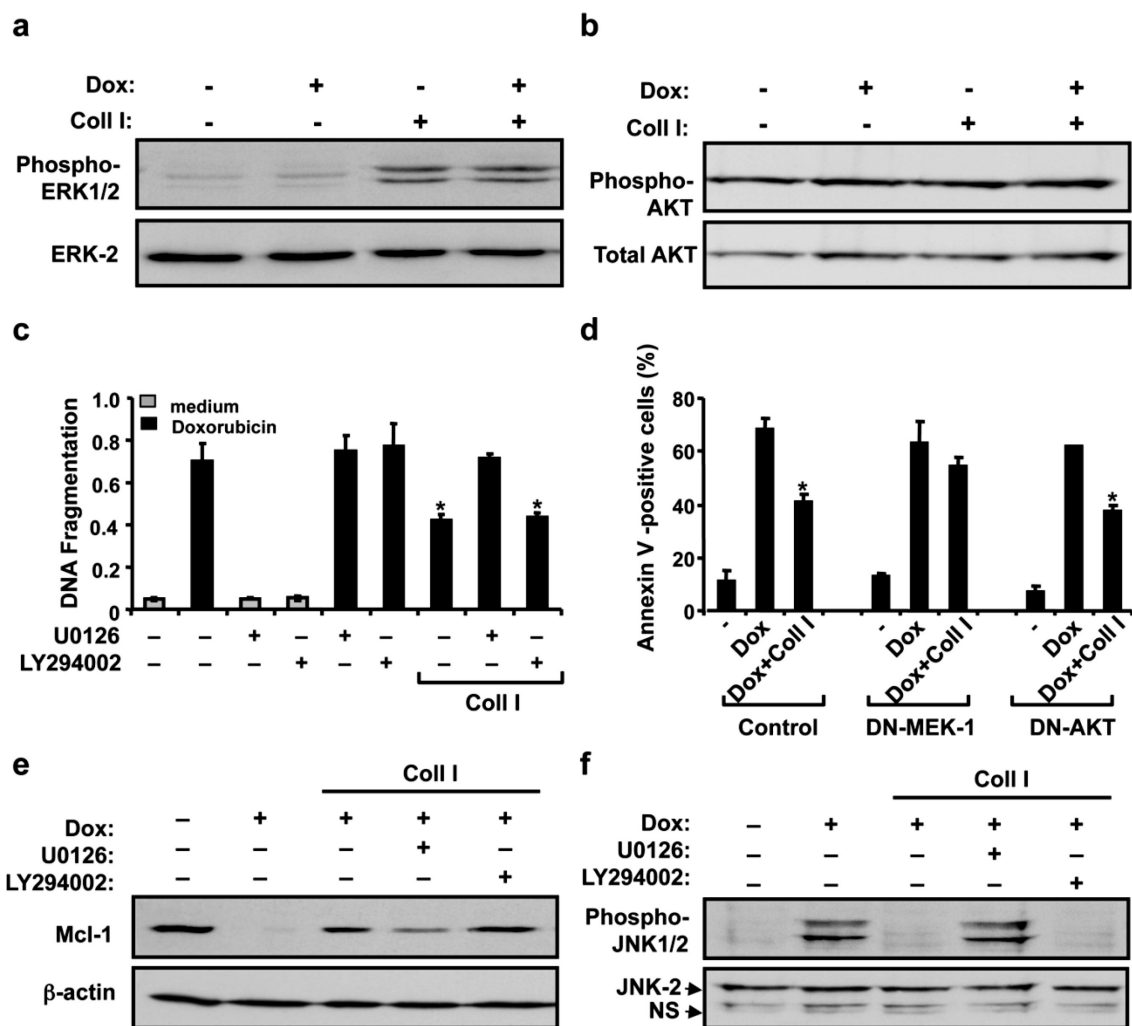


Figure 5: Coll I/ $\alpha 2\beta 1$ integrin inhibits doxorubicin-induced apoptosis in primary T-ALL blasts

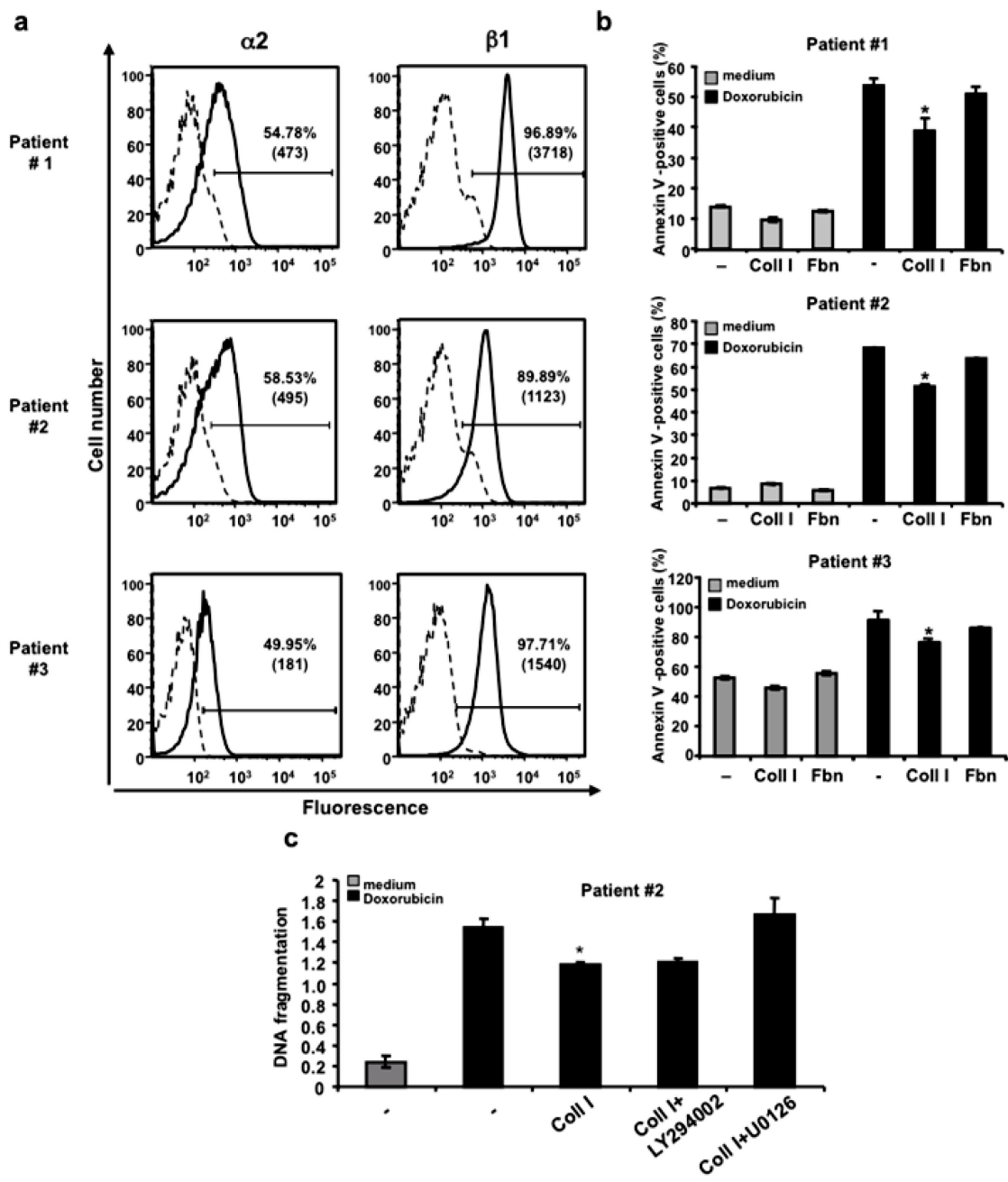
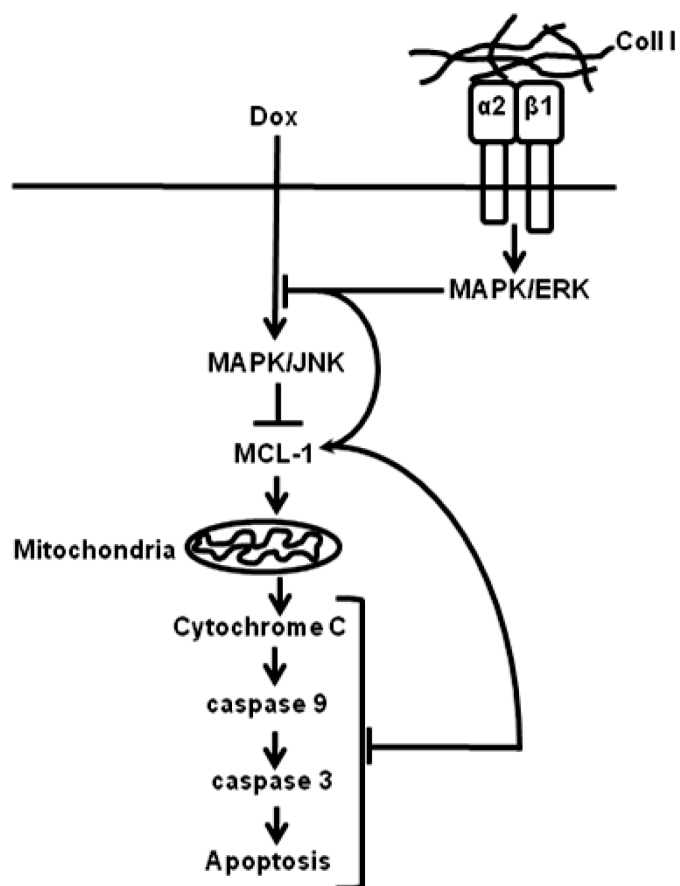
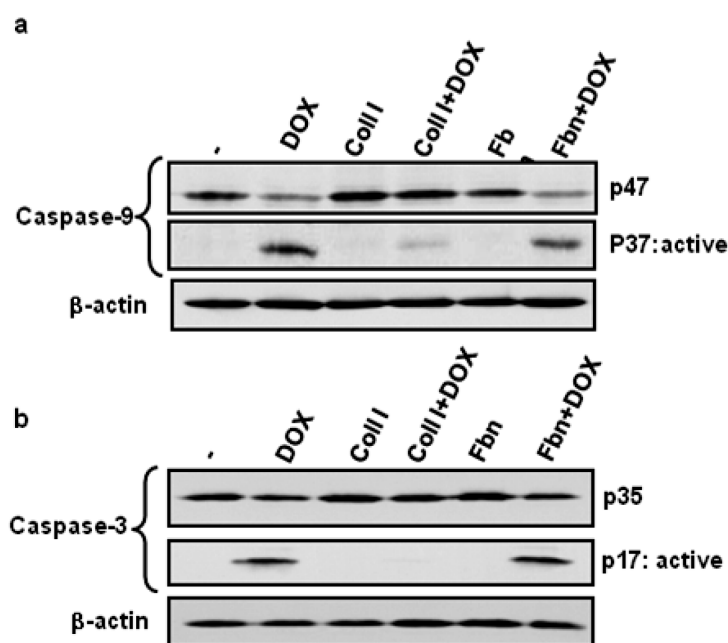


Figure 6: Proposed model by which $\alpha 2\beta 1$ integrin mediates doxorubicin resistance in T-ALL cells



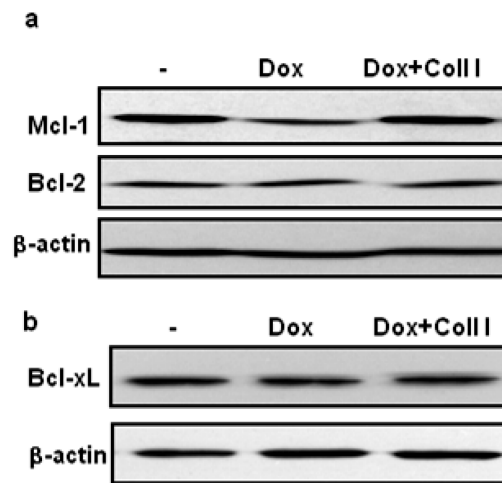
2.11 Supplementary figures and legends

Figure S1: Coll I inhibits doxorubicin-induced caspase activation in HSB-2 T cell line



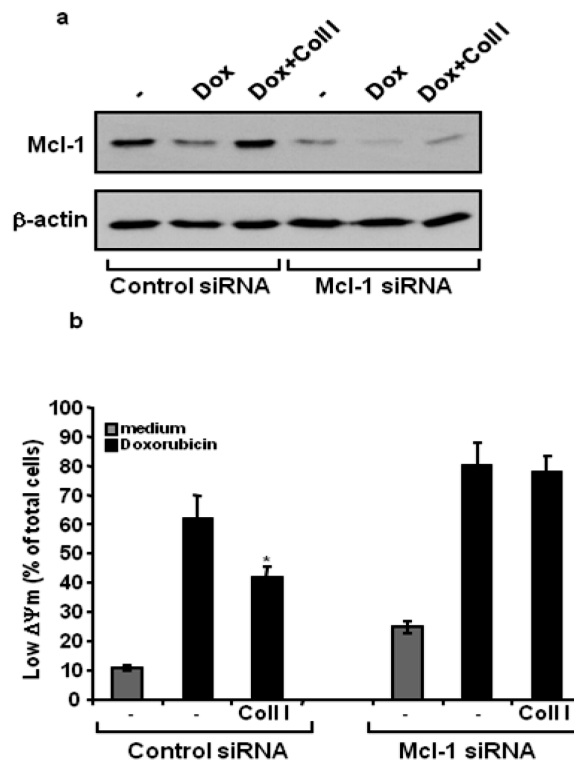
The cells were preactivated with Coll I or Fbn for 4 h, after which they were treated for 16 h with doxorubicin (Dox). The cells were lysed and activation of caspase-9 (a) and caspase-3 (b) was determined by immunoblot analysis using specific anti-caspase-9 and anti-caspase-3 antibodies that recognize the native forms and the active fragments of caspases. The membranes were stripped and reprobed with anti- β -actin antibody to confirm equal loading. The results are representative of two independent experiments.

Figure S2 : Coll I restores Mcl-1 levels in HSB-2 T cell line



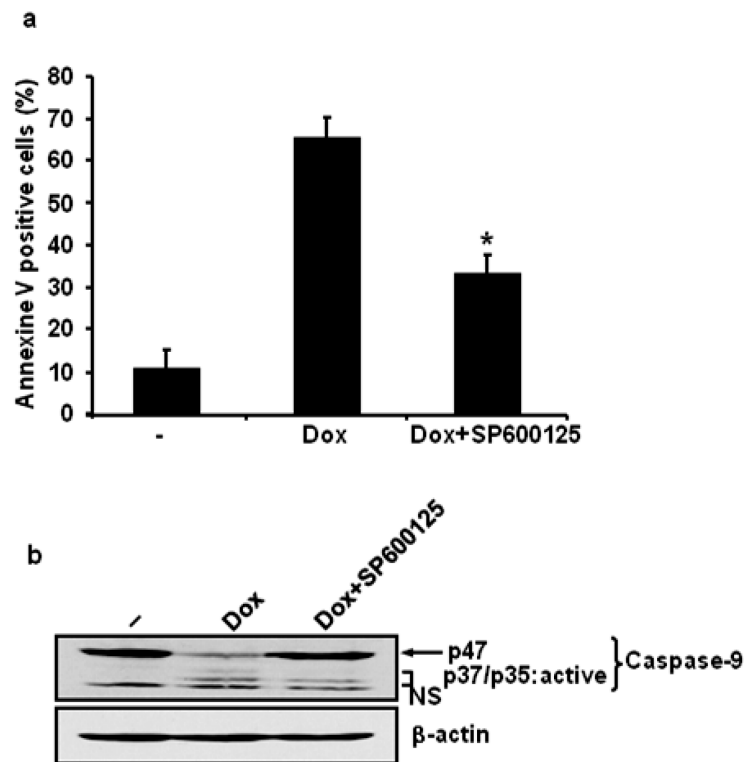
The cells were preactivated or not with Coll I, after which they were treated or not with doxorubicin (Dox) for 12 h. The cells were lysed and the expression of Mcl-1 and Bcl-2 (a) and Bcl-xL (b) was determined by immunoblot analysis using specific antibodies. The blots were stripped and reprobated with anti- β -actin antibody to ensure equal loading. The results are representative of two independent experiments.

Figure S3 : An additional Mcl-1 siRNA sequence abolishes the protective effect of Coll I



Jurkat cells were transfected with control siRNA or with Mcl-1 siRNA (ID 4170). After transfection, the cells were activated with Coll I and treated or not with doxorubicin (Dox). Expression of Mcl-1 protein levels was determined by immunoblot analysis, and β -actin levels were determined as control to ensure equal loading (panel a). Apoptosis of cells transfected with control and Mcl-1 siRNA was determined after 16 h of treatment with doxorubicin by measuring the loss of the mitochondrial membrane potential (panel b). The results represent mean values of two independent experiments with SD as indicated. $*p < 0.05$ between Dox+Coll I and Dox samples in control siRNA-transfected cells.

Figure S4 : Implication of JNK in doxorubicin-induced apoptosis



(a) HSB-2 T cells were activated with doxorubicin (Dox) in the presence or absence of 10 μ M of the JNK inhibitor SP600125. Apoptosis was determined 24 h later by Annexin V staining and flow cytometry analysis. The results represent mean values of three independent experiments with SD as indicated. $*p < 0.05$ between doxorubicin+SP600125 and doxorubicin samples. **(b)** HSB-2 cells were activated as above and 16 h later, activation of caspase-9 was determined by immunoblot analysis. (NS) indicates non-specific band. The membrane was stripped and reprobred with anti- β -actin Ab.

Chapitre III

La signalisation via l'interaction collagène/beta1 intégrine augmente l'expression du transporteur d'efflux ABCC1/MRP-1 par la voie MAPK/ERK.

3.1 Résumé

Les mécanismes par lesquels les intégrines $\beta 1$ régulent la chimiorésistance des cellules cancéreuses ne sont pas encore complètement élucidés. Dans cette étude, nous rapportons que la signalisation via les intégrines $\beta 1$ liant le collagène, mais pas la fibronectine, inhibe l'apoptose des lignées T leucémiques Jurkat et HSB2 induite par la doxorubicine et ceci *via* l'augmentation de l'expression et de l'activité du transporteur d'efflux ABCC1 (ATP-Binding Cassette C1), connu également sous le nom MRP-1 (Multi-resistance associated protein-1). L'augmentation de l'expression du transporteur ABCC1 et l'induction de l'efflux de la doxorubicine par le collagène sont dépendants de l'activation de la voie de survie MAPK/ERK et de la polymérisation du cytosquelette d'actine. L'ensemble de ces résultats indiquent que la signalisation via la voie collagène/intégrine $\beta 1$ /ERK est impliquée dans la régulation de l'expression et de la fonction d'ABCC1 et que cette activation pourrait être une voie importante dans la chimiorésistance des leucémies.

Collagen/beta1 integrin signaling upregulates the ABCC1/MRP-1 transporter in an ERK/MAPK-dependent manner.

Mohammed-Amine El Azreq*, Dalila Naci*, Fawzi Aoudjit*†.

*Centre de recherche en Rhumatologie/ immunologie, Centre hospitalier Universitaire de Québec, Pavillon CHUL, and Faculté de médecine, Université Laval.

2705 Blvd Laurier, Local T1-49, Québec, QC, Canada G1V4G2.

† Corresponding author: Centre de recherche en Rhumatologie et Immunologie

CHUQ, Pavillon CHUL 2705 Blvd Laurier, local T1-49 Ste-Foy, Québec G1V4G2 Canada

Tel: (418)656-4141 (ext. 46071) Fax :(418) 654-2765 fawzi.aoudjit @crchul.ulaval.ca

Running head: Collagen enhances ABCC1 activity.

Abbreviations: ABC, ATP binding cassette; CB, Cytochalasin B; ECM, Extracellular matrix; MRP-1, Multidrug Resistance-Related Protein-1; MDR, Multidrug Resistance; P-gP, P-glycoprotein.

3.2 Abstract

The mechanisms by which $\beta 1$ integrins regulate chemoresistance of cancer cells are still poorly addressed. In this study, we report that collagen/ $\beta 1$ integrin signaling inhibits doxorubicin-induced apoptosis of Jurkat and HSB2 leukemic T cells by upregulating the expression and function of the ATP Binding Cassette C 1 (ABCC1) transporter, also known as Multi-drug resistance-associated protein 1 (MRP-1). We found that collagen but not fibronectin reduces intracellular doxorubicin content and upregulates the expression levels of ABCC1. Inhibition and knockdown studies showed that upregulation of ABCC1 is necessary for collagen-mediated reduction of intracellular doxorubicin content, and for collagen-mediated inhibition of doxorubicin-induced apoptosis. We also demonstrate that activation of the ERK/MAPK signaling pathway is involved in collagen-induced reduction of intracellular doxorubicin accumulation, in collagen-induced upregulation of ABCC1 expression levels, and in collagen-mediated cell survival. Finally, collagen-mediated upregulation of ABCC1 expression and function also requires actin polymerization. Taken together our results indicate for the first time that collagen/ $\beta 1$ integrin/ERK signaling upregulates the expression and function of ABCC1 and suggest that its activation could represent an important pathway in cancer chemoresistance. Thus, simultaneous targeting of collagen/ $\beta 1$ integrin and ABCC1 may be more efficient in preventing drug resistance than targeting each pathway alone.

3.3 Introduction

Integrins are α/β membrane receptors that mediate cell-cell interactions and cell adhesion to the surrounding extracellular matrix (ECM). Among these receptors, the $\beta 1$ integrin subfamily is widely expressed and constitutes a major class of integrins that mediate cell interactions with ECM components including fibronectin, laminins and collagens (Humphries et al., 2006; Harburger and Calderwood, 2009). In addition to their role in cell adhesion, integrins also activate several intracellular signaling pathways such as Focal adhesion kinase, Integrin-linked kinase, Src kinases and the ERK/ MAPKinase and PI3 kinase /AKT pathways, which modulate cell growth and differentiation, migration, and survival (Lee and Juliano, 2004; Harburger and Calderwood, 2009; Streuli, 2009). In cancer, the prosurvival signals mediated by integrins-ECM interactions lead in several cases to the resistance of tumor cells to chemotherapeutic drug-induced apoptosis (Hehlhans et al., 2007; Meads et al., 2009).

Several studies have shown that integrins can protect both solid and hematological malignancies from chemotherapy-induced apoptosis by upregulating anti-apoptotic proteins and/or downmodulating the pro-apoptotic proteins of the Bcl-2 family as well as inhibiting activation of the caspase cascade (Hehlhans et al., 2007; Meads et al., 2008; Meads et al., 2009). In addition to the direct modulation of apoptotic events, resistance to chemotherapy can also result from several cell adaptations (Luqmani, 2005; Fodale et al., 2011). Indeed, the treatment efficiency could be altered in resistant malignancies by overexpressing proteins that metabolize (Roos and Bolt, 2005) or chelate (Ruzza et al., 2009) the drug more efficiently. Resistant cancer cells could also escape from chemotherapy by decreasing the drug concentrations in the cytoplasm via expressing several transporters that belongs to the ATP binding cassette (ABC) superfamily (Deeley et al., 2006; Chen and Tiwari, 2011). These proteins, through the hydrolysis of ATP, have the ability to actively promote cell detoxification by creating unidirectional flow of a wide group of endogenous (steroids, metabolites, ions) or exogenous substrates (drugs), from the cytosol to the extracellular milieu. Drug transporters of the ABC family play a central role in the development of Multidrug Resistance (MDR), a phenomenon in which cancer cells acquire cross-resistance to an array of different chemotherapeutic compounds (Luqmani, 2005; Deeley et al., 2006;

Fodale et al., 2011). MDR-1 also called ABCB1 or P-glycoprotein (P-gP), is the first member of ABC transporters that has been described (Sharom, 2011). ABCB1, along with another ABC transporter; ABCC1 also called the Multidrug Resistance-associated Protein-1 (MRP-1), are the most studied ABC transporters, and are expressed throughout normal and malignant tissues (Chen and Tiwari, 2011; Sharom, 2011).

The signaling pathways regulating the activity and the high expression levels of ABC transporters in malignant cells are not fully understood. In this study, we asked whether ECM-integrin signaling could regulate ABC transporters. We tested this possibility in leukemic T-cell lines in which we have previously shown that collagen via its integrin receptors was able to reduce doxorubicin-induced apoptosis (Gendron et al., 2005). We show that collagen increased ABCC1 expression in an ERK-dependent manner in leukemic T-cells, which consequently decreased intracellular doxorubicin amount and doxorubicin-induced apoptosis. Our results provide the first evidence of the regulation of ABCC1 by integrin signaling in cancer chemoresistance and suggest that simultaneous targeting of collagen/ β 1 integrin and ABCC1 may be more efficient in preventing drug resistance than targeting each pathway alone.

3.4 Results

3.4.1 Collagen, but not fibronectin reduces intracellular doxorubicin content.

To determine if ECM regulates the intracellular doxorubicin amount, we studied the effect of collagen and fibronectin on doxorubicin accumulation in Jurkat and HSB2 T-ALL cell lines. We show that preactivating Jurkat (figure 1A) and HSB2 cells (figure 1B) with collagen reduces the intracellular accumulation of doxorubicin as determined by flow cytometry. Quantitative analysis indicates that the intracellular doxorubicin amount is reduced in collagen-treated cells by 50 to 65% in comparison to non-treated cells (figure 1A and B; lower panels). Treatment of the cells with the collagen diluent had no effect on doxorubicin intracellular accumulation (data not shown). The effect of collagen on intracellular doxorubicin amount is also observed in cells treated with doxorubicin for 4 and 24 hours (figure S1, supplemental data).

The $\beta 1$ integrins are the major collagen receptors expressed by leukemic T cell lines (Chan et al., 1991; Aoudjit and Vuori, 2000; Ivanoff et al., 2005; Van de Walle et al., 2005). Thus, we verified if the collagen effect is mediated via $\beta 1$ integrin receptors. As shown in figure 1C, the effect of collagen on the reduction of intracellular doxorubicin content is reversed by the anti- $\beta 1$ integrin blocking antibody but not by the isotypic control antibody. In addition, the anti- $\beta 1$ antibody did not affect the accumulation of intracellular doxorubicin in absence of collagen. Together, these results indicate that collagen reduces the intracellular doxorubicin content via $\beta 1$ integrins.

In contrast to collagen, fibronectin did not regulate the intracellular doxorubicin content in Jurkat (figure 2A) and HSB2 T cell lines (figure 2B). In addition, the differential effect of collagen and fibronectin was also confirmed by fluorescence microscopy (figure 3). Indeed, collagen but not fibronectin reduces the fluorescence intensity of cells exposed to doxorubicin. Taken together, these results indicate that collagen could be the main matrix protein that reduces intracellular doxorubicin amount in T-ALL cell lines.

3.4.2 Collagen increases the expression of ABCC1.

Doxorubicin is a ligand for several ABC transporter family members including ABCC1, ABCC2, ABCC6, ABCB1, and ABCG2 (Belinsky et al., 2002; Luqmani, 2005; Deeley et al., 2006; An and Ongkeko, 2009). In addition, the ability of ABC transporters to clear their ligands from the intracellular milieu could be regulated by their expression levels (Bonhoure et al., 2006; Angelini et al., 2007). Accordingly, we studied the expression and the regulation of these drug transporters by collagen in T-ALL cell lines. Previous studies have reported that ABCC1 is the major ABC family member expressed in leukemic T-cell lines including Jurkat cells (Martel et al., 1997; van der Heijden et al., 2004; Franco and Cidlowski, 2006; Hammond et al., 2007). Similarly, we found that Jurkat and HSB2 cells express basal mRNA levels of ABCC1 but not of ABCC2, ABCC6, ABCB1 and ABCG2 transporters (figure 4). Treatment of the cells with collagen upregulates the ABCC1 mRNA levels but had no effect on the expression of other ABC transporters (figure 4). As a positive control, and as previously shown (Gutmann et al., 1999; Prime-Chapman et al., 2004; Gutmann et al., 2005), we found that the CaCo2 colorectal cancer cells express significant levels of ABCC2, ABCC6, ABCB1, and ABCG2 and weak/low levels of ABCC1 mRNA (figure 4). Doxorubicin treatment, which was previously reported to regulate ABC transporters levels (Steinbach et al., 2006), had no effect on the mRNA levels of the ABC transporters (figure 4). We then examined the expression of ABCC1 at the protein level. Immunoblot analysis shows that collagen upregulates ABCC1 levels in both Jurkat and HSB2 cells (figure 5A). In addition, flow cytometry analysis revealed that collagen treatment increased ABCC1 expression in Jurkat and HSB2 cells by 3 and 5 folds, respectively (figure 5B). Similar to the mRNA analysis, doxorubicin did not modulate the ABCC1 protein levels (figure 5A&B).

The increased of ABCC1 protein levels were maintained for at least 12 h after the addition of collagen (figure S2, supplemental data). We also found that fibronectin, which had no effect on intracellular doxorubicin content, failed to upregulate ABCC1 expression (figure 5C). The collagen effect on ABCC1 expression is mediated through β 1 integrins since it was reversed by the blocking anti- β 1 integrin mAb, which alone had no effect on ABCC1 expression (figure 5D). Taken together, these results indicate that ABCC1 is the major

transporter expressed in leukemic T cell lines and that collagen, but not fibronectin, could enhance ABCC1 activity by upregulating its expression levels in T-ALL cell lines via $\beta 1$ integrin signaling.

3.4.3 The reduction of intracellular doxorubicin content and doxorubicin-induced apoptosis by collagen involves the ABCC1 drug transporter.

Since collagen treatment strongly upregulated the expression of ABCC1 in T-ALL cells, we studied the potential implication of this transporter in the collagen-induced inhibition of intracellular doxorubicin content. As a first step, we tested if collagen would reduce the intracellular accumulation of calcein-AM, a molecule which could be transported by ABCC1 (Lebedeva et al., 2011). The results show that collagen significantly reduces the intracellular calcein-AM amounts in Jurkat (figure 6A) and HSB2 cells (figure 6B), thus supporting the implication of ABCC1.

To test the potential role of ABCC1 in collagen-induced doxorubicin efflux, we used pharmacological and genetic inhibitory strategies. Treatment of Jurkat cells with MK571, a frequently used ABCC1 inhibitor (Abdul-Ghani et al., 2006; Hammond et al., 2007), but not with the vehicle, significantly reduced the ability of collagen to decrease the intracellular doxorubicin content (figure 7A, left panel). We also used Reversan, a more recently described ABCC1 inhibitor (Burkhart et al., 2009). This compound also strongly abrogates the collagen-induced doxorubicin efflux in HSB2 cells (figure 7A, right panel). The effect of the two inhibitors was not due to cytotoxicity as we found no difference in cell viability between control and treated cells (95-96%).

The implication of ABCC1 was also studied by an siRNA knockdown approach. A specific ABCC1 siRNA markedly reduced the transporter levels in Jurkat and HSB2 cells as monitored by flow cytometry (figure 7B). Quantification analysis indicates that the ABCC1 levels were reduced by approximately 60% (figure 7B, lower panels). The reduction in ABCC1 protein levels is confirmed by immunoblot analysis (figure S3A supplemental data). The ABCC1 siRNA also reduces ABCC1 levels in collagen-treated cells (figure S3B supplemental material). Silencing ABCC1 significantly diminished the ability of collagen to reduce the intracellular accumulation of doxorubicin in Jurkat and HSB2 cells in

comparison with control siRNA transfected cells (figure 7C). Together these results demonstrate that the effect of collagen on intracellular doxorubicin content involves ABCC1.

We have previously reported that collagen protects T-ALL cell lines from doxorubicin-induced apoptosis (Gendron et al., 2005). Thus, we tested if the reduction of intracellular doxorubicin content by ABCC1 could contribute to collagen-induced T-ALL cell survival. To this end, we determined if silencing ABCC1 affects the prosurvival effect of collagen. ABCC1 silencing had no effect on spontaneous apoptosis, but strongly abrogated the ability of collagen to reduce apoptosis induced by a 16 h treatment with doxorubicin in Jurkat and HSB2 cells (figure 7D). ABCC1 siRNA had a similar effect when apoptosis was measured after 48 h of doxorubicin treatment (figure S4, supplemental data) further supporting the role of ABCC1 in collagen-induced doxorubicin resistance. Taken together, these results indicate that collagen inhibits doxorubicin-induced apoptosis by reducing its intracellular accumulation via a mechanism involving ABCC1 function.

3.4.4 ERK signaling is required for collagen-induced effects on ABCC1 activity, expression, and cell survival.

Integrin signaling leads to the activation of two major cell survival pathways including the ERK/MAPK and PI3 Kinase/AKT. We have previously shown that collagen increases the activation of ERK/MAPK but not that of PI3 kinase/AKT pathway in T-ALL cell lines (Gendron et al., 2003; Chetoui et al., 2006). Therefore, we examined the potential effect of ERK inhibition on collagen-induced ABCC1 function. As shown in figure 8, expression of a flagged dominant-negative form of MEK-1 (DN-MEK-1) in Jurkat and HSB2 cells (figure 8A) abrogated the collagen-induced reduction of intracellular doxorubicin amounts in comparison to cells transfected with the control vector (pcDNA). As a control, DN-MEK-1- but not pcDNA-transfected cells express the flag-DN-MEK-1 (figure S5, supplemental data). In addition, we found that the specific MEK/ERK inhibitor U0126, reversed collagen-induced calcein-AM efflux (figure 8B). These results indicate that ERK/MAPK is required for collagen-induced inhibition of intracellular drug accumulation. We then explored whether ERK signaling pathway regulates ABCC1 expression. The results show that DN-MEK-1-expressing Jurkat and HSB2 cells exhibit reduced ABCC1

levels in response to collagen when compared with control cells (figure 8C). Finally, DN-MEK-1 also abrogated the protective effect of collagen on doxorubicin-induced apoptosis (figure 8D). Taken together, our results indicate that collagen-induced ERK signaling in T-ALL cell lines renders them less sensitive to doxorubicin-induced apoptosis by increasing the expression levels of ABCC1, which reduces intracellular doxorubicin amounts.

3.4.5 Actin polymerization is required for collagen-induced doxorubicin efflux.

Actin polymerization has been involved in collagen-induced ERK activation in Jurkat cells (Bijian et al., 2007) and was shown to be essential for ABCC1 activity (Hummel et al., 2011). Since we have found that the effect of collagen on doxorubicin efflux and ABCC1 expression is dependent on ERK activation, we examined if actin polymerization was also part of collagen signaling in upregulating doxorubicin efflux and ABCC1 expression levels. We show that treatment of Jurkat cells with collagen substantially enhances the content of polymerized filamentous actin (F-actin) as monitored by Alexa 594-conjugated phalloidin staining and flow cytometry analysis (figure 9A). This effect was totally abrogated by cytochalasin B (CB), an inhibitor of F-actin formation (figure 9A). We then tested whether inhibition of actin polymerization affects collagen-induced doxorubicin efflux and ABCC1 expression. We found that CB significantly reduced the inhibitory effect of collagen on intracellular doxorubicin content (figure 9B) and inhibits the upregulation of ABCC1 levels by collagen (figure 9C). In the absence of CB, collagen reduced doxorubicin content by 58%. However, in the presence of CB, collagen reduced doxorubicin content by only 25%. With regard to the upregulation of ABCC1, CB strongly inhibited the ability of collagen to upregulate ABCC1 (figure 9C). The ABCC1 levels in cells treated with collagen+CB are almost equal to those in non collagen-treated cells (basal levels). Similar results were also obtained with HSB2 cells (data not shown). Together these results indicate that collagen-induced upregulation of ABCC1 expression levels and function requires actin polymerization.

3.5 Discussion

One major hurdle in anti-cancer therapy is the development of drug resistance. Thus, understanding the mechanisms contributing to this process is likely to bring new insights into the design of new therapeutical strategies. Interactions of cancer cells with ECM is recognized as a critical factor contributing to their resistance to chemotherapy-induced apoptosis. We have previously reported that collagen via its $\alpha 2\beta 1$ integrin receptor protected T-ALL cell lines from doxorubicin-induced apoptosis (Gendron et al., 2005). In this study, we demonstrate that collagen inhibits doxorubicin-induced apoptosis by promoting doxorubicin efflux via a mechanism involving activation of the ERK/MAPK and upregulation of the ABC transporter family member ABCC1. Inhibition and knockdown of ABCC1 with siRNA not only prevented collagen from reducing intracellular doxorubicin content but also abolished the protective effect of collagen on doxorubicin-induced apoptosis indicating that the reduction of intracellular doxorubicin amounts is an event that contributes to the protective effect of collagen.

Doxorubicin is a substrate for ABCC1 which has been associated with doxorubicin resistance in multi-drug resistant cancer cells (Cole et al., 1992; Bonhoure et al., 2006; Angelini et al., 2007). However, our study indicates that sensitive cancer cells such as the leukemic T-cells lines Jurkat and HSB-2, can diminish their sensitivity to doxorubicin by upregulating ABCC1. In this context, our study provides the first evidence that ABCC1 expression and activity can be regulated by $\beta 1$ integrin signaling.

One major growth site for T-ALL and other hematological malignancies is the bone marrow, which is a tissue rich in ECM such as fibronectin and collagen (Meads et al., 2008). Thus, our study suggests that by interacting with collagen, T-ALL cells could upregulate ABCC1 levels and escape the cytotoxic effect of doxorubicin and subsequently become resistant to doxorubicin. Interestingly, high levels of ABCC1 have been shown to be expressed in hematological malignancies including T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) (Martel et al., 1997; Ikeda et al., 1999; Poulain et al., 2000; Consoli et al., 2002; Hammond et al., 2007). Thus, our findings suggest an important role for collagen/ $\beta 1$ integrin signaling pathway in the upregulation of ABCC1 expression levels in these malignancies and in their resistance to drug-induced apoptosis.

In contrast to collagen, fibronectin had no effect on intracellular doxorubicin content, did not upregulate ABCC1 expression and did not protect the cells from apoptosis, despite the fact that fibronectin-binding integrins are also expressed in T-ALL cells (Ivanoff et al., 2005). The differential ability of collagen and fibronectin to upregulate ABCC1 and to promote doxorubicin resistance could be due to their differential ability to activate the ERK/MAPK survival pathway, as it will be discussed below.

Collagen did not upregulate the expression levels of other doxorubicin transporters including ABCB1, ABCC2, ABCC6 and ABCG2. In fact, ABCB1, ABCC2, ABCC6 and ABCG2 were not detected in T-ALL cell lines, which is in agreement with previous studies (Martel et al., 1997; van der Heijden et al., 2004; Franco and Cidlowski, 2006; Hammond et al., 2007). Culture of rat hepatocytes in collagen sandwich has been shown to upregulate ABCB1 (Lee, 2002; Turncliff et al., 2006). Although, the role of integrins has not been investigated but these studies support our findings and the notion that ECM- β 1 integrins interactions can regulate ABC transporters.

We also found that collagen promotes doxorubicin resistance by activating the prosurvival ERK/MAPK signaling pathway. Our results showed that inhibition of ERK reversed collagen-mediated reduction of intracellular doxorubicin content, collagen-mediated upregulation of ABCC1 expression levels and collagen-mediated inhibition of doxorubicin-induced apoptosis. The role of ERK in collagen-induced upregulation of ABCC1 in T-ALL cell lines is further supported by the fact that fibronectin, which we have previously shown to be unable to activate the ERK/MAPK pathway in Jurkat cells (Gendron et al., 2003; Chetoui et al., 2006), also failed to upregulate ABCC1 expression levels. Currently, the mechanisms by which ERK upregulates ABCC1 expression levels are unclear. One possibility is that ERK activates certain transcription factors, which can upregulate ABCC1 gene transcription. ERK can activate Ap-1, Notch1, and Sp-1 (Merchant et al., 1999; Xu et al., 2006; Goh et al., 2009), and these transcription factors have been associated with ABCC1 expression (Kurz et al., 2001; Muredda et al., 2003; Cho et al., 2011). Further studies are needed to determine how collagen/ β 1 integrin signaling upregulates ABCC1 expression.

Our results also show that actin polymerization is essential for collagen-induced upregulation of ABCC1 expression and activity. This could be explained by the fact that actin polymerization is involved in collagen-induced ERK activation in Jurkat cells (Bijian et al., 2007) and (data not shown), and ERK as shown here is important for the upregulation of ABCC1 expression levels. In addition, and as previously reported (Hummel et al., 2011), actin polymerization could also regulate the function of ABCC1 by stabilizing its localization at the plasma membrane suggesting that collagen can also enhance ABCC1 activity through inducing actin polymerization.

Collagen production in the tumor tissue can interfere with intratumoral uptake of chemotherapeutic agents (Netti et al., 2000; Loeffler et al., 2006). Thus, in addition, our study indicates that collagen can also favor drug resistance via upregulation of ABC transporters. It is interesting to note that hypoxic conditions were previously reported to modulate the expression and activation of ABC transporter such as ABCC1 (Thews et al., 2009) and ABCB1 (Lotz et al., 2007; Thews et al., 2011) in cancer cells. Moreover, hypoxia also induces collagen production (Corpechot et al., 2002; Grobe et al., 2007) suggesting that the effect of hypoxia on ABC transporters could be due to collagen signaling. Together these studies point to the importance of collagen-tumor cell interactions in the establishment of the drug resistance phenotype.

In summary, our study provides the first demonstration that collagen/ β 1 integrin contributes to doxorubicin resistance via upregulation of ABCC1. Further understanding of the mechanisms by which collagen upregulates ABCC1 is likely to lead to novel therapeutic strategies in preventing the appearance of the drug resistance phenotype.

3.6 Materials and methods

3.6.1 Reagents and antibodies

RPMI 1640, fetal bovine serum (FBS), penicillin–streptomycin and L-glutamine were purchased from Wisent (St-Bruno, QC, Canada). Collagen type I (Collagen), doxorubicin, cytochalasin B and mouse anti-Flag Ab (M2) were from sigma (St-Louis, MO). Human plasma fibronectin and the anti-ABCC1 mAb (clone QCRL-1) used in western blots were purchased from Millipore (Bellerica, MA). The MEK-1 inhibitor (U0126), the ABCC1 inhibitor (MK571), and calcein-AM were from Calbiochem (San Diego, CA). Reversan was from Cedarlane (Burlington, ON). The blocking anti- β 1 integrin (clone 4B4) and the appropriate IgG isotypic control antibodies were purchased from Beckman Coulter (Brea, CA). The FITC-conjugated anti-ABCC1 (clone QCRL-3) and the appropriate IgG isotype control antibodies used in flow cytometry analysis were from BD pharmingen (San Diego, CA). Phalloidin-Alexa Fluor 594 was from Molecular Probes (Invitrogen, Burlington, ON, Canada).

3.6.2 Cell culture

The human T-ALL cell lines Jurkat (E6.1) and HSB2 were obtained from ATCC (Manhasset, VA) and were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS), 2mmol/L glutamine and 100 unit/mL penicillin and streptomycin.

3.6.3 Flow cytometry and fluorescence microscopy analysis of intracellular drug content.

Jurkat and HSB2 cells in RPMI medium containing 2,5% FBS were activated with or without collagen, fibronectin (100 μ g/ml) or with vehicle for 4 h, and then treated with doxorubicin (250 ng/ml) or with calcein-AM (1-5 nM) for different periods of time at 37°C in the dark. The cells were then washed three times with PBS, and doxorubicin or calcein-AM intracellular contents were analyzed by flow cytometry (FACSCalibur, BD Biosciences) using the FL-2 and the FL-1 settings, respectively. The data were expressed as % of positive cells x MFI (Mean Fluorescence intensity) as previously described (Han et al., 2009; El Azreq et al., 2011).

For microscopy analysis, the cells were washed twice with PBS, fixed with 1% paraformaldehyde (30 min at 4°C in the dark) and washed with PBS. The samples were then resuspended in PBS (20 µl), and carefully spread over glass slides. Gel mount reagent (Biomedica corp) was used to mount the cover slips, which were viewed under a fluorescence microscope (Olympus BX-51) using the 40X objective connected to a digital camera (Olympus cool Snap). The general shape of the cells was observed by phase contrast and the doxorubicin content was revealed using a red excitation fluorescence filter.

3.6.4 RT-PCR analysis

Total RNA was extracted with Trizol reagent according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, Carlsbad, CA). First strand cDNA was prepared from 1 µg of total RNA using the Thermoscript RT-PCR system from Invitrogen (Carlsbad, CA). ABCC1, ABCC2, ABCC6, ABCB1, ABCG2 and β -actin transcripts were amplified by PCR using specific primers (Table 1). The amplification for each gene was in the linear curve. PCR reactions were done with 1U Taq polymerase in a total volume of 50 µl, and amplifications were carried out in a Peltier Thermal Cycler from MJ Research. ABC transporters and β -actin transcripts were amplified for 39 and 29 cycles respectively as follows: ABCC1: 94° for 30 s, 57° for 1 min, 72° for 2 min; ABCC2: 94° for 30 s, 56° for 1 min, 72° for 2 min; ABCC6: 94° for 30 s, 55° for 1 min, 72° for 2 min; ABCB1: 94° for 30 s, 55° for 1 min, 72° for 2 min; ABCG2: 94° for 30 s, 59° for 1 min, 72° for 2 min, and actin: 94° for 30 s, 58° for 35 s, 72° for 2 min. Amplified products were separated on a 2% agarose gel and were detected by RedSafe and UV illumination in a GelDoc molecular imager (Biorad).

Table 1 : Primer sequences used for RT-PCR analysis of ABCC1, ABCC2, ABCC6, ABCB1, ABCG2 and actin expression.

Protein	Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Reference
MRP1	ABCC1	AGGTCAAGCTTTCGGTGTACTG	GGACTTTCGTGTGCTCCTGA	(Hammond <i>et al.</i> , 2007)
MRP2	ABCC2	CTGCGGTGGATCTAGAGACAGA	TGCCGCACTCTATAATCTTCCC	(Hammond <i>et al.</i> , 2007)
MRP6	ABCC6	AGTTCTGTTTGTACCCACCAGTT	ACCCCTTGCTTGTGACTTCTTCTGT	(Hammond <i>et al.</i> , 2007)
MDR1	ABCB1	CCCATCATTGCAATAGCAGG	GTTCAAACCTTCTGCTCCTGA	(Noonan <i>et al.</i> , 1990)
BCRP	ABCG2	GGGTTCTCTTCTTCTGACGACC	TGGTTGTGAGATTGACCAACAGACC	(Scharenberg <i>et al.</i> , 2002)
Actin		AGCCATGCCAATCTCATCTTGT	ACGGCTGCTTCCAGCTCCTC	(Gendron <i>et al.</i> , 2005)

3.6.5 ABCC1 expression by flow cytometry.

Jurkat and HSB2 leukemic T-cell lines in RPMI medium containing 2,5% FBS were activated with or without collagen or fibronectin (100 µg/ml) for 4h before their treatment with 250 ng/ml of doxorubicin for different periods of time. The cells were washed with PBS, permeabilized with a CytoFix/CytoPerm kit (BD Biosciences) and stained with FITC-conjugated anti-ABCC1 mAb (20 µl/test) (clone QCRL-3), which recognizes an epitope located in the intracellular domain of ABCC1, or with isotypic control antibody. Stained cells were then washed and analyzed by flow cytometry (FACSCalibur, BD Biosciences). The data were expressed as % of positive cells x MFI (Mean Fluorescence intensity) as previously described (Han *et al.*, 2009; El Azreq *et al.*, 2011).

3.6.6 Immunoblot analysis.

After stimulation, the cells were washed in cold PBS and lysed in RIPA buffer containing protease and phosphatase inhibitors. Cell lysates were subjected to SDS-PAGE and analyzed by immunoblot using specific anti-ABCC1 mAb (clone QCRL-1). The blots were stripped and reprobated with control anti-β-actin Ab to ensure equal loading. In all experiments, immunoblots were visualized using an HRP-conjugated secondary antibody followed by enhanced chemiluminescence's detection (Pierce, Rockford, IL).

3.6.7 ABCC1 siRNA and silencing.

Jurkat and HSB2 T-cell lines were transfected using the Nucleofector (program C-016) (Amaxa Biosystems Cologne, Germany). Cells (5×10^6) were transfected with ON-TARGETplus smart pool (200 nM) containing a mix of four siRNA directed against ABCC1 (Dharmacon; L-007308-00-0005) (Beedholm-Ebsen et al., 2010) or with a control nonsilencing siRNA (Dharmacon). After nucleofection, cells were immediately transferred to prewarmed complete medium and were used in subsequent experiments 24 h post-transfection. The efficiency of ABCC1 silencing was assessed by western blot and flow cytometry analysis of ABCC1 expression levels.

3.6.8 Plasmid transfection

The empty plasmid (pcDNA) and the plasmid encoding the dominant-negative form of MEK-1 (DN-MEK-1) were previously used in our studies (Gendron et al., 2003; Aoudjit et al., 2004). 5×10^6 of Jurkat or HSB2 cells were transfected with 7 μ g of total plasmid DNA using the Nucleofector (program C-016) (Amaxa Biosystems, Cologne, Germany). The cells were immediately allowed to recover in pre-warmed RPMI containing 10% FBS and were used in subsequent experiments 24 h post-transfection. DN-MEK1 expression was monitored by western blot using an anti-Flag antibody.

3.6.9 Determination of apoptosis.

Jurkat and HSB2 T cells in RPMI medium containing 2,5% FBS were activated or not with collagen (100 μ g/ml) or with vehicle for 4 h. The cells were then treated with doxorubicin (250ng/ml) for 16 to 48 h. Apoptosis was determined using the Annexin V-FITC detection kit from BD Pharmingen. The cells were washed in PBS and incubated in 500 μ l of 1x buffer containing 5 μ l of Annexin V-FITC for 15 min at room temperature in the dark according to the manufacturer's protocol. The cells were then analyzed by flow cytometry using the FL-1 setting (FACSCalibur, BD Biosciences). Apoptotic cells were identified as being Annexin V-positive.

3.6.10 Determination of intracellular F-actin content

Jurkat and HSB2 T-cell lines in RPMI medium containing 2,5% FBS were incubated or not with cytochalasin B (10 μ M) for 1h. The cells were then activated or not with collagen for 4 h. The cells were washed three times with PBS, permeabilized with a CytoFix/CytoPerm kit (BD Biosciences) and stained with Alexa Fluor 594-conjugated phalloidin (1 μ M). Stained cells were washed and then analyzed by flow cytometry (FACSCalibur, BD Biosciences). Data were expressed as % of positive cells x MFI (Mean Fluorescence intensity).

3.6.11 Statistical analysis

Statistical analysis was performed by the Student's t-test. Results with $p < 0.05$ were considered statistically significant.

3.7 Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-98005) to FA. DN holds a "Pierre J. Durand" Ph.D Scholarship from "Faculté de Médecine de l'Université Laval". We thank Dr Jean Sévigny (Laval University) for providing the CaCo2 cell line.

3.8 References

- Abdul-Ghani, R., Serra, V., Gyorffy, B., Jurchott, K., Solf, A., Dietel, M., and Schafer, R. (2006). The PI3K inhibitor LY294002 blocks drug export from resistant colon carcinoma cells overexpressing MRP1. *Oncogene* 25, 1743-1752.
- An, Y., and Ongkeko, W.M. (2009). ABCG2: the key to chemoresistance in cancer stem cells. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 5, 1529-1542.
- Angelini, A., Ciofani, G., Baccante, G., Di Febbo, C., Carmine, D.I., Cuccurullo, F., and Porreca, E. (2007). Modulatory effects of heparin on cellular accumulation and cytotoxicity of doxorubicin in MRP1-overexpressing HL60/doxo cells. *Anticancer Res* 27, 351-355.
- Aoudjit, F., Guo, W., Gagnon-Houde, J.V., Castaigne, J.G., Alcaide-Loridan, C., Charron, D., and Al-Daccak, R. (2004). HLA-DR signaling inhibits Fas-mediated apoptosis in A375 melanoma cells. *Exp Cell Res* 299, 79-90.
- Aoudjit, F., and Vuori, K. (2000). Engagement of the alpha2beta1 integrin inhibits Fas ligand expression and activation-induced cell death in T cells in a focal adhesion kinase-dependent manner. *Blood* 95, 2044-2051.
- Beedholm-Ebsen, R., van de Wetering, K., Hardlei, T., Nexø, E., Borst, P., and Moestrup, S.K. (2010). Identification of multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1) as a molecular gate for cellular export of cobalamin. *Blood* 115, 1632-1639.
- Belinsky, M.G., Chen, Z.S., Shchaveleva, I., Zeng, H., and Kruh, G.D. (2002). Characterization of the drug resistance and transport properties of multidrug resistance protein 6 (MRP6, ABCC6). *Cancer Res* 62, 6172-6177.
- Bijian, K., Zhang, L., and Shen, S.H. (2007). Collagen-mediated survival signaling is modulated by CD45 in Jurkat T cells. *Mol Immunol* 44, 3682-3690.
- Bonhoure, E., Pchejetski, D., Aouali, N., Morjani, H., Levade, T., Kohama, T., and Cuvillier, O. (2006). Overcoming MDR-associated chemoresistance in HL-60 acute myeloid leukemia cells by targeting sphingosine kinase-1. *Leukemia* 20, 95-102.
- Burkhart, C.A., Watt, F., Murray, J., Pajic, M., Prokvolit, A., Xue, C., Flemming, C., Smith, J., Purmal, A., Isachenko, N., Komarov, P.G., Gurova, K.V., Sartorelli, A.C., Marshall, G.M., Norris, M.D., Gudkov, A.V., and Haber, M. (2009). Small-molecule multidrug resistance-associated protein 1 inhibitor reversan increases the therapeutic index of chemotherapy in mouse models of neuroblastoma. *Cancer Res* 69, 6573-6580.
- Chan, B.M., Wong, J.G., Rao, A., and Hemler, M.E. (1991). T cell receptor-dependent, antigen-specific stimulation of a murine T cell clone induces a transient, VLA protein-mediated binding to extracellular matrix. *J Immunol* 147, 398-404.
- Chen, Z.S., and Tiwari, A.K. (2011). Multidrug resistance proteins (MRPs/ABCCs) in cancer chemotherapy and genetic diseases. *Febs J* 278, 3226-3245.

Chetoui, N., Gendron, S., Chamoux, E., and Aoudjit, F. (2006). Collagen type I-mediated activation of ERK/MAP Kinase is dependent on Ras, Raf-1 and protein phosphatase 2A in Jurkat T cells. *Mol Immunol* 43, 1687-1693.

Cho, S., Lu, M., He, X., Ee, P.L., Bhat, U., Schneider, E., Miele, L., and Beck, W.T. (2011). Notch1 regulates the expression of the multidrug resistance gene ABCC1/MRP1 in cultured cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 20778-20783.

Cole, S.P., Bhardwaj, G., Gerlach, J.H., Mackie, J.E., Grant, C.E., Almquist, K.C., Stewart, A.J., Kurz, E.U., Duncan, A.M., and Deeley, R.G. (1992). Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 258, 1650-1654.

