

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

RÔLE DE MT1-MMP DANS L'INTERRELATION ENTRE LES VOIES SMAD2/3
ET JAK/STAT3 IMPLIQUÉES DANS LA TRANSITION ÉPITHÉLIO-
MÉSENCHYMATEUSE DES CELLULES U87 DE GLIOBLASTOMES

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR

SOUAD DJEDIAI

Février 2022

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.04-2020). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je remercie mon directeur de recherche Borhane Annabi pour m'accorder la chance d'intégrer son équipe de recherche, m'avoir donné cette extraordinaire opportunité de goûter à la recherche scientifique et de m'avoir poussé à la performance.

Je remercie Cyndia Charfi pour ses précieux conseils, ses encouragements et ses mots de gentillesse et d'attention, Alain Zgheib pour son aide sans façons ni conditions et Fatima Belkourchia pour ses conseils pertinents.

Je suis énormément redevable à Narjara Gonzalez-Suarez pour la foule de conseils techniques et théoriques, m'avoir appris des techniques et de m'avoir écouté quand j'en avais besoin, à Sahily Rodriguez-Torres et Layal El-Cheikh Hussein pour m'avoir prêté mains fortes pour la réalisation et l'achèvement de certaines de mes expériences.

Je suis également très reconnaissante au laboratoire du professeur Marc Lussier et ses doctorantes Valérie et Kim pour m'avoir permis d'utiliser le Chemidoc et éclairer ma lanterne quant à son utilisation.

A Pierre Cayer d'avoir répondu présent lorsque j'ai sollicité son aide et d'avoir fait preuve de patience, de m'avoir rappelé la rigueur lorsque je l'ai oublié.

Je remercie énormément le professeur François Ouellet, d'avoir contribué à mon intégration et ma réussite à l'UQAM, pour tous ses conseils si pertinents.

Je ne veux pas oublier madame Sonia Lachance qui répondait à toute mes questions, une mine d'information académique. Vous êtes partie et je n'ai pas pu vous dire au revoir, aujourd'hui je vous salue.

Enfin, je remercie vivement la Chaire de Prévention et Traitement du Cancer, la Fondation UQAM et la bourse Lapointe-Rosendahl pour avoir financé mes études.

DÉDICACE

*Je pense à mon père que j'aime profondément
Tu m'as toujours encouragé de façon inconditionnelle
Je te suis à jamais reconnaissante*

*A ma mère je t'aime maman
Merci de m'avoir conseillé et soutenue
Je n'oublierai jamais tes sacrifices*

*A mon mari sans qui je ne serais pas venue au Québec
Merci de m'avoir épaulé et soutenu*

Je dédie mon mémoire tout particulièrement à mes enfants, Nouha Nada et Zineddine

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES.....	VII
LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES.....	VIII
RESUMÉ	X
CHAPITRE I INTRODUCTION.....	11
1.1 Définition du cancer.....	11
1.1.1 Définition du GBM.....	13
1.1.2 Les caractéristiques des glioblastomes	14
1.1.3 L'origine cellulaire des glioblastomes.....	14
1.1.4 Les facteurs influençant la survenue du GBM.....	17
1.1.5 Les statistiques sur la mortalité associée au GBM	18
1.2 Diagnostiquer les glioblastomes	19
1.2.1 Motifs de consultation	19
1.2.2 Classification et diagnostic d'un glioblastome	19
1.2.3 Diagnostic morphologique et histologique	20
1.2.4 Diagnostic moléculaire	20
1.2.5 Hétérogénéité intra-tumorale	22
1.2.5.1 Les cellules souches de gliome	28
1.2.5.2 Cellules tumorales circulantes	29
1.3 Transition épithélio-mésenchymateuse.....	29
1.4 Les facteurs de croissance.....	32
1.4.1 La famille du facteur de croissance épidermique (EGF)	32
1.4.1.1 La famille du facteur de croissance fibroblastique (FGF).....	34
1.4.1.2 La famille des facteurs de croissance transformant (TGF)	34
1.4.1.3 La famille du facteur de croissance vasculaire endothéliale (VEGF).....	35
1.4.1.4 La famille du facteur de croissance dérivé de plaquette (PDGFR) ...	35
1.4.1.5 Le facteur de nécrose tumorale α (TNF α)	36
1.4.1.6 La famille du facteur de croissance de l'angiopoïétine	36
1.4.2 Les facteurs de transcription	36

1.4.2.1	SNAIL.....	37
1.4.2.2	TWIST.....	38
1.4.2.3	ZEB	38
1.4.3	Les métalloprotéinases matricielles.....	39
1.4.4	Les récepteurs tyrosine kinase	43
1.5	Les traitements anti-cancéreux.....	46
1.5.1	La chirurgie.....	46
1.5.2	La chimiothérapie	47
1.5.2.1	Les agents alkylants.....	47
1.5.2.2	Nitrosourées.....	48
1.5.2.3	Les inhibiteurs d'intégrines	48
1.5.2.4	Les inhibiteurs des tyrosines kinases.....	48
1.5.2.5	Les inhibiteurs de topoisomérases.....	49
1.5.2.6	Les inhibiteurs d'acétylation d'histone	49
1.5.2.7	Les anthracyclines	49
1.5.3	Radiothérapie.....	50
1.5.4	Autres thérapies	50
1.6	Chimioprévention et EGCG.....	51
1.6.1	L'EGCG.....	52
1.6.2	Les applications actuelles de l'EGCG	53
1.7	Projet de recherche.....	55
1.7.1	Problématique	55
1.7.2	Hypothèse de travail	56
1.7.3	Objectif de recherche	56
CHAPITRE II ARTICLE.....		58
MT1-MMP COOPERATES WITH TGF-B RECEPTOR-MEDIATED SIGNALING TO TRIGGER SNAIL AND INDUCE EPITHELIAL-TO-MESENCHYMAL-LIKE TRANSITION IN U87 GLIOBLASTOMA CELLS.....		58
2.1	Résumé.....	61
2.2	Abstract	62
2.3	Introduction.....	63
2.4	Materials and methods	65

2.4.1	Materials	65
2.4.2	Cell culture.....	65
2.4.3	Immunoblotting procedures.....	66
2.4.4	Gelatin zymography.....	66
2.4.5	Total RNA isolation, cDNA synthesis and real-time quantitative PCR...	66
2.4.6	Total RNA library preparation and sequencing.....	67
2.4.7	Reads alignment and differential expression analysis	68
2.4.8	Human EMT PCR array	68
2.4.9	RNA interference.....	69
2.4.10	Statistical data analysis	69
2.5	Results.....	70
2.5.1	SNAIL among the common EMT biomarkers induced by Concanavalin A and TGF- β in U87 glioblastoma cells	70
2.5.2	Galunisertib and EGCG inhibit TGF- β - and Concanavalin A-mediated SNAIL induction	71
2.5.3	MT1-MMP silencing represses TGF- β - and Concanavalin A-mediated induction of SNAIL	71
2.5.4	Concanavalin A and TGF- β trigger common signaling pathways	72
2.5.5	Evidence for MT1-MMP and SNAIL involvement in the chemotactic response to TGF- β in U87 glioblastoma cells	72
2.5.6	Pharmacological inhibition of the STAT3 signaling pathway abrogates the chemotactic response to TGF- β	73
2.6	Discussion	74
2.7	Conclusion	76
2.8	References	86
	CHAPITRE III DISCUSSION.....	95
	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	106
	BIBLIOGRAPHIE	108

LISTE DES FIGURES

FIGURE	PAGE
Figure 1.1: Le nombre de décès selon la cause survenus au Québec en 2019.....	12
Figure 1.2 : Le nombre de décès selon la cause survenus au Canada en 2019	12
Figure 1.3 : Origine des cellules souches neurales	16
Figure 1.4 : Classification des gliomes selon l'OMS 2016	23
Figure 1.5 : Modèle de Neftel sur l'hétérogénéité intra-tumorale	26
Figure 1.6 : Représentation schématique de la progression de l'EMT.....	33
Figure 1.7 : Les domaines de MT1-MMP et ses modifications post-traductionnelles	41
Figure 1.8 : Rôle de MT1-MMP dans la migration et l'invasion cellulaire	43
Figure 1.9 : Modèle de l'activation de la proMMP-2 par MT1-MMP	45
Figure 1.10 : Structure chimique de (-)-épigallocatechine-3-gallate (EGCG)	54

LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
AKT	Homologue d'oncogène viral Thymome murin V-Akt 1
CDK	Cyclin Dependent Kinase
CDKN2A	Cyclin Dependent Kinase inhibitor 2A
ConA	Concanavaline A
CSN	Cellules Souches Neurales
EGCG	Épigallo-Cathéchine Gallate
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMT	Epithelial-to-Mesenchymal Transition
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
FT	Facteur de Transcription
GBM	Glioblastome Multiforme
HIF	Hypoxia Inducible Factor
IDH	Isocythrate Déhydrogenase
JAK	Janus Kinase
MET	MET-proto-oncogène recpeteur tyrosine kinase
MMP	Métalloprotéinase Matricielle
MT1-MMP	Membrane Type 1- Matrix Metalloproteinase
mTOR	Mechanistic Target of Rapamycin Kinase
NF- κ B	Nuclear Factor κ B
OMS	Organisation mondiale pour la santé

OLIG	Oligodendrocyte transcription factor
P53/TP53	Tumor Protein 53
PATJ	Pals-Associated Tight Junction
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
RT-qPCR	Réverse-Transcription- quantitative Polymerase Chain Reaction
SNC	Système nerveux centrale
siRNA	Small interfering RNA
SNAI	SNAI transcription factor family
SOX	SRY-box transcription factor
SRC	SRC proto-oncogene non receptor tyrosine kinase
STAT	Signal Transcription and Activator of Transcription
TGF β	Transforming Growth Factor- β
T β R	TGF β receptor
TNF α	Tumor Necrosis Factors α
TWIST	Transcription factor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
ZEB	Zinc E-Box Binding homeodomain

RESUMÉ

Parmi les cancers les plus agressifs figure le glioblastome multiforme (GBM), une tumeur maligne primitive du système nerveux central. Le traitement par chimiothérapie se voit confronté à la récurrence de la tumeur par sélection de clones résistants, faisant échouer tout espoir de guérison. La caractéristique qui véhicule l'agressivité de ce type de tumeur, est la capacité à envahir les tissus environnants et de se propager via le processus de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT). Ce processus fait intervenir des facteurs de transcription comme SNAIL, des métalloprotéinases comme MT1-MMP et des protéines régulatrices telles que SMAD2/3, SRC et JAK/STAT3. Notre objectif, dans un premier temps, est d'évaluer l'effet de l'épigallocatechine gallate (EGCG), une molécule naturelle dérivée du thé, sur les voies de signalisations de l'EMT en présence et en absence de Concanavalline A (ConA) ou de TGF β , conditions connues pour induire l'EMT. La RT-qPCR a révélé que l'EGCG inhibe l'induction de l'expression des gènes de l'EMT similairement au Galunisertib, un inhibiteur pharmacologique de la fonction kinase du récepteur au TGF β . Ces résultats sont confirmés au niveau protéique par immunobuvardage. Dans un deuxième temps, notre travail vise à définir SNAIL ou MT1-MMP comme précurseur dans la cascade d'événements menant à l'EMT. Le "knock-down" des protéines cibles, a montré que l'absence de MT1-MMP réduit significativement l'expression de SNAIL, mais l'absence de SNAIL n'altère pas significativement l'expression de MT1-MMP. L'absence de MT1-MMP a également pour effet de réduire l'activation de SMAD2/3 en présence de TGF β . Ceci montre que MT1-MMP est un intermédiaire dans la transduction du signal induit par le TGF β . L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques des voies de signalisation Jak/STAT3, le Tofacitinib et l'AG490 respectivement, réduit la migration cellulaire. Sur le système Excelligence, l'EGCG avait le plus faible index de migration, ce qui en fait le meilleur inhibiteur de migration cellulaire et par conséquent de l'EMT.

Mots clés : Concanavalline A, épigallocatechine gallate, Galunisertib, MT1-MMP

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Définition du cancer

Le cancer est la 1^{ère} cause de décès au Canada et au Québec (www.statcan.gc.ca ; <https://statistique.quebec.ca/fr>) et la 2^{ème} cause de décès au monde avec 10 millions de morts en 2020 (OMS, 2021). La mortalité par le cancer était de 225 800 nouveaux cas de cancer 2020 au Canada, touchant plus d'hommes (51,28%) que de femmes (48,7%) (Brenner et al., 2020).

Le cancer est une prolifération anarchique de cellules ayant subi une conversion néoplasique. Il se développe à partir de cellules normales suites à plusieurs événements mutationnels. Le processus de cancérogenèse est causé par de multiples changements de l'expression des gènes, menant à la dérégulation de la balance entre la mort cellulaire et la prolifération cellulaire (Ruddon, 2007). Le processus de transformation néoplasique des cellules normales est souvent dû à des produits chimiques cancérogènes, des virus oncogènes ou des radiations (2011).

Le cancer est la première de cause de mortalité au Québec et au Canada (figure 1.1 et 1.2) (www.statcan.gc.ca ; <https://statistique.quebec.ca/fr>). En effet, en 2019 au Canada sur le total des morts, environ 30% concerne des cas de tumeurs dont 97% sont des tumeurs malignes. Sur les 79 844 cas de décès en 2018 provoqués par une tumeur maligne, 52,8% sont des hommes tandis que 47,2% sont des femmes soit un ratio de 1,12. Ce ratio a subi une légère augmentation (1,15) en 2019 (www.statcan.gc.ca).

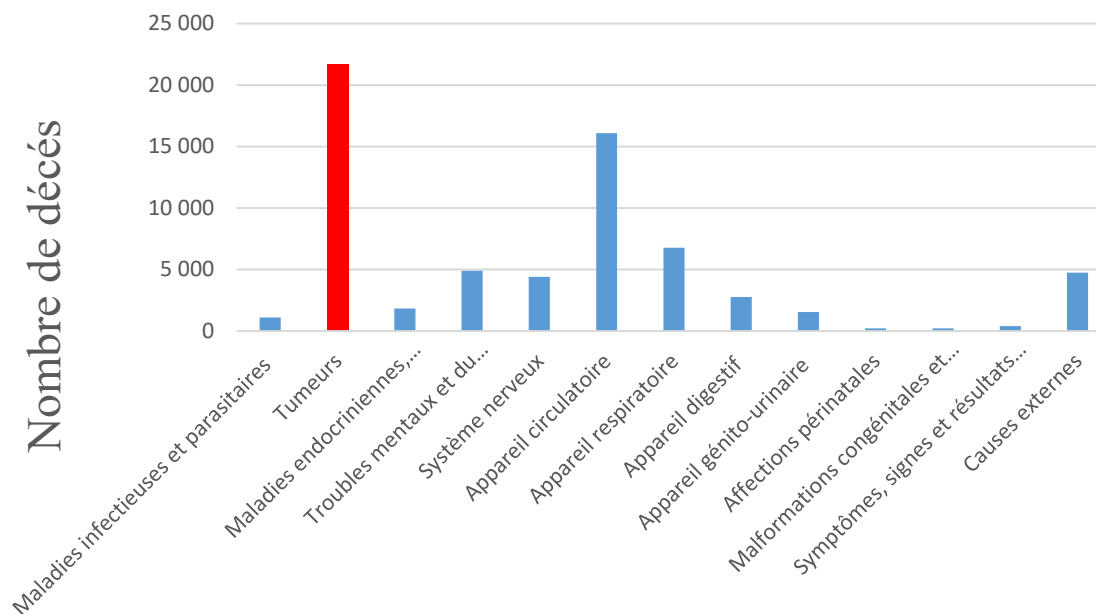


Figure 1.1: Le nombre de décès selon la cause survenus au Québec en 2019. La colonne rouge représente les décès par les tumeurs tous types confondus. Adapté de statistique.quebec.ca/fr Consulté le 09-12-2021.

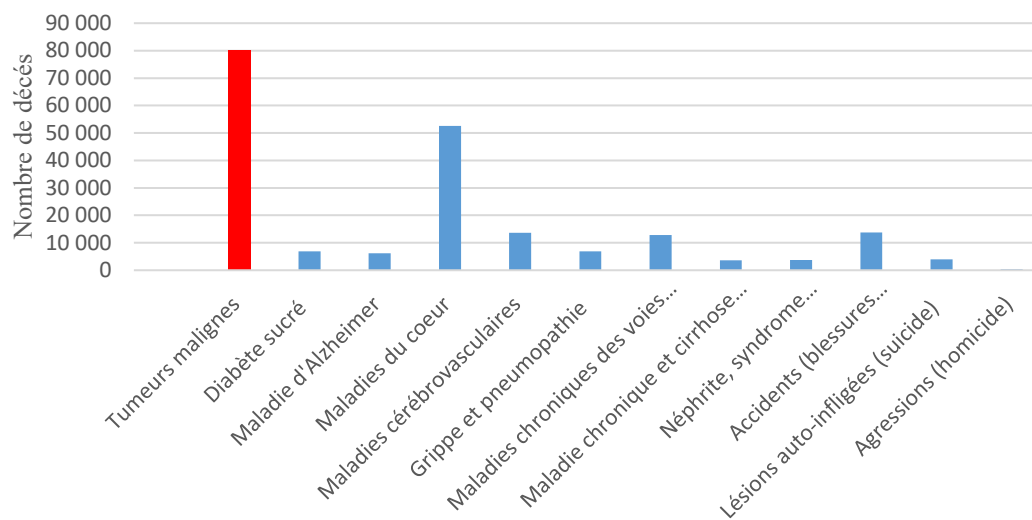


Figure 1.2 : Le nombre de décès selon la cause survenus au Canada en 2019. La colonne en rouge regroupe les décès par tumeurs malignes. Adapté de www.statcan.gc.ca Consulté le 09-12-2021.

1.1.1 Définition du GBM

Le terme glioblastome GBM, réfère à une tumeur primitive du système nerveux central (SNC), la plus fréquente, la plus agressive et représente environ 3% des cas de cancer dans le monde (Miranda-Filho *et al.*, 2017). En effet parmi les tumeurs malignes primitives du SNC recensées entre 1985 et 2014, plus de la moitié (52,5%) sont des Glioblastomes (de Vocht, 2019). D'autre part, l'espérance de vie des patients atteints de Glioblastomes primaires varie entre 12 et 18 mois, en comparaison au Glioblastome secondaire dont l'espérance de vie chez les patients, peut atteindre jusqu'à 10 ans. Les Glioblastomes primaires sont plus fréquents et surviennent sans antécédent de maladie et touchent des sujets d'une moyenne d'âge de 60 ans (Maher *et al.*, 2006). Les Glioblastomes secondaires résultent quant à eux, d'une transformation anaplasique d'un gliome infiltrant de grade II ou III (Lamairac et Paquis, 2015). Il semblerait que la conversion des cellules du cerveau en cellules tumorales soit hautement complexe. Elle résulterait de la dérégulation des voies de signalisation inter-reliées et impliquerait la surexpression d'oncogènes (EGF, EGFR, PDGF, PDGFR, AKT et mTOR) en plus d'un déficit en gènes suppresseurs de tumeurs (P53, Rb (Rétinoblastome), P16, DMBT1 et PTE). L'incidence du cancer augmente de façon proportionnelle avec l'âge. Pour qu'une tumeur solide apparaisse, une seule cellule tumorale originelle doit accumuler une cohorte de mutations motrices dans les gènes oncogènes ou dans les gènes suppresseurs de tumeurs (Alcantara Llaguno *et al.*, 2019). Les analyses moléculaires ont révélé que la surexpression du gène EGFR était exclusive au GBM primaire et la perte du gène TP53 est propre à l'astrocytome et le GBM secondaire, tandis que la déficience de PTEN et CDK2A et la surexpression de CDK4 et MDM2 (Mouse Double Minute 2) est un phénotype commun (Maher *et al.*, 2006).

1.1.2 Les caractéristiques des glioblastomes

Les aberrations génétiques peuvent être regroupées selon leur impact en ceux affectant la signalisation des facteurs de croissances et ceux provoquant une dérégulation des voies de signalisation du cycle cellulaire (Ray et Ray, 2010).

Les glioblastomes sont qualifiés de multiformes car ils sont constitués d'un groupe de tumeurs hétérogènes, en raison de leur importante variabilité morphologique, cytologique et moléculaire (Lamairac et Paquis, 2015). Ils peuvent être constitués d'astrocytes, d'oligodendrocytes ou d'un mélange des deux types cellulaires (Ray et Ray, 2010).

1.1.3 L'origine cellulaire des glioblastomes

Le glioblastome multiforme (GBM) est un cancer du SNC qui se singularise par une population cellulaire très hétérogène. Les cellules de GBM présentent à la fois les caractéristiques de cellules astrocytaires et oligodendrocytaires (Zong *et al.*, 2012). Parmi les cellules qui le composent, il existe également une petite sous-population ayant les traits distinctifs des cellules souches, à savoir, la capacité d'auto-renouvellement, de prolifération, multipotentes et aptes à la migration, ce sont les cellules souches de gliome (CSG) (Matarredona et Pastor, 2019). Étant donné l'hétérogénéité cellulaire des GBM, il n'est pas simple de définir son origine cellulaire. Pour la comprendre, il est donc nécessaire de connaître le SNC et son développement normal.

Le neurone ou la cellule nerveuse est un élément cellulaire différencié du SNC, il représente l'unité de base au niveau fonctionnel (Dubret *et al.*, 1985). Les premières cellules à l'origine du SNC sont les cellules neuro-épithéliales aussi appelées cellules souches neurales (CSN) (de Chevigny et Lledo, 2006).

Dans le cerveau adulte des mammifères, il existe deux niches neurogéniques de CSN (figure 1.3) (Bond *et al.*, 2015) :

- La zone sous-ventriculaire tapissant les ventricules latéraux (SVZ)
- La zone sous-granulaire au sein du gyrus denté de l'hippocampe (SGZ)

Durant les stades précoces du développement cérébral, les CSN se divisent symétriquement dans la zone ventriculaire et se différencient en cellules de la glie radiale. Cette dernière se divise asymétriquement en cellules de la glie radiale pour maintenir le stock de cellules progénitrices et, soit en neurone immature ou en progéniteur neuronal intermédiaire de type neuronal ou oligodendrocytaire (Traiffort et Ferent, 2015).

La question qui se pose : est-ce que l'hétérogénéité cellulaire des GBM provient de la transformation néoplasique de plusieurs types neuronaux ou bien c'est une même origine cellulaire qui se manifeste différemment sous l'effet de différentes mutations ? (Zong *et al.*, 2012). Plusieurs faits nous aident à répondre à cette question :

- 1- Les marqueurs d'expression de surface et la morphologie des cellules dans les GBM sont similaires aux CSN normales,
- 2- Le profil génétique des cellules GBM est similaire à celui des cellules normales,
- 3- Le fait que les CSN et les astrocytes dérivés des CSN ainsi que les cellules progénitrices oligodendrocytiques, soient capables d'évoluer en GBM indiquent que les CSN sont à l'origine des GBM (Yao *et al.*, 2018).

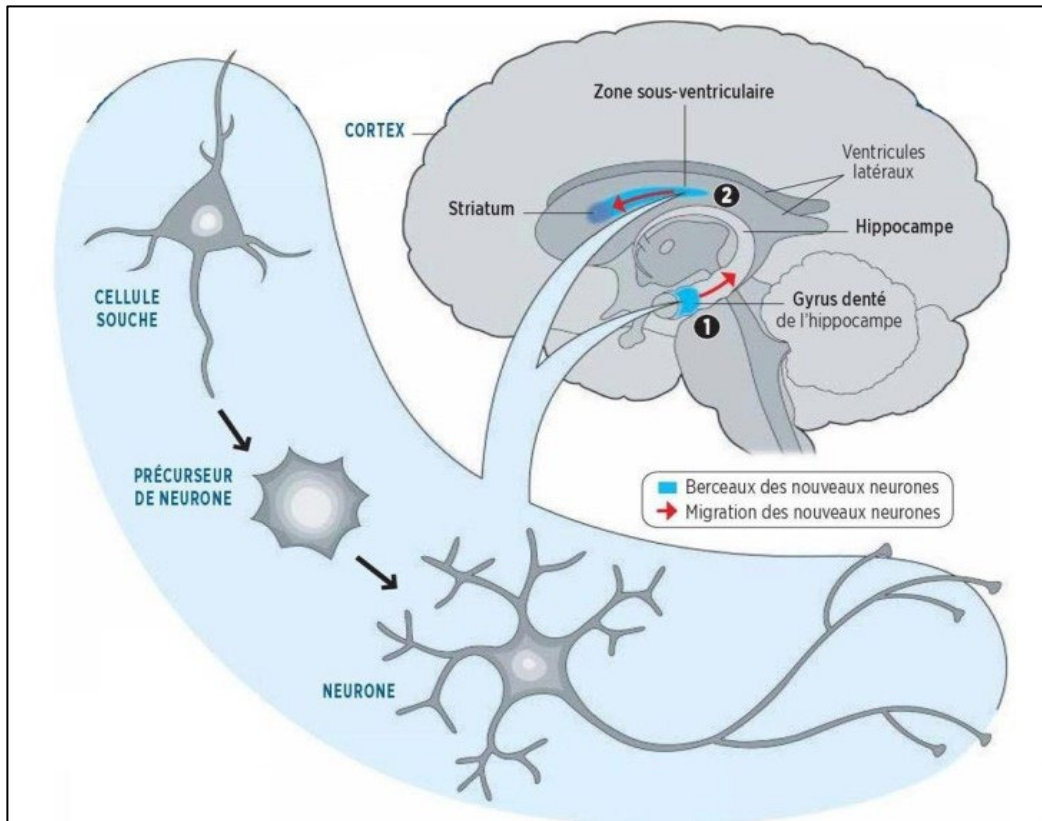


Figure 1.3 : Origine des cellules souches neurales. Dans la zone sou-ventriculaire dans le cerveau humain, les cellules souches neuronales se différencient en précurseurs neuronaux puis en neurones (Adami *et al.*, 2015).

De nombreuses études ont tenté de le prouver. C'est le cas notamment des travaux de recherches de Lee *et al.*, en 2018 qui ont démontré par séquençage qu'il y avait une correspondance entre les cellules tumorales de GBM et les tissus normaux de la SVZ et mieux encore, plus de la moitié des patients avec un GBM possédaient un faible taux de mutations motrices de GBM dans le promoteur du gène TERT (Transcriptase inverse de la Télomérase) ou dans les gènes pro-cancéreux EGFR, PTEN et TP53 (Lee *et al.*, 2018). Ces dernières mutations, introduites chez des souris, furent suffisantes pour induire non seulement un GBM mais ont aussi démontré que les CSN à leur origine ont migré de la SVZ au cortex dorso-latéral caudal, site de la gliomagenèse. Les résultats des travaux d'Alcantara Llaguno *et al.*, (2019) soutiennent les conclusions

de Lee *et al.*, (2018) puisqu'ayant ciblé différents stades de différenciation des CSN adultes chez la souris, ont pu discriminer les cellules à même d'induire des GBM. En effet, en provoquant la déplétion des gènes suppresseurs de tumeurs comme *Trp53*, *Nf1* (Neurofibromatose de type 1) et *Pten* chez la souris, ils ont démontré que contrairement à 100% d'incidence de GBM dans les CSN, leur absence des cellules plus différenciées ne leur permettait pas de former de GBM. Seules les CSN, les cellules progénitrices bipotentes et les oligodendrocytes en étaient capables.

1.1.4 Les facteurs influençant la survenue du GBM

Lorsqu'on s'intéresse aux facteurs influençant la survenue des cancers en général, on doit tenir compte de trois paramètres : l'environnement, les maladies et la prédisposition génétique.

Les facteurs environnementaux regroupent l'air qu'on respire, notre style de vie et notre comportement. Actuellement, aucune preuve d'association entre la survenue du GBM et le style de vie ou la consommation d'alcool, de drogues ou encore d'un régime alimentaire particulier n'a été rapporté. Cependant, un lien entre l'âge, le genre et l'ethnie est clairement observable. En effet, la moyenne d'âge des patients atteints de GBM est de 64 ans avec un ratio homme/femme 1,6 fois supérieur pour le GBM primaire et 0,65 fois pour le GBM secondaire. De plus le GBM a une incidence deux fois plus élevée chez les sujets de race blanche en comparaison aux individus de race noire, asiatique/pacifique et Amérindiens/natif d'Alaska (Thakkar *et al.*, 2014). Deux études contradictoires traitant de l'impact de l'usage du téléphone cellulaire sur la survenue de GBM ou sur la survie des patients atteints de GBM font polémique. Alors que Carlberg et Hardell (2014) stipulent que l'usage du téléphone sans fil à long terme entraîne une baisse statistiquement significative de la survie des patients atteints de gliome (Carlberg et Hardell, 2014); deVocht, 2019) quant à lui affirme que le fait que

l'utilisation du téléphone cellulaire soit la cause des GBM du lobe frontal, temporal et cérébelleux, semble improbable.

Il faut garder à l'esprit qu'il existe deux formes de GBM, le primaire et le secondaire. Le GBM primaire se déclare dans la majorité des cas à un âge adulte avancé sans antécédents, tandis que le GBM secondaire peut se développer chez des sujets plus jeunes (entre 20 et 40 ans) à partir d'astrocytomes de faible grade (grade II ou III) (Vleeschouwer, 2017). Les analyses moléculaires ont révélé que la surexpression du gène EGFR était exclusive au GBM primaire et la perte de gène TP53 est propre à l'astrocytome et le GBM secondaire, tandis que la déficience de PTEN et CDK2A et la surexpression de CDK4 et MDM2 (Mouse Double Minute 2) est un phénotype commun (Maher *et al.*, 2006).

1.1.5 Les statistiques sur la mortalité associée au GBM

Au Québec en 2020, sur le total des décès dus au cancer, 637 personnes sont mortes d'un cancer du SNC, un chiffre en augmentation d'environ 15% par rapport à 2019. Le ratio homme/ femme semble avoir baissé en 2020 comparé à 2019. Sur les 637 décès dus à un cancer SNC 55,4% sont des hommes et 44,8% sont des femmes donnant un ratio de 1,2. Paradoxalement, ce ratio a sensiblement baissé malgré l'augmentation du nombre de décès observé par rapport à 2019, passant de 1,4 à 1,2. (<https://statistique.quebec.ca/fr>).

Au Canada en 2017, 154 685 nouveaux cas de cancer ont été recensés et 156 620 en 2018 soit une augmentation de 1,25% dont plus de la moitié (51,41%) sont des hommes (www.statcan.gc.ca). Sur la base des données recueillies en 2015, la société Canadienne du cancer estime qu'en 2020, 3000 personnes mourront d'un cancer de l'encéphale ou du SNC. Le comité consultatif de la société Canadienne du cancer quant

à lui, estime que les cas de cancer entre 2028-2032, subiront une augmentation de 79% chez les femmes et 84% chez les hommes, et que le nombre de nouveaux cas devrait plus que doubler chez les 65 ans et plus (www.statcan.gc.ca).

1.2 Diagnostiquer les glioblastomes

1.2.1 Motifs de consultation

Selon Santé Canada, il y a des signes annonciateurs de GBM d'ordre général comme des troubles de la vue, des changements du comportement et des maux de têtes. Ce sont néanmoins des symptômes plus spécifiques, comme la nausée, les vomissements, les troubles de la vigilance et de l'asthénie traduisant une hyperpression intra-carienne et qui précèdent ceux d'ordre neurologique tels que des crises d'épilepsie inaugurale, qui amènent les patients à suspecter le diagnostic (Dieudonné-Rahm *et al.*, 2016).

1.2.2 Classification et diagnostic d'un glioblastoma

Le diagnostic des glioblastomes est généralement basé sur la neuro-imagerie des individus suspectés de présenter des lésions intracrâniennes (Weller, 2011). L'examen radiologique révèle souvent une masse pouvant évoquer aussi bien un gliome de haut grade, un abcès, qu'un lymphome cérébral. Un GBM se présente typiquement comme une masse hémisphérique volumineuse, de densité hétérogène en rapport avec des nécroses et des hémorragies intra-tumorales qui se traduisent par un aspect hyperdense au scanner (Ducray et Guillevin, 2007). L'imagerie à résonance magnétique aide à établir le diagnostic différentiel, mais l'examen histologique reste incontournable afin de confirmer le diagnostic et éviter les faux positifs (Weller, 2011).

