

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

RÔLE DE LA MT1-MMP DANS LA RÉGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DES  
MARQUEURS DE L'INFLAMMATION TUMORALE

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR

SAMUEL SHEEHY

OCTOBRE 2016

## UNIVERSITÉ DU QUÉBEC A 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.01-2006). 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

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le professeur Borhane Annabi, qui m'a donné la chance de faire partie de son équipe de recherche, et qui m'a apporté soutien et conseils lors des dernières années, me permettant d'avancer et de toujours acquérir de nouvelles connaissances tout au long de mon projet de maîtrise.

Je souhaite aussi remercier l'équipe de la Chaire en Prévention et Traitement du Cancer, soit la Dre. Sylvie Lamy, qui a toujours su répondre à mes questions, et Julie Poirier, qui m'a initié à plusieurs techniques et expérimentations dans le laboratoire. Je remercie aussi Amélie Vézina, Jonathan Pratt et Alain Zgheib qui m'ont aussi beaucoup aidé au niveau des techniques utilisées en laboratoire.

Finalement, je remercie le reste de l'équipe de laboratoire : Annie Levert, Dr Cyndia Charfi, Dr David Beauchemin, Amira Ouanouki, Djahida Djerir, Clémence Bensiali, Samuel Burke-Nanni, Pascale Gagné, Evelyne Muhire, et Bayader Annabi, pour l'ambiance générale du laboratoire et le plaisir que j'ai eu à y travailler pendant ces années.

## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES .....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES .....	viii
RÉSUMÉ .....	x
CHAPITRE I	
INTRODUCTION .....	1
1.1 Le cancer .....	1
1.1.1 Généralités.....	1
1.1.2 Fibrosarcomes .....	2
1.2 Inflammation.....	3
1.2.1 Cancer et inflammation .....	3
1.2.2 Voie NF- $\kappa$ B.....	4
1.2.3 Voie JAK-STAT.....	6
1.2.4 Cytokines.....	7
1.2.5 Cyclooxygénase-2 .....	8
1.2.6 Facteurs de transcription.....	9
1.2.7 Famille des ETS .....	12
1.3 Métalloprotéinases matricielles.....	13
1.3.1 Classes et structures.....	13
1.3.2 Fonctions .....	15
1.3.3 Rôles dans la progression tumorale.....	15
1.4 MT1-MMP.....	16
1.4.1 Structure.....	16
1.4.2 Fonctions .....	16

1.4.3	MT1-MMP et inflammation .....	17
CHAPITRE II		
	PROJET DE RECHERCHE .....	18
2.1.	Hypothèses .....	18
2.2	Objectifs du travail.....	18
CHAPITRE III		
	A ROLE FOR THE MEMBRANE TYPE-1 MATRIX METALLOPROTEINASE IN THE TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF CARCINOGEN-INDUCED INFLAMMASOME COMPONENTS .....	20
	Abstract.....	22
	Introduction.....	23
	Materials and methods .....	25
	Results.....	29
	Discussion.....	32
	Acknowledgements.....	35
	References.....	36
	Tables.....	45
	Figures.....	46
CHAPITRE IV		
	RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES.....	53
CHAPITRE V		
	DISCUSSION.....	54
	RÉFÉRENCES .....	62

## LISTE DES FIGURES

Figures	Page
1.1. L'activation de NF- $\kappa$ B par la voie canonique .....	5
1.2. Mécanisme d'activation d'EGR1 .....	11
1.3. Structure et domaines des métalloprotéinases matricielles.....	14
1.4. Structure des différentes métalloprotéinases membranaires.....	16
3.1.PMA triggers Erk, p105 and I $\kappa$ B transient phosphorylation in HT1080 fibrosarcoma cells.....	46
3.2. MT1-MMP gene silencing abrogates PMA-induced Erk, p105 and I $\kappa$ B phosphorylation in HT1080 fibrosarcoma cells.....	47
3.3. Stimulatory and repressive regulatory impact on transcription factors transcription upon MT1-MMP gene silencing in PMA-stimulated HT1080 fibrosarcoma cells.....	48
3.4. Stimulatory and repressive regulatory impact on inflammasome-related transcription upon MT1-MMP gene silencing in PMA-stimulated HT1080 fibrosarcoma cells.....	49
3.5. Evidence and validation of MT1-MMP requirement in PMA-induced inflammasome-related transcription.....	50
3.6. Evidence and validation of MT1-MMP requirement in PMA-induced transcription factors transcription.....	51
3.7.MT1-MMP gene silencing abrogates PMA-induced MMP-9 expression and function in HT1080 fibrosarcoma cells.....	52
4.1. Niveaux d'expression génique des biomarqueurs inflammatoires et de facteurs de transcription suite à la surexpression de formes recombinantes de MT1-MMP.....	53

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
3.1. Suppressive transcriptional role of MT1-MMP silencing in PMA-treated cells.....	45

## LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

AA	Acide arachidonique
ADN	Acide désoxyribonucléique
AKT (PKB)	Protéine kinase B
ARN	Acide ribonucléique
CEBP	<i>CCAAT/enhancer-binding protein</i>
ConA	Concanavaline A
COX-2	Cyclooxygénase-2
CSF-1	<i>Colony stimulating factor-1</i>
EGF	<i>Endothelial growth factor</i>
EGR1	<i>Early growth response protein 1</i>
ETS	<i>E26 transformation-specific</i>
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>
HIF-1 $\alpha$	<i>Hypoxia-inducible factor 1<math>\alpha</math></i>
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
I $\kappa$ B	<i><math>\kappa</math>B inhibitor</i>
IKK	<i>I<math>\kappa</math>B kinase</i>
IL	Interleukine
JAK	<i>Janus kinase</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MCP1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
MEC	Matrice extracellulaire
MMP	Métalloprotéinase matricielle
MSC	<i>Mesenchymal stem cell</i>
MT1-MMP	MMP membranaire de type 1
NEMO	<i>NF-<math>\kappa</math>B essential modulator</i>
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor- kappa B</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandine E2
PKC	Protéine kinase C



PMA	Phorbol 12-myristate-13-acetate
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
siRNA	ARN interférant
STAT3	<i>Signal transducers and activators of transcription 3</i>
TEM	Transition épithélio-mésenchymateuse
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor-<math>\beta</math></i>
TNF	Facteur de nécrose tumorale
uPA	<i>Urokinase-type plasminogen activator</i>
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i>
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VEGFR2	VEGF <i>receptor 2</i>

## RÉSUMÉ

La métalloprotéinase membranaire 1 (MT1-MMP), surexprimée au sein des foyers tumoraux, est impliquée dans plusieurs processus biologiques et régule de nombreuses fonctions cellulaires clés dans la progression tumorale telles que la prolifération, la migration ainsi que l'angiogénèse. Elle joue un rôle important dans ces mécanismes via son action en tant que protéase dans le remodelage de la matrice extracellulaire (MEC), mais de plus en plus d'études démontrent son implication dans la signalisation intracellulaire. De plus, de récentes découvertes ont démontré que la MT1-MMP régulerait aussi des voies de signalisation liées aux mécanismes d'inflammation, une caractéristique importante dans la progression de cancers, mais dont les mécanismes demeurent peu connus.

Ainsi, notre étude avait pour but d'élucider le niveau d'implication moléculaire de la MT1-MMP dans la régulation de biomarqueurs inflammatoires dans un modèle cellulaire humain de fibrosarcomes HT1080. Pour ce faire, nous avons utilisé le *phorbol 12-myristate-13-acetate* (PMA), un ester de phorbol et activateur de la protéine kinase C (PKC) pour induire l'expression des biomarqueurs inflammatoires, et combiné ces traitements *in vitro* avec une méthode d'ARN interférant (siRNA) de façon à réprimer l'expression génique de MT1-MMP. Par une méthode de criblage génique (*gene array*) nous avons démontré, en premier lieu, que la répression de MT1-MMP provoque une inhibition dans l'induction transcriptionnelle par le PMA de plusieurs biomarqueurs inflammatoires tels que COX-2, IL-6 et IL-1 $\beta$ , ainsi que de nombreux facteurs de transcription impliqués dans des voies de signalisation liées à l'inflammation.

Nous avons ensuite démontré que la répression génique de la MT1-MMP provoque une baisse des niveaux d'activation de protéines de signalisation, notamment NF- $\kappa$ B et I $\kappa$ B, impliquées dans la régulation des biomarqueurs inflammatoires précédemment criblés. Finalement, la surexpression de 2 formes recombinantes de MT1-MMP, une forme sauvage et une forme tronquée de sa portion cytoplasmique, nous a permis de confirmer que l'expression de IL-1 $\beta$  est corrélée avec celle de MT1-MMP, tandis que l'expression d'autres biomarqueurs comme COX-2 et IL-6 semble inhibée lors de la surexpression de la forme complète de MT1-MMP.

Ces résultats tendent à démontrer que la MT1-MMP joue un rôle significatif dans l'activation de voies de signalisation liées à l'inflammation, et que certains mécanismes lui permettent de réguler la transcription de biomarqueurs inflammatoires et dépendent de sa portion intracellulaire. Ceci pave la voie au développement de stratégies de ciblage pharmacologiques des fonctions signalétiques de MT1-MMP dans les processus pro-inflammatoires liés au développement tumoral.

Mots-clés : MT1-MMP, COX-2, IL-1 $\beta$ , NF- $\kappa$ B, PMA, fibrosarcomes, inflammation, cancer.

## CHAPITRE I

### INTRODUCTION

#### 1.1 Le cancer

##### 1.1.1 Généralités

Le cancer est une maladie répandue partout dans le monde, causée par des changements dans les niveaux d'expression de gènes régulant entre autres la prolifération et la survie cellulaire, menant à la formation d'une population cellulaire ayant la capacité d'échapper au système immunitaire et, ultimement, la formation de métastases (Ruddon, 2007). Il existe une panoplie de types de cancers, mais ceux-ci sont tous caractérisés par certaines capacités acquises par les cellules, capacités qui ont été décrites par Hanahan et Weinberg, résultant en une croissance tumorale, et, ultimement, à la formation de métastases (Hanahan & Weinberg, 2011). Ces caractéristiques fondamentales sont : le maintien d'un signal pro-prolifératif, l'évasion aux signaux suppresseurs de croissance, l'évasion à la destruction par le système immunitaire, la résistance à l'apoptose, l'immortalité répllicative, l'activation de l'invasion et la formation de métastases, l'induction de l'angiogénèse, l'instabilité du génome et mutations, la dérégulation des processus énergétiques cellulaires, et finalement, la présence d'un environnement inflammatoire favorable à la progression tumorale (Bailón-Moscoso, Romero-Benavides, & Ostrosky-Wegman, 2014).

La recherche sur le cancer est basée sur beaucoup d'études *in vitro*, utilisant des cultures de cellules cancéreuses, permettant d'étudier les propriétés et mécanismes cellulaires de façon plus pratique et moins coûteuse que les modèles *in vivo*. Le choix d'un modèle cellulaire pour une étude précise est fait en fonction des besoins de l'étude, de façon à obtenir des résultats pertinents et reproductibles. Ainsi, pour notre étude, nous avons besoin d'une lignée cellulaire transfectable, exprimant la MT1-MMP et les biomarqueurs inflammatoires à des niveaux détectables, et traitables au PMA. La lignée de fibrosarcomes HT1080 convenait à ces exigences, car celle-ci est facilement transfectable, exprime des niveaux détectables de

MT1-MMP et répond aux traitements au PMA, notamment par une augmentation de la sécrétion de MMP-9 (Toufaily & al., 2014), et de l'activation de MMP-2 par l'entremise de MT1-MMP et l'activation de la voie NF- $\kappa$ B (Park, Kim, Oh, & Chung, 2007).

### 1.1.2 Fibrosarcomes

Le fibrosarcome humain est une tumeur maligne composée de cellules fibroblastes et qui se développe dans les tissus mous, principalement aux niveaux du tronc, de la tête, du cou et des extrémités (Fletcher, Unni, & Mertens, 2002). La tumeur consiste en une masse ferme, due à la composition en collagène, qui est produit en concentrations variables, de couleur blanche ou beige, et qui peut être douloureuse ou non, dépendamment des cas (Fletcher et al., 2002). Certaines tumeurs de hauts grades peuvent présenter des symptômes de nécrose ou d'hémorragie. Le pronostic est variable et dépend du grade et de la taille et profondeur de la tumeur (Fletcher et al., 2002). Un mauvais pronostic est principalement lié à des tumeurs ayant un haut grade, une grande densité cellulaire et un bas niveau de collagène, la présence de nécrose, ainsi qu'à un compte mitotique (grade histopronostic d'Elston-Ellis) excédant 20 pour 10 champs : cela correspond au nombre de mitoses observées au microscope sur différents champs, provenant d'échantillons de la tumeur. (Fletcher et al., 2002). Les fibrosarcomes peuvent métastaser aux niveaux des poumons et des os du squelette axial. Les fibroblastes qui composent le fibrosarcome présentent un réticulum endoplasmique rugueux proéminent ainsi qu'une absence de myofilaments, de lamina externe ou de jonctions intercellulaires (Fletcher et al., 2002). La lignée cellulaire HT1080 utilisée en laboratoire pour les études *in vitro* est dérivée d'un fibrosarcome obtenu par une biopsie effectuée en 1972 d'un homme caucasien de 35 ans n'ayant pas reçu de traitement de chimiothérapie ou de radiothérapie. Les symptômes cliniques présentaient des évidences de métastase tumorale, et le diagnostic histopathologique de la biopsie consistait d'un fibrosarcome peu différencié, comportant principalement des cellules tumorales allongées, avec peu de stroma intercellulaire, des noyaux larges et pléomorphiques, et présentant un haut niveau de mitoses (Rasheed, Nelson-Rees, Toth, Arnstein, & Gardner, 1974).

Tel que mentionné plus haut, plusieurs conditions sont nécessaires à l'acquisition d'un phénotype tumoral par les cellules, dont la présence d'un microenvironnement inflammatoire (Hanahan et Weinberg, 2011). En effet, il est estimé que 20% de tous les cas de mortalité par le cancer sont liés à des infections chroniques et à l'inflammation (Porta et al., 2009), marquant ainsi l'importance d'un tel microenvironnement sur la progression tumorale.

## 1.2 Inflammation

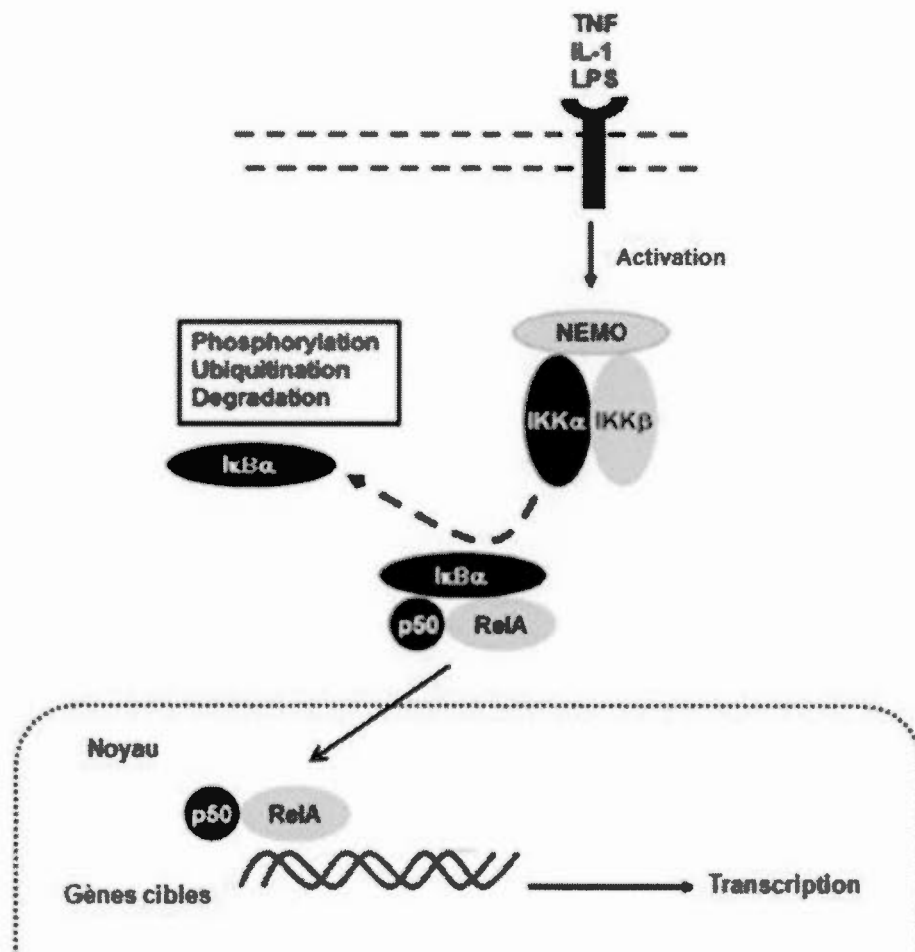
### 1.2.1 Cancer et inflammation

La principale fonction de l'inflammation, qui consiste en un mécanisme adaptatif, est de supprimer rapidement une source de perturbation qui peut être causée entre autres par une infection bactérienne, une brûlure ou une réaction allergique, de façon à restaurer l'homéostasie dans l'organisme (Serhan, Ward, & Gilroy, 2010). Par contre, un dérèglement de ce mécanisme peut mener à des pathologies, dont le cancer, car un dérèglement dans la réponse inflammatoire mène à la libération de cytokines pro-inflammatoires et immunorégulatrices, ce qui procure un microenvironnement favorable à la progression tumorale et la transformation maligne (Fernandes et al., 2015). Un tel dérèglement peut aussi mener à des altérations dans l'expression de gènes liés au cancer, ainsi qu'à des modifications post-traductionnelles de protéines impliquées dans la réparation de l'ADN, l'apoptose et la prolifération cellulaire, favorisant ainsi l'acquisition d'un profil tumoral par les cellules affectées (Fernandes et al., 2015). Le dérèglement du cycle cellulaire peut aussi être causé par un dérèglement dans les voies de signalisation dû au dommage à l'ADN suite à l'exposition des cellules à des espèces réactives à l'oxygène (*ROS*) libérées suite au stress oxydatif causé par une réponse inflammatoire prolongée (Fernandes et al., 2015). Il existe deux modèles qui font le lien entre l'inflammation chronique et le cancer, soient les modèles des voies intrinsèque et extrinsèque (Chai, Siveen, Shanmugam, Arfuso, & Sethi, 2015). Selon le modèle de voie intrinsèque, l'expression inappropriée de certains gènes est causée par des dommages à l'ADN, une instabilité chromosomale et des altérations épigénétiques, tandis que selon le modèle de voie extrinsèque est représenté par des signaux inflammatoires soutenus suite à des infections ou des maladies auto-immunes. Ces deux voies activent

plusieurs facteurs de transcription tels que NF- $\kappa$ B, HIF-1 $\alpha$  et STAT3, et des voies de signalisation telles que JAK et MAPK qui vont ultimement mener à des cascades pro-inflammatoires promouvant la prolifération cellulaire, l'invasion et l'angiogénèse ainsi qu'à une résistance à l'apoptose, le tout permettant l'acquisition d'un phénotype tumoral au niveau cellulaire (Chai et al., 2015). Ainsi, la régulation transcriptionnelle des gènes régulés par les voies NF- $\kappa$ B et JAK/STAT3, visées dans ce projet, est importante pour faire la corrélation entre les mécanismes pro-inflammatoires et la progression tumorale.