Consoli, U., Santonocito, A., Stagno, F., Fiumara, P., Privitera, A., Parisi, G., Giustolisi, G.M., Pavone, B., Palumbo, G.A., Di Raimondo, F., Milone, G., Guglielmo, P., and Giustolisi, R. (2002). Multidrug resistance mechanisms in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 116, 774-780.

Corpechot, C., Barbu, V., Wendum, D., Kinnman, N., Rey, C., Poupon, R., Housset, C., and Rosmorduc, O. (2002). Hypoxia-induced VEGF and collagen I expressions are associated with angiogenesis and fibrogenesis in experimental cirrhosis. *Hepatology* 35, 1010-1021.

Deeley, R.G., Westlake, C., and Cole, S.P. (2006). Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. *Physiol Rev* 86, 849-899.

El Azreq, M.A., Garceau, V., and Bourgoin, S.G. (2011). Cytohesin-1 regulates fMLF-mediated activation and functions of the beta2 integrin Mac-1 in human neutrophils. *J Leukoc Biol* 89, 823-836.

Fodale, V., Pierobon, M., Liotta, L., and Petricoin, E. (2011). Mechanism of cell adaptation: when and how do cancer cells develop chemoresistance. *Cancer J* 17, 89-95.

Franco, R., and Cidlowski, J.A. (2006). SLCO/OATP-like transport of glutathione in FasL-induced apoptosis: glutathione efflux is coupled to an organic anion exchange and is necessary for the progression of the execution phase of apoptosis. *J Biol Chem* 281, 29542-29557.

Gendron, S., Couture, J., and Aoudjit, F. (2003). Integrin alpha2beta1 inhibits Fas-mediated apoptosis in T lymphocytes by protein phosphatase 2A-dependent activation of the MAPK/ERK pathway. *J Biol Chem* 278, 48633-48643.

Gendron, S., Couture, J., and Aoudjit, F. (2005). Collagen type I signaling reduces the expression and the function of human receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) in T lymphocytes. *Eur J Immunol* 35, 3673-3682.

Goh, F., Irvine, K.M., Lovelace, E., Donnelly, S., Jones, M.K., Brion, K., Hume, D.A., Kotze, A.C., Dalton, J.P., Ingham, A., and Sweet, M.J. (2009). Selective induction of the

Notch ligand Jagged-1 in macrophages by soluble egg antigen from *Schistosoma mansoni* involves ERK signalling. *Immunology* 127, 326-337.

Grobe, J.L., Der Sarkissian, S., Stewart, J.M., Meszaros, J.G., Raizada, M.K., and Katovich, M.J. (2007). ACE2 overexpression inhibits hypoxia-induced collagen production by cardiac fibroblasts. *Clin Sci (Lond)* 113, 357-364.

Gutmann, H., Fricker, G., Torok, M., Michael, S., Beglinger, C., and Drewe, J. (1999). Evidence for different ABC-transporters in Caco-2 cells modulating drug uptake. *Pharm Res* 16, 402-407.

Gutmann, H., Hruz, P., Zimmermann, C., Beglinger, C., and Drewe, J. (2005). Distribution of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) mRNA expression along the human GI tract. *Biochem Pharmacol* 70, 695-699.

Hammond, C.L., Marchan, R., Krance, S.M., and Ballatori, N. (2007). Glutathione export during apoptosis requires functional multidrug resistance-associated proteins. *J Biol Chem* 282, 14337-14347.

Han, L., Wierenga, A.T., Rozenveld-Geugien, M., van de Lande, K., Vellenga, E., and Schuringa, J.J. (2009). Single-cell STAT5 signal transduction profiling in normal and leukemic stem and progenitor cell populations reveals highly distinct cytokine responses. *PLoS One* 4, e7989.

Harburger, D.S., and Calderwood, D.A. (2009). Integrin signalling at a glance. *J Cell Sci* 122, 159-163.

Hehlhans, S., Haase, M., and Cordes, N. (2007). Signalling via integrins: implications for cell survival and anticancer strategies. *Biochim Biophys Acta* 1775, 163-180.

Hummel, I., Klappe, K., Ercan, C., and Kok, J.W. (2011). Multidrug resistance-related protein 1 (MRP1) function and localization depend on cortical actin. *Mol Pharmacol* 79, 229-240.

Humphries, J.D., Byron, A., and Humphries, M.J. (2006). Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci* 119, 3901-3903.

Ikeda, K., Oka, M., Yamada, Y., Soda, H., Fukuda, M., Kinoshita, A., Tsukamoto, K., Noguchi, Y., Isomoto, H., Takeshima, F., Murase, K., Kamihira, S., Tomonaga, M., and Kohno, S. (1999). Adult T-cell leukemia cells over-express the multidrug-resistance-protein (MRP) and lung-resistance-protein (LRP) genes. *Int J Cancer* 82, 599-604.

Ivanoff, J., Talme, T., and Sundqvist, K.G. (2005). The role of chemokines and extracellular matrix components in the migration of T lymphocytes into three-dimensional substrata. *Immunology* 114, 53-62.

Kurz, E.U., Cole, S.P., and Deeley, R.G. (2001). Identification of DNA-protein interactions in the 5' flanking and 5' untranslated regions of the human multidrug resistance protein

(MRP1) gene: evaluation of a putative antioxidant response element/AP-1 binding site. *Biochem Biophys Res Commun* 285, 981-990.

Lebedeva, I.V., Pande, P., and Patton, W.F. (2011). Sensitive and specific fluorescent probes for functional analysis of the three major types of mammalian ABC transporters. *PLoS One* 6, e22429.

Lee, C.H. (2002). Differential regulation of P-glycoprotein genes in primary rat hepatocytes by collagen sandwich and drugs. *J Cell Biochem* 86, 12-20.

Lee, J.W., and Juliano, R. (2004). Mitogenic signal transduction by integrin- and growth factor receptor-mediated pathways. *Mol Cells* 17, 188-202.

Loeffler, M., Kruger, J.A., Niethammer, A.G., and Reisfeld, R.A. (2006). Targeting tumor-associated fibroblasts improves cancer chemotherapy by increasing intratumoral drug uptake. *J Clin Invest* 116, 1955-1962.

Lotz, C., Kelleher, D.K., Gassner, B., Gekle, M., Vaupel, P., and Thews, O. (2007). Role of the tumor microenvironment in the activity and expression of the p-glycoprotein in human colon carcinoma cells. *Oncol Rep* 17, 239-244.

Luqmani, Y.A. (2005). Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy. *Med Princ Pract* 14 Suppl 1, 35-48.

Martel, J., Payet, M.D., and Dupuis, G. (1997). The MDR1 (P-glycoprotein) and MRP (P-190) transporters do not play a major role in the intrinsic multiple drug resistance of Jurkat T lymphocytes. *Leuk Res* 21, 1077-1086.

Meads, M.B., Gatenby, R.A., and Dalton, W.S. (2009). Environment-mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease. *Nat Rev Cancer* 9, 665-674.

Meads, M.B., Hazlehurst, L.A., and Dalton, W.S. (2008). The bone marrow microenvironment as a tumor sanctuary and contributor to drug resistance. *Clin Cancer Res* 14, 2519-2526.

Merchant, J.L., Du, M., and Todisco, A. (1999). Sp1 phosphorylation by Erk 2 stimulates DNA binding. *Biochem Biophys Res Commun* 254, 454-461.

Muredda, M., Nunoya, K., Burtch-Wright, R.A., Kurz, E.U., Cole, S.P., and Deeley, R.G. (2003). Cloning and Characterization of the Murine and Rat *mrp1* Promoter Regions. *Mol Pharmacol* 64, 1259-1269.

Netti, P.A., Berk, D.A., Swartz, M.A., Grodzinsky, A.J., and Jain, R.K. (2000). Role of extracellular matrix assembly in interstitial transport in solid tumors. *Cancer Res* 60, 2497-2503.

Noonan, K.E., Beck, C., Holzmayer, T.A., Chin, J.E., Wunder, J.S., Andrulis, I.L., Gazdar, A.F., Willman, C.L., Griffith, B., Von Hoff, D.D., and et al. (1990). Quantitative analysis

of MDR1 (multidrug resistance) gene expression in human tumors by polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 7160-7164.

Poulain, S., Lepelley, P., Preudhomme, C., Cambier, N., Cornillon, J., Wattel, E., Cosson, A., and Fenaux, P. (2000). Expression of the multidrug resistance-associated protein in myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 110, 591-598.

Prime-Chapman, H.M., Fearn, R.A., Cooper, A.E., Moore, V., and Hirst, B.H. (2004). Differential multidrug resistance-associated protein 1 through 6 isoform expression and function in human intestinal epithelial Caco-2 cells. *J Pharmacol Exp Ther* 311, 476-484.

Roos, P.H., and Bolt, H.M. (2005). Cytochrome P450 interactions in human cancers: new aspects considering CYP1B1. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 1, 187-202.

Ruzza, P., Rosato, A., Rossi, C.R., Floreani, M., and Quintieri, L. (2009). Glutathione transferases as targets for cancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem* 9, 763-777.

Scharenberg, C.W., Harkey, M.A., and Torok-Storb, B. (2002). The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. *Blood* 99, 507-512.

Sharom, F.J. (2011). The P-glycoprotein multidrug transporter. *Essays Biochem* 50, 161-178.

Steinbach, D., Gillet, J.P., Sauerbrey, A., Gruhn, B., Dawczynski, K., Bertholet, V., de Longueville, F., Zintl, F., Remacle, J., and Efferth, T. (2006). ABCA3 as a possible cause of drug resistance in childhood acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 12, 4357-4363.

Streuli, C.H. (2009). Integrins and cell-fate determination. *J Cell Sci* 122, 171-177.

Thews, O., Nowak, M., Sauvant, C., and Gekle, M. (2011). Hypoxia-induced extracellular acidosis increases p-glycoprotein activity and chemoresistance in tumors in vivo via p38 signaling pathway. *Adv Exp Med Biol* 701, 115-122.

Thews, O., Sauvant, C., and Gekle, M. (2009). Impact of the metabolic tumor microenvironment on activity and expression of the multidrug resistance-related protein 1 (MRP1). *Acta Physiologica* Volume 195.

Turncliff, R.Z., Tian, X., and Brouwer, K.L. (2006). Effect of culture conditions on the expression and function of Bsep, Mrp2, and Mdr1a/b in sandwich-cultured rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 71, 1520-1529.

Van de Walle, G.R., Vanhoorelbeke, K., Majer, Z., Illyes, E., Baert, J., Pareyn, I., and Deckmyn, H. (2005). Two functional active conformations of the integrin $\alpha 2\beta 1$, depending on activation condition and cell type. *J Biol Chem* 280, 36873-36882.

van der Heijden, J., de Jong, M.C., Dijkmans, B.A., Lems, W.F., Oerlemans, R., Kathmann, I., Schalkwijk, C.G., Scheffer, G.L., Scheper, R.J., and Jansen, G. (2004).

Development of sulfasalazine resistance in human T cells induces expression of the multidrug resistance transporter ABCG2 (BCRP) and augmented production of TNFalpha. *Ann Rheum Dis* 63, 138-143.

Xu, C., Shen, G., Yuan, X., Kim, J.H., Gopalkrishnan, A., Keum, Y.S., Nair, S., and Kong, A.N. (2006). ERK and JNK signaling pathways are involved in the regulation of activator protein 1 and cell death elicited by three isothiocyanates in human prostate cancer PC-3 cells. *Carcinogenesis* 27, 437-445.

3.9 Figures and legends

Figure 1: Collagen/ β 1 integrin reduces intracellular amounts of doxorubicin. Jurkat (A) and HSB2 (B) cells were preactivated or not with collagen (Col) for 4 h and then treated with 250 ng/ml of doxorubicin (Dox) for an additional 2 h at 37°C in the dark. The cells were then washed with PBS and the intracellular doxorubicin content was analyzed by flow cytometry using the FL-2 settings. Upper panels represent flow cytometric profile of intracellular doxorubicin content (NT: non-treated; cells that had not been treated with doxorubicin). Intracellular doxorubicin content (Lower panels) was quantified according to the formula: positive cells (%) x the mean fluorescence intensity (MFI). (C) Jurkat cells were pretreated with 10 μ g/ml of anti- β 1 (Anti- β 1 mAb) or IgG isotypic control antibody (control mAb) for 1 h before being activated with collagen. The cells were then treated with doxorubicin and intracellular doxorubicin amount was determined as above. The results presented in A and B (lower panels) and in C represent mean values \pm SD from three independent experiments. * P<0.05 where indicated.

Figure 2: Fibronectin had no effect on intracellular doxorubicin content. Jurkat (A) and HSB2 cells (B) were preactivated or not with collagen (Col) or fibronectin (Fn) before the addition of doxorubicin. The cells were then washed with PBS and the intracellular doxorubicin content was quantified by flow cytometry. The results represent mean values \pm SD from three independent experiments. * P<0.05 where indicated.

Figure 3: Collagen but not fibronectin also reduces intracellular doxorubicin content as measured by fluorescence microscopy. Jurkat (A) and HSB2 cells (B) were preactivated with collagen (Col), fibronectin (Fn) or left unstimulated (NT) for 4 h and then were treated or not with doxorubicin (Dox) for 2 h. The cells were washed, fixed and mounted between slides and cover slips, and were observed by phase contrast and by using a red excitation fluorescence filter. The results are representative of three independent experiments.

Figure 4: ABCC1 is the major ABC transporter expressed in leukemic T-cell lines. Jurkat and HSB2 cells were preactivated with collagen (Col) or left unstimulated (NT) for 4 h and were then treated with doxorubicin (Dox) for 2 h. mRNA levels for the different

ABC transporters and for β -actin were determined by RT-PCR using specific primers (table 1). The CaCo2 cell line was used as a positive control for ABCC2, ABCC6, ABCB1 and ABCG2 mRNA detection. (M) represents the 100 bp DNA ladder marker. The results are representative of three independent experiments.

Figure 5: Collagen but not fibronectin upregulates ABCC1 protein levels through β 1-integrin. (A) Immunoblot analysis of ABCC1 expression. Jurkat (left panel) and HSB2 (right panel) cells were preactivated with collagen (Col) for 4 h and then treated with 250 ng/ml of doxorubicin (Dox) for 2 h. The cells were lysed and the cell lysates analyzed by immunoblot using the anti-ABCC1 mAb. The blots were stripped and reprobed with control anti-b-actin Ab to ensure equal loading. The results are representative of two independent experiments. (B) Flow cytometry analysis of ABCC1 expression in Jurkat and HSB2 cells. After collagen activation and doxorubicin treatment, the cells were washed with PBS and ABCC1 expression was assessed by flow cytometry by staining the cells with FITC-coupled anti-ABCC1 antibody or appropriate FITC-conjugated isotypic antibody. Representative flow cytometric profiles of ABCC-1 expression (upper panels). Lower panels represent quantification of ABCC-1 expression. (C) Fibronectin had no effect on ABCC1 levels. Jurkat cells were preactivated with collagen (Col) or fibronectin (Fn) and then treated or not with doxorubicin (Dox). The cells were then washed with PBS and ABCC1 expression was assessed by flow cytometry. (D) Collagen-mediated upregulation of ABCC1 levels is dependent on β 1-integrin. Jurkat cells were pretreated with the control or anti- β 1 integrin blocking antibodies for 1 h and then activated or not with collagen (Col) and ABCC1 expression was assessed by flow cytometry. The data in B (lower panels), C and D represent mean values \pm SD of positive cells (%) x the mean fluorescence intensity (MFI) from three independent experiments. * $P < 0.05$ where indicated.

Figure 6: Collagen downregulates the intracellular accumulation of calcein-AM. Jurkat (A) and HSB2 cells (B) were preactivated or not with collagen (Col) for 4 h and then treated with increasing concentrations of calcein-AM for 30 min at 37°C in the dark. The cells were washed with PBS and the intracellular calcein-AM content was analyzed by flow cytometry using the FL-2 settings. The results represent mean values \pm SD of positive cells

(%) x the mean fluorescence intensity (MFI) from three independent experiments. * $P < 0.05$ where indicated.

Figure 7: ABCC1 inhibition abrogates collagen-induced drug efflux and protection against doxorubicin-mediated apoptosis. (A) ABCC1 inhibitors reduce collagen-mediated doxorubicin efflux. Jurkat (left panel) and HSB2 (right panel) cells were pretreated for 1 h with 20 μ M of MK571 or Reversan respectively, or with the vehicle. The cells were then activated or not with collagen (Col), and treated with doxorubicin. The cells were washed with PBS and intracellular doxorubicin content was analyzed by flow cytometry using the FL-2 settings. (B) ABCC1 siRNA reduces ABCC1 levels. Jurkat and HSB2 cells were transfected with ABCC1 or control (Ctrl) siRNAs as described in “Materials and Methods” section. Efficiency of ABCC1 silencing in Jurkat and HSB2 cells was monitored by flow cytometry analysis of ABCC1 expression levels using FITC-coupled anti-ABCC1 mAb as described in “Materials and Methods” section. Control isotypic staining of the cells is shown. Lower panels represent quantification of ABCC1 expression in control and in ABCC1 siRNA- transfected cells. (C) ABCC1 siRNA reduces collagen-mediated doxorubicin efflux. Transfected Jurkat and HSB2 cells were activated or not with collagen (Col) before their treatment with doxorubicin. The cells were washed with PBS and intracellular doxorubicin content was assessed by flow cytometry. (D) ABCC1 siRNA reverses the protective effect of collagen on doxorubicin-induced apoptosis. Transfected Jurkat and HSB2 cells were left untreated (NT) or activated with collagen (Col) for 4 h, and then treated with doxorubicin (Dox). After 16 h of drug treatment, apoptosis was determined by annexin V staining and flow cytometry. The results in the different panels represent mean values \pm SD from three independent experiments.* $P < 0.05$ where indicated.

Figure 8: ERK inhibition abrogates collagen-induced drug efflux, ABCC1 expression and resistance against doxorubicin-mediated apoptosis. (A) DN-MEK-1 inhibits the ability of collagen to reduce intracellular doxorubicin content. Cells were transfected with DN-MEK1 or pcDNA (empty plasmid). After transfection, the cells were activated or not with collagen (Col) and then treated with doxorubicin. The intracellular doxorubicin content was measured by flow cytometry. (B) The MEK-1 inhibitor abrogates collagen-

mediated calcein efflux. Jurkat cells were preincubated or not for 1 h with 10 μ M of the MEK/ERK inhibitor (U0126) prior to their activation or not with collagen (Col) and treatment with calcein-AM. Intracellular calcein content was then assessed by flow cytometry. (C) DN-MEK-1 abolishes the upregulation of ABCC1 expression levels by collagen. Expression of ABCC1 in transfected cells was determined by ABCC1 staining and flow cytometry analysis as described in “Materials and Methods” section. (D) DN-MEK-1 abolishes the protective effect of collagen on doxorubicin-induced apoptosis. Transfected cells were activated or not with collagen and then treated or not with doxorubicin (Dox) for 16 h (NT: Non treated). Apoptosis was determined by annexin V staining and flow cytometry analysis. The results in the four panels represent mean values \pm SD from three independent experiments. * P<0.05 where indicated.

Figure 9: Actin polymerization is required for collagen-induced drug efflux and ABCC1 expression. (A) Cytochalasin B (CB) abrogates collagen-induced F-actin formation. Jurkat cells were left untreated (NT), or activated with collagen (Col) in the presence or absence of CB (10 μ M). F-actin content was assessed by staining with Alexa fluor 594-conjugated phalloidin (1 μ M) and flow cytometry analysis as described in “Materials and Methods” section. (B) Actin cytoskeleton disruption abrogates collagen-induced drug efflux. Jurkat cells were activated or not with collagen (Col) in the presence or absence of CB, and then treated with doxorubicin. Intracellular doxorubicin content was then assessed by flow cytometry analysis. (C) Actin cytoskeleton disruption abrogates collagen-induced ABCC1 expression. Jurkat cells were activated or not with collagen (Col) in the presence or absence of CB. ABCC1 expression was then assessed by intracellular staining and flow cytometry as described in the “Materials and Methods” section. The results in A, B and C represent mean values \pm SD of positive cells (%) x the mean fluorescence from three independent experiments. * P<0.05 where indicated.

Figure 1 : Collagen/ β 1 integrin reduces intracellular amounts of doxorubicin

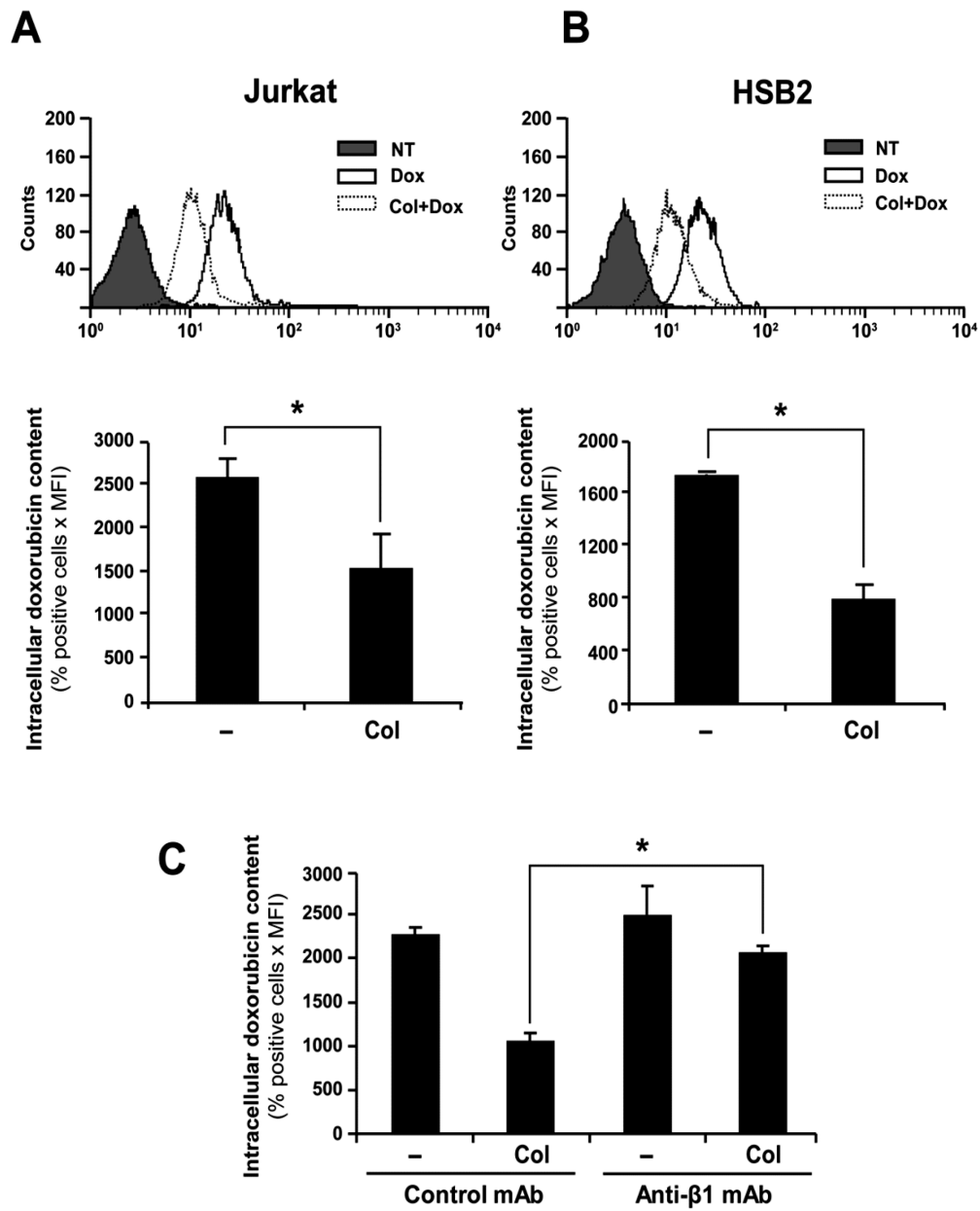


Figure 2 : Fibronectin had no effect on intracellular doxorubicin content

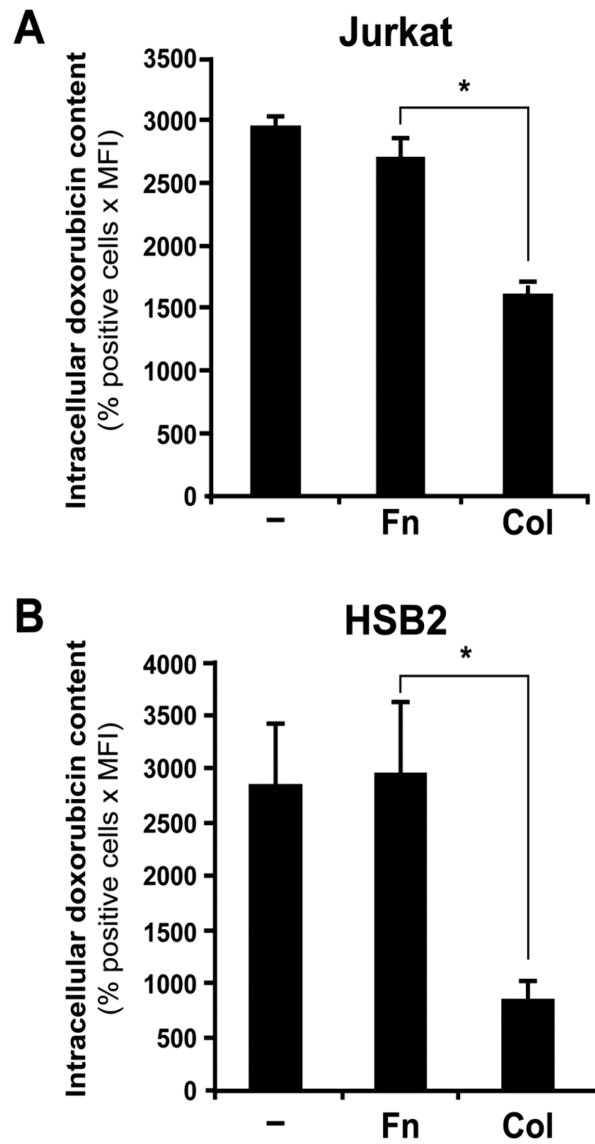


Figure 3 : Collagen but not fibronectin also reduces intracellular doxorubicin content as measured by fluorescence microscopy

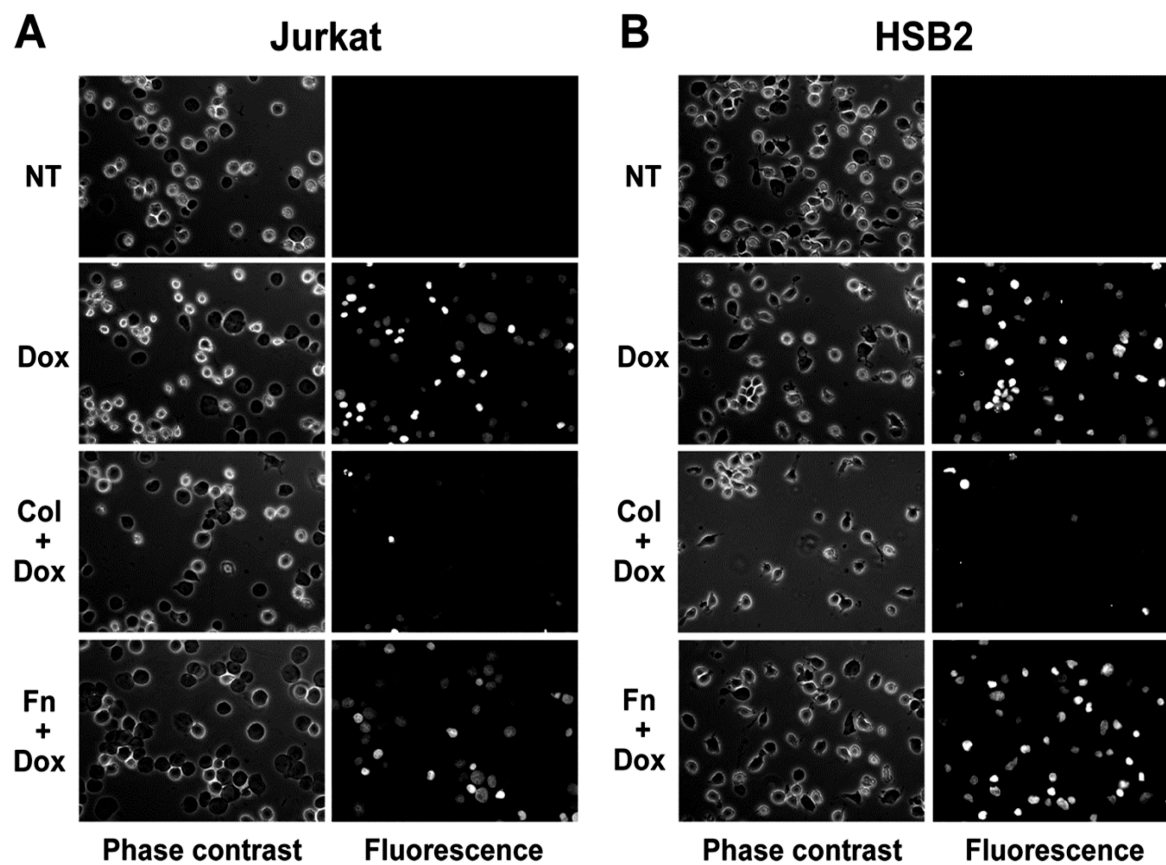


Figure 4 : ABCC1 is the major ABC transporter expressed in leukemic T-cell lines

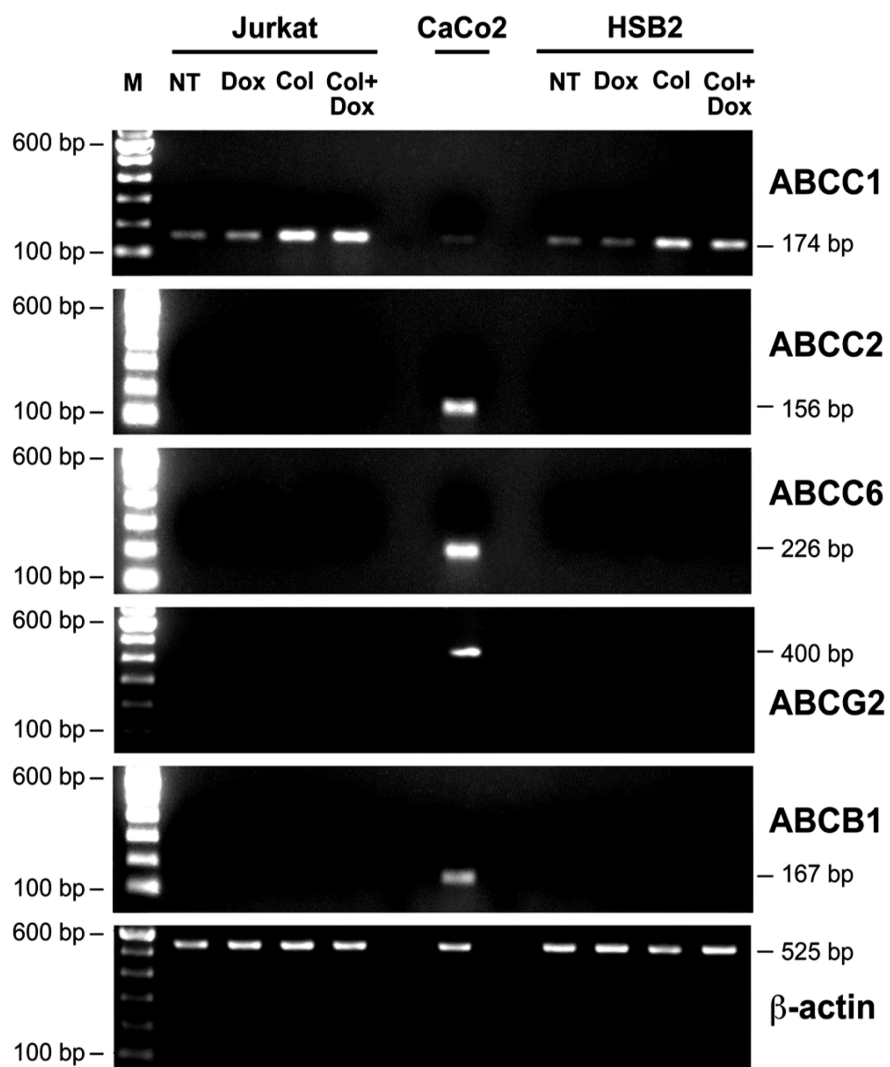


Figure 5 : Collagen but not fibronectin upregulates ABCC1 protein levels through β 1-integrin

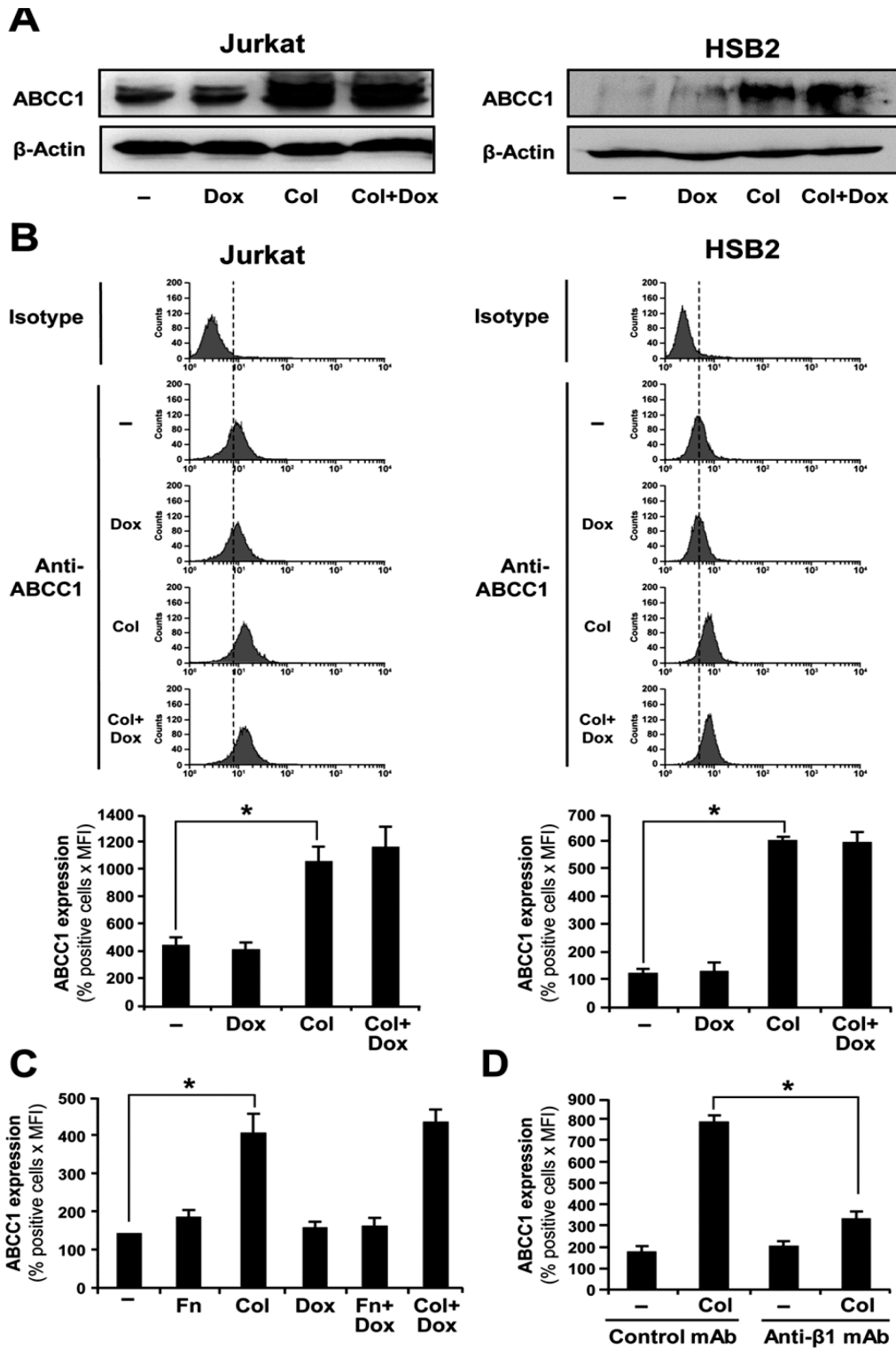


Figure 6 : Collagen downregulates the intracellular accumulation of calcein-AM

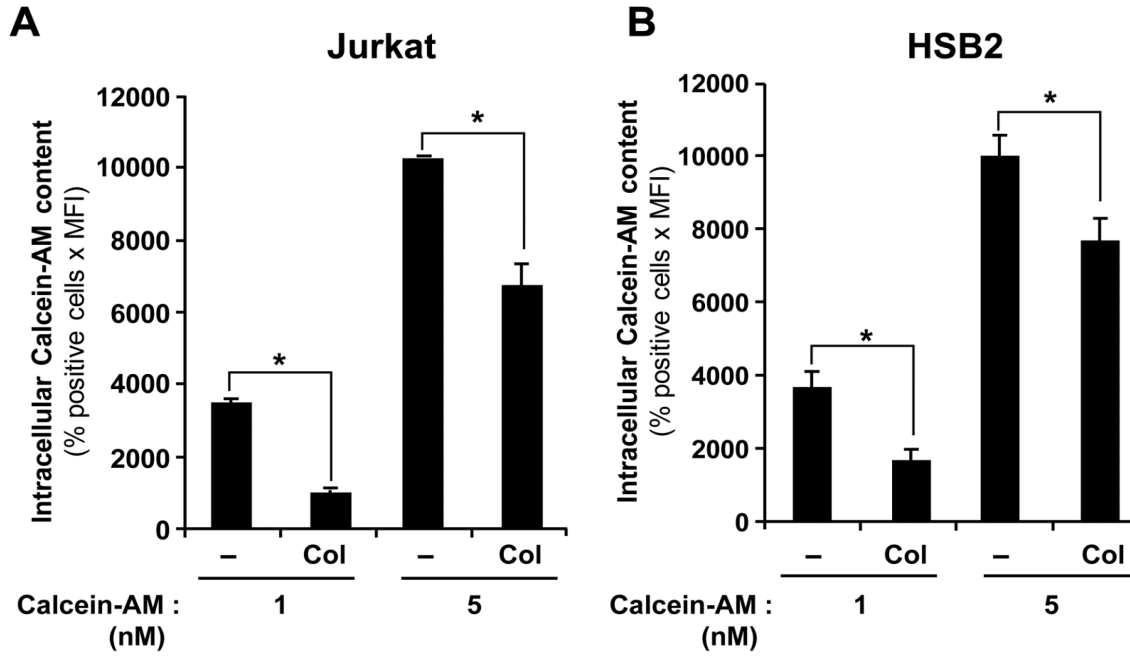


Figure 7: ABCC1 inhibition abrogates collagen-induced drug efflux and protection against doxorubicin-mediated apoptosis

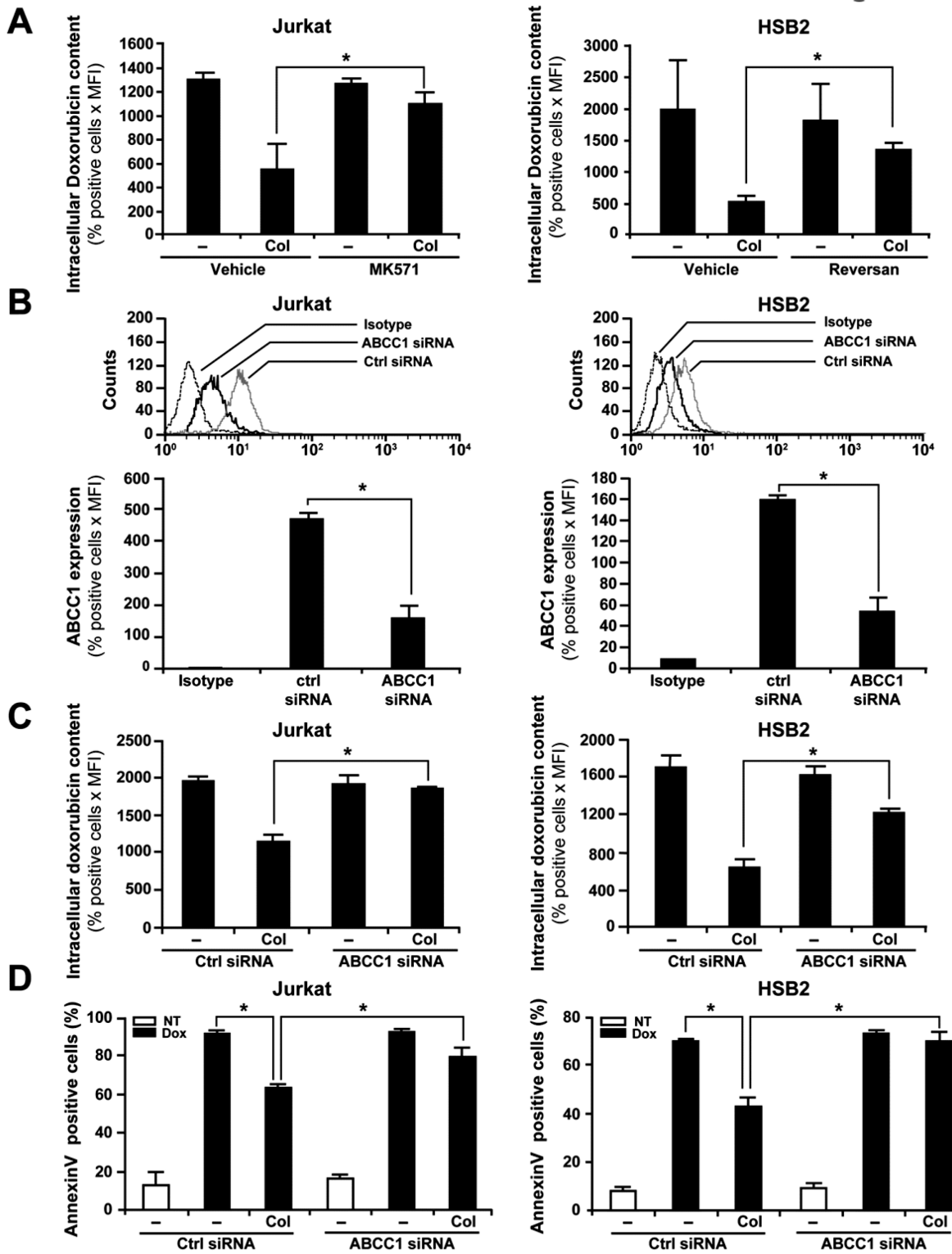


Figure 8 : ERK inhibition abrogates collagen-induced drug efflux, ABCC1 expression and resistance against doxorubicin-mediated apoptosis

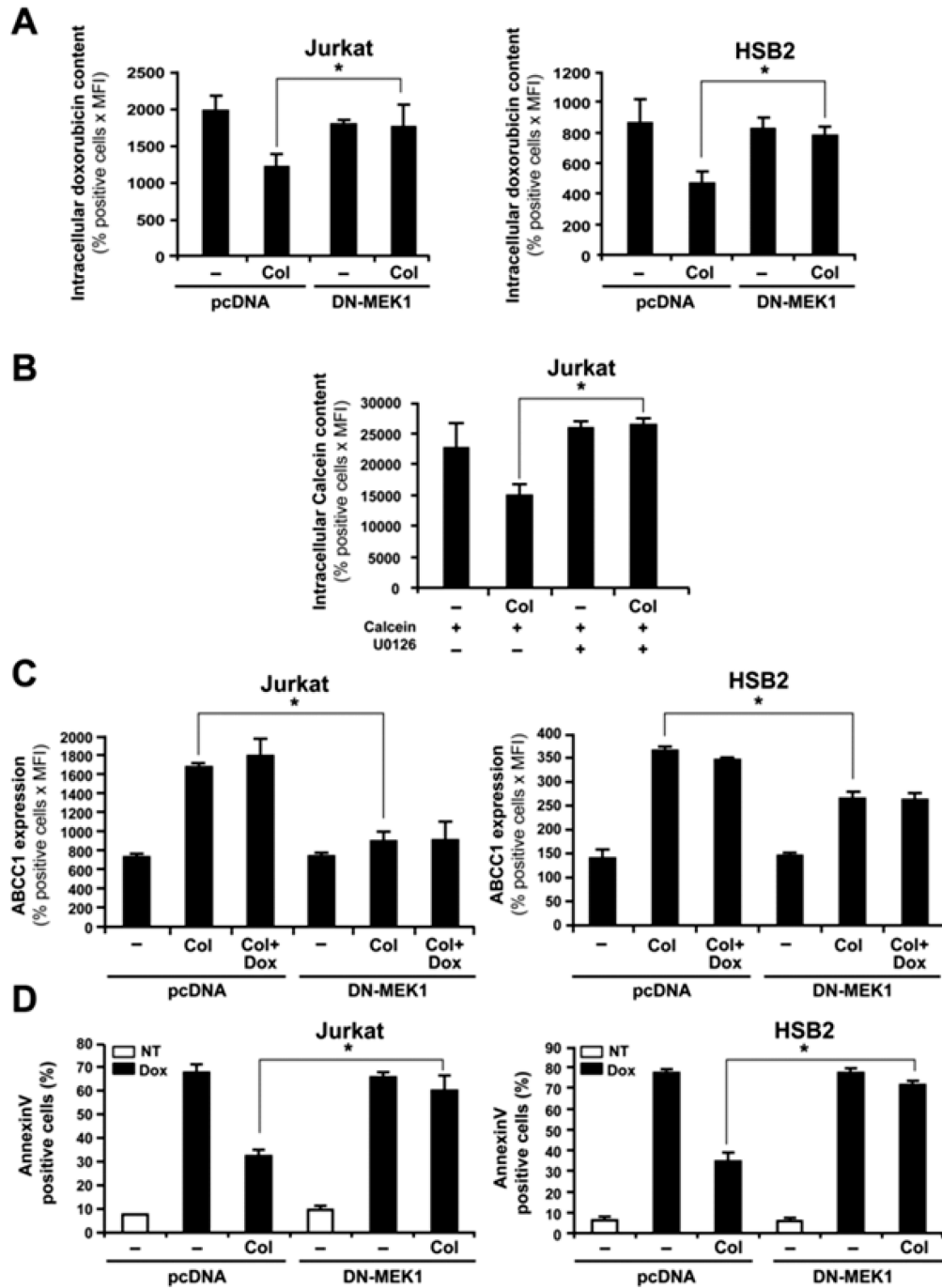
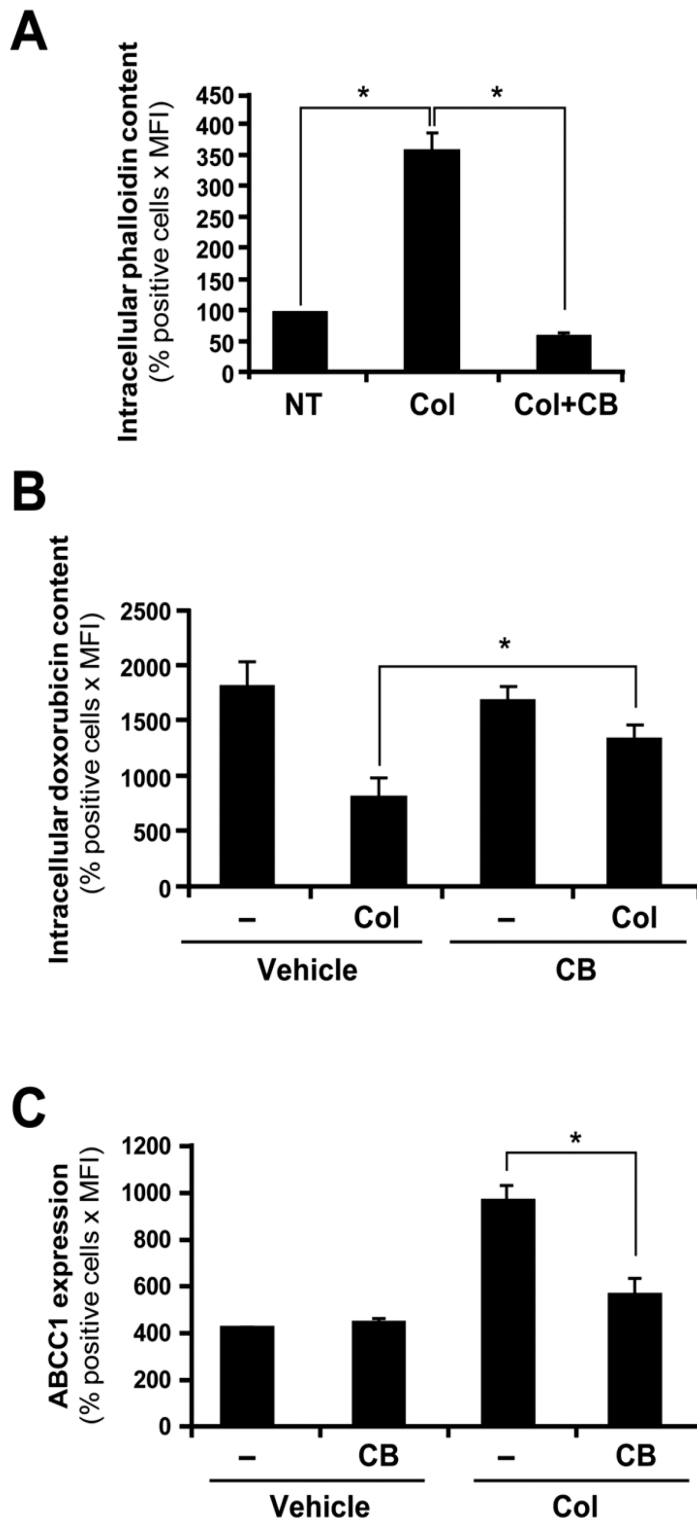
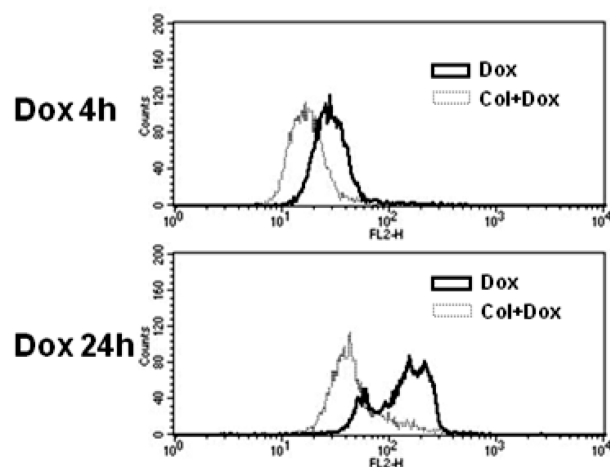


Figure 9 : Actin polymerization is required for collagen-induced drug efflux and ABCC1 expression



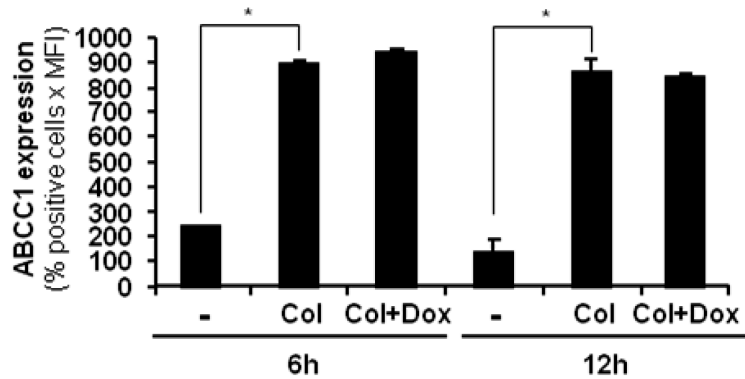
3.10 Supplementary figures and legends

Figure S1 : Kinetic effect of collagen on intracellular doxorubicin accumulation



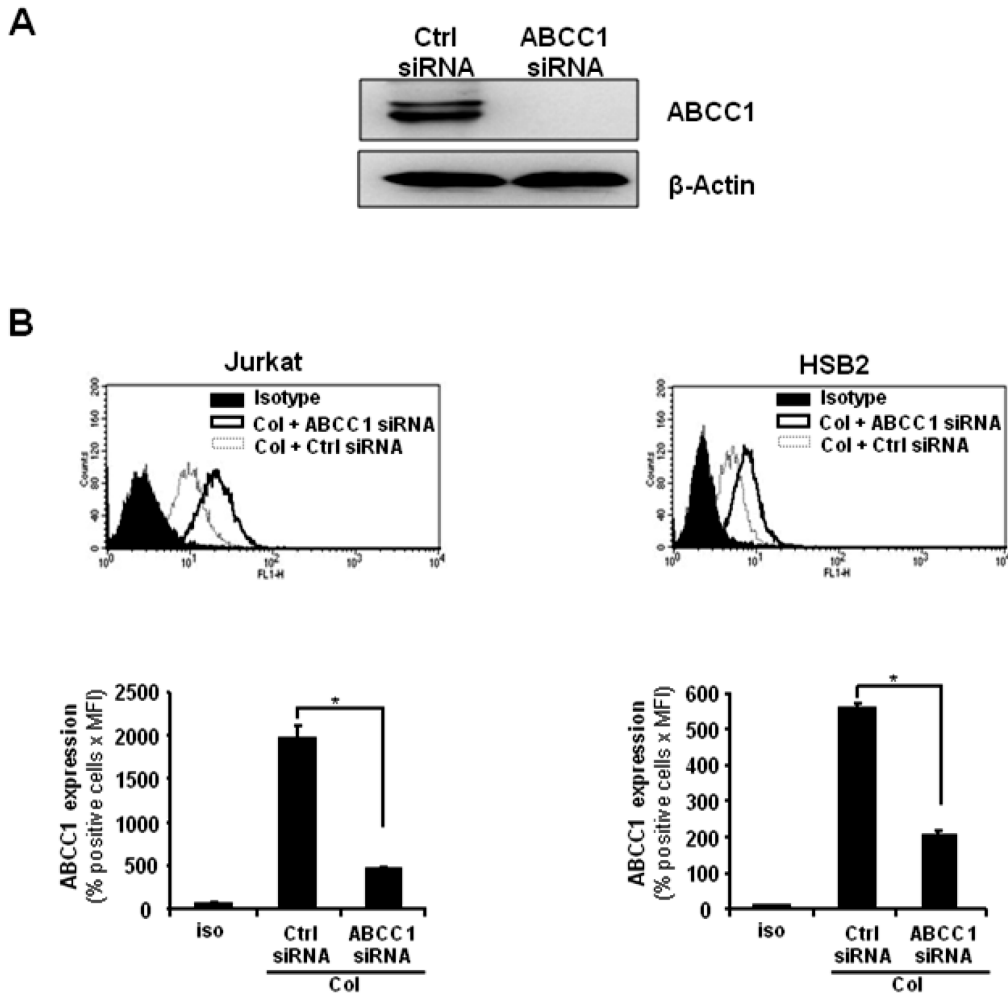
Jurkat cells were activated or not with collagen (Col) for 4h and then treated with doxorubicin (250ng/ml) (Dox) for an additional 4 or 24h. The cells were washed with PBS and the intracellular doxorubicin content was analyzed by flow cytometry using the FL-2 settings. A representative flow cytometric profile of intracellular doxorubicin content is shown.

