

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

SIGNALETIC PARTNERS OF MT1-MMP IN HYPOXIC MESENCHYMAL STEM
CELLS AND SURVIVAL FUNCTIONS IN GLIOBLASTOMA MULTIFORM CELLS

THESIS PRESENTED AS PARTIAL REQUIREMENT
OF THE MASTERS OF BIOCHEMISTRY

BY
SÉBASTIEN PROULX-BONNEAU

SEPTEMBER 2011

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.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.»

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

PARTENAIRES SIGNALÉTIQUES DE MT1-MMP DANS LES CELLULES SOUCHES
MÉSENCHYMATEUSES HYPOXIQUES ET FONCTIONS DE SURVIE DANS LES
CELLULES DE GLIOBLASTOME MULTIFORME

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR
SÉBASTIEN PROULX-BONNEAU

SEPTEMBRE 2011

REMERCIEMENTS

Je souhaite en premier lieu remercier mon directeur de recherche, Dr Borhane Annabi, pour toute la confiance qu'il m'a accordée. Son ardeur scientifique, sa motivation et son support constant m'ont permis d'évoluer avec aisance et détermination dans le monde scientifique et de réaliser ces travaux de recherche avec sans cesse plus d'autonomie.

Mes chaleureux remerciements à Asmaa Sina; ton enseignement rigoureux m'a mis sur le droit chemin dès le départ! Merci à mes collègues: Julie, Simon, Elizabeth, Eric, Sabrina, Amélie. Nos longues heures de travail acharné furent illustres et toujours enrichissantes. Merci également à tous mes patients à l'unité d'hémato-oncologie du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, nos discussions hebdomadaires m'ont toujours ramené sur terre et donné l'énergie pour continuer d'avancer.

Sans oublier ceux qui m'ont permis de tenir le coup d'un peu plus loin. Saolie Dubois, merci de ton support moral constant et d'avoir pris soin de mes doux enfants Barbara et Bertrand; Julien Hamilton, ton humour contagieux m'a redonné le sourire dans les moments les plus difficiles, merci aussi pour tes talents incomparables de traducteur scientifique; Joëlle Bertrand, merci d'avoir toujours cru en moi; François Malo, Valérie Kingsbury, Luc 'Culcul' Bourgeois et Tristan Galbas, la hauteur de vos ambitions, votre humilité et votre chaleur humaine m'ont motivé à toujours viser plus haut.

Enfin, je souhaite souligner la contribution financière du Fonds Québécois de Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT) par l'octroi d'une bourse de recherche, sans laquelle ces travaux n'auraient pas été possibles.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	x
RÉSUMÉ	xiii
ABSTRACT.....	xiv
CHAPITRE I	
INTRODUCTION	1
1.1 Le cancer	1
1.1.1 Généralités	1
1.1.2 Les tumeurs cérébrales	2
1.1.3 Oncogenèse.....	2
1.1.4 Invasion et métastase	3
1.2 Les métalloprotéases de la matrice extracellulaire.....	6
1.2.1 La matrice extracellulaire	6
1.2.2 Classification et structure des MMPs	6
1.2.3 Les MMPs et la progression tumorale.....	7
1.2.3.1 Les MMPs et la transition épithélio-mésenchymateuse	8
1.2.3.2 Les MMPs et la prolifération cellulaire	9
1.2.3.3 Les MMPs et la survie cellulaire	9
1.2.3.4 Les fonctions non-protéolytiques des MMPs	10
1.3 L'hypoxie	11
1.3.1 Le facteur de transcription HIF-1	11
1.3.2 Le microenvironnement tumoral hypoxique et l'angiogénèse	12
1.3.3 La contribution des MSC hypoxiques à la progression tumorale.....	14
1.4 Le réticulum endoplasmique.....	15
1.4.1 Structure et fonctions du réticulum endoplasmique	15

1.4.2 La protection du RE par la réponse UPR	16
1.4.3 L'induction de l'apoptose par la voie UPR	17
CHAPITRE II	
PROJET DE RECHERCHE	31
2.1 Problématique	31
2.2 Hypothèses de travail	32
2.3 Objectifs de recherche.....	33
CHAPITRE III	
A ROLE FOR MT1-MMP AS A CELL DEATH SENSOR/EFFECTOR THROUGH THE REGULATION OF ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS IN U87 GLIOBLASTOMA CELLS	34
Abstract	36
Introduction.....	37
Materials and methods	39
Results.....	42
Discussion	46
Acknowledgements	49
Figures.....	50
References.....	57
CHAPITRE IV	
A CONCERTED HIF-1A/MT1-MMP SIGNALLING AXIS REGULATES THE EXPRESSION OF THE 3BP2 ADAPTOR PROTEIN IN HYPOXIC MESENCHYMAL STROMAL CELLS.....	63
Abstract	65
Introduction	66
Materials and methods	68
Results	71
Discussion	75

Figures.....	80
References.....	87
CHAPITRE V	
DISCUSSION	96
RÉFÉRENCES.....	103

LISTE DES FIGURES

Figures	Page
1.1 Caractéristiques fondamentales des cellules cancéreuses.....	19
1.2 Titre.....	20
1.3 Titre.....	21
1.4 Classification et structure des MMPs.....	22
1.5 Structure active de MT1-MMP	23
1.6 Régulation du facteur de transcription HIF-1	24
1.7 Contribution des MSC à la vascularisation tumorale.....	26
1.8 Structure du réticulum endoplasmique	27
1.9 Repliement des protéines dans le RE en conditions physiologiques	28
1.10 Action pro- et anti-apoptotiques du stress endoplasmique	29
1.11 Le stress du RE contrôle la survie et la prolifération des cellules tumorales.....	30
3.1 Brefeldin-A inhibits cell surface localization of MT1-MMP	50
3.2 Concanavalin-A triggers MT1-MMP gene expression	51
3.3 Brefeldin inhibits MT1-MMP trafficking to the plasma membrane.....	52
3.4 MT1-MMP proteolytic processing does not contribute to the induction of endoplasmic reticulum stress by Concanavalin-A	53
3.5 Inhibition of MT1-MMP vesicular trafficking triggers endoplasmic reticulum stress.....	54
3.6 Endoplasmic reticulum trapping of MT1-MMP triggers cell death signalling.....	55
3.7 Schematic representation of the possible mechanisms involved in MT1-MMP-mediated ER stress and cell death signalling in U87 glioblastoma cells.....	56

4.1 Hypoxic culture conditions upregulate 3BP2 gene expression.....	80
4.2 Gene silencing of HIF-1 α antagonizes the effects of hypoxia on 3BP2 gene and protein expression.....	81
4.3 3BP2 silencing abrogates MSC migration in response to hypoxic culture conditions	82
4.4 Stable expression of HIF-1 α increases 3BP2 basal expression and MSC migration.....	83
4.5 Gene silencing of MT1-MMP antagonized the effects of hypoxia on 3BP2 gene expression.....	84
4.6 3BP2 induction requires MT1-MMP cytoplasmic domain-mediated signalling	85
4.7 Putative mechanisms involved in 3BP2 response to hypoxia and recruitment by MT1-MMP.....	86
5.1 Fonctions cellulaires de la protéine adaptatrice 3BP2	101
5.2 Nouvelles fonctions cytoplasmiques de MT1-MMP	102

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Gènes cibles du facteur de transcription HIF-1	25

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

3BP2	<i>Abl-SH3-domain binding protein 2</i>
ADAM	Métalloprotéase et désintégrine
ADN	Acide désoxyribonucléique
Akt/PKB	Protéine kinase B
ARNT	Translocateur nucléaire de l'aryl hydrocarbone
ATF	<i>cAMP response element-binding transcription factor</i>
ATP	Adénosine triphosphate
BCL2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
bFGF	Facteur de croissance basal des fibroblastes
Bref	Brefeldine A
BSA	Albumine sérique bovine
Cdc42	<i>Cell division control protein 42</i>
CHOP	<i>C/EBP homologous protein</i>
ConA	Concanavaline A
COX-2	Cyclooxygénase 2
ECL	<i>Enhanced chemoluminescence</i>
ECM	<i>Extracellular matrix</i>
EGF	Facteur de croissance épidermal
EGFR	Récepteur de l'EGF
eIF2	Facteur d'initiation eucaryote 2
EMT	Transition épithélio-mésenchymateuse
EPO	Érythropoïétine
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
Fas	Fragment stimulateur de l'apoptose
FasL	Ligand de Fas
GADD	<i>Growth-arrest and DNA-damage inducible gene</i>
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GLUT1	Transporteur de glucose 1
GLUT3	Transporteur de glucose 3