1.2.3 Diagnostic morphologique et histologique

La classification de l'OMS (2000) distingue, les différents types de gliomes selon des critères morphologiques et histologiques. Sur le plan morphologique, ce sont les similitudes des cellules tumorales avec les astrocytes ou oligodendrocytes normaux, qui sont pris en compte. On y distingue pour le glioblastome, des cellules faiblement différenciées, une densité cellulaire élevée, un atypisme nucléaire (chromatine et contour de noyau grossis, irrégulier et épaissis), avec une forte activité mitotique. Toujours selon la classification de l'OMS (2000), sur le plan histologique les GBM de grade IV se caractérisent par la présence de plages de nécroses entourées de cellules proliférantes réalisant un aspect en pseudo-pallissade et une prolifération endothélio-capillaire (AUS de l'ouvrage ipubli.iserm.fr).

1.2.4 Diagnostic moléculaire

Les critères de classification de l'OMS (2000) peuvent être interprétés différemment et sont soumis à la subjectivité des praticiens. C'est pourquoi des critères de classification supplémentaires sont nécessaires pour remplacer le doute par la certitude. Ainsi, les tests moléculaires apportent des preuves objectives, non sujettes à controverse.

Il faut savoir que les GBM primaires et secondaires accumulent différents lots d'altérations génétiques. Certaines correspondent à de macro-délétions chromosomiques comme la perte des fragments chromosomiques 1p et 19q dans les tumeurs oligo-dendrogiales (Riemenschneider *et al.*, 2010) ou encore aux délétions ponctuelles du gène de l'isocitrate déshydrogénase NADPH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate)-dépendante (IDH1/2). C'est le résidu arginine R132 hautement conservé de la mutation IDH1 pour l'enzyme à localisation cytosolique et R172 pour la mutation IDH2 de l'enzyme à localisation mitochondriale qui sont les plus répandus parmi les gliomes de bas grade (II et III) évoluant en GBM secondaires.

Initialement, ce sont les altérations des gènes EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) et PTEN (Phosphatase and Tensin homolog) qui étaient les plus utilisées pour le diagnostic moléculaire des GBM primaires. La mutation ou l'amplification (duplication) du gène EGFR est retrouvée dans 30 à 40% des GBM primaires, dont la moitié comporte un gène EGFR remanié appelé EGFRvIII ; celui-ci correspondant à une délétion de 267pb soit, la perte des exons 2-7. La perte du gène PTEN quant à elle, est observée chez 15 à 40% de GBM primaire et est pratiquement absente de tous les autres gliomes, d'où la pertinence de son utilisation en tant qu'outil de diagnostic (Nikiforova et Hamilton, 2011).

Selon la nouvelle classification des gliomes de l'OMS (2016) (Figure 1.4), la combinaison des examens d'immunohistochimie (IHC) et de séquençage, permet de discriminer les types cellulaires de gliomes et leurs grades. En effet, c'est d'abord la recherche de la mutation IDH1 R132 par IHC qui oriente soit vers l'investigation de la perte de l'ATRX (enzyme d'élongation des télomères) ou vers le séquençage des mutations IDH1/2. La recherche de la codélétion des fragments chromosomiques 1p/19q succède à l'examen IHC de la protéine l'ATRX tandis que la recherche de la mutation histone H3 fait suite au séquençage IDH1/2 (figure 1.4). Le GBM primaire de grade IV se distingue par un examen IHC IDH1 négatif, soit un GBM IDH-*non muté* et correspond à la moyenne d'âge des plus de 55ans. Les rares cas de GBM avec un IDH1 positif (GBM IDH-*muté*) inclut des patients avec une moyenne d'âge inférieure à 55 ans, entrant ainsi dans la catégorie des GBM secondaires (Brouland et Hottinger, 2017).

Cela dit, la communauté scientifique ne semble pas entièrement satisfaite par cette nouvelle classification, puisque des mentions comme NOS (Not Otherwise Specified; non autrement spécifié) indiquant que les informations moléculaires sont incomplètes ou que les tests n'ont pas pu être réalisés, ou encore la mention NEC (Not Elsewhere Classified; non classé ailleurs) référant à une information moléculaire obtenue qui ne

permet pas de classer la tumeur dans une catégorie existante. Pour pallier à ces lacunes, un consortium d'experts en neuropathologies en consultation avec des neuro-oncologues, initialement formé en 2014, se sont employés à établir les limites et les priorités des tests moléculaires à réaliser sur les tumeurs du cerveau, étant donné rares et précieux, tant qualitativement que quantitativement (Wood *et al.*, 2019). Ce consortium appelé le cIMPACT-NOW (consortium to Inform Molecular and Practical Approaches to CNS Tumor Taxonomy-Non Official WHO) a actualisé les critères moléculaires pour améliorer le diagnostic des gliomes. Ils stipulent que toute tumeur possédant un ou la combinaison des caractéristiques suivantes (Gonzalez Castro et Wesseling, 2021) :

- Présence de chromosome 7 surnuméraire et la délétion du chromosome 10 entier
- La mutation du promoteur du gène TERT (Transcriptase inverse de la Télomérase)
- L'amplification du gène du récepteur pour le facteur de croissance épidermique (EGFR)

Sont des caractéristiques moléculaires minimales pour identifier un gliome astrocytique diffus IDH-non muté qui, bien qu'ayant le profil histologique d'une néoplasie OMS de grade II ou III, devrait présenter un comportement clinique agressif qui se rapproche plus d'un GBM IDH-non muté de grade IV (Brat *et al.*, 2018).

1.2.5 Hétérogénéité intra-tumorale

L'hétérogénéité intra-tumorale se définit comme les différents types cellulaires aptes à exhiber des profils phénotypiques, morphologiques bien distincts, incluant la morphologie cellulaire, l'expression génique, le potentiel prolifératif et métastatique au sein d'une même tumeur (Sung *et al.*, 2019). Concrètement, la tumeur émergerait à partir d'une cellule initiale qui, par mitoses anarchiques croît en tumeur, dont les cellules sont supposées être des clones parfaits. Les aberrations communes à toutes les

parties de la tumeur sont considérées comme étant impliquées dans le développement initial de la tumeur (Harada *et al.*, 1998).

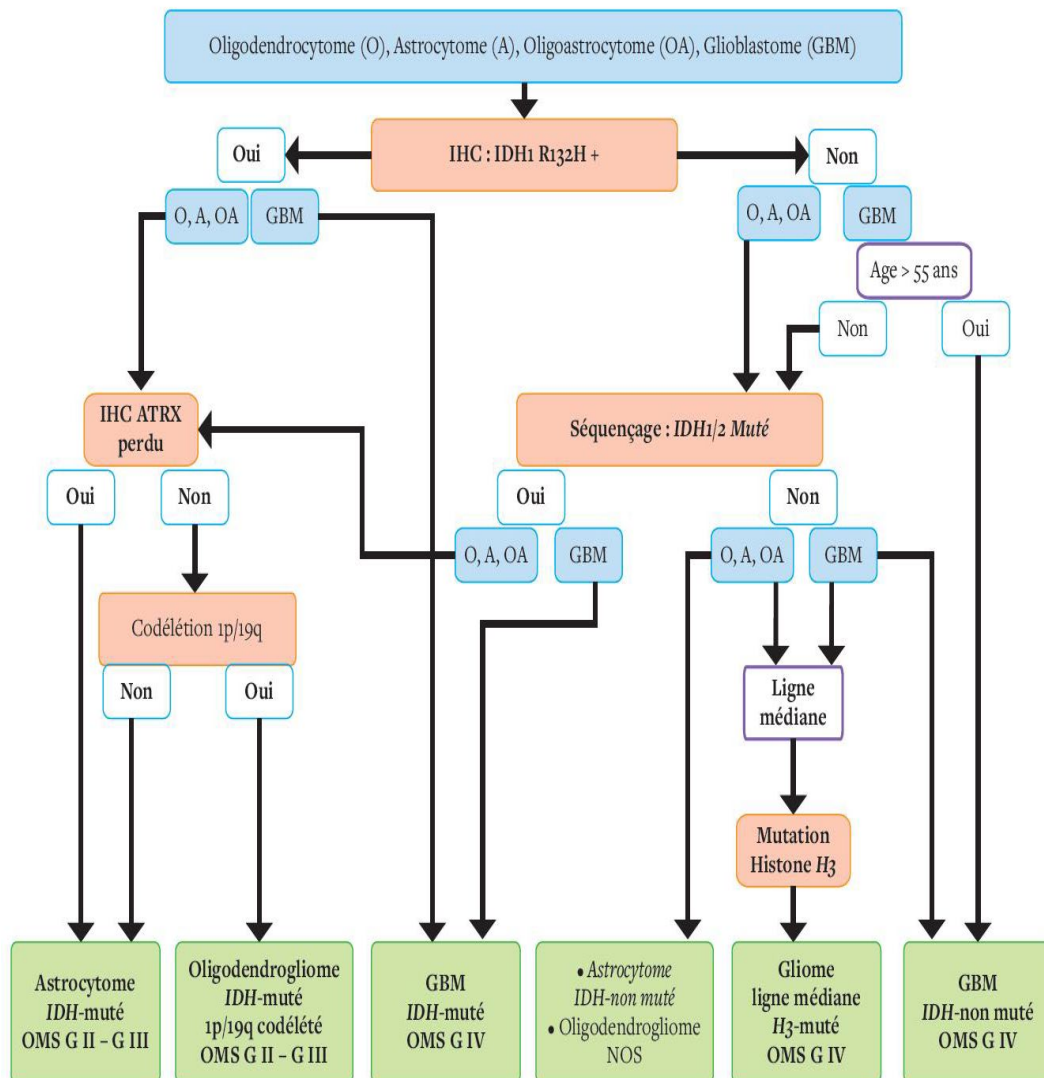


Figure 1.4 : Classification des gliomes selon l'OMS 2016 (Brouland et Hottinger, 2017).

Dépendamment du critère de distinction, nombreux travaux de recherche sur l'hétérogénéité intra tumorale s'accordent à dire qu'il existe plusieurs sous-populations de cellules de gliomes dans la masse tumorale, en se basant aussi bien sur des critères

histologiques, chromosomiques et surtout moléculaires (Harada *et al.*, 1998) (Prestegarden *et al.*, 2010) (Chang *et al.*, 2011). D'un point de vue histologique, l'index cellulaire combiné à la taille du noyau, déterminé sur une coupe histologique a permis d'identifier des sous-types cellulaires, dont un avec une activité cellulaire extrêmement élevée et associée à une expression élevée des voies de signalisation AP-1 (Activating Potein 1), INF γ (Interferon- γ), TGF β et MAPK14 (Mitogen-activated Protein Kinase 14) (Chang *et al.*, 2011) renvoyant ainsi au critère moléculaire.

La combinaison basée sur des aberrations chromosomiques et le profil d'expression des gènes EGFR, NF1 (Neurofibromatose de type 1), PDGFRA et IDH1, a permis d'identifier 4 sous types (figure 1.5) : classique, mésenchymal, proneural et neural, chacun se caractérisant par les aberrations suivantes :

- Les cellules classiques : Possèdent les anomalies de nombre des chromosomes +7/-10, un niveau élevé de l'amplification du gène EGFR avec une prévalence de plus de 50% du remaniement EGFRvIII, distinctement déficitaire en TP53 et significativement associé au déficit en CDKN2A. Il est également à noter que les marqueurs de cellules souches et de précurseurs neuraux Nestin, NOTCH et Sonic Hedgehog sont des voies de signalisation hautement exprimées dans cette sous population de gliome.
- Les cellules mésenchymales : La délétion de la région 17q11.2 portant le gène NF1 (Neurofibromatose de type 1) se produit de façon prédominante dans le sous-type mésenchymal de même que la délétion du gène PTEN. Ce sous-type exprime des marqueurs mésenchymateux comme CHI3L1 et MET. Les gènes des voies de la signalisation de la famille des facteurs de nécrose de la tumeur et la voie NF- κ B tel que TRADD (TNFRSF1A-Associated vie Death Domain), RELB (v-rel Reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B) et TNFRSF1A (Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, member 1A) sont hautement exprimés.

- Les cellules proneurales : Ce sous-type comporte deux altérations majeures à savoir l'amplification du gène PDGFR et la mutation ponctuelle IDH1. La mutation TP53 et la perte d'hétérozygotie sont des événements fréquents dans le sous-type proneural. Bien que celles-ci expriment les gènes de développement des oligodendrocytes comme PDGFR, NKX2-2 (NKe Homeobox transcription factor) et OLIG2, elles arborent également la signature des gènes de développement proneural tels que SOX, DCX (Doublecortin), DLL3 (Delta Like canonical Notch Ligand) et ASC-1 (Asc-type amino acid transporter 1).
- Les cellules neurales : Celles-ci se caractérisent par l'expression de marqueurs de neurones NEFL (Neurofilament Light chain), GABRA1 (sous-unité alpha 1 du récepteur de l'acide gamma-aminobutyrique de type A), SYT1 (Synaptotagmine) et SLC12A5 (Solute Carrier family 12 member 5) (Verhaak *et al.*, 2010).

Ces sous-types cellulaires coexistent dans des régions de la tumeur avec des rôles biologiques bien distincts (Renner *et al.*, 2016). La masse tumorale est compartimentée en corps proliférant, front invasif, niche hypoxique, cellules initiatrices de gliome (CIG) et cellules endothéliales formant la microvasculature tumorale (Verreault *et al.*, 2012). Cette compartimentation a été rationalisée à trois niches à savoir, la niche GBM périvasculaire, la niche hypoxique et la niche invasive (Hambardzumyan et Bergers, 2015).

Dans la niche périvasculaire, une forte activité des gènes FGF, PDGF et VEGF a été recensée. On y retrouve également des cellules souches cancéreuses (CSC) exprimant le marqueur CD133 (Cluster Différenciation 133) qui, par transdifférenciation, deviennent des cellules endothéliales ou péricytes qui tapissent la vasculature de la tumeur et sont donc responsables de l'angiogenèse par expansion de la vasculature. Il est intéressant de noter la présence de macrophages associés à la tumeur (TAM Tumor

Associated Macrophages) libérant du TGF β et induisant ainsi l'expression de MMP9. Cette dernière augmente le pouvoir invasif des CSC (Hambardzumyan et Bergers, 2015).

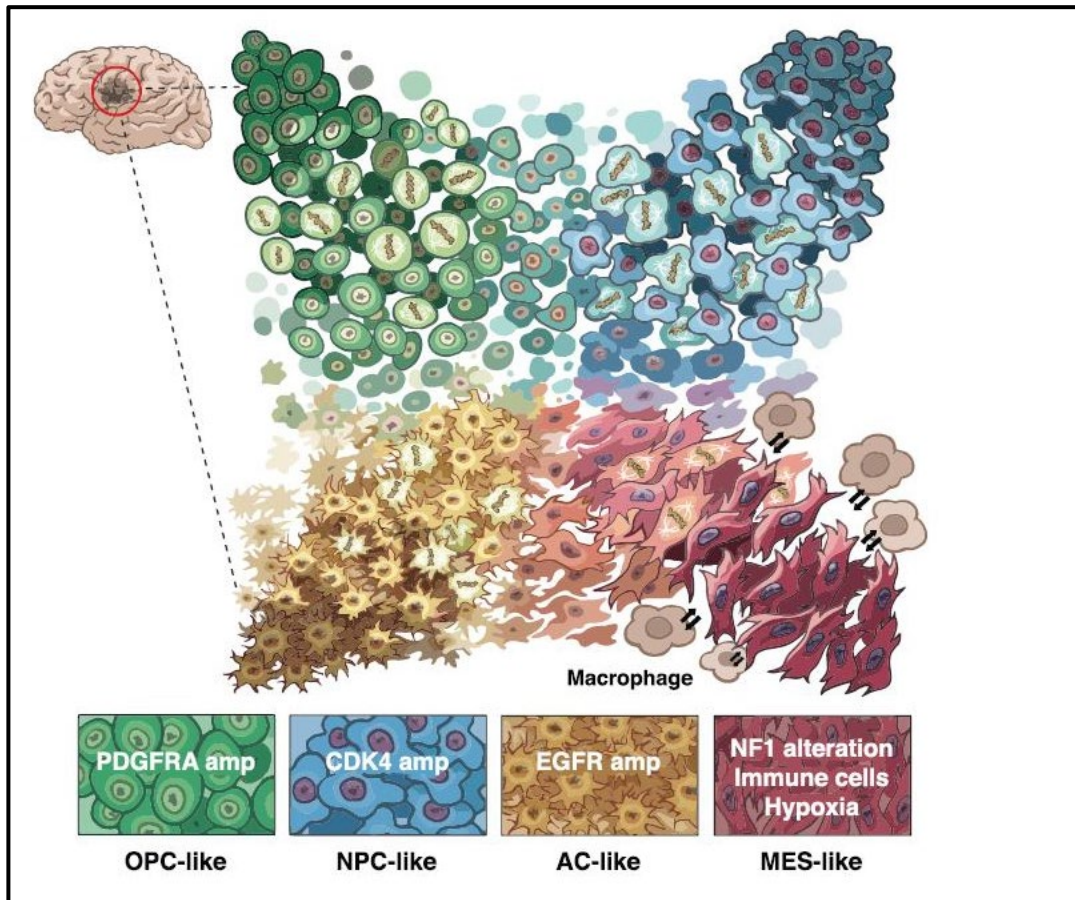


Figure 1.5 : Modèle de Neftel (2019) sur l'hétérogénéité intra-tumorale dans le glioblastome. Etats des cellules de glioblastome et leurs déterminants génétiques et microenvironnementaux. Les axes mitotiques indiquent les cycles cellulaires. Les couleurs de ton plus clair ou plus sombre indiquent l'intensité de chaque programme. Les états intermédiaires se trouvent entre les 4 états et désignent les transitions. OPC-like : cellule progénitrices oligodendrocyte-like ; NPC-like : cellule progénitrices neural-like ; AC-like : cellule astrocyte-like ; MES-like : Mesenchymal-like (Neftel *et al.*, 2019).

La niche hypoxique est une caractéristique majeure des GBM de haut grade. Dans cette région, un afflux de sang très réduit provoque une asphyxie des cellules qui se traduit par une nécrose. Les cellules du gliome répondent spécifiquement par l'apoptose des cellules qui s'alignent soigneusement autour du centre nécrotique en formant une palissade. La réponse moléculaire se traduit par la libération de HIF qui induit l'induction de la production de VEGF, protéine impliquée dans la survie et la prolifération de la tumeur. Des CSC sont présentes dans la niche hypoxique où l'hypoxie aurait le pouvoir d'induire leur différenciation en cellules endothéliales d'un côté et de les maintenir indifférenciées de l'autre. L'analyse moléculaire de tissus nécrotiques tumoraux de GBM ayant mis en évidence l'expression du gène ATF5 qui bloque la différenciation de progéniteurs neuraux en neurones le confirme (Dong *et al.*, 2005).

Enfin, la niche invasive est étroitement liée aux vaisseaux sanguins pour envahir les parenchymes normaux. L'invasion est induite par le processus de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) (Hambardzumyan et Bergers, 2015).

Le microenvironnement de la tumeur composé de cellules endothéliales et de fibroblastes et de cellules immunitaires, bien que non transformées, sont subvertis par les cellules tumorales pour répondre à leur propre besoin (Anonyme, 2013). Ces cellules expriment des marqueurs de fibroblastes associés au cancer, le PDGFR β et le CD140b. Elles seraient capables de promouvoir la croissance de la tumeur (Clavreul *et al.*, 2014).

Deux catégories de cellules tumorales de GBM doivent particulièrement retenir notre attention car elles possèdent des fonctions clé dans le développement, la prolifération et l'expansion de la tumeur, des cellules souches de gliome (CSG) (Phillips *et al.*, 2006) et des cellules tumorales circulantes de gliome (CTC) (Lombard *et al.*, 2015).

1.2.5.1 Les cellules souches de gliome

L'oncogenèse est un processus qui nécessite la génération d'une population de cellules aptes à s'auto-renouveler de façon perpétuelle et déficitaire en processus de différenciation en détournant les mécanismes de développement neuronaux. Des études sur l'activité mitotique des cellules de GBM, a révélé que plus les cellules sont différenciées, moins elle se divisent (Neftel *et al.*, 2019). Cela signifie que l'état de différenciation est intimement lié à l'activité mitotique.

En effet, les travaux de Yuan *et al.*, en 2018 ont montré que l'omniprésence de SOX2, maintient la majorité des cellules de gliome transformées, dans un état immature et potentiellement doté de plasticité cellulaire (Yuan *et al.*, 2018). Les cellules de GBM arborent une sous-population de cellules exprimant des marqueurs de cellules souches bien connus comme CD133 (Cluster Différenciation 133) ou encore Nestin, TLX (récepteur nucléaire Nuclear receptor TLX homologue to drosophile Tailless gene) et MELK (Maternal Embryonic Leucin Zipper Kinase) (Phillips *et al.*, 2006), auquel a été rajouté OLIG2 également exprimé dans les cellules souches de gliome (Kupp *et al.*, 2016).

Ces dernières expriment les marqueurs moléculaires de types DCX (Doublecortin), OLIG1 ALCAM (Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule), SOX4 (Neftel *et al.*, 2019). Il a aussi été déterminé que la plus grande proportion de cellules ayant une activité mitotique, sont majoritairement des OPC-like et des NPC-like (Liu *et al.*, 2018) (Yuan *et al.*, 2018) (Neftel *et al.*, 2019) (figure 1.5). En les purifiant, des chercheurs ont trouvé que les OPC surexprimaient les gènes PDGFR α , SOX10, OLIG2 et CSPC4 (Chamling *et al.*, 2021). Dans une étude portant sur les CSG, les analyses de clusterisation ont montré qu'il y avait une association préférentielle, entre le marqueur de surface CD24 avec les cellules NPC-like et CD133 (Cluster Différenciation 133)

avec les cellules OPC-like, les identifiant ainsi comme étant les CSG (Suvà et Tirosh, 2020).

1.2.5.2 Cellules tumorales circulantes

Il a été démontré que des cellules se détachent de la masse tumorale et se retrouvent dans la circulation sous forme de cellules tumorales circulantes (CTC). Liu *et al.*, (2018) ont démontré que des cellules de gliome acquièrent un phénotype de pseudo-cellules souches cancéreuses résistantes aux traitements génotoxiques. Ces dernières sont capables d'atteindre un site primaire pour le repeupler localement et ainsi former une nouvelle tumeur. Selon un modèle mathématique de prédiction d'efficacité de réponse aux traitements anti-tumoraux, le modèle a prédit que, lorsque le traitement cible la migration cellulaire seule, cela pouvait promouvoir la prolifération de la tumeur, mais en ciblant la prolifération tumorale et la migration cellulaire de façon combinée une amélioration de la réponse aux traitement a été observé (Gallagher *et al.*, 2020).

1.3 Transition épithélio-mésenchymateuse

La plupart des tissus et organes humains se forment à l'issue d'une série de conversion des cellules épithéliales, étroitement liés aux cellules voisines via les protéines de jonction, des molécules d'adhésion et des desmosomes, en cellules mésenchymateuses, qui sont librement agencés dans la matrice extracellulaire à travers le processus de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT). Ce processus est fondamental dans le développement embryonnaire et implique de profonds changements phénotypiques incluant la perte de l'adhésion cellule-cellule, la perte de polarité et l'acquisition de propriétés migratoires et invasives (Thiery *et al.*, 2009).

Qu'il soit à des fin de croissance ou de pathologies, le processus de l'EMT utilise un programme commun, conservé avec les mêmes mécanismes (figure 1.6) :

➤ La déconstruction des jonctions cellule-cellule : Les cellules se lient entre elles par plusieurs types de jonctions les principales étant, les jonctions serrées appelées aussi *zonula occludens* qui maintiennent la cohésion du tissu, les jonctions d'ancrages subdivisées en desmosomes et jonctions adhérentes la *zonula adhaerens*. Ces dernières regroupent principalement des molécules transmembranaires appelées cadhérines. En dernier, nous avons les jonctions communicantes (gap junction) (Lüllmann-Rauch, 2008). Durant l'EMT, ces jonctions sont relocalisées et/ou dégradées. En effet, les jonctions adhérentes sont déstabilisées et les cadhérines (E-cadérines) sont clivées puis dégradées tandis que les jonctions serrées sont dissoutes. De plus, lors de la progression de l'EMT, les protéines de jonctions subissent une répression transcriptionnelle (Lamouille *et al.*, 2014).

➤ Le changement de polarité : Les cellules épithéliales possèdent deux principaux domaines, le domaine apical et le domaine latéro-basal. Le domaine apical (près de la surface) possède des structures importantes en lien avec la fonction de la cellule (Lüllmann-Rauch, 2008). Parmi les 3 complexes protéiques clé dans l'établissement de la polarité apico-basale à savoir Par, Scribble et Crumb, deux sont localisés dans la région apicale : le complexe Par et Crumb. Le complexe Par est localisé au sein des jonctions serrées (Par3, Par6 et Apkc) alors que le complexe Crumb associe une protéine transmembranaire et deux autres protéines PATJ (Pals-Associated Tight Junction) et Pals1 (Protéines associées au Lin7 1) (Gandalovičová *et al.*, 2016). Le domaine latéro-basal quant à lui, comporte les complexes jonctionnels et des molécules d'adhérences cellulaires pour amarrer les cellules épithéliales les unes aux autres et à la membrane basale (Lüllmann-Rauch, 2008); pour l'y aider intervient le complexe Scribble, constitué de trois protéines conservées : Scribble, Dlg (Disc large protein) et Lgl (Lethal giant larvae), en s'associant à la vimentine. Le complexe Scribble est un antagoniste des complexes Par et Crumb (Gandalovičová *et al.*, 2016). La perte de l'axe

de polarité apico-basale, la dissolution des jonctions apicales et les profonds changements dans le profil d'expression protéique ont été associés à l'EMT (Wang et Margolis, 2007). En effet, l'activation de l'EMT affecte les complexes de polarité par une répression de l'expression génique, à l'exemple de Snail, un puissant acteur de l'EMT, qui réprime l'expression de Crumb3. Il en résulte la disparition des complexes Par et Crumb des jonctions cellule-cellules. ZEB, un facteur de transcription intervenant dans le processus de l'EMT, réprime quant à lui l'expression de Crumbs, PATJ (Pals-Associated Tight Junction) et Lgl (Lethal giant larvae) en même temps que l'expression des protéines de jonctions serrées et adhérentes en se liant directement à leurs promoteurs. La désorganisation des complexes de polarité conduit à déstabiliser les complexes de jonctions et ainsi à la perte de polarité apico-basal (Gandalovičová *et al.*, 2016).

➤ Réorganisation du cytosquelette : Le cytosquelette cellulaire est formé de trois type de polymères : les filaments d'actine, les microtubules et les filaments intermédiaires (FI) (Fletcher et Mullins, 2010). Les FI sont les moins rigides des trois, peuvent s'articuler avec les filaments d'actines et les microtubules mais sont incapables de soutenir des mouvements directionnels. La kératine, une des composantes des FI, voit son expression réprimée durant l'EMT alors que la vimentine voit son expression augmentée, modifiant la forme de la cellule et favorisant ainsi le comportement mobile (Nalluri *et al.*, 2015). Les microtubules sont les macromolécules les plus rigides et s'occupent notamment de la ségrégation des chromosomes homologues lors de la mitose (Fletcher et Mullins, 2010). Dans une cellule épithéliale, des microtubules de polarité uniforme sont nécessaires au maintien de la polarité cellulaire en provoquant l'extension de la cellule de la surface apicale à la surface basale (Nalluri *et al.*, 2015). Durant l'EMT, l'enzyme tyrosine ligase de tubuline est réprimée, menant à l'accumulation de tubuline détyrosinée, ce qui est en faveur de la formation de microtentacules et le détachement de la cellule épithéliale (Whipple *et al.*, 2010). Les filaments d'actine moins rigides que les microtubules, ont une structure hautement

organisée en lamellipodes ou filopodes (Lüllmann-Rauch, 2008). Ce sont les principales structures associées au mouvement cellulaire. La polarisation d'actine en avant de la cellule est la cause majeure de génération de force de motilité cellulaire (Hohmann et Dehghani, 2019). Dans les cellules néoplasiques, la β -actine, l'une des isoformes d'actines responsables de la connexion entre cellules et de la contraction, est réprimée, transformée, dispersée et localisée de façon diffuse dans le cytoplasme (Sun *et al.*, 2015a). La cortactine, une protéine se liant à l'actine (ABP), contrôle le processus d'assemblage et de désassemblage des microfilaments d'actines. Il a été montré que la cortactine est une protéine surexprimée durant la métastase et induit l'EMT dans différents types de cancers. Dernièrement, Karamanou *et al.*, ont montré que le mouvement cellulaire médié par la cortactine induit l'EMT et participe à la migration tumorale et à l'invasion (Karamanou *et al.*, 2020).

1.4 Les facteurs de croissance

Les facteurs de croissance sont des polypeptides transmettant des messages mitogènes susceptibles d'induire le déclenchement d'une mitose. Ils sont sécrétés par de nombreux types cellulaires non organisés en glandes et agissant à distance de leur origine en mode paracrine, en mode juxtacrine en agissant sur des cellules liées via les jonctions serrées ou encore autocrine en agissant sur la même cellule qui l'a produit (Robert, 2010). Il existe de nombreuses familles de facteurs de croissance.

1.4.1 La famille du facteur de croissance épidermique (EGF)

La famille de l'EGF compte l'EGF, le $\text{TGF}\alpha$, l'amphiréguline (AREG), l'épigène (EPGN), l'épiréguline (EREG), l'HB-EGF (Heparin Binding-EGF), la β -celluline et neuréguline⁴ (NRG)⁴. Ces molécules activent, via leur récepteur EGFR, la protéine Src, la protéine kinase activée par les mitogènes (MAPK), la phosphatidylinositol 3 kinase

(PI3K) /Akt, le facteur nucléaire NFκB et la β-caténine ainsi qu'une augmentation de l'expression des MMP (Mimeault *et al.*, 2007). Ces facteurs jouent un rôle majeur dans la prolifération de nombreux tissus (Robert, 2010).

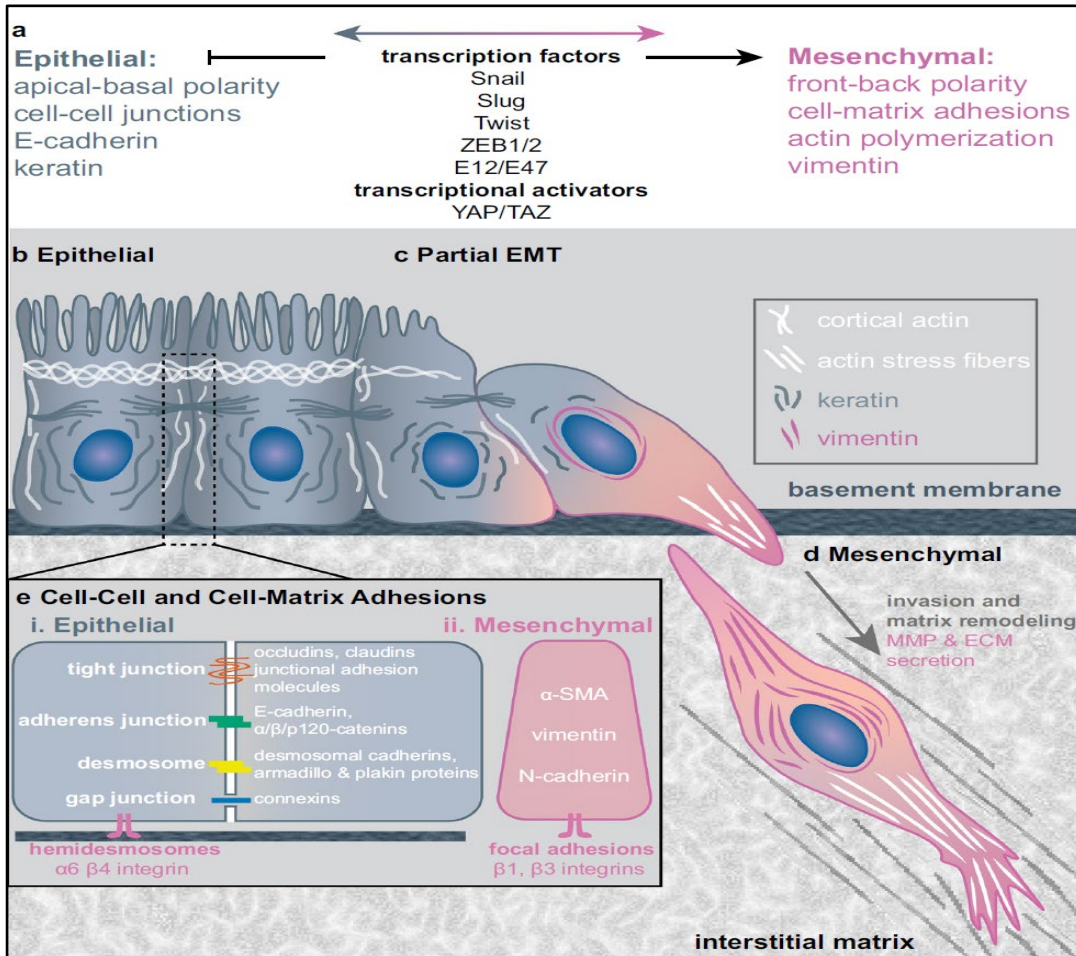


Figure 1.6 : Représentation schématique de la progression de l'EMT. **a** : caractéristiques des cellules épithéliales et mésenchymales ainsi que les facteurs de transcription qui régulent l'EMT. Représentation de l'organisation de la morphologie et du cytosquelette des cellules, **b** : épithéliales, **c** : en EMT partielle et **d** : état mésenchymal. **e** : description détaillée des liaisons cellule-cellule et cellule-matrice (Leggett *et al.*, 2021).