Figure S2 : Sustained expression of ABCC1 by collagen



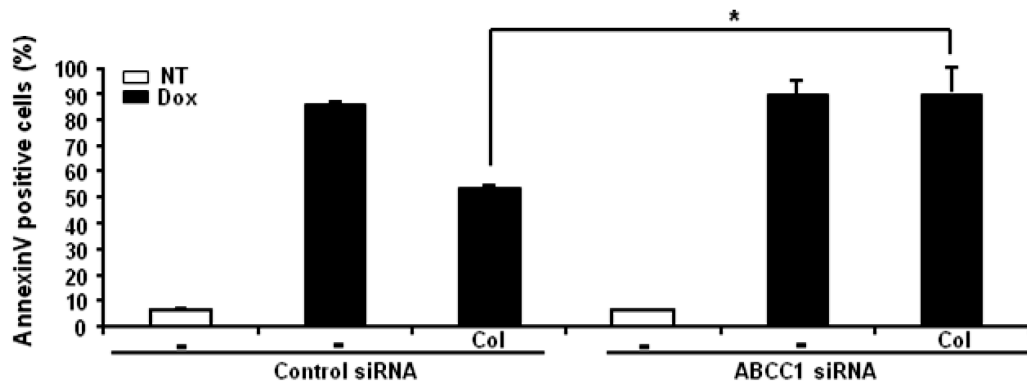
HSB2 cells were activated or not with collagen (100 μ g/ml) (Col) for 4 or 10 h before adding doxorubicin (250ng/ml) (Dox) for an additional 2 h. The cells were washed with PBS and ABCC1 expression was assessed by flow cytometry using FITC-coupled anti-ABCC1 antibody as described in “Materials and Methods”. The results represent the mean values \pm SD of positive cells (%) x the mean fluorescence intensity (MFI) from three independent experiments. * $P < 0.05$ where indicated.

Figure S3 : ABCC1 siRNA silencing in leukemic T cells



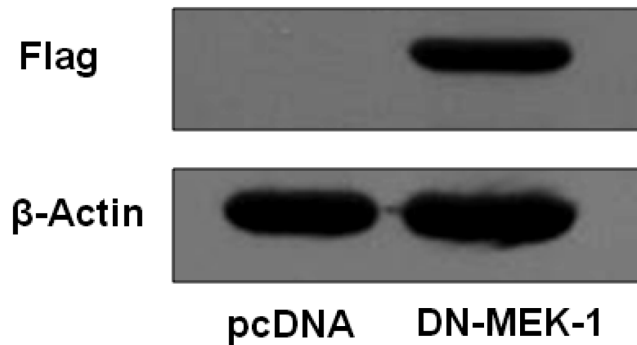
(A) Jurkat cells were transfected with ABCC1 or with control (Ctrl) siRNAs as described in Material and Methods. Cell lysates were prepared and analyzed by immunoblot using the anti-ABCC1 mAb (clone QCRL-1). The blots were stripped and reprobbed with control anti- β -actin Ab to ensure equal loading. (B) ABCC1 levels in collagen-treated cells. Flow cytometry analysis of ABCC1 expression levels in collagen-treated cells transfected with control or with ABCC1 siRNA. Lower panels represent quantifications of ABCC1 levels. The results are representative of three independent experiments. * $P < 0.05$ where indicated.

Figure S4 : ABCC1 silencing abrogated the collagen-mediated escape from apoptosis induced by a 48 h exposure to doxorubicin



Jurkat cells were transfected with control or ABCC1 siRNAs. 24 h after transfection, the cells were left untreated (NT) or activated or not with collagen (100 μ g/ml) (Col) for 4 h and incubated with doxorubicin (250 ng/ml) (Dox) for 48 h. The cells were washed and apoptosis was determined by annexin V staining and flow cytometry analysis. Data represent mean values \pm SD from three independent experiments.* $P < 0.05$ where indicated.

Figure S5: DN-MEK-1 expression in transfected cells



Jurkat cells were transfected with DN-MEK1 or pcDNA (control) plasmids as described in “Materials and Methods” section. The cells were then washed in cold PBS and lysed in RIPA buffer containing protease and phosphatase inhibitors. Cell lysates were subjected to SDS-PAGE and analyzed by immunoblot using the anti-Flag mAb. The blots were stripped and reprobed with control anti-β-actin Ab to ensure equal loading. Immunoblots were visualized using an HRP-conjugated secondary antibody followed by enhanced chemiluminescence’s detection.

Chapitre IV

L'intégrine $\alpha 2\beta 1$ promeut la résistance à la doxorubicine via l'inhibition de la voie pro-apoptotique Rac1/JNK.

4.1 Résumé :

Nous avons récemment montré que l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ liant le collagène promeut la résistance des cellules de la leucémie lymphoblastique aiguë de type T (T-ALL) contre la doxorubicine. Dans la présente étude, nous avons constaté que des lignées cellulaires de la leucémie myéloïde aiguë (AML) expriment également l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ et que leur adhésion au collagène promeut leur chimiorésistance. Nous avons également trouvé que l'apoptose induite par la doxorubicine est liée à l'activation de la voie Rac1/JNK et que le collagène inhibe cette voie au niveau de Rac1. En inhibant Rac1, le collagène réduit aussi les dommages à l'ADN causés par la doxorubicine. L'effet protecteur du collagène est dépendent de l'activation de la voie de survie MAPK/ERK mais pas de la voie PI3K/AKT. En conclusion, nos données suggèrent que, *via* le ciblage de l'effecteur pro-apoptotique Rac1, la voie de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ /MAPK/ERK pourrait être importante pour la protection des cellules leucémiques contre les anthracyclines et pourrait représenter une cible thérapeutique prometteuse dans le traitement anti-leucémique.

Alpha2beta1 integrin promotes resistance to doxorubicin by inhibiting the Rac1/JNK pro-apoptotic pathway.

Dalila Naci and Fawzi Aoudjit*

Centre de recherche du CHU de Québec, Axe des maladies infectieuses et immunitaires and
Département de Microbiologie-Immunologie, Faculté de Médecine, Université Laval.

*To whom correspondence should be addressed

Fawzi Aoudjit, Ph.D

Centre de Recherche du CHU de Québec,

2705 Blvd Laurier, local T1-49.

Québec, Canada G1V4G2.

Tel.: 418-525-4444 (ext. 46071); Fax: 418-654-2765.

E-mail: fawzi.aoudjit @crchul.ulaval.ca.

4.2 Abstract

The mechanisms by which integrins promote cancer chemoresistance are not fully understood. We have recently shown that the collagen-binding integrin $\alpha 2\beta 1$ promoted doxorubicin resistance in acute T cell lymphoblastic leukemia (T-ALL). In this study, we found that acute myeloid leukemia (AML) cell lines also express $\alpha 2\beta 1$ integrin and collagen promoted their chemoresistance as well. Furthermore, the ectopic expression of $\alpha 2$ integrin is sufficient to confer doxorubicin resistance of MOLT3 leukemic cells, further supporting the importance of $\alpha 2\beta 1$ integrin in leukemia chemoresistance. Our results also show that doxorubicin-induced apoptosis is associated with activation of Rac1/JNK pathway in leukemic cells and that collagen inhibited this pathway at the level of Rac1. Moreover, collagen also inhibited Rac1-induced DNA damage as determined by the reduction of the phosphorylated levels of the histone H2AX upon doxorubicin treatment. The effect of collagen on leukemia cell survival, activation of the Rac1/JNK pathway and phosphorylation of H2AX are dependent on the activation of the MAPK/ERK but not on the PI3K/AKT pathway. Together our results show that by targeting proapoptotic Rac1, $\alpha 2\beta 1$ integrin/MAPK/ERK pathway can be a major pathway protecting leukemic cells from genotoxic agents and may thus represent an important therapeutic target in anti-cancer treatment.

4.3 Introduction

Integrins are α/β heterodimeric membrane proteins that mediate cell-cell and cell-extracellular matrix (ECM) interactions. Integrin-mediated attachment to ECM is critical for cancer growth and metastasis [1, 2]. In addition, integrins are also critical in cell survival. Normal epithelial and endothelial cells undergo a form of cell death known as anoikis when cultured in suspension or on an inappropriate matrix protein [3, 4]. Several studies have also shown that integrin-ECM interactions are involved in cancer chemoresistance of both solid and haematological tumors [5]. A major action of chemotherapy on cancer cells occurs via induction of apoptosis and therefore inhibition of apoptosis can significantly contribute to chemoresistance [6]. Along these lines, integrins activate the two major cell survival pathways including MAPK/ERK and PI3 kinase/AKT [7].

The bone marrow niche, in which ECM components such as collagen and fibronectin are very abundant, is one of the major growth and development site for hematological malignancies [8, 9]. The $\alpha4\beta1$ integrin, which binds to fibronectin and to VCAM-1 has been involved in the inhibition of chemotherapy-induced apoptosis of acute myeloid leukemia (AML) cells and of B cell malignancies [10-12]. However, clinical studies did not show a correlation between $\alpha4$ integrin expression levels and the clinical outcome of AML patients [13, 14] suggesting that additional integrin pathways might be involved [15].

Chemotherapeutic drugs usually induce caspase activation and apoptosis by activating the mitochondria death pathway, which is regulated by pro- and anti-apoptotic proteins of the Bcl-2 family [6, 16]. The exact molecular mechanisms by which different drugs induce apoptosis are complex and not fully elucidated. Several studies have identified the stress kinase c-Jun N-Terminal kinase (JNK) as an important pathway in chemotherapy induced-apoptosis [17, 18].

Rac1 belongs to the Rho family of small GTPases and plays a central role in cytoskeleton organization and in cell adhesion and migration [19]. Recent studies have also attributed a role for Rac-1 in apoptosis. Rac1 has been involved with podocyte injury in chronic kidney disease [20], with β -amyloid peptide induced neuronal death [21] and especially with

doxorubicin cytotoxicity in cardiomyocytes [22]. In addition, Rac1 has been associated with DNA damage response to topoisomerase II inhibitors such as doxorubicin and etoposide [23, 24]. Rac1 enhances the interactions of topoisomerases II with their respective drugs, which then leads to the formation of double strands breaks and to the DNA damage response and to either DNA repair or induction of cell death [23-25]. Doxorubicin is a powerful anti-cancer agent and is a gold standard in the treatment of leukemia [26]. Thus, understanding how integrins regulate doxorubicin-induced stress response and apoptosis is of high value for cancer treatment in clinic.

We have recently shown that the collagen-binding integrin $\alpha 2\beta 1$ promotes doxorubicin chemoresistance in acute T lymphoblastic leukemia (T-ALL) by inhibiting JNK activation [27]. In this study, we extend our findings by showing that $\alpha 2\beta 1$ integrin also promotes chemoresistance of AML cells and we provide evidence that $\alpha 2\beta 1$ integrin-mediated chemoresistance is associated with the inhibition of doxorubicin-induced Rac1 activation upstream of JNK activation and with the inhibition of the DNA damage response as determined with the phosphorylation levels of histone HA2X. Together our results show that $\alpha 2\beta 1$ integrin can be a major pathway protecting leukemic cells from genotoxic agents and may thus represent an important therapeutic target in anti-cancer treatment.

4.4 Experimental procedures

4.4.1 Reagents and Antibodies

Collagen type I and doxorubicin were from Sigma (St-Louis, MO, USA). Human fibronectin was purchased from Millipore (Bellerica, MA, USA). The JNK (SP600125), MEK-1 (U0126) and PI3 kinase/AKT (wortmanin) inhibitors were from Calbiochem (San Diego, CA, USA). Rac1 inhibitor (NSC23766) was obtained from Tocris Bioscience (Ellisville, MO, USA). Antibodies were obtained as follows: anti-phospho-p44/42 MAPK/ERK (E-4), anti-ERK2 (C-14), anti-caspase-3 that detects the native and the active fragments of caspase-3, anti-Mcl-1, anti-Bcl-2 and anti- β -actin (C-2) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA); anti-phospho-AKT (Ser-473), anti-AKT, anti-caspase-9, which detects the native and active fragments of caspase-9, anti-Bcl-xL, anti-phospho-JNK1/2 (G9) and anti-JNK-2 (#9252) were from Cell Signaling Technologies (Beverly, MA, USA). PE-conjugated anti-human α 2 integrin (clone 12F1), PE-conjugated anti-human α 1 integrin (clone SR84) and APC-conjugated anti- β 1 integrin (clone MAR-4) and isotypic control antibodies were from BD Biosciences (San Diego, CA, USA). The anti- β 1 integrin (clone 4B4) and anti- α 2 integrin (PEI6) blocking antibodies were purchased from Beckman Coulter (Brea, CA, USA) and Millipore (Bellerica, MA, USA) respectively.

4.4.2 Leukemia cell lines and cell culture

The AML cell lines U937, HL-60, PLB-985 and T-ALL cell lines Jurkat, HSB2, MOLT-3 were from ATCC (Manhasset, VA, USA). Cells were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS), 2 mmol/L glutamine and 100 units/mL penicillin and streptomycin.

4.4.3 Matrix coating and determination of apoptosis

48-well plates were coated overnight with 1 mg/ml of collagen type I and fibronectin or with bovine serum albumin (BSA) (1%) at room temperature under the drying air of the hood as previously described [28, 29]. Leukemic cells (5×10^5) in 500 μ l of serum-free medium containing 50 μ g/ml BSA were seeded into coated wells. After 1 h incubation at 37^oC, the wells were washed gently to remove non-adherent cells. The remaining cells were

then treated with doxorubicin in RPMI medium containing 2,5% serum. Apoptosis was determined after 24h by annexin V staining and flow cytometry analysis using the FACS Calibur cytometer (BD Biosciences).

4.4.4 Immunoblot analysis of Caspase activation, Bcl-2 proteins expression, JNK phosphorylation

Activation of caspase-9 and caspase-3, expression levels of Mcl-1, Bcl-2 and Bcl-xL and JNK1/2 phosphorylation were determined by immunoblot analysis using specific antibodies as previously described [27]. β -actin was used as loading control.

4.4.5 RNA isolation and analysis

Total RNA was extracted with Trizol Reagent according to the manufacturer's instructions (Life Technologies). First-strand cDNA was prepared from 2 μ g of total RNA using the ThermoScript RT-PCR system from Invitrogen (Carlsbad, CA). α 1, α 2 integrin and β -actin transcripts were amplified by PCR using specific primers. PCR reactions were carried out with 1 U Taq polymerase in a total volume of 50 μ L, and amplifications were carried out in a Peltier Thermal Cycler from MJ Research. The PCR amplifications conditions and specific primers for α 1, α 2 integrin and β -actin were as respectively described [30-32].

4.4.6 Cell surface expression of integrin subunits

The cells were first incubated on ice for 1 h with inactivated human serum to block putative Fc γ receptors. After three washes with PBS, the cells were stained with 10 μ g/ml of phycoerytherin-conjugated antibodies against human α 1, α 2 and APC-conjugated anti- β 1 integrin subunits or with their corresponding isotypic antibodies for 30 minutes on ice. The cells were washed with PBS and analyzed by flow cytometry (FACSCalibur, BD Biosciences).

4.4.7 Plasmids and transient cell transfection

The plasmids encoding c-Myc-tagged forms of wild type Rac1 (WT-Rac1) and dominant-negative Rac1 (N17-Rac1) were generously provided by Dr. Josée N. Lavoie (Laval University, Canada) and were previously described [33]. 2×10^6 cells were transfected with a total of 3 μ g of the different plasmids (pcDNA3.1, N17Rac1+pcDNA3.1 or N17Rac1+

WT Rac1) using Amaxa nucleofector apparatus (Program C016) according to the manufacturer's instructions. After 24 h of transfection, viable cells were recovered by ficoll gradient and used in subsequent experiments. Transfection efficiency was verified by western blot analysis using anti-cMyc specific antibody kindly provided by Dr Sylvain Bourgoin (Laval University).

4.4.8 Generation of MOLT-3 cells overexpressing $\alpha 2\beta 1$ integrin

The generation of MOLT-3 cells expressing the $\alpha 2$ integrin chain (MOLT-3- $\alpha 2$) was carried out as previously described [34]. Briefly, the cells were transfected by electroporation using the Bio-RAD gene pulser X cellTM and after 48 h, viable cells were recovered by ficoll gradient and grown in a complete medium containing 1 mg/ml of geneticin. After 3 weeks of selection, the cells were tested for the expression of $\alpha 2$ integrin by flow cytometry. Control cells expressing the pcDNA plasmid (MOLT-3-pcDNA) were also generated in the same experimental conditions as for (MOLT-3- $\alpha 2$).

4.4.9 Mcl-1 knockdown by RNA interference

Two validated Mcl-1 silencing sequences and silencer negative control siRNA were from Ambion and were used in our previous study [35]. 5×10^6 cells were transfected with 0.2-1 μ M of siRNA using the nucleofector method from Amaxa according to the manufacturer's instructions. Mcl-1 downregulation was verified by immunoblot analysis using Mcl-1 specific antibody.

4.4.10 Measurement of Rac1 activity

Commercial Rac-1 G-LISATM kit customized to capture and quantify Rac1-GTP was purchased from Cytoskeleton, Inc (Denver, CO, USA). Rac1-GTP activity was assessed on treated and untreated cell lysates according to the manufacturer's instructions.

4.4.11 Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Student's t-test. Results with $p < 0.05$ were considered significant.

4.5 Results

4.5.1 $\alpha 2\beta 1$ integrin protects AML cell lines from doxorubicin-induced apoptosis

To study the role of collagen in AML response to chemotherapy, we first examined the expression of the two major collagen-binding integrins $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$ on two well-characterized AML cell lines HL-60 and U937. RT-PCR analysis indicates that $\alpha 2$ mRNA is detected in the two cell lines, while the expression of $\alpha 1$ mRNA is only detected in HL-60 cells (Fig. 1A). However, FACS analysis revealed that only $\alpha 2$ integrin chain is expressed at the protein level on both HL-60 and U937 cells, 98% and 77% of positive cells respectively (Fig. 1B). As expected, all the cells express high levels of $\beta 1$ integrin subunit. Altogether, these data indicate that $\alpha 2\beta 1$ but not $\alpha 1\beta 1$ integrin can be the major collagen-binding integrin expressed on AML cells.

We then studied the role of $\alpha 2\beta 1$ integrin in mediating AML cell protection against doxorubicin-induced apoptosis. U937 and HL-60 cells cultured on collagen are significantly protected against doxorubicin-induced apoptosis, by about 33.34% and 25.3% respectively, comparing to cells grown on plastic or on BSA (Fig. 2A&B). The collagen protective effect is similar to that obtained with cells adherent to VCAM-1 or to fibronectin. Interestingly, simultaneous adhesion of AML cell lines to collagen + fibronectin or collagen+VCAM-1 did not lead to a further inhibition of doxorubicin-induced apoptosis (Fig. 2A&B). The expression of $\alpha 2$ integrin and the protective effect of collagen are also observed in the myeloid PLB-985 cell line (Fig. 1S). The protective effect of collagen is mediated via $\alpha 2$ integrin as it is reversed by the use of a specific anti- $\alpha 2$ integrin blocking mAb (Fig. 2C). Together these results indicate that in addition to T-ALL cells [27], $\alpha 2\beta 1$ integrin also promotes doxorubicin chemoresistance in AML cells. To complement the inhibition studies, we examined if ectopic expression of $\alpha 2$ integrin can promote the protective effect of collagen. To this end, we used the MOLT-3 leukemia T cell line as a model to induce the stable expression of $\alpha 2$ integrin subunit. The MOLT-3 control cells (pcDNA) do not express $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha 1\beta 1$ integrins (Fig. 3A). In contrast, MOLT-3 transfected with the $\alpha 2$ integrin plasmid significantly express $\alpha 2$ integrin (75.23%) but not $\alpha 1$ integrin (5.19%) in comparison to MOLT3-pcDNA (Fig. 3A). As expected, $\alpha 2$ integrin overexpression promoted a significant protection of MOLT3- $\alpha 2$ cells

by collagen against doxorubicin-induced apoptosis (Fig. 3B). However, collagen had no effect on MOLT3-pcDNA3.1 cells response to doxorubicin (Fig. 3B). These data indicate that $\alpha 2\beta 1$ integrin can be a major pathway in leukemia chemoresistance.

4.5.2 Collagen promotes doxorubicin chemoresistance by inhibiting Rac1 activation

Growing evidence suggests that the GTPase Rac1 can have an important role in apoptosis [20-22]. To test this possibility and determine whether Rac1 activity can be regulated by collagen signaling, we first assessed Rac1 implication in doxorubicin-induced apoptosis. For this, we used the specific Rac1 inhibitor NSC 23766. As shown in Fig. 4A&B, doxorubicin-induced apoptosis of U937 and Jurkat cells was remarkably reduced in the presence of NSC23766 (by about 50%). NSC23766 used alone, had no significant effect on leukemia cell survival. To confirm these results, we transiently expressed a dominant-negative form of Rac1 (N17Rac1) (Fig. 3S) and found that doxorubicin-induced apoptosis is reduced by approximately 40% in comparison to control cells (transfected with pcDNA plasmid) (Fig. 4C). In addition, exogeneous expression of wild type Rac1 abolishes the effect of N17Rac1 indicating that N17Rac1 specifically interferes with Rac1 signaling in leukemic cells (Fig. 4C). Altogether, these data indicate that Rac1 is an important pathway in doxorubicin-induced apoptosis of leukemic cells. We then examined if collagen modulates Rac1 activity in doxorubicin-treated cells. The results in Fig. 4D show that doxorubicin increases by two-fold Rac1 activity in U937 and Jurkat leukemic cells and that collagen by itself had no effect but abrogates doxorubicin-induced Rac1 activity. These results show that collagen promotes doxorubicin chemoresistance by inhibiting Rac1 activation.

4.5.3 Collagen promotes doxorubicin chemoresistance by inhibiting Rac1/JNK pathway

We have previously shown that JNK is involved in doxorubicin-induced apoptosis of T-ALL via the down-modulation of the anti-apoptotic Mcl-1 and that collagen promoted doxorubicin chemoresistance by inhibiting JNK activation, thus restoring Mcl-1 levels [27]. We obtained similar findings with AML cells. The JNK inhibitor (SP600125, 10uM) reduced doxorubicin-induced apoptosis (Fig. 5A) and JNK activation (Fig 5B) and restored Mcl-1 levels in doxorubicin-treated cells (Fig. 5c). Moreover, collagen reduced

doxorubicin-induced caspase-9 and -3 activation, maintained Mcl-1 levels in doxorubicin-treated cells and Mcl-1 silencing abrogated the protective effect of collagen (Fig. S2).

We then examined if Rac1 contributes to doxorubicin-induced apoptosis by activating the JNK proapoptotic pathway. As shown in Fig. 6A&B, treatment of the AML (U937) and T-ALL (Jurkat) cell lines with the Rac1 inhibitor reduces doxorubicin-induced JNK activation. Furthermore, the Rac1 inhibitor partially restored Mcl-1 levels in both leukemic cell lines (Fig. 6C&D). Together these results indicate that Rac1 contributes to doxorubicin-induced apoptosis at least through activation of JNK, which led to the reduction of Mcl-1 levels and that collagen can promote doxorubicin chemoresistance by inhibiting the Rac1/JNK proapoptotic pathway.

4.5.4 Collagen downregulates Rac1 activation in MAPK/ERK dependent-manner

We previously showed that MAPK/ERK but not PI3K/AKT is associated with collagen signaling and chemoresistance in T-ALL [27]. In agreement, we found that collagen also enhances ERK activation in U937 cells (Fig. 7A) and HL-60 cells (Data not shown). The MEK1/2 specific inhibitor U0126 abrogated the protective effect of collagen (Fig. 7B). However, collagen had no effect on AKT activation and the PI3 Kinase/AKT specific inhibitor (wortmanin) did not affect collagen-mediated chemoresistance (Fig.S4). Pretreatment of AML cells with U0126 but not with wortmanin abolished the capacity of collagen to inhibit doxorubicin-induced Rac1 activation (Fig. 7C). These data indicate that collagen-induced MAPK/ERK is required for inhibiting Rac1 activation.

4.5.5 Collagen reduces Rac1-dependent DNA damage response

Rac1 is also important in the nucleus during genotoxic stress as it enhances the binding of topoisomerase poisons to their targets to lead to the formation of DNA double strand breaks and the activation of the DNA damage response [23, 24]. A hallmark of this response is the phosphorylation of histone H2AX [36]. Therefore, we examined if collagen would affect genotoxic stress at the level of DNA damage response. The results show that doxorubicin treatment induces the phosphorylation of H2AX, which is inhibited by the Rac1 inhibitor in U937 and Jurkat cells (Fig. 8A&B). In addition, collagen reduces H2AX phosphorylation,

which is reversed by the MEK-1 inhibitor suggesting that the protective effect of collagen on DNA damage is also dependent on the MAPK/ERK pathway (Fig. 8C&D).

4.6 Discussion

The mechanisms by which integrin/ECM interactions regulate chemoresistance are not fully elucidated. Previous studies have shown the importance of $\alpha 4\beta 1$ integrin interaction with fibronectin in chemoresistance of AML cells [10, 12]. However, clinical studies failed to establish a correlation between $\alpha 4\beta 1$ levels and the clinical outcome of AML patients such as relapse and survival [13, 14]. We have recently reported that the collagen-binding integrin $\alpha 2\beta 1$ promotes doxorubicin resistance of T-ALL cells [27, 32]. Herein, we extend these findings by showing that collagen/ $\alpha 2\beta 1$ integrin promotes doxorubicin chemoresistance of AML cell lines to the same extent as fibronectin/ $\alpha 4\beta 1$ integrin signaling. These results suggest that there might be a redundancy in integrin signaling pathways involved in AML chemoresistance. In our study, fibronectin did not protect T-ALL cells from chemotherapy-induced apoptosis [27, 32]. However, a recent report indicated that $\alpha 4\beta 1$ integrin has the capacity to promote Jurkat T cell chemoresistance [37]. In contrast to us, the authors of this study used recombinant ligands to crosslink $\alpha 4\beta 1$ integrin. Although redundancy between integrins might occur in T-ALL cells as well, additional experiments are warranted to sort out the role of fibronectin receptors in T-ALL chemoresistance. In agreement with our findings, it has been shown that HL-60 cell adherence to collagen promotes their protection against apoptosis induced by Ara-C and irradiation [38]. Thus, these studies strongly supports that the collagen-binding integrin $\alpha 2\beta 1$ might be one important pathway in AML and T-ALL chemoresistance. Although clinical studies should be undertaken to fully address the significance of these findings, a recent study found using microarrays and a large cohort of T-ALL patients that genes encoding biological pathways including NF κ B and Wnt and adhesion molecules are the best predictors of relapse [39]. Interestingly $\alpha 2\beta 1$ integrin is among the adhesion signaling pathway identified [39].

Our results further show that doxorubicin-induced apoptosis requires Rac1 activity and that collagen / $\alpha 2\beta 1$ integrin promoted doxorubicin chemoresistance by inhibiting Rac1. Rac1 belongs to the family of small GTPases and is involved in cytoskeleton remodeling [40]. Integrins can activate Rac1 during cell adhesion and migration [19]. However, we found that collagen had no effect on Rac1 in leukemic cells and a previous report also showed that

the integrin $\alpha 1\beta 1$ could reduce ROS generation in mesangial cells by negatively regulating epidermal growth factor receptor-mediated Rac activation [41].

Recent studies have also attributed a major role for Rac1 in apoptosis and cell stress response [20, 21]. One major target of Rac1 in this process is JNK. The Rac1/JNK pathway has recently been involved in doxorubicin-induced apoptosis of cardiomyocytes and human cancer cells as well as in simvastatin-induced apoptosis in human cancer cells [22, 42]. Our results are in line with these studies and show that in human leukemia, doxorubicin also requires the activity of Rac1/JNK. Previously, we found in T-ALL cells that doxorubicin-induced JNK activity promoted apoptosis by downregulating the anti-apoptotic protein Mcl-1, and collagen inhibited JNK activation and restored Mcl-1 levels [27]. Similar findings were also made in the present study with AML cell lines. Therefore, the Rac1/JNK/Mcl-1 is likely to be a major apoptotic signaling pathway of doxorubicin cytotoxicity in leukemic cells and collagen/ $\alpha 2\beta 1$ integrin promotes doxorubicin chemoresistance by inhibiting this pathway at least at the level of Rac1.

Although it is unclear from our studies how Rac1 mediates JNK activation. Previous studies reported the implication of reactive oxygen species (ROS) in cardiomyocytes [22] and of Tiam1, a Rac1-specific guanine nucleotide exchange factor [43].

In addition to JNK activation, Rac1 also enhances the interactions of topoisomerases II with their respective drug, which then induces the formation of double strand breaks and the DNA damage response [23, 24], leading to either DNA repair or to cell cycle arrest and induction of cell death [25]. In this regard, our results found that Rac1 is necessary for the phosphorylation of histone H2AX, which is believed to be a hallmark of DNA damage response and that collagen/ $\alpha 2\beta 1$ integrin also inhibited the phosphorylation of H2AX; therefore interfering with DNA damage signaling. Thus, we propose that $\alpha 2\beta 1$ integrin protects leukemia cells from genotoxic agents at least by inhibiting Rac1 activation, which in turn leads to the inhibition of DNA damage caused by doxorubicin and to the inhibition of JNK activation. This indicates an important role for $\alpha 2\beta 1$ integrin during anti-cancer therapy as it can preserve the ability of cancer cells to replicate and proliferate. It is unclear if other integrins can have a similar protective effect. Interestingly, Rac1/JNK has been involved with doxorubicin toxicity in cardiomyocytes. However, these cells do not express

$\alpha 2\beta 1$ integrin and the main integrin expressed is $\alpha 7\beta 1$, which interacts with fibronectin [44]. The absence of $\alpha 2\beta 1$ integrin on these cells could explain their increased sensitivity to doxorubicin. Together, these studies strongly support the importance of $\alpha 2\beta 1$ integrin in the protection from genotoxic agents.

Our study provides evidence that $\alpha 2\beta 1$ integrin inhibited Rac1 activation and HA2X phosphorylation in doxorubicin-treated cells via the MAPK/ERK pathway. Our previous findings in T-ALL cells [27] and herein with AML cells show that MAPK/ERK activation is necessary for collagen-mediated chemoresistance, JNK inhibition and restoration of Mcl-1 levels. MAPK/ERK is an important cell survival pathway, which can have various anti-apoptotic effects by targeting caspases and Bcl-2 proteins [45]. Therefore, one major mechanism by which MAPK/ERK downstream of $\alpha 2\beta 1$ integrin promotes doxorubicin chemoresistance in leukemic cells is through the inhibition of Rac1. To our knowledge, our study is the first to show Rac1 as an additional target for MAPK/ERK in cancer cell survival and protection from genotoxic stress.

In summary, our study provides evidence that $\alpha 2\beta 1$ integrin pathway can be a major pathway in protection against genotoxic stress and in leukemia chemoresistance suggesting that its blockade or the design of novel agents that can induce leukemia cell death independently from the Rac1/JNK pathway might be helpful in preventing the emergence of drug-resistant cells.

4.7 Acknowledgments

We are grateful to Dr. Josée N. Lavoie (Laval University) for providing us with the plasmids coding for dominant negative Rac1 (N17 Rac1) and wild-type Rac1 and to Dr. Sylvain Bourgoin (Laval University) for anti-cMyc antibody.

4.8 Footnotes

This work was supported by Canadian Institutes of Health Research Grant MOP-98005 (to F. A.).

4.9 References

1. Ganguly KK, Pal S, Moulik S, Chatterjee A: Integrins and metastasis. *Cell adhesion & migration* 2013, 7(3):251-261.
2. Xiong J, Balcioglu HE, Danen EH: Integrin signaling in control of tumor growth and progression. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2013, 45(5):1012-1015.
3. Paoli P, Giannoni E, Chiarugi P: Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. *Biochimica et biophysica acta* 2013, 1833(12):3481-3498.
4. Vachon PH: Integrin signaling, cell survival, and anoikis: distinctions, differences, and differentiation. *Journal of signal transduction* 2011, 2011:738137.
5. Aoudjit F, Vuori K: Integrin signaling in cancer cell survival and chemoresistance. *Chemotherapy research and practice* 2012, 2012:283181.
6. Samudio I, Konopleva M, Carter B, Andreeff M: Apoptosis in leukemias: regulation and therapeutic targeting. *Cancer treatment and research* 2010, 145:197-217.
7. Stupack DG, Cheresch DA: Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. *Journal of cell science* 2002, 115(Pt 19):3729-3738.
8. Klein G, Muller CA, Tillet E, Chu ML, Timpl R: Collagen type VI in the human bone marrow microenvironment: a strong cytoadhesive component. *Blood* 1995, 86(5):1740-1748.
9. Van der Velde-Zimmermann D, Verdaasdonk MA, Rademakers LH, De Weger RA, Van den Tweel JG, Joling P: Fibronectin distribution in human bone marrow stroma: matrix assembly and tumor cell adhesion via alpha5 beta1 integrin. *Experimental cell research* 1997, 230(1):111-120.
10. Matsunaga T, Takemoto N, Sato T, Takimoto R, Tanaka I, Fujimi A, Akiyama T, Kuroda H, Kawano Y, Kobune M et al: Interaction between leukemic-cell VLA-4 and stromal fibronectin is a decisive factor for minimal residual disease of acute myelogenous leukemia. *Nature medicine* 2003, 9(9):1158-1165.
11. Shain KH, Dalton WS: Environmental-mediated drug resistance: a target for multiple myeloma therapy. *Expert review of hematology* 2009, 2(6):649-662.
12. Jacamo R, Chen Y, Wang Z, Ma W, Zhang M, Spaeth EL, Wang Y, Battula VL, Mak PY, Schallmoser K et al: Reciprocal leukemia-stroma VCAM-1/VLA-4-dependent activation of NF-kappaB mediates chemoresistance. *Blood* 2014, 123(17):2691-2702.
13. Becker PS, Kopecky KJ, Wilks AN, Chien S, Harlan JM, Willman CL, Petersdorf SH, Stirewalt DL, Papayannopoulou T, Appelbaum FR: Very late antigen-4 function of

myeloblasts correlates with improved overall survival for patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2009, 113(4):866-874.

14. Walter RB, Alonzo TA, Gerbing RB, Ho PA, Smith FO, Raimondi SC, Hirsch BA, Gamis AS, Franklin JL, Hurwitz CA et al: High expression of the very late antigen-4 integrin independently predicts reduced risk of relapse and improved outcome in pediatric acute myeloid leukemia: a report from the children's oncology group. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2010, 28(17):2831-2838.

15. Becker PS: Dependence of acute myeloid leukemia on adhesion within the bone marrow microenvironment. *TheScientificWorldJournal* 2012, 2012:856467.

16. Fulda S, Debatin KM: Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 2006, 25(34):4798-4811.

17. Panaretakis T, Laane E, Pokrovskaja K, Bjorklund AC, Moustakas A, Zhivotovsky B, Heyman M, Shoshan MC, Grander D: Doxorubicin requires the sequential activation of caspase-2, protein kinase Cdelta, and c-Jun NH2-terminal kinase to induce apoptosis. *Molecular biology of the cell* 2005, 16(8):3821-3831.

18. Maha A, Cheong SK, Leong CF, Seow HF: Molecular responses during chemotherapy in acute myeloid leukemias in predicting poor-response to standard chemotherapy. *The Malaysian journal of pathology* 2009, 31(2):81-91.

19. Lawson CD, Burridge K: The on-off relationship of Rho and Rac during integrin-mediated adhesion and cell migration. *Small GTPases* 2014, 5(1).

20. Babelova A, Jansen F, Sander K, Lohn M, Schafer L, Fork C, Ruetten H, Plettenburg O, Stark H, Daniel C et al: Activation of Rac-1 and RhoA contributes to podocyte injury in chronic kidney disease. *PloS one* 2013, 8(11):e80328.

21. Manterola L, Hernando-Rodriguez M, Ruiz A, Apraiz A, Arrizabalaga O, Vellon L, Alberdi E, Cavaliere F, Lacerda HM, Jimenez S et al: 1-42 beta-amyloid peptide requires PDK1/nPKC/Rac 1 pathway to induce neuronal death. *Translational psychiatry* 2013, 3:e219.

22. Ma J, Wang Y, Zheng D, Wei M, Xu H, Peng T: Rac1 signaling mediates doxorubicin-induced cardiotoxicity through both reactive oxygen species-dependent and -independent pathways. *Cardiovascular research* 2013, 97(1):77-87.

23. Huelsenbeck SC, Schorr A, Roos WP, Huelsenbeck J, Henninger C, Kaina B, Fritz G: Rac1 protein signaling is required for DNA damage response stimulated by topoisomerase II poisons. *The Journal of biological chemistry* 2012, 287(46):38590-38599.

24. Wartlick F, Bopp A, Henninger C, Fritz G: DNA damage response (DDR) induced by topoisomerase II poisons requires nuclear function of the small GTPase Rac. *Biochimica et biophysica acta* 2013, 1833(12):3093-3103.

25. Roos WP, Kaina B: DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer letters* 2013, 332(2):237-248.
26. Teuffel O, Leibundgut K, Lehrnbecher T, Alonzo TA, Beyene J, Sung L: Anthracyclines during induction therapy in acute myeloid leukaemia: a systematic review and meta-analysis. *British journal of haematology* 2013, 161(2):192-203.
27. Naci D, El Azreq MA, Chetoui N, Lauden L, Sigaux F, Charron D, Al-Daccak R, Aoudjit F: alpha2beta1 integrin promotes chemoresistance against doxorubicin in cancer cells through extracellular signal-regulated kinase (ERK). *The Journal of biological chemistry* 2012, 287(21):17065-17076.
28. Naci D, Aoudjit F: Alpha2beta1 integrin promotes T cell survival and migration through the concomitant activation of ERK/Mcl-1 and p38 MAPK pathways. *Cellular signalling* 2014.
29. Kreger ST, Bell BJ, Bailey J, Stites E, Kuske J, Waisner B, Voytik-Harbin SL: Polymerization and matrix physical properties as important design considerations for soluble collagen formulations. *Biopolymers* 2010, 93(8):690-707.
30. Popov C, Radic T, Haasters F, Prall WC, Aszodi A, Gullberg D, Schieker M, Docheva D: Integrins alpha2beta1 and alpha11beta1 regulate the survival of mesenchymal stem cells on collagen I. *Cell death & disease* 2011, 2:e186.
31. de Nigris F, Botti C, Rossiello R, Crimi E, Sica V, Napoli C: Cooperation between Myc and YY1 provides novel silencing transcriptional targets of alpha3beta1-integrin in tumor cells. *Oncogene* 2007, 26(3):382-394.
32. El Azreq MA, Naci D, Aoudjit F: Collagen/beta1 integrin signaling up-regulates the ABCC1/MRP-1 transporter in an ERK/MAPK-dependent manner. *Molecular biology of the cell* 2012, 23(17):3473-3484.
33. Robert A, Smadja-Lamere N, Landry MC, Champagne C, Petrie R, Lamarche-Vane N, Hosoya H, Lavoie JN: Adenovirus E4orf4 hijacks rho GTPase-dependent actin dynamics to kill cells: a role for endosome-associated actin assembly. *Molecular biology of the cell* 2006, 17(7):3329-3344.
34. Kaneki M, Kharbanda S, Pandey P, Yoshida K, Takekawa M, Liou JR, Stone R, Kufe D: Functional role for protein kinase Cbeta as a regulator of stress-activated protein kinase activation and monocytic differentiation of myeloid leukemia cells. *Molecular and cellular biology* 1999, 19(1):461-470.
35. Chetoui N, Sylla K, Gagnon-Houde JV, Alcaide-Loridan C, Charron D, Al-Daccak R, Aoudjit F: Down-regulation of mcl-1 by small interfering RNA sensitizes resistant melanoma cells to fas-mediated apoptosis. *Mol Cancer Res* 2008, 6(1):42-52.
36. Mah LJ, El-Osta A, Karagiannis TC: gammaH2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia* 2010, 24(4):679-686.

37. Liu CC, Leclair P, Yap SQ, Lim CJ: The membrane-proximal KXGFFKR motif of alpha-integrin mediates chemoresistance. *Molecular and cellular biology* 2013, 33(21):4334-4345.
38. Estrugo D, Fischer A, Hess F, Scherthan H, Belka C, Cordes N: Ligand bound beta1 integrins inhibit procaspase-8 for mediating cell adhesion-mediated drug and radiation resistance in human leukemia cells. *PloS one* 2007, 2(3):e269.
39. Cleaver AL, Beesley AH, Firth MJ, Sturges NC, O'Leary RA, Hunger SP, Baker DL, Kees UR: Gene-based outcome prediction in multiple cohorts of pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *Molecular cancer* 2010, 9:105.
40. Wang S, Watanabe T, Matsuzawa K, Katsumi A, Kakeno M, Matsui T, Ye F, Sato K, Murase K, Sugiyama I et al: Tiam1 interaction with the PAR complex promotes talin-mediated Rac1 activation during polarized cell migration. *The Journal of cell biology* 2012, 199(2):331-345.
41. Chen X, Abair TD, Ibanez MR, Su Y, Frey MR, Dise RS, Polk DB, Singh AB, Harris RC, Zent R et al: Integrin alpha1beta1 controls reactive oxygen species synthesis by negatively regulating epidermal growth factor receptor-mediated Rac activation. *Molecular and cellular biology* 2007, 27(9):3313-3326.
42. Zhu Y, Casey PJ, Kumar AP, Pervaiz S: Deciphering the signaling networks underlying simvastatin-induced apoptosis in human cancer cells: evidence for non-canonical activation of RhoA and Rac1 GTPases. *Cell death & disease* 2013, 4:e568.
43. Zhu G, Fan Z, Ding M, Mu L, Liang J, Ding Y, Fu Y, Huang B, Wu W: DNA Damage Induces the Accumulation of Tiam1 by Blocking beta-TrCP-dependent Degradation. *The Journal of biological chemistry* 2014, 289(22):15482-15494.
44. Israeli-Rosenberg S, Manso AM, Okada H, Ross RS: Integrins and integrin-associated proteins in the cardiac myocyte. *Circulation research* 2014, 114(3):572-586.
45. Steelman LS, Franklin RA, Abrams SL, Chappell W, Kempf CR, Basecke J, Stivala F, Donia M, Fagone P, Nicoletti F et al: Roles of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway in leukemia therapy. *Leukemia* 2011, 25(7):1080-1094.

4.10 Figures and legends

Figure 1: The collagen binding integrin $\alpha 2\beta 1$ but not $\alpha 1\beta 1$ integrin is expressed by U937 and HL-60 AML cell lines. (A) RT-PCR analysis of $\alpha 2$ and $\alpha 1$ integrin mRNA levels. HUVEC and the HSB2 T-ALL cell line were used as positive controls for $\alpha 1$ and $\alpha 2$ integrin chains respectively. β -actin mRNA was used as a loading control. (B) Flow cytometric analysis of $\alpha 1$, $\alpha 2$ and $\beta 1$ integrin subunits on HL-60 and U937 cells.

Figure 2: Collagen via $\alpha 2\beta 1$ integrin protects AML cell lines from doxorubicin-induced apoptosis. U937 (A) and HL-60 (B) cells were cultured on BSA (-), collagen (Col), fibronectin (Fn) or on VCAM-1 as indicated for 2 h. Cells in suspension were washed and adherent cells were treated with doxorubicin (Dox) for 24 h. Apoptosis was determined by annexin V staining and flow cytometry analysis. The results represent mean values \pm SD from three independent experiments. * $p < 0.05$ between samples cultured on collagen, fibronectin or VCAM-1 and samples cultured on BSA (-). (C) U937 cells were pretreated with 20 $\mu\text{g/ml}$ of anti- $\alpha 2$ blocking antibody (P1E6) or with isotypic control IgG for 1 h before their culture on collagen. The cells were then treated with doxorubicin and apoptosis was determined by annexin V staining and FACS analysis. The results represent mean values \pm SD from three independent experiments. *, $p < 0.05$ between samples cultured on collagen or collagen + IgG and samples cultured on collagen + P1E6 or on BSA (-).

Figure 3: $\alpha 2\beta 1$ integrin overexpression in MOLT-3 cells induces their protection by collagen against doxorubicin-induced apoptosis. MOLT-3 cells were transfected with pcDNA3.1 or $\alpha 2$ -integrin vectors as indicated under “Experimental Procedures section”. (A) The expression of $\alpha 1$ and $\alpha 2$ integrin subunits on MOLT-3-pcDNA and MOLT-3- $\alpha 2$ was determined by FACS analysis. (B) MOLT-3 transfected cells were cultured on collagen (Col) or poly-l-lysine (PLL) and then, adherent cells were treated for 24h with doxorubicin (Dox). Apoptosis was assessed by annexin V FITC staining and FACS analysis. The results represent mean values \pm SD from two independent experiments. * $p < 0.05$ between MOLT3- $\alpha 2$ samples cultured on collagen and cultured on PLL or on plastic (-).

Figure 4: Collagen protects leukemic cells by inhibiting Rac1 activation, which is necessary for doxorubicin-induced apoptosis. U937 (A), Jurkat (B) cells were pretreated with the specific Rac1 inhibitor NSC23766 (50uM) for 1h, before their treatment with doxorubicin (Dox) for 24 h. Apoptosis determined by Annexin V staining and flow cytometry analysis. The results represent mean values± SD of three independent experiments. *, $p<0.05$ between doxorubicin and doxorubicin+NSC23766 samples. Similar data were obtained with HL-60 cells (Data not shown). (C) N17Rac1 overexpression inhibits doxorubicin- induced apoptosis. U937 cells were transfected with pcDNA3.1, N17Rac1+pcDNA3.1 or with N17Rac1+WT-Rac1 plasmids. Viable cells were recovered 24 h after transfection by ficoll gradient. The cells were then treated with doxorubicin for 24 h. Annexin-V positive cells were determined by flow cytometry analysis. The results represent mean values± SD from three independent experiments. *, $p<0.05$ between doxorubicin-pcDNA3.1 and -N17-Rac1+pcDNA3.1 samples and between doxorubicin-N17Rac1+WTRac1 and -N17-Rac1+pcDNA3.1 samples. Similar data were obtained with Jurkat cells (data not shown). (D-E) Collagen inhibits doxorubicin-induced Rac1 activation. U937 (D) and Jurkat T (E) cells were cultured on BSA (-) or on collagen and treated or not with doxorubicin (Dox) for 3 h. The cells were harvested, lysed and Rac1 activation was determined by ELISA assay as indicated under “The Experimental Procedures section”. The results represent mean values± SD from three independent experiments. * $p<0.05$ between doxorubicin samples cultured on BSA (-) and on collagen (Col).

Figure 5: Collagen-mediated chemoresistance in AML cells is associated with the inhibition of doxorubicin-induced JNK activation. (A) The JNK inhibitor reduces doxorubicin-induced apoptosis. U937 were pretreated with 10 μ M of SP600125 for 1h before their treatment with doxorubicin (Dox). Apoptosis was determined after 24 h using annexin V staining and FACS analysis. The results represent mean values± SD from three independent experiments. * $p<0.05$ between doxorubicin- and doxorubicin+SP600125-treated samples. (B) The JNK inhibitor reverses doxorubicin-induced Mcl-1 downregulation. U937 cells were pretreated or not with SP600125 and then treated with doxorubicin (Dox). After 16 h, the cells were lysed and Mcl-1 levels were determined by immunoblot analysis. β -actin immunoblot was used as loading control. (C) Collagen inhibits doxorubicin-induced JNK activation. U937 cells were cultured on collagen or on

BSA for 2h and adherent cells were treated with doxorubicin for 8h. The cells were lysed and JNK1/2 phosphorylation levels were determined by immunoblot analysis. The blot was stripped and reprobed with anti-JNK2 antibody for equal loading. The immunoblots shown in (B and C) are representative of two independent experiments and similar data were obtained with HL-60 (data not shown).

Figure 6: Rac1 activity is necessary for doxorubicin-induced JNK activation and Mcl-1 downregulation. U937 (A) and Jurkat cells (B) were treated or not with doxorubicin (Dox) in the presence or absence of the Rac1 inhibitor NS23766 (50uM, 1 h). After 8 h, the cells were lysed and JNK activation was determined by immunoblot analysis. The blot was stripped and reprobed with anti-JNK2 for equal loading. U937 (C) and Jurkat cells (D) were treated as above and after 16 h, the cells were lysed and the levels of Mcl-1 were determined by immunoblot analysis. The blot was stripped and reprobed with anti- β -actin for equal loading. The results in both panels are representative of three independent experiments.

Figure 7: Collagen-induced chemoresistance and Rac1 inhibition are dependent on the MAPK/ERK pathway. (A) U937 cells were activated with collagen for different periods of times and ERK activation was determined by immunoblot analysis. The blot was stripped and reprobed with anti-ERK2 for equal loading. Similar data were obtained with HL-60 cells (Data not shown) (B) U937 cells were pretreated or not with 20 μ M of the MAPK/ERK inhibitor (U0126) and then cultured on collagen for 2 h. Adherent cells were then treated with doxorubicin (Dox). Apoptosis was determined by DNA fragmentation ELISA assay. The results represent mean values \pm SD from three independent experiments. * $p < 0.05$ between doxorubicin+collagen and doxorubicin+ collagen +U0126- treated samples. (C) U937 cells were pretreated or not with 20 μ M of the MAPK/ERK inhibitor (U0126) or with 200 nM of the PI3 kinases/AKT inhibitor (wortmanin) and then cultured on collagen and treated with doxorubicin (Dox). After 3h, the cells were lysed and Rac1 activation was determined by ELISA assay. The results represent mean values \pm SD from three independent experiments. * $p < 0.05$ between doxorubicin + collagen and doxorubicin+ collagen +U0126- treated samples. Similar data were also obtained with Jurkat cells (data not shown).

Figure 8: Collagen inhibits H2AX phosphorylation. U937 (A) and Jurkat cells (B) were treated with doxorubicin in the presence or absence of the Rac1 inhibitor NSC23766. The cells were lysed and H2AX phosphorylation (Serine 139) was determined by immunoblot analysis. (C-D) The cells were pretreated or not with the MEK1 inhibitor (U0126) and then cultured on plastic or on collagen. Adherent cells were then treated with doxorubicin. After 2h of culture, the cells were lysed and H2AX phosphorylation was determined by immunoblot analysis. In both panels (A and B), the blots were stripped and reprobbed with anti- β -actin antibody for equal loading. The results are representative of three different experiments.