GBM	Glioblastome multiforme
Grb2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
GRP78	<i>Glucose-related protein 78 kDa</i>
HIF-1	Facteur inducible par l'hypoxie 1
HSC	Cellules souches hématopoïétiques
IGF	Facteur de croissance homologue à l'insuline
IGFR	Récepteur de l'IGF
IgG	Immunoglobuline G
IRE1/ERN1	<i>anti-ER to nucleus signalling 1</i>
JNK	C-Jun N-terminal kinase
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MEC	Matrice extracellulaire
MHC	Complexe majeur d'histocompatibilité
MMP	Méalloprotéase matricielle
MPI	Inhibiteurs des métalloprotéases matricielles
MSC	Cellules souches mésenchymateuses
MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem
MT1-MMP	Méalloprotéase matricielle de type membranaire 1
NK	Cellule tueuse naturelle (<i>natural killer</i>)
ODD	Domaine de dégradation par l'oxygène
PERK	<i>PKR-like endoplasmic reticulum kinase</i>
PBS	Tampon phosphate salin
PCR	Réaction de la polymérase en chaîne
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PGE2	Prostaglandine E2
PH	Domaine d'homologie à la pleckstrine
PI3K	Phosphatidyl-inositol-3-kinase
PLC γ 2	Phospholipase gamma 2
pVHL	Protéine de Von Hippel-Lindau
RacI	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RE	Réticulum endoplasmique

RhoA	<i>Ras homolog gene family A</i>
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SDS-PAGE	Gel électrophorétique de polyacrylamide – SDS
SH2	<i>Src-homology 2</i>
SH3	<i>Src-homology 3</i>
Src	<i>Rous sarcoma tyrosine kinase</i>
Syk	<i>Spleen tyrosine kinase</i>
TBST	Tampon Tris salin avec Tween
TGF-α	Facteur de croissance transformant α
TGF-β	Facteur de croissance transformant β
TIMP	Inhibiteur tissulaire des métalloprotéases matricielles
TNF	Facteur nécrosant tumoral
TRB3	<i>Tribbles-related protein 3</i>
TSP-1	Thrombospondine 1
uPA	Activateur du plasminogène de type urokinase
UPR	<i>Unfolded protein response</i>
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
ZAP70	<i>Zeta-chain-associated protein kinase 70 kDa</i>

RÉSUMÉ

Le glioblastome multiforme (GBM) est une tumeur primaire du cerveau dont le pronostic est très sombre, en raison de son caractère infiltrant, de la radiorésistance de ses cellules et de la faible biodisponibilité encéphalique des molécules chimiothérapeutiques. De plus, les cellules souches mésenchymateuses (MSC) de la moelle osseuse sont recrutées au site tumoral et supportent la néovascularisation et le microenvironnement inflammatoire. Ces cellules ont la capacité de se mobiliser et de migrer vers la tumeur, en plus de s'adapter aux conditions hypoxiques tumorales. La métalloprotéase MT1-MMP est principalement responsable du phénotype migratoire des cellules de GBM et des MSC. Toutefois, le développement d'inhibiteurs de la fonction catalytique des métalloprotéases s'est révélé un échec en clinique et n'a pas réussi à améliorer la survie des patients atteints de GBM. De plus en plus d'évidences expérimentales démontrent de nouvelles fonctions non-protéolytiques des métalloprotéases et l'étude de ces fonctions permettra d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Considérant le rôle que joue le stress du réticulum endoplasmique (RE) dans l'induction de l'apoptose, que les cellules de GBM sont constitutivement stressées et surexpriment une grande quantité de MT1-MMP qui transit par le RE, nous avons émis l'hypothèse que MT1-MMP peut jouer un rôle de premier plan dans le contrôle de la balance survie/mort des cellules de GBM. De plus, considérant le recrutement des MSC au site tumoral hypoxique, leur migration en partie dépendante du domaine cytoplasmique de MT1-MMP et leur contribution à la progression tumorale du glioblastome, nous avons émis l'hypothèse que l'hypoxie et le facteur de transcription HIF-1 régulent l'expression de protéines de signalisation intracellulaires responsables de la signalisation par le domaine cytoplasmique de MT1-MMP et de la migration des MSC.

Nos résultats documentent deux nouvelles fonctions non-protéolytiques associées à MT1-MMP. D'une part, l'inhibition pharmacologique du trafic vésiculaire ou la simulation des interactions avec la matrice extracellulaire impose un grand stress endoplasmique et stimule l'apoptose par la voie UPR, mais la répression génique de MT1-MMP permet de renverser ce stress et la signalisation pro-apoptotique qui en découle, mettant en évidence le rôle primordial de MT1-MMP dans ces processus. La balance entre les signaux pro- et anti-apoptotiques découlant de la voie UPR est finement régulée et MT1-MMP participe à cette « décision cellulaire ». Enfin, il existe un axe de signalisation HIF-1/MT1-MMP/3BP2, dans les MSC, qui leur permet de se mobiliser et de migrer. La protéine adaptatrice 3BP2, connue pour son rôle dans la mobilisation des cellules inflammatoires, joue le rôle de médiateur de la signalisation migratoire des MSC en aval de MT1-MMP, en réponse à l'hypoxie.

En plus de ses fonctions catalytiques, la MT1-MMP est dotée de fonctions signalétiques dans le contrôle de la survie et de la migration cellulaire. Le ciblage de ces nouvelles fonctions signalétiques de MT1-MMP pourrait être une stratégie prometteuse pour le traitement du GBM.

Mots clés : glioblastome, cellules souches mésenchymateuses, hypoxie, MT1-MMP, stress du réticulum endoplasmique.

ABSTRACT

Glioblastoma multiforme (GBM) is a primary brain tumour whose prognostic is quite bad, partly because it is highly aggressive, radio-resistant and because of the low encephalic bioavailability of the usual chemotherapeutic agents. Moreover, bone-marrow mesenchymal stem cells (MSC) are recruited to the tumour, support its neovascularization, and sustain its inflammatory microenvironment. MSC have the ability to migrate towards the tumour, and adapt to its hypoxic environment. The metalloproteinase MT1-MMP is the principal protein involved in the migratory phenotype of GBM cells and MSC. However, the recent development of inhibitor of its catalytic function was found to be unsuccessful; the primary endpoint of the clinical studies wasn't attained. In the last few years, experimental evidences have ascribed new non-proteolytic functions to metalloproteinases. Studying these functions might lead to new therapeutic strategies.

Considering the role of the endoplasmic reticulum (ER) stress in the induction of apoptosis, that GBM cells are constitutively stressed and overexpress a lot of MT1-MMP that transit by the ER, we hypothesized that MT1-MMP might play crucial functions in cell survival/death balance in GBM cells. Moreover, considering the recruitment of MSC to hypoxic tumours, their MT1-MMP-dependent migration and their overall contribution to GBM progression, we hypothesized that hypoxia and the hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) might regulate the expression of intracellular signalling proteins involved in the regulation of MSC migration via MT1-MMP.

Our results highlight two new non-proteolytic functions for MT1-MMP. First, the pharmacological inhibition of the vesicular trafficking, or the simulation of extracellular matrix interactions trigger a lot of ER stress and leads to UPR-mediated apoptosis. Interestingly, MT1-MMP silencing prevents this apoptotic signalling and its underlying ER stress. Thus, MT1-MMP may impact on the ER-associated cell survival/death decision. Additionally, we highlighted a new HIF-1/MT1-MMP/3BP2 signalling axis in MSC that enables their hypoxic migration. The adaptor protein 3BP2, mostly studied in the mobilization of inflammatory cells, may trigger the hypoxia-induced migratory signalling in MSC and represent of potential therapeutic target.

Aside from its catalytic functions, MT1-MMP's cytoplasmic domain participates in cell survival and migration. Targeting these new signalling functions might represent a promising therapeutic strategy in GBM patients.

Key words: Glioblastoma, mesenchymal stem cells, hypoxia, MT1-MMP, endoplasmic reticulum stress.