1.4.1.1 La famille du facteur de croissance fibroblastique (FGF)

La famille des FGF comprend une vingtaine de membres numérotés où le FGF2 joue un rôle dans le développement spécifique de l'angiogenèse (Robert, 2010). L'apport du FGF dans l'EMT est médié par la signalisation intracellulaire Ras, l'acquisition de la polarité cellulaire et finalement la migration (Sun et Stathopoulos, 2018). De plus, l'activation aberrante de la signalisation FGF/FGFR contribue de façon substantielle à la résistance aux oncothérapies par la promotion de mécanismes tels que l'angiogenèse et l'EMT (Zhou *et al.*, 2020b). Enfin, le FGF2 accélère l'EMT par la modulation positive de l'ARNm du TGF β et d'autres molécules associées à l'EMT comme SNAIL, SLUG et le β -intégrine (Koike *et al.*, 2020).

1.4.1.2 La famille des facteurs de croissance transformant (TGF)

Cette famille comprend une trentaine de membres dont le TGF β et la sous-famille de facteurs morphogènes comme le BMP (Bone Morphogenic Protein). Ils sont impliqués dans la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire (Robert, 2010). Le TGF β (TGF β 1, 2 et 3) est une cytokine dimérique, qui initie sa signalisation par la formation d'un complexe hétéromérique composé de récepteurs transmembranaires sérine thréonine kinase de type I (TGF β RI) et de type II (TGF β RII). Le TGF β est un paradoxe à lui seul ; il agit à la fois comme suppresseur de tumeur en inhibant la prolifération cellulaire par l'induction de l'expression de l'inhibiteur de la cycline kinase et en induisant l'apoptose. D'autre part c'est promoteur de tumeur, par l'activation des voies de signalisation prométastatiques, telles que l'induction de l'angiogenèse et de l'EMT et la répression de l'inflammation (Markopoulos *et al.*, 2019).

1.4.1.3 La famille du facteur de croissance vasculaire endothéliale (VEGF)

Les quatre facteurs de croissance vasculo-endothéliaux VEGF-A à VEGF-D stimulent particulièrement la prolifération des cellules endothéliales normales mais qui participent néanmoins à la nutrition du tissu cancéreux (Robert, 2010). Expérimentalement, il a été démontré que le VEGF-A est nécessaire dans l'angiogenèse EMT-induite dans l'initiation tumorale (Fantozzi *et al.*, 2014). De plus, dans les cellules du carcinome nasopharyngé, la signalisation autocrine VEGF/VEGFR permet de promouvoir le processus de l'EMT par l'induction de l'expression des MMPs, menant par la même la migration, l'invasion et la progression tumorale via l'activation de ERK1/2 (Chen *et al.*, 2020).

1.4.1.4 La famille du facteur de croissance dérivé de plaquette (PDGFR)

Tout comme la famille des VEGF, cette famille de facteurs de croissance en compte quatre, de PDGF-A à PDGF-D. Ces derniers fonctionnent après dimérisation, soit d'homodimères AA, BB et DD ou en hétérodimère AB (Robert, 2010). Il a été démontré que l'induction du PDGFR dans les carcinomes serait susceptible d'initier une interaction entre le PDGFR, le T β R et le CD44 dans les cellules épithéliales procédant à l'EMT (Porsch *et al.*, 2014). D'autre part, dans les cellules du cancer colorectal, l'expression de PDGF induit l'EMT et sa répression annule l'EMT ; le PDGF induit le processus de l'EMT par l'activation de l'axe Notch1/Twist (Chen *et al.*, 2016).

1.4.1.5 Le facteur de nécrose tumorale α (TNF α)

Le TNF α est une cytokine inflammatoire, existant sous deux formes, transmembranaire et soluble, libérée suite à un clivage protéolytique. Le TNF α interagit avec deux récepteurs le TNFR1, activé par la version soluble et le TNFR2 qui interagit avec la forme transmembranaire. Le TNF α présente autant un effet antitumoral, par l'activation des voies de signalisation de l'apoptose, que pro-tumorigène, par l'induction de la voie NF- κ B qui mène à l'induction des facteurs de transcription de l'EMT et la répression de l'E-cadhérine. De plus, le TNF α agit en synergie avec le TGF β pour accélérer l'EMT (Markopoulos *et al.*, 2019).

1.4.2 La famille du facteur de croissance de l'angiopoïétine

Les angiopoïétines (ANGPT) sont une famille de facteurs de croissance de rôle équivalent à celui du VEGF, dans l'angiogenèse. Les gènes de cette famille sont activés par l'hypoxie. L'ANGPT 1 et 4 activent la croissance des cellules épithéliales tandis que l'ANGPT2 réprime ces voies (Robert, 2010).

1.4.3 Les facteurs de transcription

Le répertoire des facteurs de transcription (FT) définit une classe de protéines qui se lient à l'ADN de façon séquences spécifiques mais n'ont pas une fonction enzymatique et ne font pas partie d'un complexe d'initiation (Vaquerizas *et al.*, 2009). Ces derniers sont responsables de l'activation ou de la répression des gènes, en se liant à des sites génomiques de courtes séquences spécifiques, au niveau de régions régulatrices (Wingender *et al.*, 2015). Les facteurs de transcriptions (FT) peuvent agir par un mécanisme stérique et bloquer les autres protéines en se liant tout simplement au même

site. Les FT agissent également, par le recrutement de cofacteurs, co-activateurs ou co-répresseurs; ce sont de larges protéines avec de multiple domaines qui régulent la transcription par de multiple mécanismes incluant, le remodelage du nucléosome, la liaison à la chromatine et/ou la modification des histones ou d'autres protéines comme les FT ou les ARN polymérases (Lambert *et al.*, 2018).

L'expression et l'activation des FT induisant l'EMT se produit en réponse à différentes voies de signalisation incluant : le TGF β , la protéine morphogénique osseuse (BMP Bone Morphogenic Protein), EGF, FGF, PDGF, Wnt (Wing less transcription factor), Sonic HedgeHog, Notch et la signalisation par les intégrines (Gonzalez et Medici, 2014). L'EMT est orchestré par un réseau de facteurs de transcription faisant partie des familles SNAI, ZEB et TWIST, qui répriment directement une myriade de gènes marqueurs épithéliaux, impliqués dans l'adhésion cellulaire en même temps que des gènes mésenchymateux sont directement ou indirectement régulés positivement (Goossens *et al.*, 2017). Les FT de l'EMT les plus étudiés sont TWIST 1 et 2, SNAI1 (Snail) et SNAI2 (Slug) et ZEB 1 et 2. Dans les GBM, les molécules de signalisation impliquées dans l'EMT sont, C/EBP- β (CCAAT Enhancer Binding Protein β), STAT3, ZEB1, TWIST1 FOXD1 (Forkhead box protein D1) et SNAI1 (Azam *et al.*, 2020). Une étude récente sur la signature génomique de l'EMT dans les gliomes a révélé que les gènes des voies de signalisation et les facteurs de transcription sont significativement corrélés avec le grade OMS des gliomes. Parmi ceux-ci, l'expression de SNAI1, SNAI2, TWIST, BIRC5 et PDGFB est significativement augmentés dans les GBM (Tao *et al.*, 2020).

1.4.4 SNAI

SNAI appartient à la superfamille des FT en doigt de zinc, un motif de liaison à l'ADN pour moduler la transcription génique (Cassandri *et al.*, 2017; Wingender *et al.*, 2015;

Wu et Zhou, 2010). Il a été démontré que SNAI1 est directement impliqué dans la prolifération et la migration cellulaire. En effet les travaux de Han *et al.* (2011) ont montré que la répression de SNAI1 par SiRNA spécifique, entraîne réduction significative de la prolifération cellulaire, de la migration et de l'invasion cellulaire et l'arrêt en phase G0/G1 des cellules de glioblastomes (Han *et al.*, 2011b). SNAI1 se lie au promoteur de l'E-cadherine au niveau de la séquence E-box et inhibe sa transcription. Elle inhibe également l'expression de Crumbs, altérant ainsi la polarité des cellules épithéliales (Georgakopoulos-Soares *et al.*, 2020).

1.4.4.1 TWIST

Ce FT fait partie de la superclasse des hélices-boucle-hélices basic de la superfamille S1 (Ansieau *et al.*, 2010; Wingender *et al.*, 2015). Les GBM de grade IV, expriment les taux de TWIST les plus élevés et cette surexpression a la capacité de promouvoir l'invasion *in vitro* (Elias *et al.*, 2005). Elle induit également l'expression des marqueurs mésenchymateux, comme la fibronectine, N-cadhérine et vimentine, ce qui mène à la réduction de l'adhésion cellulaire et la promotion de la mobilité (Georgakopoulos-Soares *et al.*, 2020).

1.4.4.2 ZEB

Faisant partie de la même super famille que SNAI, le Zinc-Finger E-Box Binding (ZEB) compte les FT ZEB 1 et ZEB 2. Il a été démontré que ZEB 1 et ZEB 2, sont hautement exprimés dans les GBM de haut grade et les gliomes récidivants et que leur taux d'expression est positivement corrélé; toutefois, aucune corrélation entre la survie global et l'expression de ZEB (Elias *et al.*, 2005). De plus, une fois ZEB 1 induit, il réprime de multiples gènes de génération et de maintenance de la polarité des cellules

épithéliales incluant CDH1, Lgl2 (Lethal giant larvae2), PATJ (Pals-Associated Tight Junction) et Crumbs (Georgakopoulos-Soares *et al.*, 2020).

1.4.5 Les métalloprotéinases matricielles

La découverte des métalloprotéinases matricielles (MMPs) remonte au début des années soixante. C'est en 1962 que Jérôme Gross et Charles Lapiere ont initialement déterminé par une approche biochimique, que lors de la métamorphose de têtards de grenouille, la peau, l'intestin et les branchies, subissaient un remodelage radical par l'intermédiaire d'une forte activité collagénolytique. Plus tard, en collaboration avec Nagai, en 1966 ils parviennent à purifier la première métalloprotéinase matricielle, MMP-1 à partir de la peau, la nageoire et la queue du têtard de grenouille (Iyer *et al.*, 2012).

Les MMPs comptent actuellement plus d'une vingtaine d'endopeptidases, réparties en 6 familles selon leurs différences structurales (figure 1.7). Les MMPs partagent une même structure générale (Gonzalez-Avila *et al.*, 2019) :

- Un peptide signal, excepté pour le type membranaire
- Une extrémité N-terminale pro-peptide
- Un site catalytique incluant un atome zinc
- Un région charnière 'hinge' riche en résidus proline
- Une région c-terminale contenant le domaine pseudo-hemopexine, conférant la spécificité au ligand/substrat
- Un site d'activité enzymatique

Sous l'influence d'un facteur de stress comme l'hypoxie ou des cytokines inflammatoires, les cellules néoplasiques passent d'un état différencié à un état indifférencié pseudo-mésenchymateux, avec une capacité migratoire via le processus

de TEM. Ce processus permet aux cellules d'envahir les tissus environnants qui, ultimement mènera à la métastase (Gonzalez-Avila *et al.*, 2019). La première étape dans le processus métastatique, est la dissolution des liaisons intercellulaires qui maintiennent la tumeur primaire; la perte de l'E-cadhérine qui se produit durant l'EMT conduit à la translocation nucléaire de la β -caténine et amène le NF- κ B à activer le gène *mmp-9*; dès lors la MMP-9 achève le clivage du collagène interstitiel, contribuant ainsi au détachement de la cellule cancéreuse de la masse tumorale (Barillari, 2020).

Des analyses récentes sur les niveaux d'expression des ARNm des MMPs dans les GBM par rapport aux gliomes de bas grades, ait révélé que les MMP-1, -2, -7, -8, -10, -11, -14, -17 et -23, sont significativement plus élevés dans les GBM (Pullen *et al.*, 2018).

L'expression de MT1-MMP (figure 1.7) est constitutive dans de nombreux organes et tissus normaux, mais est strictement régulée par les inhibiteurs de métalloprotéases tissulaires (TIMP) (Turunen *et al.*, 2017). Cardillo *et al.*, (2006) ont démontré par immunohistochimie que MT1-MMP est plus fortement exprimé dans les tissus néoplasiques que dans leurs homologues normaux (Cardillo *et al.*, 2006; Falconer et Loadman, 2017). On ne compte plus les études qui ont décrit le rôle central de MT1-MMP dans la migration et l'invasion des cellules cancéreuse (Ferrari *et al.*, 2019). Il est admis que l'expression globale MT1-MMP est plus ou moins hétérogène, bien qu'une expression plus élevée dans la zone tumorale périphérique a toujours été rapportée (Falconer et Loadman, 2017). En effet, l'activité de MT1-MMP est plus intense en marge de la tumeur et colocalisée de façon prépondérante avec les cellules microglies, particulièrement lorsque celles-ci se trouvent être proches des cellules de gliomes. Dans cette étude, les chercheurs ont démontré une activation de la pro-MMP-2 entièrement dépendante de la MT1-MMP sécrétée par les microglies (Markovic *et al.*, 2009). On sait également que les cellules cancéreuses ajustent la quantité de MT1-MMP exposée à la surface cellulaire de façon dépendante à l'environnement

péricellulaire et la concentre au niveau des protrusions "pseudopodes d'invasion" riches en actine, pour dégrader la matrice extracellulaire (Castro-Castro *et al.*, 2016). Les principales fonctions de MT1-MMP (figure 1.8), en plus de l'activation de la pro-MMP-2 en MMP-2, sont de dégrader les composantes de la matrice extracellulaire, certaines protéines de jonctions cellulaires et des récepteurs protéiques (Strongin, 2010). Elle clive notamment le collagène de type I, II et III, la gélatine, la laminine, la fibronectine, la vitronectine mais également la glycoprotéine de surface, CD44, le récepteur apparenté à la protéine lipoprotéique de faible densité (LRP), le syndecan-1, les intégrines et les transglutaminases (Ulasov *et al.*, 2014).

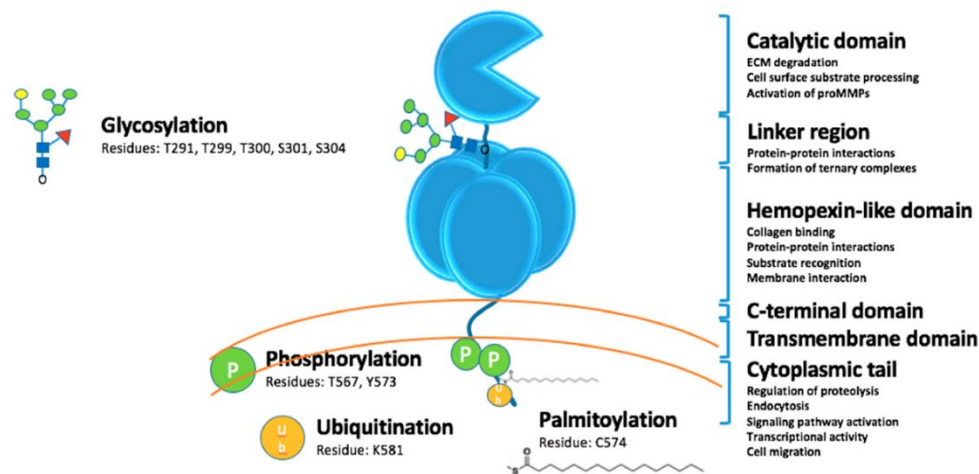


Figure 1.7 : Les domaines de MT1-MMP et ses modifications post-traductionnelles (Knapinska et Fields, 2019).

Différents stimuli sont connus pour contrôler la production de MT1-MMP dans différents tissus. Il semble que certains éléments de la matrice extracellulaire influencent l'expression de MT1-MMP et en particulier le collagène (Gifford et Itoh, 2019). En effet, le collagène de type I est un puissant inducteur de l'expression de MT1-MMP à la surface cellulaire notamment à travers la signalisation TGF β -Smad (Turunen et al., 2017).

Parmi les MMPs les plus significativement exprimées dans le GBM, on retrouve la MMP-2 (Pullen *et al.*, 2018). C'est une gélatinase qui dégrade le collagène de type IV et V et produite par les cellules stromales de plusieurs tissus (Chantrain et DeClerck, 2002). L'expression de MMP-2 a d'abord été corrélée avec une expression concomitante de MT1-MMP (Hur *et al.*, 2000). Par la suite, il a été mis en évidence qu'elle était sécrétée sous forme latente, en pro-MMP-2, nécessitant une activation. Elle se fait par MT1-MMP et implique un complexe ternaire formé de MT1-MMP, TIMP-2 et la pro-MMP-2 (figure 1.9) (Gilles *et al.*, 2000-2013). Fishman *et al.*, (1996) ont montré que les niveaux de MT1-MMP et TIMP-2 étaient renforcés par la présence de Concanavalline A dans le milieu de culture des cellules cancéreuses de l'ovaire, permettant l'activation consécutive de la MMP-2 et du pouvoir invasif (Fishman *et al.*, 1996). Thérét *et al.*, (1999) a montré qu'il était également le cas en présence du collagène de type I (Thérét *et al.*, 1999). En effet l'interaction du collagène I avec les intégrines à la surface cellulaire, active l'expression des facteurs de transcriptions Snail et LEF-1 de façon dépendante au NF- κ B dont le collagène I induit la translocation dans le noyau par l'intermédiaire du dimère β caténine-LEF-1; ceci mène à l'augmentation de l'expression des marqueurs mésenchymateux, de la vimentine et à la réduction de l'E-cadhérine (Medici et Nawshad, 2010).

Dans les GBM l'hypoxie est connue pour réguler positivement l'expression de l'ARNm de MMP-2 par l'activation du FT HIF-1 α . Dernièrement, l'IL-6 et STAT3 ont été reliés à une augmentation de l'expression de MMP-2 dans la lignée de glioblastome U87 (Hagemann *et al.*, 2012; Pullen *et al.*, 2018). Elle est aujourd'hui reconnue, pour son rôle majeur dans l'invasion cellulaire et la métastase à travers la rupture de la membrane basale (Scheau *et al.*, 2019).

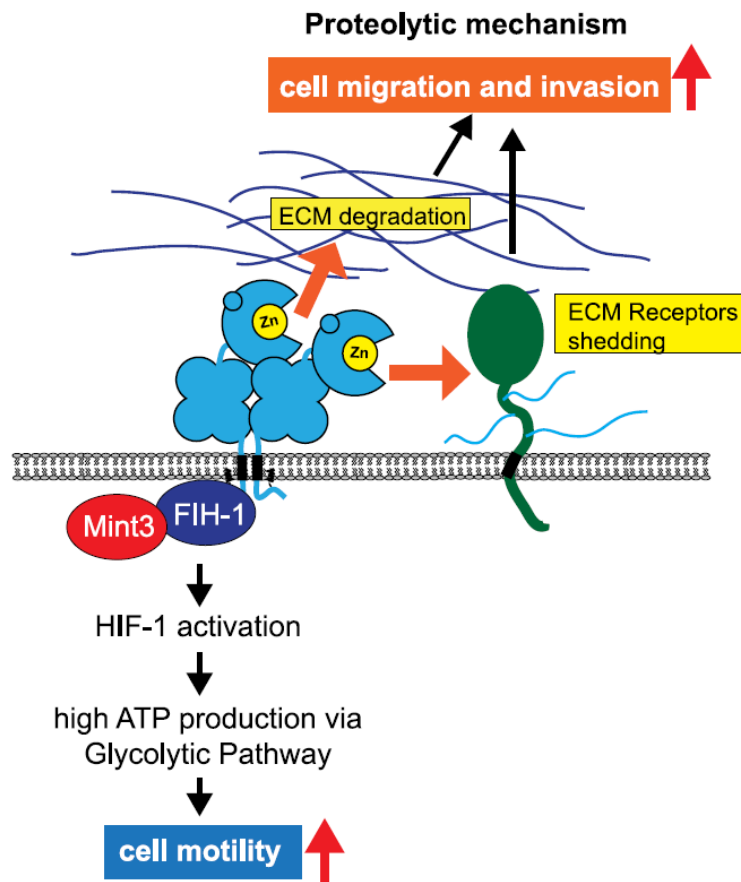


Figure 1.8 : Rôle de MT1-MMP dans la migration et l'invasion cellulaire à travers les mécanismes protéolytiques et non protéolytiques. MT1-MMP dégrade les composantes de la matrice extracellulaire (ECM) et défait les récepteurs de l'ECM à la surface cellulaire, favorisant ainsi l'invasion et la migration cellulaire de façon protéolytique dépendante. Le domaine cytoplasmique CT de MT1-MMP se lie à la protéine FIH-1 qui est inhibée par Mint4, en conséquence HIF-1 est gardée active et maintient un apport rapide et constant d'ATP pour la mobilité cellulaire (Gifford et Itoh, 2019).

1.4.6 Les récepteurs tyrosine kinase

Les récepteurs à activité tyrosine kinase sont une famille d'enzymes qui catalysent la phosphorylation de résidus tyrosine particuliers au niveau de protéines cibles. Cette modification post-traductionnelle est essentielle dans la communication cellulaire normale et dans la maintenance de l'homéostasie. Ces récepteurs sont activés par la

liaison à leurs ligands, qui enclenche une dimérisation dans un ratio ligand : récepteur de 1 : 2 ou de 2 : 2 pour activer le récepteur (Paul et Mukhopadhyay, 2004). La signalisation pTyr résulte de la combinaison de trois mécanismes moléculaires élémentaires qui sont (1) la phosphorylation du substrat permettant l'activation du signal, (2) l'interaction avec une protéine effectrice contenant un domaine d'interaction protéine-protéine SH2, assurant la lecture du signal, et (3) la déphosphorylation du substrat, conduisant à l'arrêt du signal (Sirvent *et al.*, 2014).

Les récepteurs à activité tyrosine kinases sont classés en deux grandes catégories : les Récepteurs Tyrosines Kinases (RTK) et les Non Récepteurs Tyrosines Kinases (NRTK). Les RTK sont des protéines transmembranaires possédant un multi-domaine extracellulaire, une hélice hydrophobe transmembranaire plus une portion cytoplasmique responsable de l'activité kinase. Ce type de récepteurs possède également des séquences régulatrices aux extrémités N- et C- terminal. Les NRTK sont des protéines cytoplasmiques dotées de domaines kinases et de domaines d'interaction protéine-protéine de type Src homologue-2 (SH2), se liant à la tyrosine (PTB) (Paul et Mukhopadhyay, 2004). Ces dernières coopèrent avec des récepteurs dénués de séquences catalytiques comme les intégrines (Sirvent *et al.*, 2014).

Les voies de signalisation clés intervenant dans le processus de l'EMT incluent le TGF β , JAK/STAT, les RTKs, Wnt (Wing less transcription factor) et la signalisation SHH ; parmi elle les TGF β R, FGFR EGFR et c-MET sont des récepteurs tyrosines kinases (Lee *et al.*, 2014). Le récepteur du TGF β (TGF β R) est un récepteur sérine/théonine kinase qui phosphoryle les protéines de transduction du signal Smad2 et Smad3 qui forment un complexe avec Smad4, transloque dans le noyau et régule l'expression des gènes marqueurs de l'EMT (Moustakas et Heldin, 2007). En effet, Vincent *et al* (2009) ont prouvé que le complexe Smad3/Smad4 induit par le TGF β , se lie à un cofacteur SNAI1 le complexe SNAI1-Smad3/Smad4 est recruté au niveau du promoteur de l'E-cadhérine et de l'occludine (protéines présentent dans les jonctions

adhérentes et les jonctions serrées respectivement), pour en réprimer l'expression (Vincent *et al.*, 2009). À la répression des gènes marqueurs épithéliaux, vient s'ajouter l'activation de l'expression des gènes marqueurs mésenchymateux, puisque le TGF β via son récepteur induit la formation du complexe Smad3/Smad4 qui se lie directement au promoteur du gène CDH2 codant la N-cadhérine (Yang *et al.*, 2015).

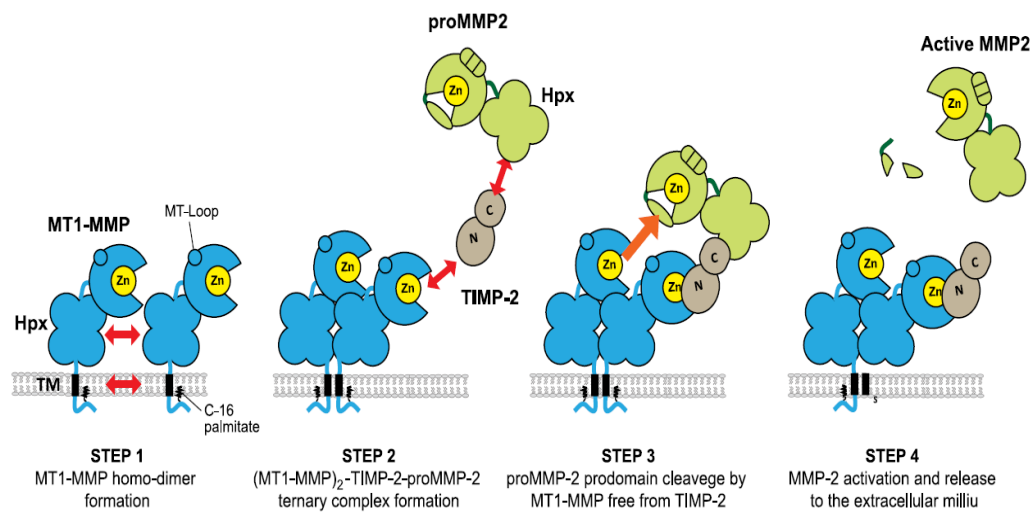


Figure 1.9 : Modèle de l'activation de la proMMP-2 par MT1-MMP à la surface cellulaire. Etape 1 : MT1-MMP forme un complexe homo-dimérique par son domaine homeopexine (Hpx) et transmembranaire à la surface de la cellule. Etape 2 : la molécule inhibitrice de métalloprotéinase tissulaire-2 (TIMP-2) se lie et inhibe une des molécule MT1-MMP du complexe dimérique, interagissant via son domaine N-terminal inhibiteur avec le domaine catalytique de MT1-MMP. L'extrémité C-terminal de TIMP-2 possède une affinité pour le domaine Hpx de la proMMP-2 et un complexe ternaire (MT1-MMP)₂-TIMP-2-proMMP-2 est formé. Etape 3 : MT1-MMP non lié à TIMP-2, clive la proMMP2 au milieu de son pro-domaine et déclenche l'activation autocatalytique de la MMP2 intermédiaire. Etape 4 : MMP-2 est libérée dans le milieu extracellulaire sous sa forme active (Gifford et Itoh, 2019).

Le c-MET est un récepteur tyrosine kinase associé à la prolifération et à l'invasion. Il possède au sein de son domaine intracellulaire une fonction tyrosine kinase. Son ligand le HGF (Hepatocyte Growth Factor) induit sa dimérisation dont découle l'autophosphorylation subséquente des résidus tyrosine du domaine cytoplasmique;

ceci a pour effet le recrutement de protéines de transduction du signal dont, Src, STAT3, PI3K (Lee *et al.*, 2014).

L'EGFR est une glycoprotéine transmembranaire récepteur tyrosine kinase connue pour phosphoryler les facteurs PTEN/AKT, ERK, JAK/STAT qui mènent à l'invasion et la métastase (Metibemu *et al.*, 2019). À la liaison avec son ligand l'EGFR induit sa dimérisation aboutissant par la suite à l'autophosphorylation du domaine tyrosine kinase intrinsèque (Ortiz *et al.*, 2021); une fois phosphorylé, ce dernier induit, par la voie de signalisation ERK1/2, la phosphorylation de Smad2/Smad3 et l'activation de Snail menant ainsi à l'EMT (Kim *et al.*, 2016).

1.5 Les traitements anti-cancéreux

1.5.1 La chirurgie

Dans le cadre du traitement du cancer la chirurgie, ou résection de la tumeur, consiste à enlever la totalité de la tumeur ou du tissu cancéreux dans un emplacement précis du corps. Celle-ci est plus efficace lorsque la tumeur en est à un stade précoce ([cancer.ca](https://www.cancer.ca)). Habituellement le recours à la chirurgie pour le traitement des tumeurs du cerveau et de la moelle épinière nécessite que (Rajaratnam *et al.*, 2020) :

- Le cancer ne se soit pas propagé
- Et que l'organisme de la personne soit suffisamment fort pour la subir

D'autres critères d'opérabilité sont pris en compte comme l'âge du patient, ses antécédents médicaux et comorbidités, son état clinique, les données anatomiques et fonctionnelles, le type de tumeur présumé et les supports techniques disponibles (Rajaratnam *et al.*, 2020). La résection fluoroguidée par l'acide 5-aminolévulinique (5-ALA) améliore la qualité de l'exérèse et la survie des patients sans récurrence. Le 5-ALA

subit une transformation enzymatique en proporphyrine IX (PPIX) qui a pour propriété de rendre la tumeur fluorescente (Picart *et al.*, 2017). La chirurgie peut être utilisée seule ou en association avec la chimiothérapie ou la radiothérapie.

1.5.2 La chimiothérapie

La chimiothérapie consiste à administrer des médicaments qui détruisent les cellules cancéreuses. Le but de la chimiothérapie est d'inhiber la prolifération cellulaire et la multiplication tumorale, évitant ainsi l'invasion et les métastases (Amjad *et al.*, 2022; Amjad et Kasi, 2021). Son désavantage majeur est son manque de sélectivité. Elle est délétère autant pour les cellules cancéreuses que les cellules saines (Tan *et al.*, 2020). La chimiothérapie a longtemps utilisé les nitrosourées comme traitement de première ligne (Simon *et al.*, 2005). La chimiothérapie regroupe les agents alkylants (témozolomide), les nitrosourées (BCNU bis-chloroéthylnitroso-urée) et les sels de platine (carboplatine) entre autres (Sanson, 2007).

1.5.2.1 Les agents alkylants

1.5.2.1.1 Témzolomide

Un agent alkylant de deuxième génération, il est utilisé comme traitement adjuvant à la radiothérapie (Chinot *et al.*, 2010; Stupp *et al.*, 2005). Parmi les caractéristiques moléculaires des GBM c'est la méthylation du promoteur MGMT (O⁶-méthylGuanine-DNA-Méthyltransférase). Ce gène code pour une protéine de réparation de l'ADN et est reconnu comme biomarqueur de prédiction cliniquement pertinent dans le cas du traitement par le témozolomide. La réduction de l'expression de ce gène, causée par la méthylation du promoteur dans 30 à 50% des GBM, inhibe la capacité de la cellule à réparer les dommages provoqués par le témozolomide (Nikiforova et Hamilton, 2011).

1.5.2.2 Nitrosourées

Les molécules telles que la carmustine et la lomustine, sont également des agents alkylants. Ils induisent des liaisons croisées entre les brins d'ADN et favorisent la carbamylation des différentes protéines. L'accumulation de dommages dans les cellules, cause l'apoptose.