### 1.2.2 Voie NF- $\kappa$ B

La voie NF- $\kappa$ B est un régulateur important dans les mécanismes inflammatoires et peut être activée en réponse à différents stimuli tels que les produits d'une infection bactérienne (lipopolysaccharides) ou virale (ARN simple brin, double brin, etc.), l'irradiation aux rayons UV ou la présence d'espèces réactives à l'oxygène (Xia, Shen, & Verma, 2014). Elle peut aussi être activée lors de la reconnaissance de signaux incluant des cytokines comme TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$  ou des facteurs de croissance (Xia et al., 2014). NF- $\kappa$ B constitue une famille de cinq facteurs de transcription : NF- $\kappa$ B1/p105 (ou la forme mature p50), NF- $\kappa$ B2/p100 (ou la forme mature p52), RelA/p65, RelB et c-Rel. Ceux-ci peuvent former différents homodimères ou hétérodimères qui vont se lier à l'ADN sur des séquences promotrices de gènes liés à l'inflammation et l'immunité. La stimulation de cette voie se fait de façon canonique via l'activation d'un complexe protéique IKK, constitué de IKK $\alpha$ , IKK2/IKK $\beta$  et NEMO/IKK $\gamma$ , qui va phosphoryler l'inhibiteur de  $\kappa$ B (I $\kappa$ B), le marquant ainsi pour la dégradation par le complexe protéosomal. Ainsi, les dimères de NF- $\kappa$ B sont libérés et transloquent vers le noyau où ils pourront se fixer à une séquence d'ADN de façon à réguler l'expression transcriptionnelle des gènes de l'inflammation (figure 1.1) (Xia et al., 2014).



**Figure 1.1. L'activation de NF-κB par la voie canonique.** La fixation des ligands au récepteur mène au recrutement d'un complexe IKK constitué de NEMO, IKKα et IKKβ, menant à la phosphorylation et la dégradation d'Iκβ, permettant la translocation des sous-unités de NF-κB au noyau, et l'activation de la transcription des gènes cibles (Adapté de Cho & Yu, 2012).

NF-κB joue un rôle, à différents niveaux, dans les cancers liés à une inflammation chronique. En effet, un niveau élevé d'activation de NF-κB cause une accumulation de cytokines pro-inflammatoires dans les tissus affectés, telles que TNFα, IL-17 et IL-1, qui sont aussi pro-

tumorigéniques (Xia et al., 2014). Ces cytokines peuvent aussi moduler les voies IL-6/STAT3, causant une rétroaction positive sur l'activation de NF- $\kappa$ B (Iliopoulos, Hirsch, & Struhl, 2009), et ce dérèglement peut causer une perte de contrôle de la prolifération cellulaire, une caractéristique importante de l'initiation tumorale, via la régulation des gènes des protéines responsables du cycle cellulaire et de voies anti-apoptotiques (Chai et al., 2015). De plus, NF- $\kappa$ B promeut l'angiogénèse car son activation régule de nombreux gènes tels que VEGF, bFGF, IL-18 et MMP-9, et favorise la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), qui est une phase précoce de la formation de métastases (Xia et al., 2014).

### 1.2.3 Voie JAK-STAT

STAT3 fait partie de la famille des protéines STAT qui agissent en tant que facteurs de transcription activés par la kinase JAK. STAT3 est impliquée dans plusieurs processus tumoraux tels que la survie et la prolifération cellulaire, l'immunosuppression et l'angiogénèse, et joue un rôle important dans la progression tumorale liée à l'inflammation. L'interleukine 6 (IL-6) est le principal activateur de STAT3 qui, lorsque fixée à son récepteur (IL-6R $\alpha$ ), mène à l'activation des JAKs, qui vont à leur tour phosphoryler et activer les STAT3 cytosoliques, causant leur translocation vers le noyau (Yu, Lee, Herrmann, Buettner, & Jove, 2014). STAT3 est constitutivement active dans plusieurs cancers et régule l'expression de plusieurs médiateurs dont des cytokines, chimiokines et facteurs de transcription, permettant le maintien d'un environnement inflammatoire favorable à la croissance tumorale et agit en synergie avec NF- $\kappa$ B dans les cellules tumorales pré-néoplasiques et malignes leur permettant d'évader à la surveillance immunitaire de l'organisme en régulant plusieurs mécanismes cellulaires dont l'apoptose, l'angiogénèse et l'invasion tumorale (Fan, Mao, & Yang, 2013). L'interaction entre ces deux voies a été observée dans plusieurs types de cancers dont le colon, l'estomac et le foie (Fernandes et al., 2015). NF- $\kappa$ B et STAT3 interagissent de différentes façons afin de promouvoir la progression tumorale médiée par l'inflammation. En effet, l'activité transcriptionnelle de STAT3 peut être directement affectée par une interaction physique entre des sous-unités de NF- $\kappa$ B comme RelA avec STAT3, induisant des changements de conformation (Fan et al., 2013). Plus indirectement, des cytokines (IL-6 par exemple) induites par NF- $\kappa$ B ou STAT3 peuvent avoir



un effet rétroactif et activer ces mêmes voies à leur tour. Finalement, NF- $\kappa$ B et STAT3, en tant que facteurs de transcription, peuvent se fixer de façon coopérative à des promoteurs, régulant l'expression de gènes cibles importants dans les mécanismes d'angiogénèse et d'hypoxie et de nombreuses cytokines et chimiokines, favorisant la tumorigénèse (Fan et al., 2013).

#### 1.2.4 Cytokines

Les cytokines sont des protéines à faibles poids moléculaires ayant des fonctions liées à la signalisation cellulaire de l'organisme et impliquées dans de nombreux mécanismes en agissant par liaison spécifique à un récepteur. Parmi celles-ci on retrouve les chimiokines, les interleukines, les interférons et le facteur de nécrose tumorale (TNF). Dans le cas de l'inflammation, elles peuvent avoir des effets activateurs ou inhibiteurs sur la réponse immunitaire. En effet, certaines interleukines ayant des propriétés anti-inflammatoires, comme IL-10, lorsque dérégulées, peuvent constituer un microenvironnement favorable à la croissance tumorale (Chai et al., 2015). En conditions normales, IL-10 régule à la baisse l'expression de cytokines pro-inflammatoires, mais il a été démontré que des niveaux élevés de cette cytokine perturbent l'équilibre entre les interleukines pro- et anti-inflammatoires, favorisant la tumorigénèse (Chai et al., 2015). De plus, les interleukines pro-inflammatoires, ainsi que le facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ont été démontrés comme étant des acteurs importants dans le développement tumoral lié à l'inflammation chronique (Fernandes et al., 2015).

Parmi les cytokines pro-inflammatoires liées à la progression tumorale, IL-6 est l'une des plus importantes et est considérée comme un médiateur important dans le lien entre l'inflammation et la formation de cancers (Rath, Billmeier, Waldner, Atreya, & Neurath, 2015). Son implication a été démontrée et des niveaux élevés de cette interleukine ont été détectés dans de nombreux cancers incluant ceux de la peau, du foie, des poumons, du sein, de la prostate, du pancréas, et plusieurs autres. Comme mentionné plus haut, IL-6 est un activateur de la voie JAK/STAT3, qui favorise la prolifération cellulaire en activant l'expression des cyclines tout en inhibant celle de p21, qui est un inhibiteur de Cdk, une

kinase dépendante de la cycline (Chai et al., 2015). En plus de l'activation de STAT3, IL-6 peut promouvoir la progression tumorale en régulant l'expression de gènes pro-carcinogènes tels que cycline D1 et c-myc, qui contribuent à la prolifération cellulaire, mais aussi de gènes favorisant l'angiogénèse, comme VEGF et VEGFR2 (Rath et al., 2015).

Une autre interleukine, dont les niveaux élevés d'expression sont associés à de nombreux cancers, est IL-1 $\beta$ , qui est une cytokine sécrétée seulement suite à un signal pro-inflammatoire (Voronov, Carmi, & Apte, 2014). Son potentiel pro-tumorigène est dû entre autres à sa capacité à réguler le facteur de transcription NF- $\kappa$ B, dont les implications dans la progression tumorale ont été décrites plus haut (Chai et al., 2015). IL-1 $\beta$  supprime aussi l'expression de la protéine p53, qui est un important régulateur de l'apoptose et suppresseur tumoral (Fernandes et al., 2015). De plus, elle induit l'expression de nombreuses chimiokines, cytokines et facteurs angiogéniques tels que VEGF, avec qui elle interagit de façon synergique dans la régulation de gènes pro-inflammatoires et de facteurs de croissance. Finalement, les propriétés pro-angiogéniques et pro-prolifératives de IL-1 $\beta$  sont dues à sa capacité à induire l'expression de chimiokines par les cellules stromales, mais aussi par les cellules tumorales, créant un microenvironnement inflammatoire favorable à la croissance tumorale (Voronov et al., 2014).

Les cytokines et chimiokines produites lors de la réponse inflammatoire enclenchent à leur tour d'autres cascades signalétiques, menant à la production de médiateurs inflammatoires, dont des enzymes, comme la cyclooxygénase-2 (COX-2), jouant un rôle important dans la progression de l'inflammation vers le cancer (Chai et al., 2015).

#### 1.2.5 Cyclooxygénase-2

Certaines enzymes jouent aussi un rôle important dans la progression tumorale liée à l'inflammation. COX-2 est l'enzyme qui catalyse la production de prostaglandines (ex : PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>) à partir de l'acide arachidonique (AA). La présence de COX-2 est indétectable dans la plupart des tissus normaux, mais surexprimée dans plusieurs cancers (Chai et al., 2015). Son expression est induite par des facteurs de croissance, des cytokines ou des

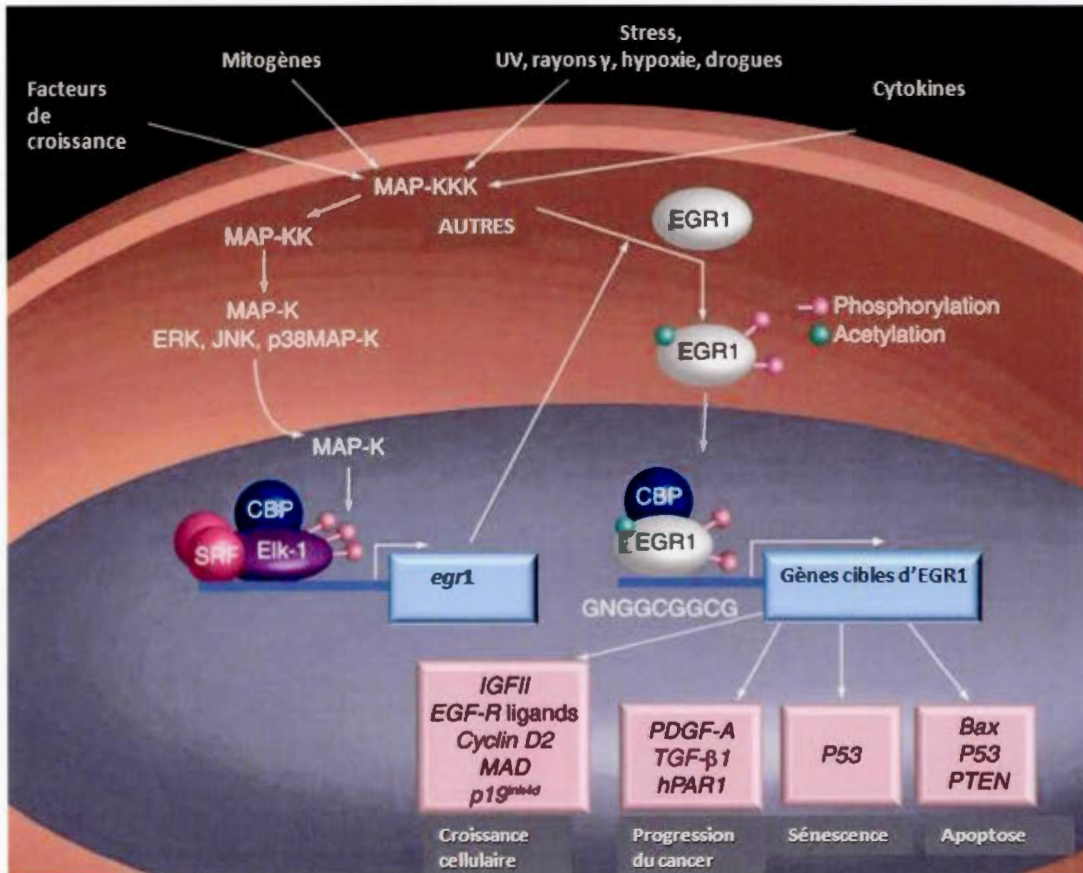
promoteurs tumoraux, suite à un stimulus pro-inflammatoire, et l'activation de facteurs de transcription tels que NF- $\kappa$ B, CEBP ou NF-IL6 (facteur nucléaire de IL-6), qui se lient au promoteur du gène COX-2 (Harris, 2002). De hauts niveaux d'expression de COX-2, et la présence de son produit enzymatique, PGE<sub>2</sub> sont associés au développement tumoral et sont, dans plusieurs cas, responsables d'un faible pronostic et taux de survie (Chai et al., 2015). COX-2 contribue au potentiel pro-angiogénique car elle régule à la hausse l'expression de VEGF, et il a aussi été démontré que son produit, la PGE<sub>2</sub>, agit en synergie avec VEGF dans la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (Hugo, Saunders, Ramsay, & Thompson, 2015). La production de PGE<sub>2</sub> par COX-2 contribue aussi au phénomène d'immunosuppression car cette prostaglandine inhibe l'activation des macrophages, des cellules T et des cellules « *natural killers* », ce qui contribue au microenvironnement favorable à la croissance tumorale (Vendramini-Costa & Carvalho, 2012). L'augmentation des niveaux de PGE<sub>2</sub> augmente aussi la production et la sécrétion des métalloprotéinases (MMPs) par les cellules tumorales, favorisant ainsi la migration cellulaire et l'angiogénèse (Vendramini-Costa & Carvalho, 2012).

#### 1.2.6 Facteurs de transcription

L'acquisition d'un phénotype tumoral par les cellules, leur propagation et leur survie dépendent de la dérégulation de plusieurs gènes : une augmentation de la transcription de gènes pro-tumoraux ainsi qu'une inhibition dans l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs (Vendramini-Costa & Carvalho, 2012). La régulation de la transcription de ces gènes dépend de facteurs de transcription, qui sont des protéines se liant à des séquences spécifiques d'ADN, qui vont contrôler le recrutement de l'ARN polymérase, et ainsi agir en tant qu'activateurs, ou répresseurs (Vendramini-Costa & Carvalho, 2012). Ils peuvent aussi agir en tant que kinases, histone acétyl-transférases ou désacétylases (Vendramini-Costa & Carvalho, 2012). Tel que mentionné plus haut, les facteurs NF- $\kappa$ B et STAT3 sont des médiateurs importants de la progression tumorale liée à l'inflammation. L'activation de ces facteurs de transcription mène à leur relocalisation vers le noyau, où ils se fixent aux promoteurs de leurs gènes cibles, régulant la transcription de nombreux gènes associés au

cycle cellulaire, à la prolifération cellulaire, à l'angiogénèse et à la résistance à l'apoptose (Chai et al., 2015).

L'*early growth response protein 1* (EGR1) est un facteur de transcription important dans la différenciation et la mitogénèse, et a été longtemps décrit comme un gène suppresseur de tumeur et transactivateur du gène de la protéine anti-tumorale p53 (Liu, Rangnekar, Adamson, & Mercola, 1997). Par contre, de récentes études l'ont associé avec la progression du cancer de la prostate (Gitenay & Baron, 2009). EGR1 est induit par différentes cytokines et facteurs de croissance, mais aussi par des stimuli tels que la radiation, certains stress mécaniques, ou des blessures, suite à l'activation de voies de signalisation comme ERK1/2, JNK, p38 MPAK, et NF- $\kappa$ B, et son activation dépend de modifications post-traductionnelles : son acétylation par le co-activateur p300/CBP promeut la survie tandis que sa phosphorylation, causée par un stress cellulaire, mènerait à la mort de la cellule (Gitenay & Baron, 2009). EGR1 peut aussi avoir des propriétés pro-angiogéniques car il a été démontré qu'il active la transcription de MMP-9 (Shin, Kim, Baker, Lim, & Lee, 2010). En effet, *Shin et al.* ont démontré que l'activation transcriptionnelle complète de MMP-9, suite à une stimulation au TNF- $\alpha$ , dépend de la fixation de EGR1 et NF- $\kappa$ B p65 sur son promoteur, et qu'il y a bel et bien une interaction physique entre EGR1 et le promoteur de MMP-9 suite à cette stimulation. De plus, des études ont démontré que, dans le cas du cancer du sein lié à l'inflammation, EGR1 fait partie des 27 gènes les plus significativement surexprimés chez les patients étudiés (Bièche et al., 2004).



**Figure 1.2. Mécanisme d'activation d'EGR1.** L'activation d'EGR1 se fait principalement au niveau transcriptionnel, suite à l'activation de protéines de la famille des MAP kinases (ERK, JNK, et p38), en réponse à différents stimuli extracellulaires comme des facteurs de croissance ou des cytokines. Suite à cette activation, le facteur de transcription Elk-1 s'associe avec la *CREB-binding protein* (CBP) et le *serum response factor* (SRF) pour activer la transcription du gène d'EGR1, qui induit à son tour des gènes cibles, impliqués dans différents processus tels que la croissance cellulaire et l'apoptose (Adapté de Gitenay & Baron, 2009).

### 1.2.7 Famille des ETS

La famille de facteurs de transcription *E26 transformation-specific* (ETS) comporte 27 membres chez l'humain, qui possèdent un domaine hautement conservé de fixation à l'ADN de 84 acides aminés, le domaine ETS (Oliver, Kushwah, & Hu, 2012). Ces facteurs agissent en tant qu'activateurs ou répresseurs dans la régulation de nombreux gènes liés à différents processus biologiques tels que la prolifération cellulaire, la différenciation, l'apoptose, l'hématopoïèse et l'angiogénèse et leur niveau d'activité dépend de modifications post-traductionnelles et de l'interaction avec d'autres facteurs de transcription (Turner, Findlay, Moussa, & Watson, 2007). Le lien entre les niveaux d'expression des membres de la famille de facteurs ETS et la progression tumorale a été démontré dans plusieurs cancers dont ceux du colon, du foie, des poumons, de la prostate, et dans certains carcinomes et leucémies (Seth & Watson, 2005). Certains membres agissent en tant qu'oncogènes (ETS1, ETS2, MYC), et sont surexprimés dans certains cancers, tandis que d'autres sont liés à des propriétés anti-tumorales (PDEF, p53), et sont inhibés dans les mêmes contextes (Turner et al., 2007). Par exemple, ETS1, qui est surexprimé dans le cancer du sein, régule à la hausse l'expression du gène de l'*urokinase plasminogen activator* (uPA), qui joue un rôle important dans l'acquisition d'un phénotype pro-métastatique via la dégradation de la MEC, la prolifération cellulaire, la migration et l'invasion (Turner et al., 2007). L'induction de l'expression de ETS1 se fait par l'exposition à différents stimuli tels que l'angiotensine II (Ang II), le PDGF-BB, l'interleukine IL-1 $\beta$ , ou le TNF- $\alpha$ , et engendre une inflammation vasculaire via la régulation de gènes tels que MCP-1 et VCAM-1 (Oettgen, 2006). De plus, il a été démontré que ETS1 promeut l'invasion cellulaire et l'angiogénèse en induisant l'expression de la MMP-2, via l'augmentation de PGE<sub>2</sub> dans le cancer du pancréas (Ito et al., 2004). Il a aussi été démontré que ETS1 régule de façon positive l'activité du promoteur de COX-2 dans les cellules pancréatiques de type bêta (Zhang, Zhang, Yang, & Han, 2007).