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Le cancer

1.1.1 Généralités

Au 21^e siècle, le cancer est devenu la principale cause de mortalité dans les pays occidentaux, devançant les maladies cardiovasculaires. Au Canada seulement, 173,800 nouveaux cas de cancer seront diagnostiqués en 2010 et 76,200 personnes succomberont de la maladie (Comité directeur des Statistiques sur le cancer, 2010). Depuis les 50 dernières années, les traitements se sont énormément développés. Les techniques chirurgicales, la technologie de radiothérapie et les banques de composés chimiothérapeutiques ont évolué avec notre compréhension de la biologie du cancer. Pourtant, il reste encore beaucoup de travail à faire afin de mieux prendre en charge cette terrible maladie. Depuis que la science est entrée dans l'ère de la génétique, la biologie du cancer progresse très rapidement et il est maintenant clair que le cancer est une maladie des gènes (Stratton, 2011). En caractérisant adéquatement les quelques centaines de pathologies génétiquement distinctes qui font partie de la grande famille du cancer, il sera possible d'identifier avec précision le talon d'Achille de chaque cancer et de le traiter adéquatement (Stratton, 2011). Il est de plus évident que l'avenir du traitement du cancer repose sur la thérapie ciblée (Palazzo, Iacovelli et Cortesi, 2010). Certaines avancées phénoménales de la dernière décennie, tel le développement de l'imatinib (un inhibiteur de la kinase mutée Abl) ou du trastuzumab (un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur de facteurs de croissance HER2), ont d'ailleurs grandement amélioré le pronostic de millions de patients atteints de cancer (Igbokwe et Lopez-Terrada, 2011). En effet, le traitement de la leucémie myéloïde chronique exprimant la protéine de fusion Bcr-Abl avec l'imatinib, un inhibiteur spécifique de la kinase mutée Abl, a mené à un taux de survie sans progression de la maladie à 95% après 7 ans (Tauchi *et al.*, 2010). L'objectif est maintenant de décrire les mécanismes biochimiques propres à chaque type de cancer afin d'en cerner les failles, d'identifier des biomarqueurs appropriés et de développer des stratégies thérapeutiques appropriées.

1.1.2 Les tumeurs cérébrales

Les tumeurs cérébrales sont peu fréquentes par rapport à tous les nouveaux cas de cancer. Au Canada, on estime que 2,600 nouveaux cas seront diagnostiqués en 2010. Les tumeurs du cerveau sont classées selon le type cellulaire duquel elles proviennent. Les astrocytomes, les oligodendrogiomes et les épendymomes sont les plus courants. Les astrocytomes de grade IV sont les plus agressifs et envahissants; ils sont nommés glioblastomes multiformes (GBM) (Louis *et al.*, 2007). Le traitement de choix du GBM repose sur la chirurgie craniotomique, la radiothérapie externe et la chimiothérapie, plus particulièrement avec le témozolamide, un agent alkylant de l'ADN. Néanmoins, les traitements demeurent encore peu efficaces. Il est difficile de retirer complètement la tumeur en raison de ses contours diffus et de son infiltration au cœur des tissus cérébraux sains. De plus, une sous-population de cellules radiorésistantes parviennent rapidement à reformer la tumeur originale (Cordes *et al.*, 2003) et des doses sub-létales de radiation potentialisent même le caractère invasif de cette sous-population (Martinou *et al.*, 2011). De plus, la barrière hémato-encéphalique limite grandement l'efficacité de certains traitements de chimiothérapie. Dans l'ensemble, la survie médiane est de moins d'un an (Stupp *et al.*, 2005). Malgré la faible incidence du GBM, l'inefficacité actuelle des traitements justifie la recherche fondamentale afin de mieux comprendre les fondements biochimiques de cette pathologie et envisager la conception de nouvelles stratégies thérapeutiques.

1.1.3 Oncogenèse

L'évolution d'une cellule saine vers le stade cancéreux implique l'acquisition de huit caractéristiques biochimiques fondamentales: 1) l'autosuffisance en signaux de croissance, 2) l'insensibilité aux signaux antiprolifératifs, 3) l'inhibition de la mort programmée par apoptose, 4) l'angiogénèse soutenue, 5) l'immortalité réplicative, 6) la capacité d'invasion et de métastase, 7) la reprogrammation du métabolisme énergétique et 8) l'évasion immunitaire (Hanahan et Weinberg, 2011) (Figure 1). Plusieurs modèles de la carcinogénèse ont été proposés au cours des 60 dernières années. Le premier modèle, élaboré grâce aux études sur le tabagisme, implique principalement des mutations génétiques à la base de l'oncogenèse

(Doll et Peto, 1978). Le second modèle, développé en lien avec les études sur le rétinoblastome, propose l'instabilité génomique soutenue, entre autres, par l'inactivation des mécanismes de réparation de l'ADN (Beckman et Loeb, 2005). Le troisième modèle, plus récent, propose les changements épigénétiques causés par le mode de vie comme point central de l'oncogenèse. Tous ces modèles peuvent toutefois être consolidés en un seul. En effet, chacun de ces modèles décrit une ou plusieurs étapes de la carcinogénèse (Figure 2). L'**initiation** consiste en l'acquisition de mutations dans la séquence de l'ADN (Stratton, Campbell et Futreal, 2009). La cellule qui acquiert ainsi un avantage prolifératif est sélectionnée et poursuit sa croissance en développant de nouvelles mutations. À l'étape de **promotion**, les cellules sont davantage instables génétiquement et acquièrent de nouvelles mutations qui leur confèrent un nouvel avantage. Les changements épigénétiques participent à la reprogrammation génétique à partir de cette étape (Laird, 2005). Ensuite, à l'étape de **progression**, les cellules sont sélectionnées et créent une expansion clonale qui possède les caractéristiques histologiques d'un néoplasme (Vineis, Schatzkin et Potter, 2010). Les cellules cancéreuses ont maintenant acquis tous les changements génétiques leur conférant les huit caractéristiques biochimiques énoncées par Hanahan et Weinberg.

1.1.4 Invasion et métastase

Beaucoup d'efforts sont consacrés à l'étude des phénotypes invasifs et métastatiques des cellules cancéreuses, une caractéristique inhérente à la plasticité génétique acquise par ces cellules (Desplaces et Poupon, 1994), car les métastases sont responsables de plus de 90% des décès reliés au cancer (Chambers, Groom et MacDonald, 2002 ; Ledford, 2011). De plus, près de 80% des cancers sont des carcinomes, c'est-à-dire d'origine épithéliale (Weinberg, 2007). Une des premières étapes de la cascade métastatique consiste donc au détachement des cellules du feuillet épithélial. Les cellules qui forment un épithélium sont étroitement associées par des dispositifs de jonctions serrées, adhérentes, de type gap, ou par des desmosomes (Thiery et Sleeman, 2006). Elles sont polarisées, ayant un pôle basal fixé à une membrane basale, et un pôle apical, ayant des fonctions différentes; cette polarisation est maintenue par une organisation stricte du cytosquelette et la distribution des jonctions intercellulaires en formes de ceinture autour des cellules (Thiery et Sleeman, 2006).

Contrairement aux cellules épithéliales, les cellules mésenchymateuses ne forment pas une monocouche, mais sont distribuées inégalement dans l'espace, n'interagissant entre elles qu'à des points focaux. Elles ne sont pas polarisées, ne reposent pas sur une membrane basale et sont dotées d'une grande liberté de mouvement (Thiery et Sleeman, 2006). Chaque type cellulaire n'est toutefois pas condamné à son phénotype, et les cellules épithéliales adultes peuvent temporairement acquérir un phénotype fibroblastique, plus approprié à la mobilité cellulaire, via la transition épithélio-mésenchymateuse, notamment pour guérir une plaie de l'épithélium, mais également dans un contexte tumoral, pour envahir les tissus et former des métastases (Weinberg, 2007). Dans le cancer, un des événements moléculaire les plus important est l'arrêt de l'expression de l'E-cadhérine par les cellules épithéliales, une des molécules d'adhésion les plus importantes pour le maintien de l'intégrité épithéliale (Hanahan et Weinberg, 2011). Par la suite, les cellules cancéreuses peuvent poursuivre avec les étapes de la cascade métastatique.