Sels de platine s'accumulent dans les cellules malignes et exercent leur effet cytotoxique via la formation d'adduits avec l'ADN, empêchant la réplication et la transcription de l'ADN. Les dommages lorsque non réparés, mènent à l'apoptose. (Aparicio-Blanco *et al.*, 2020; Minniti *et al.*, 2009).

1.5.2.3 Les inhibiteurs d'intégrines

Le cilengitide est un pentapeptide cyclique qui bloque spécifiquement et de façon compétitive le site de liaison du ligand des intégrines. Il agit comme un antiangiogénique mais son efficacité reste malheureusement limitée (Aparicio-Blanco *et al.*, 2020; Minniti *et al.*, 2009).

1.5.2.4 Les inhibiteurs des tyrosines kinases

L'erlotinib et le sorafenib sont de petites molécules qui inhibent la fonction tyrosine kinase de l'EGFR, du VEGFR respectivement (Aparicio-Blanco *et al.*, 2020; Minniti *et al.*, 2009).

1.5.2.5 Les inhibiteurs de topoisomérases

Le camptothecin, inhibiteur de la topoisomérase I, et l'étoposide inhibiteur de la topoisomérase II, stabilisent le complexe ADN-protéine ce qui empêche la formation de la liaison phosphodiester. Les inhibiteurs de topoisomérase agissent durant la réplication de l'ADN, bloquent la cellule en phase G2 du cycle cellulaire et mènent à l'apoptose (Aparicio-Blanco *et al.*, 2020; Minniti *et al.*, 2009).

1.5.2.6 Les inhibiteurs d'acétylation d'histone

Le vorinostat inhibe la désacétylation des histones en recouvrant leur charge positive ce qui renforce leur interaction avec l'ADN résultant en une conformation chromatinienne fermée. Ceci inhibe la transcription de l'ADN.

1.5.2.7 Les anthracyclines

Les anthracyclines peuvent possiblement être des agents intercalant à l'ADN inhibant la synthèse d'ADN et d'ARN, générer un excès de stress oxydant, des dommages à l'ADN et la peroxydation des lipides. Exemple la doxorubicine.

La méthylation du promoteur MGMT (le gène O-6-Methylguanine-DNA-Methyltransférase code pour une protéine de réparation de l'ADN) est associée à un bon pronostic. La réduction de l'expression de ce gène causée par la méthylation du promoteur, inhibe la capacité de la cellule à réparer les dommages provoqués par le témozolomide (Nikiforova et Hamilton, 2011).

1.5.3 Radiothérapie

La radiothérapie est un traitement qui utilise des faisceaux de radiations pour réduire la taille de la tumeur et détruire les cellules cancéreuses. Des rayonnements gamma ou de faisceaux de protons peuvent être utilisés (Kim et Khang, 2020). Dans le cas des glioblastomes, il semble que l'ajout du témozolomide à la radiothérapie aboutisse à une survie statistiquement accrue (Stupp *et al.*, 2005). Ce constat a été confirmé plus récemment lorsqu'une étude a révélé que les patients associant à leur radiothérapie à une prise quotidienne de témozolomide avaient une moyenne de survie supérieure (Nachbichler *et al.*, 2017).

1.5.4 Autres thérapies

Parmi les nombreuses autres thérapies, on retrouve la thérapie ciblée, l'immunothérapie, l'hormonothérapie ou encore les nouvelles perspectives de l'utilisation de la nanomédecine.

La thérapie ciblée, la première stratégie anticancéreuse, consiste au blocage du domaine extracellulaire d'un ligand ou d'un récepteur ou la reconnaissance d'un antigène de surface par l'intermédiaire d'un anticorps qui ne pénètre pas dans la cellule. En se basant sur les modifications génomiques, épigénétiques et transcriptionnelles, la thérapie ciblée optimise les traitements. Elle utilise des molécules qui ciblent des enzymes, des facteurs de croissances et des transducteurs du signal, interférant ainsi avec différents processus cellulaires oncogènes. Par exemple, dans le cas des gliomes, le brivanib bloque le VEGF et le FGFR (Tsimberidou, 2015).

L'immunothérapie est une forme de thérapie ciblée, qui utilise des anticorps monoclonaux (mAbs) ; ces médicaments portent le suffixe "mab" et peuvent être seuls,

conjugués ou biphasiques. Lorsqu'ils sont seuls, les mAbs se lient aux molécules cibles rendant les cellules tumorales la cible du système immunitaire ; c'est le cas du bevacizumab : anticorps utilisé dans le traitement de plusieurs cancers dont le glioblastome. Les mAbs- conjugués transportent des molécules radioactives ou chimiothérapeutiques qui délivrent spécifiquement la molécule toxique à la cellule tumorale cible. Enfin les mAbs ayant une double spécificité, sont composés de deux anticorps attachés comme le "blinatumomab" qui se lient en même temps au CD19 et au CD3. Actuellement, l'immunothérapie cible les protéines de contrôle du cycle cellulaire comme le CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4) et le programmed death-1 (PD-1) (Seebacher *et al.*, 2019).

L'utilisation de nanoparticules (NP) représente la stratégie de traitement anticancéreuse la plus prometteuse. Les NPs peuvent transporter des médicaments cytotoxiques ou des molécules adjuvantes, présenter les antigènes tumoraux aux cellules présentatrices d'antigènes plus efficacement ou encore être couplé à la thérapie photothermale (Kim et Khang, 2020).

1.6 Chimio prévention et EGCG

Il a été observé que l'incidence du cancer gastro-intestinal des population d'Asie du sud-est est plus faible que celle de leurs homologues occidentaux et cela en raison principalement de leur régime alimentaire riche en ail, oignon, tomate, curcuma, gingembre, légumes de type crucifères et du thé vert. Un aliment est dit chimiopréventif lorsque celui-ci est capable de retarder le début d'un processus carcinogène. Etant d'origine naturelle, les aliments chimiopréventifs sont pharmacologiquement sains. Leur effet a été étudié et reconnu pour avoir un effet inhibiteur sur de nombreux facteurs de croissance comme NF- κ B, AP-1 (Activating Protein 1) et Snail, sur des récepteurs de facteurs de croissances FGFR et EGFR et la voie de signalisation JAK-

STAT (Dorai et Aggarwal, 2004). Présentement, les agents de chimioprévention peuvent être classés en quatre grandes catégories : les hormones, les médicaments, les agents dérivés de l'alimentation et les vaccins (Benetou *et al.*, 2015). Des recherches expérimentales ont révélé l'effet bénéfique des agents de chimioprévention dérivés des aliments naturels dont les isoflavones de soja, la curcumine, le resveratrol et l'épigallocatechine-3-gallate (EGCG) (Sarkar et Li, 2007).

Malgré le potentiel anticarcinogène des feuilles de thé vert dans le modèle animal suggérant un effet potentiellement protecteur, les preuves épidémiologiques de l'effet protecteur contre le cancer lié à la consommation de thé vert étaient initialement faibles (Kohlmeier *et al.*, 1997). Le thé vert a été plus régulièrement associé à une réduction du risque de cancer que le thé noir, et cela vient probablement du fait que le thé vert est plus concentré en catéchines, dont fait partie l'EGCG, que le thé noir (Yan *et al.*, 2020). Plus récemment, une méta-analyse indique qu'il y aurait une association inverse entre les cancers de l'endomètre, des poumons, de l'ovaire, le lymphome non-Hodgkinien et la consommation de thé vert (Abe et Inoue, 2021).

1.6.1 L'EGCG

L'EGCG est un polyphénol dérivé du thé *Camelia sinensis* de la classe des catéchines (figure 1.10) (Nagle *et al.*, 2006). Les études relatant les bienfaits de la consommation de thé sur la santé, date des travaux de Sato *et al.* (1989) sur la prévention contre les accidents vasculaire cérébraux (Sato *et al.*, 1989). Par la suite, les chercheurs ont étendu leurs études à l'effet de thé sur le cancer. La plupart des études conclurent à un effet non significatif de la consommation de thé sur la mortalité par le cancer (Higdon et Frei, 2003). Etant le constituant majeur du thé, l'EGCG a fait l'objet de nombreuses études qui ont toutes révélé son pouvoir inhibiteur sur la prolifération cellulaire de plusieurs lignées tumorales (Cheng *et al.*, 2020; Chu *et al.*, 2017). Wang et Bachrach

(2002) ont démontré que l'EGCG inhibait préférentiellement l'activité tyrosine kinase de cellules cancéreuses sans altérer les cellules normales (Wang et Bachrach, 2002). Une étude de la pharmacocinétique des catéchines du thé dont l'EGCG démontre que 20 mg/kg de thé vert contient 195 ng d'EGCG. La concentration plasmatique atteinte ne dépasse pas les 78 ng/mL (Lee *et al.*, 2002). Une petite fraction de catéchines présents dans le tractus intestinal après la consommation de thé, peut être absorbée et sont alors considérés biodisponibles. Sa biodisponibilité est inférieure à celle d'autres catéchines, en cause son poids moléculaire élevé 458,4g/mol et ses 8 groupements phénoliques (Yang *et al.*, 2017). Il semble également, que la consommation d'acide ascorbique de façon concomitante aux catéchines augmente significativement leur recouvrance (Cai *et al.*, 2018). Il ne semble pas y avoir de récepteur dédié au transport de l'EGCG ; car le mécanisme d'entrée des catéchines dans la cellule repose principalement sur la diffusion passive (Cai *et al.*, 2018). Toutefois, une étude en 2004 a révélé que l'EGCG inhibait la prolifération de cellules tumorales en se liant au récepteur de la laminine 67LR (Tachibana *et al.*, 2004). Ceci a été confirmé par l'étude d'interaction entre l'EGCG et le récepteur 67LR (Fujimura *et al.*, 2012).

1.6.2 Les applications actuelles de l'EGCG

Ces dernières années, l'EGCG a fait l'objet de recherche quant aux mécanismes lui conférant son pouvoir anticancéreux. Ces études ont notamment révélé que l'EGCG inhibait l'angiogenèse. L'EGCG réduit la production de VEGF et interfère avec l'activité du VEGFR-2. En effet, en inhibant l'activation de l'expression de HIF-1 α , NF- κ B et le VEGF, il inhibe l'angiogenèse. Il inhibe la prolifération tumorale et accélère l'apoptose de façon dose dépendante et ceci en inhibant l'activité des facteurs de transduction et d'activation de la transcription STAT3. Dans les mécanismes anticancéreux, on peut également citer l'inhibition de la voie de signalisation

PI3K/AKT/mTOR, en réduisant la phosphorylation de ces facteurs AKT (p-AKT) et mTOR (p-mTOR) (Almatroodi *et al.*, 2020).

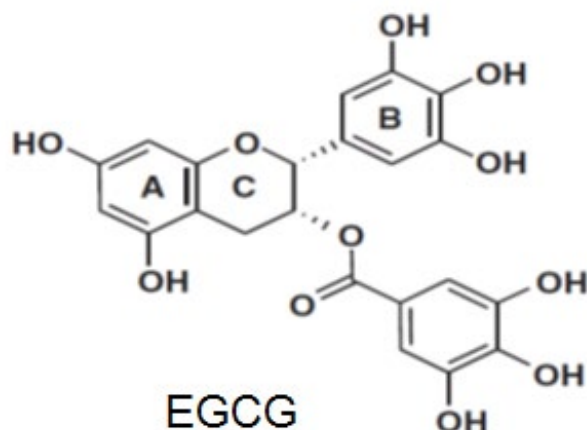


Figure 1.10 : Structure chimique de (-)-épigallocatechine-3-gallate (EGCG) (Ishii *et al.*, 2011). L'EGCG comprend un cycle benzyldiol (A) lié à une fraction tétrahydropyran (C), un cycle pyrogallol (B) et un groupement galloyl (cycle sans lettre) adapté de (Botten *et al.*, 2015).

Les propriétés avantageuses de l'EGCG le désignent pour faire partie de la solution dans la prévention contre le cancer. Ce fut d'ailleurs le cas lorsqu'une étude en cohorte de plus de 8000 individus a révélé que la consommation quotidienne de thé a retardé le début de certains cancers. Par la suite, le suivi des patientes atteintes de cancer du sein a montré que celles dont le cancer était en phase I et II ont subi moins de récives et vécurent une plus longue période sans rechute (Singh *et al.*, 2011). Une autre étude a prouvé que la prise quotidienne d'un mélange standardisé de catéchines ne contenant aucune caféine, soit 400 mg d'EGCG par jour pendant 1 an administré avec la nourriture, s'accumulait dans le plasma et était bien toléré. Les catéchines du thé n'ont provoqué aucun effet délétère sur le traitement de néoplasies intraépithéliales prostatiques de haut grade, ni aucune augmentation du risque de cancer de haut grade dans ce groupe d'hommes, attestant par la même de leurs innocuités (Kumar *et al.*, 2016). Lors d'un essai de phase II pilote, l'accumulation de l'EGCG dans l'urothélium

de la vessie non tumorale, atteignant des niveaux plasmatiques et urinaires de manière dose dépendante (Gee *et al.*, 2017).

Récemment, une étude a utilisé un composé appelé pro-EGCG, conçu pour améliorer la stabilité de l'EGCG sur des cellules de cancer du sein triple négatif (MDA-MB-231). Les MDA-MB-231 pouvaient convertir cette molécule en EGCG qui était alors accumulé. Celles-ci montrèrent un meilleur taux d'inhibition de protéasome, de l'apoptose et une répression de la croissance, lorsque comparé aux cellules traités avec l'EGCG (Bimonte *et al.*, 2020).

En 2020, les résultats de l'essai prospectif randomisé MIRACLE, mené en Allemagne sur la prévention des adénomes colorectaux (AC) et par la même des cancers colorectaux en utilisant des extraits de thé vert, s'est étendu sur 3 ans. Parmi les 1001 patients suivis âgés entre 50 et 80 ans ayant subi une polypectomie (ablation de polypes) de moins de 6 mois. Leurs résultats sont assez concrets, puisqu'ils concluent que l'extrait de thé vert réduit l'incidence d'AC métachrones de façon significative mais seulement chez les hommes (Ettrich *et al.*, 2020).

1.7 Projet de recherche

1.7.1 Problématique

Le glioblastome est la tumeur du SNC la plus fréquente et la plus agressive. Malgré l'ablation de la tumeur et l'association de la radiothérapie à la chimiothérapie, les patients sont exposés couramment, après une période sans maladie, à la récurrence de la tumeur.

La caractéristique qui véhicule l'agressivité du glioblastome est sa capacité à envahir les tissus environnants et à se propager via le processus de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT).

L'EGCG est une molécule phytochimique présente dans le thé, dont les effets anticancéreux ont été avérés au cours de nombreux travaux de recherche et de quelques études cliniques. Toutefois, l'EGCG ne fait pas encore partie intégrante des protocoles standards de chimiothérapie ou de thérapies adjuvantes. En cause, son absorption limitée, sa concentration plasmatique variable et le fait qu'il soit différemment accumulé dans les tissus de l'organisme. De plus, son mécanisme d'action est encore très peu connu. C'est dans ce contexte que viennent s'insérer nos efforts de recherche. Il est plus qu'important de déterminer à quel niveau intervient l'action de l'EGCG, de déterminer ses cibles moléculaires et les conséquences sur les voies de signalisation régulant l'EMT.

1.7.2 Hypothèse de travail

L'EGCG est connu pour son inhibition sur l'induction de l'expression de plusieurs gènes régulant l'EMT dont fait partie Snail, mais aussi des MMPs. Cela implique les facteurs de transduction du signal de différentes voies de signalisation.

1.7.3 Objectif de recherché

Notre objectif est d'identifier les voies de signalisation affectées par l'EGCG sous l'influence de la Concanavaline A et du TGF β , deux inducteurs de l'EMT, sur une lignée humaine de glioblastome U87. Pour cela, les taux d'expressions géniques, protéiques ainsi que la cinétique d'activation des MT1-MMP et Snail sont analysés. Dans le but de mieux documenter la cascade moléculaire menant à l'EMT, nous nous

sommes intéressés à la hiérarchie de signalisation entre MT1-MMP et Snail. C'est via l'expression génique et protéique que se définira cette hiérarchie dont l'impact sera ensuite évalué sur la migration cellulaire.

CHAPITRE II

Article

MT1-MMP cooperates with TGF- β receptor-mediated signaling to trigger SNAIL and induce epithelial-to-mesenchymal-like transition in U87 glioblastoma cells

Souad Djedai, Narjara Gonzalez Suarez, Layal El Cheikh Hussein, Sahily Rodriguez Torres, Lorraine Gresseau, Sheraz Dhayne, Zoé Joly-Lopez and Borhane Annabi

Manuscrit publié dans la revue *International Journal of Molecular Sciences*

Djedai S, Gonzalez Suarez N, El Cheikh-Hussein L, Rodriguez Torres S, Gresseau L, Dhayne S, Joly-Lopez Z, Annabi B. MT1-MMP Cooperates with TGF- β Receptor-Mediated Signaling to Trigger SNAIL and Induce Epithelial-to-Mesenchymal-like Transition in U87 Glioblastoma Cells. *Int J Mol Sci*. 2021 Nov 30;22(23):13006. doi: 10.3390/ijms222313006. PMID: 34884812; PMCID: PMC8657819.

Contribution des auteurs

Souad Djedai : Expérimentations, collecte et analyse des données, rédaction du manuscrit

Narjara Gonzalez Suarez : Expérimentations, collecte de données (migration)

Layal El Cheikh Hussein : Expérimentations, collecte de données (phosphorylation)

Sahily Rodriguez Torres : Expérimentations, collecte de données (gene array)

Lorraine Gresseau : Expérimentations, collecte et analyse de données (sphéroïdes)

Sheraz Dhayne : Collecte et analyse de données (volcano plot)

Zoé Joly-Lopez : Analyse de données, rédaction du manuscrit

Borhane Annabi : Conceptualisation, analyse, financement, rédaction du manuscrit

MT1-MMP cooperates with TGF- β receptor-mediated signaling to trigger SNAIL and induce epithelial-to-mesenchymal-like transition in U87 glioblastoma cells

Souad Djedai^{1,2} Narjara Gonzalez Suarez^{1,2}, Layal El Cheikh Hussein^{1,2}, Sahily Rodriguez Torres^{1,2}, Lorraine Gresseau^{1,2}, Sheraz Dhayne², Zoé Joly-Lopez² and Borhane Annabi^{1,2*}

¹Laboratoire d'Oncologie Moléculaire and CERMO-FC, Université du Québec à Montréal, Québec, Canada

²Département de Chimie, and CERMO-FC, Université du Québec à Montréal, Québec, Canada

Running title : MT1-MMP and TGF control SNAIL expression

Key words : Glioblastoma, MT1-MMP, EGCG, EMT, Concanavalin A, SNAIL, STAT3

* To whom correspondence and reprint requests should be directed

Laboratoire d'Oncologie Moléculaire

Université du Québec à Montréal

C.P. 8888, Succ. Centre-ville

Montréal, Québec

CANADA

H3C 3P8

Phone : (514) 987-3000 ext. 7610

E-mail : annabi.borhane@uqam.ca

Abbreviations : ConA, Concanavalin A; CSC, Cancer stem cells; DEG. Differentially expressed genes; EMT, epithelial-to-mesenchymal transition; ECM, extracellular

matrix; EGCG, epigallocatechin gallate; GBM, glioblastoma multiforme; LIF, Leukemia inhibitory factor; MMP, matrix metalloproteinase; MT1-MMP, membrane type-1 matrix metalloproteinase; STAT3, Signal transducer and activator of transcription 3; TGF, transforming growth factor

2.1 Résumé

Le facteur de croissance transformant (TGF)- β régule le processus métastatique via la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) auquel la métalloprotéinase matricielle de type-1 (MT1-MMP) a été associée. La coopération entre le processus de l'EMT et l'activité des MMP dans les glioblastomes multiformes, la communication moléculaire entre les voies de signalisation TGF- β -dépendantes et MT1-MMP sont très peu connues. Dans ce travail, l'existence de biomarqueurs de l'EMT communs, induits par le TGF- β et l'inducteur de MT1-MMP, la Concanavaline A (ConA), est ici explorée par une analyse par RNA-Seq et un criblage génique différentiel, dans un modèle de cellules de glioblastome humain U87. Le TGF- β et la ConA ont induit l'expression de SNAIL et de la Fibronectine de manière dose-dépendante. Ces inductions ont été réprimées par l'inhibiteur pharmacologique de l'activité kinase du récepteur au TGF- β , le Galunisertib, par les inhibiteurs de la voie JAK/STAT, l'AG490 et le Tofacitinib et par l'épigallocatechine gallate (EGCG). La répression génique transitoire de MT1-MMP a inhibé l'induction de SNAIL induite par la ConA et a annulé le chimiotactisme cellulaire induit par le TGF- β . De plus, la ConA a induit la phosphorylation de STAT3 et de Src suggérant que cette voie soit impliquée dans l'axe de signalisation médié par MT1-MMP et conduisant à l'induction de SNAIL. Nos résultats révèlent, un nouvel axe de signalisation reliant MT1-MMP à l'EMT induite par le TGF- β dans les cellules de glioblastome, processus qui peut être inhibé par l'EGCG, une catéchine dérivée de notre alimentation.

2.2 Abstract

Transforming growth factor (TGF)- β triggers metastasis through epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) to which a role for a membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) has been associated. While EMT cooperates with MMP activity in glioblastoma multiforme, the molecular crosstalk between TGF- β signaling and MT1-MMP however remains poorly understood. Here, the existence of common EMT biomarkers, induced through TGF- β and MT1-MMP inducer Concanavalin A (ConA), was explored using RNA-seq analysis and differential gene arrays in human U87 glioblastoma cells. TGF- β and ConA triggered SNAIL and Fibronectin expressions in a dose-dependent manner. Those inductions were antagonized by the TGF- β receptor kinase inhibitor Galunisertib, the JAK/STAT inhibitors AG490 and Tofacitinib, and by the diet-derived epigallocatechin gallate (EGCG). Transient gene silencing of MT1-MMP prevented the induction of SNAIL by ConA and abrogated TGF- β -induced cell chemotaxis. Moreover, ConA induced STAT3 and Src phosphorylation suggesting these pathways to be involved in the MT1-MMP-mediated signaling axis that led to SNAIL induction. Our findings highlight a new signaling axis linking MT1-MMP to TGF- β -mediated EMT-like induction in glioblastoma cells, which process can be prevented by the diet-derived EGCG.

2.3 Introduction

One of the compelling reasons, which makes it difficult to foresee brain cancer therapy response, relates to the adaptive metabolic mechanisms that regulate their chemoresistance phenotype [1, 2]. Among the therapy resistance mechanisms that regulate cancer cell death/survival balance, the fundamental importance of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in metastasis and progression of cancer has been recognized [3]. Interestingly, transforming growth factor (TGF)- β is a well-known contributor to EMT, and TGF- β downstream signaling was found highly active in high-grade glioblastomas, the most fatal tumor of the central nervous system, where elevated TGF- β activity was associated with poor clinical outcome [4]. The tumor promoting function of TGF- β is therefore a promising potential therapeutic target in high-grade gliomas, including glioblastoma multiforme (GBM) [5].

Recent analysis of transcriptomic datasets about mesenchymal shift in GBM show that, in terms of epithelial and mesenchymal phenotype, the majority of GBM appear to have a transcriptomic profile that is more mesenchymal than epithelial [6]. If induced, this phenotype can be shifted toward an even more mesenchymal phenotype in an EMT-like process in glioma cells [7]. A better understanding of the molecular regulation of the EMT during tumor spreading will therefore help design better therapeutics to target this program when treating GBM. Among the various signaling pathways associated with glioma malignancy, TGF- β signaling is hypothesized to be directly involved in such molecular mechanisms [8, 9]. A comparative proteome mapping of the U87 human glioblastoma cell line, with and without TGF- β treatment, identified numerous proteins involved in the molecular mechanisms of GBM oncogenesis and TGF- β signaling [10]. Among which, increases in 512 proteins upon TGF- β treatment were associated with survival, proliferation, cell migration and DNA repair. Moreover, studies have reported that TGF- β is able to induce metastatic processes and tumor progression via autocrine mechanisms [11, 12].

TGF- β is a multifunctional cytokine that acts as a downstream signaling both in the early stages of tumorigenesis as a potential tumor suppressor [13], and then as a tumor-promoting factor promoting EMT and tumor metastasis through Smad and Smad-independent signaling pathways [14]. The activation of the classical Smad signaling pathway occurs when TGF- β first binds to the extracellular segment of TGF receptor-type II that leads to the phosphorylation of TGF receptor-type I. This then phosphorylates and activates the downstream Smads for intracellular signaling [15]. Recently, dietary-derived anthocyanidins have been shown to inhibit EMT through a TGF β /Smad2 signaling pathway in glioblastoma cells [16]. In addition, suppressing effects of green tea extract and epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on TGF- β -induced EMT were reported in human cervical cancer cells [17]. Whether the pleiotropic actions of dietary polyphenols also target other EMT-mediated cues or downstream signaling pathways such as signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) in EMT [18] remains unknown.

Among specific brain cancer biomarkers promoting invasion and metastasis and characterized by both MMP catalytic functions and intracellular signaling properties, membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP), a key membrane bound MMP, is involved in extracellular matrix (ECM) degradation [19-21] and, more recently, signal transducing functions leading to angiogenesis [22], autophagy [23, 24], inflammation [25, 26], immune response [27], and cell death processes [28, 29]. Interestingly, type I collagen, a major MT1-MMP substrate in the ECM, is a powerful inducer of cell-surface MT1-MMP expression through TGF- β -Smad signaling [26, 30, 31]. Moreover, EGCG was found to inhibit MT1-MMP-mediated downstream signaling involving STAT3 [32, 33].

In the current study, we investigated the possible crosstalk between TGF- β signaling and MT1-MMP in the setting of EMT-like processes in an established U87 grade IV human glioblastoma cell model. Our findings help better characterize the pleiotropic actions of EGCG on processes regulating the invasive phenotype of brain cancer cells,

and on the novel crosstalk between MT1-MMP and TGF-receptor-mediated signaling in EMT.

2.4 Materials and methods

2.4.1 Materials

Sodium dodecylsulfate (SDS), epigallocatechin-3-gallate (EGCG), Tofacitinib, AG490, and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma (Oakville, ON). Electrophoresis reagents were from Bio-Rad (Mississauga, ON). The enhanced chemiluminescence (ECL) reagents were from Amersham Pharmacia Biotech (Baie d'Urfé, QC). Micro bicinchoninic acid protein assay reagents were from Pierce (Rockford, IL). Galunisertib (LY2157299) was from MedChemExpress (Monmouth Junction, NJ). The polyclonal antibody against the MT1-MMP hinge domain was from Chemicon (Temecula, CA). The polyclonal antibodies against SNAIL, Fibronectin, Smad2/3, phosphorylated Smad2/3, Src, phosphorylated Src, STAT3 and phosphorylated STAT3 were obtained from Cell Signaling Technology Inc. (Danvers, MA, USA). Horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit and anti-mouse IgG secondary antibodies were obtained from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA). The monoclonal antibody against glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was from Advanced Immunochemical Inc. (Long Beach, CA, USA). Horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit and anti-mouse IgG secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA).

2.4.2 Cell culture

Human U87 glioblastoma cells were purchased from American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA). Serum starvation is performed by culturing the cells in Eagle's minimal essential medium (EMEM; Gibco BRL, Grand Island, NY) and 100 units/ml Penicillin/Streptomycin, and from which the 10% inactivated fetal bovine serum (Hyclone Laboratories, Logan, UT) is removed.

2.4.3 Immunoblotting procedures

Human U87 glioblastoma cells were lysed, and proteins were separated by SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). In order to detect MT1-MMP proteolytic processing, samples were subjected to SDS-PAGE gels in reducing conditions. After electrophoresis, proteins (30 µg) were electrotransferred to polyvinylidene difluoride membranes, which were then blocked for one hour at room temperature with 5% non-fat dry milk in Tris-buffered saline (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5) containing 0.3% Tween-20 (TBST; Bioshop, TWN510-500). Membranes were further washed in TBST and incubated with the primary antibodies (1/1,000 dilution) in TBST containing 3% BSA and 0.1% sodium azide (Sigma-Aldrich Canada, S2002), followed by an one-hour incubation with horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit IgG at 1/2,500 dilutions in TBST containing 5% non-fat dry milk. Immunoreactive material was visualized by enhanced chemiluminescence (Amersham Pharmacia Biotech, RPN3004).

2.4.4 Gelatin zymography

Gelatin zymography was used to assess the extracellular levels and activation states of secreted proMMP-2 and MMP-2 activities. Briefly, an aliquot (20 µl) of the culture medium was subjected to SDS-PAGE in a gel containing 0.1 mg/ml gelatin (Sigma-Aldrich Canada, G2625). The gels were then incubated in 2.5% Triton X-100 (Bioshop, TRX506.500) and rinsed in nanopure distilled water. Gels were further incubated at 37°C for 20 h in 20 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 0.02% Brij-35, 50 mM Tris–HCl buffer, pH 7.6 and then stained with 0.1% Coomassie Brilliant blue R-250 (Bioshop, CBB250) and destained in 10% acetic acid, 30% methanol in water. Gelatinolytic activity was detected as unstained bands on a blue background.

2.4.5 Total RNA isolation, cDNA synthesis and real-time quantitative PCR

Total RNA was extracted from 10⁷ human U87 glioblastoma cell monolayers in 1 ml TRIzol™ as recommended by the manufacturer (Life Technologies, Gaithersburg, MD). For cDNA synthesis, one µg of total RNA was reverse-transcribed into cDNA

using a high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Gene expression was quantified by real-time quantitative PCR using iQ SYBR Green Supermix (BIO-RAD, Hercules, CA). DNA amplification was carried out using an Iqycler iQ5 (BIO-RAD, Hercules, CA) and product detection was performed by measuring binding of the fluorescent dye SYBR Green I to double-stranded DNA. The following primer sets were provided by QIAGEN (Valencia, CA): MT1-MMP (Hs_MMP14_1_SG, QT00001533), SNAIL (Hs_SNAIL_1_SG, QT00010010), PPIA (Hs_PPIA_4_SG, QT01866137), GAPDH (Hs_GAPDH_1_SG, QT00079247), and β -Actin (Hs_Actb_2_SG, QT01680476). The relative quantities of target gene mRNA were normalized against internal PPIA, GAPDH, and β -Actin RNA and were measured by following a Δ CT method employing an amplification plot (fluorescence signal vs. cycle number). The difference (Δ C_T) between the mean values in the triplicate samples of target gene and those of β -Actin RNA were calculated by CFX manager Software version 2.1 (Bio-Rad) and the relative quantified value (RQV) was expressed as $2^{-\Delta C_T}$.

2.4.6 Total RNA library preparation and sequencing

Total RNA (500 ng) was used for library preparation. RNA quality control was assessed with the Bioanalyzer RNA 6000 Nano assay on the 2100 Bioanalyzer system (Agilent technologies) and all samples had a RIN above 8. Library preparation was done with the KAPA mRNAseq Hyperprep kit (KAPA, Cat no. KK8581). Ligation was made with Illumina dual-index UMI (IDT) and 10 PCR cycles was required to amplify cDNA libraries. Libraries were quantified by QuBit and BioAnalyzer DNA1000. All libraries were diluted to 10 nM and normalized by qPCR using the KAPA library quantification kit (KAPA; Cat no. KK4973). Libraries were pooled to equimolar concentrations. Three biological replicates were generated. Sequencing was performed with the Illumina Nextseq500 using the Nextseq High Output 75 (1x75bp) cycles kit. Around 15-20 M single-end PF reads were generated per sample. Library preparation and sequencing was performed at the Genomic Platform of the Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC) (QC, Canada).

2.4.7 Reads alignment and differential expression analysis

Reads were 3' trimmed for quality and adapter sequences using Trimmomatic version 0.35 and only reads with at least 50 bp in length were kept for further analyses. Trimmed reads were aligned to the reference human genome version GRCh38 (Gene annotation from Gencode version 37, based on Ensembl 103) using STAR version 2.7.1a [34]. Gene expressions were obtained both as read count directly from STAR as well as computed using RNA-Seq by Expectation Maximization (RSEM) [35] in order to obtain normalized gene and transcript level expression, in TPM values, for these stranded RNA libraries. Differential expression analysis was done using DESeq2 version 1.22.2 [36]. The Package *limma* [37] was used to normalize expression data, and read counts data were analyzed using DESeq2. Principal component analysis (PCA) for the first two most significant components was done with R packages [38] found in iDEP (integrated Differential Expression and Pathway) analysis [39]. iDEP was also used to determine significant differentially expressed genes (DEGs) with DESeq2 with FDR adjusted p-value of 0.05 and fold-change with a cutoff of two.