Figure 1 : The collagen binding integrin $\alpha 2\beta 1$ but not $\alpha 1\beta 1$ integrin is expressed by U937 and HL-60 AML cell lines

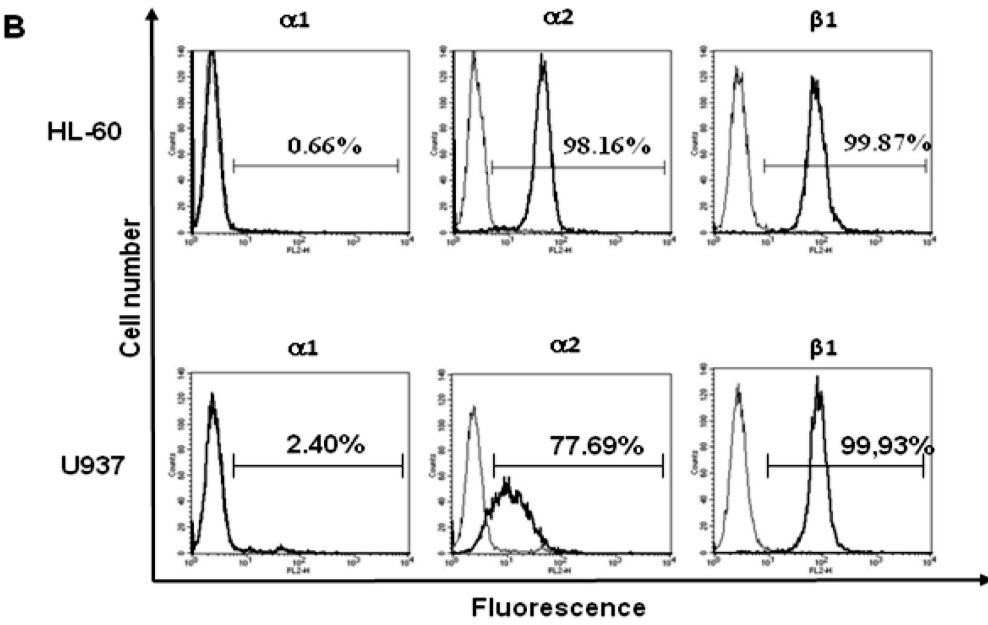
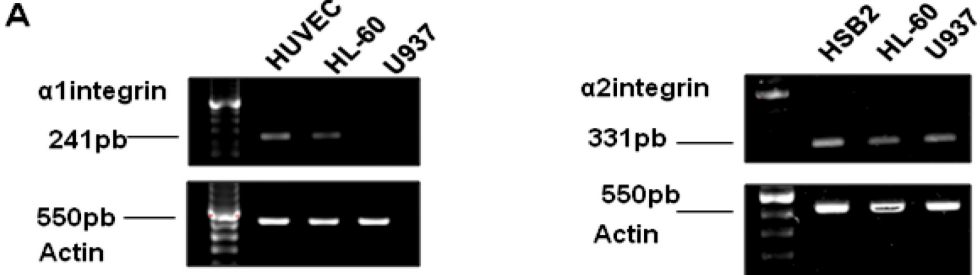


Figure 2 : Collagen protects AML cell lines from doxorubicin-induced apoptosis via $\alpha 2\beta 1$ integrin

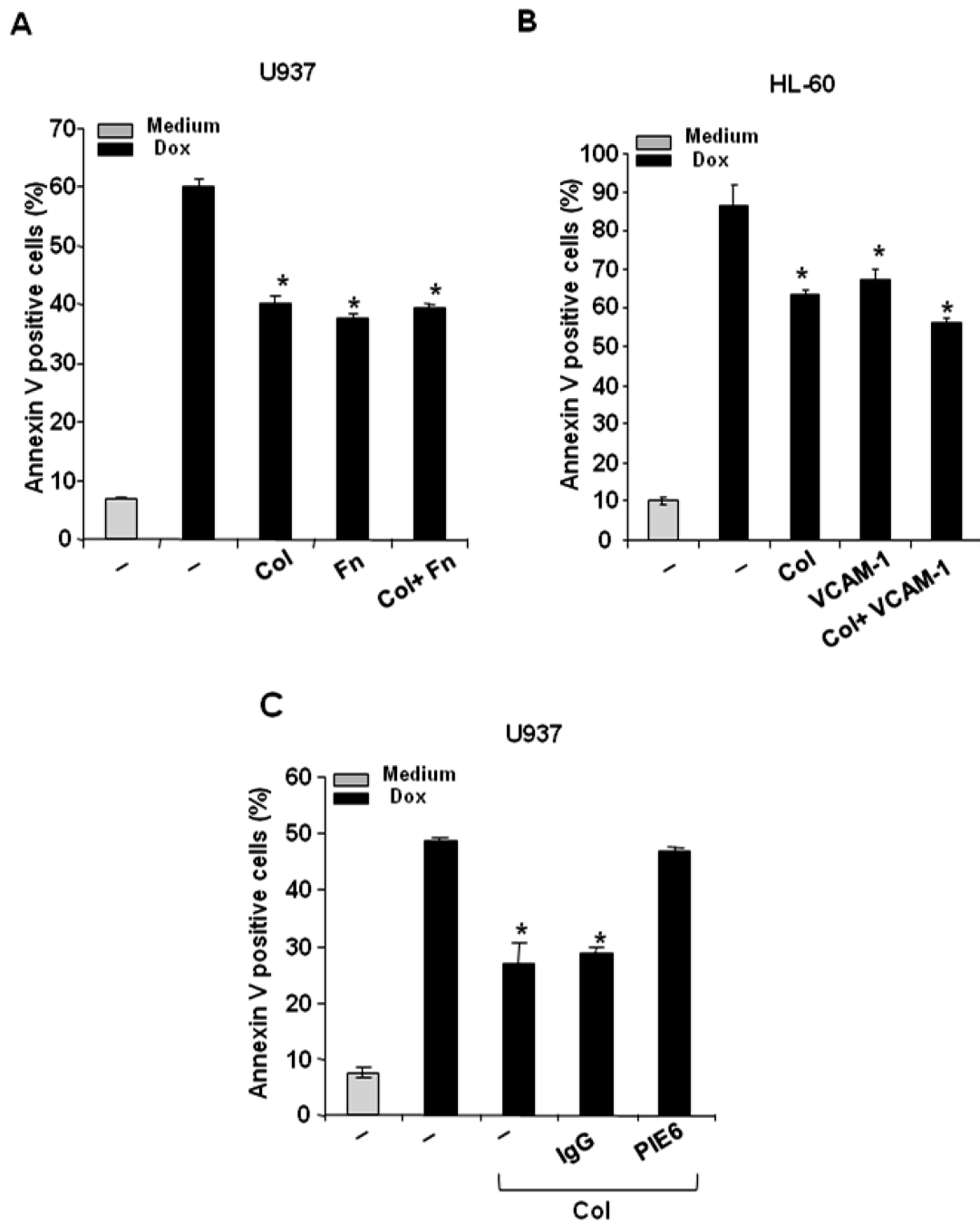


Figure 3 : $\alpha2\beta1$ integrin overexpression in MOLT-3 cells induces their protection by collagen against doxorubicin-induced apoptosis

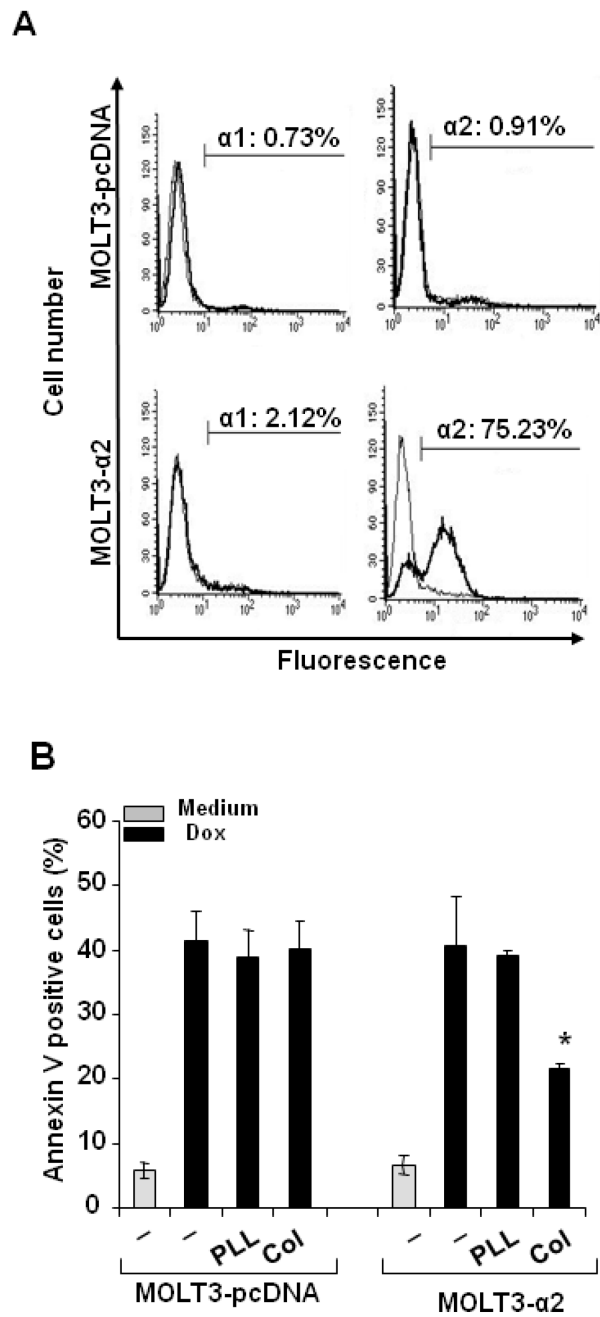


Figure 4 : Collagen protects leukemic cells by inhibiting Rac1 activation, which is necessary for doxorubicin-induced apoptosis

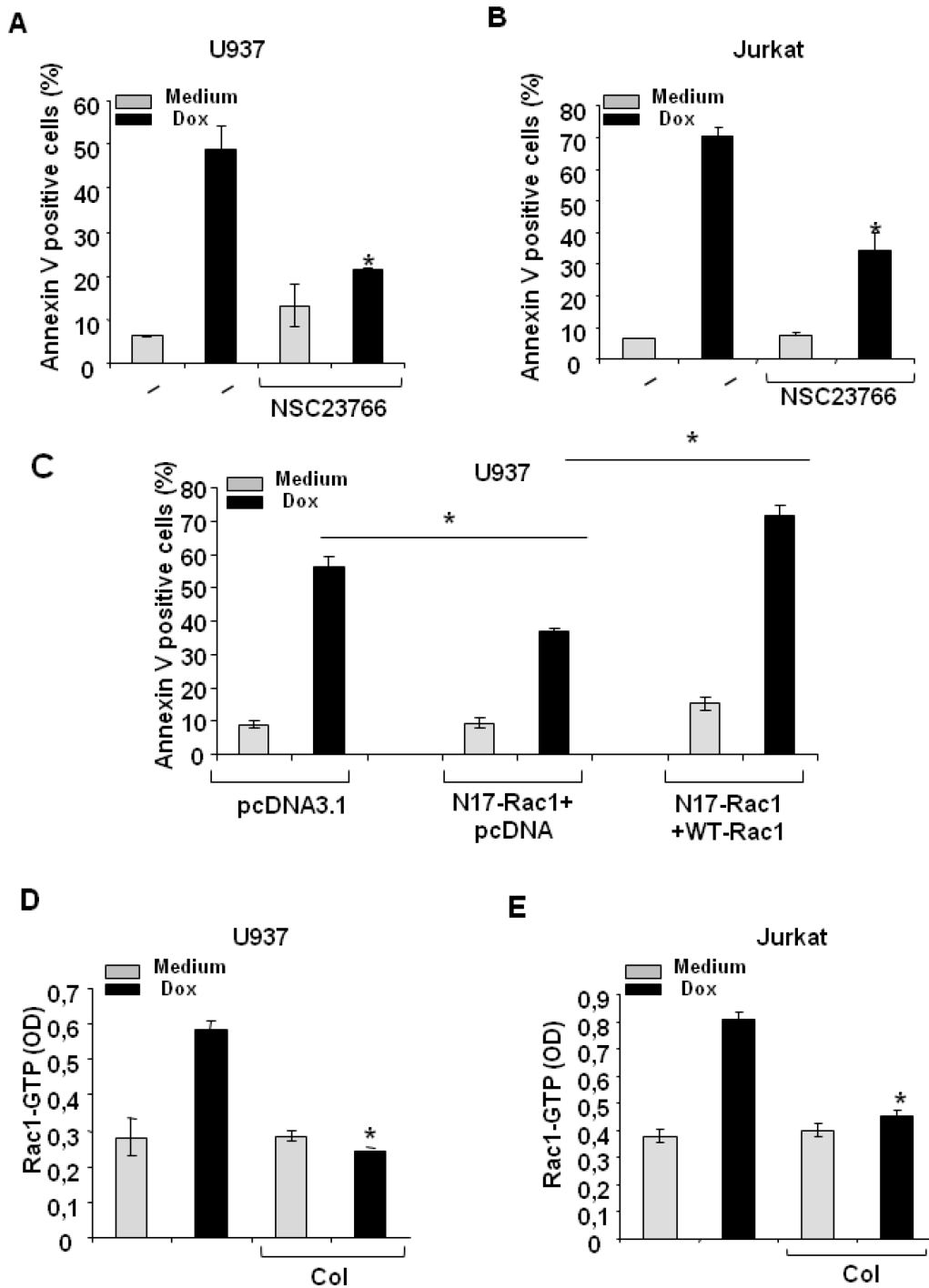


Figure 5 : Collagen-mediated chemoresistance in AML cells is associated with the inhibition of doxorubicin-induced JNK activation

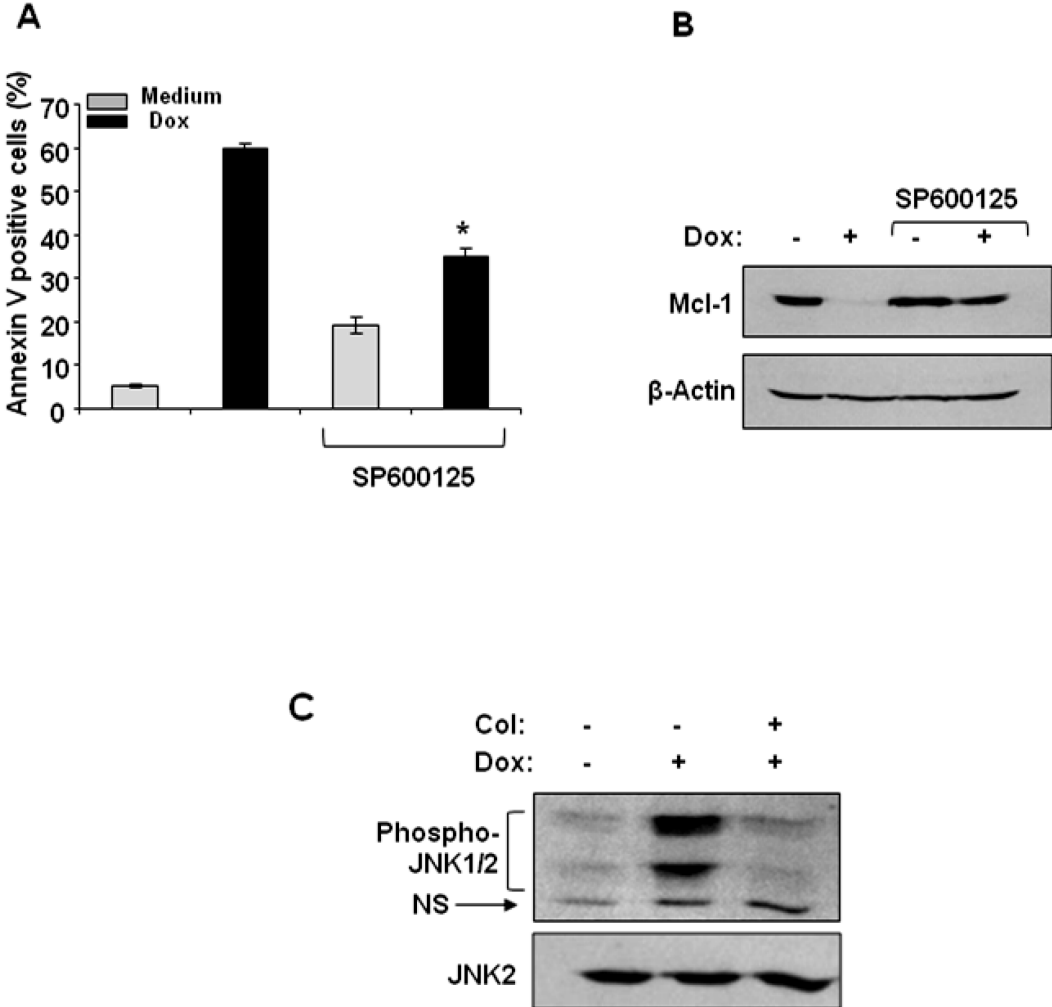


Figure 6 : Rac1 activity is necessary for doxorubicin-induced JNK activation and Mcl-1 downregulation

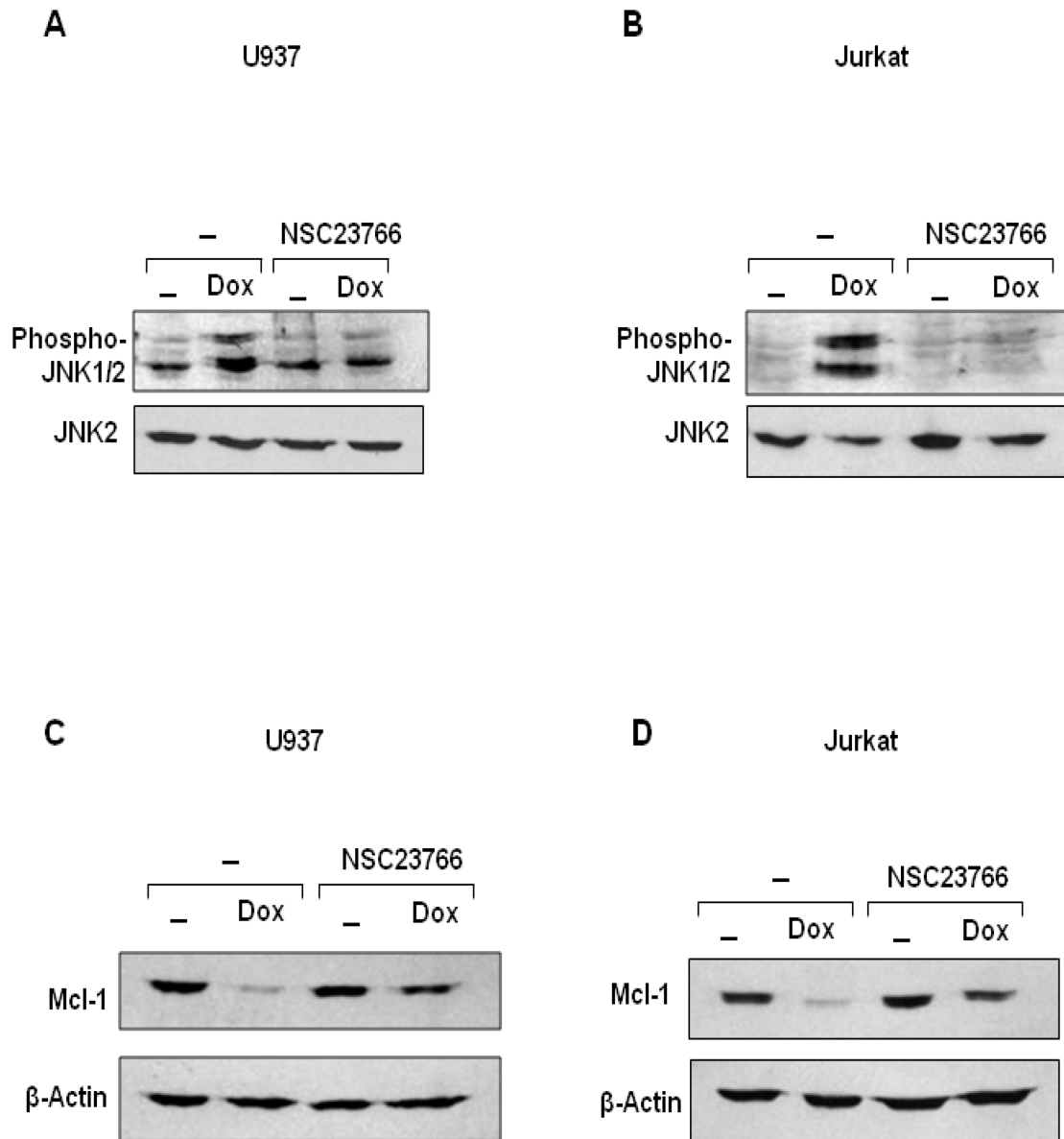


Figure 7 : Collagen-induced chemoresistance and Rac1 inhibition are dependent on the MAPK/ERK pathway

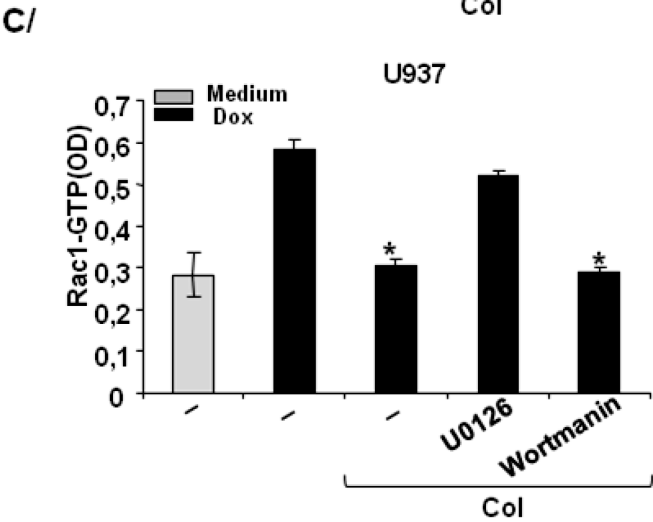
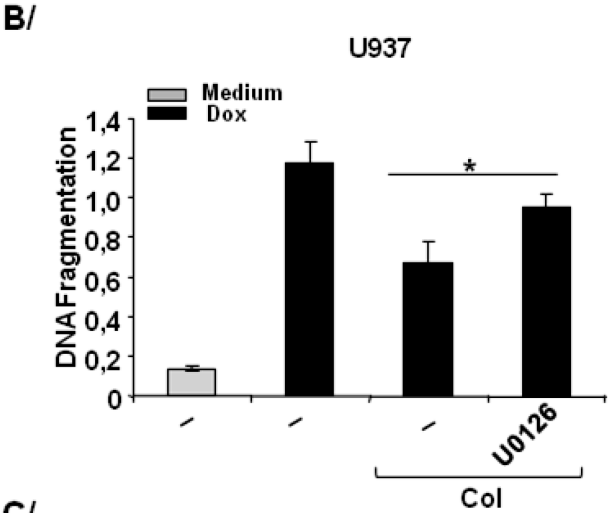
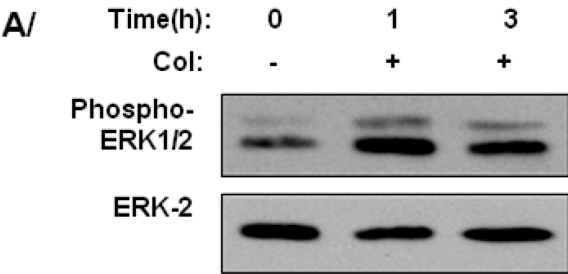
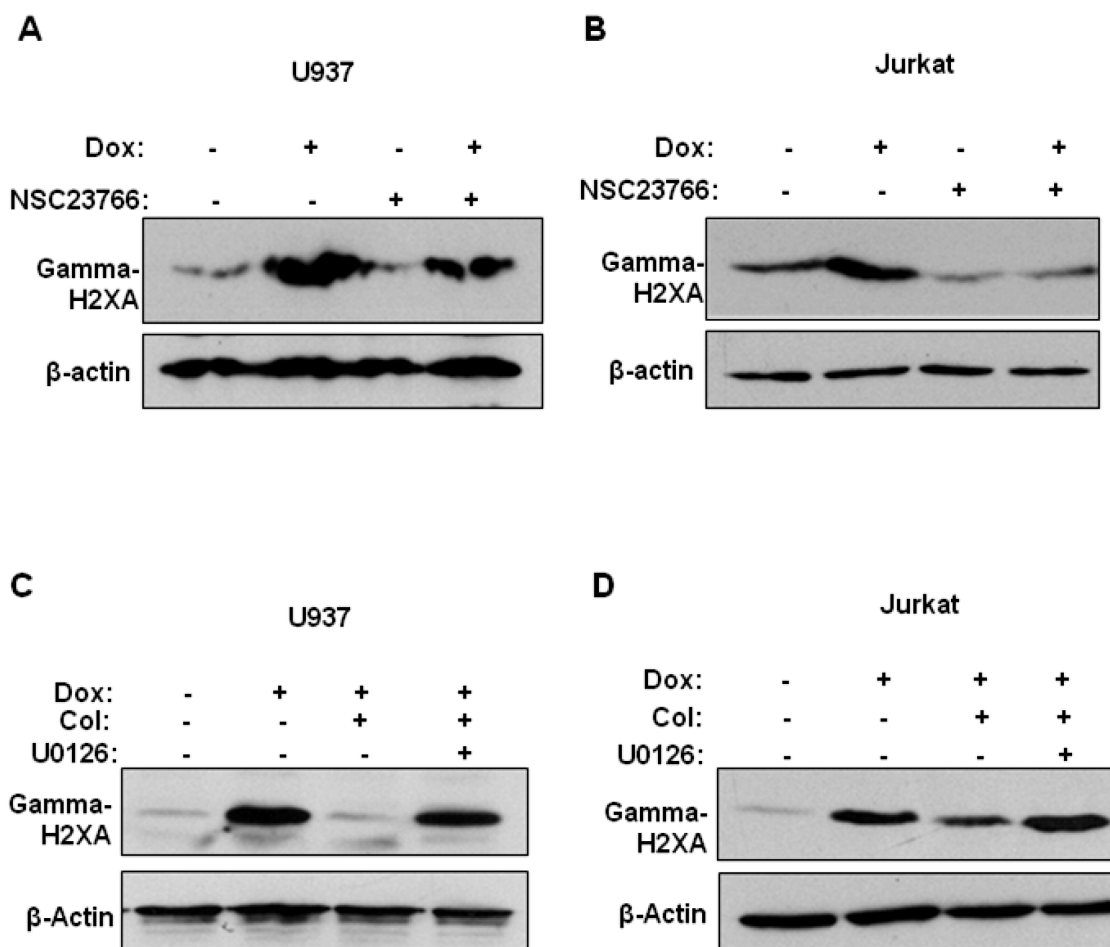


Figure 8 : Collagen inhibits H2AX phosphorylation



4.11 Supplementary figures and legends

Figure S1: Collagen promotes myeloid cell line PLB-985 protection against doxorubicin induced apoptosis

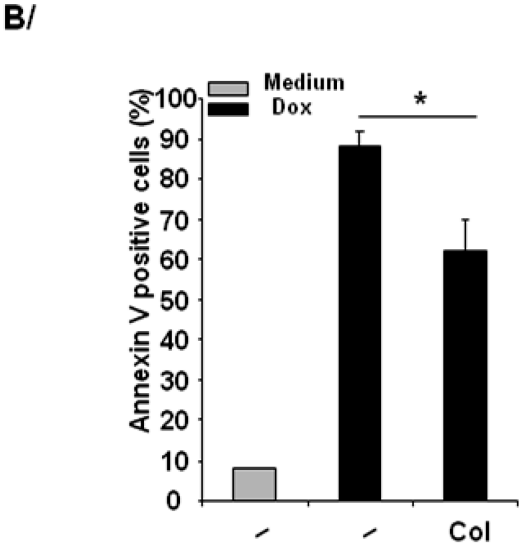
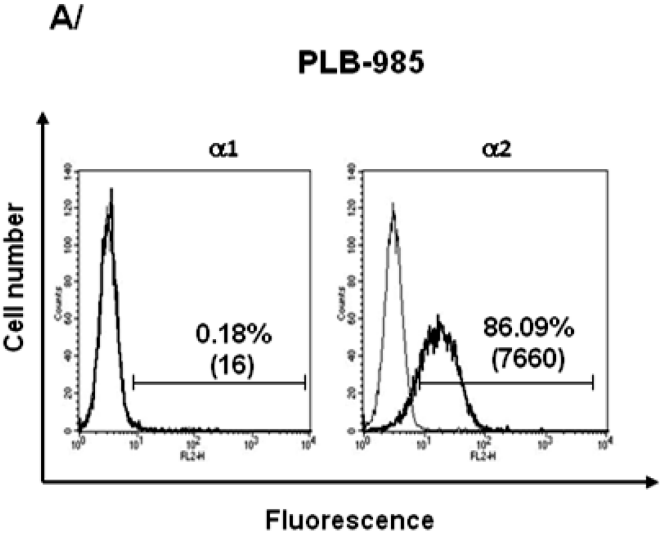


Figure S1: Collagen promotes myeloid cell line PLB-985 protection against doxorubicin induced apoptosis. A) PLB-985 cells express $\alpha 2\beta 1$ but not $\alpha 1\beta 1$, collagen binding integrin. Expression levels of $\alpha 1$ and $\alpha 2$ integrin subunits were determined by flow cytometry analysis, after a direct immunostaining with specific PE-conjugated antibodies or their corresponding isotypic matched control as described under « Experimental procedures section ». B) Collagen reduces doxorubicin induced apoptosis of PLB-985 cells. Cells were incubated in presence or absence of collagen for 4 h and then treated with doxorubicin for 24 h. Apoptosis was evaluated by AnnexinV-FITC staining and FACS analysis. The results represent the mean percentages \pm SD from two independent experiments. * $p < 0.05$ between samples cultured on collagen (Col) and those incubated on BSA.

Figure S2: Collagen inhibits doxorubicin-induced mitochondrial apoptosis by inhibiting Mcl-1 downregulation

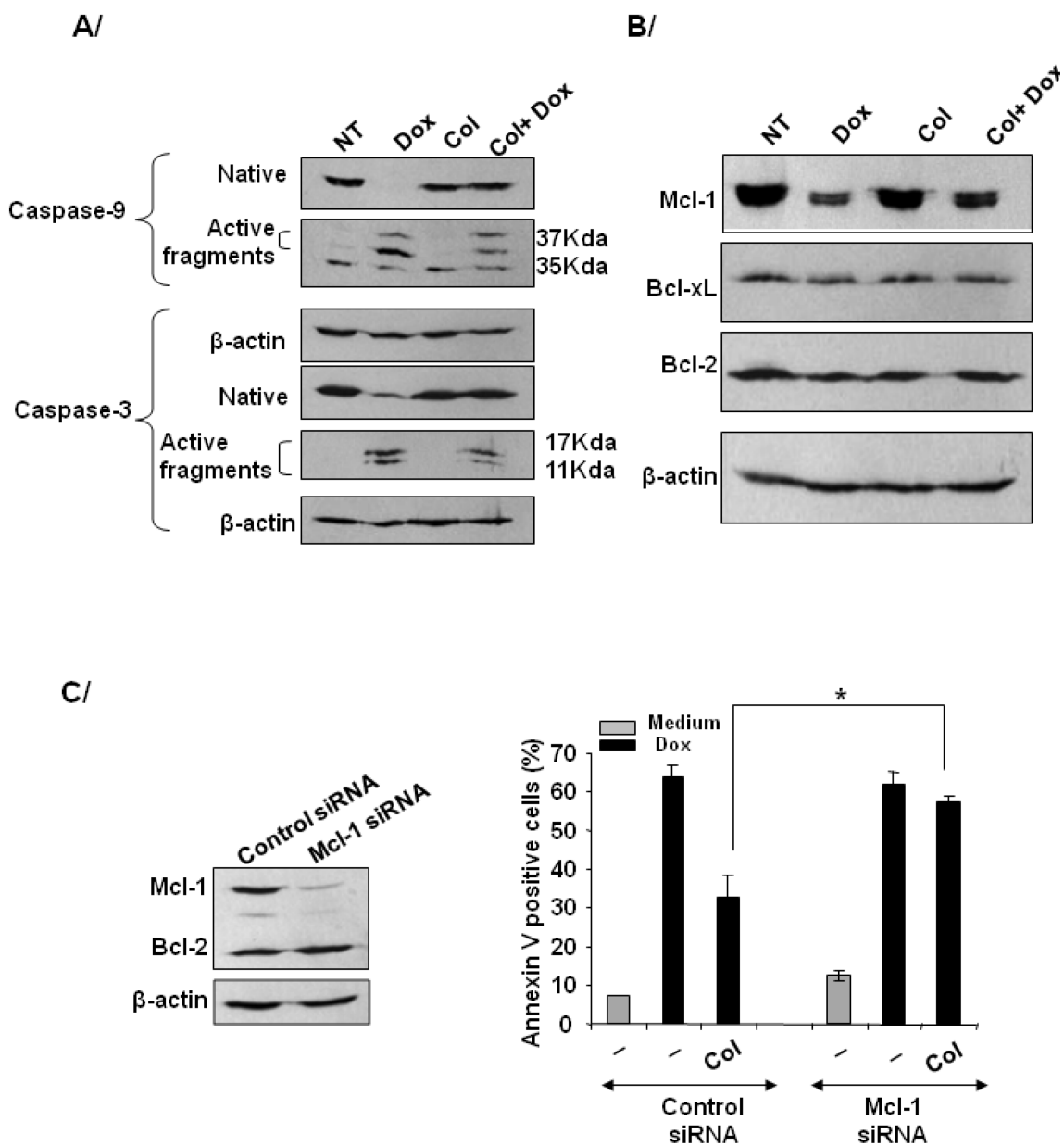


Figure S2: Collagen inhibits doxorubicin-induced mitochondrial apoptosis by inhibiting Mcl-1 downregulation. *A)* Collagen (Col) inhibits doxorubicin-induced caspase activation. HL-60 cells were cultured on collagen or BSA and then treated for 16 h

with doxorubicin (Dox). After cell lysis, activation of caspase-9 and -3 was determined by immunoblot analysis using specific anti-caspase-9 and anti-caspase-3 antibodies that recognize the native forms and the active fragments of caspases. The membrane was stripped and reprobed with anti- β -actin antibody to confirm equal loading. The results are representative of three independent experiments. **B)** Collagen (Col) maintains Mcl-1 levels in doxorubicin-treated cells. HL-60 cells were preactivated with ColII or BSA, after which they were treated for 12 h with doxorubicin (Dox). At the end, the cells were lysed, and the expression of Mcl-1, Bcl-2, and Bcl-x_L was determined by immunoblot analysis using specific antibodies. The blots were stripped and reprobed with anti- β -actin antibody to ensure equal loading. The results are representative of three independent experiments. **C)** Mcl-1 inhibition by RNA interference abolishes the protective effect of Collagen (Col). HL-60 cells were transfected with control siRNA or with Mcl-1 siRNA. After transfection, the cells were activated with collagen (Col) or BSA and treated or not with doxorubicin (Dox). Expression of Mcl-1 protein in control and in Mcl-1 siRNA-transfected cells was assessed by immunoblot analysis, and β -actin levels were determined as control to ensure equal loading (*left panel*). Transfected cells were incubated with collagen (Col) or BSA and then treated with doxorubicin for 16 h. Apoptosis was evaluated by annexin V staining and FACS analysis (*right panel*). The results represent mean values of three independent experiments with S.D. as indicated. *, $p < 0.05$ between Col+Dox in control siRNA-transfected cells and Col+Dox in Mcl-1 siRNA transfected samples. Similar results were obtained with U937 cells.

Figure S3

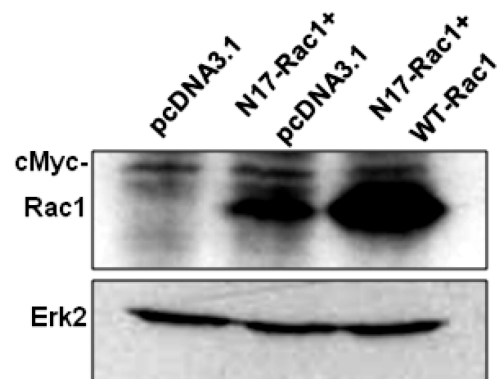
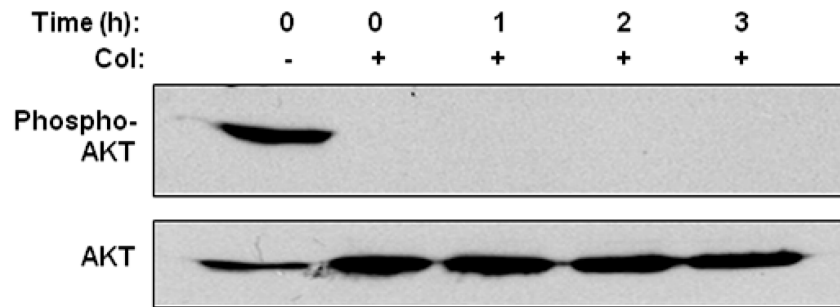


Figure S3: U937 cells were cotransfected with cMyc-tagged dominant negative Rac1 (cMyc-N17Rac1) + non tagged pcDNA3.1 plasmids or with cMyc-N17Rac1 and cMyc tagged wild type Rac1 (WT-Rac1) plasmids. Cell transfection with only pcDNA3.1 plasmid was used as a control. Viable cells were recovered 24 h after transfection by ficoll gradient. cMyc expression was determined by western blot analysis using anti-cMyc specific antibody. ERK2 was assessed to control equal loading.

Figure S4: PI3K/AKT pathway is dispensable for collagen-induced protective effect of AML cell lines

A/



B/

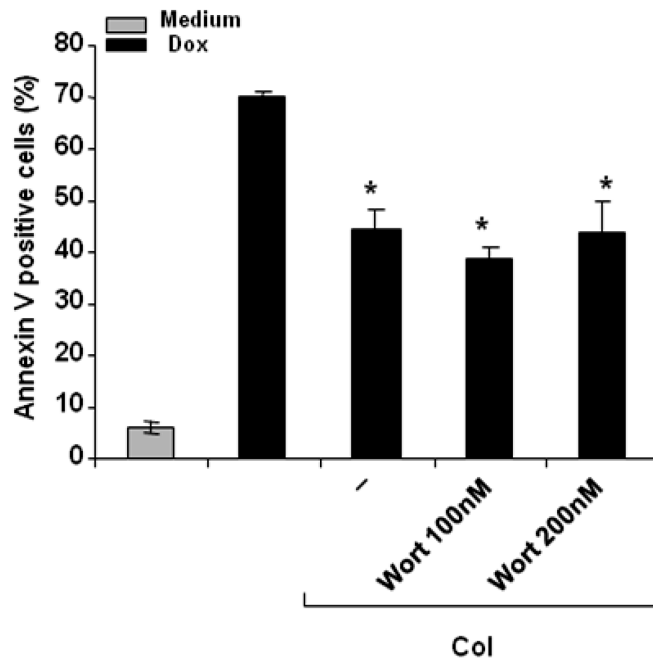


Figure S4: PI3K/AKT pathway is dispensable for collagen-induced protective effect of AML cell lines. **A)** HL-60 cells were activated with collagen (*Col*) for 1, 2 and 3h. The level of AKT activation was determined by immunoblot analysis using specific antibodies recognizing the phosphorylated forms of AKT (Ser-473). The blots were stripped and reprobed with anti-AKT antibodies to ensure equal loadings. The positive control at the left represents constitutive AKT activation in Jurkat cells. **B)** U937 cells were pretreated or not with with 100 nM or 200 nM of the PI3K inhibitor (Wortmanin) for 1 h before being activated with Collagen (*Col*). The cells were then stimulated or not with doxorubicin (*Dox*) for 24 h. Cell apoptosis was evaluated by annexing V staining and FACS analysis. The results represent mean values from three independent experiments with S.D. as indicated. * $p < 0.05$ between *Dox* treated samples and (*Dox+Col*) or (*wortmanin+Col+Dox*) treated samples.

Chapitre V

L'intégrine Alpha2beta1 favorise la survie des lymphocytes T malins et leur migration via l'activation concomitante des voies ERK/Mcl-1 et p38 MAPK.

5.1 Résumé :

Le rôle des intégrines $\beta 1$ dans la pathogenèse des leucémies T-ALL n'est pas encore exploré. Nous avons montré que le collagène *via* l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ favorise la survie de lignées cellulaires T-ALL Jurkat et HSB2 en absence de facteurs de croissance. L'effet anti-apoptotique induit par le collagène est lié à la réduction de l'activation des caspases et au maintien des niveaux de Mcl-1. Le collagène active simultanément les deux voies MAPKs ERK et p38 mais c'est uniquement la voie ERK qui est nécessaire pour la survie des cellules Jurkat et HSB2 induite par le collagène. Cependant, nous avons constaté que l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ promeut la migration des cellules HSB2 à travers le collagène par l'action synergique des deux voies ERK et p38. Ensemble, ces données indiquent que la signalisation par l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ peut présenter une voie importante dans la pathogenèse de la leucémie T-ALL et suggèrent que son blocage pourrait être bénéfique dans le traitement de cette maladie.

**Alpha2beta1 integrin promotes malignant T cell survival
and migration through the concomitant activation of
ERK/Mcl-1 and p38 MAPK pathways.**

Dalila Naci and Fawzi Aoudjit*

Centre de recherche du CHU de Québec, Axe des maladies infectieuses et immunitaires
and Département de Microbiologie-Immunologie, Faculté de Médecine, Université Laval,
Québec, Canada.

*To whom correspondence should be addressed

Fawzi Aoudjit, Ph.D

Centre de Recherche du CHU de Québec,
2705 Blvd Laurier, local T1-49.

Québec, G1V4G2, Canada.

Tel.: 418-525-4444 (ext. 46071); Fax: 418-654-2765.

E-mail: fawzi.aoudjit@crchul.ulaval.ca

5.2 Abstract

Integrin-mediated attachment to extracellular matrix (ECM) is crucial for cancer progression. Malignant T cells such as acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) express β 1-integrins, which mediate their interactions with ECM. However, the role of these interactions in T-ALL malignancy is still poorly explored. In the present study, we investigated the effect of collagen; an abundant ECM, on T-ALL survival and migration. We found that collagen through α 2 β 1 integrin promotes the survival of T-ALL cell lines in the absence of growth factors. T-ALL cell survival by collagen is associated with reduced caspase activation and maintenance of Mcl-1 levels. Collagen activated both ERK and p38 MAPKs but only MAPK/ERK was required for collagen-induced T-ALL survival. However, we found that α 2 β 1 integrin promoted T-ALL migration via both ERK and p38. Together these data indicate that α 2 β 1 integrin signaling can represent an important signaling pathway in T-ALL pathogenesis and suggest that its blockade could be beneficial in T-ALL treatment.

Key words: α 2 β 1 integrin, T-ALL, survival, Mcl-1, ERK, p38, migration.

Abbreviations: T-ALL: T-cell acute lymphoblastic leukemia; ECM: Extracellular matrix; BMSC: Bone marrow stromal cells; BSA : Bovine serum albumin ; Collagen type I : collagen ; PLL : Poly-L-Lysine ; Mcl-1: Myeloid cell leukemia 1; Bcl-2: B-cell lymphoma-2 ; Bcl-xL : B-cell lymphoma-extra-large ; MAPK: Mitogen-activated protein kinase; ERK: Extracellular signal-regulated kinase, p38 MAPK : p38-mitogen-activated protein kinase ; PI3K : Phosphatidylinositol-3 kinase ; AKT : v-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene. MEK-1: MAPK/ERK Kinase-1.

5.3 Introduction

Growing evidence indicates that the extracellular matrix (ECM) of the tumor microenvironment is an important factor in cancer development and progression [1]. Integrins are the major ECM receptors and the primary means by which cells sense and respond to their microenvironment. They are α/β heterodimeric transmembrane receptors that mediate cell adhesion to the surrounding ECM. In addition to their role in adhesion, integrins elicit a wide variety of intracellular signaling pathways including FAK, Src kinases, PI3 kinase/AKT and MAPK to regulate cell behavior such as migration, growth and differentiation [2]. Integrins are also critical for cell survival [3]. Disruption of matrix attachment of epithelial and endothelial cells induces their apoptosis, a process termed anoikis [4]. Integrins also protect anchored cells against serum starvation-induced apoptosis [5, 6] and promote cancer cell chemoresistance [7].

In addition to solid tumors, malignant cells of hematopoietic origin also interact with ECM mainly via $\beta 1$ integrin receptors [7-9]. The major growth site of these malignancies is the bone marrow [10], which is rich in ECM constituents such as collagen and fibronectin [11, 12]. Previous studies have shown that $\alpha 4\beta 1$ integrin, which interacts with fibronectin and with vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) is an important integrin in adhesion, migration and survival of myeloma and B cell malignancies [13, 14]. Malignant T cells such as T acute lymphoblastic leukemic (T-ALL) cells express various $\beta 1$ integrins, which mediate their interactions with ECM [15]. However, the role of these interactions in the regulation of T-ALL cell behavior is still poorly addressed. The fibronectin binding integrins $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha 5\beta 1$ can mediate migration of T-ALL cells on fibronectin [15]. Their engagement can also lead to apoptosis of normal and malignant T lymphocytes [16, 17]. However, a recent study reported that extensive crosslinking of these integrins can promote T-ALL cell chemoresistance [18].

Collagen type I (collagen) is the major matrix in the bone marrow microenvironment but the role of this matrix in hematological malignancies is not well understood. In contrast to B cell malignancies and myeloma, T-ALL cells do express the collagen-binding integrins [19]. Several studies have shown that $\alpha 2\beta 1$ integrin is the primary receptor that mediates T

cell adhesion to collagen [20, 21]. Moreover, we have found that collagen through $\alpha 2\beta 1$ integrin protected the T-ALL cell lines from Fas [21, 22] and doxorubicin-induced apoptosis [23]. To further understand how $\alpha 2\beta 1$ integrin signaling regulates T-ALL, we tested the role of collagen in the protection of T-ALL cells from serum starvation-induced apoptosis. This form of cell death is critical during tumor development and progression and proceeds through activation of the mitochondrial apoptotic pathway, which is regulated by Bcl-2 proteins [24, 25]. We found that collagen protects Jurkat and HSB2 T-ALL cell lines against serum starvation induced apoptosis via $\alpha 2\beta 1$ integrin-mediated activation of the MAPK/ERK pathway. Inhibition studies excluded a role for p38 MAPK in collagen-mediated T-ALL cell survival. However, activation of both ERK and p38 are implicated in the migration of HSB-2 cells across collagen-coated filters. These results provide further support to the role of $\alpha 2\beta 1$ integrin signaling in T-ALL pathogenesis and suggest that its blockade can help reduce T-ALL cell numbers and their dissemination.

5.4 Material and methods

5.4.1 Reagents and antibodies

Collagen type I (rat tail) was from BD Biosciences (San Diego, CA, USA), poly-l-lysine (PLL) and bovine serum albumin (BSA) were from Sigma (St-Louis, MO, USA). The MEK1/2 kinase inhibitor (U0126) and p38 kinase inhibitor (SB 203580) were obtained from Calbiochem (San Diego, CA). Antibodies were obtained as follows: anti-phospho-p44/42 MAPK (E-4), anti-ERK2 (C-14) and anti-caspase-3 (E-8) that detects the native and the active fragments of caspase-3, anti-Mcl-1 (22), anti-Bcl-2 (100) and anti- β -actin (C-2) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA); anti-caspase-9 detecting the native and active fragments of caspase-9, anti-Bcl-xL and anti-phospho-p38 (Thr180/Tyr182) (6E5.2) were from Cell Signaling Technologies (Beverly, MA). Anti- α 2 integrin (P1E6) and anti- α 2 β 1 (BHA2.1) blocking antibodies were from Millipore (Bellerica, MA, USA) and anti- β 1 integrin (clone 4B4) blocking antibody was from Beckman Coulter (Brea, CA, USA).

5.4.2 T-ALL cell lines and Cell culture

The human T-ALL cell lines Jurkat (E6.1) and CCRF-HSB2 were purchased from ATCC (Manhasset, VA, USA). Cells were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% of heat inactivated fetal bovine serum (FBS), 2 mmol/L glutamine and 100 units/ml penicillin and streptomycin (complete medium).

5.4.3 Serum starvation and apoptosis determination

1×10^6 /ml of cells in log phase growth were washed three times with PBS and resuspended in serum free medium containing 50 μ g/ml of BSA. Then, they were seeded at 0.5×10^6 /ml in 24 well plates previously coated with 1 mg/ml of BSA or collagen as described [26]. Apoptosis was assessed by FITC conjugated-annexin V staining according to the manufacturer's instructions (BD Biosciences, San Diego, CA). The percentages of annexin-V positive cells (apoptotic cells) were determined by flow cytometry analysis using the FACS Calibur II cytometer (BD Biosciences). Apoptosis was also assessed by DNA fragmentation analysis using the cell death detection ELISA kit (Roche Applied Science) as we previously described [22].

5.4.4 Clonogenic survival assay

Jurkat T cells were serum starved for 7 days in the presence or absence of collagen. Viable cells were recovered and resuspended in complete RPMI medium containing 1% methylcellulose (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC). They were seeded in triplicates at 1×10^4 cells per well in 96 well plates and incubated for 3 weeks. At the end of the cell culture, colonies with more than 40 cells were counted microscopically.

5.4.5 Co-culture of Jurkat cells with bone marrow stromal cells

Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs) were a generous gift from Dr Nicholas Pineault (Hema-Québec, Québec) and were previously used [23]. BMSCs at passage 2 or 3 were seeded at 1×10^5 in 24 well plates. They were cultured for 24 h to promote the formation of a monolayer of cells. After three washes with PBS, Jurkat cells were added to the BMSC monolayer and cultured for 48 h in the absence of serum. At the end of cell culture, Jurkat cells were carefully recovered by pipetting with ice-cold PBS. This treatment did not result in the detachment of BMSCs as verified by FACS analysis (FSC/SSC settings). Apoptosis of Jurkat cells cultured on PLL or in contact with BMSC was evaluated by AnnexinV-FITC binding kit as described above.

5.4.6 Immunoblot analysis of caspase activation, Bcl-2 proteins levels and MAPK activation

Activation of caspase-9 and caspase-3, protein levels of Mcl-1, Bcl-2 and Bcl-xL and phosphorylation of ERK1/2 and p38, MAP kinases were determined by immunoblot analysis using specific antibodies as previously described [23].

5.4.7 RNA Interference

Two validated Mcl-1 siRNA sequences as well as a scrambled siRNA sequence were purchased from Ambion and were previously used [23]. A pool of four siRNA sequences targeting p38 MAPK (MAPK14 on target plus smart pool) (L-003512-00-0005) and control siRNA sequences were from Dharmacon (Thermo scientific) [27]. Cells were transfected

with Amaxa nucleofector kit V (Lonza, Inc.) [23]. Mcl-1 and p38 knockdowns were confirmed by immunoblot analysis.

5.4.8 Plasmids and transient transfections

The plasmid encoding the dominant-negative form of MEK-1 (DN-MEK-1) was used previously [22, 23]. Jurkat cells were transfected by electroporation using BIO-RAD gene pulser X cell™ apparatus as described [22, 23].

5.4.9 Cell migration assay

HSB2 cell invasion through collagen was evaluated by using Boyden chamber assay [28]. Briefly, inserts of polycarbonate membrane (size pore of 3µM) were coated with 50 µl of collagen solution at (100µg/ml). The inserts were then mounted on 24 wells plates. SDF1α was added to the lower chamber at a concentration of 100 ng/ml. 5×10^5 of cells in RPMI medium containing 2% serum were seeded at the top and allowed to transmigrate for 24 h. At the end of the assay, inserts were removed and the migrated cells in the bottom chamber were counted microscopically. Assays were performed in triplicates.

5.4.10 Statistical analysis

The results shown represent the mean values of at least three independent experiments. Student's t-test was performed for comparison and statistical analysis. Results with $p < 0.05$ were considered significant.

5.5 Results

5.5.1 Collagen protects T-ALL cell lines from serum starvation-induced apoptosis via $\alpha2\beta1$ integrin.

In the present work, we investigated the role of collagen in supporting T-ALL survival under growth factor deficiency. The two established Jurkat and HSB2 T-ALL cell lines were used. Jurkat and HSB2 cells were cultured in wells coated with BSA or with collagen in the absence of serum for up to three days. The cells start to undergo significant apoptosis after 48 h of culture and the presence of collagen reduced their sensitivity to apoptosis by 40% and 30% at 48 h and 72 h of culture respectively (Fig. 1A&B). Significant collagen protection was still detected after 5 days of culture in serum-starved conditions (Data not shown). In contrast to collagen, poly-L-Lysine (PLL) a non-integrin binding ligand had no effect on serum starvation-induced apoptosis (Fig. 1C). Collagen presented to the cells in a soluble form also supported the survival of serum-starved Jurkat and HSB2 cells (Fig. 1SA&B). We then assessed if collagen maintains long-term survival. To this end, we carried out a clonogenic growth assay and as shown in Fig. 1D, serum-starved cells in the presence of collagen have the capacity to form colonies when put back in a medium containing serum.

To mimic leukemia interactions within their microenvironment, we tested the ability of bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSC), which are a major source of ECM [29, 30], to protect Jurkat cells from serum starvation-induced apoptosis. Coculture of Jurkat cells with BMSC in the absence of serum resulted in a 50% reduction of apoptosis compared to Jurkat cells cultured on PLL (Fig. 2). As $\alpha2\beta1$ integrin is the primary collagen receptor on T cells [20, 21], we verified its contribution in BMSC-induced Jurkat cell survival. Pretreatment of Jurkat cells with anti- $\alpha2$ (PIE6) or anti- $\beta1$ -integrin (4B4) blocking antibodies, reversed by 59 and 78% respectively, the protective effect mediated by BMSC whereas isotypic control antibodies had no effect (Fig. 2). Altogether, these results indicate that collagen via its receptor the $\alpha2\beta1$ integrin supports T-ALL cell survival.

5.5.2 Collagen inhibits serum withdrawal-induced caspase activation and maintains Mcl-1 levels.

Serum starvation induces activation of the mitochondrial apoptotic pathway in leukemia cells [24, 25]. In line, we sought to determine if the protective effect of collagen occurs at this level. For this, we explored the activation of caspase-9 and caspase-3, which are known to be activated downstream of mitochondria damage. As illustrated in Fig. 3A, activation of caspases-9 and 3 was undetectable in the first 24 h of serum starvation, which is consistent with the absence of significant apoptosis of T-ALL cell lines at this time. However, both caspases are activated after 48 h of serum starvation as determined by the reduction in the levels of procaspase forms and in the appearance of caspase-9 and caspase-3 active fragments, and the presence of collagen reduced activation of both caspases (Fig. 3A). These data demonstrate that the protective effect of collagen can be associated with the inhibition of the mitochondrial apoptotic pathway activated by serum withdrawal.

β 1 integrins can preserve mitochondria integrity by upregulating expression levels of Bcl-2 anti-apoptotic proteins [7]. Accordingly, we analyzed whether Bcl-2, Bcl-xL and Mcl-1 expression levels were regulated by collagen/ α 2 β 1 integrin signaling. As shown in Fig. 3B, the absence of serum induces a progressive and significant decrease in Mcl-1 levels. Treatment of T-ALL cells with collagen prevented Mcl-1 downregulation after 48-72 h of serum starvation. In contrast to Mcl-1, Bcl-2 and Bcl-xL expression levels were not influenced by serum starvation or by collagen (Fig. 3B). These data suggest the importance of Mcl-1 in the anti-apoptotic effect of collagen. To verify this possibility, we used RNA interference to inhibit Mcl-1 expression in Jurkat cells. As illustrated in Fig. 3C, Mcl-1 expression was efficiently inhibited in Jurkat cells by specific Mcl-1 siRNA as revealed by immunoblot analysis. The absence of Mcl-1 increased by almost two-fold Jurkat cell sensitivity to apoptosis induced by serum depletion (Fig. 3D) indicating that Mcl-1 is critical for Jurkat T cell survival. Importantly, Mcl-1 knockdown was accompanied with a complete abrogation of the anti-apoptotic effect of collagen (Fig. 3D). As a control, cell transfection with a scrambled siRNA did not affect Mcl-1 levels and the protective effect of collagen. In sum, it appears that Mcl-1 is an important factor in mediating T-ALL cell protection by collagen in the absence of growth factors.

5.5.3 Collagen promotes T-ALL cell survival in MAPK/ERK dependent manner.

The PI3 kinase/AKT and MAPK/ERK pathways are critical in promoting cell survival [7]. We previously showed that collagen activated the MAPK/ERK pathway in Jurkat cells cultured in the presence of serum and that it had no effect on the PI3 kinase/AKT pathway [22, 23]. In this study, we analyzed if this effect can be reproduced in the absence of growth factors. As shown in Fig. 4A&B, collagen induces a significant increase in ERK1/2 phosphorylation in both Jurkat and HSB2 cells cultured in the absence of serum. To determine if MAPK/ERK pathway regulates the survival by collagen, T-ALL cells were pretreated with U0126, a specific MEK-1/2 inhibitor and then cultured on collagen. DNA fragmentation analysis showed that U0126 used alone did not influence the level of apoptosis induced by serum starvation in control cells (Fig. 4C). However, the collagen protective effect is completely abrogated by U0126 suggesting that survival by collagen may be mediated by MAPK/ERK pathway (Fig. 4C). To confirm these results, we studied the effect of the MEK-1 dominant negative plasmid (DN-MEK-1) on the protective effect of collagen. Jurkat cells were efficiently transfected with DN-MEK-1 plasmid as determined by immunoblot analysis with anti-flag antibody (Fig.S2). Sensitivity of DN-MEK-1 transfected cells to apoptosis induced by serum withdrawal is not altered compared to control cells (46.68% versus 48.59%) (Fig. 4D). However, the collagen anti-apoptotic effect is nearly completely inhibited in DN-MEK-1 transfected cells whereas it is well preserved in control cells (Fig. 4D). As shown above (Fig. 3), maintenance of high expression levels of Mcl-1 is important for collagen to ensure T-ALL cell survival in the absence of growth factors. In order to verify if collagen-induced Mcl-1 maintenance is dependent on MAPK/ERK activation, we analyzed Mcl-1 regulation in the presence and absence of the MEK-1 inhibitor U0126. Collagen restored Mcl-1 levels in serum starved cells and this effect is reversed when the cells were pretreated with U0126 (Fig. 4E). The U0126 alone did not affect Mcl-1 levels. Together these results indicate that in the absence of growth factors, collagen protects T-ALL cells from apoptosis by maintaining high levels of Mcl-1 expression via the activation of the MAPK/ERK survival pathway. In contrast to MAPK/ERK pathway, collagen did not activate PI3 kinase/AKT pathway under serum starvation conditions and the inhibition of this pathway with wortmannin or with dominant-negative AKT did not affect cell survival by collagen (Data not shown).