Des cellules devront ensuite emprunter une voie de dissémination via le liquide céphalo-rachidien, le liquide péritonéal, le réseau lymphatique ou le réseau sanguin. L'entrée dans le système vasculaire, appelée **intravasation**, est la voie de dissémination la plus fréquente (Lee et Lim, 2007). Lors de la transition épithélio-mésenchymateuse, les cellules cancéreuses ont aussi acquis la capacité de survivre sans attachement dans la circulation sanguine, en inhibant l'anoikis, une forme d'apoptose induite par le détachement cellulaire (Sakamoto *et al.*, 2010). Les cellules doivent ensuite s'arrêter dans un lit vasculaire distant, en raison de leur taille. En effet, les capillaires ont un diamètre de 3 à 8 µm, adéquat pour le passage des érythrocytes, mais trop petit pour le passage de la plupart des cellules cancéreuses, dont la taille dépasse souvent 20 µm (Potter et Groom, 1983). Les cellules cancéreuses procèdent ensuite à l'**extravasation** afin de quitter le réseau sanguin et rejoindre le nouveau tissu, où elles formeront des micrométastases. La croissance d'une micrométastase en métastase cliniquement visible, l'étape de **colonisation**, est l'étape limitante de la métastasie et des cellules cancéreuses peuvent demeurer en dormance dans les tissus distants pendant de longues périodes avant d'acquérir la capacité de coloniser et de former des macrométastases (Rameshwar, 2010) (Figure 3). Par immunohistochimie et PCR, des centaines de micrométastases ont pu être détectées dans les tissus d'animaux et de patients qui ne

comportent pas encore de macrométastases visibles. En effet, la mise en évidence de protéines exclusivement épithéliales, telle que la cytokératine-20, dans un tissu mésenchymateux est signe de micrométastases. Le cycle de ces cellules est arrêté en phase G0; elles sont quiescentes, en attente de conditions favorables à leur croissance (Naumov *et al.*, 2002). Cette propriété des micrométastases pose deux problèmes majeurs. D'une part, puisque les étapes précédentes de la cascade métastatique sont facilement et rapidement réalisées par les cellules cancéreuses, il existe des centaines de micrométastases dans des tissus distants avant même que la tumeur primaire ne soit cliniquement détectable. D'autre part, puisque ces cellules sont quiescentes, leur activité métabolique est réduite au minimum et leur cycle cellulaire est arrêté : elles sont donc pratiquement insensibles aux principales chimiothérapies, dont les cibles classiques sont la polymérisation des microtubules, la réplication de l'ADN et le métabolisme intermédiaire, en assurant une certaine spécificité d'action sur les cellules cancéreuses de par leurs activités accrues (Naumov *et al.*, 2003). La polymérisation des microtubules est essentielle à la division cellulaire et des agents chimiothérapeutiques peuvent altérer ce processus. Des agents de couplage peuvent quant à eux interférer avec la réplication de l'ADN, essentielle à la division cellulaire, en liant de façon covalente les deux brins de l'ADN. Enfin, les agents cytotoxiques peuvent également interférer avec une variété de voies de signalisation du métabolisme intermédiaire et empêcher les cellules de se diviser de façon anarchique. À chacune des étapes de la cascade métastatique, les cellules cancéreuses doivent dégrader la matrice extracellulaire et la membrane basale. Ces étapes sont accomplies grâce à la sécrétion d'enzymes protéolytiques, dont *l'urokinase plasminogen activator* (uPA) et les métalloprotéases matricielles (MMPs) (Chambers et Matrisian, 1997). Les MMPs représentent le groupe le plus important et sont depuis longtemps reconnues associées à la progression tumorale (Raffo, Pontiggia et Simian, 2011).

1.2 Les métalloprotéases de la matrice extracellulaire

1.2.1 La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) est un enchevêtrement de protéines sécrétées par les cellules épithéliales, myoépithéliales, endothéliales, immunitaires, les fibroblastes et les adipocytes (Kalluri, 2003) et qui fournit un support solide pour l'adhésion tissulaire (Bissell et Barcellos-Hoff, 1987). Sa composition peut varier selon le tissu, mais elle contient généralement du collagène, des glycoprotéines (laminine, fibronectine, entactine, nidogen), des protéoglycans, des glycosaminoglycans et de l'acide hyaluronique (Coussens et Werb, 1996). La MEC est constamment dégradée et remodelée au cours de phénomènes physiologiques et contient aussi une variété de facteurs de croissance ancrés dans sa structure, tels que le facteur de croissance des fibroblastes (bFGF), le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et le facteur de croissance transformant alpha (TGF- α) (Peschon *et al.*, 1998). La biodisponibilité de ces facteurs joue un rôle très important dans la signalisation cellulaire et la progression tumorale (Forget, Desrosiers et Beliveau, 1999). En ce sens, en plus de servir de support physique, la MEC est considérée comme une véritable structure dynamique de signalisation cellulaire (Egeblad, Nakasone et Werb, 2010 ; Werb, 2010). Les MMPs sont les principales enzymes responsables de la dégradation de la MEC et jouent, par conséquent, un rôle de premier plan dans la pathologie néoplasique (Egeblad et Werb, 2002).

1.2.2 Classification et structure des MMPs

Les MMPs, décrites pour la première fois en 1962 (Gross et Lapiere), sont des endopeptidases zinc-dépendantes dont la fonction principale est le clivage des constituants de la MEC lors de processus physiologiques tels que le remodelage des tissus, la guérison des plaies et l'organogénèse (Page-McCaw, Ewald et Werb, 2007). Il existe 23 différentes MMPs connues chez l'humain (17 solubles et 6 membranaires) et elles possèdent toutes trois domaines communs : un prodomaine, un domaine catalytique et un domaine hemopexine C-terminal (Kessenbrock, Plaks et Werb, 2010 ; Tallant, Marrero et Gomis-Ruth, 2010) (Figure

4). Les MMPs sont sécrétées sous forme zymogène inactive en raison de l'interaction du résidu cystéine 92 du prodomaine avec l'atome de zinc du site catalytique (Bode *et al.*, 1999). L'activation des MMPs peut se faire par clivage du prodomaine par une autre protéase, telles que la furine intracellulaire, d'autres MMPs dans l'environnement extracellulaire ou des protéases à sérine comme la plasmine (Sternlicht et Werb, 2001), ou encore par oxydation du résidu cystéine 92 du prodomaine par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) abondantes du microenvironnement tumoral inflammatoire (Weiss *et al.*, 1985). La fonction catalytique des MMPs *in vivo* est finement régulée par des inhibiteurs de protéases, comme l'α2-macroglobuline, un inhibiteur sécrété par le foie et relargué dans la circulation sanguine pour prévenir la protéolyse des tissus (Woessner et Nagase, 2000). Toutefois, les MMPs sont principalement régulées par les inhibiteurs tissulaires des MMPs (TIMP-1, -2, -3 et -4) qui se lient à leur site actif et empêchent leur activité catalytique (Deryugina et Quigley, 2006). Cette activité est aussi régulée au niveau transcriptionnel (via les niveaux d'ARN messager transcrits et par l'activité des micro ARN), traductionnel (par l'ajout de modifications post-traductionnelles et par dégradation protéosomale) et par leur compartimentation dans différents compartiments subcellulaires (Kessenbrock, Plaks et Werb, 2010). Des altérations de la régulation des MMPs peuvent causer diverses pathologies, dont l'ulcération, l'arthrite, la parodontite, les problèmes cardiovasculaires, la fibrose, l'emphysème et le cancer, car les MMPs remplissent des fonctions essentielles au maintien de l'homéostasie dans bon nombre de processus physiologiques (Tallant, Marrero et Gomis-Ruth, 2010).

1.2.3 Les MMPs et la progression tumorale

En plus de jouer un rôle physiologique, les MMPs sont grandement impliquées dans toutes les étapes de la progression tumorale (Parks, Wilson et Lopez-Boado, 2004 ; Raffo, Pontiggia et Simian, 2011). Ce sont les principales enzymes responsables de l'altération du microenvironnement caractéristique de la progression tumorale (Kessenbrock, Plaks et Werb, 2010 ; Page-McCaw, Ewald et Werb, 2007). Parmi les traits caractéristiques du développement tumoral, quatre sont dépendants du microenvironnement : la capacité de migration, d'invasion, de prolifération et l'angiogénèse (Gialeli, Theocaris et Karamanos, 2011).