Un autre membre de la famille des ETS, ETS2, est un effecteur de la signalisation liée au CSF-1 (*colony stimulating factor-1*) qui module les fonctions et la survie des macrophages dans les mécanismes d'inflammation. Il a été démontré comme un acteur important dans la

progression tumorale dans le cancer du sein, dans lequel il est surexprimé (Zabuawala et al., 2010).

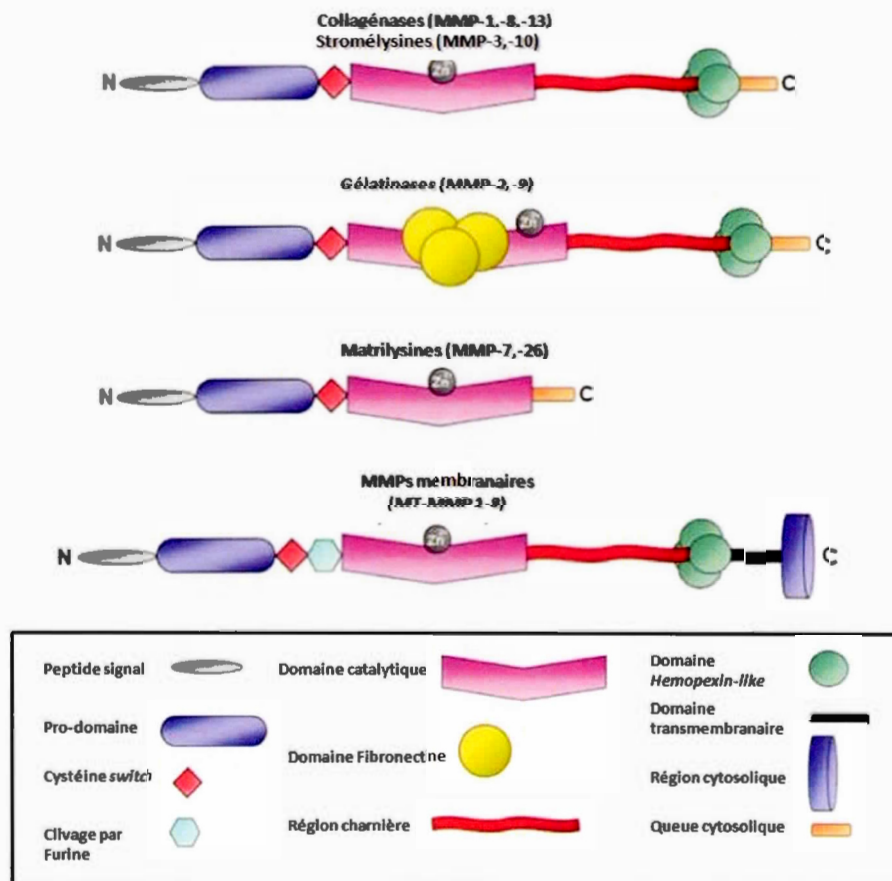
ELK1, lui aussi membre de cette famille, est un facteur de transcription important dans la régulation de processus tels que la prolifération cellulaire, la différenciation et la survie, mais aussi la migration cellulaire, car il régule les gènes de protéines responsables de la dégradation de la MEC grâce à leur activité protéolytique, telles que MMP-2 et MMP-9 (Kasza, 2013b). L'expression génique de ce facteur est régulée entre autres par des protéines importantes dans les mécanismes d'inflammation et la progression de cancers, soient IL-1 $\beta$ , une interleukine pro-inflammatoire, et EGF, un facteur de croissance épidermale (Kasza, 2013a).

### 1.3 Métalloprotéinases matricielles

#### 1.3.1 Classes et structures

Les métalloprotéinases matricielles (MMPs) font partie d'une grande famille d'enzymes, les métalloprotéinases, dont l'activité catalytique est caractérisée par la dépendance à un ion métallique, retrouvé dans leur domaine catalytique. Les MMPs ont comme substrats les composantes de la MEC et catalysent la dégradation de macromolécules telles que les protéines fibreuses et les protéoglycanes (Tauro, McGuire, & Lynch, 2014). Il existe 23 MMPs chez l'humain, dont 17 sont sécrétées et 6 sont membranaires (Tauro et al., 2014), et elles peuvent être classées en différentes catégories, en fonction de leurs différents substrats : les collagénases (MMP-1, MMP-8, MMP-13 et MT1-MMP), les gélatinases (MMP-2 et MMP-9), les stromélysines (MMP-3, MMP-10 et MMP-11) qui dégradent les collagènes de type IV et IX, la laminine, la fibronectine l'élastine et les protéoglycanes et les matrilysines (MMP-7 et MMP-26) (Sagi & Gaffney, 2015). Leur expression et leur activité sont régulées aux niveaux géniques et post-traductionnels : elles sont synthétisées sous forme d'enzymes inactives, possédant un pro-domaine, ultérieurement clivé par d'autres MMPs ou d'autres protéinases, les libérant ainsi sous leur forme active (Tauro et al., 2014).

Les MMPs sont constituées d'un peptide signal et de 4 domaines, soient le pro-domaine N-terminal, le domaine catalytique, la région charnière (*hinge*), la portion C-terminale *hemopexin-like*, ainsi qu'une portion transmembranaire et une petite portion intracytoplasmique dans le cas des MMPs membranaires (MT-MMP) (Figure 1.3). Toutes les MMPs ont aussi un motif de fixation pour l'ion zinc qui leur est caractéristique (HExxHxxGxxH), situé à l'intérieur du domaine catalytique (Sagi & Gaffney, 2015).



**Figure 1.3. Structure et domaines des métalloprotéinases matricielles.** Les différentes métalloprotéinases matricielles possèdent toutes une structure semblable, constituée du peptide signal à l'extrémité N-terminale, le pro-domaine, le domaine *cystéine switch*, le domaine catalytique, la région charnière et le domaine *Hemopexin-like* à l'extrémité C-terminale (Adapté de Gupta, 2012).



### 1.3.2 Fonctions

Les MMPs ont longtemps été reconnues pour leurs fonctions dans le remodelage de la MEC et la dégradation de ses composantes, jouant ainsi un rôle important dans des processus biologiques tels que l'angiogénèse (Sagi & Gaffney, 2015). De nombreuses autres fonctions leur sont aussi attribuées, dont la transformation de molécules comme des cytokines, des chimiokines, des hormones, des molécules d'adhésion, etc. Elles transforment aussi plusieurs substrats présents à la surface cellulaire. En effet, les MMP-2, MMP-9 et MMP-13 peuvent activer le TGF- $\beta$  à la surface cellulaire, régulant ainsi des processus tels que la prolifération cellulaire et la différenciation. Plus récemment, il a aussi été démontré que les MMPs peuvent dégrader ou transformer des substrats intracellulaires, comme des chaperonnes moléculaires, des transducteurs de signaux, des régulateurs transcriptionnels et traductionnels, des enzymes impliquées dans la synthèse protéique et du métabolisme, des protéines du cytosquelette, etc., leur conférant un rôle important dans le métabolisme de la cellule, l'apoptose et la défense immunitaire (Sagi & Gaffney, 2015).

### 1.3.3 Rôles dans la progression tumorale

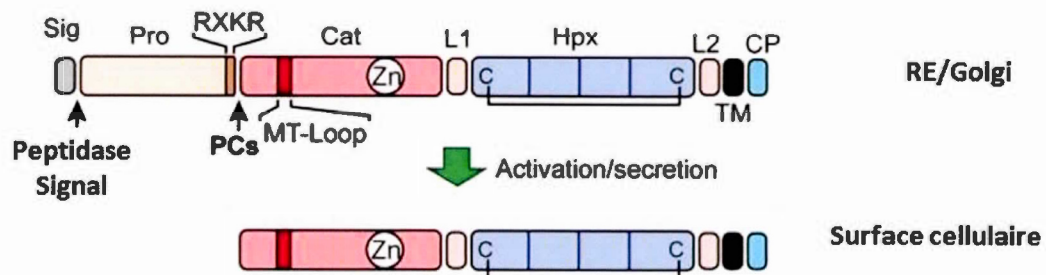
La première évidence de l'implication des MMPs dans la progression tumorale fut leur implication dans le remodelage de la MEC, facilitant sa dégradation et lui donnant ainsi un rôle important dans l'angiogénèse et la formation de métastases (Yadav et al., 2013). Par contre, depuis plusieurs années, de nombreuses études ont démontré leur implication dans différents processus biologiques et ainsi, dans plusieurs étapes de la carcinogénèse (Yadav et al., 2013). En effet, il a été démontré que celles-ci ont des fonctions dans la régulation de la croissance cellulaire, car elles exercent un contrôle sur la disponibilité de facteurs de croissance dans le milieu extracellulaire (IGF par exemple) et en régulant de façon indirecte des signaux prolifératifs, via le clivage de la E-cadhérine et la  $\beta$ -caténine (Yadav et al., 2013). Elles peuvent aussi réguler l'apoptose via différents mécanismes dont l'activation de TGF- $\beta$ , la génération de molécules pro-apoptotiques comme TNF- $\alpha$  et le ligand de Fas, l'activation

des kinases AKT et PKB, ou le clivage de molécules d'adhésion, menant ainsi à un signal pro-apoptotique (Yadav et al., 2013).

#### 1.4 MT1-MMP

##### 1.4.1 Structure

MT1-MMP, comme les autres MMPs associées à la membrane (Figure 1.4), consiste en un peptide signal, suivi d'un pro-domaine possédant un motif basique d'acide aminés à son extrémité C-terminale (clivé par les pro-protéines convertases lors de sa sécrétion), un domaine catalytique, une région charnière (*linker-1*), un domaine *hemopexin-like* (Hpx), une région *stalk* (*linker-2*), une région transmembranaire, et un domaine cytoplasmique (Itoh, 2015).



**Figure 1.4. Structure des différentes métalloprotéinases membranaires.** La MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP et la MT5-MMP possèdent toutes une structure semblable, représentée ci-dessus. Abréviations : Sig; peptide signal, Pro; pro-domaine, PCs; protéines convertases, Cat; domaine catalytique, L1; *linker-1*, Hpx; *hemopexin-like*, L2; *linker-2*, TM; domaine transmembranaire, CP; queue cytoplasmique (Adapté de Itoh, 2015).

##### 1.4.2 Fonctions

MT1-MMP a d'abord été caractérisée pour son rôle d'activation de la proMMP-2 à la surface cellulaire, qui permet la croissance des cancers épithéliaux, via la dégradation de la

membrane basale, car la MMP-2 est en mesure de dégrader le collagène de type IV qui la compose (Itoh, 2015). MT1-MMP active aussi la pro-MMP-13 à la surface cellulaire (Itoh, 2015). Elle peut aussi cliver les protéoglycanes et les protéines de surface, comme syndecan-1 et CD44, qui est une molécule d'adhésion (Itoh, 2015). Plus récemment, des études ont démontré que des MMPs, dont MT1-MMP, sont retrouvées dans différents compartiments intracellulaires, où elles exercent leurs fonctions protéolytiques. En effet, MT1-MMP est retrouvée dans des fractions du cytosquelette de cellules musculaires lisses où elle clive la protéine kinase d'adhésion focale (FAK). MT1-MMP est aussi retrouvée dans le noyau des cellules de carcinomes hépatocellulaires, et sa colocalisation avec la MMP-2 confère aux patients atteints un faible taux de survie (Sagi & Gaffney, 2015).

#### 1.4.3 MT1-MMP et inflammation

Depuis quelques années, de plus en plus d'études ont démontré l'implication de MT1-MMP dans les mécanismes liés à l'inflammation, via sa fonction en tant que protéase, mais aussi en tant que molécule de signalisation (Itoh, 2015). En effet, il a été mis en évidence que MT1-MMP joue un rôle dans l'expression de biomarqueurs inflammatoires car les niveaux d'expression de celle-ci ont été corrélés avec ceux de COX-2 et MMP-9 (Annabi & al., 2013). Il a aussi été démontré que MT1-MMP serait impliquée dans une signalisation intracellulaire pro-inflammatoire, via les voies JAK/STAT3, dans un modèle de cellules stromales mésenchymateuses (MSC) (Akla, Pratt, & Annabi, 2012). De plus, MT1-MMP régulerait la fonction immune des macrophages, indépendamment de son activité protéolytique, en activant des voies de signalisation intracellulaires, dont la voie PI3K $\delta$ /Akt/GSK3 $\beta$  (Shimizu-Hirota et al., 2012). Finalement, la portion cytoplasmique de MT1-MMP serait impliquée dans cette signalisation intracellulaire, car il a été démontré que MT1-MMP régulerait la motilité des macrophages et qu'elle stimulerait la migration cellulaire, indépendamment de sa fonction protéolytique, mais nécessitant la présence de sa portion cytoplasmique (Sakamoto & Seiki, 2009). Ces percées récentes ont permis de démontrer l'impact de MT1-MMP sur la signalisation pro-inflammatoire intracellulaire, et le rôle de sa portion cytoplasmique. Les mécanismes selon lesquels elle activerait ces cascades demeurent jusqu'à maintenant peu connus.

## CHAPITRE II

### PROJET DE RECHERCHE

#### 2.1. Hypothèses

Étant donné des résultats préliminaires obtenus, où nous avons remarqué que la répression de MT1-MMP causait des modulations dans l'induction transcriptionnelle des gènes encodants certains biomarqueurs inflammatoires tels que COX-2 et IL-1 $\beta$  suite à un traitement au PMA, nous en sommes venus à nous demander à quel niveau MT1-MMP régulerait l'expression de ces gènes, que ce soit via la signalisation transduite par sa portion cytoplasmique, ou simplement une corrélation au niveau transcriptionnel entre son expression et celle des biomarqueurs inflammatoires. Notre hypothèse était donc que MT1-MMP agirait sur les niveaux d'activation de protéines de signalisation régulant l'expression des biomarqueurs inflammatoires, notamment la voie NF- $\kappa$ B, et que cette régulation serait dépendante de sa portion cytoplasmique.

#### 2.2 Objectifs du travail

Afin de déterminer l'impact de la MT1-MMP sur les niveaux d'expression des biomarqueurs inflammatoires, nous devons d'abord vérifier l'effet de sa répression sur les niveaux d'expression de ces biomarqueurs, et leurs niveaux d'induction suite à des traitements au PMA à des doses fixes. Un criblage génique (*gene array*) nous permettrait ainsi d'identifier rapidement plusieurs gènes de l'inflammasome et de certains facteurs de transcription impliqués. Après avoir observé les effets de la répression de MT1-MMP sur les niveaux d'expression de ces gènes suite aux traitements au PMA, nous devons ensuite déterminer à l'aide d'une analyse par PCR quantitative si ces effets étaient observables de façon dose-dépendante. L'effet de la répression de MT1-MMP combinée à des traitements au PMA serait ensuite vérifié sur les niveaux d'activation de protéines de signalisation régulant l'expression des biomarqueurs inflammatoires et ce, par immunobuvardage de type Western. Finalement, pour déterminer si les effets observés étaient dûs à la présence seule de la MT1-

MMP, ou de sa portion cytoplasmique, nous devons surexprimer des formes recombinantes de la métalloprotéinase de type sauvage et une tronquée de sa portion cytoplasmique, pour ensuite mesurer les niveaux d'expression des biomarqueurs inflammatoires dans les cellules exprimant ces formes recombinantes. Collectivement, ces résultats nous permettront de confirmer l'implication de la MT1-MMP, et l'importance de sa portion cytoplasmique dans les cascades signalétiques et la régulation de l'expression des biomarqueurs inflammatoires dans un modèle cellulaire humain de fibrosarcomes.

### CHAPITRE III

#### A ROLE FOR THE MEMBRANE TYPE-1 MATRIX METALLOPROTEINASE IN THE TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF CARCINOGEN-INDUCED INFLAMMASOME COMPONENTS

Article soumis dans la revue scientifique *BMC Immunology*

**Contributions des co-auteurs :**

Sheehy : Expérimentation et essais biologiques, analyse et interprétation des résultats, montage des figures, rédaction du manuscrit.

Annabi : Analyse des résultats, montage des figures, rédaction du manuscrit, financement et conception du projet.

**A role for the membrane type-1 matrix metalloproteinase in the transcriptional regulation of carcinogen-induced inflammasome components**

Samuel Sheehy and Borhane Annabi

Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Centre de recherche BIOMED, Département de Chimie, Université du Québec à Montréal, Quebec, Canada

*Correspondence should be directed to :*

Borhane Annabi, PhD, 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

*Running header :* MT1-MMP regulates inflammation

*Abbreviations:* COX-2, Cyclooxygenase-2; ECM, extracellular matrix; EGCG, epigallocatechin-3-gallate; EGR1, Early growth response protein 1; ERK, extracellular signal-regulated kinase; I $\kappa$ B, inhibitor of kappa B; IL, Interleukin; MMP, matrix metalloproteinase; MT1-MMP, Membrane type-1 matrix metalloproteinase; NF- $\kappa$ B, nuclear factor-kappa B; PMA, phorbol-12-myristate-13-acetate; STAT3, signal transducers and activators of transcription 3; TNF, tumour necrosis factor

## Abstract

Signal transducing functions driven by the cytoplasmic domain of membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) are believed to regulate many inflammation-mediated cancer cell functions including migration, proliferation, and survival. Besides the upregulation of the inflammation biomarker cyclooxygenase (COX)-2 expression, MT1-MMP's role in relaying the signals triggered from pro-inflammatory cues remain poorly understood. Here, we treated HT1080 fibrosarcoma cells with phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA), a well-known carcinogen and inducer of COX-2 and of MT1-MMP, to assess the global transcriptional regulatory role that MT1-MMP may exert on inflammation biomarkers. Using gene array screens and transient MT1-MMP gene silencing strategy, we found that MT1-MMP expression exerted both stimulatory or repressive transcriptional control of several inflammasome-related biomarkers such as IL-1B, IL-6, IL-12A, and IL-33, as well as of transcription factors such as EGR1, ELK1, and ETS1/2 in PMA-treated cells. Among the signal transducing pathways explored, silencing of MT1-MMP prevented PMA from phosphorylating Erk, I $\kappa$ B, and p105 K $\kappa$ B intermediates. We also highlight a signaling axis linking MT1-MMP to MMP-9 transcriptional regulation. Altogether, our data evidence an important involvement of MT1-MMP in the transcriptional regulation of inflammatory biomarkers consolidating its contribution in signal transducing functions, in addition to its classical hydrolytic activity.



## Introduction

Membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) is a transmembrane matrix metalloprotease which, in addition to its classical capacity to degrade interstitial collagens and extracellular matrix (ECM) components, also functions as a signal transducing intermediate in pathophysiological processes including atherosclerosis, muscular diseases and cancer (Chen et al., 2013; Snyman and Niesler, 2015; Itoh, 2015). In fact, numerous lines of evidence suggest that MT1-MMP relays signals linking cancer to cancer-related inflammation (Parks et al., 2004; Sun, 2010; Löffek et al., 2011; Al-Raawi et al., 2011). Among the signal transducing events involved, overexpression of MT1-MMP was found to trigger phosphorylation of signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) (Zgheib et al., 2013a), and a MT1-MMP/ nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- $\kappa$ B) signaling axis found to act as a checkpoint controller of cyclooxygenase (COX)-2 expression in CD133+ U87 glioblastoma cells (Annabi et al., 2009). JAK/STAT3 and NF- $\kappa$ B are involved in major pathways regulating inflammation, and are constitutively active in most cancers and often activated by most cancer risk factors (Porta et al., 2009). Moreover, hypoxia and acidic conditions such as found within solid tumors are known to activate NF- $\kappa$ B (Iurlaro et al., 2014; Biddlestone et al., 2015), and to correlate with increased MT1-MMP expression (Annabi et al., 2003; Proulx-Bonneau et al., 2011; Pratt and Annabi, 2014). Given numerous gene products linked to inflammation, survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis are regulated by NF- $\kappa$ B (Mitchell et al., 2016), a better understanding of MT1-MMP's contribution to proinflammatory pathways regulation may provide opportunities for both prevention and treatment of cancer.