2.4.8 Human EMT PCR array

The RT² Profiler™ PCR Array for Human Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) (PAHS-090Z) was used according to the manufacturer's protocol (QIAGEN). The detailed list of the key genes assessed can be found on the manufacturer's website (<https://geneglobe.qiagen.com/us/product-groups/rt2-profiler-pcr-arrays>). Using real-time quantitative PCR, we reliably analyzed expression of a focused panel of genes related to EMT biomarkers. Relative gene expressions were calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method, in which C_T indicates the fractional cycle number where the fluorescent signal reaches detection threshold. The 'delta-delta' method uses the normalized ΔC_T value of each sample, calculated using five endogenous control genes (*B2M*, *HPRT1*, *RPL13A*, *GAPDH*, and *ACTB*). Fold change values are then presented as average fold change = $2^{(\text{average } \Delta\Delta C_T)}$ for genes in differentiated adipocytes relative to pre-adipocytes. Detectable PCR products were obtained and defined as requiring <35

cycles. The resulting raw data were then analyzed using the PCR Array Data Analysis Template (<http://www.sabiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php>). This integrated web-based software package automatically performs all $\Delta\Delta C_T$ based fold-change calculations from the uploaded raw threshold cycle data.

2.4.9 RNA interference

U87 glioblastoma cells were transiently transfected with siRNA sequences using Lipofectamine-2000 transfection reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Gene silencing was performed using 20 nM siRNA against MT1-MMP (HS_Mmp14_6 HP siRNA, S103648841), SNAIL (Hs_SNAI1_5 HP siRNA, SI02636424) or scrambled sequences (AllStar Negative Control siRNA, 1027281). The above small interfering RNA and mismatch siRNA were all synthesized by QIAGEN and annealed to form duplexes.

2.4.10 Statistical data analysis

Data are representative of three or more independent experiments. Statistical significance was assessed using Student's unpaired t-test. Probability values of less than 0.05 were considered significant and an asterisk identifies such significance in the figures.

2.5 Results

2.5.1 SNAIL among the common EMT biomarkers induced by Concanavalin A and TGF- β in U87 glioblastoma cells

Concanavalin A (ConA) has been demonstrated to trigger numerous signaling pathways in glioblastoma cells, which among other cellular processes, lead to pro-angiogenic and pro-inflammatory events [40]. ConA has also been shown to require MT1-MMP-mediated signaling to trigger U87 glioblastoma cell invasive phenotype [41]. Here, we wanted to first assess whether ConA could also trigger epithelial-to-mesenchymal (EMT) biomarkers expression, and second compare ConA to the classical EMT inducer TGF- β . We therefore isolated total RNA from U87 glioblastoma cells treated with either vehicle, 10 nM TGF- β , or 30 μ g/ml ConA, and performed RNA sequencing (RNA-seq) analysis to identify genes potentially involved in ConA- and TGF-mediated response. A gene expression PCA plot mapping the distances between samples revealed major differences for two replicates (ConA3 and TGF4), which were then discarded from future analysis (Supplemental Figure.S1). Differentially expressed genes (DEGs) analysis between ConA-treated cells and untreated cells, and between TGF-treated cells and untreated cells was performed. Among the DEGs identified in ConA-treated cells, SNAIL (ENSG00000124216) was found among the top 10 most upregulated genes, with a $\sim$ 10.5-fold change (p-value $8.03\text{e-}13$) (Figure.2.1A, Supplemental Table.1). SNAIL was also upregulated in cells treated with TGF- β , with a fold change of $\sim$ 9.9 (p-value $4.45\text{e-}10$) (Figure.2.1B). Whereas TGF-mediated transcriptional regulation of SNAIL in EMT is well recognized [42], the mechanisms linking SNAIL regulation and ConA induction of EMT are less understood and were further confirmed using a differential gene array approach. In agreement with the RNA-seq analysis, SNAIL was also found among the most significantly upregulated genes (Figure.2.1C).

2.5.2 Galunisertib and EGCG inhibit TGF- β - and Concanavalin A-mediated SNAIL induction

Given the ConA-mediated induction of SNAIL, and that SNAIL is a strong downstream biomarker also induced upon TGF- β treatment, we next explored whether any common signaling crosstalk was involved between TGF- β mediated signaling and the effects of ConA. Serum-starved U87 glioblastoma cells were treated with increasing concentrations of TGF- β in the presence or absence of either 30 μ M EGCG or 10 μ M Galunisertib, a selective TGF- β receptor type I (TGF- β RI) kinase inhibitor [43]. The protein expression levels of SNAIL, Fibronectin and GAPDH were then assessed by immunoblotting using cell lysates. SNAIL was effectively induced upon TGF- β treatment and found to be inhibited by EGCG and by Galunisertib (Figure.2.2A, upper panel). While the expression of GAPDH remained unaltered (Figure.2.2A, lower panel), that of Fibronectin was also repressed by both agents suggesting the involvement of common signaling intermediates in the induction of EMT biomarkers (Figure.2.2A, middle panel). In agreement with its increased transcript levels (Figure.2.1), SNAIL was also found induced by ConA, but was inhibited in the presence of either EGCG or Galunisertib (Figure.2.2B). Finally, total RNA was extracted from treated cells and RT-qPCR performed as described in the Methods section. SNAIL induction was again confirmed in TGF- β and ConA-treated cells at the transcript level, whereas it was inhibited in both cases by Galunisertib (Figure.2.2C). On the other hand, EGCG was unable to inhibit ConA-induced SNAIL gene expression, whereas it inhibited SNAIL induction in TGF- β -treated cells (Figure.2.2C).

2.5.3 MT1-MMP silencing represses TGF- β - and Concanavalin A-mediated induction of SNAIL

SiRNA-mediated gene silencing was performed in U87 glioblastoma cells transiently transfected with siScrambled, siSNAIL, or siMT1-MMP as described in the Methods section. Serum-starved cells were next treated with 10 nM TGF- β or 30 μ M ConA for 24 hours, and conditioned media harvested to assess proMMP-2 activation status by

gelatin zymography. MT1-MMP silencing was confirmed as both ConA-mediated proMMP-2 activation and MT1-MMP proteolytic hinge domain formation were abrogated (Figure.2.3A). SNAIL silencing efficacy was also confirmed as neither TGF- β nor ConA were able to upregulate its expression (Figure.2.3A). Total RNA was extracted from the respective conditions and RT-qPCR was performed to monitor MT1-MMP and SNAIL gene expression levels. We observed that, in cells where MT1-MMP was silenced, neither TGF- β nor ConA were able to induce SNAIL (Figure.2.3B, right panel). Whereas in cells that were silenced for SNAIL, MT1-MMP transcript levels remained unaltered upon TGF- β or ConA treatments (Figure.2.3B, left panel).

2.5.4 Concanavalin A and TGF- β trigger common signaling pathways

As both TGF- β and ConA appear to upregulate SNAIL expression, we next investigated whether TGF- β mediated signaling pathways were also involved in ConA induction of SNAIL. U87 glioblastoma cells were therefore treated with TGF- β or ConA for various time-courses and cell protein lysates were harvested. Long time-course (0-120 min) was performed to monitor Smad2, Smad3, and STAT3 protein phosphorylation status (Figure.2.4A), whereas a shorter time-course (0-10 min) was performed in order to monitor Src phosphorylation status (Figure.2.4B). Scanning densitometric analysis of representative Western blots revealed transient increases in Smad2/3 and STAT3 phosphorylation upon TGF- β treatment peaking between 15-30 min, whereas no increases in Src phosphorylation was found (Figure.2.4C). On the other hand, in ConA-treated cells, no evidence of Smad2 phosphorylation was found and only slight increases in Smad3 phosphorylation observed, whereas significant sustained phosphorylation of STAT3 as well as transient Src phosphorylation were found (Figure.2.4D).

2.5.5 Evidence for MT1-MMP and SNAIL involvement in the chemotactic response to TGF- β in U87 glioblastoma cells

We next wished to elucidate the potential crosstalk between TGF- β receptor-mediated signaling and that of ConA-induced MT1-MMP. Gene silencing was thus performed

in U87 glioblastoma cells transiently transfected with siScrambled, siSNAIL, and siMT1-MMP siRNAs, and cell chemotaxis assessed in unstimulated (vehicle) or in response to TGF- β as described in the Methods section. Chemotaxis was significantly induced in response to TGF- β in siScrambled-transfected cells (Figure.2.5A, left panel). In contrast, silencing of either MT1-MMP or SNAIL abrogated the chemotactic response to TGF- β (Figure.2.5A, middle and right panels). Whether MT1-MMP silencing abrogated the phosphorylation status of those TGF- β -signaling intermediates examined above was next explored. The global phosphorylation status of Smad2/3 and of STAT3 were significantly reduced in cells where MT1-MMP was silenced (Figure.2.5B). This suggests that an MT1-MMP-mediated signaling crosstalk exists with TGF- β -receptor-mediated signaling.

2.5.6 Pharmacological inhibition of the STAT3 signaling pathway abrogates the chemotactic response to TGF- β

Given the above evidence that STAT3 may link MT1-MMP signaling to that of TGF- β and that SNAIL appeared to be a common intermediate in ConA and TGF- β responses, we next assessed the impact of AG490 and of Tofacitinib, two JAK/STAT3 inhibitors [44, 45], as well as of EGCG [32, 46] on the TGF- β induced chemotactic response. U87 glioblastoma cells migration was found induced with TGF- β (Figure.2.6A; Vehicle condition), whereas pharmacological inhibitors of STAT3, including AG490, Tofacitinib, and EGCG, collectively prevented that increase. Such reduced chemotactic response is in part explained through the reduced phosphorylation status of STAT3 in both TGF- β - and ConA-stimulated cells, as well as of Src in ConA-stimulated cells (Figure.2.6B).

2.6 Discussion

Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) is a mechanism associated with tumor progression, invasion, and metastasis, in which polar epithelial cells eventually transfer to mesenchymal phenotype cells [47]. Accordingly, sustained elevation of SNAIL was found to promote glial-mesenchymal transition after irradiation in malignant glioma [48]. However, although EMT may be a common pattern in glioma progression, the therapeutic interventions affecting the occurrence and magnitude of EMT during the clinical course of GBM still remains a constant challenge [49, 50], as the microenvironment that induces EMT in gliomas is characterized by hypoxia and the enrichment of myeloid cells following stimulation by TGF- β [51]. Meanwhile, there is a transformation process similar to EMT during the progress of GBM, which is called EMT-like process [6, 7]. EMT-like process mainly represents the decrease of epithelial markers such as E-cadherin and the increase of interstitial markers such as N-cadherin and Vimentin. Studies thus far demonstrate that the overexpression of a ‘mesenchymal’ gene expression signature related with the poor prognosis of glioma patients, indicating that the EMT-like process is closely related to the invasive phenotype of GBM [6].

It has been previously reported that TGF- β levels are high in the blood serum and tumor tissue of patients with malignant glioma, and this level was correlated with the type of malignancy, the tumor developmental stage and the patient prognosis [10]. Here, we show that a crosstalk between MT1-MMP and TGF- β -receptor signaling regulates TGF- β -mediated EMT-like induction of SNAIL expression and chemotactic response in a model of GBM through, in part, STAT3. Moreover, the oncogenic contribution of MT1-MMP in GBM invasion is not strictly controlled through the extent of its expression levels, but also through its signal transducing capacity [52-54]. In addition to initiating carcinoma cell invasion, TGF- β -induced EMT-like process can also guide cancer cells to then de-differentiate and gain cancer stem-cell-like properties. EMT also allows the generation of stromal cells that support and instruct cancer progression. As such, it is inferred that EMT, cancer stem cells (CSCs) and drug resistance form the lethal "three combinations" and become the main barrier for glioma to be cured. The

inhibition of EMT may thus prevent invasion and metastasis of tumor cell, reduce CSCs and overcome drug resistance. Accordingly, acquisition of EMT has been documented in CSC, and phytochemicals, in particular curcumin, EGCG, sulforaphane, resveratrol and genistein shown to interfere with intrinsic CSC pathways *in vitro* and in human xenograft mice, leading to elimination of CSC [55].

During the EMT process, malignant cells start to intravasate into the surrounding blood vessels in order to migrate to other parts of the body. To accomplish this process, the ECM and basement membrane of blood vessels have to be degraded by MMPs [56]. Whereas the most relevant MMPs in this invasive process are MMP-2 and MMP-9 [57], SNAIL was found to induce MMP-9 expression, and EMT found necessary for intravasation of lymph vessels in GBM and other cancers [58]. EMT has been shown to cooperate with MMP activity in GBM, allowing cells to gain access to lymph vessels. Preliminary data suggest this new EMT-associated drug target, in combination with stereotactic radiosurgery, may provide potential rationale for future treatments [59]. Moreover, recent evidence supports such crosstalk as TGF- β facilitated MT1-MMP-mediated proMMP-9 activation and invasion in an oral squamous cell carcinoma cell model [60]. Moreover, MT1-MMP-mediated proprotein maturation of TGF- β 1, accelerating the release of free TGF- β 1 in type II airway epithelial cells A549, was found to induce EMT [61].

TGF- β activates the JAK/STAT pathway via the induction of leukemia inhibitory factor (LIF) secretion acting through an autocrine/paracrine loop [62]. After binding of LIF to its cell surface receptor LIFR, heterodimerization with another transmembrane protein, glycoprotein-130 (gp130) occurs, followed by recruitment of JAK and STAT3 via Src-homology-2 (SH2) domains in the LIFR-gp130 heterodimer. STAT3 can induce the expression of Sox2 stimulating self-renewal capacity and stemness in glioma-derived CSCs [4]. JAK/STAT3 signaling was also found to be required for TGF- β -induced EMT in lung cancer cells [63]. Intriguingly and although TGF- β -mediated signaling was found active in our U87 glioblastoma cell model, no significant

phosphorylation of Src was observed in our hand which contrasts with other reports and suggests for cell type specific signaling [64].

2.7 Conclusion

In summary, a cooperative signal transducing role for MT1-MMP has been previously documented to take part in the transcriptional control of inflammasome-related genes [25], autophagy [24], and COX-2 induction [41]. Here, we now provide the first evidence for a cooperative crosstalk linking TGF- β receptor-mediated signaling to that of MT1-MMP, both of which activities have also been occurring in CSC [65-67]. It becomes tempting to suggest that TGF- β signaling may connect with some CSC phenotype in GBM, as CSC represent a subset of GBM cells thought to be responsible for tumor initiation, progression, and relapse of disease [68]. Following the current crosstalk of TGF- β signaling and the underlying mechanisms identified here linking MT1-MMP, the promise of TGF- β targeted therapy or chemopreventive approaches, such as through diet-derived EGCG in malignant gliomas, is appealing (Figure.2.7). Several drugs targeting TGF- β signaling have been developed that showed potent antitumor activity in preclinical models. Several agents are currently evaluated in early clinical studies in glioma patients with the perspective on the promise of TGF- β -targeted therapy. Here, we further provide evidence for such chemopreventive diet-derived intervention that could be achieved through EGCG.

Acknowledgements

This work was funded by the Institutional Research Chair in Cancer Prevention and Treatment held by Dr Borhane Annabi at UQAM, and by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to BA.

Data accessibility

All data generated or analyzed during this study are included in this published article.

Declaration of conflicting interest

The authors declare no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Figure and legends

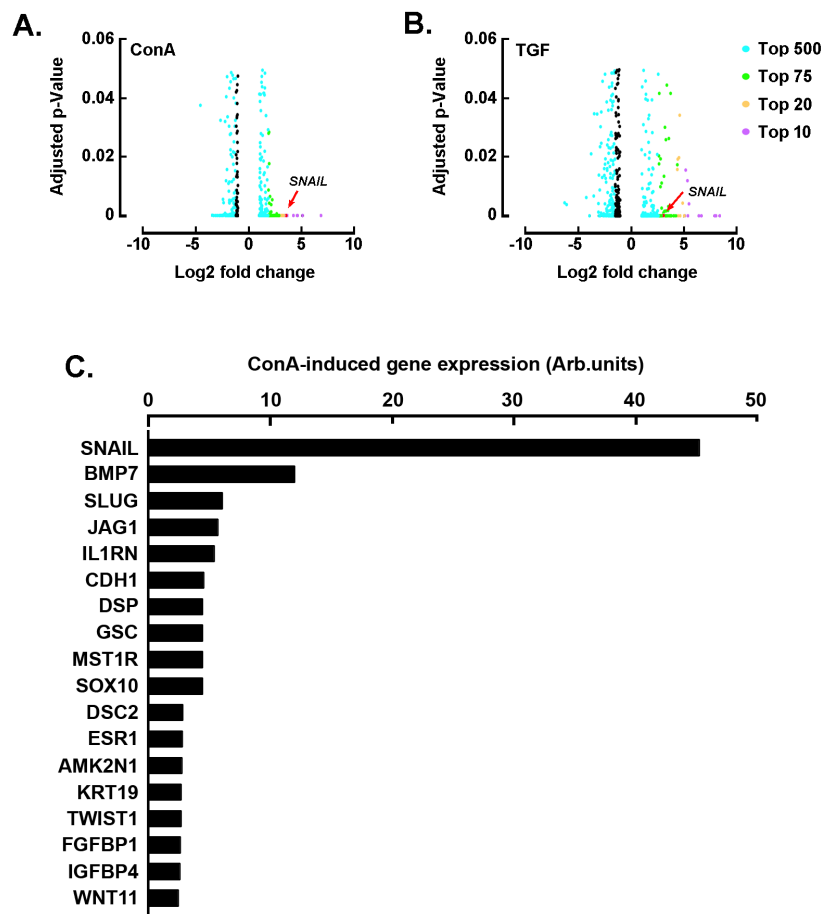


Figure.2.1: **Concanavalin A- and TGF- β -mediated transcriptional control of *SNAIL*.** Volcano plots of differentially expressed genes (DEG) between U87 glioblastoma cells treated or not with A) 30 μ g/ml of Concanavalin A (ConA) for 24 hours, and B) U87 glioblastoma cells treated or not with 10 nM TGF- β . The adjusted p-value is shown on the y-axis and log2 fold change is plotted in the x-axis. Colored points indicate genes called as DEG at adjusted p value ≤ 0.05 and the different colors indicate the top upregulated or downregulated genes, according to the legend. Three replicates for untreated cells, two replicates for ConA- and two replicates for TGF- β -

treated cells. C) Total RNA was extracted from U87 glioblastoma cells treated or not with ConA and RT-qPCR was performed using a RT2-Profiler gene array to assess EMT gene expression levels. Ratios of ConA-induced gene expression on vehicle treated cells gene expression are expressed from one representative experiment out of two.

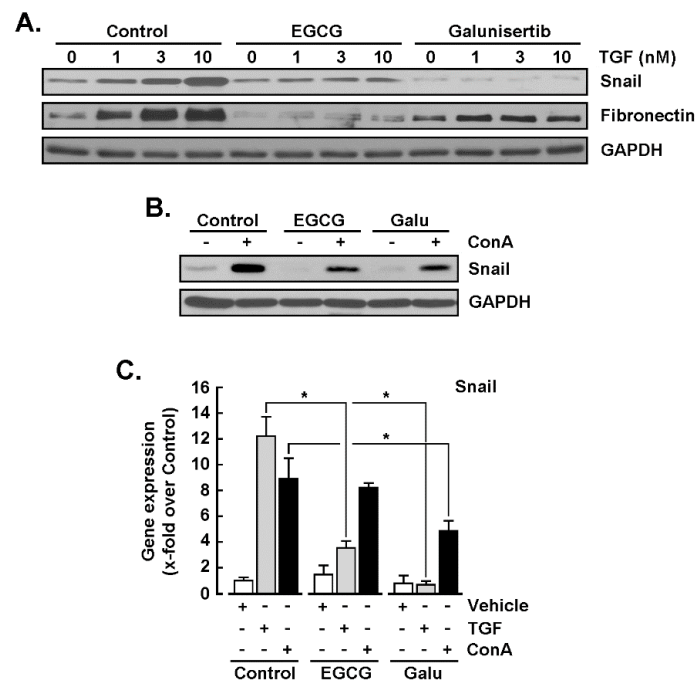


Figure.2.2: SNAIL induction by Concanavalin A involves a TGF- β receptor-mediated signaling axis component. A) Serum starved U87 glioblastoma cells were treated with increasing concentrations of TGF- β in the presence or not of 30 μ M EGCG, or 10 μ M Galunisertib for 24 hours. SNAIL, Fibronectin and GAPDH protein expression were then assessed by immunoblotting using the respective cell lysates. B) Serum starved U87 glioblastoma cells were treated with 30 μ g/ml of Concanavalin A (ConA) for 24 hours in the presence or not of 30 μ M EGCG, or 10 μ M Galunisertib (Galu) for 24 hours. SNAIL and GAPDH protein expression were then assessed by

immunoblotting using the respective cell lysates. C) Total RNA was extracted from treated cells and RT-qPCR performed to assess SNAIL gene expression as described in the Methods section. Data are means $\pm$ SD from three independent experiments.

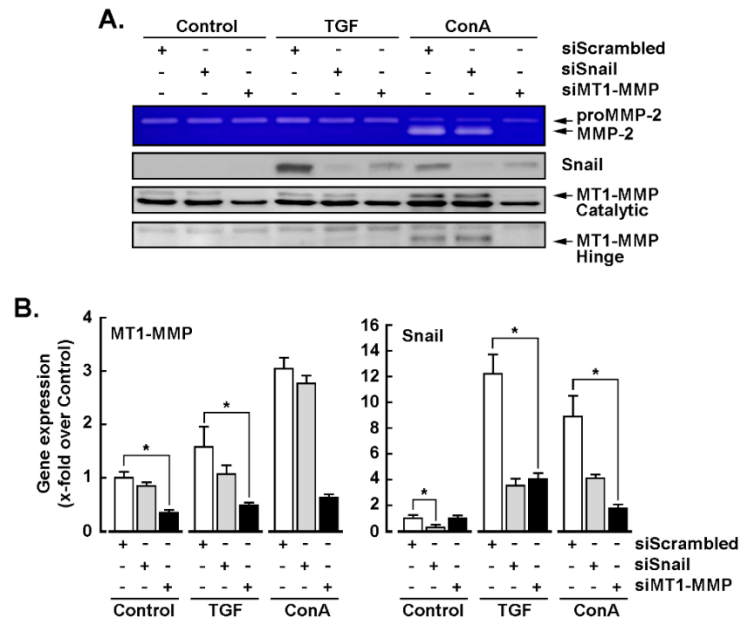


Figure.2.3: MT1-MMP silencing represses TGF- β - and Concanavalin A-mediated induction of SNAIL. Transient siRNA-mediated gene silencing was performed in U87 glioblastoma cells transfected with siScrambled, siSNAIL, and siMT1-MMP. Serum-starved cells were next treated with 10 nM TGF- β or 30 μ M ConA for 24 hours. A) The conditioned media were harvested and subjected to gelatin zymography to assess proMMP-2 activation into MMP-2, whereas cell lysates were subjected to immunoblotting of SNAIL and MT1-MMP catalytic and hinge forms for protein expression. B) Total RNA was also extracted from the respective above conditions and RT-qPCR performed to monitor MT1-MMP and SNAIL gene expression. Data are means $\pm$ SD from three independent experiments.

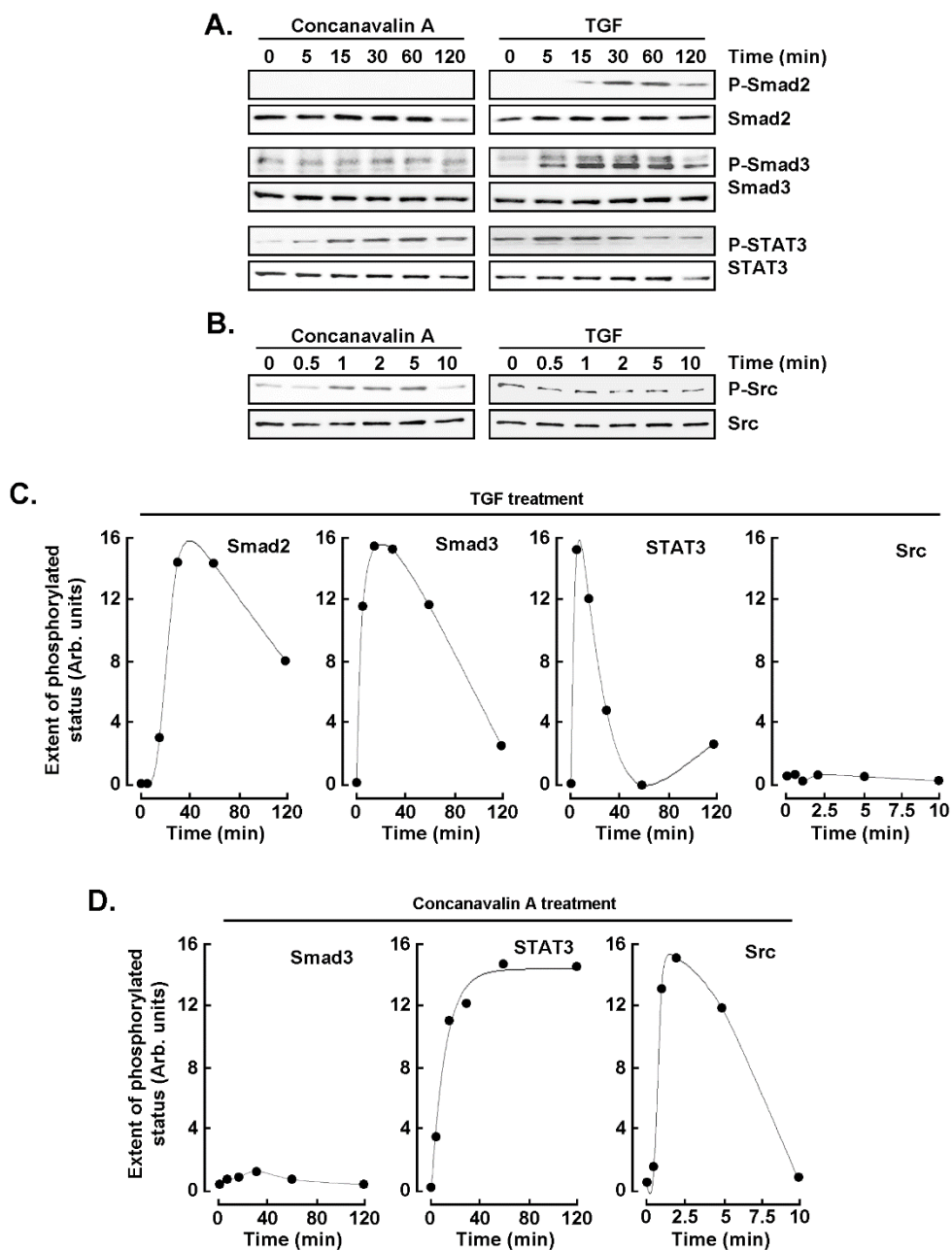


Figure.2.4: **Concanavalin A and TGF- β share common signaling axis.** U87 glioblastoma cells were treated with 10 nM TGF- β or 30 μ M ConA for the indicated times and cell protein lysates harvested. Long time-course was performed from 0 to

120 minutes in A) to monitor Smad2, Smad3, and STAT3 protein status, whereas a short time-course was performed from 0-10 minutes in B) to monitor Src phosphorylation status. Scanning densitometric analysis was performed of a representative experiment for C) TGF- β treatment, and D) Concanavalin A treatment.

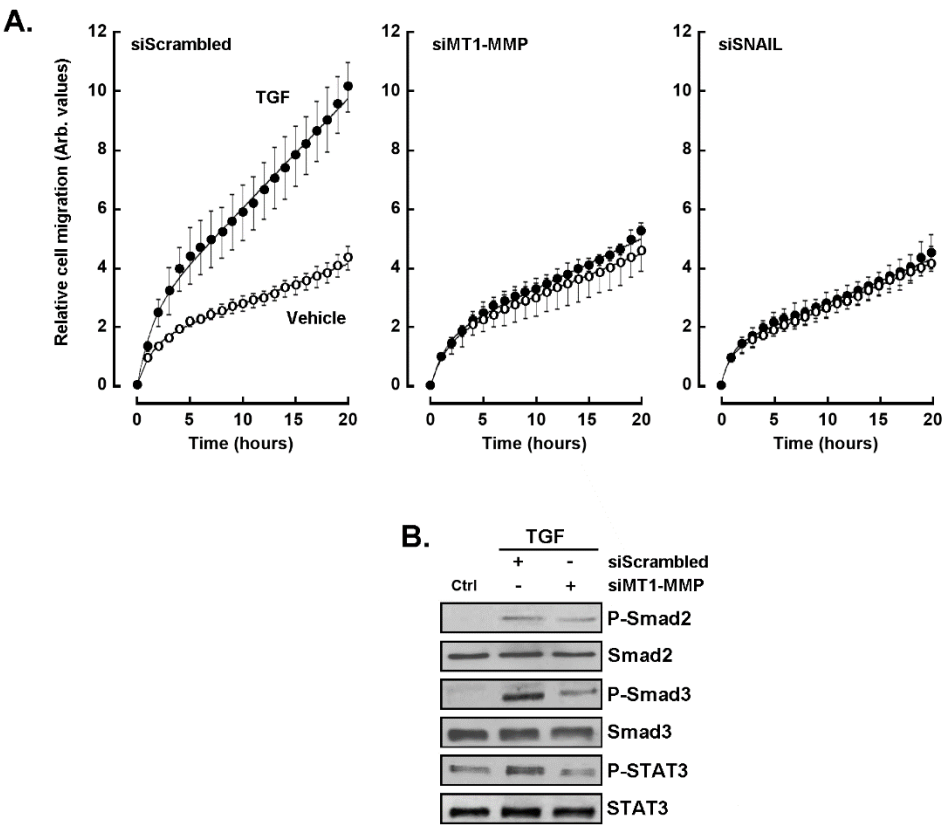


Figure.2.5: Evidence for MT1-MMP and SNAIL involvement in the chemotactic response of U87 glioblastoma cells to TGF- β . siRNA-mediated gene silencing was performed in U87 glioblastoma cells transiently-transfected with siScrambled, siSNAIL, and siMT1-MMP. A) Cell chemotaxis was next assessed in unstimulated (vehicle, open circles) or in response to TGF- β (closed circles) as described in the Methods section. B) Cells where MT1-MMP was silenced (siMT1-

MMP) were treated with 10 nM TGF- β for 30 minutes and cell protein lysates harvested to monitor Smad2, Smad3, and STAT3 phosphorylation status.

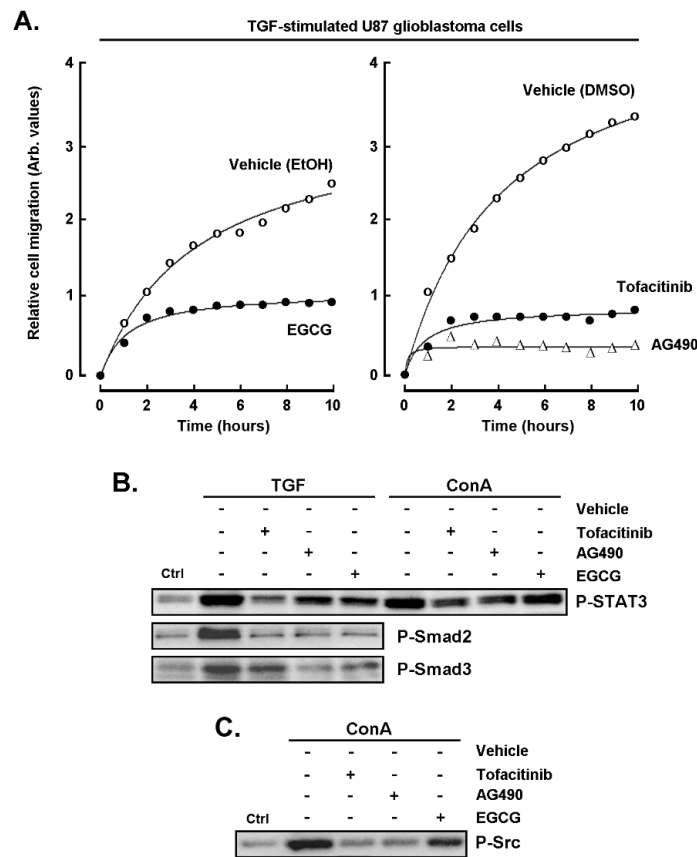


Figure.2.6: **Pharmacological inhibition of the STAT3 signaling pathway abrogates the chemotactic response to TGF- β .** A) U87 glioblastoma cell chemotaxis was assessed in the presence of 10 nM TGF- β in the presence or not of 30 μ M EGCG (left panel, vehicle Ethanol), or Tofacitinib, AG490 (right panel, vehicle DMSO). B) Cells were treated with 10 nM TGF- β or 30 μ M ConA and cell protein lysates harvested to monitor Src, Smad2, Smad3, and STAT3 phosphorylated status.