1.2.3.1 Les MMPs et la transition épithélio-mésenchymateuse

Les MMPs dégradent la MEC pour permettre l'expansion de la tumeur, son intravasation dans la circulation sanguine ou lymphatique et sa colonisation à un site métastatique. Parmi toutes les MMPs, la MMP de type membranaire 1 (MT1-MMP, MMP14) est particulièrement exprimée et localisée à la surface des cellules cancéreuses, au sein de structures membranaires appelées invadopode. Les invadopodes servent à regrouper plusieurs protéines impliquées dans la mobilité cellulaire et établissent la direction de la migration. En plus de ses domaines extracellulaires, elle possède un domaine cytoplasmique de 20 acides aminés (Figure 5). Les MMP-2 et MMP-9 sont sécrétées dans l'environnement extracellulaire et contribuent également grandement à la dégradation de la MEC permettant la migration des cellules cancéreuses (Weaver, 2006). De plus, le facteur de croissance transformant beta (TGF- β), sécrété sous forme zymogène, peut être activé par clivage protéolytique grâce aux MMP-2, MMP-9 et MT1-MMP (Mu *et al.*, 2002 ; Yu et Stamenkovic, 2000). Le TGF- β est une cytokine aux multiples fonctions, et les MMPs ont un impact considérable sur son activité. Il agit via des récepteurs sérine/thréonine kinase, dont les effecteurs intracellulaires principaux sont les facteurs de transcription de la famille Smad (Attisano et Wrana, 2002). Suite à la liaison du TGF- β sur son récepteur, les protéines Smad2/3 et Smad4 forment un complexe hétérotrimérique qui est transloqué au noyau et stimule l'expression de plusieurs gènes (Akiyoshi *et al.*, 1999 ; Heldin, Miyazono et ten Dijke, 1997 ; Nishihara *et al.*, 1998). Le TGF- β , via le programme transcriptionnel qu'il met en place, interrompt la croissance et la prolifération des cellules épithéliales et lymphoïdes, dans la plupart des tissus humains, en supprimant l'expression de c-Myc (Chen, Kang et Massague, 2001). De plus, il contribue à la stabilité génomique (Glick *et al.*, 1996) et au maintien de la sénescence répllicative (Stampfer *et al.*, 2001); en ce sens, il est donc considéré comme un gène suppresseur de tumeurs, c'est-à-dire un gène dont la perte d'activité stimule directement la prolifération cellulaire (Wakefield et Sporn, 1990). Paradoxalement, il est maintenant évident que la métastasie de plusieurs types de cellules cancéreuses requiert le TGF- β (Wakefield et Roberts, 2002). De nombreux travaux en arrivent à la conclusion que la signalisation TGF- β -Smad active la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), et c'est ce qui confère son rôle si important au TGF- β dans la métastasie. Les protéines Smad mettent également en jeu un programme

transcriptionnel qui inclut les facteurs de transcription Snail, Slug et Twist, qui jouent un rôle important dans l'induction de l'EMT. En plus de la signalisation Smad, le récepteur au TGF- β agit sur des voies de signalisations telles que ERK, JNK, p38MAPK, PI3K, ainsi que les GTPases RhoA, Rac1 et Cdc42 (Moustakas et Heldin, 2007). Ces interactions permettent au récepteur de moduler directement la polarité cellulaire, la migration et la survie des cellules en perte de contact, des paramètres importants dans le processus d'EMT (Ozdamar *et al.*, 2005). Les MMPs, et particulièrement les MMP-2, -9 et -14, stimulent donc l'invasion et la métastase des cellules cancéreuses de plusieurs façons, entre autres via le TGF- β .

1.2.3.2 Les MMPs et la prolifération cellulaire

Les MMPs sont également impliquées dans la prolifération des cellules cancéreuses. En effet, en dégradant la MEC, les MMPs rendent disponibles de nombreux facteurs de croissance séquestrés dans la MEC, tels que le facteur de croissance insulin-like (IGF) (Nakamura *et al.*, 2005), le facteur de croissance de l'épiderme (EGF) et le TGF- α (Sahin *et al.*, 2004 ; Suzuki *et al.*, 1997). Tous ces facteurs de croissance stimulent la prolifération incontrôlée des cellules tumorales. En plus d'activer le TGF- β dans l'environnement extracellulaire, les MMPs clivent l'E-cadhérite afin de faciliter l'EMT. De façon intéressante, le clivage fonctionnel de l'E-cadhérite a aussi pour conséquence de libérer la β -caténine du complexe d'adhésion focale et celle-ci transloque vers le noyau où elle mime la signalisation Wnt et module la transcription de nombreux gènes impliqués dans l'EMT mais aussi dans la prolifération cellulaire (Maretzky *et al.*, 2005 ; Thiery et Sleeman, 2006). En effet, la β -caténine est également un facteur de transcription effecteur de la voie de signalisation Wnt, une voie qui contrôle entre autres la différenciation cellulaire.

1.2.3.3 Les MMPs et la survie cellulaire

Les MMPs sont également impliquées dans la survie cellulaire, la résistance à l'apoptose et l'évasion immunitaire. Le récepteur transmembranaire Fas est un récepteur de mort présent, entre autres, à la surface des cellules cancéreuses et il induit la signalisation apoptotique lorsque stimulé par son ligand, FasL, un membre de la famille des facteurs de nécrose

tumoraux (TNF) (Kirkin *et al.*, 2007). Toutefois, des MMPs sécrétées dans l'environnement extracellulaire, particulièrement la MMP-7, clivent le ligand FasL et abolissent par conséquent l'apoptose des cellules cancéreuses par la voie des récepteurs de mort (Mitsiades *et al.*, 2001 ; Strand *et al.*, 2004). De plus, les MMPs peuvent activer indirectement la voie de survie d'Akt via les récepteurs EGFR et IGFR, en clivant leur substrat respectif ancré dans la MEC (Gialeli *et al.*, 2009 ; Kulik, Klippel et Weber, 1997). En effet, des formes latentes de l'EGF et de l'IGF sont ancrées dans la MEC et leur clivage par les MMPs les rend disponible à interagir avec leur récepteur respectif. Enfin, les MMPs contribuent à l'évasion immunitaire et donc à la survie des cellules cancéreuses de plusieurs façons. La métalloprotéase et désintégrine 10 (ADAM) peut cliver les protéines de surface du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I, rendant les cellules cancéreuses invisibles à la destruction cytotoxique par les cellules CD8 (Waldhauer *et al.*, 2008). De plus, la MT1-MMP, fortement surexprimée dans un grand nombre de cancers, peut empêcher l'activation du complément en se liant à la protéine C1q, sans induire l'activité protéolytique de C1qr et C1qs (Rozanov *et al.*, 2004b), et en clivant la protéine C3b (Rozanov *et al.*, 2004a), suggérant un rôle pour MT1-MMP dans l'évasion immunitaire. Ces quelques exemples illustrent bien comment les MMPs peuvent influencer la décision de survie et de mort cellulaire des cellules cancéreuses.

1.2.3.4 Les fonctions non-protéolytiques des MMPs

En plus de leurs nombreuses contributions à l'oncogenèse via leurs fonctions catalytiques, certaines MMPs ont également des fonctions non protéolytiques importantes. En effet, plus de la moitié des membres de la famille ADAM n'expriment aucune activité catalytique (Kessenbrock, Plaks et Werb, 2010). Le domaine hémopexine des MMPs joue un rôle important. Certaines évidences expérimentales montrent que les MMP-2 et MMP-9 peuvent stimuler la migration des cellules inflammatoires et cancéreuses; de façon intéressante, le domaine hemopexin-like est indispensable à cette fonction mais le domaine catalytique ne l'est pas (Dufour *et al.*, 2008). L'activation de la voie de PI3K et des MAPK semble être en cause dans la migration de ces cellules, bien que le lien entre les MMP-2, MMP-9 et les voies de signalisation intracellulaires soit peu documenté. Également, certaines MMPs peuvent interagir avec des molécules extracellulaires sans clivage protéolytique. Par exemple, tel que

mentionné à la section 1.2.3.3, la MT1-MMP est capable d'interaction avec la protéine C1q du complément, sans induire l'activation de C1qr et C1qs, suggérant un rôle immunosuppresseur de MT1-MMP en contexte tumoral (Rozanov *et al.*, 2004b). En outre, la MT1-MMP est très importante pour la migration cellulaire. La délétion de son domaine cytoplasmique inhibe la migration cellulaire des macrophages, démontrant le rôle crucial de ce domaine dans les fonctions de MT1-MMP (Sakamoto et Seiki, 2009). Des données de notre groupe de recherche montrent également que le domaine cytoplasmique de MT1-MMP est essentiel pour induire la signalisation pro-inflammatoire, via la voie NF-kB (la principale voie de signalisation cellulaire responsable de l'activation des processus inflammatoires), dans les cellules de glioblastome U87 (Sina *et al.*, 2010). Le domaine cytoplasmique de MT1-MMP comporte 20 acides aminés et une seule tyrosine. La phosphorylation de cette tyrosine par Src est essentielle afin d'induire la migration et la prolifération en 3D des cellules endothéliales et tumorales (Nyalendo *et al.*, 2008). Cette tyrosine phosphorylable du domaine cytoplasmique de MT1-MMP suggère son association avec d'autres protéines de signalisation cellulaire, en particulier les protéines adaptatrices. En effet, les tyrosines phosphorylées sur des récepteurs transmembranaires recrutent des protéines adaptatrices via leur affinité pour les domaines Src-homology 2 (SH2), afin d'initier des cascades de signalisation (Brummer, Schmitz-Peiffer et Daly, 2010). Les protéines adaptatrices sont judicieusement placées pour réguler la signalisation intracellulaire, car elles assurent la formation des signalosomes (les complexes de protéines de signalisation cellulaire) en vertu de leurs différents domaines d'affinité (Buday et Tompa, 2010). Le domaine intracellulaire de MT1-MMP régule donc la migration cellulaire par activation de voies de signalisation via une ou des protéines adaptatrices. Cette propriété sera discutée davantage à la section 1.3.3.