MT1-MMP is well characterized as a cell surface proMMP-2 activator (Sato and Takino, 2010). It shares with other MT-MMPs a common domain structure consisting of a signal peptide, a pro-domain, a catalytic domain, a hinge, a hemopexin-like domain, a transmembrane domain, and a stalk region (Zucker et al., 2003). MT1-, MT2-, MT3-, and MT5-MMP are further characterized by a short cytoplasmic domain, while GPI-anchored type MT-MMPs characterize MT4- and MT6-MMP (Itoh, 2015). Deletion or point mutations

performed within the cytoplasmic domain of MT1-MMP have been shown to alter RhoA/ROK expression (Annabi et al., 2005; Ando et al., 2011), as well as the phosphorylation status of Erk (Gingras et al., 2001), STAT3 (Zgheib et al., 2013a; Pratt and Annabi, 2014), and Akt (Ohkawa et al., 2014). MT1-MMP gene silencing has also provided the first evidence regarding its involvement in transcriptional regulation as it prevented Concanavalin-A-mediated STAT3 and NF- $\kappa$ B regulation of inflammation, autophagy, and angiogenesis, in numerous cell models (Akla et al., 2012; Zgheib et al., 2013b).

Recent literature suggests a cooperative link between inflammasomes, which are cytoplasmic protein complexes that sense diverse inflammatory stimuli (de Zoete et al., 2014), to many downstream cellular processes such as autophagy (Martins et al., 2015), angiogenesis (Li et al., 2016), and carcinogenesis (Pandey et al., 2015). Interestingly, inflammasome components, upon complex scaffold proteins assembly (Lu and Wu, 2015), trigger caspase activity and lead to the cleavage of precursors and release of proinflammatory cytokines interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and IL-18 (Man and Kanneganti, 2015). MT1-MMP knockdown suppressed angiogenesis in glioma tumors through decreased production of pro-angiogenic factors such as VEGF and IL-8 (Ulasov et al., 2015), and was also found to regulate the transcription of colony-stimulating factors 2 and 3 in mesenchymal stromal cells (Zgheib et al., 2013a). In addition, MT1-MMP was also demonstrated to regulate caspase activity (Langlois et al., 2005), angiogenesis (Genis et al., 2006), and cell migration (Seiki et al., 2003). Whether any MT1-MMP intracellular signaling functions are linked to inflammasome regulation remains however to be demonstrated.

Inflammasomes are believed to be promising therapeutic targets in cancer-related clinical conditions as their inhibition, or neutralization of their products, affect profoundly carcinogenesis and tumor progression (Zitvogel et al., 2012). Loss of MT1-MMP was also found to lead to nuclear defects and possibly to altered gene transcription (Gutiérrez-Fernández et al., 2015). Here, we wished to further address and discuss whether MT1-MMP exerted any transcriptional regulation of inflammasome-related biomarkers upon pro-inflammatory stimuli in a HT1080 fibrosarcoma cell model.

## Materials and methods

### *Materials*

Sodium dodecylsulfate (SDS) and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma (Oakville, ON). Electrophoresis reagents were purchased from Bio-Rad (Mississauga, ON). The enhanced chemiluminescence (ECL) reagents were from Perkin Elmer (Waltham, MA). Micro bicinchoninic acid protein assay reagents were from Pierce (Rockford, IL). The monoclonal anti-MT1-MMP catalytic domain antibody clone 3G4.2 was from EMD Millipore (Billerica, MA). The polyclonal antibody against I $\kappa$ B, p105, phosphorylated p105, Erk, and phosphorylated Erk were purchased from Cell Signaling (Danvers, MA). The monoclonal antibody against GAPDH was from Advanced Immunochemical Inc. (Long Beach, CA). Horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit and anti-mouse IgG secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA). All other reagents were from Sigma-Aldrich Canada.

### *Cell culture and siRNA transfection*

The human HT1080 fibrosarcoma cell line was purchased from American Type Culture Collection and maintained in Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) containing 10% (v/v) fetal calf serum (FCS) (HyClone Laboratories), 2 mM glutamine, 100 units/mL penicillin and 100  $\mu$ g/mL streptomycin, and were cultured at 37°C under a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. Gene silencing of MT1-MMP was performed through cell transfection of 20 nM MT1-MMP specific siRNA (Hs\_MMP14\_6 HP validated siRNA; QIAGEN, SI03648841), or with a scrambled siRNA sequence (Qiagen, AllStar Negative Control siRNA, SI03650318) as a control using lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. Small interfering RNA and mismatch siRNA were synthesized by QIAGEN and annealed to form duplexes. Twenty-four hours post-transfection, cells were treated with up to 30 nM phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) or vehicle in a serum-free medium for 18 hours.

### *Immunoblotting procedures*

Following treatments or transfection, HT1080 cells were washed with PBS and lysed with lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 120 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40, 0.1% Triton) in the presence of phosphatase and protease inhibitors on ice for 30 minutes. Cell debris was pelleted by centrifugation for 10 min at high speed. Protein concentration was quantified using a micro bicinchoninic acid protein assay kit (Thermo Fisher Scientific Inc). Proteins from control and treated cells were separated by SDS- polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). After electrophoresis, proteins were electrotransferred to polyvinylidene difluoride membranes, which were then blocked overnight at 4°C 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). Membranes were further washed in TBST and incubated with primary antibodies directed against MT1-MMP (1/10,000), p105, phosphorylated p105, Erk, phosphorylated Erk, IκB, phosphorylated IκB (1/1,000), or GAPDH (1/1,500). Washing was then performed in TBST, followed by a 1 hour incubation with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (1/10,000) or anti-mouse IgG (1/5,000) in TBST containing 5% non-fat dry milk. Immunoreactive material was visualized by Western Lightning Enhanced Chemiluminescence Pro (Perkin Elmer).

#### *Total RNA isolation, cDNA synthesis and real-time quantitative RT-PCR*

Total RNA was extracted from HT1080 cell monolayers using TRIzol reagent (Life Technologies, Gaithersburg, MD). For cDNA synthesis, 1 µg of total RNA was reverse-transcribed into cDNA using a high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). cDNA was stored at -80°C prior to PCR. 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 Icyler 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): IL1B (Hs\_IL1B\_1\_SG, QT00021385), IL6 (Hs\_IL6\_1\_SG, QT00083720), IL12A (Hs\_IL12A\_1\_SG, QT00000357), IL33 (Hs\_IL33\_1\_SG, QT00041559), EGR1 (Hs\_EGR1\_1\_SG, QT0026505), ETS1 (Hs\_ETS1\_1\_SG, QT00049133), ETS2 (Hs\_ETS2\_1\_SG, QT00086198), ELK1 (Hs\_ELK1\_1\_SG, QT00034104), β-Actin (Hs\_ACTB\_2\_SG, QT01680476), GAPDH (Hs\_GAPDH\_1\_SG,

QT00079247), PPIA (Hs\_PPIA\_4\_SG, QT01866137). The relative quantities of target gene mRNA against an internal control,  $\beta$ -Actin/GAPDH/PPIA RNA, were measured by following a  $\Delta C_T$  method employing an amplification plot (fluorescence signal vs. cycle number). The difference ( $\Delta C_T$ ) between the mean values in the triplicate samples of target gene and those of  $\beta$ -Actin/GAPDH/PPIA RNA were calculated by iQ5 Optical System Software version 2.0 (BIO-RAD, Hercules, CA) and the relative quantified value (RQV) was expressed as  $2^{-\Delta C_T}$ .

#### *Gelatin zymography*

Gelatin zymography was used to assess the extent of proMMP-2 gelatinolytic activity and activation status as previously described (Fortier et al., 2008). Briefly, a 20  $\mu$ l aliquot of the culture medium was subjected to SDS-PAGE in a gel containing 0.1 mg/ml gelatin, a substrate that is efficiently hydrolyzed by proMMP-9, proMMP-2 and MMP-2. The gels were then incubated in 2.5% Triton X-100 and rinsed in nanopure distilled H<sub>2</sub>O. Gels were further incubated at 37°C for 20 hours in 20 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.02% Brij-35, 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.6, then stained with 0.1% Coomassie Brilliant blue R-250 and destained in 10% acetic acid, 30% methanol in H<sub>2</sub>O. Gelatinolytic activity was detected as unstained bands on a blue background.

#### *Human transcription factors and inflammasome PCR arrays*

The Human Inflammasomes (PAHS-097Z) and Transcription Factors (PAHS-075Z) RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array screens (SA Biosciences, Frederick, MD) were performed according to the manufacturer's protocol. The detailed list of these key transcription factor genes can be found on the manufacturer's website (<http://www.sabiosciences.com/ArrayList.php>). Using real-time quantitative PCR, we reliably analyzed expression of a focused panel of genes related to transcription factors gene targets. 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  $\Delta C_T$  value of each sample, calculated using a total of 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 siScrambled PMA-treated HT1080 cells relative to siMT1-MMP PMA-treated cells. 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 our uploaded raw threshold cycle data.

*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.

## Results

*PMA triggers Erk, p105 and IκB transient phosphorylation in HT1080 fibrosarcoma cells.* We first wished to address the level of responsiveness of HT1080 fibrosarcoma cells to phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), which is known to prime cell migration and proliferation (Toufaily et al., 2014) in part through a NF-κB transducing pathway (Ghosh et al., 1998; Karin and Delhase, 2000). More specifically here, we assessed the phosphorylation status of IκB, p105 precursor protein of NF-κB1, as well as of the extracellular signal-regulated kinase (Erk). HT1080 cells were treated with 30 nM PMA for up to 60 minutes and the phosphorylation status of the above molecules determined by immunoblotting as described in the Methods section (Fig.1A). We found that IκB optimal phosphorylation occurred at 10 minutes while that of p105 and Erk occurred later at 30 minutes (Fig.1B).

*MT1-MMP gene silencing abrogates PMA-induced Erk, p105 and IκB phosphorylation in HT1080 fibrosarcoma cells.* Given the new hypothesized role of membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) as an intermediate in several signal transducing pathways particularly involved in the regulation of cell invasion and inflammation (Pratt and Annabi, 2014; Zgheib et al., 2013a; Akla et al., 2012; Proulx-Bonneau et al., 2011), we next decided to transiently silence MT1-MMP gene expression in HT1080 fibrosarcoma cells and to then evaluate such impact on PMA-induced signalling. We found that, while MT1-MMP expression was significantly reduced (Fig.2, bottom panels), the PMA-induced phosphorylation status of IκB, p105, and Erk were all significantly abrogated. This reinforces the concept that MT1-MMP may further modulate downstream end-products expression through potential transcription regulation.

*Stimulatory and repressive regulatory impact on transcription factors and cytokines transcription upon MT1-MMP gene silencing in PMA-stimulated HT1080 fibrosarcoma cells.* In order to further assess the possible transcriptional impact of MT1-MMP in PMA-stimulated cells, we used a gene array approach to explore some downstream transcription factor gene targets (Fig.3). Transcriptional profiling was also performed on genes involved in inflammasome response (Fig.4). Among the 84 transcription factors genes assessed

downstream of PMA stimulation, 61% were induced by PMA (Fig.3A) in cells where MT1-MMP was silenced, suggesting MT1-MMP exerted a repressive transcriptional control. Among these, several were involved in cell proliferation, survival and inflammation. On the other hand, expression of 29% of the transcription factors assessed was found decreased in those same conditions (Fig.3B), suggesting MT1-MMP exerted a positive effect upon PMA treatment. Among these, similar proliferation and inflammation processes were involved (Table.1, upper part) and this confirms the dynamic balance that the signaling contribution of MT1-MMP exerts within the cell. A similar screening was performed with inflammasome-associated biomarkers. Interestingly, 17% of the genes tested were found upregulated in cells where MT1-MMP was silenced (Fig.4A), whereas 83% were inhibited (Fig.4B). The latter observation suggests that MT1-MMP exerts a significant role in the transcriptional regulation of inflammasome-related genes in PMA-stimulated cells (Table.1, lower part).

*Evidence and validation of MT1-MMP requirement in PMA-induced cytokine and transcription factors transcription.* Given the observations above from the screens, we decided to next focus on the potential stimulatory roles that MT1-MMP originally exerts on gene transcription, and which were found repressed upon PMA stimulation in MT1-MMP-silenced cells (Fig.3B and 4B). We therefore performed dose-response treatments to PMA in siScrambled or siMT1-MMP-transfected cells, and qRT-PCR of specific inflammasome-related (Fig.5) and transcription factors (Fig.6) target genes. We basically confirmed that PMA was able to trigger gene expression of IL-1B, IL-6, IL-12, and IL-33 in control (siScrambled) cells, whereas MT1-MMP gene silencing prevented such PMA-induced expression (Fig.5). Similarly, transcription of ELK1, EGR1, ETS1, and ETS2 were also found induced by PMA, while MT1-MMP silencing prevented such increases (Fig.6).

*MT1-MMP gene silencing abrogates PMA-induced MMP-9 expression and function in HT1080 fibrosarcoma cells.* Finally, whether, any downstream biomarker common to cell proliferation/invasion and to inflammation phenotypes associated with cancer cell invasiveness, we decided to assess the expression of MMP-9, a secreted MMP known to be highly inducible upon inflammatory-mediated conditions such as TNF or PMA (Wang et al., 2015; Toufaily et al., 2014; Tahanian et al., 2011). MT1-MMP was again transiently silenced



and found to prevent PMA-mediated MMP-9 induction (Fig.7A). This was further confirmed at the protein level using zymography to assess the extracellular hydrolytic activity of proMMP-9 and of proMMP-2 (Fig.7B). While proMMP-9 hydrolytic activity was increased by PMA, it was significantly prevented upon MT1-MMP gene silencing (Fig.7C). A detectable activation of latent proMMP-2 to active MMP-2 was observed upon PMA treatment, but was repressed in MT1-MMP-silenced cells confirming the functional repression of MT1-MMP at the cell surface.

## Discussion

MT1-MMP is among those membrane-embedded proteins which exhibit functions on both sides of the plasma membrane to allow coordination between the extracellular and intracellular milieus in response to environmental cues such as inflammatory stimuli. It is therefore well positioned to sense and modify the extracellular environment by processing matrix components, transmembrane proteins and soluble factors, as well as to regulate, through its intracellular membrane-anchored domain, cell motility, metabolism and gene transcription. In support to its contribution towards gene regulation, our results provide evidence that MT1-MMP exerts transcriptional control of inflammasomes components, and position MT1-MMP as an important signal transducing intermediate relaying extracellular pro-inflammatory cues.

Non-catalytical MT1-MMP regulation of gene transcription in endothelial cells recently highlighted genes involved in cell proliferation, vasculature development, and blood vessel morphogenesis (Koziol et al., 2012). Furthermore, indirect evidence of MT1-MMP-mediated transcriptional regulation of target genes have also been reported to require a functional MT1-MMP intracellular domain. These were, in part, deduced from Concanavalin-A-treated cells and included growth factors and cytokines (Domoto et al., 2012; Zgheib et al., 2013a), inflammation (Sina et al., 2010; Akla et al., 2012) and autophagy (Pratt et al. 2012; Pratt and Annabi, 2014) biomarkers. Here, we not only confirm the signal transducing intermediate role of MT1-MMP, as its absence reduced the PMA-induced phosphorylation status of NF- $\kappa$ B and Erk, but we extend our observations to the modulation of downstream transcription factors expression such as ELK1, EGR1, ETS1, and ETS2. Interestingly, ETS1/2 were found involved in inflammatory immune response to viral infection of the heart (Corsten et al., 2015). ETS1 particularly is a common mediator of the renal proinflammatory and profibrotic effects of Ang II (Feng et al., 2012). Interestingly, a crosstalk between ELK3/ETS1/MT1-MMP related to angiogenesis has recently been reported (Heo and Cho, 2014).

An interesting aspect from our study relates to the MT1-MMP/MMP-9 interrelationship in PMA-stimulated cells. We found that PMA-induced MMP-9 was abrogated in cells where MT1-MMP was silenced, suggesting MT1-MMP to play an important signalling intermediate in MMP-9 gene and protein expression. Given the foremost mechanism of action of MMP-9 in brain disorders appears to be its involvement in immune/inflammation responses through processing and activation of various cytokines and chemokines (Vafadari et al., 2015), the involvement of a MT1-MMP-dependent event may be envisioned as a secondary process that could regulate the response to a given pro-inflammatory stimuli. More recently, the MT1-MMP expression level status was found to dictate the *in vitro* action of lupeol on PMA-induced inflammatory biomarkers MMP-9 and COX-2 in a pediatric brain tumor cell model (Annabi et al., 2013).

Therapies which can directly or indirectly target the inflammasome and its downstream cytokines to quiet inflammation are currently envisioned (McCoy et al., 2016; de Rivero Vaccari et al., 2016). Given carcinogen-induced inflammasome activation, according to our current study, requires in part MT1-MMP, one may envision that any strategy that alters MT1-MMP's non-catalytic functions may also alter inflammasome components expression and downstream cytokines. As such, the green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate (EGCG) is among the most potent natural inhibitors of the catalytic and non-catalytic functions of MT1-MMP (Annabi et al., 2002; Garbisa et al., 2001; Maeda-Yamamoto et al., 2003; Yamakawa et al., 2004). EGCG was found to suppress melanoma growth by inhibiting inflammasome and IL-1 $\beta$  secretion (Ellis et al., 2011), and to inhibit NLRP3 inflammasome activation (Tsai et al., 2011). More recently, EGCG targeting of MT1-MMP-mediated Src and JAK/STAT3 signaling was found to inhibit transcription of colony-stimulating factors 2 and 3 in mesenchymal stromal cells (Zgheib et al., 2013a). Finally, the non-antibiotic cellular effects exerted by the anti-inflammatory tetracycline derivative minocycline was recently assessed in a Concanavalin-A-activated human HepG2 hepatoma cell model, a condition known to increase the expression of MT1-MMP and to trigger inflammatory and autophagy processes (Lei and Chang, 2007). Parts of minocycline's effects were found to be exerted through the inhibition of MT1-MMP signaling functions (Desjarlais et al., 2014). In line with that observation, minocycline exerted protective properties against NLRP3 inflammasome-

induced inflammation and P53-associated apoptosis in an early brain injury model (Li et al., 2015).

Among the downstream pro-inflammatory cytokines screened in our study, we found IL-33 and IL-12A which transcription was MT1-MMP-dependent in carcinogen-stimulated HT1080 cells. Newly discovered roles of IL-33 in obesity, intestinal inflammation and tumorigenesis have recently been reported (Schwartz et al., 2016; Lu et al., 2016), whereas low IL-12 production or high IL-33/IL-12 ratio in patients are believed to contribute to tumor development (Jafarzadeh et al., 2015). Whether MT1-MMP is involved in IL-12 expression as an anti-tumor cytokine or in IL-33 expression, a cytokine which bears both pro- and anti-tumor activities, remains to be addressed. Interestingly, selective inhibition of MT1-MMP abrogated the progression of experimental inflammatory arthritis and upregulation of IL-12 (Kaneko et al., 2016).