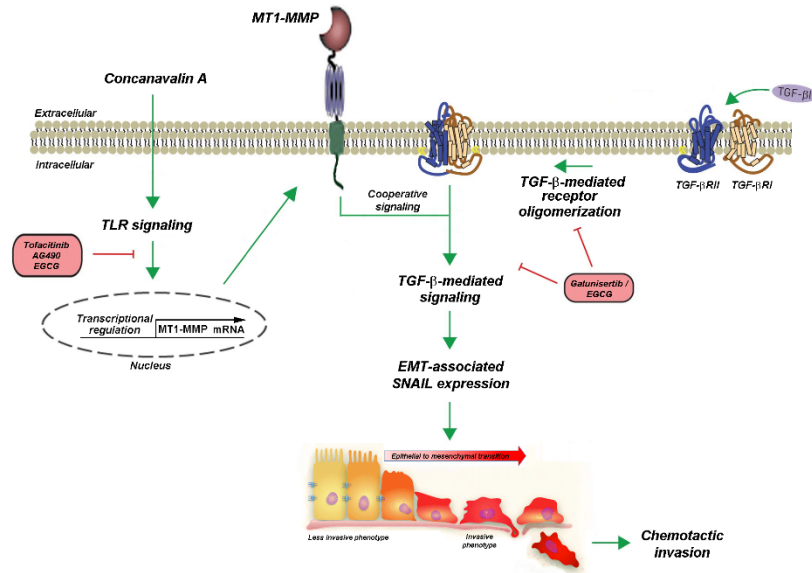


Figure.2.7: Scheme summarizing the cooperative signaling and pharmacological targeting between MT1-MMP and TGF- β receptor in U87 glioblastoma cells. We postulate that the MT1-MMP signal transducing activity cooperates with that of the TGF- β receptor in U87 glioblastoma cells. Concanavalin-A triggers MT1-MMP transcription and protein expression, possibly involving Toll-like receptors (TLR) signaling [32, 46]. EGCG efficiently inhibits TGF- β -mediated EMT (SNAIL expression) by either competing with the TGF- β receptor binding site or by inhibiting TGF- β receptor oligomerization. Evidence for the common involvement of JAK/STAT signaling is provided through the pharmacological actions of Tofacitinib and AG490. The acquisition of a less invasive to a more invasive phenotype leads to increased cell chemotactic invasive phenotype. These EMT-like events reflect the metastatic and chemoresistant phenotype that can ultimately be prevented by the diet-derived EGCG.

Supplemental material

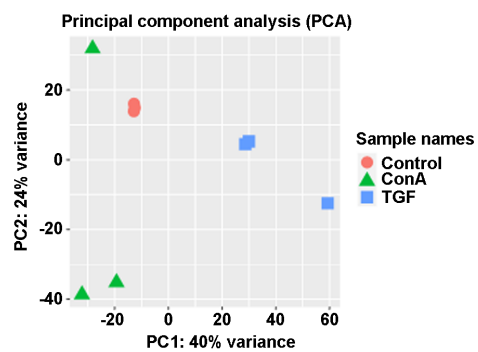
Fig.S1

Figure.S1 : Principal component analysis (PCA) showing the variance for the two first principal components for three replicates for TGF-treated cells (TGF), ConA-treated cells (ConA) and untreated cells (Control).

2.8 References

1. Oliver L, Lalier L, Salaud C, Heymann D, Cartron PF &Vallette FM (2020) Drug resistance in glioblastoma: are persisters the key to therapy? *Cancer Drug Resist* **3**, 287-301.
2. Osuka S & Van Meir EG (2017) Overcoming therapeutic resistance in glioblastoma: the way forward. *J Clin Invest* **127**, 415-426.
3. Roche J (2018) The epithelial-to-mesenchymal transition in cancer (2018) *Cancers (Basel)* **10**, 52. Erratum in: *Cancers (Basel)*. 2018; **10**(3).
4. Joseph JV, Balasubramaniyan V, Walenkamp A & Kruyt FA (2013) TGF- β as a therapeutic target in high grade gliomas - promises and challenges. *Biochem Pharmacol* **85**, 478-485.
5. Towner RA, Zalles M, Saunders D & Smith N (2020) Novel approaches to combat chemoresistance against glioblastomas. *Cancer Drug Resist* **3**, 686-698.
6. Iser IC, Pereira MB, Lenz G & Wink MR (2017) The epithelial-to-mesenchymal transition-like process in glioblastoma: An updated systematic review and in silico investigation. *Med Res Rev* **37**, 271-313.
7. Iser IC, Lenz G & Wink MR (2019) EMT-like process in glioblastomas and reactive astrocytes. *Neurochem Int* **122**, 139-143.
8. Platten M, Wick W & Weller M (2001) Malignant glioma biology: Role for TGF-beta in growth, motility, angiogenesis, and immune escape. *Microsc Res Tech* **52**, 401-410.
9. Rich JN (2003) The role of transforming growth factor-beta in primary brain tumors. *Front Biosci* **8**, e245-e260.

10. Bryukhovetskiy I & Shevchenko V (2016) Molecular mechanisms of the effect of TGF- β 1 on U87 human glioblastoma cells. *Oncol Lett* **12**, 1581-1590.
11. Gregory PA, Bracken CP, Smith E, Bert AG, Wright JA, Roslan S, Morris M, Wyatt L, Farshid G, Lim YY, et al. (2011) An autocrine TGF-beta/ZEB/miR-200 signaling network regulates establishment and maintenance of epithelial-mesenchymal transition. *Mol Biol Cell* **22**, 1686-1698.
12. Ikushima H, Todo T, Ino Y, Takahashi M, Miyazawa K & Miyazono K (2009) Autocrine TGF-beta signaling maintains tumorigenicity of glioma-initiating cells through Sry-related HMG-box factors. *Cell Stem Cell* **5**, 504-514.
13. Kim BG, Malek E, Choi SH, Ignatz-Hoover JJ & Driscoll JJ (2021) Novel therapies emerging in oncology to target the TGF- β pathway. *J Hematol Oncol* **14**, 55.
14. Zhang YE (2009) Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res* **19**, 128-139.
15. Zhang YE (2018) Mechanistic insight into contextual TGF- β signaling. *Curr Opin Cell Biol* **51**, 1-7.
16. Ouanouki A, Lamy S & Annabi B (2017) Anthocyanidins inhibit epithelial-mesenchymal transition through a TGF β /Smad2 signaling pathway in glioblastoma cells. *Mol Carcinog* **56**, 1088-1099.
17. Panji M, Behmard V, Zare Z, Malekpour M, Nejadbiglari H, Yavari S, Nayerpour Dizaj T, Safaeian A, Maleki N, Abbasi M, Abazari O, Shabanzadeh M & Khanicheragh P (2021) Suppressing effects of green tea extract and epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on TGF- β - induced epithelial-to-mesenchymal transition via ROS/Smad signaling in human cervical cancer cells. *Gene* **20**, 794:145774.
18. Wendt MK, Balanis N, Carlin CR & Schiemann WP (2014) STAT3 and epithelial-mesenchymal transitions in carcinomas. *JAKSTAT* **3**, e28975.

19. Deryugina EI, Ratnikov B, Monosov E, Postnova TI, DiScipio R, Smith JW & Strongin AY (2001) MT1-MMP initiates activation of pro-MMP-2 and integrin α v β 3 promotes maturation of MMP-2 in breast carcinoma cells. *Exp Cell Res* **263**, 209-223.
20. Foda HD & Zucker S (2001) Matrix metalloproteinases in cancer invasion, metastasis and angiogenesis. *Drug Discov Today* **6**, 478-482.
21. Itoh Y (2015) Membrane-type matrix metalloproteinases: Their functions and regulations. *Matrix Biol* **44-46**, 207-223.
22. Chang JH, Huang YH, Cunningham CM, Han KY, Chang M, Seiki M, Zhou Z & Azar DT (2016) Matrix metalloproteinase 14 modulates signal transduction and angiogenesis in the cornea. *Surv Ophthalmol* **61**, 478-497.
23. Mori H, Bhat R, Bruni-Cardoso A, Chen EI, Jorgens DM, Coutinho K, Louie K, Bowen BB, Inman JL, Tecca V, Lee SJ, Becker-Weimann S, Northen T, Seiki M, Borowsky AD, Auer M & Bissell MJ (2016) New insight into the role of MMP14 in metabolic balance. *PeerJ* **4**, e2142.
24. Pratt J, Roy R & Annabi B (2012) Concanavalin-A-induced autophagy biomarkers requires membrane type-1 matrix metalloproteinase intracellular signaling in glioblastoma cells. *Glycobiology* **22**, 1245-1255.
25. Sheehy S & Annabi B (2017) A transcriptional regulatory role for the membrane type-1 matrix metalloproteinase in carcinogen-induced inflammasome gene expression. *Gene Regul Syst Bio* **11**, 1177625017713996.
26. Turunen SP, Tatti-Bugaeva O & Lehti K (2017) Membrane-type matrix metalloproteases as diverse effectors of cancer progression. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* **1864**, 1974-1988.

27. Shimizu-Hirota R, Xiong W, Baxter BT, Kunkel SL, Maillard I, Chen XW, Sabeh F, Liu R, Li XY & Weiss SJ (2012) MT1-MMP regulates the PI3K δ -Mi-2/NuRD-dependent control of macrophage immune function. *Genes Dev* **26**, 395-413. Erratum in: *Genes Dev* (2012) **26**, 1122.
28. Belkaid A, Fortier S, Cao J & Annabi B (2007) Necrosis induction in glioblastoma cells reveals a new "bioswitch" function for the MT1-MMP/G6PT signaling axis in proMMP-2 activation versus cell death decision. *Neoplasia* **9**, 332-340.
29. Proulx-Bonneau S, Pratt J & Annabi B (2011) A role for MT1-MMP as a cell death sensor/effector through the regulation of endoplasmic reticulum stress in U87 glioblastoma cells. *J Neurooncol* **104**, 33-43.
30. Sakai K, Nakamura T, Suzuki Y, Imizu T & Matsumoto K (2011) 3-D collagen-dependent cell surface expression of MT1-MMP and MMP-2 activation regardless of integrin β 1 function and matrix stiffness. *Biochem Biophys Res Commun* **412**, 98-103.
31. Shields MA, Krantz SB, Bentrem DJ, Dangi-Garimella S & Munshi HG (2012) Interplay between β 1-integrin and Rho signaling regulates differential scattering and motility of pancreatic cancer cells by snail and slug proteins. *J Biol Chem* **287**, 6218-6229.
32. Zgheib A, Lamy S & Annabi B (2013) Epigallocatechin gallate targeting of membrane type 1 matrix metalloproteinase-mediated Src and Janus kinase/signal transducers and activators of transcription 3 signaling inhibits transcription of colony-stimulating factors 2 and 3 in mesenchymal stromal cells. *J Biol Chem* **288**, 13378-13386.
33. Desjarlais M, Pratt J, Lounis A, Mounier C, Haidara K & Annabi B (2014) Tetracycline derivative minocycline inhibits autophagy and inflammation in concanavalin-a-activated human hepatoma cells. *Gene Regul Syst Bio* **8**, 63-73.

34. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M & Gingeras TR (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **29**, 15-21.
35. Li B & Dewey CN (2011) RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* **12**, 323.
36. Love MI, Huber W & Anders S (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* **15**, 550.
37. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W & Smyth GK (2015) limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res* **43**, e47.
38. The R core Team. R: A Language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. 2017; Version 3.4.1.
39. Ge SX, Son EW & Yao R (2018) iDEP: an integrated web application for differential expression and pathway analysis of RNA-Seq data. *BMC Bioinformatics* **19**, 534.
40. Djerir D, Iddir M, Bourgault S, Lamy S & Annabi B (2018) Biophysical evidence for differential gallated green tea catechins binding to membrane type-1 matrix metalloproteinase and its interactors. *Biophys Chem* **234**, 34-41.
41. Sina A, Proulx-Bonneau S, Roy A, Poliquin L, Cao J & Annabi B (2010) The lectin concanavalin-A signals MT1-MMP catalytic independent induction of COX-2 through an IKKgamma/NF-kappaB-dependent pathway. *J Cell Commun Signal* **4**, 31-38.
42. Nieszporek A, Skrzypek K, Adamek G & Majka M (2019) Molecular mechanisms of epithelial to mesenchymal transition in tumor metastasis. *Acta Biochim Pol* **66**, 509-520.

43. Sicard AA, Suarez NG, Cappadocia L & Annabi B (2021) Functional targeting of the TGF- β R1 kinase domain and downstream signaling: A role for the galloyl moiety of green tea-derived catechins in ES-2 ovarian clear cell carcinoma. *J Nutr Biochem* **87**, 108518.
44. Jing N & Tweardy DJ (2005) Targeting Stat3 in cancer therapy. *Anticancer Drugs* **16**, 601-607.
45. Hosseini A, Gharibi T, Marofi F, Javadian M, Babaloo Z, Baradaran B (2020) Janus kinase inhibitors: A therapeutic strategy for cancer and autoimmune diseases. *J Cell Physiol* **235**, 5903-5924.
46. Zgheib A, Pelletier-Bonnier É, Levros LC Jr & Annabi B (2013) Selective JAK/STAT3 signalling regulates transcription of colony stimulating factor-2 and -3 in Concanavalin-A-activated mesenchymal stromal cells. *Cytokine* **63**, 187-193.
47. Yang J, Antin P, Berx G, Blanpain C, Brabletz T, Bronner M, Campbell K, Cano A, Casanova J, Christofori G, Dedhar S, Derynck R, Ford HL, Fuxe J, García de Herreros A, Goodall GJ, Hadjantonakis AK, Huang RJY, Kalcheim C, Kalluri R, Kang Y, Khew-Goodall Y, Levine H, Liu J, Longmore GD, Mani SA, Massagué J, Mayor R, McClay D, Mostov KE, Newgreen DF, Nieto MA, Puisieux A, Runyan R, Savagner P, Stanger B, Stemmler MP, Takahashi Y, Takeichi M, Theveneau E, Thiery JP, Thompson EW, Weinberg RA, Williams ED, Xing J, Zhou BP & Sheng G (2020) EMT International Association (TEMTIA). Guidelines and definitions for research on epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* **21**, 341-352.
48. Mahabir R, Tanino M, Elmansuri A, Wang L, Kimura T, Itoh T, Ohba Y, Nishihara H, Shirato H, Tsuda M & Tanaka S (2014) Sustained elevation of Snail promotes glial-mesenchymal transition after irradiation in malignant glioma. *Neuro Oncol* **16**, 671-685.

49. Kim YH, Yoo KC, Cui YH, Uddin N, Lim EJ, Kim MJ, Nam SY, Kim IG, Suh Y & Lee SJ (2014) Radiation promotes malignant progression of glioma cells through HIF-1 α stabilization. *Cancer Lett* **354**, 132-141.
50. Piao Y, Liang J, Holmes L, Zurita AJ, Henry V, Heymach JV, de Groot JF (2012) Glioblastoma resistance to anti-VEGF therapy is associated with myeloid cell infiltration, stem cell accumulation, and a mesenchymal phenotype. *Neuro Oncol* **14**, 1379-1392.
51. Iwadata Y (2016) Epithelial-mesenchymal transition in glioblastoma progression. *Oncol Lett* **11**, 1615-1620.
52. Ohkawara H, Ikeda K, Ogawa K & Takeishi Y (2015) Membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) identified as a multifunctional regulator of vascular responses. *Fukushima J Med Sci* **61**, 91-100.
53. Attur M, Lu C, Zhang X, Han T, Alexandre C, Valacca C, Zheng S, Meikle S, Dabovic BB, Tassone E, Yang Q, Kolupaeva V, Yakar S, Abramson S & Mignatti P (2020) Membrane-type 1 matrix metalloproteinase modulates tissue homeostasis by a non-proteolytic mechanism. *iScience* **23**, 101789.
54. Sakamoto T & Seiki M (2017) Integrated functions of membrane-type 1 matrix metalloproteinase in regulating cancer malignancy: Beyond a proteinase. *Cancer Sci* **108**, 1095-1100.
55. Naujokat C & McKee DL (2021) The "big five" phytochemicals targeting cancer stem cells: Curcumin, EGCG, sulforaphane, resveratrol and genistein. *Curr Med Chem* **28**, 4321-4342.
56. Liu CA, Chang CY, Hsueh KW, Su HL, Chiou TW, Lin SZ & Harn HJ (2018) Migration/invasion of malignant gliomas and implications for therapeutic treatment. *Int J Mol Sci* **19**, 1115.

57. Vu TH & Werb Z (2000) Matrix metalloproteinases: Effectors of development and normal physiology. *Genes Dev* **14**, 2123-2133.
58. Kim S, Takahashi H, Lin WW, Descargues P, Grivennikov S, Kim Y, Luo JL & Karin M (2009) Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. *Nature* **457**, 102-106.
59. Greenspoon JN, Sharieff W, Hirte H, Overholt A, Devillers R, Gunnarsson T, Whitton A (2014) Fractionated stereotactic radiosurgery with concurrent temozolomide chemotherapy for locally recurrent glioblastoma multiforme: A prospective cohort study. *Onco Targets Ther* **7**, 485-490.
60. Yamahana H, Terashima M, Takatsuka R, Asada C, Suzuki T, Uto Y & Takino T (2021) TGF- β 1 facilitates MT1-MMP-mediated proMMP-9 activation and invasion in oral squamous cell carcinoma cells. *Biochem Biophys Rep* **27**, 101072.
61. Xiong Y, Zhang J, Shi L, Ning Y, Zhu Y, Chen S, Yang M, Chen J, Zhou GW & Li Q (2017) NOGO-B promotes EMT in lung fibrosis via MMP14 mediates free TGF-beta1 formation. *Oncotarget* **8**, 71024-71037.
62. Peñuelas S, Anido J, Prieto-Sánchez RM, Folch G, Barba I, Cuartas I, García-Dorado D, Poca MA, Sahuquillo J, Baselga J & Seoane J (2009) TGF-beta increases glioma-initiating cell self-renewal through the induction of LIF in human glioblastoma. *Cancer Cell* **15**, 315-27.
63. Liu RY, Zeng Y, Lei Z, Wang L, Yang H, Liu Z, Zhao J & Zhang HT (2014) JAK/STAT3 signaling is required for TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cells. *Int J Oncol* **44**, 1643-1651.
64. Galliher AJ & Schiemann WP (2007) Src phosphorylates Tyr284 in TGF-beta type II receptor and regulates TGF-beta stimulation of p38 MAPK during breast cancer cell proliferation and invasion. *Cancer Res* **67**, 3752-3758.

65. Kahm YJ, Kim RK, Jung U & Kim IG (2021) Epithelial membrane protein 3 regulates lung cancer stem cells via the TGF- β signaling pathway. *Int J Oncol* **59**, 80.
66. Shaim H, Shanley M, Basar R, Daher M, Gumin J, Zamlar DB, Upreti N, Wang F, Huang Y, Gabrusiewicz K, Miao Q, Dou J, Alsuliman A, Kerbaui LN, Acharya S, Mohanty V, Mendt M, Li S, Lu J, Wei J, Fowlkes NW, Gokdemir E, Ensley EL, Kaplan M, Kassab C, Li L, Ozcan G, Banerjee PP, Shen Y, Gilbert AL, Jones CM, Bdiwi M, Nunez-Cortes AK, Liu E, Yu J, Imahashi N, Muniz-Feliciano L, Li Y, Hu J, Draetta G, Marin D, Yu D, Mielke S, Eylich M, Champlin RE, Chen K, Lang FF, Shpall EJ, Heimberger AB & Rezvani K (2021) Targeting the αv integrin/TGF- β axis improves natural killer cell function against glioblastoma stem cells. *J Clin Invest* **131**, e142116.
67. Ghazi N, Saghravanian N, Taghi Shakeri M & Jamali M (2021) Evaluation of CD44 and TGF-B Expression in Oral Carcinogenesis. *J Dent (Shiraz)* **22**, 33-40.
68. Annabi B, Lachambre MP, Plouffe K, Sartelet H & Béliveau R (2009) Modulation of invasive properties of CD133+ glioblastoma stem cells: a role for MT1-MMP in bioactive lysophospholipid signaling. *Mol Carcinog* **48**, 910-919.

CHAPITRE III

DISCUSSION

Le présent travail de recherche vise, dans un premier temps, à évaluer l'effet de l'EGCG, un flavonoïde de la classe des catéchines dérivé du thé vert (Botten *et al.*, 2015), sur le processus de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT). Ce processus englobe toutes les modifications cellulaires et moléculaires qui permettent à la cellule d'être mobile, apte à la migration cellulaire et d'acquérir un phénotype invasif orienté vers la métastase (Datta *et al.*, 2021). Les voies de signalisation régulant l'EMT, font intervenir de nombreux facteurs de transcription dont SNAI1 (Zeisberg et Neilson, 2009). L'activation de Snail entraîne la transcription de gènes codant pour des protéines qui participent activement à l'EMT notamment la vimentine, la fibronectine et les MMP2/9 (Kaufhold et Bonavida, 2014). C'est pour cela qu'il nous a semblé pertinent d'en faire l'une des cibles moléculaires quant à l'évaluation de l'effet de l'EGCG sur l'EMT.

MT1-MMP, une métalloprotéinase matricielle, est également un acteur incontournable du processus de l'EMT et notre seconde cible moléculaire. MT1-MMP a été identifié comme étant le principal exécutant de la migration cellulaire à travers son activité de dégradation de la membrane basale (Castro-Castro *et al.*, 2016). Aujourd'hui, il est bien établi que MT1-MMP active la proMMP-2 en MMP-2 pour dégrader le collagène de type IV (Laronha et Caldeira, 2020). Dans les conditions *in vitro*, cette activation se fait par l'intermédiaire d'une lectine végétale, la concanavaline A (ConA) (Yu *et al.*, 1995). MT1-MMP est donc considéré comme un pivot de la migration cellulaire, l'invasion et de ce fait de la métastase. Pour atteindre notre premier objectif, nous avons utilisé une lignée cellulaire de glioblastome les U87 et deux inducteurs de l'EMT : le

facteur de croissance des tumeurs le TGF β et la concanavaline A (ConA) et ceux en présence et en absence de l'EGCG.

Le TGF β induit l'expression de plusieurs biomarqueurs de l'EMT qui englobe les facteurs de transcription : Snail, ZEB1/2 et TWIST1 mais induit également le remodelage de la matrice extracellulaire par l'induction de la fibronectine et les MMPs (Tsubakihara et Moustakas, 2018). L'expression de MT1-MMP, Snail et la fibronectine sont induites par la ConA et le TGF β de manière dose dépendante. Cette induction, est annulée lorsque les U87 sont traitées avec l'EGCG. Ling *et al.*, (2011) rapportent que l'expression de MT1-MMP fut induite par des concentrations croissantes de TGF β dans les cellules de glioblastomes. D'autres modèles cellulaires l'ont également démontré, comme celui des lentilles humaines fœtales, de l'adénocarcinome pancréatique et du foie (Eldred *et al.*, 2012; Gingras *et al.*, 2000; Ling *et al.*, 2011; Ottaviano *et al.*, 2006). Il semblerait que l'EGCG agisse sur la transduction du signal puisqu'il inhibe l'induction mais ne réduit pas significativement l'expression basale. Auparavant, l'EGCG a été qualifié d'inhibiteur des MMPs dans les cellules ombilicales humaines, cultivées dans un milieu riche en facteurs de croissance. Des résultats similaires ont été obtenus par de précédents (Nanni *et al.*, 2016; Sina *et al.*, 2010) et de récents travaux de recherche où l'EGCG inhibait la signalisation médiée par MT1-MMP ConA-induite (Djerir *et al.*, 2018).

L'induction de l'expression de Snail par le TGF β est également corrélée par un travail de recherche réalisé sur une lignée cancéreuse du foie, des cellules épithéliales mammaires ou encore une lignée de glioblastome (Myung *et al.*, 2014; Naber *et al.*, 2013; Peinado *et al.*, 2003). De très récents travaux rapportent également que l'extrait de thé vert et l'EGCG inhiberaient potentiellement la translocation et la transcription TGF β -dépendante et de ce fait l'expression de Snail (Panji *et al.*, 2021). Lors d'une autre étude menée sur des cellules anaplasiques du carcinome thyroïdien, l'EGCG a significativement inhibé la phosphorylation des Smad2/3 et a par conséquent réprimé l'expression des facteurs de transcription Snail1/2 (Li *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2012).

La fibronectine est une glycoprotéine nécessaire à l'adhérence des cellules (Scott *et al.*, 2019), mais est également un indicateur de l'EMT, avec une expression croissante dans les cellules mésenchymales (Lu et Kang, 2019; Petrini *et al.*, 2016). Il est à noter que l'induction de l'expression de la FNI est TGF β -induite dans les cellules de glioblastome, mais également par ses trois isoformes TGF β 1, TGF β 2, et TGF β 3 dans les cellules endothéliales (Joseph *et al.*, 2014; Ventura *et al.*, 2018). L'EGCG provoque une très forte inhibition de l'expression de la FNI, qu'il soit seul ou bien combiné au TGF β . Cette réduction, est pareillement observée sur des fibroblastes non stimulés en présence d'EGCG (Vu *et al.*, 2019) et sur des cellules hépatiques étoilées où l'EGCG réduit significativement l'expression de la fibronectine TGF β -induite (Yumei *et al.*, 2006). Cela nous indique clairement que l'EGCG interfère avec la signalisation médiée par le TGF β .

Le galunisertib est un inhibiteur de la fonction sérine/thréonine kinase du récepteur au TGF β (T β R) (Kelley *et al.*, 2019). Dans le présent travail, son utilisation sur les cellules de glioblastome engendre l'inhibition de l'induction de l'expression de MT1-MMP, Snail et FNI. Le galunisertib inhibe efficacement la phosphorylation de Smad2 TGF β -induite (Miyoshi *et al.*, 2016) dont dépend l'expression de Snail (Frick *et al.*, 2017). Le même effet a été obtenu sur les cellules du cancer du sein triple négatif en utilisant le galunisertib (Zhang *et al.*, 2021). Celui-ci provoque une interruption de la transduction du signal TGF β -induit en empêchant Smad2 et Smad3 d'être phosphorylés. Il abroge par la même, leur translocation dans le noyau, en conséquence de quoi, aucune activation transcriptionnelle de Snail faisant intervenir les Smads ne peut avoir lieu (Li *et al.*, 2019).

Nos résultats montrent que le galunisertib a un effet drastique sur l'expression de la FNI utilisé seul ou en concomitance avec le TGF β . L'utilisation de la molécule chimique A830 (un inhibiteur de la signalisation du TGF β) supprime toute induction de l'expression de la FNI TGF β -induite sur les U87 (Joseph *et al.*, 2014). Par analogie,

cette étude confirme nos résultats, à savoir qu'en inhibant la voie de signalisation du TGF β , l'expression de la FNI l'est également.

L'EGCG semble avoir un effet inhibiteur comparable à celui du galunisertib. Tous deux révèlent des profils d'inhibition similaires. Ceci nous amène à penser que l'EGCG pourrait avoir un mode d'action analogue à celui du galunisertib. Si l'on s'en tient à nos résultats, l'EGCG interagirait avec le T β R et interfèrerait avec la transduction du signal TGF β -induit. Les travaux de Tabuchi *et al.* en 2013 sont arrivés à la même conclusion en s'appuyant sur le fait que l'EGCG empêchait l'anticorps spécifique du T β R ainsi que le TGF β lui-même de se fixer au T β R (Tabuchi *et al.*, 2013).

Le galunisertib réduit de plus de 50% l'induction de l'expression de Snail ConA-induite, chose totalement inattendue, dans la mesure où le galunisertib est supposé réprimer la fonction kinase du T β R et non le domaine cytoplasmique de MT1-MMP. Puisque la ConA interagit avec MT1-MMP, ce résultat nous suggère d'émettre l'hypothèse selon laquelle il y aurait une communication entre les domaines cytoplasmiques du T β R et de MT1-MMP.

Le profil d'inhibition généré par l'EGCG étant comparable à celui du galunisertib sous l'effet du TGF β , nous a poussé à nous interroger sur le mode d'action de l'EGCG : agirait-il en amont, en aval ou bien au niveau même des domaines cytoplasmiques de MT1-MMP et du T β R ? Ensuite, la réduction de l'expression de Snail ConA-induite dû au galunisertib, nous impose de nous poser deux autres questions. Existerait-il bien une communication entre les voies médiées par MT1-MMP et celle du T β R et quelle est la hiérarchie de signalisation entre MT1-MMP et Snail ?

Pour tenter d'identifier le mode d'action de l'EGCG, nous avons exploré les voies de signalisation connues pour être induites par le TGF β tels que la voie des Smads, JAK/STAT et SRC (Ooshima *et al.*, 2019; Peñuelas *et al.*, 2009; Zhang, 2009). Celles-ci sont pareillement évaluées lors de la stimulation par la ConA. Dans la présente étude,

on ne voit aucune activation de Smad2 et 3 sous l'effet de la ConA, que ce soit à court ou à long terme.

Il est bien établi, que le TGF β induit la phosphorylation des facteurs de transduction du signal Smad2 et Smad3 par l'intermédiaire de la fonction tyrosine kinase du T β R (Hata et Chen, 2016; Kawabata et Miyazono, 1999; Wrana, 2013). Ici, nous avons procédé à la comparaison du profil de phosphorylation des facteurs de transduction du signal de la voie JAK/STAT3 et SCR, commune au TGF β et à la ConA en présence des inhibiteurs pharmacologiques de phosphorylation, le tofacitinib et l'AG490 à celui de l'EGCG. Le tofacitinib est un inhibiteur pharmacologique de phosphorylation, spécifique à la famille des kinases JAK (JAK1, JAK2 et JAK3) (Furumoto et Gadina, 2013), tandis que l'AG490 est un inhibiteur pharmacologique spécifique à l'enzyme JAK2 et empêche la phosphorylation des facteurs de transduction STAT3 et ERK2 (De Vos *et al.*, 2000).

Dans le présent travail, le prétraitement des cellules U87 avec le tofacitinib et l'AG490 a révélé une inhibition de la phosphorylation de STAT3 et Src comme attendu et ceux en présence de ConA et de TGF β . L'EGCG a présenté un profil d'inhibition sur la phosphorylation de STAT3 et Src, similaire à celui du tofacitinib et de l'AG490, autant en présence de ConA que de TGF β . De façon similaire, le prétraitement de cellules du cancer buccal avec l'EGCG, a significativement inhibé l'activation de Src (Chen *et al.*, 2011). Récemment, une étude rapporte des résultats qui contrastent avec l'inhibition que nous avons obtenue, sur les cellules de myélome multiple humaines où l'EGCG augmente significativement la phosphorylation de Src (Kumazoe *et al.*, 2020). Par contre, l'EGCG réduit la phosphorylation de STAT3 sur des cellules chéloïdes (Park *et al.*, 2008), le cancer du pancréas (Tang *et al.*, 2012) et les cellules du carcinome hépatocellulaire (Wang *et al.*, 2013).

Tenant compte de nos résultats, il semblerait que le mode d'action de l'EGCG soit basé sur l'inhibition de la phosphorylation des facteurs de transduction du signal. Les

mécanismes anticancéreux de l'EGCG varient énormément et englobent l'activité antioxydante, l'induction de l'apoptose, l'arrêt du cycle cellulaire, l'inhibition des facteurs de transcription ou encore l'inhibition des voies des tyrosines kinases (Cheng *et al.*, 2020; Shirakami et Shimizu, 2018). Nos expérimentations confirment que l'EGCG est à la fois un inhibiteur des voies des tyrosines kinases lorsqu'il inhibe la phosphorylation de Src et Smad2/3 et, un inhibiteur de facteurs de transcription lorsqu'il inhibe l'expression l'induction de Snail. Il semble à présent raisonnable de postuler que l'EGCG agirait sur l'activité kinase des enzymes à l'interface entre la molécule MT1-MMP, le T β R et les facteurs de transduction du signal. De ce fait, une ébauche de réponse à notre question commence à se profiler.