1.3 L'hypoxie

1.3.1 Le facteur de transcription HIF-1

Dans l'air ambiant, la tension d'oxygène est de 21%, mais elle n'est que de 6% dans la circulation sanguine. La majorité des cellules ont besoin d'une telle concentration d'oxygène afin de soutenir la respiration oxydative, leur principale source d'énergie (Vander Heiden,

Cantley et Thompson, 2009). Dans certaines conditions physiologiques telles que dans la moelle osseuse ou pathologiques telles qu'au centre d'une tumeur, la tension d'oxygène est beaucoup plus faible et les cellules possèdent des mécanismes pour s'y adapter. Le facteur de transcription Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF-1) est le principal médiateur biochimique de l'hypoxie. La sous-unité alpha (HIF-1 α) possède un domaine de liaison à l'ADN et un domaine de dégradation à l'oxygène (ODD) (Huang *et al.*, 1998). En présence d'oxygène, deux résidus proline de ce domaine sont hydroxylés en 4-hydroxyproline par une dioxygénase (Masson *et al.*, 2001). Cette modification augmente l'affinité de HIF-1 α pour la protéine Von Hippel-Lindau (pVHL), une E3 ubiquitine ligase, qui cible HIF-1 α pour dégradation protéosomale (Maxwell *et al.*, 1999). HIF-1 α est donc très rapidement dégradé et a un taux de renouvellement très rapide. En hypoxie, la tension d'oxygène intracellulaire est réduite et ne permet plus l'hydroxylation de HIF-1 α . La sous-unité HIF-1 β , aussi appelée « aryl hydrocarbon nuclear translocator » (ARNT), forme alors un complexe avec HIF-1 α puis transloque vers le noyau pour se lier à la région promotrice de plus de 60 gènes impliqués dans la réponse à l'hypoxie, l'angiogénèse, le métabolisme du fer, le métabolisme du glucose et la survie et prolifération cellulaire (Ke et Costa, 2006) (Figure 6). Parmi les gènes régulés par HIF-1 α , le VEGF, l'érythropoïétine (EPO) et les transporteurs de glucose (GLUT1, GLUT3) sont les exemples les mieux étudiés (Lee *et al.*, 2004). Le tableau 1 présente une liste plus détaillée des gènes activés par HIF-1 α . L'activation du facteur de transcription HIF-1 est donc d'une grande importance en oncologie, en raison du caractère hypoxique d'un grand nombre de tumeurs solides (Ziemer *et al.*, 2001).

1.3.2 Le microenvironnement tumoral hypoxique et l'angiogénèse

Lors de la croissance d'un néoplasme, les cellules se divisent de façon anarchique à partir d'un seul clone cellulaire, donnant lieu à une masse compacte de cellules. Quand cette masse atteint plus de 1 mm³, la concentration en oxygène au centre de la tumeur est 6 à 7 fois plus faible que dans le tissu environnant (Semenza, 2010). Les cellules ne reçoivent plus l'oxygène et les nutriments nécessaires à leur développement et ne peuvent plus éliminer leurs nombreux déchets métaboliques (Folkman, 2006). Ces cellules mettent alors en branle un programme transcriptionnel qui leur permettra de s'adapter à ces conditions, grâce à la

translocation nucléaire de HIF-1. Dans un premier temps, les cellules reprogramment leur métabolisme énergétique afin de produire l'ATP par glycolyse et par fermentation lactique plutôt que par respiration oxydative (Semenza, 2010 ; Warburg, 1956). Ce mode de production d'énergie, appelé l'effet Warburg, est près de 18 fois moins efficace que la respiration oxydative en termes de production d'ATP, mais le facteur HIF-1 induit aussi fortement l'expression du transporteur de glucose GLUT1, qui augmente grandement l'apport cytosolique de glucose pour pallier à ce problème (Jones et Thompson, 2009). Parallèlement, les cellules cancéreuses stimulent l'angiogénèse, c'est-à-dire la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, pour assurer l'alimentation de la tumeur en nutriments et lui permettre l'élimination des déchets métaboliques. L'angiogénèse est un mécanisme complexe qui implique la prolifération et l'organisation des cellules endothéliales en structures tubulaires, le recrutement et la différenciation des MSC en péricytes (Annabi *et al.*, 2004a ; Patenaude, Parker et Karsan, 2010) et le remodelage de la MEC (Folkman, 2002 ; Raza, Franklin et Dudek, 2010). Après l'embryogénèse, le réseau vasculaire est plutôt statique et l'angiogénèse physiologique n'a lieu que lors de la guérison de plaies ou lors du cycle menstruel.

Le processus d'angiogénèse est finement régulé par des inhibiteurs et des activateurs et, en contexte cancéreux, cet équilibre est débalancé vers une angiogénèse soutenue (Hanahan et Folkman, 1996). Ce débalancement est mieux connu sous le nom de « *switch* angiogénique ». Le VEGF est exprimé et sécrété par les cellules cancéreuses, grâce à HIF-1 ou à la signalisation oncogénique issue de Ras ou Myc, et stimule la prolifération des cellules endothéliales (Ferrara, 2009 ; Mac Gabhann et Popel, 2008). De plus, l'expression de la thrombospondine 1 (TSP-1), un puissant inhibiteur de l'angiogénèse, est dépendante du gène suppresseur de tumeurs p53 et l'absence de ce gène fonctionnel, une caractéristique commune à nombreux cancers, favorise le *switch* angiogénique en inhibant l'expression de TSP-1 (Dameron *et al.*, 1994 ; Volpert, Stellmach et Bouck, 1995). En outre, la dégradation de la MEC par les MMPs sécrétées par les cellules cancéreuses, stromales et endothéliales, telle que MMP-2 et MMP-9, permet aussi la libération de plusieurs facteurs pro-angiogéniques séquestré au sein de la MEC, dont une forme latente du VEGF, le facteur de croissance des fibroblastes (FGF) et le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) (Kessenbrock, Plaks et Werb, 2010). Ainsi, en plus de créer de l'espace pour la

néovascularisation et l'invasion tumorale, la dégradation de la MEC par les métalloprotéases matricielles stimule fortement l'angiogénèse et offre aux cellules cancéreuses une voie de dissémination essentielle (Folkman, 2002).