Altogether, our data evidence an important involvement of MT1-MMP in the transcriptional regulation of inflammatory biomarkers consolidating its contribution to signal transducing functions, in addition to its classical hydrolytic activity. In the current study, we chose to document MT1-MMP transcriptional effects on those genes which were under a positive control from MT1-MMP within proinflammatory cues (PMA treatment, Table.1). Given silencing of MT1-MMP lead to increased expression of several PMA-stimulated cells (Fig.3A and 4A), such transcriptional control will have to be further investigated in order to determine its impact in inflammatory diseases. Development and assessment of MT1-MMP catalytic and non-catalytic inhibitors (Goldberg, 2015; Fields, 2015; Mendes et al., 2016) may therefore be envisioned to possibly also contribute to the reduction of cancer-related inflammation processes.

### Acknowledgements

This study was funded by a grant #288249 from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to BA.

### Competing interest

The authors disclose no potential conflicts of interest.

## References

- Snyman C, Niesler CU. MMP-14 in skeletal muscle repair. *J Muscle Res Cell Motil.* 2015 Jun;36(3):215-25
- Itoh Y. Membrane-type matrix metalloproteinases: Their functions and regulations. *Matrix Biol.* 2015 May-Jul;44-46:207-23
- Chen Q, Jin M, Yang F, Zhu J, Xiao Q, Zhang L. Matrix metalloproteinases: inflammatory regulators of cell behaviors in vascular formation and remodeling. *Mediators Inflamm.* Volume 2013; (2013) 14 pages
- Parks WC, Wilson CL, López-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2004 Aug;4(8):617-29.
- Al-Raawi D, Abu-El-Zahab H, El-Shinawi M, Mohamed MM. Membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) correlates with the expression and activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in inflammatory breast cancer. *Int J Clin Exp Med.* 2011;4(4):265-75
- Löffek S, Schilling O, Franzke CW. Series "matrix metalloproteinases in lung health and disease": Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. *Eur Respir J.* 2011 Jul;38(1):191-208
- Jun Sun. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases Are Essential for the Inflammatory Response in Cancer Cells. *Journal of Signal Transduction* Volume 2010 (2010), 7 pages
- Zgheib A, Lamy S, Annabi B. 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*. 2013a May 10;288(19):13378-86

Annabi B, Laflamme C, Sina A, Lachambre MP, Béliveau R. A MT1-MMP/NF-kappaB signaling axis as a checkpoint controller of COX-2 expression in CD133+ U87 glioblastoma cells. *J Neuroinflammation*. 2009 Mar 9;6:8

Porta C, Larghi P, Rimoldi M, Totaro MG, Allavena P, Mantovani A, Sica A. Cellular and molecular pathways linking inflammation and cancer. *Immunobiology*. 2009;214(9-10):761-77

Biddlestone J, Bandarra D, Rocha S. The role of hypoxia in inflammatory disease. *Int J Mol Med*. 2015 Apr;35(4):859-69

Iurlaro R, León-Annicchiarico CL, Muñoz-Pinedo C. Regulation of cancer metabolism by oncogenes and tumor suppressors. *Methods Enzymol*. 2014;542:59-80

Proulx-Bonneau S, Guezguez A, Annabi B. A concerted HIF-1 $\alpha$ /MT1-MMP signalling axis regulates the expression of the 3BP2 adaptor protein in hypoxic mesenchymal stromal cells. *PLoS One*. 2011;6(6):e21511

Annabi B, Lee YT, Turcotte S, Naud E, Desrosiers RR, Champagne M, Eliopoulos N, Galipeau J, Béliveau R. Hypoxia promotes murine bone-marrow-derived stromal cell migration and tube formation. *Stem Cells*. 2003;21(3):337-47.

Pratt J, Annabi B. Induction of autophagy biomarker BNIP3 requires a JAK2/STAT3 and MT1-MMP signaling interplay in Concanavalin-A-activated U87 glioblastoma cells. *Cell Signal*. 2014 May;26(5):917-24

Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A. Signaling via the NF $\kappa$ B system. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2016 (in press)

- Sato H, Takino T. Coordinate action of membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) and MMP-2 enhances pericellular proteolysis and invasion. *Cancer Sci.* 2010 Apr;101(4):843-7.
- Zucker S, Pei D, Cao J, Lopez-Otin C. Membrane type-matrix metalloproteinases (MT-MMP). *Curr Top Dev Biol.* 2003;54:1-74
- Ando K, Ishibashi T, Ohkawara H, Inoue N, Sugimoto K, Uekita H, Hu C, Okamoto Y, Takuwa Y, Takeishi Y. Crucial role of membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) in RhoA/Rac1-dependent signaling pathways in thrombin-stimulated endothelial cells. *J Atheroscler Thromb.* 2011;18(9):762-73
- Annabi B, Bouzeghrane M, Moundjian R, Moghrabi A, Béliveau R. Probing the infiltrating character of brain tumors: inhibition of RhoA/ROK-mediated CD44 cell surface shedding from glioma cells by the green tea catechin EGCG. *J Neurochem.* 2005 Aug;94(4):906-16
- Gingras D, Bousquet-Gagnon N, Langlois S, Lachambre MP, Annabi B, Béliveau R. Activation of the extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) cascade by membrane-type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *FEBS Lett.* 2001 Oct 26;507(2):231-6.
- Ohkawara H, Ishibashi T, Sugimoto K, Ikeda K, Ogawa K, Takeishi Y. Membrane type 1-matrix metalloproteinase/Akt signaling axis modulates TNF- $\alpha$ -induced procoagulant activity and apoptosis in endothelial cells. *PLoS One.* 2014 Aug 27;9(8):e105697.
- Akla N, Pratt J, Annabi B. Concanavalin-A triggers inflammatory response through JAK/STAT3 signalling and modulates MT1-MMP regulation of COX-2 in mesenchymal stromal cells. *Exp Cell Res.* 2012 Nov 15;318(19):2498-506
- Zgheib A, Pelletier-Bonnieur É, Levros LC Jr, Annabi B. Selective JAK/STAT3 signalling



- regulates transcription of colony stimulating factor-2 and -3 in Concanavalin-A-activated mesenchymal stromal cells. *Cytokine*. 2013b Aug;63(2):187-93
- de Zoete MR, Palm NW, Zhu S, Flavell RA. Inflammasomes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014 Oct 16;6(12):a016287.
- Martins JD, Liberal J, Silva A, Ferreira I, Neves BM, Cruz MT. Autophagy and inflammasome interplay. *DNA Cell Biol*. 2015 Apr;34(4):274-81
- Li TH, Huang CC, Yang YY, Lee KC, Hsieh SL, Hsieh YC, Alan L, Lin HC, Lee SD, Tsai CY. Thalidomide Improves the Intestinal Mucosal Injury and Suppresses Mesenteric Angiogenesis and Vasodilatation by Down-Regulating Inflammasomes-Related Cascades in Cirrhotic Rats. *PLoS One*. 2016 Jan 28;11(1):e0147212.
- Pandey S, Singh S, Anang V, Bhatt AN, Natarajan K, Dwarakanath BS. Pattern Recognition Receptors in Cancer Progression and Metastasis. *Cancer Growth Metastasis*. 2015 Jul 23;8:25-34
- Lu A, Wu H. Structural mechanisms of inflammasome assembly. *FEBS J*. 2015 Feb;282(3):435-44.
- Man SM, Kanneganti TD. Regulation of inflammasome activation. *Immunol Rev*. 2015 May;265(1):6-21.
- Ulasov I, Borovjagin AV, Kaverina N, Schroeder B, Shah N, Lin B, Baryshnikov A, Cobbs C. MT1-MMP silencing by an shRNA-armed glioma-targeted conditionally replicative adenovirus (CRAAd) improves its anti-glioma efficacy in vitro and in vivo. *Cancer Lett*. 2015 Sep 1;365(2):240-50.
- Langlois S, Di Tomasso G, Boivin D, Roghi C, Murphy G, Gingras D, Béliveau R. Membrane type 1-matrix metalloproteinase induces endothelial cell morphogenic

- differentiation by a caspase-dependent mechanism. *Exp Cell Res.* 2005 Jul 15;307(2):452-64.
- Genís L, Gálvez BG, Gonzalo P, Arroyo AG. MT1-MMP: universal or particular player in angiogenesis? *Cancer Metastasis Rev.* 2006 Mar;25(1):77-86.
- Seiki M, Mori H, Kajita M, Uekita T, Itoh Y. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase and cell migration. *Biochem Soc Symp.* 2003;(70):253-62.
- Zitvogel L, Kepp O, Galluzzi L, Kroemer G. Inflammasomes in carcinogenesis and anticancer immune responses. *Nat Immunol.* 2012 Mar 18;13(4):343-51.
- Gutiérrez-Fernández A, Soria-Valles C, Osorio FG, Gutiérrez-Abril J, Garabaya C, Aguirre A, Fueyo A, Fernández-García MS, Puente XS, López-Otín C. Loss of MT1-MMP causes cell senescence and nuclear defects which can be reversed by retinoic acid. *EMBO J.* 2015 Jul 14;34(14):1875-88
- Fortier S, Touaibia M, Lord-Dufour S, Galipeau J, Roy R, Annabi B. Tetra- and hexavalent mannosides inhibit the pro-apoptotic, antiproliferative and cell surface clustering effects of concanavalin-A: impact on MT1-MMP functions in marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Glycobiology.* 2008 Feb;18(2):195-204
- Toufaily C, Charfi C, Annabi B, Annabi B. A Role for the Cavin-3/Matrix Metalloproteinase-9 Signaling Axis in the Regulation of PMA-Activated Human HT1080 Fibrosarcoma Cell Neoplastic Phenotype. *Cancer Growth Metastasis.* 2014 Dec 8;7:43-51
- Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:225-60
- Karin M, Delhase M. The I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B: key elements of proinflammatory signalling. *Semin Immunol.* 2000 Feb;12(1):85-98

- Tahanian E, Sanchez LA, Shiao TC, Roy R, Annabi B. Flavonoids targeting of I $\kappa$ B phosphorylation abrogates carcinogen-induced MMP-9 and COX-2 expression in human brain endothelial cells. *Drug Des Devel Ther.* 2011;5:299-309
- Wang F, Ma J, Wang KS, Mi C, Lee JJ, Jin X. Blockade of TNF- $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B signaling pathway and anti-cancer therapeutic response of dihydrotanshinone I. *Int Immunopharmacol.* 2015 Sep;28(1):764-72
- Koziol A, Martín-Alonso M, Clemente C, Gonzalo P, Arroyo AG. Site-specific cellular functions of MT1-MMP. *Eur J Cell Biol.* 2012 Nov-Dec;91(11-12):889-95
- Domoto T, Takino T, Guo L, Sato H. Cleavage of hepatocyte growth factor activator inhibitor-1 by membrane-type MMP-1 activates matriptase. *Cancer Sci.* 2012 Mar;103(3):448-54
- Sina A, Proulx-Bonneau S, Roy A, Poliquin L, Cao J, Annabi B. The lectin concanavalin-A signals MT1-MMP catalytic independent induction of COX-2 through an IKK $\gamma$ /NF- $\kappa$ B-dependent pathway. *J Cell Commun Signal.* 2010 Mar;4(1):31-8
- Pratt J, Roy R, Annabi B. Concanavalin-A-induced autophagy biomarkers requires membrane type-1 matrix metalloproteinase intracellular signaling in glioblastoma cells. *Glycobiology.* 2012 Sep;22(9):1245-55.
- Corsten M, Heggermont W, Papageorgiou AP, Deckx S, Tijsma A, Verhesen W, van Leeuwen R, Carai P, Thibaut HJ, Custers K, Summer G, Hazebroek M, Verheyen F, Neyts J, Schroen B, Heymans S. The microRNA-221/-222 cluster balances the antiviral and inflammatory response in viral myocarditis. *Eur Heart J.* 2015 Nov 7;36(42):2909-19

- Feng W, Chumley P, Hua P, Rezonzew G, Jaimes D, Duckworth MW, Xing D, Jaimes EA. Role of the transcription factor erythroblastosis virus E26 oncogen homolog-1 (ETS-1) as mediator of the renal proinflammatory and profibrotic effects of angiotensin II. *Hypertension*. 2012 Nov;60(5):1226-33
- Heo SH, Cho JY. ELK3 suppresses angiogenesis by inhibiting the transcriptional activity of ETS-1 on MT1-MMP. *Int J Biol Sci*. 2014 Mar 27;10(4):438-47
- Vafadari B, Salamian A, Kaczmarek L. MMP-9 in Translation: From Molecule to Brain Physiology, Pathology and Therapy. *J Neurochem*. 2015
- Annabi B, Vaillancourt-Jean E, Béliveau R. MT1-MMP expression level status dictates the in vitro action of lupeol on inflammatory biomarkers MMP-9 and COX-2 in medulloblastoma cells. *Inflammopharmacology*. 2013 Feb;21(1):91-9.
- McCoy SS, Stannard J, Kahlenberg JM. Targeting the inflammasome in rheumatic diseases. *Transl Res*. 2016 Jan;167(1):125-37
- de Rivero Vaccari JP, Dietrich WD, Keane RW. Therapeutics targeting the inflammasome after central nervous system injury. *Transl Res*. 2016 Jan;167(1):35-45
- Ellis LZ, Liu W, Luo Y, Okamoto M, Qu D, Dunn JH, Fujita M. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate suppresses melanoma growth by inhibiting inflammasome and IL-1 $\beta$  secretion. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Oct 28;414(3):551-6
- Tsai PY, Ka SM, Chang JM, Chen HC, Shui HA, Li CY, Hua KF, Chang WL, Huang JJ, Yang SS, Chen A. Epigallocatechin-3-gallate prevents lupus nephritis development in mice via enhancing the Nrf2 antioxidant pathway and inhibiting NLRP3 inflammasome activation. *Free Radic Biol Med*. 2011 Aug 1;51(3):744-54
- Desjarlais M, Pratt J, Lounis A, Mounier C, Haidara K, Annabi B. Tetracycline derivative

minocycline inhibits autophagy and inflammation in concanavalin-a-activated human hepatoma cells. *Gene Regul Syst Bio*. 2014 Mar 4;8:63-73.

Li J, Chen J, Mo H, Chen J, Qian C, Yan F, Gu C, Hu Q, Wang L, Chen G. Minocycline Protects Against NLRP3 Inflammasome-Induced Inflammation and P53-Associated Apoptosis in Early Brain Injury After Subarachnoid Hemorrhage. *Mol Neurobiol*. 2016 May;53(4):2668-2678

Schwartz C, O'Grady K, Lavelle EC, Fallon PG. Interleukin 33: an innate alarm for adaptive responses beyond Th2 immunity - emerging roles in obesity, intestinal inflammation and cancer. *Eur J Immunol*. 2016 (in press).

Lu B, Yang M, Wang Q. Interleukin-33 in tumorigenesis, tumor immune evasion, and cancer immunotherapy. *J Mol Med (Berl)*. 2016 (in press)

Garbisa S, Sartor L, Biggin S, Salvato B, Benelli R, Albini A. Tumor gelatinases and invasion inhibited by the green tea flavanol epigallocatechin-3-gallate. *Cancer*. 2001 Feb 15;91(4):822-32.

Annabi B, Lachambre MP, Bousquet-Gagnon N, Page M, Gingras D, Beliveau R. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin 3-gallate inhibits MMP-2 secretion and MT1-MMP-driven migration in glioblastoma cells. *Biochim Biophys Acta*. 2002 Jan 30;1542(1-3):209-20.

Maeda-Yamamoto M, Suzuki N, Sawai Y, Miyase T, Sano M, Hashimoto-Ohta A, Isemura M. Association of suppression of extracellular signal-regulated kinase phosphorylation by epigallocatechin gallate with the reduction of matrix metalloproteinase activities in human fibrosarcoma HT1080 cells. *J Agric Food Chem*. 2003 Mar 26;51(7):1858-63.

Yamakawa S, Asai T, Uchida T, Matsukawa M, Akizawa T, Oku N. (-)-Epigallocatechin gallate inhibits membrane-type 1 matrix metalloproteinase, MT1-MMP, and tumor

angiogenesis. *Cancer Lett.* 2004 Jul 8;210(1):47-55.

Lei HY, Chang CP. Induction of autophagy by concanavalin A and its application in anti-tumor therapy. *Autophagy.* 2007 Jul-Aug;3(4):402-4

Jafarzadeh A, Minaee K, Farsinejad AR, Nemati M, Khosravimashizi A, Daneshvar H, Mohammadi MM, Sheikhi A, Ghaderi A. Evaluation of the circulating levels of IL-12 and IL-33 in patients with breast cancer: influences of the tumor stages and cytokine gene polymorphisms. *Iran J Basic Med Sci.* 2015 Dec;18(12):1189-98.

Kaneko K, Williams RO, Dransfield DT, Nixon AE, Sandison A, Itoh Y. Selective Inhibition of Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase Abrogates Progression of Experimental Inflammatory Arthritis: Synergy With Tumor Necrosis Factor Blockade. *Arthritis Rheumatol.* 2016 Feb;68(2):521-31

Fields GB. New strategies for targeting matrix metalloproteinases. *Matrix Biol.* 2015 May-Jul;44-46:239-46.

Mendes DE, Wong-On-Wing A, Berkman CE. Phosphoramidate-based peptidomimetic inhibitors of membrane type-1 matrix metalloproteinase. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2016 Feb;31(1):167-71

Goldberg GI. Renaissance of MMPs as therapeutic targets? Maybe. *Structure.* 2015 Jan 6;23(1):6-7.

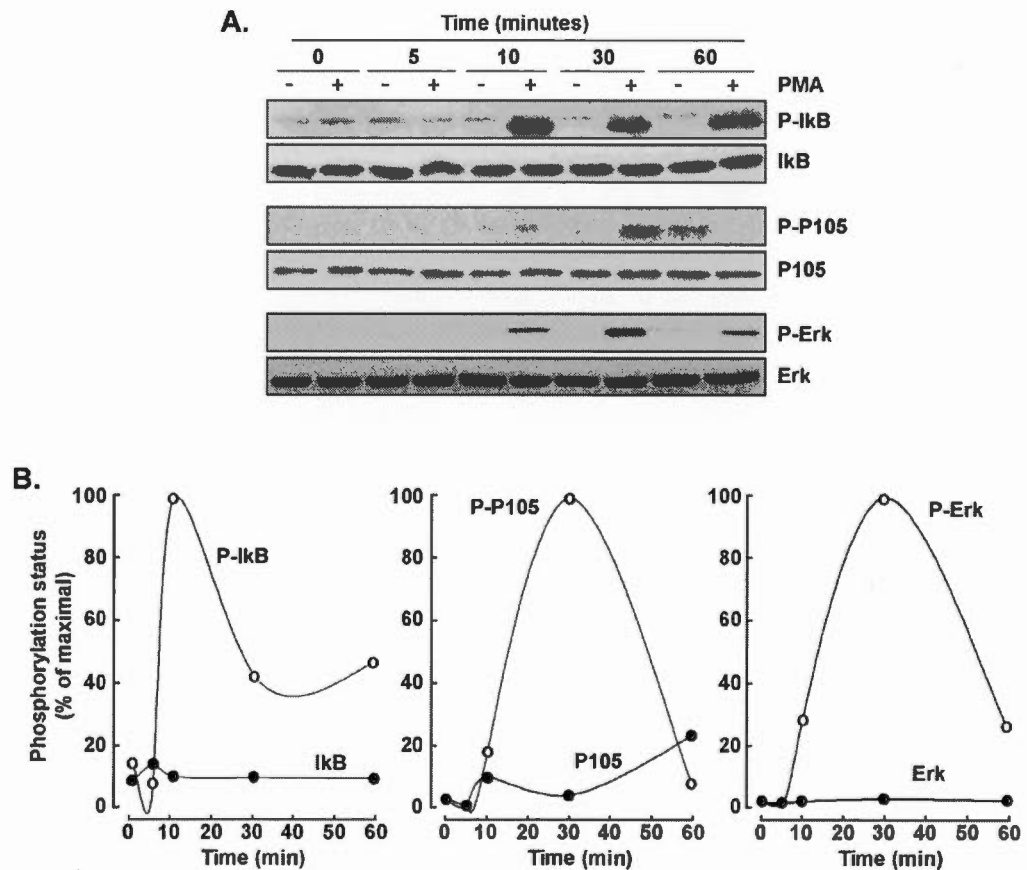
## Tables

**Table 3.1: Suppressive transcriptional role of MT1-MMP silencing in PMA-treated cells.** HT1080 fibrosarcoma cells were transiently transfected with siScrambled or siMT1-MMP. Serum-starved cells were treated with 30 nM PMA for 18 hrs. Total RNA was isolated and cDNA synthesized as described in the Methods section. The identity of selected genes from transcription factors family (upper table) or from inflammasomes components (lower table) and which expression was inhibited by 50-90% is shown and extracted from Fig.3B and 4B. Data are representative from 2 independent array screens.