5.5.4 Activation of p38 MAPK in T-ALL cell lines is dispensable for collagen-induced survival.

Previous evidence categorized p38 as a pro-apoptotic pathway [31] but recent studies demonstrate that p38 can mediate normal and cancer cell survival [32]. To examine this possibility, we tested if collagen activates p38 in leukemic cells cultured in the absence of serum. As shown in Fig. 5A&B, collagen increases activation of p38 in both Jurkat and HSB-2 cell lines. However, the p38 pharmacological inhibitor SB203580 did not affect the protective effect of collagen (Fig. 5C) suggesting that p38 is not necessary for the protective effect of collagen.

To confirm these results, we used RNA interference to knockdown p38 expression. The level of p38 phosphorylation induced by collagen in HSB2 cells transfected with p38 siRNA was reduced by about 60% compared to control cells (Fig. 5D). p38 silencing did not affect HSB2 cell survival induced by collagen (Fig. 5E). Similar results were also obtained with Jurkat T cells (Data not shown). In sum, these results indicate that p38 is not required for $\alpha 2\beta 1$ integrin-mediated T-ALL survival in the absence of growth factors.

5.5.6 $\alpha 2\beta 1$ integrin mediates T-ALL cell migration through collagen in ERK and p38 MAPKs- dependent manner.

Since migration through ECM is important in immune response and in leukemia dissemination, we studied the role of $\alpha 2\beta 1$ integrin signaling in this process. A previous study reported that HSB2 cells can transmigrate through collagen inserts [15]. As shown in Fig. 6A, HSB2 cells poorly transmigrate through collagen but their migratory capacity can be increased in the presence of SDF1 α (from 0.04% to 0.2%). The anti- $\alpha 2$ integrin blocking antibody (P1E6) inhibited both the random and directional mobility of HSB2 cells by 50 and 60% respectively (Fig. 6A), while no effect was noticed with the isotypic control antibody. Similar results were also obtained with BHA2.1; a neutralizing mAb against $\alpha 2\beta 1$ integrin (data not shown). We then examined the implication of MAPK/ERK and p38 pathways in T-ALL cell migration. As shown in Fig. 6B, inhibition of MAPK/ERK and p38 MAPK using U0126 and SB203580 inhibitors, reduces HSB2 cell migration by about 33.2 and 33.5% respectively. The combined use of U0126 and SB203580 inhibitors further potentiates the blockade of HSB2 cell migration (52%). These data suggest that $\alpha 2\beta 1$

integrin induces T-ALL cell invasion through collagen by the combined activation of ERK and p38 MAPKs pathways.

5.6 Discussion

The bone marrow is an important niche for leukemia development [10]. Recent studies have shown that IL-7 and IGF promote T-ALL survival and progression [33, 34]. T-ALL cells also interact with the ECM present in the bone marrow niche but its role in T-ALL survival is still poorly understood. In this study, we report that collagen is an important element for T-ALL survival in the absence of growth factors. We found that collagen supports the survival of Jurkat and HSB2 T-ALL cell lines in the absence of serum and preserve their growth ability. The collagen pro-survival effect is transduced by $\alpha 2\beta 1$ integrin and is due to the activation of MAPK/ERK pathway and the maintenance of Mcl-1 levels. Moreover, we found that $\alpha 2\beta 1$ integrin promotes T-ALL invasion via simultaneous activation of ERK and p38 pathways. Together, these results demonstrate that $\alpha 2\beta 1$ integrin can represent an important pathway in the pathogenesis of T-ALL.

BMSC plays a critical role in leukemia pathogenesis [35]. Leukemia cells are very sensitive cells to growth factors deficiency; but they can bypass this condition by establishing a direct contact with BMSC [36, 37]. Winter et al. demonstrated that adhesion of Jurkat and primary T-lymphoblasts to BMSC promoted their survival in the absence of serum. They found that the anti-apoptotic effect of BMSC is transduced by LFA-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 intercellular interactions [37]. Our results are in agreement with this study and revealed the additional implication of collagen binding $\alpha 2\beta 1$ integrin in the preservation of T-ALL cell viability. Along these lines, BMSCs are major sources of collagen within the bone marrow niche [29, 30].

Our results showed that immobilized or soluble collagen have the same ability in promoting T-ALL cell survival. Collagen derived fragments are abundant within bone marrow and can result from collagen degradation by metalloproteinases that are known to be produced by leukemia and stromal cells [38, 39]. The pathogenic role of this form of collagen in cancer progression is less investigated although it is considered as a biomarker of bone metastasis [40] and it is associated with the poor outcome of patients affected by head and neck squamous carcinoma and lung cancers [41, 42]. Collagen derived fragments can also block apoptosis of serum-deprived neuroblastoma and chondrosarcoma cells [43, 44]. Altogether,

our results indicate that collagen can play a pathogenic role in T-ALL progression by supporting survival in anchorage-dependent and -independent manner.

Our results showed that collagen protects T-ALL cell lines from serum starvation-induced apoptosis by inhibiting caspases-9 and -3 activation and by maintaining Mcl-1 levels. We found that serum-starvation is associated with a loss in Mcl-1 levels and the presence of collagen restored those levels. Mcl-1 is a member of the Bcl-2 anti-apoptotic proteins and therefore we propose that collagen promotes T-ALL survival by inhibiting mitochondria apoptotic pathway via Mcl-1. Mcl-1 is a key factor in the survival of hematopoietic malignancies [45] and its expression is broadly controlled by growth factors [46, 47]. In agreement with our findings, a previous study also reported that collagen/ $\alpha 2\beta 1$ integrin upregulates Mcl-1 levels in pancreatic cancer cells [48]. Thus, collagen through $\alpha 2\beta 1$ integrin signaling can constitute an additional/alternative pathway for Mcl-1 upregulation in cancer cells.

Integrins can promote cell survival by activating the MAPK/ERK and the PI3 Kinase/AKT pathways [7]. We previously showed that collagen activated the MAPK/ERK in T-ALL cell line [23]. Herein, we found that collagen induces a gradual ERK phosphorylation, which is maintained for up to 72h in serum-starved cells. Inhibition studies demonstrated that MAPK/ERK is essential for the protective effect of collagen. In agreement, MAPK/ERK is among the primary pathways mediating cancer resistance to stress-induced apoptosis [49]. Reduction of ERK expression and activity provokes cell death in serum-starved acute myeloid leukemia (AML) cell lines [50].

It is well established that ERK can target different substrates depending on its subcellular localization. In serum-starved AML cells, ERK is mainly positioned in the cytoplasm where it is more prone to regulate Bcl-2 family proteins [50, 51]. Along these lines, we found that collagen restored Mcl-1 levels by activating the MAPK/ERK pathway. In addition to MAPK/ERK, collagen induces a significant activation of p38 MAPK pathway. Accumulated data indicates that p38 is important for the survival of normal thymocytes and its constitutive or inducible activation can mediate B cell leukemia survival [32]. However, in the present work, we found through pharmacological inhibition and siRNA strategies

that p38 pathway is dispensable for collagen induced pro-survival. These results suggest that the anti-apoptotic function of p38 could be cell type and context specific.

High leukemia cells in blood circulation and extra-medullar metastasis are associated with bad prognosis of patients and the occurrence of chemoresistance [52, 53]. Previous studies associated $\alpha 2\beta 1$ integrin with bone marrow metastasis of solid cancer cells [54]. In this study we found that $\alpha 2\beta 1$ integrin also promotes HSB2 cell migration through collagen suggesting that in addition to cell survival, $\alpha 2\beta 1$ integrin can promote T-ALL invasion. Interestingly, Ho et al. showed that $\alpha 2\beta 1$ integrin overexpression induces leukemic K562 cell transmigration through immobilized collagen and by using in vivo video-microscopy analysis, they found that $\alpha 2\beta 1$ integrin promoted K562 cell invasion through liver parenchyma [55]. Together these studies suggest that $\alpha 2\beta 1$ integrin can represent an important pathway in leukemia dissemination.

Our results showed that $\alpha 2\beta 1$ integrin induced ERK and p38 pathways are required for HSB2 cell migration. In our study, ERK and p38 MAPKs acted in synergistic manner as their concomitant inhibition by the combined use of U0126 and SB203580 further decreased T-ALL cell migration. This additive effect can be explained by the ability of each pathway to target different substrates involved in the regulation of cell migration. ERK can be important in cytoskeletal dynamics via the phosphorylation of actin-myosin network such as MLCK (myosin light chain kinase) whereas p38 can phosphorylate the MAPK-activated protein kinases 2/3 which can be important in directional migration [56]. Along these lines, defective p38 signaling has been associated with impairment of acute lymphoblastic leukemia chemotactic function [57]. Since p38 does not regulate T-ALL survival, it is likely that activation of p38 by collagen could be needed only to ensure T-ALL directional migration whereas activation of ERK is indispensable for both functions.

Collagen type I to which T-ALL cells bind through $\alpha 2\beta 1$ integrin is an abundant matrix in the bone marrow niche as well as in other organs where T-ALL disseminate such as the spleen, lymph nodes, lungs and kidneys. We have previously reported that $\alpha 2\beta 1$ integrin protected T-ALL cell lines from death receptor-mediated apoptosis and promoted their chemoresistance by activating the MAPK/ERK pathway [22, 23, 58]. The present study

further supports the role of $\alpha 2\beta 1$ /ERK pathway in T-ALL survival and dissemination and suggests that its targeting can be beneficial for the treatment of T-ALL.

5.7 Conclusions

We report that the collagen-binding integrin $\alpha 2\beta 1$ protects leukemic T cells from serum starvation-induced apoptosis through the maintenance of Mcl-1 levels, which is dependent on the MAPK/ERK. Activation of p38 by $\alpha 2\beta 1$ integrin does not participate in T cell survival. However, both ERK and p38 are required for T cell migration through collagen. To our knowledge, this is the first report dissecting the signaling pathways activated by $\alpha 2\beta 1$ integrin in leukemic T cell survival and migration.

5.8 Disclosure

The authors have declared no conflict of interest. All authors have approved the final article.

5.9 Author contributions

DN performed the experiments, analyzed the data and wrote the manuscript. FA supervised the research design, data interpretation, manuscript writing and editing.

5.10 Acknowledgments

We are grateful to Dr. Jean Charron (Laval University) and to Dr. Nicholas Pineault (Hema-Québec, Québec, Canada) for providing us with the DN-MEK-1 plasmid and human bone marrow mesenchymal cells, respectively.

This work was supported in part by grants from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-98005) and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (290517) to F A.

5.11 References

1. Wong GS, Rustgi AK: Matricellular proteins: priming the tumour microenvironment for cancer development and metastasis. *Br J Cancer* 2013, 108(4):755-761.
2. Geiger B, Yamada KM: Molecular architecture and function of matrix adhesions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011, 3(5).
3. Stupack DG, Cheresh DA: Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. *J Cell Sci* 2002, 115(Pt 19):3729-3738.
4. Chiarugi P, Giannoni E: Anoikis: a necessary death program for anchorage-dependent cells. *Biochemical pharmacology* 2008, 76(11):1352-1364.
5. De Toni-Costes F, Despeaux M, Bertrand J, Bouroгаа E, Ysebaert L, Payrastra B, Racaud-Sultan C: A New alpha5beta1 integrin-dependent survival pathway through GSK3beta activation in leukemic cells. *PLoS One* 2010, 5(3):e9807.
6. Manohar A, Shome SG, Lamar J, Stirling L, Iyer V, Pumiglia K, DiPersio CM: Alpha 3 beta 1 integrin promotes keratinocyte cell survival through activation of a MEK/ERK signaling pathway. *J Cell Sci* 2004, 117(Pt 18):4043-4054.
7. Aoudjit F, Vuori K: Integrin signaling in cancer cell survival and chemoresistance. *Chemotherapy research and practice* 2012, 2012:283181.
8. Becker PS: Dependence of acute myeloid leukemia on adhesion within the bone marrow microenvironment. *TheScientificWorldJournal* 2012, 2012:856467.
9. Meads MB, Gatenby RA, Dalton WS: Environment-mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease. *Nat Rev Cancer* 2009, 9(9):665-674.
10. Ayala F, Dewar R, Kieran M, Kalluri R: Contribution of bone microenvironment to leukemogenesis and leukemia progression. *Leukemia* 2009, 23(12):2233-2241.
11. Malara A, Currao M, Gruppi C, Celesti G, Viarengo G, Buracchi C, Laghi L, Kaplan DL, Balduini A: Megakaryocytes Contribute to the Bone Marrow-Matrix Environment by Expressing Fibronectin, Type IV Collagen, and Laminin. *Stem cells* 2014, 32(4):926-937.
12. Tancred TM, Belch AR, Reiman T, Pilarski LM, Kirshner J: Altered expression of fibronectin and collagens I and IV in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *The journal of histochemistry and cytochemistry* 2009, 57(3):239-247.
13. Hsieh YT, Gang EJ, Geng H, Park E, Huantes S, Chudziak D, Dauber K, Schaefer P, Scharman C, Shimada H et al: Integrin alpha4 blockade sensitizes drug resistant pre-B acute lymphoblastic leukemia to chemotherapy. *Blood* 2013, 121(10):1814-1818.

14. Mori Y, Shimizu N, Dallas M, Niewolna M, Story B, Williams PJ, Mundy GR, Yoneda T: Anti-alpha4 integrin antibody suppresses the development of multiple myeloma and associated osteoclastic osteolysis. *Blood* 2004, 104(7):2149-2154.
15. Ivanoff J, Talme T, Sundqvist KG: The role of chemokines and extracellular matrix components in the migration of T lymphocytes into three-dimensional substrata. *Immunology* 2005, 114(1):53-62.
16. Sugahara H, Kanakura Y, Furitsu T, Ishihara K, Oritani K, Ikeda H, Kitayama H, Ishikawa J, Hashimoto K, Kanayama Y et al: Induction of programmed cell death in human hematopoietic cell lines by fibronectin via its interaction with very late antigen 5. *J Exp Med* 1994, 179(6):1757-1766.
17. Damle NK, Klussman K, Leytze G, Aruffo A, Linsley PS, Ledbetter JA: Costimulation with integrin ligands intercellular adhesion molecule-1 or vascular cell adhesion molecule-1 augments activation-induced death of antigen-specific CD4+ T lymphocytes. *J Immunol* 1993, 151(5):2368-2379.
18. Liu CC, Leclair P, Yap SQ, Lim CJ: The membrane-proximal KXGFFKR motif of alpha-integrin mediates chemoresistance. *Mol Cell Biol* 2013, 33(21):4334-4345.
19. McCall-Culbreath KD, Zutter MM: Collagen receptor integrins: rising to the challenge. *Current drug targets* 2008, 9(2):139-149.
20. Chan BM, Wong JG, Rao A, Hemler ME: T cell receptor-dependent, antigen-specific stimulation of a murine T cell clone induces a transient, VLA protein-mediated binding to extracellular matrix. *J Immunol* 1991, 147(2):398-404.
21. Aoudjit F, Vuori K: Engagement of the alpha2beta1 integrin inhibits Fas ligand expression and activation-induced cell death in T cells in a focal adhesion kinase-dependent manner. *Blood* 2000, 95(6):2044-2051.
22. Gendron S, Couture J, Aoudjit F: Integrin alpha2beta1 inhibits Fas-mediated apoptosis in T lymphocytes by protein phosphatase 2A-dependent activation of the MAPK/ERK pathway. *J Biol Chem* 2003, 278(49):48633-48643.
23. Naci D, El Azreq MA, Chetoui N, Lauden L, Sigaux F, Charron D, Al-Daccak R, Aoudjit F: alpha2beta1 integrin promotes chemoresistance against doxorubicin in cancer cells through extracellular signal-regulated kinase (ERK). *J Biol Chem* 2012, 287(21):17065-17076.
24. Letai A: Growth factor withdrawal and apoptosis: the middle game. *Mol Cell* 2006, 21(6):728-730.
25. Cuvillier O, Levade T: Sphingosine 1-phosphate antagonizes apoptosis of human leukemia cells by inhibiting release of cytochrome c and Smac/DIABLO from mitochondria. *Blood* 2001, 98(9):2828-2836.

26. Kreger ST, Bell BJ, Bailey J, Stites E, Kuske J, Waisner B, Voytik-Harbin SL: Polymerization and matrix physical properties as important design considerations for soluble collagen formulations. *Biopolymers* 2010, 93(8):690-707.
27. Peng H, Wang X, Barnes PF, Tang H, Townsend JC, Samten B: The *Mycobacterium tuberculosis* early secreted antigenic target of 6 kDa inhibits T cell interferon-gamma production through the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 2011, 286(27):24508-24518.
28. Hachehouche LN, Chetoui N, Aoudjit F: Implication of discoidin domain receptor 1 in T cell migration in three-dimensional collagen. *Mol Immunol* 2010, 47(9):1866-1869.
29. Harvey A, Yen TY, Aizman I, Tate C, Case C: Proteomic analysis of the extracellular matrix produced by mesenchymal stromal cells: implications for cell therapy mechanism. *PLoS One* 2013, 8(11):e79283.
30. Chen XD, Dusevich V, Feng JQ, Manolagas SC, Jilka RL: Extracellular matrix made by bone marrow cells facilitates expansion of marrow-derived mesenchymal progenitor cells and prevents their differentiation into osteoblasts. *Journal of bone and mineral research* 2007, 22(12):1943-1956.
31. Obata T, Brown GE, Yaffe MB: MAP kinase pathways activated by stress: the p38 MAPK pathway. *Crit Care Med* 2000, 28(4 Suppl):N67-77.
32. Thornton TM, Rincon M: Non-classical p38 map kinase functions: cell cycle checkpoints and survival. *Int J Biol Sci* 2009, 5(1):44-51.
33. Silva A, Laranjeira AB, Martins LR, Cardoso BA, Demengeot J, Yunes JA, Seddon B, Barata JT: IL-7 contributes to the progression of human T-cell acute lymphoblastic leukemias. *Cancer Res* 2011, 71(14):4780-4789.
34. Medyouf H, Gusscott S, Wang H, Tseng JC, Wai C, Nemirovsky O, Trumpp A, Pflumio F, Carboni J, Gottardis M et al: High-level IGF1R expression is required for leukemia-initiating cell activity in T-ALL and is supported by Notch signaling. *J Exp Med* 2011, 208(9):1809-1822.
35. Winter SS, Sweatman J, Shuster JJ, Link MP, Amylon MD, Pullen J, Camitta BM, Larson RS: Bone marrow stroma-supported culture of T-lineage acute lymphoblastic leukemic cells predicts treatment outcome in children: a Pediatric Oncology Group study. *Leukemia* 2002, 16(6):1121-1126.
36. Ramasamy R, Lam EW, Soeiro I, Tisato V, Bonnet D, Dazzi F: Mesenchymal stem cells inhibit proliferation and apoptosis of tumor cells: impact on in vivo tumor growth. *Leukemia* 2007, 21(2):304-310.
37. Winter SS, Sweatman JJ, Lawrence MB, Rhoades TH, Hart AL, Larson RS: Enhanced T-lineage acute lymphoblastic leukaemia cell survival on bone marrow stroma requires involvement of LFA-1 and ICAM-1. *Br J Haematol* 2001, 115(4):862-871.

38. Bouchard F, Belanger SD, Biron-Pain K, St-Pierre Y: EGR-1 activation by EGF inhibits MMP-9 expression and lymphoma growth. *Blood* 2010, 116(5):759-766.
39. Yu XF, Han ZC: Matrix metalloproteinases in bone marrow: roles of gelatinases in physiological hematopoiesis and hematopoietic malignancies. *Histology and histopathology* 2006, 21(5):519-531.
40. Leeming DJ, Koizumi M, Qvist P, Barkholt V, Zhang C, Henriksen K, Byrjalsen I, Karsdal MA: Serum N-Terminal Propeptide of Collagen Type I is Associated with the Number of Bone Metastases in Breast and Prostate Cancer and Correlates to Other Bone Related Markers. *Biomark Cancer* 2011, 3:15-23.
41. Nurmenniemi S, Koivula MK, Nyberg P, Tervahartiala T, Sorsa T, Mattila PS, Salo T, Risteli J: Type I and III collagen degradation products in serum predict patient survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2012, 48(2):136-140.
42. Ylisirnio S, Hoyhtya M, Makitaro R, Paaakko P, Risteli J, Kinnula VL, Turpeenniemi-Hujanen T, Jukkola A: Elevated serum levels of type I collagen degradation marker ICTP and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) 1 are associated with poor prognosis in lung cancer. *Clin Cancer Res* 2001, 7(6):1633-1637.
43. Vincourt JB, Etienne S, Cottet J, Delaunay C, Malanda CB, Lionneton F, Sirveaux F, Netter P, Plenat F, Mainard D et al: C-propeptides of procollagens I alpha 1 and II that differentially accumulate in enchondromas versus chondrosarcomas regulate tumor cell survival and migration. *Cancer Res* 2010, 70(11):4739-4748.
44. Bozzo C, Bellomo G, Silengo L, Tarone G, Altruda F: Soluble integrin ligands and growth factors independently rescue neuroblastoma cells from apoptosis under nonadherent conditions. *Exp Cell Res* 1997, 237(2):326-337.
45. Ertel F, Nguyen M, Roulston A, Shore GC: Programming cancer cells for high expression levels of Mcl1. *EMBO Rep* 2013, 14(4):328-336.
46. Chetoui N, Boisvert M, Gendron S, Aoudjit F: Interleukin-7 promotes the survival of human CD4+ effector/memory T cells by up-regulating Bcl-2 proteins and activating the JAK/STAT signalling pathway. *Immunology* 2010, 130(3):418-426.
47. Le Gouill S, Podar K, Amiot M, Hideshima T, Chauhan D, Ishitsuka K, Kumar S, Raje N, Richardson PG, Housseau JL et al: VEGF induces Mcl-1 up-regulation and protects multiple myeloma cells against apoptosis. *Blood* 2004, 104(9):2886-2892.
48. Armstrong T, Packham G, Murphy LB, Bateman AC, Conti JA, Fine DR, Johnson CD, Benyon RC, Iredale JP: Type I collagen promotes the malignant phenotype of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2004, 10(21):7427-7437.
49. Steelman LS, Franklin RA, Abrams SL, Chappell W, Kempf CR, Basecke J, Stivala F, Donia M, Fagone P, Nicoletti F et al: Roles of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway in leukemia therapy. *Leukemia* 2011, 25(7):1080-1094.

50. Ajenjo N, Canon E, Sanchez-Perez I, Matallanas D, Leon J, Perona R, Crespo P: Subcellular localization determines the protective effects of activated ERK2 against distinct apoptogenic stimuli in myeloid leukemia cells. *J Biol Chem* 2004, 279(31):32813-32823.
51. Koziel K, Smigelskaite J, Drasche A, Enthammer M, Ashraf MI, Khalid S, Troppmair J: RAF and antioxidants prevent cell death induction after growth factor abrogation through regulation of Bcl-2 proteins. *Exp Cell Res* 2013, 319(17):2728-2738.
52. Yan Y, Wieman EA, Guan X, Jakubowski AA, Steinherz PG, O'Reilly RJ: Autonomous growth potential of leukemia blast cells is associated with poor prognosis in human acute leukemias. *Journal of hematology & oncology* 2009, 2:51.
53. Pui CH, Howard SC: Current management and challenges of malignant disease in the CNS in paediatric leukaemia. *The lancet oncology* 2008, 9(3):257-268.
54. Schneider JG, Amend SR, Weilbaecher KN: Integrins and bone metastasis: integrating tumor cell and stromal cell interactions. *Bone* 2011, 48(1):54-65.
55. Ho WC, Heinemann C, Hangan D, Uniyal S, Morris VL, Chan BM: Modulation of in vivo migratory function of alpha 2 beta 1 integrin in mouse liver. *Mol Biol Cell* 1997, 8(10):1863-1875.
56. Huang C, Jacobson K, Schaller MD: MAP kinases and cell migration. *J Cell Sci* 2004, 117(Pt 20):4619-4628.
57. Bendall LJ, Baraz R, Juarez J, Shen W, Bradstock KF: Defective p38 mitogen-activated protein kinase signaling impairs chemotactic but not proliferative responses to stromal-derived factor-1alpha in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 2005, 65(8):3290-3298.
58. El Azreq MA, Naci D, Aoudjit F: Collagen/beta1 integrin signaling up-regulates the ABCC1/MRP-1 transporter in an ERK/MAPK-dependent manner. *Mol Biol Cell* 2012, 23(17):3473-3484.

5.12 Figures and legends

Figure 1: Collagen inhibits serum starvation-induced apoptosis of T-ALL cells. Jurkat (A) and HSB2 (B) cells were maintained in serum free medium in wells coated with collagen (Col) or with BSA (-) for the indicated periods of time. At the end of cell culture, apoptosis was determined by Annexin V-FITC staining and flow cytometry analysis as described under “Material and methods section”. (C) T-ALL cells were cultured on collagen or on poly-L-Lysine (PLL) in serum-free medium for 72 h and apoptosis was determined by annexin V staining and flow cytometry. In (A-C), the mean percentages (\pm S.D) of annexin V positive cells obtained from at least three independent experiments are presented. * $p < 0.05$ between BSA-treated samples (-) and collagen-treated samples (Col). (D) Collagen promotes clonogenic growth of serum-starved cells. Jurkat cells were cultured on BSA (-) or on collagen-coated wells in serum free medium for 7 days. The cells were recovered and incubated in complete medium containing methyl-cellulose as described under “Material and methods section”. The number of colonies was determined after 21 days of cell culture. The mean values (\pm S.D) from three independent experiments are presented. * $p < 0.05$ between BSA (-)- and collagen (Col)-treated samples.

Figure 2: Bone marrow derived mesenchymal stem cells (BMSCs) protect Jurkat cells from serum starvation-induced apoptosis via $\alpha 2\beta 1$ integrin. Jurkat cells were pretreated or not with 10 $\mu\text{g/ml}$ of specific anti- $\alpha 2$ (PEI6), anti- $\beta 1$ integrin (4B4) blocking antibodies or with their corresponding isotypic control (IgG) before their co-culture with BMSC as described under “Material and methods”. Jurkat cells were also cultured on PLL-coated wells. After 48 h of cell culture in serum free medium, the cells were detached and apoptosis was determined by annexin V staining and flow cytometry analysis. The mean percentages (\pm SD) of annexin V positive cells from three independent experiments are presented. * $p < 0.05$ between samples of Jurkat cells cultured on BMSC and on PLL or between samples of Jurkat cells cultured on BMSC and treated with IgG vs anti- $\alpha 2$ or anti- $\beta 1$ antibodies.

Figure 3: Collagen inhibits serum-starvation induced caspase activation, which is associated with maintenance of Mcl-1 levels. (A) Collagen reduces caspase-9 and -3 activation in serum-starved T-ALL cells. Jurkat cells were cultured on BSA(-)- or on

collagen (Col)-coated wells in the absence of serum for the indicated periods of time and caspase-9 and caspase-3 activation was determined by immunoblot analysis using specific antibodies detecting the native and cleaved forms of caspase 9 and 3 (NS: non specific band). The membrane was stripped and reprobed with anti- β -actin antibody to ensure equal loading. (B) Collagen reverses serum withdrawal induced Mcl-1 downregulation. Jurkat cells were cultured on BSA (-) or on collagen (Col)-coated wells in the absence of serum for 24-72 h. Expression levels of Mcl-1, Bcl-2 and Bcl-xL were determined by immunoblot analysis using specific antibodies. β -actin immunoblot was used to ensure equal loading. The blots shown in A and B are representative of three independent experiments. (C-D) Inhibition of Mcl-1 expression by RNA interference abrogates the collagen protective effect. (C) Jurkat cells were transfected with Mcl-1 siRNA or with control siRNA and Mcl-1 levels were determined by immunoblot analysis. (D) Transfected Jurkat cells were incubated in serum free medium with or without collagen (Col) for 48h. Apoptosis was determined by annexin V staining and flow cytometry analysis. The mean percentages (\pm SD) of annexin V positive cells obtained from three independent experiments are presented. * $p < 0.05$ between BSA- (-) and collagen- (Col) treated samples of Jurkat cells transfected with control siRNA. (ns: not significant).

Figure 4: Collagen anti-apoptotic effect is dependent on the MAPK/ERK pathway.

Collagen increases MAPK/ERK activation in serum-starved Jurkat (A) and HSB2 (B) cells. The cells were cultured in serum free medium on collagen (Col) as indicated. ERK1/2 phosphorylation levels were assessed by immunoblot analysis using specific anti-phospho-ERK (42/43) antibodies. Membranes were stripped and reprobed with anti-ERK2 to ensure equal loading. (C) The MEK1 kinase inhibitor U0126 inhibits the collagen protective effect. HSB2 cells were treated or not with 10 μ M of U0126 for 1h and then cultured on collagen (Col) or on BSA (-) for 72h in the absence of serum. Apoptosis was determined by DNA fragmentation ELISA assay. Results were expressed as mean values (\pm SD) from three independent experiments. * $p < 0.05$ between Col- and U0126+Col-treated samples. (D) Dominant negative MEK-1 (DN-MEK-1) overexpression abrogates collagen pro-survival effect. Jurkat cells were transfected with DN-MEK-1 or control pcDNA3.1 plasmids. Viable cells recovered after 24h and cultured on BSA (-) or on collagen (Col) in the absence of serum for 48h. Apoptosis was then quantified by annexin V staining and

flow cytometry analysis. The mean percentages (\pm SD) of annexin V positive cells from three independent experiments are presented. * $p < 0.05$ between collagen-treated pcDNA3.1 transfected cells and collagen-treated DN-MEK-1 transfected cells. (E) U0126 inhibits Mcl-1 maintenance by collagen. Jurkat cells were pretreated or not with U0126 and then cultured on collagen-coated wells for 48h in the absence of serum. Mcl-1 and Bcl-2 expression levels were determined by immunoblot analysis. Lane 1 at the left indicates the levels of Mcl-1, Bcl-2 and ERK2 in non-starved cells. The results are representative of three independent experiments.

Figure 5: Collagen-induced p38 activation is not involved in T-ALL cell survival.

Collagen increases p38 activation in serum-starved Jurkat (A) and HSB2 (B) cells. T-ALL cells were resuspended in serum-free medium and cultured on coated-collagen as indicated. Phosphorylation levels of p38 were assessed by immunoblot analysis using specific anti-phospho-p38 (Thr180/Tyr182) antibody. β -actin was used to ensure equal loading. (C) The p38 inhibitor SB 203580 did not inhibit the protective effect of collagen. Jurkat cells were treated or not with 10 μ M of SB 203580 (SB) for 1 h and then stimulated with collagen (Col) for 72h in the absence of serum. Cells were stained with annexin-V-FITC and apoptosis was evaluated by FACS analysis. Mean percentages \pm SD obtained from three independent experiments were presented. * $p < 0.05$ between Col-treated cells vs BSA-treated (-) cells and between SB+Col- vs SB+BSA-treated samples. (D-E) p38 silencing did not affect the protective effect of collagen. (D) HSB2 cells were transfected with p38 siRNA or with control siRNA as described under “Material and methods section” and the levels of phospho-p38 were determined by immunoblot analysis. (E) After transfection, viable cells recovered by a ficoll gradient and were cultured for 48h on collagen (Col) or on BSA (-) in serum free medium. Apoptosis was determined by annexin V staining and FACS analysis. The mean percentages (\pm SD) of annexin V positive cells obtained from three independent experiments are presented. * $p < 0.05$ between BSA (-)- and collagen (Col)-treated samples.

Figure 6: $\alpha 2\beta 1$ integrin mediates HSB2 cell migration through collagen via ERK and p38.

(A) $\alpha 2\beta 1$ integrin promotes HSB2 cell invasion. HSB2 cells were pretreated or not with the anti- $\alpha 2$ (P1E6) blocking antibody or with control isotypic antibody (IgG). Cells

were allowed to transmigrate through collagen-coated inserts for 24 h in the presence and absence of SDF1 α added to the lower chamber. The migrated cells within the lower chamber were counted microscopically. Mean values (\pm SD) obtained from three independent experiments were presented. * $p < 0.05$ between P1E6-treated and non-treated (-) samples. (B) The ERK and p38 inhibitors reduce HSB2 cell migration through collagen. HSB2 cells were pretreated with U0126 and SB 20358 (SB) alone or in combination for 2 h. Cells were then allowed to transmigrate through collagen for 24h in response to SDF1 α . The migrated cells within the lower chamber were counted microscopically. Mean values (\pm SD) obtained from three independent experiments were presented. * $p < 0.05$ between non-treated (-) and U0126- or SB-treated samples. ** $p < 0.05$ between U0126+SB- and U0126- or SB-treated samples.

Figure 1: Collagen inhibits serum starvation-induced apoptosis of T-ALL cells

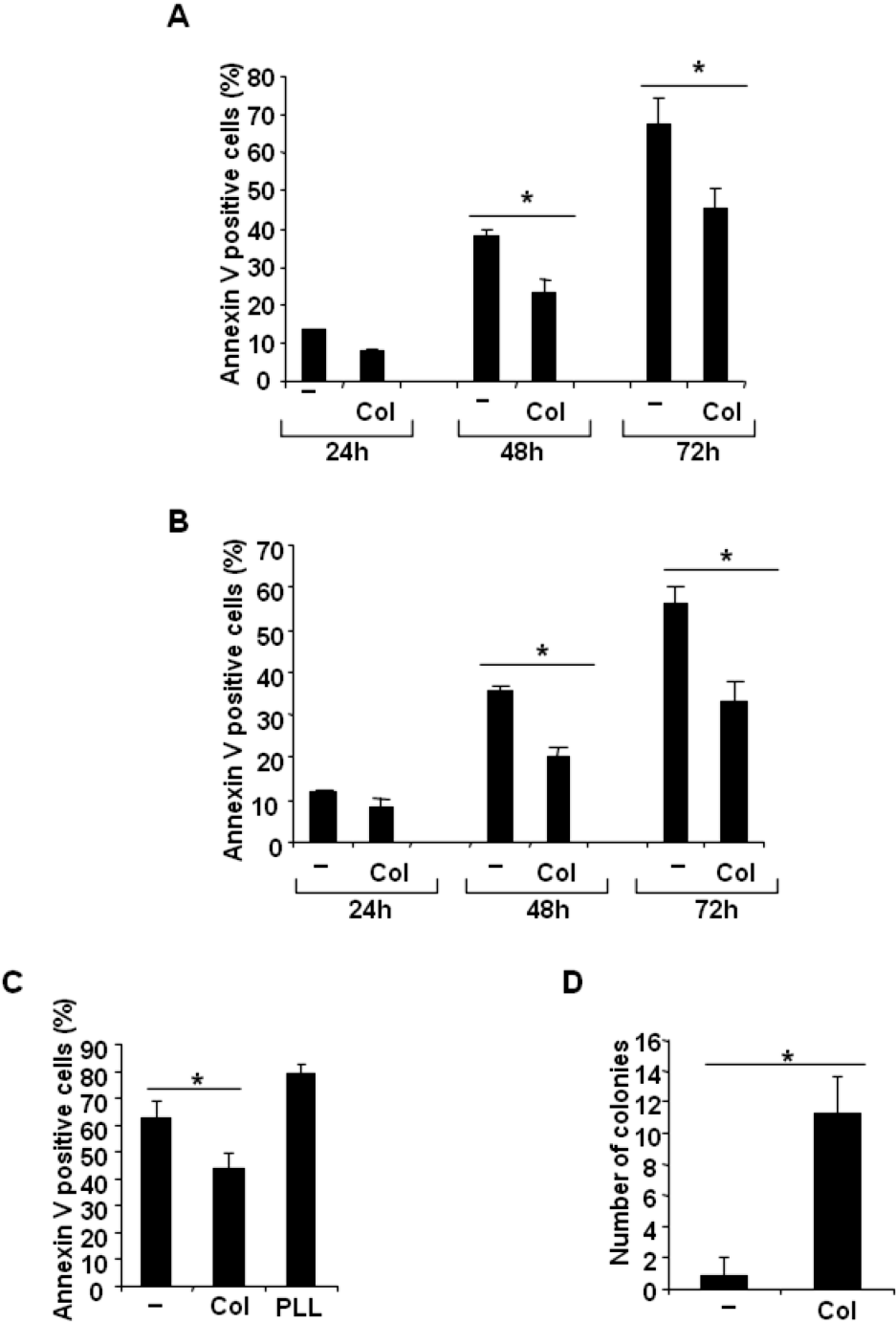


Figure 2 : Bone marrow derived mesenchymal stem cells (BMSCs) protect Jurkat cells from serum starvation-induced apoptosis via $\alpha 2\beta 1$ integrin

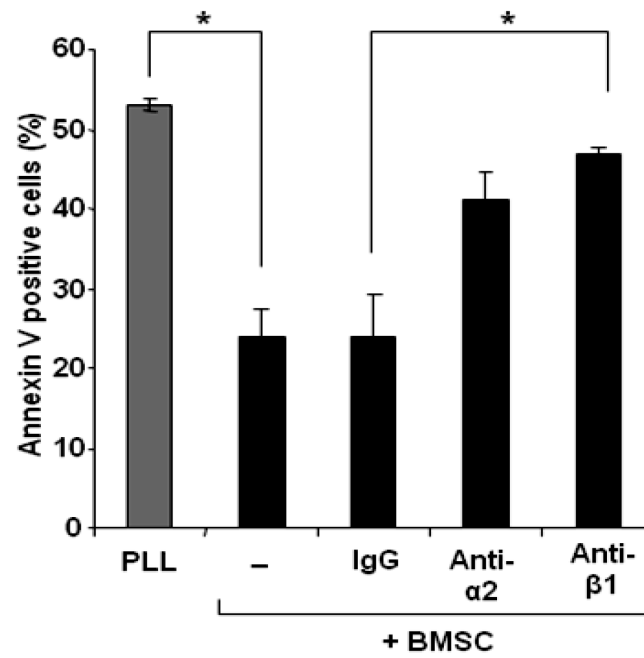


Figure 3 : Collagen inhibits serum-starvation induced caspase activation, which is associated with maintenance of Mcl-1 levels

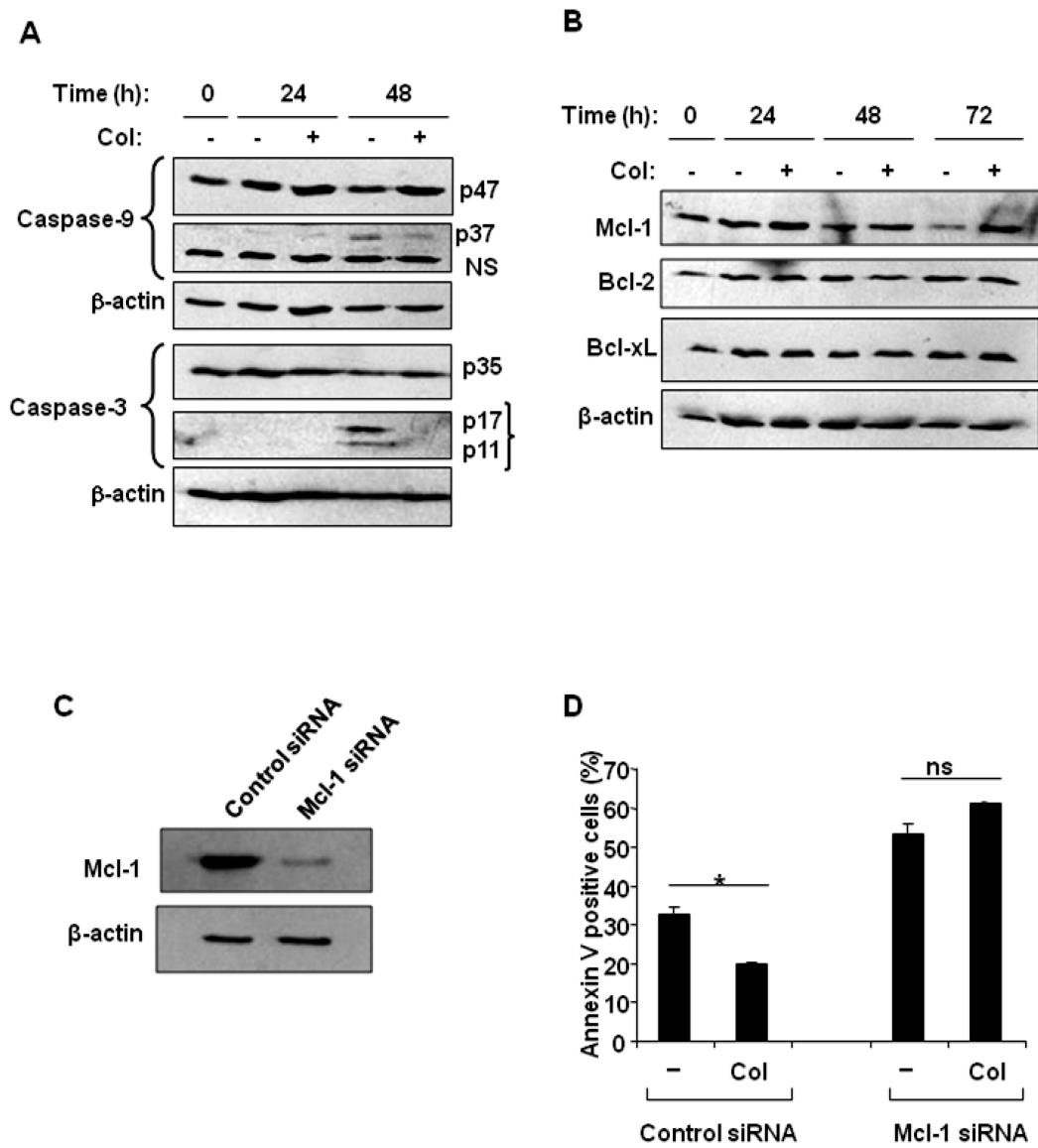


Figure 4 : Collagen anti-apoptotic effect is dependent on the MAPK/ERK pathway

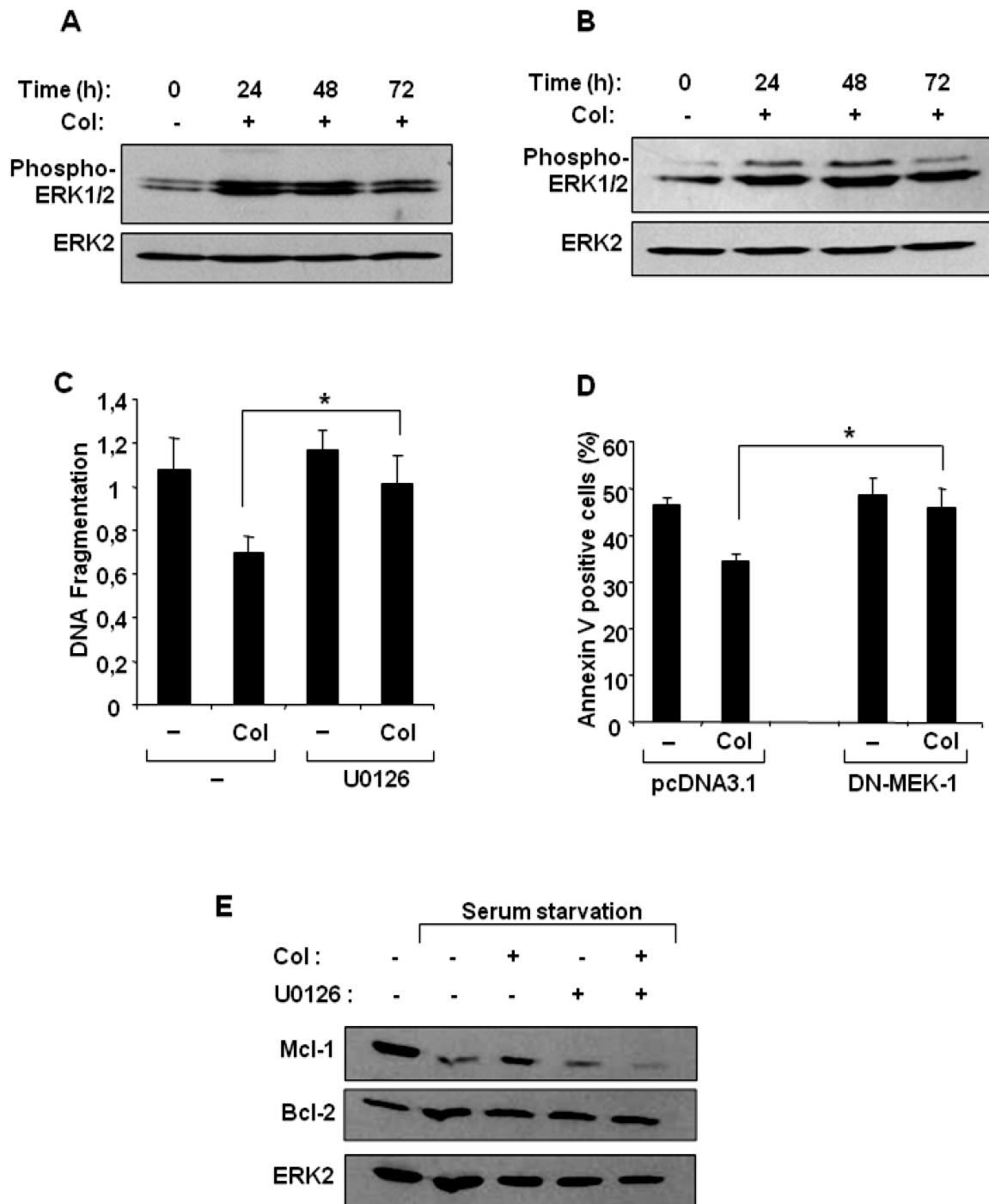


Figure 5 : Collagen-induced p38 activation is not involved in T-ALL cell survival

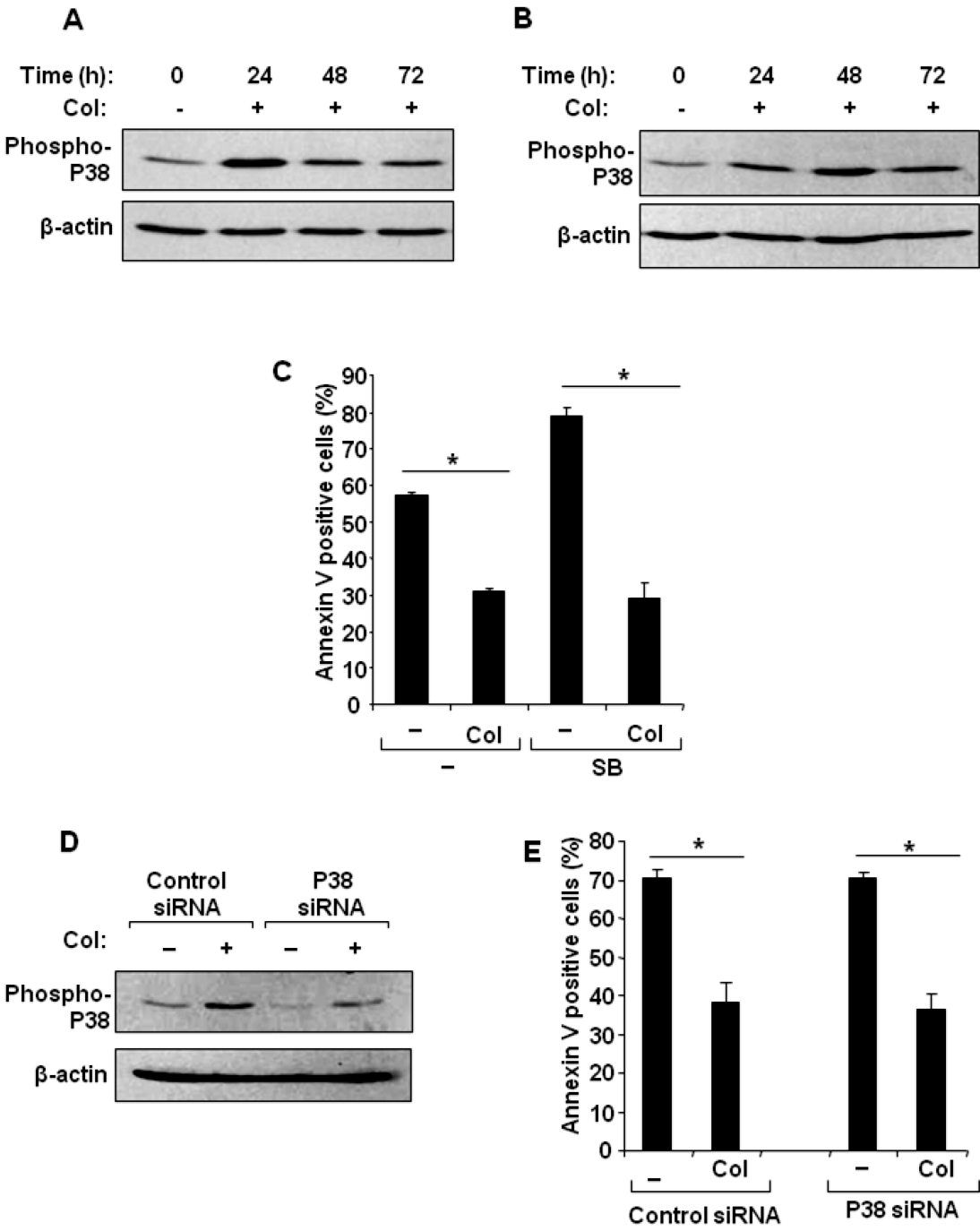
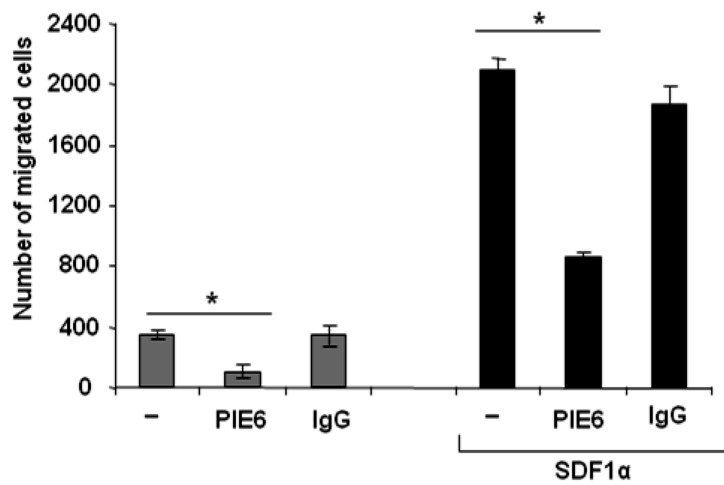
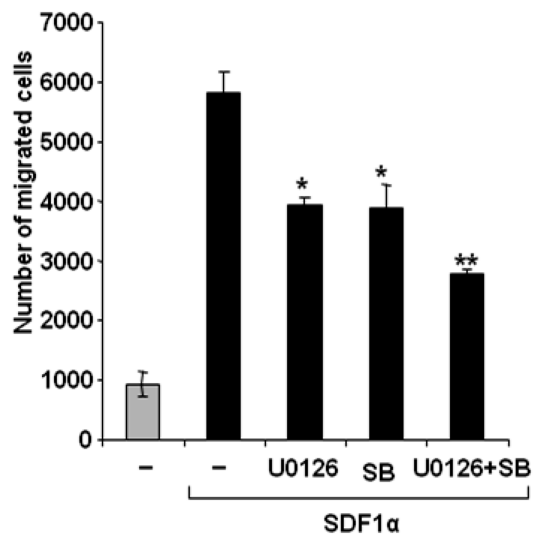


Figure 6 : $\alpha 2\beta 1$ integrin mediates HSB2 cell migration through collagen via ERK and p38

A

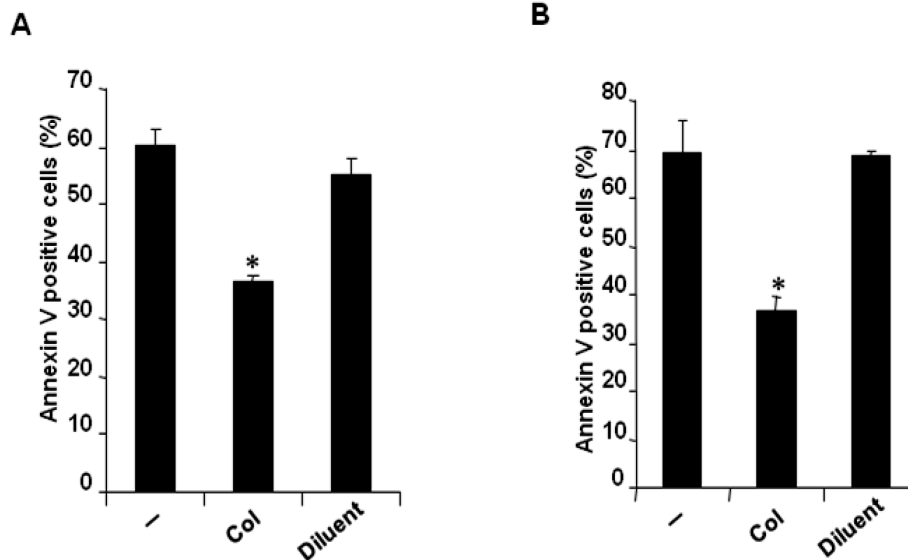


B



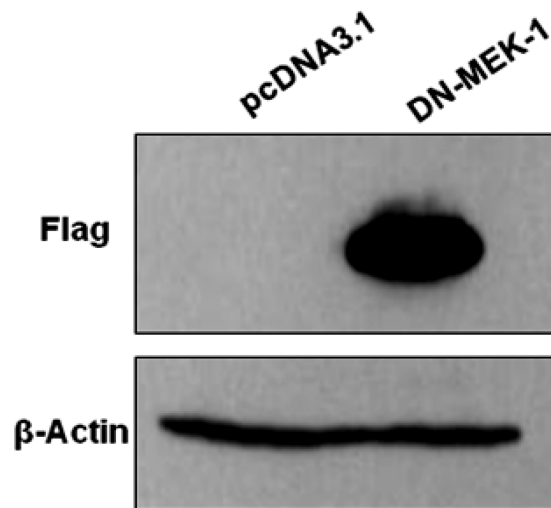
5.13 Supplementary figures and legends

Figure S1: Soluble collagen protects Jurkat and HSB2 cells against serum starvation-induced apoptosis



Jurkat (A) and HSB2 (B) were incubated in serum free medium containing or not soluble collagen (50 μ g/ml) or its diluent. Apoptosis was determined after 72h of incubation by annexin V binding and flow cytometry analysis. The results represent the mean percentages \pm SD of more than three independent experiments. * p <0.05 between collagen (Col)- and BSA- (-) or diluent-treated samples.

Figure S2



Jurkat cells were transfected with flag-tagged dominant-negative MEK-1 (DN-MEK-1) plasmid or with a control pc-DNA3.1 plasmid. After transfection, the cells were lysed and cell lysates were analyzed by immunoblot using anti-Flag antibody. The blot was stripped and reprobbed with anti- β -actin antibody to ensure equal loading.