1.3.3 La contribution des MSC hypoxiques à la progression tumorale

Dans certains tissus, tel que la moelle osseuse, la concentration d'oxygène est plus faible et se situe même en deçà de 1% (Chow *et al.*, 2001) et une telle condition est considérée hypoxique. Les cellules souches mésenchymateuses (MSC) et les cellules souches hématopoïétiques (HSC) résident dans cette niche hypoxique et doivent, par conséquent, développer des mécanismes adaptatifs face à ces faibles tensions d'oxygène. Les MSC sont une population de cellules multipotentes provenant du mésoderme et représentent de 0,001% à 0,01% des cellules mononucléaires, une faible proportion comparée aux HSC qui représentent 1% de ces cellules (Pittenger *et al.*, 1999). Les MSC sont néanmoins primordiales au maintien du microenvironnement qui contrôle la quiescence et la prolifération des HSC (Valtieri et Sorrentino, 2008). Elles ont la capacité de se différencier en ostéoblastes, adipocytes, chondrocytes, myocytes et neurones (Jiang *et al.*, 2002). L'environnement hypoxique régule leur renouvellement via le facteur HIF-1 et la voie de Wnt, et protège leur intégrité génomique en limitant la production de ROS par la respiration mitochondriale (Kaufman, 2010). En conditions physiologiques normales, les MSC contribuent à la guérison des plaies et à la régénération des tissus, en se différenciant en tissu mésenchymal, en supportant la vasculogénèse et en sécrétant des cytokines qui créent un microenvironnement approprié à la guérison des tissus (Brooke *et al.*, 2007). Toutefois, les MSC semblent également contribuer à la progression de différents types de cancer, dont le cancer du colon (Zhu *et al.*, 2006), le lymphome (Djouad *et al.*, 2003) et le mélanome (Ame-Thomas *et al.*, 2007). En effet, des MSC injectées dans la circulation sanguine de souris sont recrutées au sein de tumeurs cérébrales expérimentales sous-cutanées, et participent à leur vascularisation en s'y différenciant en péryctes et en cellules endothéliales (Annabi *et al.*, 2004a) (Figure 7). Des données cliniques montrent également la migration des MSC depuis la moelle osseuse vers des tumeurs primaires et même des sites métastatiques (Dwyer *et al.*, 2007). En outre, des MSC humaines injectées dans la circulation sanguine ont été localisées

au site du glioblastome, dévoilant leur potentiel à traverser la barrière hémato-encéphalique (Nakamizo *et al.*, 2005).

Le grand potentiel migratoire des MSC leur permet de migrer vers la tumeur, sous l'action de facteurs chimio-attractants sécrétés par les cellules tumorales et stromales. Une fois recrutées au site tumoral, les MSC participent à la néovascularisation en se différenciant en fibroblastes, en péricytes et en cellules « endothéliales-like » (Short *et al.*, 2003 ; Spaeth *et al.*, 2009), en plus de sécréter des facteurs qui stimulent la prolifération comme le SDF-1 (Kinnaird *et al.*, 2004), le VEGF et le PDGF (Beckermann *et al.*, 2008). Les MSC contribuent également à la progression tumorale en inhibant la réponse immunitaire par des mécanismes encore peu documentés (Batten, Rosenthal et Yacoub, 2007). Puisque le métabolisme des MSC est adapté à leur environnement hypoxique dans la moelle osseuse, ces cellules seraient donc judicieusement positionnées pour s'adapter aussi aux conditions hypoxiques des tumeurs où elles sont recrutées (Mylotte *et al.*, 2008). Enfin, bon nombre d'évidences supportent maintenant le rôle essentiel du facteur HIF-1 dans la mobilisation et la migration des MSC vers la circulation sanguine (Liu *et al.*, 2011) et les sites tumoraux (Ceradini et Gurtner, 2005 ; Du *et al.*, 2008). Cette migration des MSC est également fortement dépendante de MT1-MMP (Annabi *et al.*, 2003b), mais la relation entre l'hypoxie, MT1-MMP et la migration des MSC est à ce jour peu documentée.

1.4 Le réticulum endoplasmique

1.4.1 Structure et fonctions du réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) est un compartiment subcellulaire en continuité avec la membrane nucléaire. La lumière du RE représente plus de 10% du volume total de la cellule (Csala, Banhegyi et Benedetti, 2006) (Figure 8). Le RE est le siège de la synthèse des protéines transmembranaires et des protéines solubles sécrétées, et assure leur repliement tridimensionnel adéquat (Strasser et Puthalakath, 2008). Les protéines sont synthétisées par les ribosomes sur la surface cytoplasmique de la membrane endoplasmique et transloquent vers la lumière endoplasmique (Adesnik *et al.*, 1976) où elles subiront des modifications

post-traductionnelles telles que la lipidation, la glycosylation et la formation de ponts disulfures (Dobson, 2004). Les fonctions du RE dans le repliement des protéines requièrent un environnement riche en ATP, des ions calcium et un environnement oxydant permettant la formation des ponts disulfures (Gaut et Hendershot, 1993). De plus, le RE est un compartiment métabolique multifonctionnel qui joue un rôle important dans la biosynthèse des stérols, le déclenchement de l'apoptose, la libération d'acide arachidonique et de calcium (Csala, Banhegyi et Benedetti, 2006 ; Szegezdi *et al.*, 2006). La synthèse accrue de protéines dans le RE conduit à l'agrégation de certaines de ces protéines en cours de synthèse et de repliement, et induit la « unfolded protein response » (UPR), aussi appelée stress endoplasmique (Szegezdi *et al.*, 2006). Par exemple, dans la pathologie néoplasique, de grandes quantités de protéines doivent être synthétisées pour subvenir au programme invasif cellulaire. Les nombreuses mutations génétiques et l'environnement hypoxique tumoral provoquent le repliement inadéquat d'une grande quantité de protéines (Ma et Hendershot, 2004). L'activation constitutive de l'UPR dans ces cellules est probablement un mécanisme de protection cellulaire.

1.4.2 La protection du RE par la réponse UPR

Étant donné le contexte hypoxique des cellules tumorales, les réserves intracellulaires de glucose sont souvent réduites. En effet, les cellules hypoxiques sont privées d'oxygène et de glucose en raison du réseau vasculaire insuffisant. Le glucose est essentiel pour la N-glycosylation des protéines dans le RE (Ma et Hendershot, 2004). De plus, le RE contient les stocks de calcium nécessaires au bon repliement des protéines, mais qui sont aussi relargués dans le cytoplasme en réponse aux diverses voies de signalisation. Ces voies étant suractivées en contexte tumoral, l'homéostasie calcique du RE est perturbée et affecte le repliement adéquat des protéines (Lee, 1992). En conditions normales, la protéine IRE1 est maintenue inactive par association avec la chaperonne GRP78 (Okamura *et al.*, 2000). L'accumulation de protéines mal repliées dans la lumière endoplasmique disloque GRP78 (Sidrauski et Walter, 1997) et permet l'activation d'IRE1 qui stimule la transcription de gènes reliés à l'UPR, dont la fonction principale est d'assurer le repliement adéquat des protéines et de protéger l'intégrité du RE (Cox et Walter, 1996) (Figure 9). De plus, en condition de stress

endoplasmique, GRP78 est aussi dissociée de la protéine PERK, une kinase qui phosphoryle le facteur d'initiation eucaryote 2 (eIF2). Cette phosphorylation inhibe la synthèse de nouvelles protéines afin d'alléger la charge de protéines natives amenées au RE et permet de réduire le stress endoplasmique (Harding *et al.*, 2000). Des évidences expérimentales montrent également que des conditions hypoxiques, telles que rencontrées en contexte tumoral, activent la kinase PERK et la voie UPR (Koumenis *et al.*, 2002). En outre, GRP78 se dissocie également du facteur de transcription ATF6 en conditions de stress, lequel transloque au noyau et induit l'expression de gènes reliés à la réponse UPR : des protéines chaperons comme GRP78 et le facteur de transcription CHOP, mieux connu sous le nom de « growth-arrest and DNA-damage inducible gene 153 » (GADD153) (Schroder et Kaufman, 2005). Le facteur CHOP peut avoir un impact sur la balance entre la protection du RE et l'induction de l'apoptose.

1.4.3 L'induction de l'apoptose par la voie UPR

Dans le contexte tumoral, la réponse UPR a plusieurs bienfaits cellulaires et son activation, possible, entre autre par l'hypoxie, est essentielle à la progression tumorale. Toutefois, son activation prolongée ou trop intense peut activer les voies apoptotiques et ainsi protéger l'hôte (Ma et Hendershot, 2004) (Figure 10). Le facteur de transcription CHOP, exprimé lors de la réponse UPR, stimule l'expression de BCL2, GADD34 et TRB3, trois protéines qui peuvent stimuler les voies apoptotiques (Zinszner *et al.*, 1998). L'activité de CHOP est également modulée à la hausse par phosphorylation sur deux résidus par p38MAPK, une kinase suractivée dans bon nombre de tumeurs (Wang et Ron, 1996). TRP3 agit comme un puissant inhibiteur de la voie de survie Akt et entraîne les cellules vers l'apoptose (Ohoka *et al.*, 2005). De plus, les protéines PERK, ATF6 et IRE1 activée lors de l'UPR stimulent l'activité de la kinase JNK. Cette kinase phosphoryle BCL2 dans la lumière endoplasmique et stimule l'apoptose, en plus de perturber davantage l'homéostasie calcique du RE (Bassik *et al.*, 2004). Toutes ces voies mènent à la phase d'exécution de l'apoptose, dans laquelle une variété de caspases sont activées. Les caspases sont des protéases à cystéine impliquées dans le processus d'apoptose en clivant une variété de molécules dans la cellule. Plusieurs études sur le stress endoplasmique ont mis en évidence l'activité de caspases, entre autres les

caspases 3, 6, 7, 8, 9 et 12, mais l'identité de la caspase est encore floue (Szegezdi *et al.*, 2006). De façon intéressante, la réponse UPR, constitutivement active dans plusieurs pathologies néoplasiques, stimule également l'angiogénèse tumorale. Le facteur de transcription ATF4, activé lors de l'UPR, stimule la transcription accrue de VEGF au noyau. (Roybal *et al.*, 2004). De plus, la protéine chaperon GRP78 permet de stabiliser la protéine VEGF et d'assister à son repliement adéquat dans le RE. La synthèse accrue de VEGF pourrait aussi surcharger le RE et maintenir le stress endoplasmique (Steel *et al.*, 2004). Les facteurs qui influencent la balance entre la survie et l'apoptose en lien avec l'UPR sont peu connus et font l'objet de beaucoup de recherches (Szegezdi *et al.*, 2006) (Figure 11).