A la lumière de ces éléments, il semblerait que l'EGCG agisse en aval du T β R, au niveau de la cascade de signalisation, avec une préférence pour l'inhibition de la phosphorylation des facteurs des voies Src, JAK/STAT3 et Smad2/3 TGF β -induites. L'inhibition de la phosphorylation observée ici se répercute négativement sur la migration cellulaire. En effet, en réduisant la phosphorylation l'EGCG réduit la transduction du signal menant à la transcription des gènes régulant l'EMT. La réduction de la migration provoquée par l'EGCG est équivalente à celle engendrée par le tofacitinib. Cette petite molécule réduit considérablement la viabilité et la migration cellulaire des cellules de médulloblastomes humaine *in vitro* en réduisant la phosphorylation de JAK/STAT3 (Wei *et al.*, 2019). Dans une étude récente, le blocage de la signalisation de STAT3 par l'AG490, inhibe la prolifération anormale et l'invasion de fibroblastes chéloïdes humains, favorisant par la même leur apoptose (Zhou *et al.*, 2020a).

L'inhibition de la phosphorylation ne suggère en rien l'interrelation entre les deux voies de signalisation. Inversement la réduction de l'expression de Snail par le galunisertib en présence de ConA le suggère fortement et nous incite à nous demander quel rôle tient la molécule MT1-MMP dans la transduction du signal médié par la ConA et le

TGF β . Le galunisertib inhibe l'expression de Snail TGF β -induite dans la lignée de glioblastome U87 (Ouanouki *et al.*, 2017). Ceci correspond à une interruption directe de la transduction du signal TGF β -induit. D'autre part, la ConA induit l'expression de Snail par une voie de signalisation Smads-indépendante puisqu'on ne constate pas leur phosphorylation en sa présence. Cependant, le traitement des cellules U87 avec le galunisertib de façon concomitante à la ConA a révélé une réduction de l'induction de l'expression de Snail, ce qui n'a jamais été rapporté au paravent. Dans ce contexte l'existence d'une communication croisée entre les voies médiées par MT1-MMP et le T β R paraît plus que probable. Pour l'inférer, nous avons procédé à la répression génique des molécules cibles en utilisant des SiRNA. Les cellules ayant subi une répression de MT1-MMP puis traitée à la ConA ne révèlent aucune activité gélatinolytique (Akla *et al.*, 2012). La répression de MT1-MMP s'est avérée délétère sur l'induction de l'expression de Snail en présence de TGF β ou de ConA. Si le galunisertib inhibe cette interaction, cela signifie forcément qu'elle se déroule au niveau des domaines cytoplasmiques compte tenu du fait qu'il inhibe la fonction kinase du T β R et que celle-ci est située au niveau de son domaine cytoplasmique (Hinck, 2012).

En sa qualité de facteur de transcription, on peut penser que Snail régulerait éventuellement l'expression de MT1-MMP, qui serait l'exécutant de l'EMT (Shields *et al.*, 2011). Pourtant, une étude sur le carcinome de la cavité buccale à cellules squameuses, rapporte que la surexpression de Snail n'affecte pas l'expression de MT1-MMP, tant au niveau génique que protéique (Sun *et al.*, 2008). Dans le présent travail, la répression de Snail réduit légèrement l'expression de MT1-MMP, mais pas de manière significative. Inversement, l'expression de MT1-MMP est régulée par Snail, puisque sa répression entraîne la disparition de l'ARNm de MT1-MMP dans les cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse (Lu *et al.*, 2013). De plus, la répression de Snail a significativement réduit l'expression génique et protéique de MT1-MMP dans les cellules du cancer de l'ovaire et les fibroblastes dermiques du rat

(Qin *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2015b). Ceci suggère que l'interrelation entre MT1-MMP et Snail serait tissu-dépendante. Nos résultats indiquent que MT1-MMP contribue à relayer le signal du TGF β dans l'induction de l'expression de Snail. Cette dernière enclenche les modifications moléculaires et structurales conduisant à l'EMT, la migration cellulaire et à la métastase. Les résultats nous apprennent qu'en absence de MT1-MMP ou de Snail, la migration cellulaire des U87 est significativement réduite. Des résultats similaires sont obtenus suite à la répression de Snail dans une lignée de glioblastome (Han *et al.*, 2011a; Myung *et al.*, 2014), de cellules squameuses du carcinome de la cavité buccale (Sun *et al.*, 2008) ainsi que sur des cellules squameuses du carcinome laryngé (Zhao *et al.*, 2017).

Jusqu'à ce jour, aucune étude ne rapporte l'impact de la répression génique de MT1-MMP sur l'expression génique et protéique de Snail. Nos résultats montrent que lorsque MT1-MMP est réprimé, une réduction de l'induction de l'expression de Snail est observée sous l'effet de la ConA et du TGF β . Ce résultat suggère *à priori* que hiérarchiquement, MT1-MMP précède Snail dans la cascade d'événement régulant l'EMT. En effet, la répression de MT1-MMP dans le cancer gastrique réduit l'expression de plusieurs de gènes de l'EMT dont Snail (Li *et al.*, 2015) faisant ainsi écho à nos résultats. De plus, le « Gene Array » de l'EMT des cellules U87 traitées à la ConA a révélé une induction significative de l'expression de Snail, induction que l'on perd, car régulé négativement suite à la répression génique de MT1-MMP. Il semble plausible de penser que MT1-MMP régule l'expression de Snail dans la lignée de glioblastome U87 et non l'inverse. MT1-MMP est une molécule constitutivement présente à la surface cellulaire (Turunen *et al.*, 2017) tandis que Snail est un facteur de transcription dont l'expression est inductible (Peinado *et al.*, 2003).

Ce nouveau résultat vient appuyer notre hypothèse selon laquelle ce serait MT1-MMP qui régulerait l'expression de Snail et qui joue un rôle central dans la transduction du signal de la ConA et TGF β . Dans le même contexte, la répression de MT1-MMP dans

les cellules de glioblastome annule l'induction de l'expression ConA-induite de gènes impliqués dans l'autophagie BNIP (BCL2/adenovirus E1B Interaction Protein), ATG3 (Autophagy Related protein 3) , 12 et 16-L1 (Pratt et Annabi, 2014). Dans une étude plus récente, l'inhibition de l'expression de MT1-MMP provoque l'abolition de l'induction de l'expression de la MMP-9 PMA (Phorbol Myristate Acetate)-induite dans les cellules de fibrosarcome (Sheehy et Annabi, 2017). Néanmoins, aucun travail de recherche n'a à ce jour relaté la répression de l'expression Snail en absence de MT1-MMP, d'où l'originalité de nos résultats.

À présent on sait que la ConA induit l'expression de Snail et ceux en interaction avec MT1-MMP. Cependant on ignore encore par quelle voie de signalisation. Dans la mesure où elle ne semble pas faire intervenir la voie des Smads, car non phosphorylés en présence de ConA, nous avons exploré la voie JAK/STAT3. La répression de MT1-MMP nous indique que la phosphorylation de Smad2 TGFβ-dépendante requiert uniquement la fonction kinase du TβR tandis que l'événement subséquent, la phosphorylation de Smad3 nécessite l'intervention de MT1-MMP. Cette collaboration expliquerait que la transduction du signal TGFβ-induit soit interrompue en absence de MT1-MMP.

On ne peut pas s'avancer et dire que la ConA provoque l'induction de l'expression de Snail de façon MT1-MMP-dépendante en communiquant avec le domaine cytoplasmique du TβR, car le cas échéant nous aurions eu la phosphorylation de Smad3 lors des traitements à la ConA ; or ce n'est pas le cas. Par contre l'inverse semble être vrai. MT1-MMP semble être requise pour la phosphorylation TGFβ-dépendante de Smad3. Précédemment, la répression de MT1-MMP a significativement réduit l'expression de Smad1 par l'activation de l'expression du TGFβ (Freudenberg et Chen, 2007). Ceci prouve que MT1-MMP intervient bien dans la régulation de facteurs de transduction du signal de la famille des Smads. D'autre part, une étude plus récente désigne le domaine cytoplasmique de MT1-MMP, comme obligatoire pour l'induction

de l'autophagie par l'interaction avec la protéine BNIP (BCL2/adenovirus E1B Interaction Protein) (Pratt et Annabi, 2014). Le domaine cytoplasmique de MT1-MMP interagirait donc avec de nombreuses voies de signalisation cellulaire.

Très peu de travaux se sont intéressés à l'impact de la répression de MT1-MMP sur les facteurs de transduction du signal de la voie JAK/STAT3. Similairement à nos résultats, une réduction significative de la phosphorylation de STAT3 est observée dans les cellules stromales mésenchymateuses de la moelle osseuse à la suite de la répression génique de MT1-MMP (Akla *et al.*, 2012). Cependant, en absence de MT1-MMP, nous avons constaté une diminution du signal uniquement sous l'effet de la ConA. Cela sous-entend que la phosphorylation de STAT3 par le TGF β est MT1-MMP-indépendante tandis qu'avec la ConA, sa collaboration est nécessaire (Pratt et Annabi, 2014).

La réduction de la migration cellulaire subséquente à la répression de MT1-MMP est en accord avec de nombreuses recherches expérimentales réalisées sur les cellules du cancer du sein, du carcinome épidermoïde de l'œsophage, du glioblastome et le cancer de l'ovaire (Carey *et al.*, 2017; Ota *et al.*, 2009; Pang *et al.*, 2016; Sakr *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2015b). Ces éléments placent MT1-MMP dans une position centrale de l'axe régulant le processus de l'EMT. Toutefois, d'autres travaux de recherche attribuent l'importance de MT1-MMP à son domaine cytoplasmique. Effectivement, la migration cellulaire de MT1-MMP est directement liée à la phosphorylation du résidu tyrosine localisé au sein de son domaine intracellulaire (Nyalendo *et al.*, 2007). D'autre part, la participation de MT1-MMP dans la phosphorylation de facteurs de transduction du signal tel que ERK1/2, AKT et la voie JAK/STAT3 (Akla *et al.*, 2012; Valacca *et al.*, 2015) nous indique qu'elle remplit également une fonction non protéolytique-dépendante. Ceci suggère que l'absence de MT1-MMP et Snail a des répercussions similaires sur le processus invasif.

En nous basant sur nos résultats, nous sommes capables d'avancer une théorie sur le mode d'action de l'EGCG. Ce dernier serait un éventuel inhibiteur de phosphorylation qui agirait sur les facteurs de transduction du signal et donc en aval des domaines cytoplasmiques du T β R et de MT1-MMP. L'interrelation entre les voies JAK/STAT3 et Smads solliciterait le domaine cytoplasmique de MT1-MMP.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le présent travail de recherche s'articule autour deux axes : le premier consiste à évaluer l'effet de l'EGCG, un flavonoïde de la classe des catéchines, dérivé du thé vert sur le processus de transition épithélio-mésenchymateuse EMT. Lors de celui-ci, MT1-MMP et SNAIL, des marqueurs de l'EMT, constituent des cibles moléculaires pour l'évaluation de l'effet de l'EGCG sur l'EMT. Ensuite, dans le second axe, nous nous sommes fixé comme objectif d'identifier la relation hiérarchique entre MT1-MMP et Snail dans le processus de l'EMT. Pour atteindre nos objectifs, nous avons utilisé une lignée cellulaire de glioblastome les U87 et deux inducteurs de l'EMT : le facteur de croissance des tumeurs le TGF β et la Concanavaline A (ConA) et ceux en présence et en absence de l'EGCG.

Les résultats montrent que MT1-MMP, Snail et fibronectine sont induits par le TGF β de manière concentration dépendante. Cette induction est annulée par prétraitées avec l'EGCG. Le galunisertib engendre l'inhibition de l'induction de l'expression de MT1-MMP, Snail et FNI TGF β -induite. L'EGCG semble avoir un effet inhibiteur comparable à celui du galunisertib, puisque tous deux révèlent des profils d'inhibition similaires. En comparaison avec l'EGCG, le galunisertib n'a eu aucun impact sur l'expression de MT1-MMP induite par la ConA. Ceci suggère qu'il y a une transduction du signal de la ConA médié par MT1-MMP indépendant du TGF β R. Par contre, il réduit l'induction de l'expression de Snail ConA-induite. Ceci indique qu'il y aurait une communication entre le domaine cytoplasmique du TGF β R et le domaine cytoplasmique de MT1-MMP.

Le mode d'action de l'EGCG, est comparable à celui d'inhibiteurs pharmacologiques de phosphorylation, le galunisertib, le tofacitinb et l'AG490. Tenant compte de nos résultats, il semblerait que le mode d'action de l'EGCG soit basé sur l'inhibition de la phosphorylation des facteurs de transduction du signal.

La répression de Snail n'influence pas significativement l'expression de MT1-MMP TGF β –dépendante ou même son activité enzymatique ConA-dépendante. En revanche la répression de MT1-MMP s'est avérée délétère sur l'induction de l'expression de Snail en présence de TGF β ou de ConA. Le criblage des gènes de l'EMT par RT²-qPCR sur des cellules traitées à la ConA a révélé une nette induction de l'expression de Snail, induction que l'on perd car régulé négativement suite à la répression génique de MT1-MMP. Il semblerait que MT1-MMP régule l'expression de Snail et joue un rôle central dans la transduction du signal induit par la ConA et le TGF β . La répression génique de MT1-MMP n'influence pas la phosphorylation de Smad2 TGF β -induite par contre, réduit significativement la phosphorylation de Smad3. Ces résultats indiquent que la phosphorylation de Smad3 nécessite l'intervention de MT1-MMP. Aussi, nos résultats montrent que la phosphorylation de SRC en absence de MT1-MMP est inhibée.

Par ailleurs, la migration des U87 est significativement réduite en absence MT1-MMP et Snail. Ceci suggère que l'absence de MT1-MMP et Snail entraîne des répercussions similaires sur les processus biologiques de l'EMT.

Dans la perspective de mieux connaître le mécanisme d'inhibition de l'EGCG, il serait intéressant de comparer l'effet d'autres types d'inhibiteurs à celui de l'EGCG. D'autres expérimentations incluant la répression génique de MT1-MMP associée à différents types inhibiteurs de l'EMT renforcerait le savoir quant au rôle de MT1-MMP dans la signalisation TGF β -induite. Comparer les profils de phosphorylation des Smad2 et 3 après répression de MT1-MMP suivis du traitement à l'ilomastat (un inhibiteur du domaine catalytique de MT1-MMP), permettrait d'établir avec certitude son rôle dans la transduction du signal TGF β -dépendante. Enfin MT1-MMP et Snail sont deux molécules indispensables au processus de l'EMT.

BIBLIOGRAPHIE

- (2011) Neoplastic Cell Transformation. Dans *Encyclopedia of Cancer*. Schwab M, ed. Springer Berlin Heidelberg. Berlin, Heidelberg.
- Abe SK et Inoue M (2021) Green tea and cancer and cardiometabolic diseases: a review of the current epidemiological evidence. *European Journal of Clinical Nutrition* 75: 865-876.
- Adami R, Maggio A, Agoni V, Colombo M, Platonova N, Chiaramonte R, Ghidoni R, Bottinelli R, Canepari M et Bottai D (2015) *Effects of motor deprivation on neurogenesis*.
- Akla N, Pratt J et Annabi B (2012) Concanavalin-A triggers inflammatory response through JAK/STAT3 signalling and modulates MT1-MMP regulation of COX-2 in mesenchymal stromal cells. *Experimental cell research* 318: 2498-2506.
- Alcantara Llaguno S, Sun D, Pedraza AM, Vera E, Wang Z, Burns DK et Parada LF (2019) Cell-of-origin susceptibility to glioblastoma formation declines with neural lineage restriction. *Nat Neurosci* 22: 545-555.
- Almatroodi SA, Almatroudi A, Khan AA, Alhumaydhi FA, Alsahli MA et Rahmani AH (2020) Potential Therapeutic Targets of Epigallocatechin Gallate (EGCG), the Most Abundant Catechin in Green Tea, and Its Role in the Therapy of Various Types of Cancer. *Molecules* 25:
- Amjad MT, Chidharla A et Kasi A (2022) Cancer Chemotherapy. Dans *StatPearls*. StatPearls Publishing Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC. Treasure Island (FL).
- Amjad MT et Kasi A (2021) Cancer Chemotherapy. Dans *StatPearls*. StatPearls Publishing Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC. Treasure Island (FL).
- Anonyme (2013) ©Rôle du microenvironnement dans la tumorigenèse et la progression tumorale. *Collection Rapports sur les avancées, ouvrage collectif édité par La Fondation ARC pour la recherche sur le cancer et l'INCa* 96.
- Ansieau S, Morel AP, Hinkal G, Bastid J et Puisieux A (2010) TWISTing an embryonic transcription factor into an oncoprotein. *Oncogene* 29: 3173-3184.
- Aparicio-Blanco J, Sanz-Arriazu L, Lorenzoni R et Blanco-Prieto MJ (2020) Glioblastoma chemotherapeutic agents used in the clinical setting and in clinical trials: Nanomedicine approaches to improve their efficacy. *Int J Pharm* 581: 119283.
- Azam Z, TO S-ST et Tannous BA (2020) Mesenchymal Transformation: The Rosetta Stone of Glioblastoma Pathogenesis and Therapy Resistance. *Advanced Science* 7: 2002015.

- Barillari G (2020) The Impact of Matrix Metalloproteinase-9 on the Sequential Steps of the Metastatic Process. *Int J Mol Sci* 21:
- Benetou V, Lagiou A et Lagiou P (2015) Chemoprevention of cancer: current evidence and future prospects. *F1000Res* 4: 916.
- Bimonte S, Cascella M, Barbieri A, Arra C et Cuomo A (2020) Current shreds of evidence on the anticancer role of EGCG in triple negative breast cancer: an update of the current state of knowledge. *Infectious Agents and Cancer* 15: 2.
- Bond AM, Ming GL et Song H (2015) Adult Mammalian Neural Stem Cells and Neurogenesis: Five Decades Later. *Cell Stem Cell* 17: 385-395.
- Botten D, Fugallo G, Fraternali F et Molteni C (2015) Structural Properties of Green Tea Catechins. *The Journal of Physical Chemistry B* 119: 12860-12867.
- Brat DJ, Aldape K, Colman H, Holland EC, Louis DN, Jenkins RB, Kleinschmidt-DeMasters BK, Perry A, Reifenberger G, Stupp R, et al. (2018) cIMPACT-NOW update 3: recommended diagnostic criteria for "Diffuse astrocytic glioma, IDH-wildtype, with molecular features of glioblastoma, WHO grade IV". *Acta Neuropathol* 136: 805-810.
- Brenner DR, Weir HK, Demers AA, Ellison LF, Louzado C, Shaw A, Turner D, Woods RR et Smith LM (2020) Projected estimates of cancer in Canada in 2020. *Canadian Medical Association Journal* 192: E199.
- Brouland J-P et Hottinger AF (2017) Nouvelle classification OMS 2016 des gliomes : quels changements? *Rev Med Suisse* 13: 1805-1809.
- Cai ZY, Li XM, Liang JP, Xiang LP, Wang KR, Shi YL, Yang R, Shi M, Ye JH, Lu JL, et al. (2018) Bioavailability of Tea Catechins and Its Improvement. *Molecules* 23:
- Cardillo MR, Di Silverio F et Gentile V (2006) Quantitative immunohistochemical and in situ hybridization analysis of metalloproteinases in prostate cancer. *Anticancer Res* 26: 973-982.
- Carey SP, Martin KE et Reinhart-King CA (2017) Three-dimensional collagen matrix induces a mechanosensitive invasive epithelial phenotype. *Scientific Reports* 7: 42088.
- Carlberg M et Hardell L (2014) Decreased survival of glioma patients with astrocytoma grade IV (glioblastoma multiforme) associated with long-term use of mobile and cordless phones. *Int J Environ Res Public Health* 11: 10790-10805.
- Cassandri M, Smirnov A, Novelli F, Pitolli C, Agostini M, Malewicz M, Melino G et Raschellà G (2017) Zinc-finger proteins in health and disease. *Cell Death Discovery* 3: 17071.

- Castro-Castro A, Marchesin V, Monteiro P, Lodillinsky C, Rossé C et Chavrier P (2016) Cellular and Molecular Mechanisms of MT1-MMP-Dependent Cancer Cell Invasion. *Annu Rev Cell Dev Biol* 32: 555-576.
- Chamling X, Kallman A, Fang W, Berlinicke CA, Mertz JL, Devkota P, Pantoja IEM, Smith MD, Ji Z, Chang C, et al. (2021) Single-cell transcriptomic reveals molecular diversity and developmental heterogeneity of human stem cell-derived oligodendrocyte lineage cells. *Nat Commun* 12: 652.
- Chang H, Fontenay GV, Han J, Cong G, Baehner FL, Gray JW, Spellman PT et Parvin B (2011) Morphometric analysis of TCGA glioblastoma multiforme. *BMC Bioinformatics* 12: 484.
- Chantrain C et DeClerck YA (2002) Les métalloprotéases matricielles et leurs inhibiteurs synthétiques dans la progression tumorale. *Med Sci (Paris)* 18: 565-575.
- Chen J, Yuan W, Wu L, Tang Q, Xia Q, Ji J, Liu Z, Ma Z, Zhou Z, Cheng Y, et al. (2016) PDGF-D promotes cell growth, aggressiveness, angiogenesis and EMT transformation of colorectal cancer by activation of Notch1/Twist1 pathway. *Oncotarget* 8:
- Chen L, Lin G, Chen K, Liang R, Wan F, Zhang C, Tian G et Zhu X (2020) VEGF promotes migration and invasion by regulating EMT and MMPs in nasopharyngeal carcinoma. *Journal of Cancer* 11: 7291-7301.
- Chen PN, Chu SC, Kuo WH, Chou MY, Lin JK et Hsieh YS (2011) Epigallocatechin-3 gallate inhibits invasion, epithelial-mesenchymal transition, and tumor growth in oral cancer cells. *J Agric Food Chem* 59: 3836-3844.
- Cheng Z, Zhang Z, Han Y, Wang J, Wang Y, Chen X, Shao Y, Cheng Y, Zhou W, Lu X, et al. (2020) A review on anti-cancer effect of green tea catechins. *Journal of Functional Foods* 74: 104172.
- Chinot O, Soulier P et Frenay M (2010) Chimiothérapie et traitements ciblés des glioblastomes. *Neurochirurgie* 56: 491-498.
- Chu C, Deng J, Man Y et Qu Y (2017) Green Tea Extracts Epigallocatechin-3-gallate for Different Treatments. *Biomed Res Int* 2017: 5615647.
- Clavreul A, Guette C, Faguer R, Tétaud C, Boissard A, Lemaire L, Rousseau A, Avril T, Henry C, Coqueret O, et al. (2014) Glioblastoma-associated stromal cells (GASCs) from histologically normal surgical margins have a myofibroblast phenotype and angiogenic properties. *J Pathol* 233: 74-88.

- Datta A, Deng S, Gopal V, Yap KC-H, Halim CE, Lye ML, Ong MS, Tan TZ, Sethi G, Hooi SC, et al. (2021) Cytoskeletal Dynamics in Epithelial-Mesenchymal Transition: Insights into Therapeutic Targets for Cancer Metastasis. *Cancers* 13: 1882.
- de Chevigny A et Lledo P-M (2006) La neurogenèse bulbaire et son impact neurologique. *M/S : médecine sciences* 22: 607-613.
- de Vocht F (2019) Analyses of temporal and spatial patterns of glioblastoma multiforme and other brain cancer subtypes in relation to mobile phones using synthetic counterfactuals. *Environ Res* 168: 329-335.
- De Vos J, Jourdan M, Tarte K, Jasmin C et Klein B (2000) JAK2 tyrosine kinase inhibitor tyrphostin AG490 downregulates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) and signal transducer and activator of transcription (STAT) pathways and induces apoptosis in myeloma cells. *British Journal of Haematology* 109: 823-828.
- Dieudonné-Rahm N, Micheli RD et Hottinger A (2016) Prise en charge palliative des glioblastomes. *Revue Medical Suisse* 2: 853 - 856
- Djerir D, Iddir M, Bourgault S, Lamy S et Annabi B (2018) Biophysical evidence for differential gallated green tea catechins binding to membrane type-1 matrix metalloproteinase and its interactors. *Biophysical chemistry* 234: 34-41.
- Dong S, Nutt CL, Betensky RA, Stemmer-Rachamimov AO, Denko NC, Ligon KL, Rowitch DH et Louis DN (2005) Histology-based expression profiling yields novel prognostic markers in human glioblastoma. *J Neuropathol Exp Neurol* 64: 948-955.
- Dorai T et Aggarwal BB (2004) Role of chemopreventive agents in cancer therapy. *Cancer Lett* 215: 129-140.
- Dubret Gr, Cousin F-R et Cousin F-R (1985) *Elements d'anatomie et de physiologie du système nerveux central*. Flammarion, Paris.
- Ducray F et Guillemin R (2007) Caractéristiques radiologiques des glioblastomes. *La Lettre du Neurologue* XI: 1-2.
- Eldred JA, Hodgkinson LM, Dawes LJ, Reddan JR, Edwards DR et Wormstone IM (2012) MMP2 Activity is Critical for TGF β 2-Induced Matrix Contraction—Implications for Fibrosis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 53: 4085-4098.
- Elias MC, Tozer KR, Silber JR, Mikheeva S, Deng M, Morrison RS, Manning TC, Silbergeld DL, Glackin CA, Reh TA, et al. (2005) TWIST is expressed in human gliomas and promotes invasion. *Neoplasia* 7: 824-837.

- Ettrich TJ, Stingl J, Menzler S, Messmann H, Kleber G, Zipprich A, Frank-Gleich S, Algül H, Metter K, Odemar F, et al. (2020) Green tea extract to prevent colorectal adenomas in men and women: Results of the MIRACLE trial. *Journal of Clinical Oncology* 38: 1551-1551.
- Falconer RA et Loadman PM (2017) Membrane-type matrix metalloproteinases: expression, roles in metastatic prostate cancer progression and opportunities for drug targeting. *Journal of Cancer Metastasis and Treatment* 3: 315-327.
- Fantozzi A, Gruber DC, Pisarsky L, Heck C, Kunita A, Yilmaz M, Meyer-Schaller N, Cornille K, Hopfer U, Bentires-Alj M, et al. (2014) VEGF-mediated angiogenesis links EMT-induced cancer stemness to tumor initiation. *Cancer Res* 74: 1566-1575.
- Ferrari R, Martin G, Tagit O, Guichard A, Cambi A, Voituriez R, Vassilopoulos S et Chavrier P (2019) MT1-MMP directs force-producing proteolytic contacts that drive tumor cell invasion. *Nat Commun* 10: 4886.
- Fishman DA, Bafetti LM et Stack MS (1996) Membrane-type matrix metalloproteinase expression and matrix metalloproteinase-2 activation in primary human ovarian epithelial carcinoma cells. *Invasion Metastasis* 16: 150-159.
- Fletcher DA et Mullins RD (2010) Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* 463: 485-492.
- Freudenberg JA et Chen WT (2007) Induction of Smad1 by MT1-MMP contributes to tumor growth. *Int J Cancer* 121: 966-977.
- Frick CL, Yarka C, Nunns H et Goentoro L (2017) Sensing relative signal in the Tgf- β /Smad pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114: E2975-E2982.
- Fujimura Y, Sumida M, Sugihara K, Tsukamoto S, Yamada K et Tachibana H (2012) Green tea polyphenol EGCG sensing motif on the 67-kDa laminin receptor. *PLoS One* 7: e37942.
- Furumoto Y et Gadina M (2013) The arrival of JAK inhibitors: advancing the treatment of immune and hematologic disorders. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy* 27: 431-438.
- Gallaher JA, Massey SC, Hawkins-Daarud A, Noticewala SS, Rockne RC, Johnston SK, Gonzalez-Cuyar L, Juliano J, Gil O, Swanson KR, et al. (2020) From cells to tissue: How cell scale heterogeneity impacts glioblastoma growth and treatment response. *PLOS Computational Biology* 16: e1007672.
- Gandalovičová A, Vomastek T, Rosel D et Brábek J (2016) Cell polarity signaling in the plasticity of cancer cell invasiveness. *Oncotarget* 7: 25022-25049.

- Gee JR, Saltzstein DR, Kim K, Kolesar J, Huang W, Havighurst TC, Wollmer BW, Stublaski J, Downs T, Mukhtar H, et al. (2017) A Phase II Randomized, Double-blind, Presurgical Trial of Polyphenon E in Bladder Cancer Patients to Evaluate Pharmacodynamics and Bladder Tissue Biomarkers. *Cancer Prev Res (Phila)* 10: 298-307.
- Georgakopoulos-Soares I, Chartoumpekis DV, Kyriazopoulou V et Zaravinos A (2020) EMT Factors and Metabolic Pathways in Cancer. *Front Oncol* 10: 499.
- Gifford V et Itoh Y (2019) MT1-MMP-dependent cell migration: Proteolytic and non-proteolytic mechanisms. *Biochemical Society Transactions* 47: BST20180363.
- Gilles C, Newgreen D et Sato Hea (2000-2013) Métalloprotéases matricielles et transition épithéliale-mésenchymateuse : implications pour la métastase du carcinome. *Madame Curie Bioscience Database [Internet] Austin (TX) : Landes Biosciences*
- Gingras D, Pagé M, Annabi B et Béliveau R (2000) Rapid activation of matrix metalloproteinase-2 by glioma cells occurs through a posttranslational MT1-MMP-dependent mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1497: 341-350.
- Gonzalez-Avila G, Sommer B, Mendoza-Posada DA, Ramos C, Garcia-Hernandez AA et Falfan-Valencia R (2019) Matrix metalloproteinases participation in the metastatic process and their diagnostic and therapeutic applications in cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 137: 57-83.
- Gonzalez Castro LN et Wesseling P (2021) The cIMPACT-NOW updates and their significance to current neuro-oncology practice. *Neuro-Oncology Practice* 8: 4-10.
- Gonzalez DM et Medici D (2014) Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci Signal* 7: re8.
- Goossens S, Vandamme N, Van Vlierberghe P et Berx G (2017) EMT transcription factors in cancer development re-evaluated: Beyond EMT and MET. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 1868: 584-591.
- Hagemann C, Anacker J, Ernestus RI et Vince GH (2012) A complete compilation of matrix metalloproteinase expression in human malignant gliomas. *World J Clin Oncol* 3: 67-79.
- Hambardzumyan D et Bergers G (2015) Glioblastoma: Defining Tumor Niches. *Trends Cancer* 1: 252-265.

- Han SP, Kim J-H, Han M-E, Sim H-E, Kim K-S, Yoon S, Baek S, Kim B-S et Oh S-O (2011a) SNAI1 is Involved in the Proliferation and Migration of Glioblastoma Cells. *Cellular and molecular neurobiology* 31: 489-496.
- Han SP, Kim JH, Han ME, Sim HE, Kim KS, Yoon S, Baek SY, Kim BS et Oh SO (2011b) SNAI1 is involved in the proliferation and migration of glioblastoma cells. *Cell Mol Neurobiol* 31: 489-496.
- Harada K, Nishizaki T, Ozaki S, Kubota H, Ito H et Sasaki K (1998) Intratumoral cytogenetic heterogeneity detected by comparative genomic hybridization and laser scanning cytometry in human gliomas. *Cancer Res* 58: 4694-4700.
- Hata A et Chen YG (2016) TGF- β Signaling from Receptors to Smads. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8:
- Higdon JV et Frei B (2003) Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Crit Rev Food Sci Nutr* 43: 89-143.
- Hinck AP (2012) Structural studies of the TGF- β s and their receptors – insights into evolution of the TGF- β superfamily. *FEBS Letters* 586: 1860-1870.
- Hohmann T et Dehghani F (2019) The Cytoskeleton-A Complex Interacting Meshwork. *Cells* 8:
- Hur JH, Park MJ, Park IC, Yi DH, Rhee CH, Hong SI et Lee SH (2000) Matrix metalloproteinases in human gliomas: activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) may be correlated with membrane-type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) expression. *J Korean Med Sci* 15: 309-314.
- Ishii T, Ichikawa T, Minoda K, Kusaka K, Ito S, Suzuki Y, Akagawa M, Mochizuki K, Goda T et Nakayama T (2011) Human serum albumin as an antioxidant in the oxidation of (-)-epigallocatechin gallate: participation of reversible covalent binding for interaction and stabilization. *Biosci Biotechnol Biochem* 75: 100-106.
- Iyer RP, Patterson NL, Fields GB et Lindsey ML (2012) The history of matrix metalloproteinases: milestones, myths, and misperceptions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 303: H919-930.
- Joseph JV, Conroy S, Tomar T, Eggens-Meijer E, Bhat K, Copray S, Walenkamp AME, Boddeke E, Balasubramanyian V, Wagemakers M, et al. (2014) TGF- β is an inducer of ZEB1-dependent mesenchymal transdifferentiation in glioblastoma that is associated with tumor invasion. *Cell Death & Disease* 5: e1443.
- Karamanou K, Franchi M, Vynios D et Brézillon S (2020) Epithelial-to-mesenchymal transition and invadopodia markers in breast cancer: Lumican a key regulator. *Seminars in Cancer Biology* 62: 125-133.