Chapitre VI

Discussion

Comparativement aux tumeurs solides¹¹, le rôle des intégrines liant la MEC dans la chimiorésistance des leucémies aiguës T-ALL et AML n'est pas encore clairement établi. L'exploration de cette question dans notre laboratoire a permis de révéler l'importance de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ liant le collagène dans l'induction de la résistance des leucémies T-ALL contre l'apoptose induite par différentes drogues couramment utilisées en chimiothérapie anti-leucémique, soit la doxorubicine (chapitres II et III), la vincristine et le méthotrexate (**Figure S1, Annexe**). L'intégrine $\alpha 2\beta 1$ est le récepteur majeur liant le collagène sur les lignées leucémiques T-ALL^{410,457}. L'effet protecteur du collagène est aboli par les anticorps bloquants spécifiques de la chaîne $\alpha 2$ intégrine (clone PEI6) (chapitres II et IV). Également, la seule induction de cette intégrine dans les cellules MOLT-3 reproduit la quasi-totalité de l'action protectrice du collagène (chapitre IV). Ces résultats ont été confirmés par l'utilisation des cellules souches mésenchymateuses du microenvironnement médullaire (BMSC). En effet, les cellules BMSC sont connues pour jouer un rôle important dans la chimiorésistance et la progression leucémique^{41,517}. Ce sont également les principales cellules productrices de collagène au niveau médullaire⁴⁴. Nous avons trouvé que le contact des cellules leucémiques Jurkat avec ces cellules promeut leur protection contre l'apoptose induite par la doxorubicine *via* l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ (chapitre II). Par ailleurs, nous avons trouvé que la survie des cellules induite par le collagène n'était pas transitoire, mais tel qu'élucidé par le test de la croissance clonogénique, ces cellules peuvent survivre à long terme et proliférer. Ceci suggère que l'état de résistance induit par l'interaction du collagène avec l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ peut favoriser l'émergence de clones T-ALL qui contribueront à la maladie résiduelle minimale et aux rechutes ultérieures des patients atteints de leucémies T-ALL. Nous avons aussi démontré pour la première fois que l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ est exprimée sur les lymphoblastes T dérivant de biopsies médullaires de patients T-ALL au stade diagnostique (chapitre II). La stimulation *ex vivo* de ces blastes par le collagène, promeut leur protection contre l'apoptose induite par la doxorubicine, renforçant l'implication de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ dans l'induction de la résistance de novo des leucémies T-ALL contre la chimiothérapie.

En outre, nous avons aussi trouvé que l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ est remarquablement exprimée sur différentes lignées leucémiques de type AML, ce qui corrèle avec d'anciennes données cliniques révélant l'expression de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ à la surface de blastes de patients atteints de leucémies AML^{62,455}. Comme pour les cellules T-ALL, l'adhésion des cellules leucémiques AML au collagène *via* l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ assure leur protection contre l'effet pro-apoptotique induit par la doxorubicine (chapitre IV). Ceci est en accord avec les résultats du groupe du Dr. Cordes qui a précédemment montré que l'adhésion des cellules HL-60 au collagène diminue leur apoptose induite par la cytarabine et l'irradiation⁵¹⁰. Cependant, dans son travail, le rôle des intégrines liant le collagène n'a pas été étudié. Plusieurs travaux ont suggéré la contribution de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ à la résistance du cancer pancréatique et mammaire contre la chimiothérapie^{433,516}. En plus des tumeurs solides, notre travail a donc permis d'élucider l'importance de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ dans l'induction de la chimiorésistance des leucémies aiguës T-ALL et AML. Le rôle de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ dans la régulation de la chimiorésistance d'autres types d'hémopathies malignes comme les lymphomes de type T reste à étudier.

De plus, nous avons montré que le collagène à l'état soluble et d'une façon similaire au collagène immobilisé, peut induire la protection des cellules AML et T-ALL contre la chimiothérapie (chapitres II et IV). Les fragments peptidiques du collagène sont fréquemment libérés au niveau médullaire et extra-médullaire par le remodelage de la MEC assuré par l'activité des métalloprotéinases (MMP) et des autres protéases produites par les cellules leucémiques et par les cellules stromales du microenvironnement tumoral^{53-55,518}. Nos données démontrent ainsi que l'attachement des cellules leucémiques au collagène du stroma n'est pas une condition absolue pour induire leur protection et que cet effet peut être aussi produit dans les cellules leucémiques non adhérentes. Nos données vont dans le même sens que celles de Seong *et al.* ayant montré que les formes immobilisées et solubles du collagène activent de la même façon l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ ⁵¹⁹.

Contrairement à l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ qui se lie principalement au collagène de type I, l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ est le récepteur majeur au collagène de type IV qui est exprimé au niveau de la membrane basale des vaisseaux sanguins^{325,520}. Elle est détectée à la surface de plusieurs tumeurs solides, jouant un rôle principalement dans la prolifération et la migration

des cellules cancéreuses⁵²¹⁻⁵²⁴. Ce récepteur est faiblement détecté à la surface des lignées T-ALL et AML que nous avons investiguées au laboratoire. Nos résultats corrélerent avec certaines données cliniques ayant révélé la faible expression de l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ à la surface des leucémies lymphoblastiques (T-ALL et B-ALL) et des leucémies myéloïdes^{62,454}. Ceci suggère que l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ pourrait avoir un rôle mineur dans la chimiorésistance et la progression des leucémies AML et T-ALL. Ces études suggèrent aussi que les cellules T-ALL et AML qui se trouvent dans la zone médullaire riche en collagène de type I, particulièrement dans les niches endostéales sont probablement celles qui seront protégées et à l'origine des rechutes⁴⁵. Ceci est en corrélation avec les travaux qui ont montré en utilisant le model murin de xénogreffes de cellules leucémiques B-ALL ou AML, qu'après l'administration de forte doses de cytarabine, les blastes résiduels sont préférentiellement localisés au niveau des niches endostéales de la moelle osseuse^{51,83,84}.

En plus du collagène, la fibronectine est abondamment exprimée dans le microenvironnement médullaire⁶⁰. Les intégrines $\alpha 4\beta 1$ et $\alpha 5\beta 1$ sont les principaux récepteurs liant cette matrice et sont fréquemment exprimées sur les cellules des lignées T-ALL et AML^{370,458,463} et les blastes dérivant de patients leucémiques^{62,455}. Cependant, nous avons trouvé que la fibronectine n'induit pas la protection des cellules des lignées T-ALL et des lymphoblastes T de patients contre l'effet apoptotique induit par la doxorubicine (chapitres II et III). Ces données sont en accord avec les résultats précédents de notre laboratoire montrant l'incapacité de la fibronectine à protéger les cellules Jurkat contre l'apoptose extrinsèque induite par le récepteur Fas⁴¹⁰. Également, certaines publications ont rapporté un rôle pro-apoptotique de la fibronectine contre les lymphocytes T normaux et des lignées T-ALL^{411,479}. Contrairement à nos données, l'équipe de Dr. Lim a rapporté récemment que l'adhésion des cellules Jurkat aux fragments recombinants CS1 de la fibronectine réduit leur apoptose induite par la doxorubicine⁵²⁵. Cependant, dans ce travail, l'effet anti-apoptotique de la fibronectine entière n'a pas été démontré. Contrairement aux cellules T-ALL, la liaison des intégrines $\alpha 4\beta 1$ et $\alpha 5\beta 1$ avec la fibronectine et/ou avec VCAM-1 est impliquée dans la résistance des leucémies lymphoïdes B et des leucémies AML contre l'apoptose induite par les drogues et l'irradiation^{317,463,487}, ce qui suggère que la résistance via les intégrines $\alpha 4\beta 1$ et $\alpha 5\beta 1$ est dépendante du type cellulaire. En plus de la fibronectine, la moelle osseuse contient d'autres matrices telles que les laminines et la

vitronectine^{526,527}. L'implication de ces dernières dans la régulation de la réponse à la thérapie des leucémies T-ALL et AML nécessitent d'autres investigations.

Étant donné l'abondance du collagène dans l'environnement médullaire et extra-médullaire, la voie collagène/intégrine $\alpha 2\beta 1$ peut représenter une voie primordiale dans la chimiorésistance des leucémies T-ALL et AML. L'analyse clinique récente de Cleaver *et al.* réalisée sur quatre cohortes indépendantes de patients T-ALL, a démontré que l'expression de niveaux élevés de l'ARNm de la chaîne $\alpha 2$ intégrine (CD49b) au stade diagnostique est en corrélation avec le taux de rechute chez les patients T-ALL²²⁸. Plus intéressant, cette étude n'a pas révélé de corrélation entre les rechutes de ces patients et les niveaux d'expression de l'ARNm des chaînes $\alpha 4$ (CD49d) et $\alpha 5$ (CD49e) intégrines. En plus de l'absence de leur implication dans la résistance des leucémies T-ALL, le rôle des intégrines $\alpha 4\beta 1$ et $\alpha 5\beta 1$ dans la résistance des leucémies AML est également controversé. En effet, contrairement aux études initiales réalisées *in vitro* et *in vivo*^{463,487}, les investigations cliniques ont montré l'absence de corrélation entre les niveaux d'expression des chaînes $\alpha 4$ intégrine (protéique) et $\alpha 5$ intégrine (mRNA) et les rechutes des patients AML pédiatriques et adultes⁵¹¹⁻⁵¹³. Au contraire, les niveaux élevés de la chaîne $\alpha 4$ intégrine sont associés au bon pronostic des patients AML^{511,512}. Ces controverses peuvent être expliquées par la possibilité de la co-implication d'autres intégrines dans la régulation de la chimiorésistance des leucémies AML. En résumé, nos résultats consolidés avec ceux de l'étude clinique de Cleaver *et al.*²²⁸ suggèrent fortement que l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ peut représenter une voie majeure dans la chimiorésistance au moins des leucémies de type T-ALL.

Les voies MAPK/ERK et PI3K/AKT sont deux voies cruciales pour la progression des leucémies et des autres tumeurs⁵²⁸⁻⁵³⁰. Elles sont actuellement parmi les cibles thérapeutiques majeures en clinique^{531,532}. Ces deux voies sont aussi les voies principales de survie activées par les intégrines^{322,533}. Des études précédentes ont démontré que l'effet anti-apoptotique induit par l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ est dépendant de la voie PI3K/AKT dans les hémopathies lymphoïdes de type B et les leucémies myéloïdes^{317,487}. La voie PI3K/AKT est aussi induite par l'engagement de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ et est impliquée dans la régulation de la chimiorésistance du cancer du sein et du cancer de la tête et du cou^{433,534}. Contrairement à

ces données, nous avons trouvé que l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ n'induit pas l'activation de la voie PI3K/AKT dans les cellules leucémiques de type T-ALL et AML (chapitres II et IV). Cette voie est activée constitutivement dans certaines lignées (telle que la lignée Jurkat E6.1) mais son inhibition n'affecte pas la chimio-protection des cellules leucémiques T-ALL et AML induite par le collagène. Le collagène induit particulièrement l'activation des deux voies MAPKs ERK et p38. Cependant, l'inhibition de la voie p38 par l'inhibiteur SB203580 ou par ARN interférence n'affecte pas l'effet anti-apoptotique induit par le collagène contre la doxorubicine dans les cellules des lignées T-ALL et AML (**Figure S2, Annexe**).

La voie MAPK/ERK est la voie de survie majeure induite par l'interaction du collagène avec l'intégrine $\alpha 2\beta 1$, assurant son effet de chimiorésistance dans les leucémies T-ALL et AML (chapitres II, III et IV). Nous avons remarqué que l'activation de la voie MAPK/ERK par le collagène est induite précocement, après 1 h de stimulation et qu'elle est maintenue dans le temps (elle reste augmentée après 24 h). Ce profil d'activation est propice pour la régulation des événements précoces et tardifs de la survie des cellules leucémiques par le collagène. Notre étude nous a permis d'identifier deux facteurs majeurs à la chimiorésistance via l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ qui sont induits par la voie MAPK/ERK, soit la protéine anti-apoptotique Mcl-1 et le transporteur des drogues ABCC1 appelé aussi MRP-1 (chapitres II, III et IV).

A l'heure actuelle, nous n'avons pas exploré les mécanismes d'induction de la pompe ABCC1 par la voie ERK (chapitre III) mais une action de la voie ERK est possible à différents niveaux de régulation de l'expression génique du transporteur ABCC1. L'induction rapide de l'augmentation de l'ARNm de ABCC1 et de son expression protéique par le collagène suggère un rôle de la voie ERK dans la préservation de la stabilité de l'ARNm de ABCC1 et une potentialisation de sa traduction. La voie ERK est impliquée dans l'induction du transporteur ABCC1 dans les cellules du carcinome hépatocellulaire^{288,289}. Également, il a été démontré que l'expression du transporteur ABCC1 dans ces cellules est liée à une diminution des niveaux des microARN; miR-199a/b et miR-296 spécifiques du transporteur ABCC1⁵³⁵. Ces données suggèrent un rôle probable de la voie ERK dans l'inhibition de l'expression de certains microARNs qui peuvent

diminuer l'expression du transporteur ABCC1. Par ailleurs, il a été aussi démontré que le contrôle de la machinerie de traduction est l'un des mécanismes impliqués dans la progression des cancers induite par les intégrines⁵³⁶. Le rassemblement et le fonctionnement de la machinerie traductionnelle sont particulièrement dépendants de l'activité du facteur eIF4E. Ce dernier est impliqué dans la régulation de la chimiorésistance et la progression des hémopathies malignes^{537,538}. L'activité du facteur eIF4E est en partie, régulée par l'intermédiaire des kinases MNK et p70S6K qui sont activées par la voie ERK^{529,539}. Ainsi, la potentialisation de la traduction du transporteur ABCC1 *via* l'activation du facteur eIF4E par la voie ERK, expliquerait son expression membranaire précoce induite par le collagène. En outre, la voie ERK peut assurer une augmentation de la transcription du transporteur ABCC1 et le maintien à long terme de son expression et de l'efflux de la doxorubicine des cellules leucémiques, via l'activation des facteurs de transcription AP1, SP1, NFκB et Notch1^{294-298,540} qui sont impliqués dans la transcription du gène ABCC1^{285,290-293}.

En plus de la possibilité de l'augmentation de sa transcription et de sa traduction, la voie ERK peut promouvoir la stabilité du transporteur ABCC1 au niveau de la membrane plasmique. Il n'y a pas d'études à ce jour ayant montré un effet de phosphorylation direct du transporteur ABCC1 par la kinase ERK. Cependant la voie ERK est impliquée dans la polymérisation de l'actine corticale via en partie la régulation de la localisation et de l'activité de la cortactine^{541,542}. Tel que démontré dans notre étude (chapitre III) et celle de Hummal *et al.*³⁰⁶, l'actine corticale est une structure importante pour maintenir la stabilité du transporteur ABCC1 à la surface cellulaire et pour induire l'efflux de la doxorubicine.

En plus de l'importance du transporteur ABCC1, Mcl-1 est une protéine cruciale pour la survie des leucémies T-ALL et AML et pour leur chimiorésistance induite par le collagène (chapitres II et IV). Contrairement au transporteur ABCC1, le maintien des niveaux de Mcl-1 par la voie ERK n'est pas dû à une augmentation de sa transcription ou de sa traduction telle que démontré par l'absence d'augmentation de Mcl-1 suite à la stimulation des cellules avec le collagène seul (chapitres II et IV). Dans le contexte de notre exploration, on ne sait pas s'il y a un effet de phosphorylation direct de la protéine Mcl-1 par la voie ERK favorisant la stabilisation de Mcl-1. Par contre, nous avons démontré que

la voie ERK est capable de maintenir les niveaux de Mcl-1 via l'inhibition de la kinase JNK induite par la doxorubicine, ce qui suggère un rôle du collagène *via* ERK dans l'inhibition de l'ubiquitination et la dégradation protéosomale de Mcl-1 induite par la voie JNK^{220,222}. La voie JNK est importante pour l'induction de l'apoptose des cellules des leucémies aiguës et autres tumeurs solides par la chimiothérapie^{190,194,200,543,544}. L'inhibition de l'activation de la voie JNK corrèle avec la faible réponse des patients T-ALL et AML à la chimiothérapie d'induction^{89,545}. L'inhibition de l'activation de la voie JNK est aussi notée dans les lignées U937 et HL-60 intrinsèquement résistantes aux anthracyclines^{545,546}. En corrélation avec ces données, nous avons trouvé que l'induction de la voie JNK par la doxorubicine est inhibée par la voie ERK activée par le collagène dans les cellules T-ALL et AML, ce qui bloquerait en conséquence la dégradation protéosomale de Mcl-1 induite par la kinase JNK en présence de la doxorubicine. Des exemples similaires d'inhibition de la voie de stress JNK par la voie de survie MAPK/ERK ont été précédemment décrits dans les mélanocytes malins et les cellules leucémiques des lignées Jurkat et U937 stimulées par le docetaxel et le bortezomib respectivement^{191,547}.

Le maintien des niveaux de Mcl-1 par le collagène promeut l'inhibition de l'apoptose mitochondriale, traduite par la diminution du relâchement au niveau cytosolique du cytochrome C et de l'activation des caspases 9 et 3 (chapitres II et IV). En accord, certaines études ont révélé que la maladie résiduelle minimale corrèle également avec l'inhibition de l'activation de la voie mitochondriale d'apoptose induite par la chimiothérapie et qui se manifeste par une diminution des niveaux des fragments actifs des caspases-9 et -3^{89,90}. Ensemble, ces données suggèrent que le collagène, via l'intégrine $\alpha 2\beta 1$, pourrait contribuer à la maladie résiduelle minimale chez les patients atteints de leucémies T-ALL et AML.

L'inhibition de l'activation de JNK par le collagène est indépendante de l'efflux de la doxorubicine par le transporteur ABCC1 puisque l'inhibition de l'expression du transporteur ABCC1 par ARN interférence n'empêche pas le collagène d'inhiber l'activation de JNK (**Figure S3, Annexe**). Ceci indique que les deux voies ERK/ABCC1 et ERK/Mcl-1 pourraient avoir des rôles indépendants mais complémentaires dans la résistance des leucémies T-ALL et AML induite par le collagène. La complémentarité entre

les deux systèmes Mcl-1 et ABCC1 dans l'inhibition de l'apoptose mitochondriale induite par la doxorubicine n'est pas encore comprise mais suggère un effet du transporteur ABCC1 sur d'autres acteurs de l'apoptose mitochondriale, tel que l'inhibition de l'expression ou de l'activation des protéines à domaine BH3 (Bid, Bim, puma, Noxa) ou encore l'inhibition de l'activation des caspases via l'induction des protéines de la famille des IAPs (XIAP, c-IAP1, c-IAP2)¹¹¹. En outre, la complémentarité entre les deux systèmes Mcl-1 et ABCC1 est en accord avec les études cliniques démontrant l'existence d'une plus forte association entre les rechutes des patients leucémiques et l'augmentation simultanée des niveaux des protéines de la famille Bcl-2 et ceux des transporteurs ABC comparativement à celle liée à l'augmentation séparée de ces protéines⁵⁴⁸. Cette collaboration pourrait aussi expliquer la faible efficacité clinique des inhibiteurs des transporteurs ABC dans le traitement des cancers en général et des leucémies en particulier^{278,279}.

Afin de comprendre le mécanisme par lequel la voie ERK activée par le collagène inhibe l'induction de la voie JNK par la doxorubicine, nous avons investigué le rôle de la GTPase Rac1. Notre étude a permis de démontrer que le collagène inhibe la kinase JNK en inhibant l'activation de Rac1 par la doxorubicine (chapitre IV). Ces résultats sont en accord avec des études précédentes qui ont montré l'implication de la voie Rac1/JNK dans l'induction de l'apoptose par la doxorubicine^{205,208,549}.

Dans notre contexte, le collagène seul n'active pas la voie Rac1 et l'inhibition de cette dernière n'affecte pas l'effet anti-apoptotique induit par le collagène. Nous avons trouvé que *via* l'inhibition de Rac1 par la voie ERK, le collagène bloque l'activation de la kinase JNK maintenant ainsi des niveaux élevés de la protéine Mcl-1, permettant, de cette façon l'inhibition de la perméabilisation de la mitochondrie. En plus, Rac1 peut aussi avoir un effet génotoxique au niveau nucléaire soit dans l'induction des dommages à l'ADN. En effet, Rac1 peut augmenter la liaison de la doxorubicine à la topoisomérase II⁵⁴⁹. Dans ce contexte, nous avons trouvé que le collagène inhibe la phosphorylation de l'histone H2XA au niveau du site serine 139, qui est un marqueur précoce des réponses aux dommages de l'ADN (chapitre IV et^{550,551}). Ainsi, le collagène en inhibant l'activité de Rac1 pourrait

également diminuer le nombre de cassures à l'ADN et ainsi diminuer la signalisation pro-apoptotique de la doxorubicine.

L'inhibition de l'activation de l'histone H2XA par le collagène implique aussi la voie ERK. L'inhibition de l'activation de Rac1 par la voie collagène/ $\alpha 2\beta 1$ /ERK pourrait favoriser le maintien de l'intégrité de l'ADN par l'inhibition des dommages à l'ADN induits par la GTPase Rac1⁵⁴⁹. Les mécanismes *via* lesquels ERK régule l'activation de Rac1 ne sont pas encore déterminés. Une étude récente de l'équipe du Dr. Wu a démontré que l'activation de la voie Rac1/JNK par la doxorubicine dans les cellules Hela est dépendante de l'augmentation des niveaux du Tiam⁵⁵². Ce dernier est un facteur d'échange de nucléotide guanine impliqué dans l'activation de Rac1. Un effet de la voie ERK sur la modulation des niveaux d'expression ou d'activité de Tiam en vue d'inhiber Rac1 serait l'un des mécanismes probables.

En résumé de notre travail, un modèle par lequel l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ favorise la chimiorésistance des leucémies T-ALL et AML est présenté dans la **figure 17**.

Figure 17: La régulation de la chimiorésistance des leucémies T-ALL et AML par la voie collagène/intégrine $\alpha 2\beta 1$

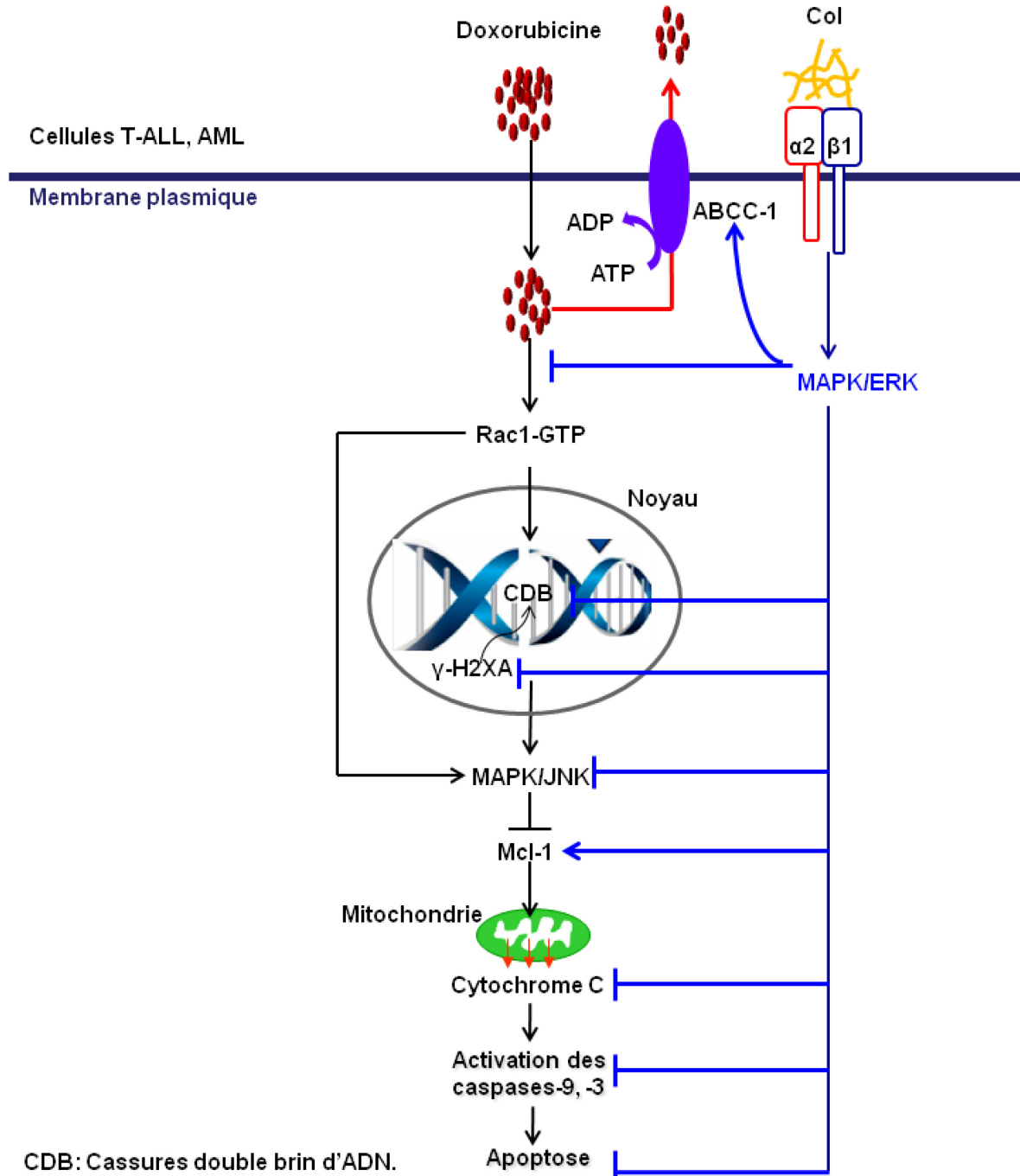


Figure 17 : Régulation de la chimiorésistance des leucémies T-ALL et AML par la voie collagène/ $\alpha 2\beta 1$.

L'adhésion au collagène via l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ favorise la résistance des cellules leucémiques T-ALL et AML contre l'apoptose induite par la doxorubicine et ceci via l'activation de la voie de survie MAPK/ERK et la régulation des protéines anti-apoptotiques Mcl-1 et ABCC1. En effet, la voie ERK augmente l'expression et la stabilité membranaire du transporteur d'efflux ABCC1, ce qui renverse l'accumulation de la doxorubicine au niveau des cellules leucémiques. Également, la voie ERK promeut l'inhibition de la voie pro-apoptotique Rac1/JNK induite par la doxorubicine, ce qui est important pour le maintien des niveaux de Mcl-1 et l'inhibition de la cascade d'apoptose mitochondriale induite par la doxorubicine. Le blocage de l'activation de Rac1 par la voie de survie ERK permet aussi la préservation de l'intégrité de l'ADN, ce qui pourrait diminuer l'effet génotoxique de la doxorubicine. De cette façon, la voie collagène/ $\alpha 2\beta 1$ /ERK semble jouer un rôle important dans l'émergence à long terme de nouveaux clones T-ALL et AML résistants à la doxorubicine. (CDB: Cassures double brin d'ADN).

Dans nos travaux, nous n'avons pas exploré en détail les mécanismes via lesquels le collagène protège les cellules leucémiques T-ALL contre la vincristine et le méthotrexate (**Figure S1, Annexe**). Cependant, certaines études ont déjà montré l'induction et l'implication de la voie JNK dans l'apoptose des cellules lymphoïdes et du mélanome induite par ces drogues^{214,553}. Les effets pro-apoptotiques induits par la vincristine et le méthotrexate sont inhibés par l'activation de la voie ERK⁵⁵⁴. Également, l'apoptose des cellules cancéreuses induite par la vincristine est liée à l'induction de la dégradation protéosomale de la protéine anti-apoptotique Mcl-1⁵⁵⁵. De plus, la pompe ABCC1 est connue pour pouvoir induire l'efflux de la vincristine et du méthotrexate^{265,276}. Ces données suggèrent que le collagène pourrait induire la résistance des blastes T-ALL et AML contre la vincristine et le méthotrexate *via* le même mécanisme induit contre la doxorubicine, c'est-à-dire l'activation de la voie de survie ERK/Mcl-1/ABCC1 et l'inhibition de la voie pro-apoptotique JNK. De même, les glucocorticoïdes sont des drogues largement utilisés dans le traitement des leucémies T-ALL⁵⁵⁶. Nous n'avons pas pu les tester dans notre étude à cause de la résistance fréquente des lignées T-ALL contre ces drogues^{232,557}. Cependant, certaines études ont démontré que la résistance aux glucocorticoïdes est liée à l'activation de la voie de survie ERK et aux protéines Mcl-1 et ABCC1⁵⁵⁸⁻⁵⁶¹. Ceci suggère que le collagène *via* l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ pourrait aussi favoriser la résistance des leucémies T-ALL contre l'apoptose induite par les glucocorticoïdes. De ce fait, l'activation de la voie ERK/Mcl-1/ABCC1 par le couple collagène/intégrine $\alpha 2\beta 1$ favoriserait la multi-résistance des leucémies AML et T-ALL, ce qui serait à l'origine de la faible réponse des patients aux protocoles classiques de la chimiothérapie.

En clinique, la protéine Mcl-1, le transporteur ABCC1 et la forme phosphorylée de la kinase ERK sont associés aux rechutes des patients AML et T-ALL^{5,229,248,275,276,562}. Ces trois facteurs sont considérés parmi les acteurs majeurs de la chimiorésistance leucémique. De ce fait, on assiste à l'émergence de plusieurs molécules visant le blocage de la voie ERK et l'inhibition des activités anti-apoptotiques des protéines Mcl-1 et ABCC1^{247,277,529,563}. Également, la faible activation de la kinase JNK est associée à la détection de la maladie résiduelle minimale chez les patients AML et T-ALL^{89,545}. L'ensemble de ces données cliniques est en corrélation avec les résultats de notre investigation réalisée *in vitro* et suggère que l'activation de la voie ERK/Mcl-1/ABCC1 par

le couple collagène/ intégrine $\alpha 2\beta 1$ pourrait jouer un rôle primordial dans l'émergence de la résistance des leucémies T-ALL et AML.

En plus de son rôle dans la chimiorésistance, nous avons montré que le collagène via l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ peut réguler la progression des leucémies T-ALL via le maintien de leur survie en absence de facteurs de croissance au niveau du microenvironnement médullaire (chapitre V). En accord, les lymphoblastes dérivant de patients T-ALL, B-ALL ou AML sont incapable de survivre en culture, en absence de leur contact avec les cellules stromales ou avec la MEC^{469,470,564-566}. La survie via le collagène dans ce contexte est aussi assurée par la voie MAPK/ERK qui inhibe la diminution Mcl-1 induite par la privation de sérum. Des études précédentes ont montré que la voie JNK est impliquée dans l'induction de l'apoptose des cellules Jurkat en absence de sérum⁴⁷¹. Ceci suggère que la voie ERK peut restaurer les niveaux de Mcl-1 en absence de facteurs de croissance en inhibant l'activation de la voie de stress JNK, comme démontré dans le contexte de la résistance à la doxorubicine (chapitre II). Nos résultats suggèrent que l'activation de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ par le collagène et l'induction de la voie ERK, jouent un rôle primordial dans la survie des cellules leucémiques.

En plus de son rôle dans le maintien de la survie et la chimiorésistance des leucémies T-ALL, notre laboratoire a précédemment démontré que la voie ERK activée suite à l'engagement de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ par le collagène, favoriserait l'échappement des cellules leucémiques à l'action pro-apoptotique des cellules immunitaires. En effet, le collagène protège les cellules leucémiques des lignées T-ALL contre l'apoptose extrinsèque induite par les récepteurs de mort Fas et TRAIL⁴¹⁰. Ensemble, ces données suggèrent que la voie collagène/ $\alpha 2\beta 1$ intégrine/ERK pourrait jouer un rôle critique dans la survie et la progression des leucémies T-ALL et probablement des cellules AML aussi.

Certains travaux ont démontré que la chimiorésistance des leucémies T-ALL et AML peut corrélérer avec les propriétés invasives des cellules leucémiques^{30,567-569}. Nous avons trouvé qu'en plus de son rôle dans la chimiorésistance, l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ promeut la migration des cellules leucémiques HSB2 à travers le collagène (chapitre V), suggérant son implication dans la dissémination des cellules T-ALL vers les organes extra-médullaires. L'intégrine $\alpha 2\beta 1$ est impliquée dans l'induction des métastases de plusieurs tumeurs solides (cancer de

la prostate, de l'ovaire, du pancréas, chondrosarcome)^{451,570-572}. Son hyper-expression dans les cellules leucémiques K562 induit aussi leur migration à travers le parenchyme hépatique⁵⁷³. Ces données suggèrent que l'expression de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ favoriserait l'invasion des cellules T-ALL.

Les mécanismes *via* lesquels l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ peut réguler la migration des leucémies T-ALL et l'implication potentielle des Rho GTPases restent à explorer. Ce que nous avons démontré pour l'instant est que la voie ERK agit en synergie avec la voie p38MAPK pour promouvoir la migration des cellules HSB2 à travers le collagène (chapitre V). Ceci indique que les deux voies ERK et p38 peuvent réguler les réarrangements du cytosquelette d'actine-myosine des cellules en migration en agissant sur différents substrats⁵⁷⁴. De plus, comme démontré dans les leucémies B-ALL, la voie p38 pourrait favoriser la chimiotaxie des cellules T-ALL en réponse au SDF-1 α ⁵⁷⁵. La voie p38 est importante pour la migration leucémique mais elle n'est pas requise pour la protection des cellules T-ALL contre l'apoptose induite par la doxorubicine (**Figure S2, Annexe**) ou par l'absence de sérum (chapitre V).

L'implication de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ *via* la voie ERK dans la survie, la chimiorésistance, l'immuno-protection et la migration leucémique souligne l'importance de cette voie dans la progression et l'agressivité des leucémies T-ALL et AML. Cependant, nous n'avons pas encore exploré le rôle de l'interaction collagène/intégrine $\alpha 2\beta 1$ dans la régulation de la croissance des leucémies T-ALL et AML.

L'ensemble des résultats de nos travaux suggèrent que l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ serait une cible thérapeutique prometteuse permettant l'augmentation de l'efficacité de la chimiothérapie dans le traitement des leucémies T-ALL et l'inhibition du développement de la chimiorésistance. Ceci serait possible selon les données de la littérature qui montrent un rôle redondant de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ dans la régulation de plusieurs processus physiologiques de cicatrisation, d'angiogenèse et de coagulation^{523,576-580}. En effet, des études ont montré que l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ ne serait pas nécessaire à la cicatrisation⁵⁷⁶⁻⁵⁷⁸ et semble plutôt favoriser l'induction de l'angiogenèse tumorale que physiologique^{523,581}. En plus, les souris déficientes en la chaîne $\alpha 2$ intégrine (KO) ne présentent aucune anomalie pathologique même à l'âge adulte sauf des défauts mineurs d'adhésion des plaquettes au collagène et

dans le branchement des glandes mammaires ont été notés^{582,583}. Ces anomalies n'affectent ni le rôle des plaquettes dans la coagulation, ni la fonction des glandes mammaires dans la sécrétion du lait.

L'intégrine $\alpha 2\beta 1$ est aussi connue pour son rôle pro-inflammatoire dans le contexte des réponses immunes innée et adaptative⁵⁸⁴⁻⁵⁸⁷. Elle est significativement exprimée par les lymphocytes T effecteurs Th1 et Th17^{588,589}. Sa liaison au collagène promeut *via* la co-stimulation du récepteur à l'antigène (TCR), la production des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-17 et l'INF- γ ^{588,589}. L'engagement de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ induit aussi, l'inhibition de l'apoptose des lymphocytes T activées induite par la réactivation du TCR ou l'AICD (Activation Induced Cell Death)⁴⁰⁹. Kassiotis et *al.* ont montré que l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ n'est pas requise pour l'activité anti-infectieuse des lymphocytes T effecteurs contre le virus de l'influenza⁵⁹⁰. Par contre, son expression a été associée à une réponse immuno-pathologique des lymphocytes T effecteurs et à une potentialisation des dommages tissulaires. En accord, l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ est associée à la pathogénèse et l'agressivité de plusieurs pathologies inflammatoires et auto-immunes telles que la polyarthrite rhumatoïde et la sclérose en plaque⁵⁹¹⁻⁵⁹³. Son inhibition dans un modèle murin d'arthrite induite par le collagène, réduit considérablement l'ampleur des dommages tissulaires *via* la réduction du nombre des Th17 et de la production de l'IL-17⁵⁹³. Le blocage de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ est l'une des perspectives majeures pour le traitement des maladies auto-immunes^{325,594,595}. L'anticorps monoclonal bloquant la chaîne $\alpha 2$ intégrine (GBR-500, Sanofi) est en cours d'essais cliniques de phase II pour le traitement de la sclérose en plaque et la colite ulcéreuse^{325,595}. Les essais cliniques de phase I ont montré que l'immunothérapie *via* l'anticorps GBR-500 est parfaitement tolérée chez les individus. Également, la molécule sulfonamide E7820 qui est un inhibiteur de la synthèse de la chaîne $\alpha 2$ intégrine, est en phase II d'essais cliniques pour la prévention de l'angiogenèse et des métastases des tumeurs solides^{449,451}. Ensemble, ces données suggèrent que le ciblage de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ pourrait être bénéfique et tolérable chez les patients atteints de leucémies T-ALL et AML.

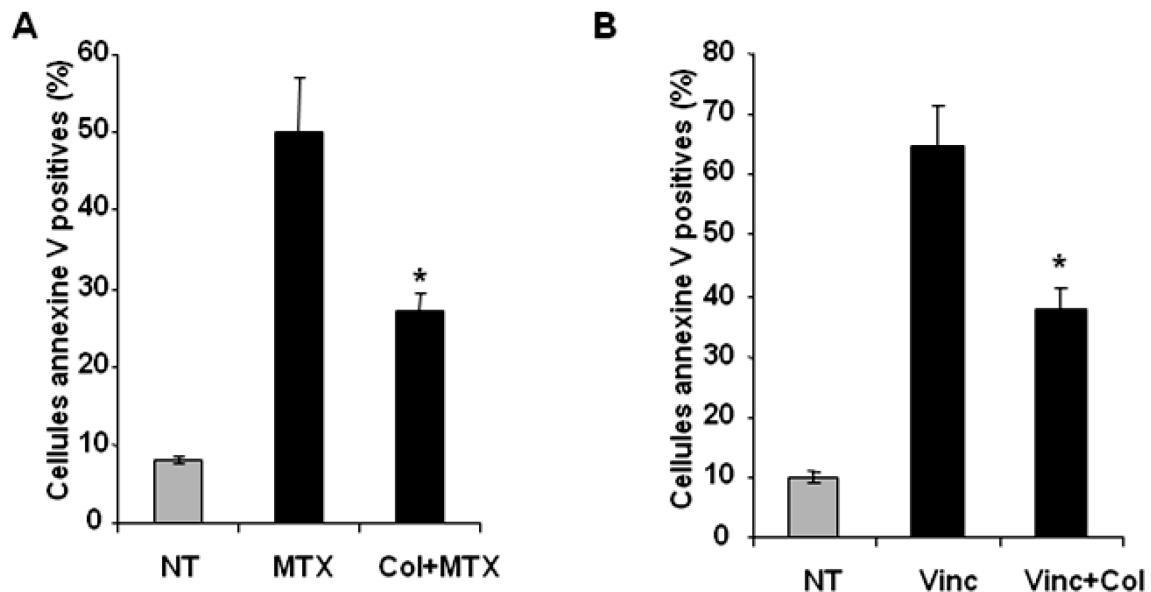
En conclusion, nos résultats démontrent que *via* son rôle dans la survie et la chimiorésistance, l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ pourrait constituer un marqueur prédictif pour les

rechutes des patients T-ALL et AML. Elle pourrait également constituer une cible thérapeutique prometteuse afin de potentialiser l'efficacité de la chimiothérapie chez les patients T-ALL et AML et ainsi empêcher le développement de la résistance aux drogues et les rechutes. Afin de compléter nos données surtout en vue d'éventuelles perspectives cliniques, l'importance de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ dans la chimiorésistance et la progression des leucémies T-ALL et AML mérite d'être vérifié *in vivo* par l'utilisation d'un modèle de xénogreffes de leucémies T-ALL et AML dans les souris immuno-déficientes. De même, une analyse de corrélation entre les niveaux d'expression protéique de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ au stade diagnostic et la réponse clinique des patients T-ALL et AML à la chimiothérapie est requise.

Annexe

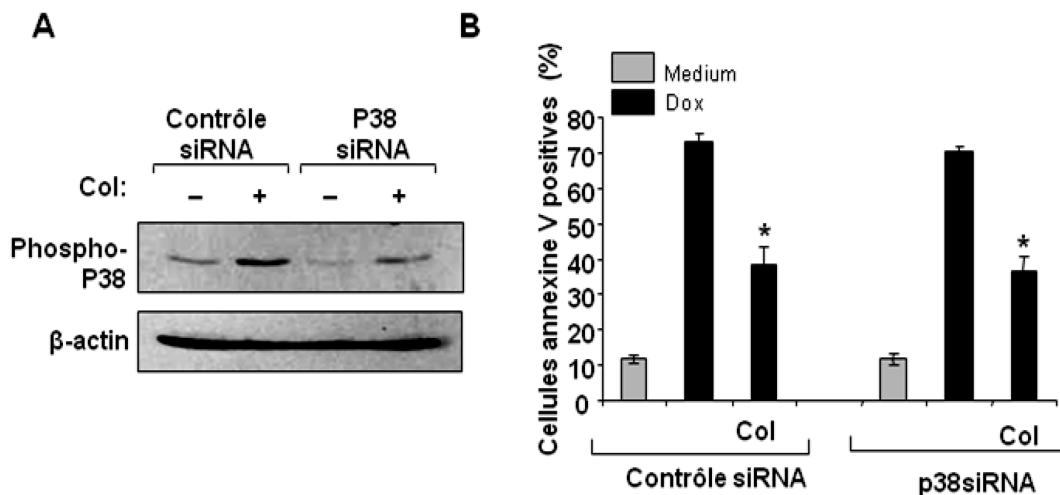
Figures supplémentaires

Figure S1 : Le collagène de type I protège les cellules T leucémiques contre l'apoptose induite par le méthotrexate et la vincristine



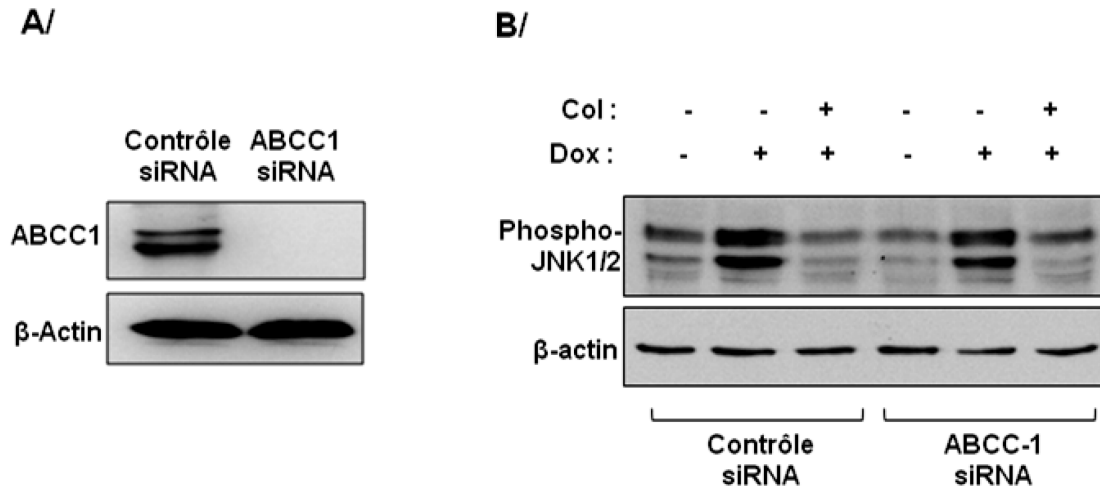
Les cellules Jurkat (A) et HSB2 (B) ont été pré-incubées en contact du collagène de type I (Col) pendant 4 h ensuite traitées avec le méthotrexate (MTX) ou la vincristine (Vinc) pendant 24 h. L'apoptose a été évaluée par marquage à l'annexine V-FITC suivie d'une analyse par la cytométrie en flux. Les moyennes des valeurs obtenues (\pm DS) à partir de trois expériences indépendantes sont présentées. * $p < 0.05$ entre les échantillons traités au MTX et Col+MTX et entre ceux traités à la Vinc et Col+ Vinc.

Figure S2 : L'effet protecteur du collagène de type I contre l'apoptose induite par la doxorubicine est indépendant de la voie p38 MAPK



Les cellules HSB2 ont été transfectées avec des séquences siRNA spécifiques de la kinase p38MAPK ou avec un siRNA contrôle en utilisant la méthode du nucleofacteur d'Amaza. Après transfection, les cellules ont été incubées pendant 24 h dans un milieu RPMI supplémenté avec 10% de sérum bovin foetal. **(A)** Les cellules transfectées avec les siRNA p38 ou siRNA contrôle, ont été incubées avec le collagène (Col) pendant 4 h ensuite les niveaux de phosphorylation de p38 ont été mesurés par immunobuvardage en utilisant l'anticorps anti-phospho-p38MAPK (clone 28B10). La β-actine a été utilisée comme un contrôle de charge. **(B)** Les cellules transfectées ont été pré-incubées en contact du collagène (Col) pendant 4 h ensuite traitées avec la doxorubicine (Dox) pendant 24 h. L'apoptose a été évaluée par marquage à l'annexine V-FITC suivie d'une analyse par la cytométrie en flux. Les moyennes des valeurs obtenues (\pm DS) à partir de trois expériences indépendantes sont présentées. * $p < 0.05$ entre les échantillons traités avec Dox et Col+Dox des cellules transfectées avec siRNA contrôle et entre les échantillons Dox et Col+Dox des cellules transfectées avec siRNA p38. Des résultats similaires ont été obtenus avec les cellules de la lignée Jurkat E6.1 et par l'utilisation de l'inhibiteur pharmacologique SB 203580 de la kinase p38 (20 μ M) dans les cellules leucémiques AML des lignées HL-60 et U937.

Figure S3 : Le collagène inhibe l'activation de JNK induite par la doxorubicine et cet effet n'est pas altéré par l'inhibition de l'expression du transporteur ABCC1



Les cellules Jurkat ont été transfectées avec des séquences siRNA spécifiques du transporteur ABCC1 ou avec un siRNA contrôle en utilisant la méthode du nucleofacteur d'Amaza. Après transfection, les cellules ont été incubées pendant 24 h dans un milieu RPMI supplémenté avec 10% sérum bovin foetal. **(A)** L'inhibition de l'expression du transporteur ABCC1 a été vérifiée par immunobuvardage en utilisant l'anticorps anti-ABCC1 (clone QCRL-1). La β-actine a été utilisée comme contrôle de charge. **(B)** Les cellules transfectées avec les siRNA ABCC1 ou siRNA contrôle, ont été incubées en contact du collagène (Col) pendant 4 h ensuite avec la doxorubicine pendant 8h. Les niveaux de phosphorylation de la JNK1/2 ont été déterminés par immunobuvardage en utilisant des anticorps anti-phospho-JNK1/2 (clone G9). La β-actine a été utilisée comme contrôle de charge.

Bibliographie

1. Ayala, F., Dewar, R., Kieran, M. & Kalluri, R. Contribution of bone microenvironment to leukemogenesis and leukemia progression. *Leukemia* **23**, 2233-2241 (2009).
2. Ramakrishnan, A. & Deeg, H.J. A novel role for the marrow microenvironment in initiating and sustaining hematopoietic disease. *Expert opinion on biological therapy* **9**, 21-28 (2009).
3. Teachey, D.T. & Hunger, S.P. Predicting relapse risk in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *British journal of haematology* **162**, 606-620 (2013).
4. Ravandi, F. Relapsed acute myeloid leukemia: why is there no standard of care? *Best practice & research. Clinical haematology* **26**, 253-259 (2013).
5. Holleman, A., *et al.* Gene-expression patterns in drug-resistant acute lymphoblastic leukemia cells and response to treatment. *The New England journal of medicine* **351**, 533-542 (2004).
6. Samudio, I., Konopleva, M., Carter, B. & Andreeff, M. Apoptosis in leukemias: regulation and therapeutic targeting. *Cancer treatment and research* **145**, 197-217 (2010).
7. Lauten, M., *et al.* Prediction of outcome by early bone marrow response in childhood acute lymphoblastic leukemia treated in the ALL-BFM 95 trial: differential effects in precursor B-cell and T-cell leukemia. *Haematologica* **97**, 1048-1056 (2012).
8. Nair, R.R., Tolentino, J. & Hazlehurst, L.A. The bone marrow microenvironment as a sanctuary for minimal residual disease in CML. *Biochemical pharmacology* **80**, 602-612 (2010).
9. Klein, G. The extracellular matrix of the hematopoietic microenvironment. *Experientia* **51**, 914-926 (1995).
10. Klein, G., Muller, C.A., Tillet, E., Chu, M.L. & Timpl, R. Collagen type VI in the human bone marrow microenvironment: a strong cytoadhesive component. *Blood* **86**, 1740-1748 (1995).
11. Desgrosellier, J.S. & Cheresch, D.A. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nature reviews. Cancer* **10**, 9-22 (2010).
12. Ferrara, F. & Schiffer, C.A. Acute myeloid leukaemia in adults. *Lancet* **381**, 484-495 (2013).
13. Inaba, H., Greaves, M. & Mullighan, C.G. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* **381**, 1943-1955 (2013).
14. Falini, B., Tiacci, E., Martelli, M.P., Ascani, S. & Pileri, S.A. New classification of acute myeloid leukemia and precursor-related neoplasms: changes and unsolved issues. *Discovery medicine* **10**, 281-292 (2010).
15. Graux, C. Biology of acute lymphoblastic leukemia (ALL): clinical and therapeutic relevance. *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis* **44**, 183-189 (2011).
16. Rodriguez-Abreu, D., Bordoni, A. & Zucca, E. Epidemiology of hematological malignancies. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **18 Suppl 1**, i3-i8 (2007).
17. Dores, G.M., Devesa, S.S., Curtis, R.E., Linet, M.S. & Morton, L.M. Acute leukemia incidence and patient survival among children and adults in the United States, 2001-2007. *Blood* **119**, 34-43 (2012).

18. Rieger, M.A. & Schroeder, T. Hematopoiesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **4**(2012).
19. Ma, D., Wei, Y. & Liu, F. Regulatory mechanisms of thymus and T cell development. *Developmental and comparative immunology* **39**, 91-102 (2013).
20. Vecchio, L., Seke Etet, P.F., Kipanyula, M.J., Krampera, M. & Nwabo Kamdje, A.H. Importance of epigenetic changes in cancer etiology, pathogenesis, clinical profiling, and treatment: what can be learned from hematologic malignancies? *Biochim Biophys Acta* **1836**, 90-104 (2013).
21. W.L. Carroll, M.L., A. Biondi, C. Willman. The Biology of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Childhood Leukemia*, 29. , © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2011, 29-60 (2011).
22. Graux, C., Cools, J., Michaux, L., Vandenberghe, P. & Hagemeijer, A. Cytogenetics and molecular genetics of T-cell acute lymphoblastic leukemia: from thymocyte to lymphoblast. *Leukemia* **20**, 1496-1510 (2006).
23. Martins, V.C., *et al.* Cell competition is a tumour suppressor mechanism in the thymus. *Nature* **509**, 465-470 (2014).
24. Wang, J.C. & Dick, J.E. Cancer stem cells: lessons from leukemia. *Trends in cell biology* **15**, 494-501 (2005).
25. Colmone, A., *et al.* Leukemic cells create bone marrow niches that disrupt the behavior of normal hematopoietic progenitor cells. *Science* **322**, 1861-1865 (2008).
26. Aoyagi, M., Furusawa, S., Waga, K., Tsunogake, S. & Shishido, H. Suppression of normal hematopoiesis in acute leukemia: effect of leukemic cells on bone marrow stromal cells and hematopoietic progenitor cells. *Internal medicine* **33**, 288-295 (1994).
27. Arrigan, M., Smyth, L., Harmon, M., Flynn, C. & Sheehy, N. Imaging findings in recurrent extramedullary leukaemias. *Cancer imaging : the official publication of the International Cancer Imaging Society* **13**, 26-35 (2013).
28. Kato, I., *et al.* Identification of hepatic niche harboring human acute lymphoblastic leukemic cells via the SDF-1/CXCR4 axis. *PLoS One* **6**, e27042 (2011).
29. Luesink, M. & Jansen, J.H. Advances in understanding the pulmonary infiltration in acute promyelocytic leukaemia. *British journal of haematology* **151**, 209-220 (2010).
30. Pui, C.H. & Howard, S.C. Current management and challenges of malignant disease in the CNS in paediatric leukaemia. *The lancet oncology* **9**, 257-268 (2008).
31. Askmyr, M., Quach, J. & Purton, L.E. Effects of the bone marrow microenvironment on hematopoietic malignancy. *Bone* **48**, 115-120 (2011).
32. Konopleva, M.Y. & Jordan, C.T. Leukemia stem cells and microenvironment: biology and therapeutic targeting. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **29**, 591-599 (2011).
33. Morrison, S.J. & Scadden, D.T. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature* **505**, 327-334 (2014).
34. Carlesso, N. & Cardoso, A.A. Stem cell regulatory niches and their role in normal and malignant hematopoiesis. *Current opinion in hematology* **17**, 281-286 (2010).
35. Ding, L., Saunders, T.L., Enikolopov, G. & Morrison, S.J. Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature* **481**, 457-U465 (2012).
36. Tokoyoda, K., Hauser, A.E., Nakayama, T. & Radbruch, A. Organization of immunological memory by bone marrow stroma. *Nature reviews. Immunology* **10**, 193-200 (2010).
37. Krause, D.S., Scadden, D.T. & Pfeffer, F.I. The hematopoietic stem cell niche--home for friend and foe? *Cytometry. Part B, Clinical cytometry* **84**, 7-20 (2013).
38. Dazzi, F., Ramasamy, R., Glennie, S., Jones, S.P. & Roberts, I. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood reviews* **20**, 161-171 (2006).