Transcription factors	Gene ID	PMA inhibition (%)	Functional grouping
FOS	2353	55	Inflammation, proliferation, differentiation
ETS2	2114	66	Inflammation, proliferation, survival
STAT2	6773	66	Proliferation, migration, apoptosis
ELK1	2002	67	Inflammation, proliferation, survival
HSF1	3297	68	Proliferation, apoptosis, metabolism
EGR1	1958	68	Differentiation, mitogenesis
STAT5A	6776	69	Proliferation, apoptosis
JUNB	3726	77	Proliferation, transformation
ETS1	2113	78	Migration, proliferation, survival

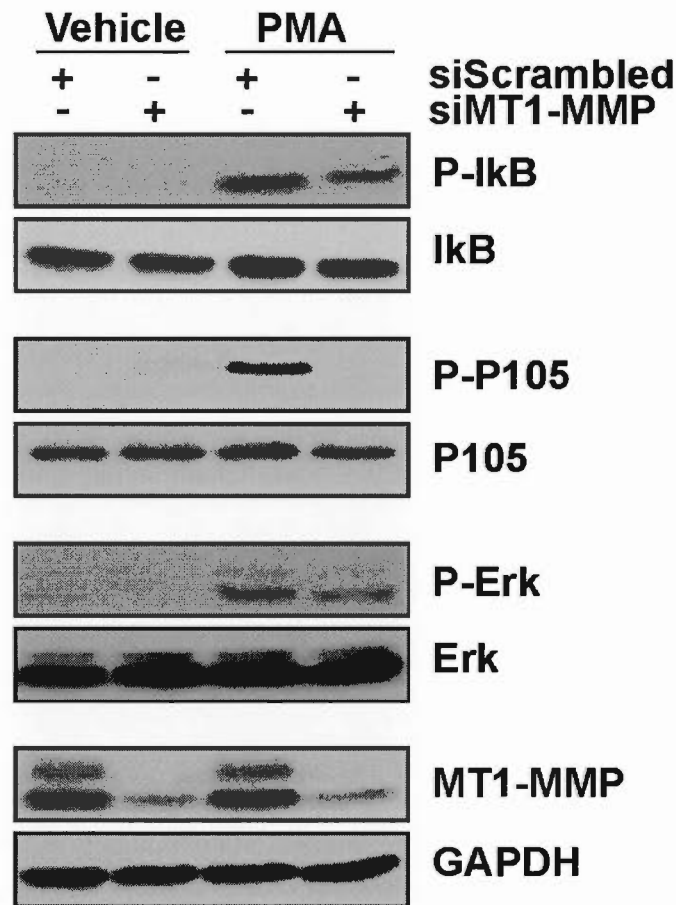
Inflammasome components	Gene ID	PMA inhibition (%)	Functional grouping
IL-33	90865	50	Inflammation
IL-12A	3592	55	Inflammation, differentiation
CCL5	6352	56	Inflammation
TNF	7124	59	Inflammation, apoptosis
IL-6	3569	78	Inflammation
NLRP9	338321	78	Inflammation, apoptosis
XIAP	331	82	Apoptosis, autophagy
NLRP6	101613	83	Apoptosis, immunity
TRAF6	7189	84	Immunity, inflammation
IL-1B	3553	87	Inflammation

## Figures

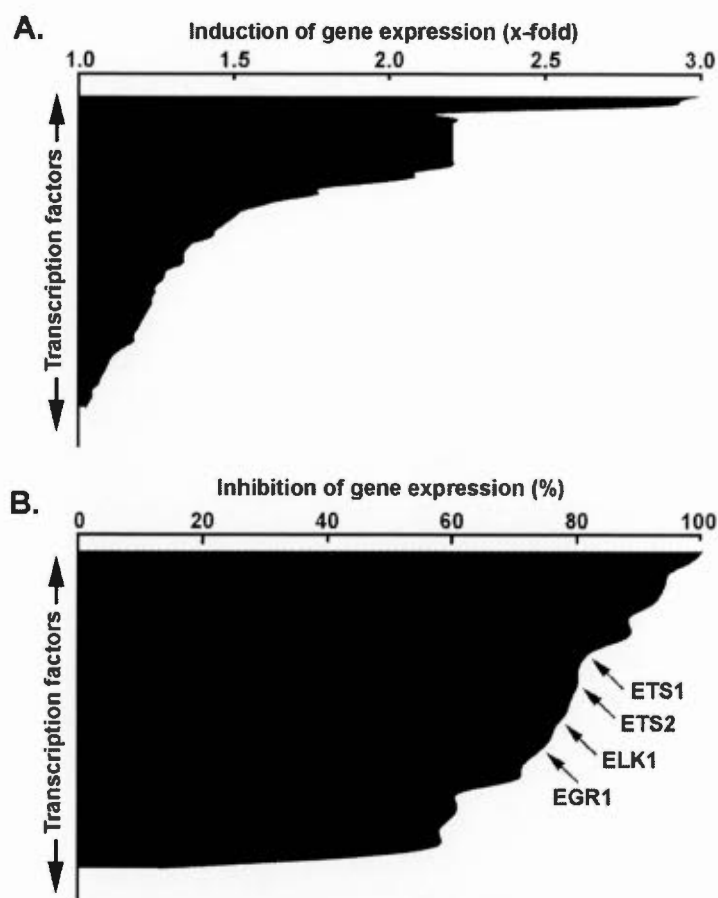


**Fig.3.1 :** PMA triggers Erk, p105 and I $\kappa$ B transient phosphorylation in HT1080 fibrosarcoma cells. Serum-starved HT1080 fibrosarcoma cells were treated for up to 60 minutes with vehicle or 30  $\mu$ M PMA, following which cell lysates were isolated, electrophoresed via SDS-PAGE and immunodetected for (A) P-I $\kappa$ B, I $\kappa$ B, P-p105, p105, P-Erk, and Erk proteins as described in the Methods section. (B) Quantification was performed by scanning densitometry of a representative autoradiogram.





**Fig.3.2: MT1-MMP gene silencing abrogates PMA-induced Erk, p105 and IκB phosphorylation in HT1080 fibrosarcoma cells.** Transient MT1-MMP gene silencing was performed in HT1080 cells as described in the Methods section. Serum-starved HT1080 fibrosarcoma cells were then treated for either 10 minutes to monitor Erk phosphorylation extent, or 30 minutes to monitor p105 and IκB phosphorylation within vehicle or 30 μM PMA-treated cells. Cell lysates were isolated, electrophoresed via SDS-PAGE and immunodetected for P-IκB, IκB, P-p105, p105, P-Erk, Erk, MT1-MMP and GAPDH proteins as described in the Methods section.



**Fig.3.3 :** **Stimulatory and repressive regulatory impact on transcription factors transcription upon MT1-MMP gene silencing in PMA-stimulated HT1080 fibrosarcoma cells.** Gene silencing was performed with either siScrambled or siMT1-MMP in HT1080 fibrosarcoma cells. Cells were then serum-starved in the presence or absence of 30 nM PMA for 24 h. Total RNA isolation and qRT-PCR were performed as described in the Methods section to assess expression of a subset of 84 different transcription factors genes using human PCR arrays as described in the Methods section. (A) PMA stimulatory response expressed as the ratio of siMT1-MMP-transfected cells on siScrambled-transfected cells (x-fold induction). (B) PMA repressive response expressed as the ratio of siMT1-MMP-transfected cells on siScrambled-transfected cells (% inhibition).

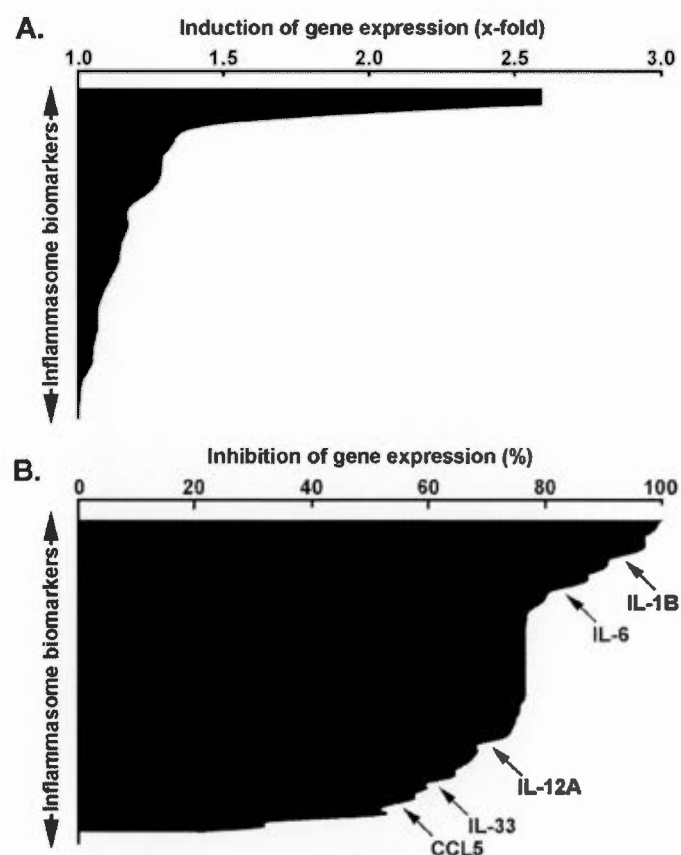


Fig.3.4 : **Stimulatory and repressive regulatory impact on inflammasome-related transcription upon MT1-MMP gene silencing in PMA-stimulated HT1080 fibrosarcoma cells.** Gene silencing was performed with either siScrambled or siMT1-MMP in HT1080 fibrosarcoma cells. Cells were then serum-starved in the presence or absence of 30 nM PMA for 24 h. Total RNA isolation and qRT-PCR were performed as described in the Methods section to assess expression of a subset of 84 different inflammasome-related genes using human PCR arrays as described in the Methods section. (A) PMA stimulatory response expressed as the ratio of siMT1-MMP-transfected cells on siScrambled-transfected cells (x-fold induction). (B) PMA repressive response expressed as the ratio of siMT1-MMP-transfected cells on siScrambled-transfected cells (% inhibition).

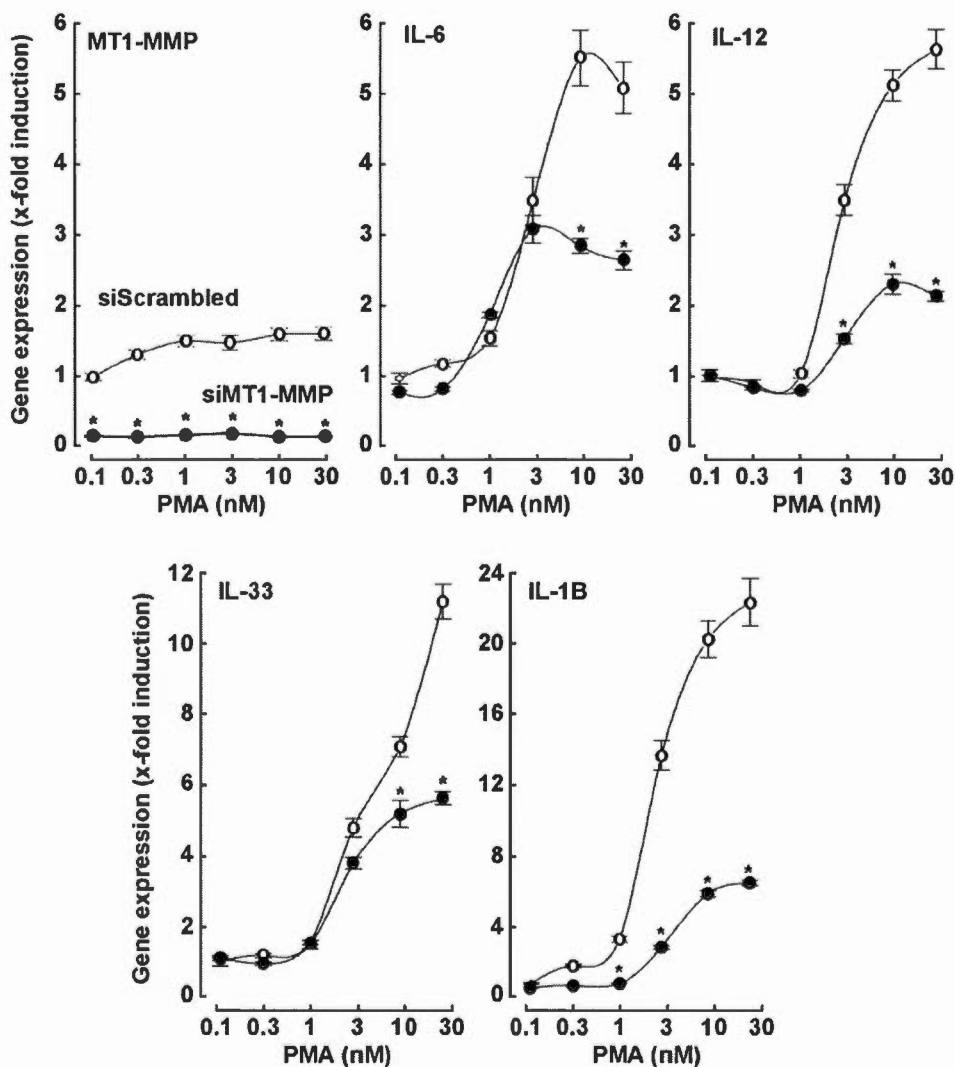
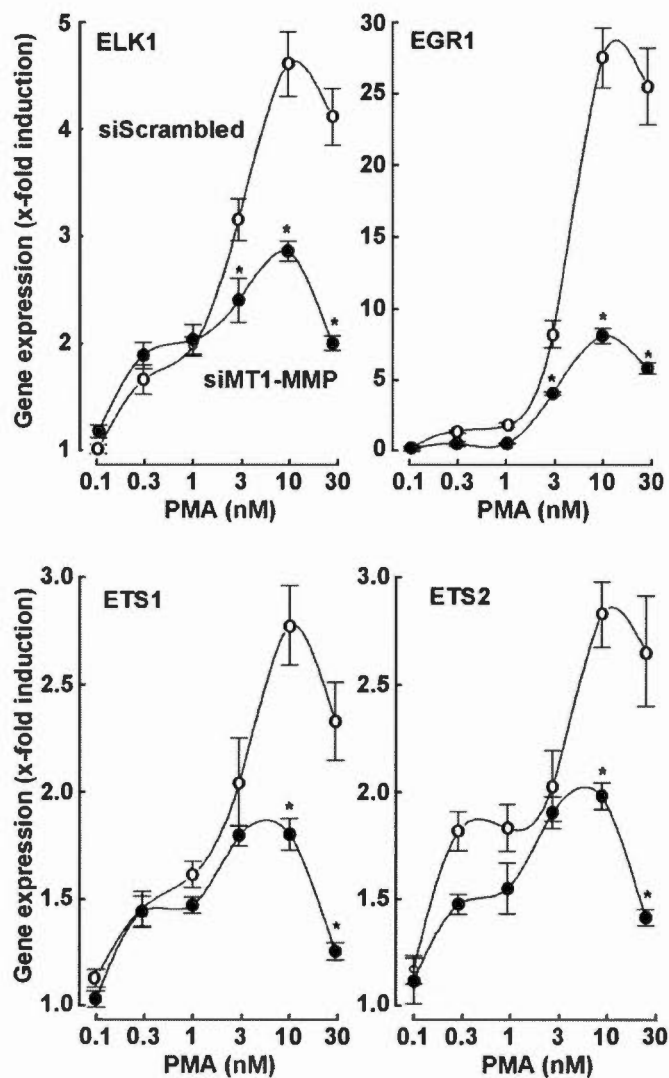
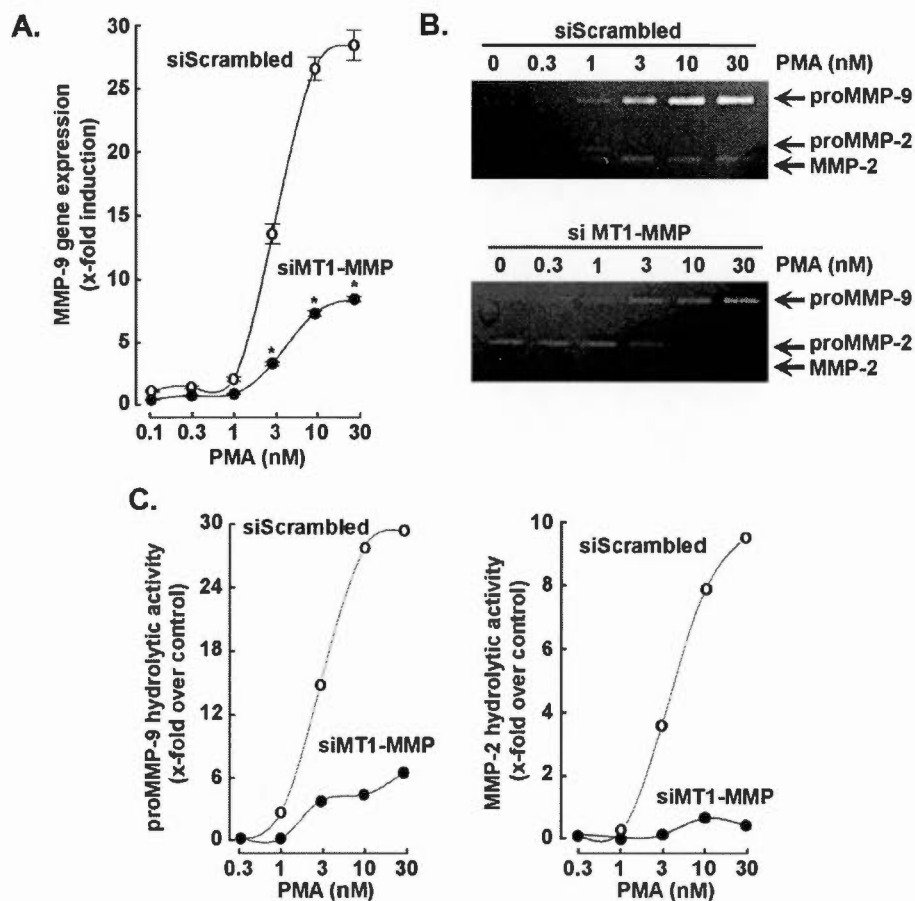


Fig.3.5: **Evidence and validation of MT1-MMP requirement in PMA-induced inflammasome-related transcription.** Gene silencing was performed with either siScrambled (open circles) or siMT1-MMP (closed circles) in HT1080 fibrosarcoma cells. Cells were then serum-starved in the presence or absence of up to 30 nM PMA for 24 hours. Total RNA isolation and qRT-PCR were performed as described in the Methods section to assess expression of MT1-MMP, IL-6, IL-12, IL-33 or IL-1B.