- Kaufhold S et Bonavida B (2014) Central role of Snail1 in the regulation of EMT and resistance in cancer: a target for therapeutic intervention. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 33: 62.
- Kawabata M et Miyazono K (1999) Signal transduction of the TGF-beta superfamily by Smad proteins. *J Biochem* 125: 9-16.
- Kelley RK, Gane E, Assenat E, Siebler J, Galle PR, Merle P, Hourmand IO, Cleverly A, Zhao Y, Gueorguieva I, et al. (2019) A Phase 2 Study of Galunisertib (TGF- β 1 Receptor Type I Inhibitor) and Sorafenib in Patients With Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Clinical and Translational Gastroenterology* 10: e00056.
- Kim J, Kong J, Chang H, Kim H et Kim A (2016) EGF induces epithelial-mesenchymal transition through phospho-Smad2/3-Snail signaling pathway in breast cancer cells. *Oncotarget* 7: 85021-85032.
- Kim K et Khang D (2020) Past, Present, and Future of Anticancer Nanomedicine. *Int J Nanomedicine* 15: 5719-5743.
- Knapinska AM et Fields GB (2019) The Expanding Role of MT1-MMP in Cancer Progression. *Pharmaceuticals (Basel)* 12:
- Kohlmeier L, Weterings KG, Steck S et Kok FJ (1997) Tea and cancer prevention: an evaluation of the epidemiologic literature. *Nutr Cancer* 27: 1-13.
- Koike Y, Yozaki M, Utani A et Murota H (2020) Fibroblast growth factor 2 accelerates the epithelial-mesenchymal transition in keratinocytes during wound healing process. *Scientific Reports* 10: 18545.
- Kumar NB, Pow-Sang J, Spiess PE, Park J, Salup R, Williams CR, Parnes H et Schell MJ (2016) Randomized, placebo-controlled trial evaluating the safety of one-year administration of green tea catechins. *Oncotarget* 7: 70794-70802.
- Kumazoe M, Kadomatsu M, Bae J, Otsuka Y, Fujimura Y et Tachibana H (2020) Src Mediates Epigallocatechin-3-O-Gallate-Elicited Acid Sphingomyelinase Activation. *Molecules* 25:
- Kupp R, Shtayer L, Tien AC, Szeto E, Sanai N, Rowitch DH et Mehta S (2016) Lineage-Restricted OLIG2-RTK Signaling Governs the Molecular Subtype of Glioma Stem-like Cells. *Cell Rep* 16: 2838-2845.
- Lamairac F et Paquis P (2015) Glioblastome. *L'encyclopédie neurochirurgicale*

- Lambert SA, Jolma A, Campitelli LF, Das PK, Yin Y, Albu M, Chen X, Taipale J, Hughes TR et Weirauch MT (2018) The Human Transcription Factors. *Cell* 172: 650-665.
- Lamouille S, Xu J et Derynck R (2014) Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15: 178-196.
- Laronha H et Caldeira J (2020) Structure and Function of Human Matrix Metalloproteinases. *Cells* 9: 1076.
- Lee JH, Lee JE, Kahng JY, Kim SH, Park JS, Yoon SJ, Um J-Y, Kim WK, Lee J-K, Park J, et al. (2018) Human glioblastoma arises from subventricular zone cells with low-level driver mutations. *Nature* 560: 243-247.
- Lee JK, Joo KM, Lee J, Yoon Y et Nam DH (2014) Targeting the epithelial to mesenchymal transition in glioblastoma: the emerging role of MET signaling. *Onco Targets Ther* 7: 1933-1944.
- Lee MJ, Maliakal P, Chen L, Meng X, Bondoc FY, Prabhu S, Lambert G, Mohr S et Yang CS (2002) Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (-)-epigallocatechin-3-gallate by humans: formation of different metabolites and individual variability. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11: 1025-1032.
- Leggett SE, Hruska AM, Guo M et Wong IY (2021) The epithelial-mesenchymal transition and the cytoskeleton in bioengineered systems. *Cell Commun Signal* 19: 32.
- Li T, Zhao N, Lu J, Zhu Q, Liu X, Hao F et Jiao X (2019) Epigallocatechin gallate (EGCG) suppresses epithelial-Mesenchymal transition (EMT) and invasion in anaplastic thyroid carcinoma cells through blocking of TGF- β 1/Smad signaling pathways. *Bioengineered* 10: 282-291.
- Li W, Li S, Deng L, Yang S, Li M, Long S, Chen S, Lin F et Xiao L (2015) Decreased MT1-MMP in gastric cancer suppressed cell migration and invasion via regulating MMPs and EMT. *Tumour Biol* 36: 6883-6889.
- Ling G, Wang S, Song Z, Sun X, Liu Y, Jiang X, Cai Y, Du M et Ke Y (2011) Transforming growth factor- β is required for vasculogenic mimicry formation in glioma cell line U251MG. *Cancer biology & therapy* 12: 978-988.
- Liu LC, Tsao TC, Hsu SR, Wang HC, Tsai TC, Kao JY et Way TD (2012) EGCG inhibits transforming growth factor- β -mediated epithelial-to-mesenchymal transition via the inhibition of Smad2 and Erk1/2 signaling pathways in nonsmall cell lung cancer cells. *J Agric Food Chem* 60: 9863-9873.

- Liu T, Xu H, Huang M, Ma W, Saxena D, Lustig RA, Alonso-Basanta M, Zhang Z, O'Rourke DM, Zhang L, et al. (2018) Circulating Glioma Cells Exhibit Stem Cell-like Properties. *Cancer Res* 78: 6632-6642.
- Lombard A, Goffart N et Rogister B (2015) Glioblastoma Circulating Cells: Reality, Trap or Illusion? *Stem Cells Int* 2015: 182985.
- Lu C, Sun X, Sun L, Sun J, Lu Y, Yu X, Zhou L et Gao X (2013) Snail mediates PDGF-BB-induced invasion of rat bone marrow mesenchymal stem cells in 3D collagen and chick chorioallantoic membrane. *Journal of cellular physiology* 228: 1827-1833.
- Lu W et Kang Y (2019) Epithelial-Mesenchymal Plasticity in Cancer Progression and Metastasis. *Developmental cell* 49: 361-374.
- Lüllmann-Rauch R (2008) *Histologie*. De Boeck, Bruxelles.
- Maher EA, Brennan C, Wen PY, Durso L, Ligon KL, Richardson A, Khattry D, Feng B, Sinha R, Louis DN, et al. (2006) Marked genomic differences characterize primary and secondary glioblastoma subtypes and identify two distinct molecular and clinical secondary glioblastoma entities. *Cancer Res* 66: 11502-11513.
- Markopoulos GS, Roupakia E, Marcu KB et Kolettas E (2019) Epigenetic Regulation of Inflammatory Cytokine-Induced Epithelial-To-Mesenchymal Cell Transition and Cancer Stem Cell Generation. *Cells* 8:
- Markovic DS, Vinnakota K, Chirasani S, Synowitz M, Raguet H, Stock K, Sliwa M, Lehmann S, Kälin R, van Rooijen N, et al. (2009) Gliomas induce and exploit microglial MT1-MMP expression for tumor expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 12530-12535.
- Matarredona ER et Pastor AM (2019) Neural Stem Cells of the Subventricular Zone as the Origin of Human Glioblastoma Stem Cells. Therapeutic Implications. *Front Oncol* 9: 779.
- Medici D et Nawshad A (2010) Type I collagen promotes epithelial-mesenchymal transition through ILK-dependent activation of NF-kappaB and LEF-1. *Matrix Biol* 29: 161-165.
- Metibemu DS, Akinloye OA, Akamo AJ, Ojo DA, Okeowo OT et Omotuyi IO (2019) Exploring receptor tyrosine kinases-inhibitors in Cancer treatments. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics* 20: 35.
- Mimeault M, Hauke R et Batra SK (2007) Stem cells: a revolution in therapeutics-recent advances in stem cell biology and their therapeutic applications in regenerative medicine and cancer therapies. *Clin Pharmacol Ther* 82: 252-264.

- Minniti G, Muni R, Lanzetta G, Marchetti P et Enrici RM (2009) Chemotherapy for glioblastoma: current treatment and future perspectives for cytotoxic and targeted agents. *Anticancer Res* 29: 5171-5184.
- Miranda-Filho A, Piñeros M, Soerjomataram I, Deltour I et Bray F (2017) Cancers of the brain and CNS: global patterns and trends in incidence. *Neuro Oncol* 19: 270-280.
- Miyoshi S, Kudo M, Shitara K, Yamauchi M, Doi T et Matsumura Y (2016) TGF- β inhibitor LY2157299 (galunisertib) in combination with standard chemotherapy and inhibition of signaling to pSmad and EMT and suppression of tumor growth in gastric cancer. *Journal of Clinical Oncology* 34: 50-50.
- Moustakas A et Heldin CH (2007) Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression. *Cancer Sci* 98: 1512-1520.
- Myung JK, Choi SA, Kim S-K, Wang K-C et Park S-H (2014) Snail plays an oncogenic role in glioblastoma by promoting epithelial mesenchymal transition. *International journal of clinical and experimental pathology* 7: 1977-1987.
- Naber HP, Drabsch Y, Snaar-Jagalska BE, ten Dijke P et van Laar T (2013) Snail and Slug, key regulators of TGF- β -induced EMT, are sufficient for the induction of single-cell invasion. *Biochemical and biophysical research communications* 435: 58-63.
- Nachbichler SB, Schupp G, Ballhausen H, Niyazi M et Belka C (2017) Temozolomide during radiotherapy of glioblastoma multiforme : Daily administration improves survival. *Strahlenther Onkol* 193: 890-896.
- Nagle DG, Ferreira D et Zhou YD (2006) Epigallocatechin-3-gallate (EGCG): chemical and biomedical perspectives. *Phytochemistry* 67: 1849-1855.
- Nalluri SM, O'Connor JW et Gomez EW (2015) Cytoskeletal signaling in TGF β -induced epithelial-mesenchymal transition. *Cytoskeleton (Hoboken)* 72: 557-569.
- Nanni SB, Pratt J, Beauchemin D, Haidara K et Annabi B (2016) Impact of Concanavalin-A-Mediated Cytoskeleton Disruption on Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein-1 Internalization and Cell Surface Expression in Glioblastomas. *Biomark Cancer* 8: 77-87.
- Neftel C, Laffy J, Filbin MG, Hara T, Shore ME, Rahme GJ, Richman AR, Silverbush D, Shaw ML, Hebert CM, et al. (2019) An Integrative Model of Cellular States, Plasticity, and Genetics for Glioblastoma. *Cell* 178: 835-849.e821.
- Nikiforova MN et Hamilton RL (2011) Molecular diagnostics of gliomas. *Arch Pathol Lab Med* 135: 558-568.

- Nyalendo C, Michaud M, Beaulieu E, Roghi C, Murphy G, Gingras D et Béliveau R (2007) Src-dependent Phosphorylation of Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase on Cytoplasmic Tyrosine 573: ROLE IN ENDOTHELIAL AND TUMOR CELL MIGRATION *. *Journal of Biological Chemistry* 282: 15690-15699.
- Ooshima A, Park J et Kim S-J (2019) Phosphorylation status at Smad3 linker region modulates transforming growth factor- β -induced epithelial-mesenchymal transition and cancer progression. *Cancer Science* 110: 481-488.
- Ortiz MA, Mikhailova T, Li X, Porter BA, Bah A et Kotula L (2021) Src family kinases, adaptor proteins and the actin cytoskeleton in epithelial-to-mesenchymal transition. *Cell Communication and Signaling* 19: 67.
- Ota I, Li XY, Hu Y et Weiss SJ (2009) Induction of a MT1-MMP and MT2-MMP-dependent basement membrane transmigration program in cancer cells by Snail1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 20318-20323.
- Ottaviano AJ, Sun L, Ananthanarayanan V et Munshi HG (2006) Extracellular Matrix-Mediated Membrane-Type 1 Matrix Metalloproteinase Expression in Pancreatic Ductal Cells Is Regulated by Transforming Growth Factor- β 1. *Cancer Research* 66: 7032-7040.
- Ouanouki A, Lamy S et Annabi B (2017) Anthocyanidins inhibit epithelial-mesenchymal transition through a TGF- β /Smad2 signaling pathway in glioblastoma cells: Anthocyanidins inhibit TGF- β -mediated EMT. *Molecular Carcinogenesis* 56:
- Pang L, Li Q, Li S, He J, Cao W, Lan J, Sun B, Zou H, Wang C, Liu R, et al. (2016) Membrane type 1-matrix metalloproteinase induces epithelial-to-mesenchymal transition in esophageal squamous cell carcinoma: Observations from clinical and in vitro analyses. *Scientific Reports* 6: 22179.
- Panji M, Behmard V, Zare Z, Malekpour M, Nejadbiglari H, Yavari S, Nayerpour dizaj T, Safaeian A, Maleki N, Abbasi M, et al. (2021) Suppressing effects of green tea extract and Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on TGF- β - induced Epithelial-to-mesenchymal transition via ROS/Smad signaling in human cervical cancer cells. *Gene* 794:
- Park G, Yoon BS, Moon J-H, Kim B, Jun EK, Oh S, Kim H, Song HJ, Noh JY, Oh C, et al. (2008) Green Tea Polyphenol Epigallocatechin-3-Gallate Suppresses Collagen Production and Proliferation in Keloid Fibroblasts via Inhibition of the STAT3-Signaling Pathway. *Journal of Investigative Dermatology* 128: 2429-2441.
- Paul MK et Mukhopadhyay AK (2004) Tyrosine kinase - Role and significance in Cancer. *Int J Med Sci* 1: 101-115.

- Peinado H, Quintanilla M et Cano A (2003) Transforming Growth Factor β -1 Induces Snail Transcription Factor in Epithelial Cell Lines: MECHANISMS FOR EPITHELIAL MESENCHYMAL TRANSITIONS. *Journal of Biological Chemistry* 278: 21113-21123.
- Peñuelas S, Anido J, Prieto-Sánchez RM, Folch G, Barba I, Cuartas I, García-Dorado D, Poca MA, Sahuquillo J, Baselga J, et al. (2009) TGF- β Increases Glioma-Initiating Cell Self-Renewal through the Induction of LIF in Human Glioblastoma. *Cancer Cell* 15: 315-327.
- Petrini I, Barachini S, Carnicelli V, Galimberti S, Modeo L, Boni R, Sollini M et Erba PA (2016) ED-B fibronectin expression is a marker of epithelial-mesenchymal transition in translational oncology. *Oncotarget* 8:
- Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, Misra A, Nigro JM, Colman H, Soroceanu L, et al. (2006) Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* 9: 157-173.
- Picart T, Armoiry X, Berthiller J, Dumot C, Pelissou-Guyotat I, Signorelli F et Guyotat J (2017) Is fluorescence-guided surgery with 5-ala in eloquent areas for malignant gliomas a reasonable and useful technique? *Neurochirurgie* 63: 189-196.
- Porsch H, Mehić M, Olofsson B, Heldin P et Heldin C-H (2014) Platelet-derived Growth Factor β -Receptor, Transforming Growth Factor β ; Type I Receptor, and CD44 Protein Modulate Each Other's Signaling and Stability *. *Journal of Biological Chemistry* 289: 19747-19757.
- Pratt J et Annabi B (2014) Induction of autophagy biomarker BNIP3 requires a JAK2/STAT3 and MT1-MMP signaling interplay in Concanavalin-A-activated U87 glioblastoma cells. *Cellular Signalling* 26: 917-924.
- Prestegarden L, Svendsen A, Wang J, Sleire L, Skafnesmo KO, Bjerkvig R, Yan T, Askland L, Persson A, Sakariassen P, et al. (2010) Glioma cell populations grouped by different cell type markers drive brain tumor growth. *Cancer Res* 70: 4274-4279.
- Pullen N, Pickford AR, Perry M, Jaworski D, Loveson KF, Arthur D, Holliday J, Meter T, Peckham R, Younas W, et al. (2018) *Current insights into matrix metalloproteinases and glioma progression: transcending the degradation boundary.*
- Qin Z, Feng J, Liu Y, Deng LL et Lu C (2016) PDGF-D promotes dermal fibroblast invasion in 3-dimensional extracellular matrix via Snail-mediated MT1-MMP upregulation. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 37: 591-599.

- Rajaratnam V, Islam MM, Yang M, Slaby R, Ramirez HM et Mirza SP (2020) Glioblastoma: Pathogenesis and Current Status of Chemotherapy and Other Novel Treatments. *Cancers (Basel)* 12:
- Ray SK et Ray SK (2010) *Glioblastoma : molecular mechanisms of pathogenesis and current therapeutic strategies*. Springer, Dordrecht.
- Renner DN, Malo CS, Jin F, Parney IF, Pavelko KD et Johnson AJ (2016) Improved Treatment Efficacy of Antiangiogenic Therapy when Combined with Picornavirus Vaccination in the GL261 Glioma Model. *Neurotherapeutics* 13: 226-236.
- Riemenschneider MJ, Jeuken JW, Wesseling P et Reifenberger G (2010) Molecular diagnostics of gliomas: state of the art. *Acta Neuropathol* 120: 567-584.
- Robert J (2010) *Signalisation cellulaire et cancer : un manuel pour les étudiants et les oncologues*. Springer, Paris.
- Ruddon RW (2007) *Cancer biology*. Oxford University Press, Oxford ;.
- Sakr M, Takino T, Sabit H, Nakada M, Li Z et Sato H (2016) MiR-150-5p and miR-133a suppress glioma cell proliferation and migration through targeting membrane-type-1 matrix metalloproteinase. *Gene* 587:
- Sanson M (2007) Place de la chimiothérapie dans les gliomes de haut grade. *La Lettre du Neurologue* XI: 1-3.
- Sarkar FH et Li Y-w (2007) Targeting multiple signal pathways by chemopreventive agents for cancer prevention and therapy. *Acta Pharmacologica Sinica* 28: 1305-1315.
- Sato Y, Nakatsuka H, Watanabe T, Hisamichi S, Shimizu H, Fujisaku S, Ichinowatari Y, Ida Y, Suda S, Kato K, et al. (1989) Possible contribution of green tea drinking habits to the prevention of stroke. *Tohoku J Exp Med* 157: 337-343.
- Scheau C, Badarau IA, Costache R, Caruntu C, Mihai GL, Didilescu AC, Constantin C et Neagu M (2019) The Role of Matrix Metalloproteinases in the Epithelial-Mesenchymal Transition of Hepatocellular Carcinoma. *Anal Cell Pathol (Amst)* 2019: 9423907.
- Scott LE, Weinberg SH et Lemmon CA (2019) Mechanochemical Signaling of the Extracellular Matrix in Epithelial-Mesenchymal Transition. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 7:
- Seebacher NA, Stacy AE, Porter GM et Merlot AM (2019) Clinical development of targeted and immune based anti-cancer therapies. *J Exp Clin Cancer Res* 38: 156.

- Sheehy S et Annabi B (2017) A Transcriptional Regulatory Role for the Membrane Type-1 Matrix Metalloproteinase in Carcinogen-Induced Inflammasome Gene Expression. *Gene Regul Syst Bio* 11: 1177625017713996.
- Shields MA, Dangi-Garimella S, Krantz SB, Bentrem DJ et Munshi HG (2011) Pancreatic cancer cells respond to type I collagen by inducing snail expression to promote membrane type 1 matrix metalloproteinase-dependent collagen invasion. *J Biol Chem* 286: 10495-10504.
- Shirakami Y et Shimizu M (2018) Possible Mechanisms of Green Tea and Its Constituents against Cancer. *Molecules* 23:
- Simon JM, Toubiana T, Lang P, Taillibert S et Mazon JJ (2005) [Radiotherapy for glioblastomas: from radiobiology to concomitant chemotherapy]. *Cancer Radiother* 9: 322-331.
- Sina A, Proulx-Bonneau S, Roy A, Poliquin L, Cao J et Annabi B (2010) The lectin concanavalin-A signals MT1-MMP catalytic independent induction of COX-2 through an IKKgamma/NF-kappaB-dependent pathway. *J Cell Commun Signal* 4: 31-38.
- Singh BN, Shankar S et Srivastava RK (2011) Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications. *Biochem Pharmacol* 82: 1807-1821.
- Sirvent A, Urbach S et Roche S (2014) [Analysis of oncogenic signaling induced by tyrosine kinases in tumors by SILAC-based quantitative proteomic approach]. *Med Sci (Paris)* 30: 558-566.
- Strongin AY (2010) Proteolytic and non-proteolytic roles of membrane type-1 matrix metalloproteinase in malignancy. *Biochim Biophys Acta* 1803: 133-141.
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, et al. (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352: 987-996.
- Sun B, Fang Y, Li Z, Chen Z et Xiang J (2015a) Role of cellular cytoskeleton in epithelial-mesenchymal transition process during cancer progression (Review). *Biomed Rep* 3: 603-610.
- Sun J et Stathopoulos A (2018) FGF controls epithelial-mesenchymal transitions during gastrulation by regulating cell division and apicobasal polarity. *Development* 145:

- Sun L, Diamond ME, Ottaviano AJ, Joseph MJ, Ananthanarayan V et Munshi HG (2008) Transforming Growth Factor- β 1 Promotes Matrix Metalloproteinase-9–Mediated Oral Cancer Invasion through Snail Expression. *Molecular Cancer Research* 6: 10-20.
- Sun L, Lin P, Qin Z, Liu Y, Deng LL et Lu C (2015b) Hypoxia promotes HO-8910PM ovarian cancer cell invasion via Snail-mediated MT1-MMP upregulation. *Exp Biol Med (Maywood)* 240: 1434-1445.
- Sung JY, Shin HT, Sohn KA, Shin SY, Park WY et Joung JG (2019) Assessment of intratumoral heterogeneity with mutations and gene expression profiles. *PLoS One* 14: e0219682.
- Suvà ML et Tirosh I (2020) The Glioma Stem Cell Model in the Era of Single-Cell Genomics. *Cancer Cell* 37: 630-636.
- Tabuchi M, Hayakawa S, Honda E, Ooshima K, Itoh T, Yoshida K, Park A-M, Higashino H, Isemura M et Munakata H (2013) Epigallocatechin-3-gallate suppresses transforming growth factor-beta signaling by interacting with the transforming growth factor-beta type II receptor. *World Journal of Experimental Medicine* 3: 100.
- Tachibana H, Koga K, Fujimura Y et Yamada K (2004) A receptor for green tea polyphenol EGCG. *Nature Structural & Molecular Biology* 11: 380-381.
- Tan AC, Ashley DM, López GY, Malinzak M, Friedman HS et Khasraw M (2020) Management of glioblastoma: State of the art and future directions. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 70: 299-312.
- Tang SN, Fu J, Shankar S et Srivastava RK (2012) EGCG enhances the therapeutic potential of gemcitabine and CP690550 by inhibiting STAT3 signaling pathway in human pancreatic cancer. *PloS one* 7: e31067.
- Tao C, Huang K, Shi J, Hu Q, Li K et Zhu X (2020) Genomics and Prognosis Analysis of Epithelial-Mesenchymal Transition in Glioma. *Front Oncol* 10: 183.
- Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C, Ostrom QT, Lightner DD, Barnholtz-Sloan JS et Villano JL (2014) Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 23: 1985-1996.
- Théret N, Lehti K, Musso O et Clément B (1999) MMP2 activation by collagen I and concanavalin A in cultured human hepatic stellate cells. *Hepatology* 30: 462-468.
- Thiery JP, Acloque H, Huang YJR et Nieto MA (2009) Transitions épithéliales-mésenchymateuses dans le développement et la maladie. *cell* 139: 871-890.

- Traiffort E et Ferent J (2015) Cellules souches neurales et signalisation Notch. *Med Sci (Paris)* 31: 1115-1125.
- Tsimberidou AM (2015) Targeted therapy in cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 76: 1113-1132.
- Tsubakihara Y et Moustakas A (2018) Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis under the Control of Transforming Growth Factor β . *Int J Mol Sci* 19:
- Turunen SP, Tatti-Bugaeva O et Lehti K (2017) Membrane-type matrix metalloproteases as diverse effectors of cancer progression. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1864: 1974-1988.
- Ulasov I, Yi R, Guo D, Sarvaiya P et Cobbs C (2014) The emerging role of MMP14 in brain tumorigenesis and future therapeutics. *Biochim Biophys Acta* 1846: 113-120.
- Valacca C, Tassone E et Mignatti P (2015) TIMP-2 Interaction with MT1-MMP Activates the AKT Pathway and Protects Tumor Cells from Apoptosis. *PLOS ONE* 10: e0136797.
- Vaquerizas JM, Kummerfeld SK, Teichmann SA et Luscombe NM (2009) A census of human transcription factors: function, expression and evolution. *Nat Rev Genet* 10: 252-263.
- Ventura E, Weller M, Macnair W, Eschbach K, Beisel C, Cordazzo C, Claassen M, Zardi L et Burghardt I (2018) TGF- β induces oncofetal fibronectin that, in turn, modulates TGF- β superfamily signaling in endothelial cells. *Journal of Cell Science* 131:
- Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP, et al. (2010) Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 17: 98-110.
- Verreault M, Delattre J-Y et Idhah A (2012) Les tumeurs gliales diffuses de l'adulte. *Med Sci (Paris)* 28: 813-816.
- Vincent T, Neve EP, Johnson JR, Kukalev A, Rojo F, Albanell J, Pietras K, Virtanen I, Philipson L, Leopold PL, et al. (2009) A SNAIL1-SMAD3/4 transcriptional repressor complex promotes TGF-beta mediated epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol* 11: 943-950.
- Vleeschouwer Sd (2017) *Glioblastoma*. Codon Publications, Brisbane, Australia.
- Vu A, Kottom T, Schaefbauer K et Limper A (2019) NINTEDANIB AND GREEN TEA EXTRACTS (ELLAGIC ACID AND EPIGALLOCATECHIN GALLATE): A COST-EFFECTIVE,

COMBINATION THERAPY TO REDUCE PULMONARY FIBROSIS IN HUMAN TGF-BETA STIMULATED FIBROBLASTS. *CHEST* 156: A1136.

Wang Q et Margolis B (2007) omplexes jonctionnels apicaux et polarité cellulaire. *CRITIQUE* 72: 1448-1458.

Wang Y, Ren X, Deng C, Yang L, Yan E, Guo T, Li Y et Xu MX (2013) Mechanism of the inhibition of the STAT3 signaling pathway by EGCG. *Oncol Rep* 30: 2691-2696.

Wang YC et Bachrach U (2002) The specific anti-cancer activity of green tea (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG). *Amino Acids* 22: 131-143.

Wei J, Ma L, Li C, Pierson CR, Finlay JL et Lin J (2019) Targeting Upstream Kinases of STAT3 in Human Medulloblastoma Cells. *Curr Cancer Drug Targets* 19: 571-582.

Weller M (2011) Novel diagnostic and therapeutic approaches to malignant glioma. *Swiss Med Wkly* 141: w13210.

Whipple RA, Matrone MA, Cho EH, Balzer EM, Vitolo MI, Yoon JR, Ioffe OB, Tuttle KC, Yang J et Martin SS (2010) Epithelial-to-Mesenchymal Transition Promotes Tubulin Detyrosination and Microtentacles that Enhance Endothelial Engagement. *Cancer Research* 70: 8127-8137.

Wingender E, Schoeps T, Haubrock M et Dönitz J (2015) TFClass: a classification of human transcription factors and their rodent orthologs. *Nucleic Acids Res* 43: D97-102.

Wood MD, Halfpenny AM et Moore SR (2019) Applications of molecular neuro-oncology - a review of diffuse glioma integrated diagnosis and emerging molecular entities. *Diagn Pathol* 14: 29.

Wrana JL (2013) Signaling by the TGF β superfamily. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5: a011197.

Wu Y et Zhou BP (2010) Snail: More than EMT. *Cell Adh Migr* 4: 199-203.

Yan Z, Zhong Y, Duan Y, Chen Q et Li F (2020) Antioxidant mechanism of tea polyphenols and its impact on health benefits. *Animal Nutrition* 6: 115-123.

Yang B, Gao P, Wu X, Yu J, Li Y, Meng R, Li Y, Yan J et Jin X (2017) Epigallocatechin-3-gallate attenuates neointimal hyperplasia in a rat model of carotid artery injury by inhibition of high mobility group box 1 expression. *Exp Ther Med* 14: 1975-1982.

Yang H, Wang L, Zhao J, Chen Y, Lei Z, Liu X, Xia W, Guo L et Zhang HT (2015) TGF- β -activated SMAD3/4 complex transcriptionally upregulates N-cadherin expression in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 87: 249-257.

- Yao M, Li S, Wu X, Diao S, Zhang G, He H, Bian L et Lu Y (2018) Cellular origin of glioblastoma and its implication in precision therapy. *Cell Mol Immunol* 15: 737-739.
- Yu M, Sato H, Seiki M et Thompson EW (1995) Complex Regulation of Membrane-Type Matrix Metalloproteinase Expression and Matrix Metalloproteinase-2 Activation by Concanavalin A in MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cells. *Cancer Research* 55: 3272-3277.
- Yuan J, Levitin HM, Frattini V, Bush EC, Boyett DM, Samanamud J, Ceccarelli M, Dovas A, Zanazzi G, Canoll P, et al. (2018) Single-cell transcriptome analysis of lineage diversity in high-grade glioma. *Genome Medicine* 10: 57.
- Yumei F, Zhou Y, Zheng S et Chen A (2006) The antifibrogenic effect of (–)-epigallocatechin gallate results from the induction of de novo synthesis of glutathione in passaged rat hepatic stellate cells. *Laboratory Investigation* 86: 697-709.
- Zeisberg M et Neilson EG (2009) Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *The Journal of Clinical Investigation* 119: 1429-1437.
- Zhang J, Zhang X, Li Z, Wang Q, Shi Y, Jiang X et Sun X (2021) The miR-124-3p/Neuropilin-1 Axis Contributes to the Proliferation and Metastasis of Triple-Negative Breast Cancer Cells and Co-Activates the TGF- β Pathway. *Frontiers in Oncology* 11:
- Zhang YE (2009) Non-Smad pathways in TGF- β signaling. *Cell Research* 19: 128-139.
- Zhao X, Yu D, Yang J, Xue K, Liu Y et Jin C (2017) Knockdown of Snail inhibits epithelial-mesenchymal transition of human laryngeal squamous cell carcinoma Hep-2 cells through the vitamin D receptor signaling pathway. *Biochem Cell Biol* 95: 672-678.
- Zhou Y, Sun Y, Hou W, Ma L, Tao Y, Li D, Xu C, Bao J et Fan W (2020a) The JAK2/STAT3 pathway inhibitor, AG490, suppresses the abnormal behavior of keloid fibroblasts in vitro. *Int J Mol Med* 46: 191-200.
- Zhou Y, Wu C, Lu G, Hu Z, Chen Q et Du X (2020b) FGF/FGFR signaling pathway involved resistance in various cancer types. *Journal of Cancer* 11: 2000-2007.
- Zong H, Verhaak RG et Canoll P (2012) The cellular origin for malignant glioma and prospects for clinical advancements. *Expert Rev Mol Diagn* 12: 383-394.