39. Wagner, W., Saffrich, R. & Ho, A.D. The Stromal Activity of Mesenchymal Stromal Cells. *Transfusion medicine and hemotherapy : offzielles Organ der Deutschen Gesellschaft fur Transfusionsmedizin und Immunhamatologie* **35**, 185-193 (2008).
40. Jing, D., *et al.* Hematopoietic stem cells in co-culture with mesenchymal stromal cells-- modeling the niche compartments in vitro. *Haematologica* **95**, 542-550 (2010).
41. Houthuijzen, J.M., Daenen, L.G., Roodhart, J.M. & Voest, E.E. The role of mesenchymal stem cells in anti-cancer drug resistance and tumour progression. *Br J Cancer* **106**, 1901-1906 (2012).
42. Wong, R.S. & Cheong, S.K. Role of mesenchymal stem cells in leukaemia: Dr. Jekyll or Mr. Hyde? *Clinical and experimental medicine* (2013).
43. Barcellos-de-Souza, P., Gori, V., Bambi, F. & Chiarugi, P. Tumor microenvironment: Bone marrow-mesenchymal stem cells as key players. *Biochim Biophys Acta* **1836**, 321-335.
44. He, H., *et al.* Promotion of hepatic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells on decellularized cell-deposited extracellular matrix. *BioMed research international* **2013**, 406871 (2013).
45. Nilsson, S.K., *et al.* Immunofluorescence characterization of key extracellular matrix proteins in murine bone marrow in situ. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* **46**, 371-377 (1998).
46. Clark, B.R. & Keating, A. Biology of bone marrow stroma. *Ann N Y Acad Sci* **770**, 70-78 (1995).
47. Alachkar, H., *et al.* SPARC promotes leukemic cell growth and predicts acute myeloid leukemia outcome. *The Journal of clinical investigation* **124**, 1512-1524 (2014).
48. Shoulders, M.D. & Raines, R.T. Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem* **78**, 929-958 (2009).
49. Sottile, J., *et al.* Fibronectin-dependent collagen I deposition modulates the cell response to fibronectin. *American journal of physiology. Cell physiology* **293**, C1934-1946 (2007).
50. Chen, Y., Bal, B.S. & Gorski, J.P. Calcium and collagen binding properties of osteopontin, bone sialoprotein, and bone acidic glycoprotein-75 from bone. *The Journal of biological chemistry* **267**, 24871-24878 (1992).
51. Boyerinas, B., *et al.* Adhesion to osteopontin in the bone marrow niche regulates lymphoblastic leukemia cell dormancy. *Blood* **121**, 4821-4831 (2013).
52. Sangaletti, S., *et al.* Defective stromal remodeling and neutrophil extracellular traps in lymphoid tissues favor the transition from autoimmunity to lymphoma. *Cancer discovery* **4**, 110-129 (2014).
53. Klein, G., Vellenga, E., Fraaije, M.W., Kamps, W.A. & de Bont, E.S. The possible role of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in cancer, e.g. acute leukemia. *Critical reviews in oncology/hematology* **50**, 87-100 (2004).
54. Vacca, A., *et al.* Proteolytic activity of human lymphoid tumor cells. Correlation with tumor progression. *Developmental immunology* **7**, 77-88 (2000).
55. Yu, X.F. & Han, Z.C. Matrix metalloproteinases in bone marrow: roles of gelatinases in physiological hematopoiesis and hematopoietic malignancies. *Histology and histopathology* **21**, 519-531 (2006).
56. Prickett, T.C., Lyver, A., Wilson, R., Espiner, E.A. & Sullivan, M.J. C-type Natriuretic Peptide: a novel biomarker of steroid induced bone toxicity in children with acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Peptides* **36**, 54-59 (2012).
57. Crofton, P.M., *et al.* Effects of intensive chemotherapy on bone and collagen turnover and the growth hormone axis in children with acute lymphoblastic leukemia. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **83**, 3121-3129 (1998).
58. Lund, T., Abildgaard, N., Andersen, T.L., Delaisse, J.M. & Plesner, T. Multiple myeloma: changes in serum C-terminal telopeptide of collagen type I and bone-specific alkaline

- phosphatase can be used in daily practice to detect imminent osteolysis. *European journal of haematology* **84**, 412-420 (2010).
59. Gui, L., Wojciechowski, K., Gildner, C.D., Nedelkowska, H. & Hocking, D.C. Identification of the heparin-binding determinants within fibronectin repeat III1: role in cell spreading and growth. *The Journal of biological chemistry* **281**, 34816-34825 (2006).
 60. Van der Velde-Zimmermann, D., *et al.* Fibronectin distribution in human bone marrow stroma: matrix assembly and tumor cell adhesion via alpha5 beta1 integrin. *Experimental cell research* **230**, 111-120 (1997).
 61. Basak, P., *et al.* Phenotypic alteration of bone marrow HSC and microenvironmental association in experimentally induced leukemia. *Current stem cell research & therapy* **5**, 379-386 (2010).
 62. Duhrsen, U. & Hossfeld, D.K. Stromal abnormalities in neoplastic bone marrow diseases. *Annals of hematology* **73**, 53-70 (1996).
 63. Saki, N., Abroun, S., Farshdousti Hagh, M. & Asgharei, F. Neoplastic bone marrow niche: hematopoietic and mesenchymal stem cells. *Cell journal* **13**, 131-136 (2011).
 64. Verfaillie, C., Hurley, R., Bhatia, R. & McCarthy, J.B. Role of bone marrow matrix in normal and abnormal hematopoiesis. *Critical reviews in oncology/hematology* **16**, 201-224 (1994).
 65. Dilly, S.A. & Jagger, C.J. Bone marrow stromal cell changes in haematological malignancies. *Journal of clinical pathology* **43**, 942-946 (1990).
 66. Schepers, K., *et al.* Myeloproliferative neoplasia remodels the endosteal bone marrow niche into a self-reinforcing leukemic niche. *Cell stem cell* **13**, 285-299 (2013).
 67. Tripodo, C., *et al.* Stromal SPARC contributes to the detrimental fibrotic changes associated with myeloproliferation whereas its deficiency favors myeloid cell expansion. *Blood* **120**, 3541-3554 (2012).
 68. Mailloux, A.W., *et al.* Fibrosis and subsequent cytopenias are associated with basic fibroblast growth factor-deficient pluripotent mesenchymal stromal cells in large granular lymphocyte leukemia. *Journal of immunology* **191**, 3578-3593 (2013).
 69. Tancred, T.M., Belch, A.R., Reiman, T., Pilarski, L.M. & Kirshner, J. Altered expression of fibronectin and collagens I and IV in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* **57**, 239-247 (2009).
 70. Lin, T.L. & Levy, M.Y. Acute myeloid leukemia: focus on novel therapeutic strategies. *Clinical Medicine Insights. Oncology* **6**, 205-217 (2012).
 71. Peloquin, G.L., Chen, Y.B. & Fathi, A.T. The evolving landscape in the therapy of acute myeloid leukemia. *Protein & cell* **4**, 735-746 (2013).
 72. Lindauer, M. & Hochhaus, A. Dasatinib. *Recent results in cancer research. Fortschritte der Krebsforschung. Progres dans les recherches sur le cancer* **201**, 27-65 (2014).
 73. Bhojwani, D. & Pui, C.H. Relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. *The lancet oncology* **14**, e205-217 (2013).
 74. Kanate, A.S., Pasquini, M.C., Hari, P.N. & Hamadani, M. Allogeneic hematopoietic cell transplant for acute myeloid leukemia: Current state in 2013 and future directions. *World journal of stem cells* **6**, 69-81 (2014).
 75. Kubal, T. & Lancet, J.E. The thorny issue of relapsed acute myeloid leukemia. *Current opinion in hematology* **20**, 100-106 (2013).
 76. Bhatla, T., *et al.* The Biology of Relapsed Acute Lymphoblastic Leukemia: Opportunities for Therapeutic Interventions. *Journal of pediatric hematology/oncology* (2014).
 77. Patel, C., *et al.* Multidrug resistance in relapsed acute myeloid leukemia: evidence of biological heterogeneity. *Cancer* **119**, 3076-3083 (2013).
 78. Dimov, N.D., Medeiros, L.J., Ravandi, F. & Bueso-Ramos, C.E. Acute promyelocytic leukemia at time of relapse commonly demonstrates cytogenetic evidence of clonal

- evolution and variability in blast immunophenotypic features. *American journal of clinical pathology* **133**, 484-490 (2010).
79. Lane, S.W., Scadden, D.T. & Gilliland, D.G. The leukemic stem cell niche: current concepts and therapeutic opportunities. *Blood* **114**, 1150-1157 (2009).
 80. La Starza, R., *et al.* Linking genomic lesions with minimal residual disease improves prognostic stratification in children with T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia research* **37**, 928-935 (2013).
 81. Gaynon, P.S., *et al.* Survival after relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia: impact of site and time to first relapse--the Children's Cancer Group Experience. *Cancer* **82**, 1387-1395 (1998).
 82. Hourigan, C.S. & Karp, J.E. Minimal residual disease in acute myeloid leukaemia. *Nature reviews. Clinical oncology* **10**, 460-471 (2013).
 83. Ishikawa, F., *et al.* Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region. *Nature biotechnology* **25**, 1315-1321 (2007).
 84. Wu, Z., *et al.* Clustered immature myeloid precursors in intertrabecular region during remission evolve from leukemia stem cell near endosteum and contribute to disease relapse in acute myeloid leukemia. *Medical hypotheses* **80**, 624-628 (2013).
 85. Maffei, R., *et al.* Physical contact with endothelial cells through beta1- and beta2- integrins rescues chronic lymphocytic leukemia cells from spontaneous and drug-induced apoptosis and induces a peculiar gene expression profile in leukemic cells. *Haematologica* **97**, 952-960 (2012).
 86. Ninomiya, M., *et al.* Homing, proliferation and survival sites of human leukemia cells in vivo in immunodeficient mice. *Leukemia* **21**, 136-142 (2007).
 87. Hanahan, D. & Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674 (2011).
 88. van Stijn, A., *et al.* Minimal residual disease in acute myeloid leukemia is predicted by an apoptosis-resistant protein profile at diagnosis. *Clin Cancer Res* **11**, 2540-2546 (2005).
 89. Maha, A., Cheong, S.K., Leong, C.F. & Seow, H.F. Molecular responses during chemotherapy in acute myeloid leukemias in predicting poor-response to standard chemotherapy. *The Malaysian journal of pathology* **31**, 81-91 (2009).
 90. Marston, E., *et al.* Stratification of pediatric ALL by in vitro cellular responses to DNA double-strand breaks provides insight into the molecular mechanisms underlying clinical response. *Blood* **113**, 117-126 (2009).
 91. Meads, M.B., Gatenby, R.A. & Dalton, W.S. Environment-mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease. *Nature reviews. Cancer* **9**, 665-674 (2009).
 92. Fulda, S. & Debatin, K.M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* **25**, 4798-4811 (2006).
 93. Fulda, S. Therapeutic opportunities for counteracting apoptosis resistance in childhood leukaemia. *British journal of haematology* **145**, 441-454 (2009).
 94. Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology* **35**, 495-516 (2007).
 95. Fulda, S. Targeting apoptosis for anticancer therapy. *Seminars in cancer biology* (2014).
 96. de Bruin, E.C. & Medema, J.P. Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response. *Cancer treatment reviews* **34**, 737-749 (2008).
 97. Herr, I. & Debatin, K.M. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood* **98**, 2603-2614 (2001).
 98. Kim, R. Recent advances in understanding the cell death pathways activated by anticancer therapy. *Cancer* **103**, 1551-1560 (2005).
 99. Sarosiek, K.A., Ni Chonghaile, T. & Letai, A. Mitochondria: gatekeepers of response to chemotherapy. *Trends in cell biology* **23**, 612-619 (2013).

100. Pop, C., Timmer, J., Sperandio, S. & Salvesen, G.S. The apoptosome activates caspase-9 by dimerization. *Molecular cell* **22**, 269-275 (2006).
101. Martinez-Ruiz, G., Maldonado, V., Ceballos-Cancino, G., Grajeda, J.P. & Melendez-Zajgla, J. Role of Smac/DIABLO in cancer progression. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* **27**, 48 (2008).
102. Natarajan, S.K. & Becker, D.F. Role of apoptosis-inducing factor, proline dehydrogenase, and NADPH oxidase in apoptosis and oxidative stress. *Cell health and cytoskeleton* **2012**, 11-27 (2012).
103. Lipton, S.A. & Bossy-Wetzell, E. Dueling activities of AIF in cell death versus survival: DNA binding and redox activity. *Cell* **111**, 147-150 (2002).
104. Kook, S., *et al.* Caspase-cleaved arrestin-2 and BID cooperatively facilitate cytochrome C release and cell death. *Cell death and differentiation* **21**, 172-184 (2014).
105. Robertson, J.D., *et al.* Processed caspase-2 can induce mitochondria-mediated apoptosis independently of its enzymatic activity. *EMBO reports* **5**, 643-648 (2004).
106. Kumar, S. Caspase 2 in apoptosis, the DNA damage response and tumour suppression: enigma no more? *Nature reviews. Cancer* **9**, 897-903 (2009).
107. Fava, L.L., Bock, F.J., Geley, S. & Villunger, A. Caspase-2 at a glance. *Journal of cell science* **125**, 5911-5915 (2012).
108. Lassus, P., Opitz-Araya, X. & Lazebnik, Y. Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization. *Science* **297**, 1352-1354 (2002).
109. Janssens, S. & Tinel, A. The PIDDosome, DNA-damage-induced apoptosis and beyond. *Cell death and differentiation* **19**, 13-20 (2012).
110. Greenstein, S., Ghias, K., Krett, N.L. & Rosen, S.T. Mechanisms of glucocorticoid-mediated apoptosis in hematological malignancies. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **8**, 1681-1694 (2002).
111. Fulda, S. Targeting apoptosis signaling pathways for anticancer therapy. *Frontiers in oncology* **1**, 23 (2011).
112. Roos, W.P. & Kaina, B. DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer letters* **332**, 237-248 (2013).
113. Moldoveanu, T., Follis, A.V., Kriwacki, R.W. & Green, D.R. Many players in BCL-2 family affairs. *Trends in biochemical sciences* **39**, 101-111 (2014).
114. Bender, T. & Martinou, J.C. Where killers meet--permeabilization of the outer mitochondrial membrane during apoptosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**, a011106 (2013).
115. Shamas-Din, A., Kale, J., Leber, B. & Andrews, D.W. Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **5**, a008714 (2013).
116. Giam, M., Huang, D.C. & Bouillet, P. BH3-only proteins and their roles in programmed cell death. *Oncogene* **27 Suppl 1**, S128-136 (2008).
117. Anvekar, R.A., Ascioia, J.J., Missert, D.J. & Chipuk, J.E. Born to be alive: a role for the BCL-2 family in melanoma tumor cell survival, apoptosis, and treatment. *Frontiers in oncology* **1**(2011).
118. Alves, N.L., van Lier, R.A. & Eldering, E. Withdrawal symptoms on display: Bcl-2 members under investigation. *Trends Immunol* **28**, 26-32 (2007).
119. Letai, A. Growth factor withdrawal and apoptosis: the middle game. *Mol Cell* **21**, 728-730 (2006).
120. Zinkel, S., Gross, A. & Yang, E. BCL2 family in DNA damage and cell cycle control. *Cell death and differentiation* **13**, 1351-1359 (2006).
121. Letai, A.G. Diagnosing and exploiting cancer's addiction to blocks in apoptosis. *Nature reviews. Cancer* **8**, 121-132 (2008).

122. Czabotar, P.E., Lessene, G., Strasser, A. & Adams, J.M. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature reviews. Molecular cell biology* **15**, 49-63 (2014).
123. Mazumder, S., Choudhary, G.S., Al-Harbi, S. & Almasan, A. Mcl-1 Phosphorylation defines ABT-737 resistance that can be overcome by increased NOXA expression in leukemic B cells. *Cancer research* **72**, 3069-3079 (2012).
124. Autret, A. & Martin, S.J. Emerging role for members of the Bcl-2 family in mitochondrial morphogenesis. *Molecular cell* **36**, 355-363 (2009).
125. Perciavalle, R.M., *et al.* Anti-apoptotic MCL-1 localizes to the mitochondrial matrix and couples mitochondrial fusion to respiration. *Nature cell biology* **14**, 575-583 (2012).
126. Akl, H., *et al.* A dual role for the anti-apoptotic Bcl-2 protein in cancer: Mitochondria versus endoplasmic reticulum. *Biochimica et biophysica acta* (2014).
127. Tantral, L., *et al.* Intracellular calcium release is required for caspase-3 and -9 activation. *Cell biochemistry and function* **22**, 35-40 (2004).
128. Jamil, S., Stoica, C., Hackett, T.L. & Duronio, V. MCL-1 localizes to sites of DNA damage and regulates DNA damage response. *Cell cycle* **9**, 2843-2855 (2010).
129. Dutta, C., *et al.* BCL2 suppresses PARP1 function and nonapoptotic cell death. *Cancer research* **72**, 4193-4203 (2012).
130. Deng, X., Gao, F., Flagg, T., Anderson, J. & May, W.S. Bcl2's flexible loop domain regulates p53 binding and survival. *Molecular and cellular biology* **26**, 4421-4434 (2006).
131. Wang, J., Beauchemin, M. & Bertrand, R. Phospho-Bcl-x(L)(Ser62) plays a key role at DNA damage-induced G(2) checkpoint. *Cell cycle* **11**, 2159-2169 (2012).
132. Koehler, B.C., *et al.* Beyond cell death - antiapoptotic Bcl-2 proteins regulate migration and invasion of colorectal cancer cells in vitro. *PloS one* **8**, e76446 (2013).
133. Hardwick, J.M. & Soane, L. Multiple functions of BCL-2 family proteins. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **5**(2013).
134. Fernald, K. & Kurokawa, M. Evading apoptosis in cancer. *Trends in cell biology* **23**, 620-633 (2013).
135. Hemann, M.T. & Lowe, S.W. The p53-Bcl-2 connection. *Cell death and differentiation* **13**, 1256-1259 (2006).
136. Zhang, X., Tang, N., Hadden, T.J. & Rishi, A.K. Akt, FoxO and regulation of apoptosis. *Biochimica et biophysica acta* **1813**, 1978-1986 (2011).
137. Ishimaru, D., *et al.* Mechanism of regulation of bcl-2 mRNA by nucleolin and A+U-rich element-binding factor 1 (AUF1). *The Journal of biological chemistry* **285**, 27182-27191 (2010).
138. Garzon, R., *et al.* MicroRNA 29b functions in acute myeloid leukemia. *Blood* **114**, 5331-5341 (2009).
139. Mott, J.L., Kobayashi, S., Bronk, S.F. & Gores, G.J. mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis. *Oncogene* **26**, 6133-6140 (2007).
140. Inomata, M., *et al.* MicroRNA-17-92 down-regulates expression of distinct targets in different B-cell lymphoma subtypes. *Blood* **113**, 396-402 (2009).
141. Domina, A.M., Vrana, J.A., Gregory, M.A., Hann, S.R. & Craig, R.W. MCL1 is phosphorylated in the PEST region and stabilized upon ERK activation in viable cells, and at additional sites with cytotoxic okadaic acid or taxol. *Oncogene* **23**, 5301-5315 (2004).
142. Luciano, F., *et al.* Phosphorylation of Bim-EL by Erk1/2 on serine 69 promotes its degradation via the proteasome pathway and regulates its proapoptotic function. *Oncogene* **22**, 6785-6793 (2003).
143. Gao, Z., Shao, Y. & Jiang, X. Essential roles of the Bcl-2 family of proteins in caspase-2-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry* **280**, 38271-38275 (2005).
144. Li, H., Zhu, H., Xu, C.J. & Yuan, J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**, 491-501 (1998).

145. Clohessy, J.G., Zhuang, J. & Brady, H.J. Characterisation of Mcl-1 cleavage during apoptosis of haematopoietic cells. *British journal of haematology* **125**, 655-665 (2004).
146. Fan, F., *et al.* Targeting Mcl-1 for multiple myeloma (MM) therapy: drug-induced generation of Mcl-1 fragment Mcl-1(128-350) triggers MM cell death via c-Jun upregulation. *Cancer letters* **343**, 286-294 (2014).
147. Ozoren, N. & El-Deiry, W.S. Defining characteristics of Types I and II apoptotic cells in response to TRAIL. *Neoplasia* **4**, 551-557 (2002).
148. Tafani, M., Karpinich, N.O., Serroni, A., Russo, M.A. & Farber, J.L. Re-evaluation of the distinction between type I and type II cells: the necessary role of the mitochondria in both the extrinsic and intrinsic signaling pathways upon Fas receptor activation. *Journal of cellular physiology* **208**, 556-565 (2006).
149. Schug, Z.T., Gonzalvez, F., Houtkooper, R.H., Vaz, F.M. & Gottlieb, E. BID is cleaved by caspase-8 within a native complex on the mitochondrial membrane. *Cell death and differentiation* **18**, 538-548 (2011).
150. Han, J., Goldstein, L.A., Gastman, B.R. & Rabinowich, H. Interrelated roles for Mcl-1 and BIM in regulation of TRAIL-mediated mitochondrial apoptosis. *The Journal of biological chemistry* **281**, 10153-10163 (2006).
151. Sprick, M.R. & Walczak, H. The interplay between the Bcl-2 family and death receptor-mediated apoptosis. *Biochimica et biophysica acta* **1644**, 125-132 (2004).
152. Chang, D.W., *et al.* c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. *The EMBO journal* **21**, 3704-3714 (2002).
153. Lavrik, I.N. & Krammer, P.H. Regulation of CD95/Fas signaling at the DISC. *Cell death and differentiation* **19**, 36-41 (2012).
154. Parrish, A.B., Freel, C.D. & Kornbluth, S. Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **5**(2013).
155. Taylor, R.C., Cullen, S.P. & Martin, S.J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature reviews. Molecular cell biology* **9**, 231-241 (2008).
156. Widmann, C., Gibson, S. & Johnson, G.L. Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis. A turn-off mechanism for anti-apoptotic signals. *The Journal of biological chemistry* **273**, 7141-7147 (1998).
157. Lopez-Royuela, N., *et al.* Different contribution of BH3-only proteins and caspases to doxorubicin-induced apoptosis in p53-deficient leukemia cells. *Biochemical pharmacology* **79**, 1746-1758 (2010).
158. Takahashi, R., *et al.* A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. *The Journal of biological chemistry* **273**, 7787-7790 (1998).
159. Holcik, M., Lefebvre, C., Yeh, C., Chow, T. & Korneluk, R.G. A new internal-ribosome-entry-site motif potentiates XIAP-mediated cytoprotection. *Nature cell biology* **1**, 190-192 (1999).
160. Mita, A.C., Mita, M.M., Nawrocki, S.T. & Giles, F.J. Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **14**, 5000-5005 (2008).
161. Altieri, D.C. Survivin and IAP proteins in cell-death mechanisms. *The Biochemical journal* **430**, 199-205 (2010).
162. Dohi, T., *et al.* An IAP-IAP complex inhibits apoptosis. *The Journal of biological chemistry* **279**, 34087-34090 (2004).
163. Peter, M.E. Programmed cell death: Apoptosis meets necrosis. *Nature* **471**, 310-312 (2011).
164. Mathiasen, I.S. & Jaattela, M. Triggering caspase-independent cell death to combat cancer. *Trends in molecular medicine* **8**, 212-220 (2002).
165. Kim, R., Emi, M. & Tanabe, K. Caspase-dependent and -independent cell death pathways after DNA damage (Review). *Oncology reports* **14**, 595-599 (2005).

166. Jain, M.V., *et al.* Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: implications for cancer therapy development. *Journal of cellular and molecular medicine* **17**, 12-29 (2013).
167. Chen, S., *et al.* Regulation of Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand Expression in Primary Acute Leukemic Cells by Chemotherapeutics. *Turkish journal of haematology : official journal of Turkish Society of Haematology* **30**, 263-268 (2013).
168. Ehrhardt, H., Wachter, F., Maurer, M., Stahnke, K. & Jeremias, I. Important role of caspase-8 for chemosensitivity of ALL cells. *Clin Cancer Res* **17**, 7605-7613 (2011).
169. Fulda, S., Strauss, G., Meyer, E. & Debatin, K.M. Functional CD95 ligand and CD95 death-inducing signaling complex in activation-induced cell death and doxorubicin-induced apoptosis in leukemic T cells. *Blood* **95**, 301-308 (2000).
170. Lam, V., Findley, H.W., Reed, J.C., Freedman, M.H. & Goldenberg, G.J. Comparison of DR5 and Fas expression levels relative to the chemosensitivity of acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Leukemia research* **26**, 503-513 (2002).
171. McGahon, A.J., Costa Pereira, A.P., Daly, L. & Cotter, T.G. Chemotherapeutic drug-induced apoptosis in human leukaemic cells is independent of the Fas (APO-1/CD95) receptor/ligand system. *British journal of haematology* **101**, 539-547 (1998).
172. Kontos, C.K., Christodoulou, M.I. & Scorilas, A. Apoptosis-related BCL2-family members: Key players in chemotherapy. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry* **14**, 353-374 (2014).
173. Sarosiek, K.A., *et al.* BID preferentially activates BAK while BIM preferentially activates BAX, affecting chemotherapy response. *Molecular cell* **51**, 751-765 (2013).
174. Pritchard, J.R., *et al.* Bcl-2 family genetic profiling reveals microenvironment-specific determinants of chemotherapeutic response. *Cancer research* **71**, 5850-5858 (2011).
175. Akiyama, T., Dass, C.R. & Choong, P.F. Bim-targeted cancer therapy: a link between drug action and underlying molecular changes. *Molecular cancer therapeutics* **8**, 3173-3180 (2009).
176. Yu, J. & Zhang, L. PUMA, a potent killer with or without p53. *Oncogene* **27 Suppl 1**, S71-83 (2008).
177. Perez-Galan, P., *et al.* The proteasome inhibitor bortezomib induces apoptosis in mantle-cell lymphoma through generation of ROS and Noxa activation independent of p53 status. *Blood* **107**, 257-264 (2006).
178. Ploner, C., Kofler, R. & Villunger, A. Noxa: at the tip of the balance between life and death. *Oncogene* **27 Suppl 1**, S84-92 (2008).
179. Kitada, S., Zapata, J.M., Andreeff, M. & Reed, J.C. Protein kinase inhibitors flavopiridol and 7-hydroxy-staurosporine down-regulate antiapoptosis proteins in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **96**, 393-397 (2000).
180. Ehrhardt, H., *et al.* NOXA as critical mediator for drug combinations in polychemotherapy. *Cell death & disease* **3**, e327 (2012).
181. Roos, W.P. & Kaina, B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends in molecular medicine* **12**, 440-450 (2006).
182. Hosoya, N. & Miyagawa, K. Targeting DNA damage response in cancer therapy. *Cancer science* **105**, 370-388 (2014).
183. Wei, F., Yan, J. & Tang, D. Extracellular signal-regulated kinases modulate DNA damage response - a contributing factor to using MEK inhibitors in cancer therapy. *Current medicinal chemistry* **18**, 5476-5482 (2011).
184. Shen, C., *et al.* Regulation of FANCD2 by the mTOR pathway contributes to the resistance of cancer cells to DNA double-strand breaks. *Cancer research* **73**, 3393-3401 (2013).
185. Dai, Y., *et al.* Interruption of the Ras/MEK/ERK signaling cascade enhances Chk1 inhibitor-induced DNA damage in vitro and in vivo in human multiple myeloma cells. *Blood* **112**, 2439-2449 (2008).

186. Helbig, L., *et al.* Late activation of stress-activated protein kinases/c-Jun N-terminal kinases triggered by cisplatin-induced DNA damage in repair-defective cells. *The Journal of biological chemistry* **286**, 12991-13001 (2011).
187. Picco, V. & Pages, G. Linking JNK Activity to the DNA Damage Response. *Genes & cancer* **4**, 360-368 (2013).
188. Fan, M. & Chambers, T.C. Role of mitogen-activated protein kinases in the response of tumor cells to chemotherapy. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* **4**, 253-267 (2001).
189. Munshi, A. & Ramesh, R. Mitogen-activated protein kinases and their role in radiation response. *Genes & cancer* **4**, 401-408 (2013).
190. Sui, X., *et al.* p38 and JNK MAPK pathways control the balance of apoptosis and autophagy in response to chemotherapeutic agents. *Cancer letters* **344**, 174-179 (2014).
191. Mhaidat, N.M., Zhang, X.D., Jiang, C.C. & Hersey, P. Docetaxel-induced apoptosis of human melanoma is mediated by activation of c-Jun NH2-terminal kinase and inhibited by the mitogen-activated protein kinase extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **13**, 1308-1314 (2007).
192. Muscarella, D.E. & Bloom, S.E. The contribution of c-Jun N-terminal kinase activation and subsequent Bcl-2 phosphorylation to apoptosis induction in human B-cells is dependent on the mode of action of specific stresses. *Toxicology and applied pharmacology* **228**, 93-104 (2008).
193. Kolomeichuk, S.N., Terrano, D.T., Lyle, C.S., Sabapathy, K. & Chambers, T.C. Distinct signaling pathways of microtubule inhibitors--vinblastine and Taxol induce JNK-dependent cell death but through AP-1-dependent and AP-1-independent mechanisms, respectively. *The FEBS journal* **275**, 1889-1899 (2008).
194. Vasilevskaya, I. & O'Dwyer, P.J. Role of Jun and Jun kinase in resistance of cancer cells to therapy. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* **6**, 147-156 (2003).
195. Dhanasekaran, D.N. & Reddy, E.P. JNK signaling in apoptosis. *Oncogene* **27**, 6245-6251 (2008).
196. Chen, Z., *et al.* ASK1 mediates apoptotic cell death induced by genotoxic stress. *Oncogene* **18**, 173-180 (1999).
197. Sanchez-Perez, I., Murguia, J.R. & Perona, R. Cisplatin induces a persistent activation of JNK that is related to cell death. *Oncogene* **16**, 533-540 (1998).
198. Krause, D., Lyons, A., Fennelly, C. & O'Connor, R. Transient activation of Jun N-terminal kinases and protection from apoptosis by the insulin-like growth factor I receptor can be suppressed by dicumarol. *The Journal of biological chemistry* **276**, 19244-19252 (2001).
199. Chen, Y.R., Wang, X., Templeton, D., Davis, R.J. & Tan, T.H. The role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in apoptosis induced by ultraviolet C and gamma radiation. Duration of JNK activation may determine cell death and proliferation. *The Journal of biological chemistry* **271**, 31929-31936 (1996).
200. Panaretakis, T., *et al.* Doxorubicin requires the sequential activation of caspase-2, protein kinase Cdelta, and c-Jun NH2-terminal kinase to induce apoptosis. *Molecular biology of the cell* **16**, 3821-3831 (2005).
201. Penna, F., *et al.* Caspase 2 activation and ER stress drive rapid Jurkat cell apoptosis by clofibrate. *PloS one* **7**, e45327 (2012).
202. Wang, Z., Wang, M., Kar, S. & Carr, B.I. Involvement of ATM-mediated Chk1/2 and JNK kinase signaling activation in HKH40A-induced cell growth inhibition. *Journal of cellular physiology* **221**, 213-220 (2009).
203. Lawson, C.D. & Burrige, K. The on-off relationship of Rho and Rac during integrin-mediated adhesion and cell migration. *Small GTPases* **5**(2014).

204. Fritz, G. & Kaina, B. Rac1 GTPase, a multifunctional player in the regulation of genotoxic stress response. *Cell cycle* **12**, 2521-2522 (2013).
205. Huelsenbeck, S.C., *et al.* Rac1 protein signaling is required for DNA damage response stimulated by topoisomerase II poisons. *The Journal of biological chemistry* **287**, 38590-38599 (2012).
206. Zhu, Y., Casey, P.J., Kumar, A.P. & Pervaiz, S. Deciphering the signaling networks underlying simvastatin-induced apoptosis in human cancer cells: evidence for non-canonical activation of RhoA and Rac1 GTPases. *Cell death & disease* **4**, e568 (2013).
207. Ramaswamy, M., *et al.* Cutting edge: Rac GTPases sensitize activated T cells to die via Fas. *Journal of immunology* **179**, 6384-6388 (2007).
208. Ma, J., *et al.* Rac1 signalling mediates doxorubicin-induced cardiotoxicity through both reactive oxygen species-dependent and -independent pathways. *Cardiovascular research* **97**, 77-87 (2013).
209. Miyano, K., Ueno, N., Takeya, R. & Sumimoto, H. Direct involvement of the small GTPase Rac in activation of the superoxide-producing NADPH oxidase Nox1. *The Journal of biological chemistry* **281**, 21857-21868 (2006).
210. Jiang, F., Zhang, Y. & Dusting, G.J. NADPH oxidase-mediated redox signaling: roles in cellular stress response, stress tolerance, and tissue repair. *Pharmacological reviews* **63**, 218-242 (2011).
211. Mansat-de Mas, V., *et al.* Implication of radical oxygen species in ceramide generation, c-Jun N-terminal kinase activation and apoptosis induced by daunorubicin. *Molecular pharmacology* **56**, 867-874 (1999).
212. Wilson, D.J., *et al.* JNK, but not MAPK, activation is associated with Fas-mediated apoptosis in human T cells. *European journal of immunology* **26**, 989-994 (1996).
213. Tournier, C., *et al.* Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science* **288**, 870-874 (2000).
214. Zhu, B.K., *et al.* Activation of Jun N-terminal kinase is a mediator of vincristine-induced apoptosis of melanoma cells. *Anti-cancer drugs* **19**, 189-200 (2008).
215. Jones, E.V., Dickman, M.J. & Whitmarsh, A.J. Regulation of p73-mediated apoptosis by c-Jun N-terminal kinase. *The Biochemical journal* **405**, 617-623 (2007).
216. Oleinik, N.V., Krupenko, N.I. & Krupenko, S.A. Cooperation between JNK1 and JNK2 in activation of p53 apoptotic pathway. *Oncogene* **26**, 7222-7230 (2007).
217. Lei, K. & Davis, R.J. JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 2432-2437 (2003).
218. Donovan, N., Becker, E.B., Konishi, Y. & Bonni, A. JNK phosphorylation and activation of BAD couples the stress-activated signaling pathway to the cell death machinery. *The Journal of biological chemistry* **277**, 40944-40949 (2002).
219. Deng, Y., Ren, X., Yang, L., Lin, Y. & Wu, X. A JNK-dependent pathway is required for TNFalpha-induced apoptosis. *Cell* **115**, 61-70 (2003).
220. Thomas, L.W., Lam, C. & Edwards, S.W. Mcl-1; the molecular regulation of protein function. *FEBS letters* **584**, 2981-2989 (2010).
221. Inoshita, S., *et al.* Phosphorylation and inactivation of myeloid cell leukemia 1 by JNK in response to oxidative stress. *The Journal of biological chemistry* **277**, 43730-43734 (2002).
222. Morel, C., Carlson, S.M., White, F.M. & Davis, R.J. Mcl-1 integrates the opposing actions of signaling pathways that mediate survival and apoptosis. *Molecular and cellular biology* **29**, 3845-3852 (2009).
223. Holohan, C., Van Schaeybroeck, S., Longley, D.B. & Johnston, P.G. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nature reviews. Cancer* **13**, 714-726 (2013).
224. Testa, U. & Riccioni, R. Dereglulation of apoptosis in acute myeloid leukemia. *Haematologica* **92**, 81-94 (2007).

225. Xia, C.Q. & Smith, P.G. Drug efflux transporters and multidrug resistance in acute leukemia: therapeutic impact and novel approaches to mediation. *Molecular pharmacology* **82**, 1008-1021 (2012).
226. Bourquin, J.P. & Izraeli, S. Where can biology of childhood ALL be attacked by new compounds? *Cancer Treat Rev* **36**, 298-306 (2010).
227. Morishita, N., *et al.* Activation of Akt is associated with poor prognosis and chemotherapeutic resistance in pediatric B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric blood & cancer* **59**, 83-89 (2012).
228. Cleaver, A.L., *et al.* Gene-based outcome prediction in multiple cohorts of pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *Molecular cancer* **9**, 105 (2010).
229. Kornblau, S.M., *et al.* Simultaneous activation of multiple signal transduction pathways confers poor prognosis in acute myelogenous leukemia. *Blood* **108**, 2358-2365 (2006).
230. Recher, C., *et al.* Expression of focal adhesion kinase in acute myeloid leukemia is associated with enhanced blast migration, increased cellularity, and poor prognosis. *Cancer research* **64**, 3191-3197 (2004).
231. Bressanin, D., *et al.* Harnessing the PI3K/Akt/mTOR pathway in T-cell acute lymphoblastic leukemia: eliminating activity by targeting at different levels. *Oncotarget* **3**, 811-823 (2012).
232. Piovan, E., *et al.* Direct reversal of glucocorticoid resistance by AKT inhibition in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer cell* **24**, 766-776 (2013).
233. Lonetti, A., *et al.* Activity of the pan-class I phosphoinositide 3-kinase inhibitor NVP-BKM120 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* (2013).
234. Juin, P., Geneste, O., Gautier, F., Depil, S. & Campone, M. Decoding and unlocking the BCL-2 dependency of cancer cells. *Nature reviews. Cancer* **13**, 455-465 (2013).
235. Gottesman, M.M., Fojo, T. & Bates, S.E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nature reviews. Cancer* **2**, 48-58 (2002).
236. Vazquez, A., Bond, E.E., Levine, A.J. & Bond, G.L. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nature reviews. Drug discovery* **7**, 979-987 (2008).
237. Chiaretti, S., *et al.* TP53 mutations are frequent in adult acute lymphoblastic leukemia cases negative for recurrent fusion genes and correlate with poor response to induction therapy. *Haematologica* **98**, e59-61 (2013).
238. Hof, J., *et al.* Mutations and deletions of the TP53 gene predict nonresponse to treatment and poor outcome in first relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **29**, 3185-3193 (2011).
239. Wattel, E., *et al.* p53 mutations are associated with resistance to chemotherapy and short survival in hematologic malignancies. *Blood* **84**, 3148-3157 (1994).
240. Vo, T.T., *et al.* Relative mitochondrial priming of myeloblasts and normal HSCs determines chemotherapeutic success in AML. *Cell* **151**, 344-355 (2012).
241. Ni Chonghaile, T., *et al.* Pretreatment mitochondrial priming correlates with clinical response to cytotoxic chemotherapy. *Science* **334**, 1129-1133 (2011).
242. Chauhan, P.S., *et al.* Expression of genes related to multiple drug resistance and apoptosis in acute leukemia: response to induction chemotherapy. *Experimental and molecular pathology* **92**, 44-49 (2012).
243. Campos, L., *et al.* High expression of bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy. *Blood* **81**, 3091-3096 (1993).
244. Mehta, S.V., Shukla, S.N. & Vora, H.H. Overexpression of Bcl2 protein predicts chemoresistance in acute myeloid leukemia: its correlation with FLT3. *Neoplasia* **60**, 666-675 (2013).

245. Ertel, F., Nguyen, M., Roulston, A. & Shore, G.C. Programming cancer cells for high expression levels of Mcl1. *EMBO reports* **14**, 328-336 (2013).
246. Glaser, S.P., *et al.* Anti-apoptotic Mcl-1 is essential for the development and sustained growth of acute myeloid leukemia. *Genes & development* **26**, 120-125 (2012).
247. Bose, P. & Grant, S. Mcl-1 as a Therapeutic Target in Acute Myelogenous Leukemia (AML). *Leukemia research reports* **2**, 12-14 (2013).
248. Kaufmann, S.H., *et al.* Elevated expression of the apoptotic regulator Mcl-1 at the time of leukemic relapse. *Blood* **91**, 991-1000 (1998).
249. Sung, K.W., *et al.* Overexpression of Apollon, an antiapoptotic protein, is associated with poor prognosis in childhood de novo acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* **13**, 5109-5114 (2007).
250. Fulda, S. Inhibitor of apoptosis proteins in pediatric leukemia: molecular pathways and novel approaches to therapy. *Frontiers in oncology* **4**, 3 (2014).
251. Brinkmann, K. & Kashkar, H. Targeting the mitochondrial apoptotic pathway: a preferred approach in hematologic malignancies? *Cell death & disease* **5**, e1098 (2014).
252. Wright, J.J. Combination therapy of bortezomib with novel targeted agents: an emerging treatment strategy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **16**, 4094-4104 (2010).
253. Thomas, R.L., *et al.* Loss of MCL-1 leads to impaired autophagy and rapid development of heart failure. *Genes & development* **27**, 1365-1377 (2013).
254. Meynet, O., *et al.* Caloric restriction modulates Mcl-1 expression and sensitizes lymphomas to BH3 mimetic in mice. *Blood* **122**, 2402-2411 (2013).
255. Fulda, S. Molecular pathways: targeting inhibitor of apoptosis proteins in cancer--from molecular mechanism to therapeutic application. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **20**, 289-295 (2014).
256. Fakler, M., *et al.* Small molecule XIAP inhibitors cooperate with TRAIL to induce apoptosis in childhood acute leukemia cells and overcome Bcl-2-mediated resistance. *Blood* **113**, 1710-1722 (2009).
257. Loder, S., *et al.* RIP1 is required for IAP inhibitor-mediated sensitization of childhood acute leukemia cells to chemotherapy-induced apoptosis. *Leukemia* **26**, 1020-1029 (2012).
258. Loeder, S., Dresek, A., Jeremias, I., Debatin, K.M. & Fulda, S. Small molecule XIAP inhibitors sensitize childhood acute leukemia cells for CD95-induced apoptosis. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **126**, 2216-2228 (2010).
259. Yu, X., Deng, Q., Bode, A.M., Dong, Z. & Cao, Y. The role of necroptosis, an alternative form of cell death, in cancer therapy. *Expert review of anticancer therapy* **13**, 883-893 (2013).
260. Laukens, B., *et al.* Smac mimetic bypasses apoptosis resistance in FADD- or caspase-8-deficient cells by priming for tumor necrosis factor alpha-induced necroptosis. *Neoplasia* **13**, 971-979 (2011).
261. Linton, K.J. Structure and function of ABC transporters. *Physiology* **22**, 122-130 (2007).
262. Higgins, C.F. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. *Nature* **446**, 749-757 (2007).
263. Borst, P. & Elferink, R.O. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annual review of biochemistry* **71**, 537-592 (2002).
264. Modok, S., Mellor, H.R. & Callaghan, R. Modulation of multidrug resistance efflux pump activity to overcome chemoresistance in cancer. *Current opinion in pharmacology* **6**, 350-354 (2006).
265. Kunicka, T. & Soucek, P. Importance of ABCC1 for cancer therapy and prognosis. *Drug metabolism reviews* (2014).

266. Morrow, C.S., *et al.* Multidrug resistance protein 1 (MRP1, ABCC1) mediates resistance to mitoxantrone via glutathione-dependent drug efflux. *Molecular pharmacology* **69**, 1499-1505 (2006).
267. Bunting, K.D. ABC transporters as phenotypic markers and functional regulators of stem cells. *Stem cells* **20**, 11-20 (2002).
268. Barbet, R., *et al.* Expression of the 49 human ATP binding cassette (ABC) genes in pluripotent embryonic stem cells and in early- and late-stage multipotent mesenchymal stem cells: possible role of ABC plasma membrane transporters in maintaining human stem cell pluripotency. *Cell cycle* **11**, 1611-1620 (2012).
269. Malfuson, J.V., *et al.* SP/drug efflux functionality of hematopoietic progenitors is controlled by mesenchymal niche through VLA-4/CD44 axis. *Leukemia* (2013).
270. Mo, W. & Zhang, J.T. Human ABCG2: structure, function, and its role in multidrug resistance. *International journal of biochemistry and molecular biology* **3**, 1-27 (2012).
271. Hardwick, L.J., Velamakanni, S. & van Veen, H.W. The emerging pharmacotherapeutic significance of the breast cancer resistance protein (ABCG2). *British journal of pharmacology* **151**, 163-174 (2007).
272. Svirnovski, A.I., *et al.* ABCB1 and ABCG2 proteins, their functional activity and gene expression in concert with drug sensitivity of leukemia cells. *Hematology* **14**, 204-212 (2009).
273. Shtil, A.A. Emergence of multidrug resistance in leukemia cells during chemotherapy: mechanisms and prevention. *Journal of hematotherapy & stem cell research* **11**, 231-241 (2002).
274. van den Heuvel-Eibrink, M.M., *et al.* CD34-related coexpression of MDR1 and BCRP indicates a clinically resistant phenotype in patients with acute myeloid leukemia (AML) of older age. *Annals of hematology* **86**, 329-337 (2007).
275. Plasschaert, S.L., *et al.* Expression of multidrug resistance-associated proteins predicts prognosis in childhood and adult acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res* **11**, 8661-8668 (2005).
276. Winter, S.S., *et al.* ATP Binding Cassette C1 (ABCC1/MRP1)-mediated drug efflux contributes to disease progression in T-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Health* **5**(2013).
277. Burkhart, C.A., *et al.* Small-molecule multidrug resistance-associated protein 1 inhibitor reversan increases the therapeutic index of chemotherapy in mouse models of neuroblastoma. *Cancer research* **69**, 6573-6580 (2009).
278. Szakacs, G., Paterson, J.K., Ludwig, J.A., Booth-Genthe, C. & Gottesman, M.M. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nature reviews. Drug discovery* **5**, 219-234 (2006).
279. Shaffer, B.C., *et al.* Drug resistance: still a daunting challenge to the successful treatment of AML. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* **15**, 62-69 (2012).
280. Notarbartolo, M., Cervello, M., Dusonchet, L., Cusimano, A. & D'Alessandro, N. Resistance to diverse apoptotic triggers in multidrug resistant HL60 cells and its possible relationship to the expression of P-glycoprotein, Fas and of the novel anti-apoptosis factors IAP (inhibitory of apoptosis proteins). *Cancer Lett* **180**, 91-101 (2002).
281. Rahgozar, S., *et al.* mRNA expression profile of multidrug-resistant genes in acute lymphoblastic leukemia of children, a prognostic value for ABCA3 and ABCA2. *Cancer biology & therapy* **15**, 35-41 (2014).
282. Yu, M., Ocana, A. & Tannock, I.F. Reversal of ATP-binding cassette drug transporter activity to modulate chemoresistance: why has it failed to provide clinical benefit? *Cancer metastasis reviews* **32**, 211-227 (2013).

283. Ma, H., *et al.* Reversal effect of ST6GAL 1 on multidrug resistance in human leukemia by regulating the PI3K/Akt pathway and the expression of P-gp and MRP1. *PLoS one* **9**, e85113 (2014).
284. Tazzari, P.L., *et al.* Multidrug resistance-associated protein 1 expression is under the control of the phosphoinositide 3 kinase/Akt signal transduction network in human acute myelogenous leukemia blasts. *Leukemia* **21**, 427-438 (2007).
285. Wang, Q. & Beck, W.T. Transcriptional suppression of multidrug resistance-associated protein (MRP) gene expression by wild-type p53. *Cancer research* **58**, 5762-5769 (1998).
286. Bush, J.A. & Li, G. Cancer chemoresistance: the relationship between p53 and multidrug transporters. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **98**, 323-330 (2002).
287. Katayama, K., Yoshioka, S., Tsukahara, S., Mitsuhashi, J. & Sugimoto, Y. Inhibition of the mitogen-activated protein kinase pathway results in the down-regulation of P-glycoprotein. *Molecular cancer therapeutics* **6**, 2092-2102 (2007).
288. Hoffmann, K., *et al.* Correlation of gene expression of ATP-binding cassette protein and tyrosine kinase signaling pathway in patients with hepatocellular carcinoma. *Anticancer research* **31**, 3883-3890 (2011).
289. Lin, S., *et al.* MEK inhibition induced downregulation of MRP1 and MRP3 expression in experimental hepatocellular carcinoma. *Cancer cell international* **13**, 3 (2013).
290. Scotto, K.W. Transcriptional regulation of ABC drug transporters. *Oncogene* **22**, 7496-7511 (2003).
291. Cho, S., *et al.* Notch1 regulates the expression of the multidrug resistance gene ABCC1/MRP1 in cultured cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 20778-20783 (2011).
292. Ronaldson, P.T., Ashraf, T. & Bendayan, R. Regulation of multidrug resistance protein 1 by tumor necrosis factor alpha in cultured glial cells: involvement of nuclear factor-kappaB and c-Jun N-terminal kinase signaling pathways. *Molecular pharmacology* **77**, 644-659 (2010).
293. Shinoda, C., *et al.* Doxorubicin induces expression of multidrug resistance-associated protein 1 in human small cell lung cancer cell lines by the c-jun N-terminal kinase pathway. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **117**, 21-31 (2005).
294. Karin, M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *The Journal of biological chemistry* **270**, 16483-16486 (1995).
295. Monje, P., Hernandez-Losa, J., Lyons, R.J., Castellone, M.D. & Gutkind, J.S. Regulation of the transcriptional activity of c-Fos by ERK. A novel role for the prolyl isomerase PIN1. *The Journal of biological chemistry* **280**, 35081-35084 (2005).
296. Tan, N.Y. & Khachigian, L.M. Sp1 phosphorylation and its regulation of gene transcription. *Molecular and cellular biology* **29**, 2483-2488 (2009).
297. Chen, B.C. & Lin, W.W. PKC- and ERK-dependent activation of I kappa B kinase by lipopolysaccharide in macrophages: enhancement by P2Y receptor-mediated CaMK activation. *British journal of pharmacology* **134**, 1055-1065 (2001).
298. Tremblay, I., Pare, E., Arseneault, D., Douziech, M. & Boucher, M.J. The MEK/ERK pathway promotes NOTCH signalling in pancreatic cancer cells. *PLoS one* **8**, e85502 (2013).
299. Stolarczyk, E.I., Reiling, C.J. & Paumi, C.M. Regulation of ABC transporter function via phosphorylation by protein kinases. *Current pharmaceutical biotechnology* **12**, 621-635 (2011).
300. Vanoye, C.G., Castro, A.F., Pourcher, T., Reuss, L. & Altenberg, G.A. Phosphorylation of P-glycoprotein by PKA and PKC modulates swelling-activated Cl⁻ currents. *The American journal of physiology* **276**, C370-378 (1999).

301. Xie, Y., Burcu, M., Linn, D.E., Qiu, Y. & Baer, M.R. Pim-1 kinase protects P-glycoprotein from degradation and enables its glycosylation and cell surface expression. *Molecular pharmacology* **78**, 310-318 (2010).
302. Stolarczyk, E.I., *et al.* Casein kinase 2alpha regulates multidrug resistance-associated protein 1 function via phosphorylation of Thr249. *Molecular pharmacology* **82**, 488-499 (2012).
303. Xie, Y., *et al.* The 44-kDa Pim-1 kinase phosphorylates BCRP/ABCG2 and thereby promotes its multimerization and drug-resistant activity in human prostate cancer cells. *The Journal of biological chemistry* **283**, 3349-3356 (2008).
304. Fu, D. & Roufogalis, B.D. Actin disruption inhibits endosomal traffic of P-glycoprotein-EGFP and resistance to daunorubicin accumulation. *American journal of physiology. Cell physiology* **292**, C1543-1552 (2007).
305. Luciani, F., *et al.* P-glycoprotein-actin association through ERM family proteins: a role in P-glycoprotein function in human cells of lymphoid origin. *Blood* **99**, 641-648 (2002).
306. Hummel, I., Klappe, K., Ercan, C. & Kok, J.W. Multidrug resistance-related protein 1 (MRP1) function and localization depend on cortical actin. *Molecular pharmacology* **79**, 229-240 (2011).
307. Miletti-Gonzalez, K.E., *et al.* The CD44 receptor interacts with P-glycoprotein to promote cell migration and invasion in cancer. *Cancer research* **65**, 6660-6667 (2005).
308. Zhang, L., *et al.* Activated ERM protein plays a critical role in drug resistance of MOLT4 cells induced by CCL25. *PLoS One* **8**, e52384 (2013).
309. Gallagher, R.E., *et al.* Treatment-influenced associations of PML-RARalpha mutations, FLT3 mutations, and additional chromosome abnormalities in relapsed acute promyelocytic leukemia. *Blood* **120**, 2098-2108 (2012).
310. Mullighan, C.G., *et al.* CREBBP mutations in relapsed acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* **471**, 235-239 (2011).
311. Correia, A.L. & Bissell, M.J. The tumor microenvironment is a dominant force in multidrug resistance. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* **15**, 39-49 (2012).
312. Abdi, J., Chen, G. & Chang, H. Drug resistance in multiple myeloma: latest findings and new concepts on molecular mechanisms. *Oncotarget* **4**, 2186-2207 (2013).
313. Winter, S.S., *et al.* Identification of genomic classifiers that distinguish induction failure in T-lineage acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group. *Blood* **110**, 1429-1438 (2007).
314. Clappier, E., *et al.* Clonal selection in xenografted human T cell acute lymphoblastic leukemia recapitulates gain of malignancy at relapse. *The Journal of experimental medicine* **208**, 653-661 (2011).
315. Hazlehurst, L.A., *et al.* Cell adhesion to fibronectin (CAM-DR) influences acquired mitoxantrone resistance in U937 cells. *Cancer research* **66**, 2338-2345 (2006).
316. Damiano, J.S., Cress, A.E., Hazlehurst, L.A., Shtil, A.A. & Dalton, W.S. Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines. *Blood* **93**, 1658-1667 (1999).
317. Shishido, S., Bonig, H. & Kim, Y.M. Role of integrin alpha4 in drug resistance of leukemia. *Frontiers in oncology* **4**, 99 (2014).
318. Westhoff, M.A., Bruhl, O., Nonnenmacher, L., Karpel-Massler, G. & Debatin, K.M. Killing me softly--future challenges in apoptosis research. *International journal of molecular sciences* **15**, 3746-3767 (2014).
319. Smith, C.W. 3. Adhesion molecules and receptors. *The Journal of allergy and clinical immunology* **121**, S375-379; quiz S414 (2008).
320. Campbell, I.D. & Humphries, M.J. Integrin structure, activation, and interactions. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **3**(2011).

321. Shattil, S.J., Kim, C. & Ginsberg, M.H. The final steps of integrin activation: the end game. *Nature reviews. Molecular cell biology* **11**, 288-300 (2010).
322. Stupack, D.G. & Cheresch, D.A. Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. *Journal of cell science* **115**, 3729-3738 (2002).
323. Lal, H., *et al.* Integrins and proximal signaling mechanisms in cardiovascular disease. *Frontiers in bioscience* **14**, 2307-2334 (2009).
324. Liddington, R.C. Structural aspects of integrins. *Advances in experimental medicine and biology* **819**, 111-126 (2014).
325. Kapp, T.G., Rechenmacher, F., Sobahi, T.R. & Kessler, H. Integrin modulators: a patent review. *Expert opinion on therapeutic patents* **23**, 1273-1295 (2013).
326. Johnson, M.S. & Chouhan, B.S. Evolution of integrin I domains. *Advances in experimental medicine and biology* **819**, 1-19 (2014).
327. Valdramidou, D., Humphries, M.J. & Mould, A.P. Distinct roles of beta1 metal ion-dependent adhesion site (MIDAS), adjacent to MIDAS (ADMIDAS), and ligand-associated metal-binding site (LIMBS) cation-binding sites in ligand recognition by integrin alpha2beta1. *The Journal of biological chemistry* **283**, 32704-32714 (2008).
328. Mould, A.P., Barton, S.J., Askari, J.A., Craig, S.E. & Humphries, M.J. Role of ADMIDAS cation-binding site in ligand recognition by integrin alpha 5 beta 1. *The Journal of biological chemistry* **278**, 51622-51629 (2003).
329. Rose, D.M., Cardarelli, P.M., Cobb, R.R. & Ginsberg, M.H. Soluble VCAM-1 binding to alpha4 integrins is cell-type specific and activation dependent and is disrupted during apoptosis in T cells. *Blood* **95**, 602-609 (2000).
330. Jung, S.M. & Moroi, M. Activation of the platelet collagen receptor integrin alpha(2)beta(1): its mechanism and participation in the physiological functions of platelets. *Trends in cardiovascular medicine* **10**, 285-292 (2000).
331. Van de Walle, G.R., *et al.* Two functional active conformations of the integrin {alpha}2{beta}1, depending on activation condition and cell type. *The Journal of biological chemistry* **280**, 36873-36882 (2005).
332. Mobley, J.L., Ennis, E. & Shimizu, Y. Differential activation-dependent regulation of integrin function in cultured human T-leukemic cell lines. *Blood* **83**, 1039-1050 (1994).
333. Fierro, F.A., *et al.* BCR/ABL expression of myeloid progenitors increases beta1-integrin mediated adhesion to stromal cells. *Journal of molecular biology* **377**, 1082-1093 (2008).
334. Glodek, A.M., Honczarenko, M., Le, Y., Campbell, J.J. & Silberstein, L.E. Sustained activation of cell adhesion is a differentially regulated process in B lymphopoiesis. *The Journal of experimental medicine* **197**, 461-473 (2003).
335. Peled, A., *et al.* The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. *Blood* **95**, 3289-3296 (2000).
336. Shen, W., Bendall, L.J., Gottlieb, D.J. & Bradstock, K.F. The chemokine receptor CXCR4 enhances integrin-mediated in vitro adhesion and facilitates engraftment of leukemic precursor-B cells in the bone marrow. *Experimental hematology* **29**, 1439-1447 (2001).
337. Shen, B., Delaney, M.K. & Du, X. Inside-out, outside-in, and inside-outside-in: G protein signaling in integrin-mediated cell adhesion, spreading, and retraction. *Current opinion in cell biology* **24**, 600-606 (2012).
338. Ivaska, J. & Heino, J. Cooperation between integrins and growth factor receptors in signaling and endocytosis. *Annual review of cell and developmental biology* **27**, 291-320 (2011).
339. Kinashi, T. Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nature reviews. Immunology* **5**, 546-559 (2005).
340. Spaargaren, M., *et al.* The B cell antigen receptor controls integrin activity through Btk and PLCgamma2. *The Journal of experimental medicine* **198**, 1539-1550 (2003).