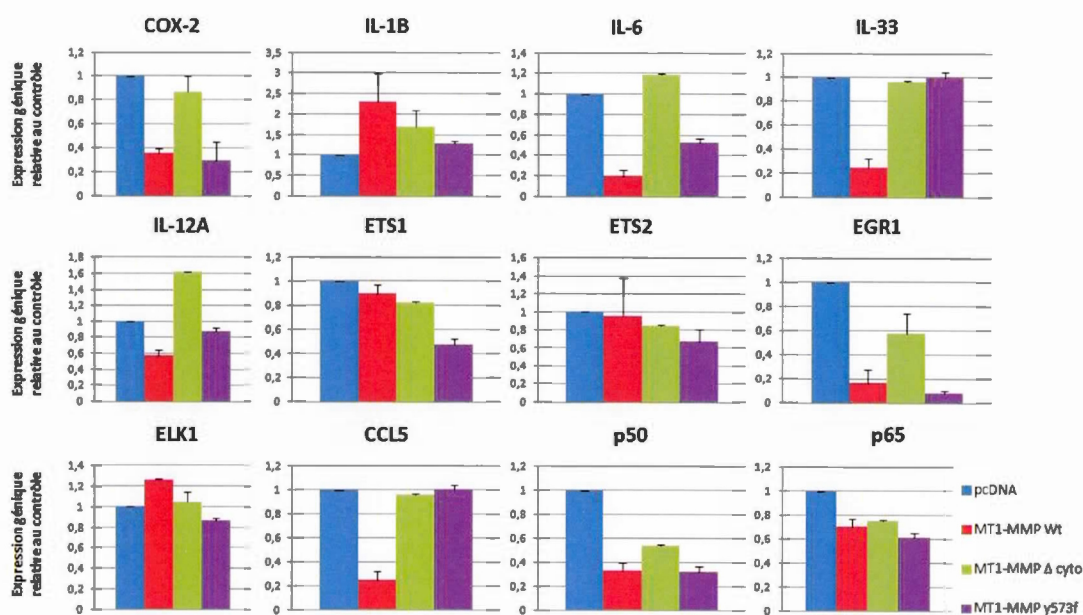
**Fig.3.6 : Evidence and validation of MT1-MMP requirement in PMA-induced transcription factors transcription.** Gene silencing was performed with either siScrambled (open circles) or siMT1-MMP (closed circles) in HT1080 fibrosarcoma cells. Cells were then serum-starved in the presence or absence of up to 30 nM PMA for 24 hours. Total RNA isolation and qRT-PCR were performed as described in the Methods section to assess expression of ELK1, EGR1, ETS1, or ETS2.



**Fig.3.7 :** **MT1-MMP gene silencing abrogates PMA-induced MMP-9 expression and function in HT1080 fibrosarcoma cells.** Gene silencing was performed with either siScrambled (open circles) or siMT1-MMP (closed circles) in HT1080 fibrosarcoma cells. Cells were then serum-starved in the presence or absence of up to 30 nM PMA for 24 hours. (A) Total RNA isolation and qRT-PCR were performed as described in the Methods section to assess the expression of MMP-9. (B) Upon treatment, conditioned media was harvested and gelatin zymography performed as described in the Methods section to assess the extent of proMMP-9, proMMP-2, and MMP-2 hydrolytic activity. (C) Scanning densitometry was performed of a representative zymogram.

## CHAPITRE IV

### RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES



**Figure 4.1. Niveaux d'expression génique des biomarqueurs inflammatoires et de facteurs de transcription suite à la surexpression de 2 formes recombinantes de MT1-MMP.** Les cellules HT1080 furent transfectées avec des vecteurs plasmidiques encodant pour une MT1-MMP de forme sauvage (*wild type*, en rouge), une MT1-MMP tronquée de sa portion cytoplasmique ( $\Delta$  *cyto*, en vert), et une MT1-MMP où la tyrosine 573 a été mutée en phénylalanine ( $\gamma$ 573f, en violet). Les valeurs des niveaux d'expression ont été normalisées par rapport à celles de la condition contrôle (pcDNA, en bleu). L'ARN total a été extrait des lysats de cellules et les niveaux d'expression des différents facteurs de transcription et biomarqueurs inflammatoires ont été mesurés par qRT-PCR. Les données correspondent à des valeurs moyennes provenant de triplicatas.

## CHAPITRE V

### DISCUSSION

#### **MT1-MMP régule l'expression de nombreux facteurs de transcription et gènes de l'inflammasome**

Tout d'abord, les traitements au PMA sont effectués dans le but de créer un environnement pro-inflammatoire chez les cellules. Celui-ci agit en tant qu'activateur de la protéine kinase C (PKC), qui initie l'activation de NF- $\kappa$ B via les voies Ras, Raf-1 et ERK1/2, indépendamment de p38 et MAPK (Chang et al., 2005). Dans les figures 3.3 et 3.4, nous sommes à même d'observer l'effet du PMA sur l'expression de gènes de l'inflammasome et de facteurs de transcription, et que la distribution globale des valeurs des ratios d'expression est affectée lorsque l'expression génique de MT1-MMP est réprimée. De plus, nous pouvons observer l'effet de cette inhibition sur les niveaux d'expression différentiels de ces gènes suite aux traitements au PMA, qui mène à une induction de l'expression de certains gènes (figures 3.3.A et 3.4.A) et à la répression d'autres gènes (figures 3.3.B et 3.4.B). Ces résultats nous ont permis de démontrer que l'absence de MT1-MMP modifie les niveaux d'induction ou de répression transcriptionnelle, en lien avec les traitements au PMA, de gènes de l'inflammasome et de facteurs de transcription.

Ainsi, l'expression de plusieurs biomarqueurs importants dans la réponse inflammatoire, normalement induite par le traitement au PMA, est diminuée en l'absence de MT1-MMP. C'est le cas pour plusieurs interleukines dont IL-6, IL-1B, IL-12A, IL-33, mais aussi pour des molécules de signalisation, notamment de la famille des STAT, dont STAT2 et STAT5A, la famille NF- $\kappa$ B, dont RelA, RelB, et NF- $\kappa$ B1, et d'un autre acteur important dans le processus d'inflammation, soit la COX-2. Cette baisse d'induction d'expression par le PMA, corrélée avec l'inhibition transcriptionnelle de MT1-MMP, est observable aussi pour plusieurs autres facteurs de transcription, notamment ceux de la famille des ETS, comme ETS1, ETS2 et ELK1, et d'autres facteurs aussi liés à l'inflammation comme FOS et EGR1. À l'inverse, l'induction de l'expression de certains marqueurs et facteurs de transcription par le PMA est



potentialisée lorsque l'expression de MT1-MMP est inhibée. En effet, les niveaux d'expression des gènes comme ID1, AR, MYB, FOXO1, impliqués dans plusieurs processus comme la prolifération la survie et l'inflammation, sont plus élevés lorsque MT1-MMP est inhibée au niveau transcriptionnel. De plus, ces différences dans les taux d'induction d'expression de ces mêmes gènes par le PMA ont aussi été observées de façon dose-dépendante, où les niveaux transcriptionnels ont été mesurés en réponse à des doses croissantes de PMA, et ce, suite à l'inhibition transcriptionnelle transitoire de MT1-MMP (voir figures 3.5 et 3.6).

Ainsi, les niveaux d'expression de la MT1-MMP sont corrélés avec ceux de nombreux facteurs de transcriptionnels et biomarqueurs de l'inflammation, en réponse aux traitements par le PMA, et ce projet avait pour but de tenter d'expliquer cette corrélation, afin de faire le lien entre cette métalloprotéinase et les mécanismes d'inflammation dans un modèle de cellules cancéreuses. Une question qui se pose donc est le niveau d'implication de MT1-MMP dans la régulation des niveaux d'expression de ces biomarqueurs, et si cette implication est due à l'action directe de celle-ci sur des molécules de signalisation, via sa fonction protéolytique, ou encore via sa portion cytoplasmique, dont les mécanismes d'action sont encore peu connus.

### **MT1-MMP régule les niveaux d'activation de la voie NF- $\kappa$ B**

Pour déterminer l'impact de MT1-MMP sur les voies de signalisation activées lors d'un stimulus pro-inflammatoire, les niveaux de phosphorylation de protéines de ces cascades signalétiques ont été mesurés suite au traitement des cellules au PMA, et dont l'expression de MT1-MMP a été réprimée. Il a été observé qu'aux temps de traitement où les pics de phosphorylation étaient les plus élevés, les niveaux de phosphorylation d'I $\kappa$ B et de la sous-unité p105 de NF- $\kappa$ B étaient plus faibles lorsque les cellules exprimaient très peu la MT1-MMP. Celle-ci jouerait donc un rôle dans l'activation de ces voies de signalisation, ayant un effet d'activation sur la voie NF- $\kappa$ B suite au stimulus pro-inflammatoire, soit le traitement au PMA. Donc, lors du stimulus pro-inflammatoire, la protéine inhibitrice de NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B, est phosphorylée et mène à l'activation des sous-unités p50 et RelA, qui migrent vers le noyau

pour réguler la transcription de gènes cibles. En l'absence de MT1-MMP, cette phosphorylation est inhibée, empêchant ainsi l'activation de la voie. Le mécanisme de cette régulation par MT1-MMP demeure cependant incompris, et l'implication de sa portion cytoplasmique dans la signalisation intracellulaire reste à être déterminée.

Pour ce faire, différentes constructions plasmidiques encodant MT1-MMP ont été surexprimées dans le modèle cellulaire, afin d'observer l'impact de cette surexpression seule sur les niveaux d'expression des biomarqueurs inflammatoires précédemment étudiés (Voir figure 4.1). Les constructions utilisées étant une construction encodant MT1-MMP de type sauvage (*wild type*), une encodant MT1-MMP tronquée de sa portion cytoplasmique ( $\Delta$ -cyto), et une dont la tyrosine 573 est remplacée par une phénylalanine (*y573f*), car il a été démontré que la phosphorylation de cette tyrosine par la kinase Src est importante dans le mécanisme de migration cellulaire (Nyalendo et al., 2007) et pourrait aussi être impliquée dans d'autres cascades signalétiques médiées par la portion cytoplasmique de MT1-MMP.

### **Implication de la portion cytoplasmique de MT1-MMP dans la régulation des biomarqueurs inflammatoires**

Étant donné les résultats obtenus lors des expériences précédentes, où l'inhibition d'expression de MT1-MMP corrélait avec une baisse d'induction des gènes de l'inflammasome par le PMA, nous anticipions qu'une surexpression de la protéine complète *wild type* de MT1-MMP provoque une induction de ces mêmes gènes, dont COX-2. De plus, il a déjà été démontré, dans un modèle de gliomes U87 CD33(+), que la MT1-MMP régule de façon directe l'expression de COX-2 via la voie NF- $\kappa$ B et ce, indépendamment de sa fonction catalytique (Annabi et al., 2009). Au contraire, nos résultats montrent que la surexpression de MT1-MMP provoque l'inhibition de l'expression de COX-2, mais aussi d'autres gènes de l'inflammasome régulés par NF- $\kappa$ B, soit IL-6, IL-12A, IL-33, CCL-5 et des sous-unités p50 et p65 de NF- $\kappa$ B. Parmi les gènes testés, les seuls induits par la surexpression de MT1-MMP sont ceux de l'IL-1 $\beta$  et du facteur de transcription ELK1, et cette induction est diminuée, ou même abrogée dans les cas où la protéine surexprimée ne comporte pas sa portion cytoplasmique, ou que la tyrosine 573 est mutée. Le mécanisme selon lequel MT1-

MMP régulerait à la hausse l'expression de l'IL-1 $\beta$  semble donc dépendre de la portion cytoplasmique, et, plus précisément, de la tyrosine en position 573. Cette induction de l'IL-1 $\beta$  peut être corrélée avec l'augmentation de l'expression du facteur ELK1, car celui-ci peut être activé via les voies JNK, p38 ou ERK1/2, suite à une stimulation par IL-1 $\beta$  et sa fixation à son récepteur (Kasza, 2013a). Par contre, cette même stimulation par l'IL-1 $\beta$  active aussi la transcription de gènes via la voie NF- $\kappa$ B (Kasza, 2013a), donc une augmentation de son expression mènerait normalement à une hausse dans l'expression d'autres biomarqueurs inflammatoires comme COX-2, IL-6, IL-33 et IL-12A (Vendramini-Costa & Carvalho, 2012), mais nos résultats montrent plutôt une baisse dans l'expression de ces gènes. Cette baisse pourrait s'expliquer par le fait que la surexpression de la MT1-MMP provoque aussi une baisse d'expression dans les sous-unités p50 et p65, inhibant ainsi l'expression des gènes régulés par celles-ci.

Pour ce qui est des biomarqueurs inhibés lors d'une surexpression de MT1-MMP, l'inhibition semble dépendante de la portion cytoplasmique. En effet, les niveaux d'expression de COX-2, IL-6, IL-33 et CCL5 reviennent à des niveaux de base lors de la surexpression de la MT1-MMP ne possédant pas de portion cytoplasmique. Pour l'IL-12A, nous observons même que l'absence de portion cytoplasmique provoque une augmentation du niveau d'expression par rapport au niveau de base. Pour les facteurs EGR1 et p50, le niveau d'expression en absence de portion cytoplasmique est un peu plus élevé, mais n'atteint pas le niveau de base. En résumé, ces résultats démontrent l'importance de la portion cytoplasmique de MT1-MMP sur la régulation de plusieurs biomarqueurs inflammatoires : l'expression de leurs gènes est inhibée par la présence de MT1-MMP, mais cette inhibition est abrogée complètement, ou en partie, lorsque la MT1-MMP recombinante est tronquée de sa portion intracytoplasmique.

### **Comparaison avec d'autres isoformes de MT-MMP**

Tout comme la MT1-MMP, les autres métalloprotéinases membranaires jouent des rôles importants dans de nombreux processus biologiques, incluant la progression tumorale (Itoh, 2015). Par exemple, MT2-MMP est impliquée dans l'angiogénèse des matrices de fibrine (Lafleur, Handsley, Knauper, Murphy, & Edwards, 2002), MT3-MMP est hautement

exprimée dans les tumeurs agressives de mélanome humain (Tatti et al., 2011), MT4-MMP promeut la progression tumorale et les métastases chez le cancer du sein (Chabottaux et al., 2006), et MT6-MMP est impliquée dans la progression tumorale de plusieurs types de cancers (Velasco et al., 2000). En fonction des résultats obtenus dans le cadre de ce projet, où la MT1-MMP semble impliquée dans les mécanismes d'inflammation tumorale de par ses fonctions non-catalytiques et sa portion cytoplasmique, il serait intéressant de comparer celle-ci avec les isoformes de MT-MMP ayant une structure similaire, et qui comportent elles aussi une portion cytoplasmique, soient MT2-, MT3- et MT5-MMP (Itoh, 2015). Ces MT-MMPs sont aussi impliquées dans les mécanismes inflammatoires, agissant comme médiateurs dans les fonctions leucocytaires, et jouent un rôle dans les maladies inflammatoires dont l'athérosclérose, l'arthrite rhumatoïde, et la sclérose multiple (Marco, Fortin, & Fulop, 2013). Les mécanismes connus par lesquels celles-ci promeuvent l'inflammation sont principalement liés à leur fonction protéolytique : la MT1-, MT2- et MT3-MMP ont toutes comme substrat et contribuent au clivage du proTNF- $\alpha$ , favorisant ainsi l'inflammation (Marco et al., 2013). Il a aussi été démontré que la MT5-MMP est essentielle au développement de l'hyperalgésie inflammatoire chez la souris, via les voies impliquant le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  (Folgueras et al., 2009). La MT1-MMP demeure néanmoins la métalloprotéinase membranaire dont les rôles sont les plus documentés, et de plus en plus d'études démontrent l'importance de sa portion cytoplasmique sur les voies de signalisation cellulaires. Par contre, l'implication des autres isoformes de MT-MMP, et leurs fonctions non-catalytiques dans les mécanismes liés à l'inflammation tumorale demeurent obscures et c'est pourquoi cette étude ouvre la porte sur l'élucidation et la compréhension de tels mécanismes.

### **Agents thérapeutiques et leur impact sur l'inflammation tumorale**

Les MMPs ont longtemps été considérées comme des cibles thérapeutiques potentielles pour différentes maladies, dont le cancer et certaines maladies inflammatoires. A ce titre, différentes molécules et peptides ont été développés pour agir en tant qu'inhibiteurs spécifiques à certains domaines présents au sein des différentes isoformes (Fields, 2015). Par exemple, l'anticorps monoclonal 9E8 cible une boucle spécifique dans le domaine catalytique

de MT1-MMP, de façon à inhiber l'activation de la proMMP-2, sans affecter ses autres fonctions catalytiques (Woskowicz, Weaver, Shitomi, Ito, & Itoh, 2013). De plus, il a été démontré que le ciblage de MT1-MMP par l'anticorps DX-2400, couplé au blocage du TNF par une protéine de fusion, ralentit la progression de l'arthrite inflammatoire chez la souris et inhibe la surexpression de l'IL-12 (Kaneko et al., 2016). D'après les résultats obtenus lors de ce projet, la régulation de l'inflammation tumorale par MT1-MMP semble indépendante de ses fonctions catalytiques. Ainsi, dans un contexte thérapeutique, il serait envisageable de cibler MT1-MMP via ses fonctions non-catalytiques. À ce titre, le polyphénol épigallocatechine-3-galate (EGCG) extrait du thé vert a été démontré comme étant un inhibiteur efficace de MT1-MMP (Annabi et al., 2002), et ayant des propriétés anti-inflammatoires (Ellis et al., 2011). En effet, il a été démontré que l'EGCG causerait une inhibition de NF- $\kappa$ B chez le mélanome, due à une diminution dans la sécrétion d'IL-1 $\beta$  via la répression d'un gène de l'inflammasome, le gène NLRP1 (Ellis et al., 2011). Chez la souris, il a aussi été démontré que l'EGCG inhibe l'activation de l'inflammasome par NLRP3 en promouvant la voie de signalisation de l'antioxydant Nrf2 (Tsai et al., 2011). Par contre, les mécanismes par lesquels l'EGCG agit sur l'inflammasome demeurent peu documentés. L'implication de la MT1-MMP dans la régulation des gènes de l'inflammasome constatée dans le cadre de ce projet pourrait expliquer en partie l'effet de l'EGCG sur les voies de signalisation liées à l'inflammation. Étant donné les nombreuses fonctions des MMPs, et toutes les voies de signalisation dans lesquelles elles sont impliquées, beaucoup de thérapies impliquant des inhibiteurs de MMPs ont causé des effets secondaires indésirables (Chaudhary, Chaudhary, Ghosh, & Nadkarni, 2016). La compréhension des mécanismes impliquant la MT1-MMP, et les liens démontrés entre celle-ci et l'inflammation tumorale pourraient permettre de mieux cibler ses fonctions non-catalytiques, de façon à développer des médicaments plus efficaces dans le but de traiter les différentes maladies impliquant cette métalloprotéinase.