341. Harburger, D.S., Bouaouina, M. & Calderwood, D.A. Kindlin-1 and -2 directly bind the C-terminal region of beta integrin cytoplasmic tails and exert integrin-specific activation effects. *The Journal of biological chemistry* **284**, 11485-11497 (2009).
342. Nolz, J.C., *et al.* WAVE2 regulates high-affinity integrin binding by recruiting vinculin and talin to the immunological synapse. *Molecular and cellular biology* **27**, 5986-6000 (2007).
343. Cantor, J.M., Ginsberg, M.H. & Rose, D.M. Integrin-associated proteins as potential therapeutic targets. *Immunological reviews* **223**, 236-251 (2008).
344. Calderwood, D.A., Campbell, I.D. & Critchley, D.R. Talins and kindlins: partners in integrin-mediated adhesion. *Nature reviews. Molecular cell biology* **14**, 503-517 (2013).
345. Wernimont, S.A., *et al.* Contact-dependent T cell activation and T cell stopping require talin1. *Journal of immunology* **187**, 6256-6267 (2011).
346. Shimonaka, M., *et al.* Rap1 translates chemokine signals to integrin activation, cell polarization, and motility across vascular endothelium under flow. *The Journal of cell biology* **161**, 417-427 (2003).
347. Lee, H.S., Anekal, P., Lim, C.J., Liu, C.C. & Ginsberg, M.H. Two modes of integrin activation form a binary molecular switch in adhesion maturation. *Molecular biology of the cell* **24**, 1354-1362 (2013).
348. Ye, F., Kim, C. & Ginsberg, M.H. Reconstruction of integrin activation. *Blood* **119**, 26-33 (2012).
349. Bate, N., *et al.* Talin contains a C-terminal calpain2 cleavage site important in focal adhesion dynamics. *PLoS One* **7**, e34461 (2012).
350. Wang, J.H. Pull and push: talin activation for integrin signaling. *Cell research* **22**, 1512-1514 (2012).
351. Schmid, M.C., *et al.* PI3-kinase gamma promotes Rap1a-mediated activation of myeloid cell integrin alpha4beta1, leading to tumor inflammation and growth. *PLoS One* **8**, e60226 (2013).
352. Bos, J.L., *et al.* The role of Rap1 in integrin-mediated cell adhesion. *Biochemical Society transactions* **31**, 83-86 (2003).
353. Nolz, J.C., *et al.* The WAVE2 complex regulates T cell receptor signaling to integrins via Abl- and CrkL-C3G-mediated activation of Rap1. *The Journal of cell biology* **182**, 1231-1244 (2008).
354. Zhu, J., *et al.* Requirement of alpha and beta subunit transmembrane helix separation for integrin outside-in signaling. *Blood* **110**, 2475-2483 (2007).
355. Carman, C.V. & Springer, T.A. Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized? *Current opinion in cell biology* **15**, 547-556 (2003).
356. Romanova, L.Y., *et al.* Phosphorylation of paxillin at threonine 538 by PKCdelta regulates LFA1-mediated adhesion of lymphoid cells. *Journal of cell science* **123**, 1567-1577 (2010).
357. Ali, O., *et al.* Cooperativity between integrin activation and mechanical stress leads to integrin clustering. *Biophysical journal* **100**, 2595-2604 (2011).
358. Levental, K.R., *et al.* Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell* **139**, 891-906 (2009).
359. Legate, K.R., Wickstrom, S.A. & Fassler, R. Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling. *Genes & development* **23**, 397-418 (2009).
360. Holleran, B.J., Barbar, E., Payet, M.D. & Dupuis, G. Differential recruitment of alpha2beta1 and alpha4beta1 integrins to lipid rafts in Jurkat T lymphocytes exposed to collagen type IV and fibronectin. *Journal of leukocyte biology* **73**, 243-252 (2003).
361. Aplin, A.E., Short, S.M. & Juliano, R.L. Anchorage-dependent regulation of the mitogen-activated protein kinase cascade by growth factors is supported by a variety of integrin alpha chains. *The Journal of biological chemistry* **274**, 31223-31228 (1999).

362. Meyer, S., Orso, E., Schmitz, G., Landthaler, M. & Vogt, T. Lubrol-RAFTs in melanoma cells: a molecular platform for tumor-promoting ephrin-B2-integrin-beta1 interaction. *The Journal of investigative dermatology* **127**, 1615-1621 (2007).
363. Chen, Y., *et al.* Combined integrin phosphoproteomic analyses and small interfering RNA--based functional screening identify key regulators for cancer cell adhesion and migration. *Cancer research* **69**, 3713-3720 (2009).
364. Spencer, V.A., Xu, R. & Bissell, M.J. Extracellular matrix, nuclear and chromatin structure, and gene expression in normal tissues and malignant tumors: a work in progress. *Advances in cancer research* **97**, 275-294 (2007).
365. Wehrle-Haller, B. Structure and function of focal adhesions. *Current opinion in cell biology* **24**, 116-124 (2012).
366. Hynes, R.O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**, 11-25 (1992).
367. Zaidel-Bar, R., Itzkovitz, S., Ma'ayan, A., Iyengar, R. & Geiger, B. Functional atlas of the integrin adhesome. *Nature cell biology* **9**, 858-867 (2007).
368. Zamir, E. & Geiger, B. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *Journal of cell science* **114**, 3583-3590 (2001).
369. Mitra, S.K. & Schlaepfer, D.D. Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Current opinion in cell biology* **18**, 516-523 (2006).
370. Nojima, Y., Tachibana, K., Sato, T., Schlossman, S.F. & Morimoto, C. Focal adhesion kinase (pp125FAK) is tyrosine phosphorylated after engagement of alpha 4 beta 1 and alpha 5 beta 1 integrins on human T-lymphoblastic cells. *Cellular immunology* **161**, 8-13 (1995).
371. Pichard, V., *et al.* Adhesion, actin cytoskeleton organisation and the spreading of colon adenocarcinoma cells induced by EGF are mediated by alpha2beta1 integrin low clustering through focal adhesion kinase. *Histochemistry and cell biology* **116**, 337-348 (2001).
372. Brami-Cherrier, K., *et al.* FAK dimerization controls its kinase-dependent functions at focal adhesions. *The EMBO journal* **33**, 356-370 (2014).
373. Reyes-Reyes, M., Mora, N., Zentella, A. & Rosales, C. Phosphatidylinositol 3-kinase mediates integrin-dependent NF-kappaB and MAPK activation through separate signaling pathways. *Journal of cell science* **114**, 1579-1589 (2001).
374. Sato, T., Tachibana, K., Nojima, Y., D'Avirro, N. & Morimoto, C. Role of the VLA-4 molecule in T cell costimulation. Identification of the tyrosine phosphorylation pattern induced by the ligation of VLA-4. *Journal of immunology* **155**, 2938-2947 (1995).
375. Harburger, D.S. & Calderwood, D.A. Integrin signalling at a glance. *Journal of cell science* **122**, 159-163 (2009).
376. Delon, I. & Brown, N.H. Integrins and the actin cytoskeleton. *Current opinion in cell biology* **19**, 43-50 (2007).
377. Miao, H., *et al.* Differential regulation of Rho GTPases by beta1 and beta3 integrins: the role of an extracellular domain of integrin in intracellular signaling. *Journal of cell science* **115**, 2199-2206 (2002).
378. de Curtis, I. & Meldolesi, J. Cell surface dynamics - how Rho GTPases orchestrate the interplay between the plasma membrane and the cortical cytoskeleton. *Journal of cell science* **125**, 4435-4444 (2012).
379. Huttenlocher, A. & Horwitz, A.R. Integrins in cell migration. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**, a005074 (2011).
380. Goundiam, O., Nagel, M.D. & Vayssade, M. Akt and RhoA inhibition promotes anoikis of aggregated B16F10 melanoma cells. *Cell biology international* **36**, 311-319 (2012).
381. Hirsch, E., *et al.* Defective Rac-mediated proliferation and survival after targeted mutation of the beta1 integrin cytodomain. *The Journal of cell biology* **157**, 481-492 (2002).

382. Le, S.S., *et al.* Inhibition of Rac GTPase triggers a c-Jun- and Bim-dependent mitochondrial apoptotic cascade in cerebellar granule neurons. *Journal of neurochemistry* **94**, 1025-1039 (2005).
383. Schlaepfer, D.D. & Hunter, T. Focal adhesion kinase overexpression enhances ras-dependent integrin signaling to ERK2/mitogen-activated protein kinase through interactions with and activation of c-Src. *The Journal of biological chemistry* **272**, 13189-13195 (1997).
384. Chetoui, N., Gendron, S., Chamoux, E. & Aoudjit, F. Collagen type I-mediated activation of ERK/MAP Kinase is dependent on Ras, Raf-1 and protein phosphatase 2A in Jurkat T cells. *Molecular immunology* **43**, 1687-1693 (2006).
385. Vacca, A., *et al.* alpha(v)beta(3) integrin engagement modulates cell adhesion, proliferation, and protease secretion in human lymphoid tumor cells. *Experimental hematology* **29**, 993-1003 (2001).
386. Wary, K.K., Mainiero, F., Isakoff, S.J., Marcantonio, E.E. & Giancotti, F.G. The adaptor protein Shc couples a class of integrins to the control of cell cycle progression. *Cell* **87**, 733-743 (1996).
387. Barberis, L., *et al.* Distinct roles of the adaptor protein Shc and focal adhesion kinase in integrin signaling to ERK. *The Journal of biological chemistry* **275**, 36532-36540 (2000).
388. Wary, K.K., Mariotti, A., Zurzolo, C. & Giancotti, F.G. A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth. *Cell* **94**, 625-634 (1998).
389. Baughn, L.B. & Rosenberg, N. Disruption of the Shc/Grb2 complex during abelson virus transformation affects proliferation, but not apoptosis. *Journal of virology* **79**, 2325-2334 (2005).
390. Rucci, N., *et al.* A novel protein kinase C alpha-dependent signal to ERK1/2 activated by alphaVbeta3 integrin in osteoclasts and in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Journal of cell science* **118**, 3263-3275 (2005).
391. Xia, H., Nho, R.S., Kahm, J., Kleidon, J. & Henke, C.A. Focal adhesion kinase is upstream of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt in regulating fibroblast survival in response to contraction of type I collagen matrices via a beta 1 integrin viability signaling pathway. *The Journal of biological chemistry* **279**, 33024-33034 (2004).
392. Zeller, K.S., *et al.* PI3-kinase p110alpha mediates beta1 integrin-induced Akt activation and membrane protrusion during cell attachment and initial spreading. *Cellular signalling* **22**, 1838-1848 (2010).
393. King, W.G., Mattaliano, M.D., Chan, T.O., Tschlis, P.N. & Brugge, J.S. Phosphatidylinositol 3-kinase is required for integrin-stimulated AKT and Raf-1/mitogen-activated protein kinase pathway activation. *Molecular and cellular biology* **17**, 4406-4418 (1997).
394. Ricard, I., Payet, M.D. & Dupuis, G. Clustering the adhesion molecules VLA-4 (CD49d/CD29) in Jurkat T cells or VCAM-1 (CD106) in endothelial (ECV 304) cells activates the phosphoinositide pathway and triggers Ca²⁺ mobilization. *European journal of immunology* **27**, 1530-1538 (1997).
395. Riaz, A., Zeller, K.S. & Johansson, S. Receptor-specific mechanisms regulate phosphorylation of AKT at Ser473: role of RICTOR in beta1 integrin-mediated cell survival. *PLoS One* **7**, e32081 (2012).
396. Pankov, R., *et al.* Specific beta1 integrin site selectively regulates Akt/protein kinase B signaling via local activation of protein phosphatase 2A. *The Journal of biological chemistry* **278**, 18671-18681 (2003).
397. Velling, T., Nilsson, S., Stefansson, A. & Johansson, S. beta1-Integrins induce phosphorylation of Akt on serine 473 independently of focal adhesion kinase and Src family kinases. *EMBO reports* **5**, 901-905 (2004).

398. Legate, K.R., Montanez, E., Kudlacek, O. & Fassler, R. ILK, PINCH and parvin: the tIPP of integrin signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology* **7**, 20-31 (2006).
399. Miranti, C.K. & Brugge, J.S. Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. *Nature cell biology* **4**, E83-90 (2002).
400. ffrench-Constant, C. & Colognato, H. Integrins: versatile integrators of extracellular signals. *Trends in cell biology* **14**, 678-686 (2004).
401. Frisch, S.M. & Ruoslahti, E. Integrins and anoikis. *Current opinion in cell biology* **9**, 701-706 (1997).
402. Aoudjit, F. & Vuori, K. Matrix attachment regulates Fas-induced apoptosis in endothelial cells: a role for c-flip and implications for anoikis. *The Journal of cell biology* **152**, 633-643 (2001).
403. Gilmore, A.P., Metcalfe, A.D., Romer, L.H. & Streuli, C.H. Integrin-mediated survival signals regulate the apoptotic function of Bax through its conformation and subcellular localization. *The Journal of cell biology* **149**, 431-446 (2000).
404. Lee, B.H. & Ruoslahti, E. alpha5beta1 integrin stimulates Bcl-2 expression and cell survival through Akt, focal adhesion kinase, and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV. *Journal of cellular biochemistry* **95**, 1214-1223 (2005).
405. Moro, L., *et al.* Integrins induce activation of EGF receptor: role in MAP kinase induction and adhesion-dependent cell survival. *The EMBO journal* **17**, 6622-6632 (1998).
406. Okada, H., *et al.* Integrins protect cardiomyocytes from ischemia/reperfusion injury. *The Journal of clinical investigation* **123**, 4294-4308 (2013).
407. Salerno, E.P., Olson, W.C., McSkimming, C., Shea, S. & Slingsluff, C.L., Jr. T cells in the human metastatic melanoma microenvironment express site-specific homing receptors and retention integrins. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **134**, 563-574 (2014).
408. Bae, H.B., *et al.* Vitronectin inhibits neutrophil apoptosis through activation of integrin-associated signaling pathways. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **46**, 790-796 (2012).
409. Aoudjit, F. & Vuori, K. Engagement of the alpha2beta1 integrin inhibits Fas ligand expression and activation-induced cell death in T cells in a focal adhesion kinase-dependent manner. *Blood* **95**, 2044-2051 (2000).
410. Gendron, S., Couture, J. & Aoudjit, F. Integrin alpha2beta1 inhibits Fas-mediated apoptosis in T lymphocytes by protein phosphatase 2A-dependent activation of the MAPK/ERK pathway. *The Journal of biological chemistry* **278**, 48633-48643 (2003).
411. Damle, N.K., *et al.* Costimulation with integrin ligands intercellular adhesion molecule-1 or vascular cell adhesion molecule-1 augments activation-induced death of antigen-specific CD4⁺ T lymphocytes. *Journal of immunology* **151**, 2368-2379 (1993).
412. Lu, P., Weaver, V.M. & Werb, Z. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *The Journal of cell biology* **196**, 395-406 (2012).
413. Ke, A.W., *et al.* CD151 amplifies signaling by integrin alpha6beta1 to PI3K and induces the epithelial-mesenchymal transition in HCC cells. *Gastroenterology* **140**, 1629-1641 e1615 (2011).
414. Denadai, M.V., *et al.* Expression of integrin genes and proteins in progression and dissemination of colorectal adenocarcinoma. *BMC clinical pathology* **13**, 16 (2013).
415. Lesniak, D., *et al.* Beta1-integrin circumvents the antiproliferative effects of trastuzumab in human epidermal growth factor receptor-2-positive breast cancer. *Cancer research* **69**, 8620-8628 (2009).
416. Ren, J., Xu, S., Guo, D., Zhang, J. & Liu, S. Increased expression of alpha5beta1-integrin is a prognostic marker for patients with gastric cancer. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico* (2013).

417. Dingemans, A.M., *et al.* Integrin expression profiling identifies integrin alpha5 and beta1 as prognostic factors in early stage non-small cell lung cancer. *Molecular cancer* **9**, 152 (2010).
418. Chong, H.C., Tan, C.K., Huang, R.L. & Tan, N.S. Matricellular proteins: a sticky affair with cancers. *J Oncol* **2012**, 351089.
419. Ganguly, K.K., Pal, S., Moulik, S. & Chatterjee, A. Integrins and metastasis. *Cell adhesion & migration* **7**, 251-261 (2013).
420. Simpson, C.D., Anyiwe, K. & Schimmer, A.D. Anoikis resistance and tumor metastasis. *Cancer letters* **272**, 177-185 (2008).
421. Petitclerc, E., *et al.* Integrin alpha(v)beta3 promotes M21 melanoma growth in human skin by regulating tumor cell survival. *Cancer research* **59**, 2724-2730 (1999).
422. Smith, S.D., *et al.* Protein kinase Calpha (PKCalpha) regulates p53 localization and melanoma cell survival downstream of integrin alphav in three-dimensional collagen and in vivo. *The Journal of biological chemistry* **287**, 29336-29347 (2012).
423. Gu, J., Fujibayashi, A., Yamada, K.M. & Sekiguchi, K. Laminin-10/11 and fibronectin differentially prevent apoptosis induced by serum removal via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt- and MEK1/ERK-dependent pathways. *The Journal of biological chemistry* **277**, 19922-19928 (2002).
424. Chung, J. & Mercurio, A.M. Contributions of the alpha6 integrins to breast carcinoma survival and progression. *Molecules and cells* **17**, 203-209 (2004).
425. Mills, J.R., *et al.* mTORC1 promotes survival through translational control of Mcl-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 10853-10858 (2008).
426. Edderkaoui, M., Hong, P., Lee, J.K., Pandol, S.J. & Gukovskaya, A.S. Insulin-like growth factor-I receptor mediates the prosurvival effect of fibronectin. *The Journal of biological chemistry* **282**, 26646-26655 (2007).
427. Fornaro, M., *et al.* Fibronectin protects prostate cancer cells from tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis via the AKT/survivin pathway. *The Journal of biological chemistry* **278**, 50402-50411 (2003).
428. Lane, D., Goncharenko-Khaider, N., Rancourt, C. & Piche, A. Ovarian cancer ascites protects from TRAIL-induced cell death through alphavbeta5 integrin-mediated focal adhesion kinase and Akt activation. *Oncogene* **29**, 3519-3531 (2010).
429. Eke, I., *et al.* beta(1)Integrin/FAK/cortactin signaling is essential for human head and neck cancer resistance to radiotherapy. *The Journal of clinical investigation* **122**, 1529-1540 (2012).
430. Ahmed, K.M., Zhang, H. & Park, C.C. NF-kappaB regulates radioresistance mediated by beta1-integrin in three-dimensional culture of breast cancer cells. *Cancer research* **73**, 3737-3748 (2013).
431. Huang, C., *et al.* beta1 integrin mediates an alternative survival pathway in breast cancer cells resistant to lapatinib. *Breast cancer research : BCR* **13**, R84 (2011).
432. Pontiggia, O., *et al.* The tumor microenvironment modulates tamoxifen resistance in breast cancer: a role for soluble stromal factors and fibronectin through beta1 integrin. *Breast cancer research and treatment* **133**, 459-471 (2012).
433. Aoudjit, F. & Vuori, K. Integrin signaling inhibits paclitaxel-induced apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene* **20**, 4995-5004 (2001).
434. Huanwen, W., *et al.* Intrinsic chemoresistance to gemcitabine is associated with constitutive and laminin-induced phosphorylation of FAK in pancreatic cancer cell lines. *Molecular cancer* **8**, 125 (2009).
435. Mantoni, T.S., Lunardi, S., Al-Assar, O., Masamune, A. & Brunner, T.B. Pancreatic stellate cells radioprotect pancreatic cancer cells through beta1-integrin signaling. *Cancer research* **71**, 3453-3458 (2011).

436. Duxbury, M.S., *et al.* RNA interference demonstrates a novel role for integrin-linked kinase as a determinant of pancreatic adenocarcinoma cell gemcitabine chemoresistance. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **11**, 3433-3438 (2005).
437. Morello, V., *et al.* beta1 integrin controls EGFR signaling and tumorigenic properties of lung cancer cells. *Oncogene* **30**, 4087-4096 (2011).
438. Giannelli, G., *et al.* ZD6474 inhibits proliferation and invasion of human hepatocellular carcinoma cells. *Biochemical pharmacology* **71**, 479-485 (2006).
439. Long, Q.Z., *et al.* Interaction of CCN1 with alphavbeta3 integrin induces P-glycoprotein and confers vinblastine resistance in renal cell carcinoma cells. *Anti-cancer drugs* **24**, 810-817 (2013).
440. Hsieh, I.S., *et al.* Upregulation of drug transporter expression by osteopontin in prostate cancer cells. *Molecular pharmacology* **83**, 968-977 (2013).
441. Seguin, L., *et al.* An integrin beta(3)-KRAS-RalB complex drives tumour stemness and resistance to EGFR inhibition. *Nature cell biology* **16**, 457-468 (2014).
442. Dangi-Garimella, S., Sahai, V., Ebine, K., Kumar, K. & Munshi, H.G. Three-dimensional collagen I promotes gemcitabine resistance in vitro in pancreatic cancer cells through HMGA2-dependent histone acetyltransferase expression. *PloS one* **8**, e64566 (2013).
443. Xiong, J., Balcioglu, H.E. & Danen, E.H. Integrin signaling in control of tumor growth and progression. *The international journal of biochemistry & cell biology* **45**, 1012-1015 (2013).
444. Sun, C.C., Qu, X.J. & Gao, Z.H. Integrins: players in cancer progression and targets in cancer therapy. *Anti-cancer drugs* (2014).
445. Marelli, U.K., Rechenmacher, F., Sobahi, T.R., Mas-Moruno, C. & Kessler, H. Tumor Targeting via Integrin Ligands. *Frontiers in oncology* **3**, 222 (2013).
446. Carter, A. Integrins as target: first phase III trial launches, but questions remain. *Journal of the National Cancer Institute* **102**, 675-677 (2010).
447. Almokadem, S. & Belani, C.P. Volociximab in cancer. *Expert opinion on biological therapy* **12**, 251-257 (2012).
448. Wei, X.W., Zhang, Z.R. & Wei, Y.Q. Anti-angiogenic drugs currently in Phase II clinical trials for gynecological cancer treatment. *Expert opinion on investigational drugs* **22**, 1181-1192 (2013).
449. Keizer, R.J., *et al.* Evaluation of alpha2-integrin expression as a biomarker for tumor growth inhibition for the investigational integrin inhibitor E7820 in preclinical and clinical studies. *The AAPS journal* **13**, 230-239 (2011).
450. Funahashi, Y., *et al.* Sulfonamide derivative, E7820, is a unique angiogenesis inhibitor suppressing an expression of integrin alpha2 subunit on endothelium. *Cancer research* **62**, 6116-6123 (2002).
451. Marthick, J.R. & Dickinson, J.L. Emerging putative biomarkers: the role of alpha 2 and 6 integrins in susceptibility, treatment, and prognosis. *Prostate cancer* **2012**, 298732 (2012).
452. Mita, M., *et al.* Phase I study of E7820, an oral inhibitor of integrin alpha-2 expression with antiangiogenic properties, in patients with advanced malignancies. *Clin Cancer Res* **17**, 193-200 (2011).
453. De Waele, M., *et al.* Different expression of adhesion molecules on CD34+ cells in AML and B-lineage ALL and their normal bone marrow counterparts. *European journal of haematology* **63**, 192-201 (1999).
454. Moller, P., Eichelmann, A., Koretz, K. & Mechtersheimer, G. Adhesion molecules VLA-1 to VLA-6 define discrete stages of peripheral B lymphocyte development and characterize different types of B cell neoplasia. *Leukemia* **6**, 256-264 (1992).

455. Vila, L., Thomas, X., Campos, L., Sabido, O. & Archimbaud, E. Expression of VLA molecules on acute leukemia cells: relationship with disease characteristics. *Experimental hematology* **23**, 514-518 (1995).
456. Bank, I., *et al.* The epidermotropic mycosis fungoides associated alpha1beta1 integrin (VLA-1, CD49a/CD29) is primarily a collagen IV receptor on malignant T cells. *Journal of cutaneous pathology* **26**, 65-71 (1999).
457. Chan, B.M., Wong, J.G., Rao, A. & Hemler, M.E. T cell receptor-dependent, antigen-specific stimulation of a murine T cell clone induces a transient, VLA protein-mediated binding to extracellular matrix. *Journal of immunology* **147**, 398-404 (1991).
458. Ivanoff, J., Talme, T. & Sundqvist, K.G. The role of chemokines and extracellular matrix components in the migration of T lymphocytes into three-dimensional substrata. *Immunology* **114**, 53-62 (2005).
459. Makrynika, V. & Bradstock, K.F. Adhesion of precursor-B acute lymphoblastic leukaemia cells to bone marrow stromal proteins. *Leukemia* **7**, 86-92 (1993).
460. Nadav, L., *et al.* Tumorigenic potential and disease manifestations of malignant B-cell variants differing in their fibronectin adhesiveness. *Experimental hematology* **36**, 1524-1534 (2008).
461. Nadav, L., *et al.* The generation and regulation of functional diversity of malignant plasma cells. *Cancer research* **66**, 8608-8616 (2006).
462. Filshie, R., Gottlieb, D. & Bradstock, K. VLA-4 is involved in the engraftment of the human pre-B acute lymphoblastic leukaemia cell line NALM-6 in SCID mice. *British journal of haematology* **102**, 1292-1300 (1998).
463. Matsunaga, T., *et al.* Interaction between leukemic-cell VLA-4 and stromal fibronectin is a decisive factor for minimal residual disease of acute myelogenous leukemia. *Nature medicine* **9**, 1158-1165 (2003).
464. Mori, Y., *et al.* Anti-alpha4 integrin antibody suppresses the development of multiple myeloma and associated osteoclastic osteolysis. *Blood* **104**, 2149-2154 (2004).
465. Burger, J.A., Spoo, A., Dwenger, A., Burger, M. & Behringer, D. CXCR4 chemokine receptors (CD184) and alpha4beta1 integrins mediate spontaneous migration of human CD34+ progenitors and acute myeloid leukaemia cells beneath marrow stromal cells (pseudoemperipolesis). *British journal of haematology* **122**, 579-589 (2003).
466. Harima, A., *et al.* Fibronectin promotes cell proliferation of human pre-B cell line via its interactions with VLA-4 and VLA-5. *Hematology* **13**, 236-243 (2008).
467. Makrynika, V., Bianchi, A., Bradstock, K., Gottlieb, D. & Hewson, J. Migration of acute lymphoblastic leukemia cells into human bone marrow stroma. *Leukemia* **8**, 1734-1743 (1994).
468. Frassanito, M.A., *et al.* Bone marrow fibroblasts parallel multiple myeloma progression in patients and mice: in vitro and in vivo studies. *Leukemia* **28**, 904-916 (2014).
469. Yost, A.J., *et al.* Defined, serum-free conditions for in vitro culture of primary human T-ALL blasts. *Leukemia* **27**, 1437-1440 (2013).
470. Garcia-Gila, M., Lopez-Martin, E.M. & Garcia-Pardo, A. Adhesion to fibronectin via alpha4 integrin (CD49d) protects B cells from apoptosis induced by serum deprivation but not via IgM or Fas/Apo-1 receptors. *Clinical and experimental immunology* **127**, 455-462 (2002).
471. Caricchio, R., D'Adamio, L. & Cohen, P.L. Fas, ceramide and serum withdrawal induce apoptosis via a common pathway in a type II Jurkat cell line. *Cell death and differentiation* **9**, 574-580 (2002).
472. Cuvillier, O. & Levade, T. Sphingosine 1-phosphate antagonizes apoptosis of human leukemia cells by inhibiting release of cytochrome c and Smac/DIABLO from mitochondria. *Blood* **98**, 2828-2836 (2001).

473. Ajenjo, N., *et al.* Subcellular localization determines the protective effects of activated ERK2 against distinct apoptogenic stimuli in myeloid leukemia cells. *J Biol Chem* **279**, 32813-32823 (2004).
474. Ming, L., *et al.* Sp1 and p73 activate PUMA following serum starvation. *Carcinogenesis* **29**, 1878-1884 (2008).
475. Winter, S.S., *et al.* Enhanced T-lineage acute lymphoblastic leukaemia cell survival on bone marrow stroma requires involvement of LFA-1 and ICAM-1. *British journal of haematology* **115**, 862-871 (2001).
476. Landowski, T.H., Olashaw, N.E., Agrawal, D. & Dalton, W.S. Cell adhesion-mediated drug resistance (CAM-DR) is associated with activation of NF-kappa B (RelB/p50) in myeloma cells. *Oncogene* **22**, 2417-2421 (2003).
477. Tabe, Y., *et al.* Activation of integrin-linked kinase is a critical prosurvival pathway induced in leukemic cells by bone marrow-derived stromal cells. *Cancer research* **67**, 684-694 (2007).
478. De Toni-Costes, F., *et al.* A New alpha5beta1 integrin-dependent survival pathway through GSK3beta activation in leukemic cells. *PLoS One* **5**, e9807 (2010).
479. Sugahara, H., *et al.* Induction of programmed cell death in human hematopoietic cell lines by fibronectin via its interaction with very late antigen 5. *J Exp Med* **179**, 1757-1766 (1994).
480. Saito, Y., *et al.* Apoptotic death of hematopoietic tumor cells through potentiated and sustained adhesion to fibronectin via VLA-4. *The Journal of biological chemistry* **285**, 7006-7015 (2010).
481. Laouar, A., Glesne, D. & Huberman, E. Protein kinase C-beta, fibronectin, alpha(5)beta(1)-integrin, and tumor necrosis factor-alpha are required for phorbol diester-induced apoptosis in human myeloid leukemia cells. *Molecular carcinogenesis* **32**, 195-205 (2001).
482. de Haart, S.J., *et al.* Accessory cells of the microenvironment protect multiple myeloma from T-cell cytotoxicity through cell adhesion-mediated immune resistance. *Clin Cancer Res* **19**, 5591-5601 (2013).
483. Perez, L.E., *et al.* Bone marrow stroma confers resistance to Apo2 ligand/TRAIL in multiple myeloma in part by regulating c-FLIP. *Journal of immunology* **180**, 1545-1555 (2008).
484. Lumkul, R., *et al.* Human AML cells in NOD/SCID mice: engraftment potential and gene expression. *Leukemia* **16**, 1818-1826 (2002).
485. Pearce, D.J., *et al.* AML engraftment in the NOD/SCID assay reflects the outcome of AML: implications for our understanding of the heterogeneity of AML. *Blood* **107**, 1166-1173 (2006).
486. Hsieh, Y.T., *et al.* Integrin alpha4 blockade sensitizes drug resistant pre-B acute lymphoblastic leukemia to chemotherapy. *Blood* **121**, 1814-1818 (2013).
487. Matsunaga, T., *et al.* Combination therapy of an anticancer drug with the FNIII14 peptide of fibronectin effectively overcomes cell adhesion-mediated drug resistance of acute myelogenous leukemia. *Leukemia* **22**, 353-360 (2008).
488. Hazlehurst, L.A., Argilagos, R.F. & Dalton, W.S. Beta1 integrin mediated adhesion increases Bim protein degradation and contributes to drug resistance in leukaemia cells. *British journal of haematology* **136**, 269-275 (2007).
489. Funayama, K., Murai, F., Shimane, M., Nomura, H. & Asano, S. Adhesion-induced drug resistance in leukemia stem cells. *Pharmacology* **86**, 79-84 (2010).
490. Hazlehurst, L.A., Damiano, J.S., Buyuksal, I., Pledger, W.J. & Dalton, W.S. Adhesion to fibronectin via beta1 integrins regulates p27kip1 levels and contributes to cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR). *Oncogene* **19**, 4319-4327 (2000).
491. Damiano, J.S., Hazlehurst, L.A. & Dalton, W.S. Cell adhesion-mediated drug resistance (CAM-DR) protects the K562 chronic myelogenous leukemia cell line from apoptosis

- induced by BCR/ABL inhibition, cytotoxic drugs, and gamma-irradiation. *Leukemia* **15**, 1232-1239 (2001).
492. Hu, Z. & Slayton, W.B. Integrin VLA-5 and FAK are Good Targets to Improve Treatment Response in the Philadelphia Chromosome Positive Acute Lymphoblastic Leukemia. *Frontiers in oncology* **4**, 112 (2014).
493. De Toni, F., *et al.* A crosstalk between the Wnt and the adhesion-dependent signaling pathways governs the chemosensitivity of acute myeloid leukemia. *Oncogene* **25**, 3113-3122 (2006).
494. Kobune, M., *et al.* Wnt3/RhoA/ROCK signaling pathway is involved in adhesion-mediated drug resistance of multiple myeloma in an autocrine mechanism. *Molecular cancer therapeutics* **6**, 1774-1784 (2007).
495. Shain, K.H., *et al.* Beta1 integrin adhesion enhances IL-6-mediated STAT3 signaling in myeloma cells: implications for microenvironment influence on tumor survival and proliferation. *Cancer research* **69**, 1009-1015 (2009).
496. Sison, E.A. & Brown, P. The bone marrow microenvironment and leukemia: biology and therapeutic targeting. *Expert review of hematology* **4**, 271-283 (2011).
497. Peled, A. & Tavor, S. Role of CXCR4 in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. *Theranostics* **3**, 34-39 (2013).
498. Sanz-Rodriguez, F., Hidalgo, A. & Teixido, J. Chemokine stromal cell-derived factor-1alpha modulates VLA-4 integrin-mediated multiple myeloma cell adhesion to CS-1/fibronectin and VCAM-1. *Blood* **97**, 346-351 (2001).
499. Hidalgo, A., *et al.* Chemokine stromal cell-derived factor-1alpha modulates VLA-4 integrin-dependent adhesion to fibronectin and VCAM-1 on bone marrow hematopoietic progenitor cells. *Experimental hematology* **29**, 345-355 (2001).
500. Nervi, B., *et al.* Chemosensitization of acute myeloid leukemia (AML) following mobilization by the CXCR4 antagonist AMD3100. *Blood* **113**, 6206-6214 (2009).
501. Zeng, Z., *et al.* Targeting the leukemia microenvironment by CXCR4 inhibition overcomes resistance to kinase inhibitors and chemotherapy in AML. *Blood* **113**, 6215-6224 (2009).
502. Buchner, M., *et al.* Spleen tyrosine kinase inhibition prevents chemokine- and integrin-mediated stromal protective effects in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **115**, 4497-4506 (2010).
503. Shalpour, S., *et al.* High VLA-4 expression is associated with adverse outcome and distinct gene expression changes in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia at first relapse. *Haematologica* **96**, 1627-1635 (2011).
504. Shanafelt, T.D., *et al.* CD49d expression is an independent predictor of overall survival in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a prognostic parameter with therapeutic potential. *British journal of haematology* **140**, 537-546 (2008).
505. Buggins, A.G., *et al.* Evidence for a macromolecular complex in poor prognosis CLL that contains CD38, CD49d, CD44 and MMP-9. *British journal of haematology* **154**, 216-222 (2011).
506. Nair, R.R., Gebhard, A.W., Emmons, M.F. & Hazlehurst, L.A. Emerging strategies for targeting cell adhesion in multiple myeloma. *Advances in pharmacology* **65**, 143-189 (2012).
507. Danylesko, I., Beider, K., Shimoni, A. & Nagler, A. Novel strategies for immunotherapy in multiple myeloma: previous experience and future directions. *Clinical & developmental immunology* **2012**, 753407 (2012).
508. Podar, K., *et al.* The selective adhesion molecule inhibitor Natalizumab decreases multiple myeloma cell growth in the bone marrow microenvironment: therapeutic implications. *British journal of haematology* **155**, 438-448 (2011).

509. Mraz, M., *et al.* Bone marrow stromal cells protect lymphoma B-cells from rituximab-induced apoptosis and targeting integrin alpha-4-beta-1 (VLA-4) with natalizumab can overcome this resistance. *British journal of haematology* **155**, 53-64 (2011).
510. Estrugo, D., *et al.* Ligand bound beta1 integrins inhibit procaspase-8 for mediating cell adhesion-mediated drug and radiation resistance in human leukemia cells. *PloS one* **2**, e269 (2007).
511. Walter, R.B., *et al.* High expression of the very late antigen-4 integrin independently predicts reduced risk of relapse and improved outcome in pediatric acute myeloid leukemia: a report from the children's oncology group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **28**, 2831-2838 (2010).
512. Becker, P.S., *et al.* Very late antigen-4 function of myeloblasts correlates with improved overall survival for patients with acute myeloid leukemia. *Blood* **113**, 866-874 (2009).
513. Walter, R.B., *et al.* Significance of expression of ITGA5 and its splice variants in acute myeloid leukemia: a report from the Children's Oncology Group. *American journal of hematology* **88**, 694-702 (2013).
514. Becker, P.S. Dependence of acute myeloid leukemia on adhesion within the bone marrow microenvironment. *TheScientificWorldJournal* **2012**, 856467 (2012).
515. Tripodo, C., *et al.* The bone marrow stroma in hematological neoplasms--a guilty bystander. *Nature reviews. Clinical oncology* **8**, 456-466 (2011).
516. Armstrong, T., *et al.* Type I collagen promotes the malignant phenotype of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **10**, 7427-7437 (2004).
517. Iwamoto, S., Mihara, K., Downing, J.R., Pui, C.H. & Campana, D. Mesenchymal cells regulate the response of acute lymphoblastic leukemia cells to asparaginase. *The Journal of clinical investigation* **117**, 1049-1057 (2007).
518. Bouchard, F., Belanger, S.D., Biron-Pain, K. & St-Pierre, Y. EGR-1 activation by EGF inhibits MMP-9 expression and lymphoma growth. *Blood* **116**, 759-766 (2010).
519. Seong, J., *et al.* Distinct biophysical mechanisms of focal adhesion kinase mechanoactivation by different extracellular matrix proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 19372-19377 (2013).
520. Richter, M., *et al.* Collagen distribution and expression of collagen-binding alpha1beta1 (VLA-1) and alpha2beta1 (VLA-2) integrins on CD4 and CD8 T cells during influenza infection. *Journal of immunology* **178**, 4506-4516 (2007).
521. Van Slambrouck, S., *et al.* Activation of the FAK-src molecular scaffolds and p130Cas-JNK signaling cascades by alpha1-integrins during colon cancer cell invasion. *International journal of oncology* **31**, 1501-1508 (2007).
522. Yang, C., *et al.* Integrin alpha1beta1 and alpha2beta1 are the key regulators of hepatocarcinoma cell invasion across the fibrotic matrix microenvironment. *Cancer research* **63**, 8312-8317 (2003).
523. Senger, D.R., *et al.* The alpha(1)beta(1) and alpha(2)beta(1) integrins provide critical support for vascular endothelial growth factor signaling, endothelial cell migration, and tumor angiogenesis. *The American journal of pathology* **160**, 195-204 (2002).
524. Brown, M.C., Staniszewska, I., Del Valle, L., Tuszynski, G.P. & Marcinkiewicz, C. Angiostatic activity of obtustatin as alpha1beta1 integrin inhibitor in experimental melanoma growth. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **123**, 2195-2203 (2008).
525. Liu, C.C., Leclair, P., Yap, S.Q. & Lim, C.J. The membrane-proximal KXGFFKR motif of alpha-integrin mediates chemoresistance. *Molecular and cellular biology* **33**, 4334-4345 (2013).
526. Siler, U., *et al.* Characterization and functional analysis of laminin isoforms in human bone marrow. *Blood* **96**, 4194-4203 (2000).

527. Seiffert, D. Detection of vitronectin in mineralized bone matrix. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* **44**, 275-280 (1996).
528. Steelman, L.S., *et al.* Contributions of the Raf/MEK/ERK, PI3K/PTEN/Akt/mTOR and Jak/STAT pathways to leukemia. *Leukemia* **22**, 686-707 (2008).
529. Steelman, L.S., *et al.* Roles of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway in leukemia therapy. *Leukemia* **25**, 1080-1094 (2011).
530. Steelman, L.S., *et al.* Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. *Aging* **3**, 192-222 (2011).
531. Knight, T. & Irving, J.A. Ras/Raf/MEK/ERK Pathway Activation in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia and Its Therapeutic Targeting. *Frontiers in oncology* **4**, 160 (2014).
532. Tasian, S.K., Teachey, D.T. & Rheingold, S.R. Targeting the PI3K/mTOR Pathway in Pediatric Hematologic Malignancies. *Frontiers in oncology* **4**, 108 (2014).
533. Aoudjit, F. & Vuori, K. Integrin signaling in cancer cell survival and chemoresistance. *Chemotherapy research and practice* **2012**, 283181 (2012).
534. Cohen, E., *et al.* Collagen I provides a survival advantage to MD-1483 head and neck squamous cell carcinoma cells through phosphoinositol 3-kinase signaling. *Anticancer research* **33**, 379-386 (2013).
535. Borel, F., *et al.* Adenosine triphosphate-binding cassette transporter genes up-regulation in untreated hepatocellular carcinoma is mediated by cellular microRNAs. *Hepatology* **55**, 821-832 (2012).
536. Chung, J. & Kim, T.H. Integrin-dependent translational control: Implication in cancer progression. *Microscopy research and technique* **71**, 380-386 (2008).
537. Bordeleau, M.E., *et al.* Therapeutic suppression of translation initiation modulates chemosensitivity in a mouse lymphoma model. *The Journal of clinical investigation* **118**, 2651-2660 (2008).
538. Cencic, R., *et al.* Modifying chemotherapy response by targeted inhibition of eukaryotic initiation factor 4A. *Blood cancer journal* **3**, e128 (2013).
539. Lim, S., *et al.* Targeting of the MNK-eIF4E axis in blast crisis chronic myeloid leukemia inhibits leukemia stem cell function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, E2298-2307 (2013).
540. Yoon, S. & Seger, R. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* **24**, 21-44 (2006).
541. Bijian, K., *et al.* Actin cytoskeleton regulates extracellular matrix-dependent survival signals in glomerular epithelial cells. *American journal of physiology. Renal physiology* **289**, F1313-1323 (2005).
542. Kelley, L.C., Hayes, K.E., Ammer, A.G., Martin, K.H. & Weed, S.A. Cortactin phosphorylated by ERK1/2 localizes to sites of dynamic actin regulation and is required for carcinoma lamellipodia persistence. *PloS one* **5**, e13847 (2010).
543. Brozovic, A. & Osmak, M. Activation of mitogen-activated protein kinases by cisplatin and their role in cisplatin-resistance. *Cancer letters* **251**, 1-16 (2007).
544. Krilleke, D., *et al.* Inhibition of JNK signaling diminishes early but not late cellular stress-induced apoptosis. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **107**, 520-527 (2003).
545. Lagadinou, E.D., *et al.* c-Jun N-terminal kinase activation failure is a new mechanism of anthracycline resistance in acute myeloid leukemia. *Leukemia* **22**, 1899-1908 (2008).
546. Xu, B., *et al.* Disulfiram/copper complex activated JNK/c-jun pathway and sensitized cytotoxicity of doxorubicin in doxorubicin resistant leukemia HL60 cells. *Blood cells, molecules & diseases* **47**, 264-269 (2011).

547. Yu, C., Rahmani, M., Dent, P. & Grant, S. The hierarchical relationship between MAPK signaling and ROS generation in human leukemia cells undergoing apoptosis in response to the proteasome inhibitor Bortezomib. *Experimental cell research* **295**, 555-566 (2004).
548. Kasimir-Bauer, S., *et al.* In acute myeloid leukemia, coexpression of at least two proteins, including P-glycoprotein, the multidrug resistance-related protein, bcl-2, mutant p53, and heat-shock protein 27, is predictive of the response to induction chemotherapy. *Experimental hematology* **26**, 1111-1117 (1998).
549. Wartlick, F., Bopp, A., Henninger, C. & Fritz, G. DNA damage response (DDR) induced by topoisomerase II poisons requires nuclear function of the small GTPase Rac. *Biochimica et biophysica acta* **1833**, 3093-3103 (2013).
550. Mah, L.J., El-Osta, A. & Karagiannis, T.C. gammaH2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia* **24**, 679-686 (2010).
551. Kuo, L.J. & Yang, L.X. Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In vivo* **22**, 305-309 (2008).
552. Zhu, G., *et al.* DNA Damage Induces the Accumulation of Tiam1 by Blocking beta-TrCP-dependent Degradation. *The Journal of biological chemistry* **289**, 15482-15494 (2014).
553. Spurlock, C.F., 3rd, *et al.* Increased sensitivity to apoptosis induced by methotrexate is mediated by JNK. *Arthritis and rheumatism* **63**, 2606-2616 (2011).
554. Kawabata, T., *et al.* Up-regulation of pro-apoptotic protein Bim and down-regulation of anti-apoptotic protein Mcl-1 cooperatively mediate enhanced tumor cell death induced by the combination of ERK kinase (MEK) inhibitor and microtubule inhibitor. *The Journal of biological chemistry* **287**, 10289-10300 (2012).
555. Wertz, I.E., *et al.* Sensitivity to antitubulin chemotherapeutics is regulated by MCL1 and FBW7. *Nature* **471**, 110-114 (2011).
556. Inaba, H. & Pui, C.H. Glucocorticoid use in acute lymphoblastic leukaemia. *The lancet oncology* **11**, 1096-1106 (2010).
557. Wuchter, C., *et al.* In vitro susceptibility to dexamethasone- and doxorubicin-induced apoptotic cell death in context of maturation stage, responsiveness to interleukin 7, and early cyto-reduction in vivo in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **99**, 4109-4115 (2002).
558. Drigo, I., *et al.* Selective resistance to different glucocorticoids in severe autoimmune disorders. *Clinical immunology* **134**, 313-319 (2010).
559. Kfir-Erenfeld, S., Sionov, R.V., Spokoini, R., Cohen, O. & Yefenof, E. Protein kinase networks regulating glucocorticoid-induced apoptosis of hematopoietic cancer cells: fundamental aspects and practical considerations. *Leukemia & lymphoma* **51**, 1968-2005 (2010).
560. Tsitoura, D.C. & Rothman, P.B. Enhancement of MEK/ERK signaling promotes glucocorticoid resistance in CD4+ T cells. *The Journal of clinical investigation* **113**, 619-627 (2004).
561. Heidari, N., Hicks, M.A. & Harada, H. GX15-070 (obatoclox) overcomes glucocorticoid resistance in acute lymphoblastic leukemia through induction of apoptosis and autophagy. *Cell death & disease* **1**, e76 (2010).
562. Loriaux, M.M., *et al.* High-throughput sequence analysis of the tyrosine kinome in acute myeloid leukemia. *Blood* **111**, 4788-4796 (2008).
563. Szakacs, G., *et al.* Targeting the achilles heel of multidrug-resistant cancer by exploiting the fitness cost of resistance. *Chemical reviews* **114**, 5753-5774 (2014).
564. Griessinger, E., *et al.* A niche-like culture system allowing the maintenance of primary human acute myeloid leukemia-initiating cells: a new tool to decipher their chemoresistance and self-renewal mechanisms. *Stem cells translational medicine* **3**, 520-529 (2014).

565. Bertrand, J., *et al.* Sex differences in the GSK3beta-mediated survival of adherent leukemic progenitors. *Oncogene* **31**, 694-705 (2012).
566. Zhang, Z., Vuori, K., Reed, J.C. & Ruoslahti, E. The alpha 5 beta 1 integrin supports survival of cells on fibronectin and up-regulates Bcl-2 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 6161-6165 (1995).
567. Annels, N.E., *et al.* Possible link between unique chemokine and homing receptor expression at diagnosis and relapse location in a patient with childhood T-ALL. *Blood* **103**, 2806-2808 (2004).
568. Azin, A., *et al.* Relapse of acute myeloid leukemia manifested by cholecystitis: A case report and review of the literature. *International journal of surgery case reports* **5**, 302-305 (2014).
569. Friedman, B., *et al.* Isolated cutaneous extramedullary relapse of leukemia confirmed by fluorescent in situ hybridization analysis. *Journal of the American Academy of Dermatology* **67**, e162-164 (2012).
570. Liu, J.F., *et al.* Cyclooxygenase-2 enhances alpha2beta1 integrin expression and cell migration via EP1 dependent signaling pathway in human chondrosarcoma cells. *Molecular cancer* **9**, 43 (2010).
571. Lu, J., *et al.* Pancreatic stellate cells promote hapto-migration of cancer cells through collagen I-mediated signalling pathway. *Br J Cancer* **110**, 409-420 (2014).
572. Ricci, E., *et al.* Increased expression of putative cancer stem cell markers in the bone marrow of prostate cancer patients is associated with bone metastasis progression. *The Prostate* **73**, 1738-1746 (2013).
573. Ho, W.C., *et al.* Modulation of in vivo migratory function of alpha 2 beta 1 integrin in mouse liver. *Molecular biology of the cell* **8**, 1863-1875 (1997).
574. Huang, C., Jacobson, K. & Schaller, M.D. MAP kinases and cell migration. *J Cell Sci* **117**, 4619-4628 (2004).
575. Bendall, L.J., Baraz, R., Juarez, J., Shen, W. & Bradstock, K.F. Defective p38 mitogen-activated protein kinase signaling impairs chemotactic but not proliferative responses to stromal-derived factor-1alpha in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer research* **65**, 3290-3298 (2005).
576. Grenache, D.G., *et al.* Wound healing in the alpha2beta1 integrin-deficient mouse: altered keratinocyte biology and dysregulated matrix metalloproteinase expression. *The Journal of investigative dermatology* **127**, 455-466 (2007).
577. Parks, W.C. What is the alpha2beta1 integrin doing in the epidermis? *The Journal of investigative dermatology* **127**, 264-266 (2007).
578. Zweers, M.C., *et al.* Integrin alpha2beta1 is required for regulation of murine wound angiogenesis but is dispensable for reepithelialization. *The Journal of investigative dermatology* **127**, 467-478 (2007).
579. Perruzzi, C.A., *et al.* Functional overlap and cooperativity among alphav and beta1 integrin subfamilies during skin angiogenesis. *The Journal of investigative dermatology* **120**, 1100-1109 (2003).
580. Heemskerk, J.W., *et al.* Function of glycoprotein VI and integrin alpha2beta1 in the procoagulant response of single, collagen-adherent platelets. *Thrombosis and haemostasis* **81**, 782-792 (1999).
581. Zhang, Z., *et al.* alpha2beta1 integrin expression in the tumor microenvironment enhances tumor angiogenesis in a tumor cell-specific manner. *Blood* **111**, 1980-1988 (2008).
582. Chen, J., Diacovo, T.G., Grenache, D.G., Santoro, S.A. & Zutter, M.M. The alpha(2) integrin subunit-deficient mouse: a multifaceted phenotype including defects of branching morphogenesis and hemostasis. *The American journal of pathology* **161**, 337-344 (2002).

583. Holtkotter, O., *et al.* Integrin alpha 2-deficient mice develop normally, are fertile, but display partially defective platelet interaction with collagen. *The Journal of biological chemistry* **277**, 10789-10794 (2002).
584. Rao, W.H., Hales, J.M. & Camp, R.D. Potent costimulation of effector T lymphocytes by human collagen type I. *Journal of immunology* **165**, 4935-4940 (2000).
585. McCall-Culbreath, K.D., Li, Z. & Zutter, M.M. Crosstalk between the alpha2beta1 integrin and c-met/HGF-R regulates innate immunity. *Blood* **111**, 3562-3570 (2008).
586. McCall-Culbreath, K.D. & Zutter, M.M. Collagen receptor integrins: rising to the challenge. *Current drug targets* **9**, 139-149 (2008).
587. Edelson, B.T., Li, Z., Pappan, L.K. & Zutter, M.M. Mast cell-mediated inflammatory responses require the alpha 2 beta 1 integrin. *Blood* **103**, 2214-2220 (2004).
588. Boisvert, M., Gendron, S., Chetoui, N. & Aoudjit, F. Alpha2 beta1 integrin signaling augments T cell receptor-dependent production of interferon-gamma in human T cells. *Molecular immunology* **44**, 3732-3740 (2007).
589. Boisvert, M., Chetoui, N., Gendron, S. & Aoudjit, F. Alpha2beta1 integrin is the major collagen-binding integrin expressed on human Th17 cells. *European journal of immunology* **40**, 2710-2719 (2010).
590. Kassiotis, G., Gray, D., Kiafard, Z., Zwirner, J. & Stockinger, B. Functional specialization of memory Th cells revealed by expression of integrin CD49b. *Journal of immunology* **177**, 968-975 (2006).
591. de Fougères, A.R., *et al.* Regulation of inflammation by collagen-binding integrins alpha1beta1 and alpha2beta1 in models of hypersensitivity and arthritis. *The Journal of clinical investigation* **105**, 721-729 (2000).
592. Tsunoda, I., *et al.* Modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by VLA-2 blockade. *Brain pathology* **17**, 45-55 (2007).
593. El Azreq, M.A., *et al.* alpha2beta1 integrin regulates Th17 cell activity and its neutralization decreases the severity of collagen-induced arthritis. *Journal of immunology* **191**, 5941-5950 (2013).
594. Eble, J.A. Collagen-binding integrins as pharmaceutical targets. *Current pharmaceutical design* **11**, 867-880 (2005).
595. Goodman, S.L. & Picard, M. Integrins as therapeutic targets. *Trends in pharmacological sciences* **33**, 405-412 (2012).