### **Applicabilité à d'autres types de cancers**

Étant donné les résultats obtenus lors de cette étude, effectuée sur un modèle de fibrosarcomes humains, il serait intéressant de faire le parallèle entre l'implication de MT1-

MMP dans l'inflammation tumorale observée dans ce contexte, et les rôles que jouerait celle-ci dans différents types de cancers. Tel que mentionné précédemment, MT1-MMP régulerait la transcription, possiblement via la signalisation médiée par sa portion cytoplasmique, des biomarqueurs inflammatoires COX-2 et MMP-9 en réponse à des traitements au PMA et au lupéol, un triterpénoïde présent dans plusieurs fruits et légumes, dans un modèle de médulloblastomes (Annabi et al., 2013). De plus, il a aussi été démontré que l'augmentation d'expression de celle-ci est induite par la Concanavaleine-A (ConA), qui induit aussi l'autophagie et l'inflammation dans un modèle d'hépatome humain HepG2, et que cette induction est abrogée par la minocycline, qui est un dérivé de l'antibiotique anti-inflammatoire, la tétracycline (Desjarlais et al., 2014). Plus précisément, la minocycline exercerait ses propriétés anti-inflammatoires via la voie JAK/STAT, qui est médiée par MT1-MMP (Desjarlais et al., 2014), possiblement par sa fonction dans la signalisation intracellulaire (Zgheib, Lamy, & Annabi, 2013). Il a aussi été démontré que MT1-MMP induit l'expression de COX-2 par sa régulation intracellulaire de la voie IKK/NF- $\kappa$ B dans un modèle de glioblastomes U87 (Sina et al., 2010). Dans l'ensemble, ces évidences portent à croire que les fonctions de MT1-MMP dans la signalisation cellulaire et son implication dans les mécanismes d'inflammation tumorale observées dans le cadre de ce projet pourraient être transposées dans différentes lignées cellulaires et autres types de cancers que le fibrosarcome humain.

### **Conclusions et perspectives**

Ce projet nous a permis de démontrer l'implication de la MT1-MMP dans la régulation des biomarqueurs de l'inflammation dans la signalisation engendrée par le PMA, mais aussi via son niveau d'expression seulement. Les mécanismes selon lesquels elle régulerait l'expression de ces gènes semblent différents dans les deux cas, mais son implication est évidente. Dans le cas de la signalisation en réponse au PMA, l'inhibition transcriptionnelle de MT1-MMP affecte l'induction (ou la répression) de nombreux biomarqueurs inflammatoires comme COX-2, IL-1 $\beta$  et IL-6 et facteurs de transcription tels que EGR1 et ELK1, ainsi que l'activation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B. Pour ce qui est de la régulation de ces biomarqueurs par le niveau d'expression seul de MT1-MMP, nous avons été en mesure de

déterminer que sa surexpression affecte aussi la régulation des gènes de ces mêmes biomarqueurs, et que cette régulation dépend en partie de la portion intracellulaire de la protéine.

Peu d'études ont tenté d'effectuer le lien entre la signalisation intracellulaire régie par MT1-MMP et les mécanismes d'inflammation, et notre étude a permis de faire la lumière sur cette interaction. Bien que nous ayons déterminé plusieurs biomarqueurs et facteurs de transcription impliqués dans cette régulation, et ciblé des voies de signalisation affectées par la MT1-MMP, les mécanismes par lesquels celle-ci régule ces voies restent méconnus. Cela ouvre donc la porte à plusieurs études visant à élucider ces mécanismes, qui pourraient permettre de mieux comprendre les liens entre cette métalloprotéinase, surexprimée dans plusieurs types de cancers, et l'inflammation, qui joue un rôle important dans la progression tumorale, pour éventuellement mieux utiliser ces voies de signalisation comme cibles thérapeutiques, autant dans les cancers que dans les maladies liées à l'inflammation chronique.

## RÉFÉRENCES

- Akla, N., Pratt, J., & Annabi, B. (2012). Concanavalin-A triggers inflammatory response through JAK/STAT3 signalling and modulates MT1-MMP regulation of COX-2 in mesenchymal stromal cells. *Exp Cell Res*, 318(19), 2498-2506. doi: 10.1016/j.yexcr.2012.08.003
- Annabi, B., Lachambre, M. P., Bousquet-Gagnon, N., Page, M., Gingras, D., & Beliveau, R. (2002). Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin 3-gallate inhibits MMP-2 secretion and MT1-MMP-driven migration in glioblastoma cells. *Biochim Biophys Acta*, 1542(1-3), 209-220.
- Annabi, B., Laflamme, C., Sina, A., Lachambre, M., & Beliveau, R. (2009). A MT1-MMP/NF- $\kappa$ B signaling axis as a checkpoint controller of COX-2 expression in CD133(+) U87 glioblastoma cells. *Journal of Neuroinflammation*, 6, 8-8. doi: 10.1186/1742-2094-6-8
- Annabi, B., Vaillancourt-Jean, E., & Beliveau, R. (2013). MT1-MMP expression level status dictates the in vitro action of lupeol on inflammatory biomarkers MMP-9 and COX-2 in medulloblastoma cells. *Inflammopharmacology*, 21(1), 91-99. doi: 10.1007/s10787-012-0142-8
- Bailón-Moscoso, N., Romero-Benavides, J., & Ostrosky-Wegman, P. (2014). Development of anticancer drugs based on the hallmarks of tumor cells. *Tumor Biology*, 35(5), 3981-3995. doi: 10.1007/s13277-014-1649-y
- Bièche, I., Lerebours, F., Tozlu, S., Espie, M., Marty, M., & Lidereau, R. (2004). Molecular Profiling of Inflammatory Breast Cancer: Identification of a Poor-Prognosis Gene Expression Signature. *Clinical Cancer Research*, 10(20), 6789-6795. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-04-0306
- Chabottaux, V., Sounni, N. E., Pennington, C. J., English, W. R., van den Brule, F., Blacher, S., . . . Noel, A. (2006). Membrane-type 4 matrix metalloproteinase promotes breast cancer growth and metastases. *Cancer Res*, 66(10), 5165-5172. doi: 10.1158/0008-5472.can-05-3012
- Chai, E. Zhi P., Siveen, Kodappully S., Shanmugam, Muthu K., Arfuso, F., & Sethi, G. (2015). Analysis of the intricate relationship between chronic inflammation and cancer. *Biochemical Journal*, 468(1), 1-15. doi: 10.1042/bj20141337
- Chang, M. S., Chen, B. C., Yu, M. T., Sheu, J. R., Chen, T. F., & Lin, C. H. (2005). Phorbol 12-myristate 13-acetate upregulates cyclooxygenase-2 expression in human pulmonary epithelial cells via Ras, Raf-1, ERK, and NF-kappaB, but not p38 MAPK, pathways. *Cell Signal*, 17(3), 299-310. doi: 10.1016/j.cellsig.2004.07.008
- Chaudhary, A. K., Chaudhary, S., Ghosh, K., & Nadkarni, A. (2016). Pleiotropic Roles of Metalloproteinases in Hematological Malignancies: an Update. *Asian Pac J Cancer Prev*, 17(7), 3043-3051.
- Cho, C. H., & Yu, J. (2012). *From Inflammation to Cancer: Advances in Diagnosis and Therapy for Gastrointestinal and Hepatological Diseases*: World Scientific.



- 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. doi: 10.4137/grsb.s13946
- Ellis, L. Z., Liu, W., Luo, Y., Okamoto, M., Qu, D., Dunn, J. H., & Fujita, M. (2011). Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate suppresses melanoma growth by inhibiting inflammasome and IL-1 $\beta$  secretion. *Biochem Biophys Res Commun*, 414(3), 551-556. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.09.115
- Fan, Y., Mao, R., & Yang, J. (2013). NF- $\kappa$ B and STAT3 signaling pathways collaboratively link inflammation to cancer. *Protein & Cell*, 4(3), 176-185. doi: 10.1007/s13238-013-2084-3
- Fernandes, J., Cobucci, R., Jatobá, C., de Medeiros Fernandes, T., de Azevedo, J., & de Araújo, J. (2015). The Role of the Mediators of Inflammation in Cancer Development. *Pathology & Oncology Research*, 1-8. doi: 10.1007/s12253-015-9913-z
- Fields, G. B. (2015). New strategies for targeting matrix metalloproteinases. *Matrix Biol*, 44-46, 239-246. doi: 10.1016/j.matbio.2015.01.002
- Fletcher, C. D. M., Unni, K. K., & Mertens, F. (2002). *Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone*: IARC Press.
- Folgueras, A. R., Valdes-Sanchez, T., Llano, E., Menendez, L., Baamonde, A., Denlinger, B. L., . . . Lopez-Otin, C. (2009). Metalloproteinase MT5-MMP is an essential modulator of neuro-immune interactions in thermal pain stimulation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106(38), 16451-16456. doi: 10.1073/pnas.0908507106
- Gitenay, D., & Baron, V. T. (2009). Is EGR1 a potential target for prostate cancer therapy? *Future oncology (London, England)*, 5(7), 993-1003. doi: 10.2217/fon.09.67
- Gupta, S. P. (2012). *Matrix Metalloproteinase Inhibitors: Specificity of Binding and Structure-Activity Relationships*: Springer Basel.
- Hanahan, D., & Weinberg, Robert A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646-674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013
- Harris, R. E. (2002). *COX-2 Blockade in Cancer Prevention and Therapy*: Humana Press.
- Hugo, H., Saunders, C., Ramsay, R. G., & Thompson, E. W. (2015). New Insights on COX-2 in Chronic Inflammation Driving Breast Cancer Growth and Metastasis. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 1-11. doi: 10.1007/s10911-015-9333-4
- Iliopoulos, D., Hirsch, H. A., & Struhl, K. (2009). An epigenetic switch involving NF- $\kappa$ B, Lin28, let-7 microRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation. *Cell*, 139(4), 693-706. doi: 10.1016/j.cell.2009.10.014
- Ito, H., Duxbury, M., Benoit, E., Clancy, T. E., Zinner, M. J., Ashley, S. W., & Whang, E. E. (2004). Prostaglandin E2 Enhances Pancreatic Cancer Invasiveness through an Ets-1-Dependent Induction of Matrix Metalloproteinase-2. *Cancer research*, 64(20), 7439-7446. doi: 10.1158/0008-5472.can-04-1177
- Itoh, Y. (2015). Membrane-type matrix metalloproteinases: Their functions and regulations. *Matrix Biology*(0).

- Kaneko, K., Williams, R. O., Dransfield, D. T., Nixon, A. E., Sandison, A., & Itoh, Y. (2016). Selective Inhibition of Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase Abrogates Progression of Experimental Inflammatory Arthritis: Synergy With Tumor Necrosis Factor Blockade. *Arthritis Rheumatol*, 68(2), 521-531. doi: 10.1002/art.39414
- Kasza, A. (2013a). IL-1 and EGF regulate expression of genes important in inflammation and cancer. *Cytokine*, 62(1), 22-33.
- Kasza, A. (2013b). Signal-dependent Elk-1 target genes involved in transcript processing and cell migration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1829(10), 1026-1033.
- Lafleur, M. A., Handsley, M. M., Knauper, V., Murphy, G., & Edwards, D. R. (2002). Endothelial tubulogenesis within fibrin gels specifically requires the activity of membrane-type-matrix metalloproteinases (MT-MMPs). *J Cell Sci*, 115(Pt 17), 3427-3438.
- Liu, C., Rangnekar, V. M., Adamson, E., & Mercola, D. (1997). Suppression of growth and transformation and induction of apoptosis by EGR-1. *Cancer gene therapy*, 5(1), 3-28.
- Marco, M., Fortin, C., & Fulop, T. (2013). Membrane-type matrix metalloproteinases: key mediators of leukocyte function. *J Leukoc Biol*, 94(2), 237-246. doi: 10.1189/jlb.0612267
- Nyalendo, C., Michaud, M., Beaulieu, E., Roghi, C., Murphy, G., Gingras, D., & Béliveau, R. (2007). Src-dependent Phosphorylation of Membrane Type I Matrix Metalloproteinase on Cytoplasmic Tyrosine 573: ROLE IN ENDOTHELIAL AND TUMOR CELL MIGRATION. *Journal of Biological Chemistry*, 282(21), 15690-15699. doi: 10.1074/jbc.M608045200
- Oettgen, P. (2006). Regulation of Vascular Inflammation and Remodeling by ETS Factors. *Circulation Research*, 99(11), 1159-1166. doi: 10.1161/01.RES.0000251056.85990.db
- Oliver, J. R., Kushwah, R., & Hu, J. (2012). Multiple roles of the epithelium-specific ETS transcription factor, ESE-1, in development and disease. *Lab Invest*, 92(3), 320-330.
- Park, J. M., Kim, A., Oh, J. H., & Chung, A. S. (2007). Methylseleninic acid inhibits PMA-stimulated pro-MMP-2 activation mediated by MT1-MMP expression and further tumor invasion through suppression of NF-kappaB activation. *Carcinogenesis*, 28(4), 837-847. doi: 10.1093/carcin/bgl203
- Porta, C., Larghi, P., Rimoldi, M., Totaro, M. G., Allavena, P., Mantovani, A., & Sica, A. (2009). Cellular and molecular pathways linking inflammation and cancer. *Immunobiology*, 214(9-10), 761-777. doi: 10.1016/j.imbio.2009.06.014
- Rasheed, S., Nelson-Rees, W. A., Toth, E. M., Arnstein, P., & Gardner, M. B. (1974). Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). *Cancer*, 33(4), 1027-1033. doi: 10.1002/1097-0142(197404)33:4<1027::AID-CNCR2820330419>3.0.CO;2-Z
- Rath, T., Billmeier, U., Waldner, M., Atreya, R., & Neurath, M. (2015). From physiology to disease and targeted therapy: interleukin-6 in inflammation and inflammation-associated carcinogenesis. *Archives of Toxicology*, 89(4), 541-554. doi: 10.1007/s00204-015-1461-5

- Ruddon, R. W. (2007). *Cancer Biology*: Oxford University Press, USA.
- Sagi, I., & Gaffney, J. (2015). *Matrix Metalloproteinase Biology*: Wiley.
- Sakamoto, T., & Seiki, M. (2009). Cytoplasmic tail of MT1-MMP regulates macrophage motility independently from its protease activity. *Genes to Cells*, *14*(5), 617-626.
- Serhan, C. N., Ward, P. A., & Gilroy, D. W. (2010). *Fundamentals of Inflammation*: Cambridge University Press.
- Seth, A., & Watson, D. K. (2005). ETS transcription factors and their emerging roles in human cancer. *European Journal of Cancer*, *41*(16), 2462-2478. doi: 10.1016/j.ejca.2005.08.013
- Shimizu-Hirota, R., Xiong, W., Baxter, B. T., Kunkel, S. L., Maillard, I., Chen, X.-W., . . . Weiss, S. J. (2012). MT1-MMP regulates the PI3K $\delta$ -Mi-2/NuRD-dependent control of macrophage immune function. *Genes & Development*, *26*(4), 395-413. doi: 10.1101/gad.178749.111
- Shin, S. Y., Kim, J. H., Baker, A., Lim, Y., & Lee, Y. H. (2010). Transcription Factor Egr-1 Is Essential for Maximal Matrix Metalloproteinase-9 Transcription by Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ . *Molecular Cancer Research*, *8*(4), 507-519. doi: 10.1158/1541-7786.mcr-09-0454
- 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 IKK $\gamma$ /NF- $\kappa$ B-dependent pathway. *J Cell Commun Signal*, *4*(1), 31-38. doi: 10.1007/s12079-009-0084-0
- Tatti, O., Arjama, M., Ranki, A., Weiss, S. J., Keski-Oja, J., & Lehti, K. (2011). Membrane-type-3 matrix metalloproteinase (MT3-MMP) functions as a matrix composition-dependent effector of melanoma cell invasion. *PLoS One*, *6*(12), e28325. doi: 10.1371/journal.pone.0028325
- Tauro, M., McGuire, J., & Lynch, C. (2014). New approaches to selectively target cancer-associated matrix metalloproteinase activity. *Cancer and Metastasis Reviews*, *33*(4), 1043-1057. doi: 10.1007/s10555-014-9530-4
- Toufaily, C., Charfi, C., Annabi, B., & Annabi, B. (2014). A Role for the Cavin-3/Matrix Metalloproteinase-9 Signaling Axis in the Regulation of PMA-Activated Human HT1080 Fibrosarcoma Cell Neoplastic Phenotype. *Cancer Growth and Metastasis*, *7*, 43-51. doi: 10.4137/CGM.S18581
- Tsai, P. Y., Ka, S. M., Chang, J. M., Chen, H. C., Shui, H. A., Li, C. Y., . . . Chen, A. (2011). Epigallocatechin-3-gallate prevents lupus nephritis development in mice via enhancing the Nrf2 antioxidant pathway and inhibiting NLRP3 inflammasome activation. *Free Radic Biol Med*, *51*(3), 744-754. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.016
- Turner, D. P., Findlay, V. J., Moussa, O., & Watson, D. K. (2007). Defining ETS transcription regulatory networks and their contribution to breast cancer progression. *Journal of Cellular Biochemistry*, *102*(3), 549-559. doi: 10.1002/jcb.21494
- Velasco, G., Cal, S., Merlos-Suarez, A., Ferrando, A. A., Alvarez, S., Nakano, A., . . . Lopez-Otin, C. (2000). Human MT6-matrix metalloproteinase: identification, progelatinase A activation, and expression in brain tumors. *Cancer Res*, *60*(4), 877-882.
- Vendramini-Costa, D. B., & Carvalho, J. E. (2012). Molecular link mechanisms between inflammation and cancer. *Current pharmaceutical design*, *18*(26), 3831-3852.

- Voronov, E., Carmi, Y., & Apte, R. N. (2014). The role IL-1 in tumor-mediated angiogenesis. *Frontiers in Physiology*, *5*, 114. doi: 10.3389/fphys.2014.00114
- Woskowicz, A. M., Weaver, S. A., Shitomi, Y., Ito, N., & Itoh, Y. (2013). MT-LOOP-dependent localization of membrane type I matrix metalloproteinase (MT1-MMP) to the cell adhesion complexes promotes cancer cell invasion. *J Biol Chem*, *288*(49), 35126-35137. doi: 10.1074/jbc.M113.496067
- Xia, Y., Shen, S., & Verma, I. M. (2014). NF- $\kappa$ B, an active player in human cancers. *Cancer immunology research*, *2*(9), 823-830. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0112
- Yadav, L., Puri, N., Rastogi, V., Satpute, P., Ahmad, R., & Kaur, G. (2013). Matrix metalloproteinases and cancer-roles in threat and therapy. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, *15*(3), 1085-1091.
- Yu, H., Lee, H., Herrmann, A., Buettner, R., & Jove, R. (2014). Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions. *Nat Rev Cancer*, *14*(11), 736-746. doi: 10.1038/nrc3818
- Zabuawala, T., Taffany, D. A., Sharma, S. M., Merchant, A., Adair, B., Srinivasan, R., . . . Ostrowski, M. C. (2010). An Ets2-Specific Transcriptional Program in Tumor Associated Macrophages Promotes Tumor Metastasis. *Cancer research*, *70*(4), 1323. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1474
- 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*(19), 13378-13386. doi: 10.1074/jbc.M113.456533
- Zhang, X., Zhang, J., Yang, X., & Han, X. (2007). Several transcription factors regulate COX-2 gene expression in pancreatic  $\beta$ -cells. *Molecular Biology Reports*, *34*(3), 199-206. doi: 10.1007/s11033-007-9085-3