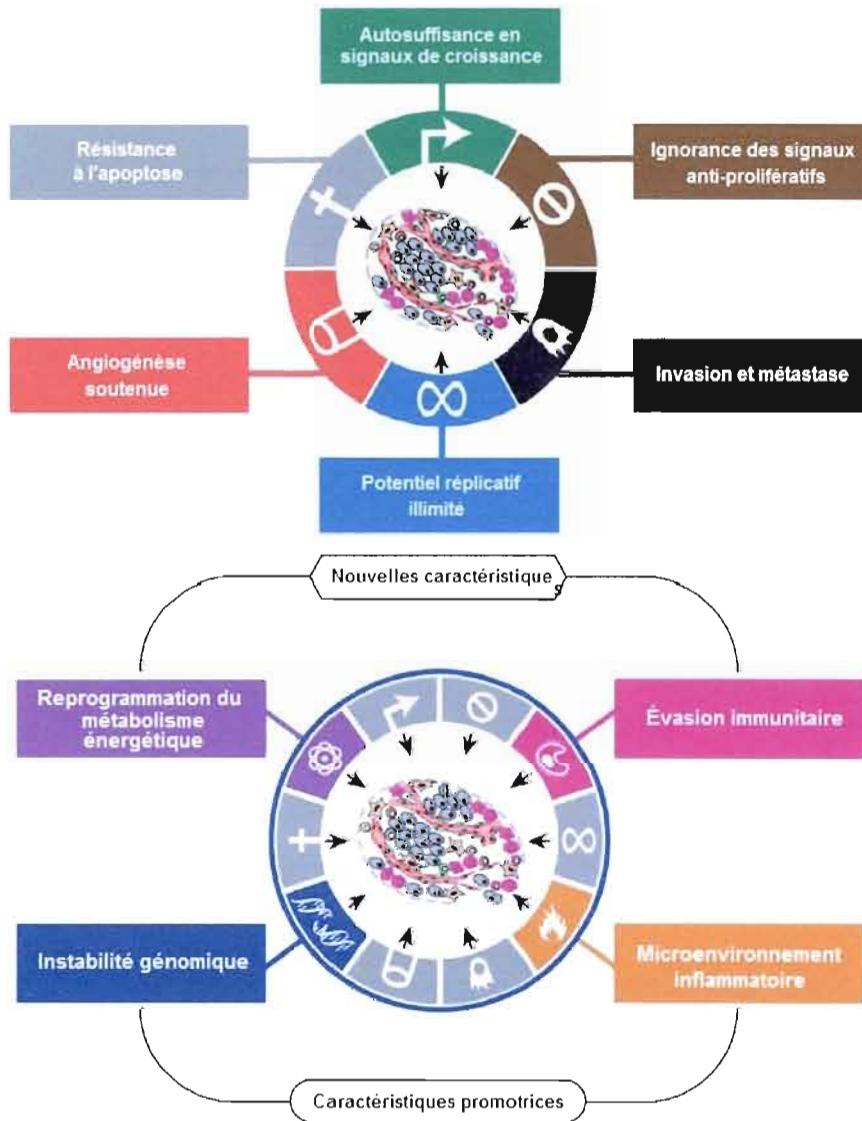


Figure 1.1 Caractéristiques fondamentales des cellules cancéreuses.

Au fil des mutations et de la sélection clonale, les cellules cancéreuses acquièrent diverses caractéristiques qui leur permettent d'envahir les tissus. Le panneau du haut présente les six caractéristiques fondamentales telles qu'établie par Hanahan et Weinberg en 2000. La recherche ayant progressé énormément au cours de la dernière décennie, le panneau du bas présente deux nouvelles caractéristiques identifiées comme fondamentales pour tous les cancers, soit la reprogrammation du métabolisme énergétique et l'évasion immunitaire, en plus de deux caractéristiques promotrices de la progression tumorale, soit l'instabilité génomique et l'inflammation pro-tumorelle. Adapté de Hanahan et Weinberg (2011).

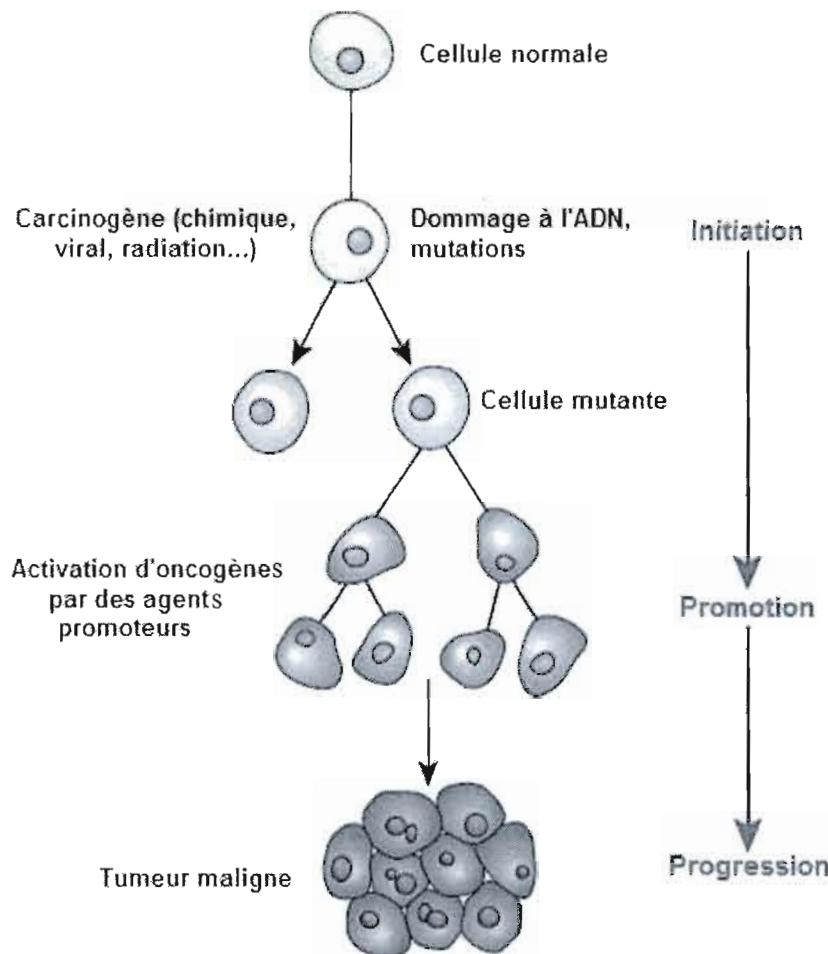


Figure 2. Initiation, promotion et progression, les étapes de l'oncogenèse.

L'oncogenèse se déroule sur une longue période de temps et comporte trois étapes principales. À l'étape d'initiation, une cellule saine subit une mutation suite à l'exposition à un agent carcinogène chimique, viral ou à des radiations. À l'étape de promotion, la cellule mutante est sélectionnée et acquiert un avantage prolifératif grâce à l'activation d'oncogènes et l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs, sous l'action d'agents promoteurs. Enfin, lors de la progression, une cellule ayant acquis toutes les caractéristiques fondamentales des cellules cancéreuses formera un néoplasme. Adapté de <http://www.hakeem-sy.com/main/files/process.jpg>

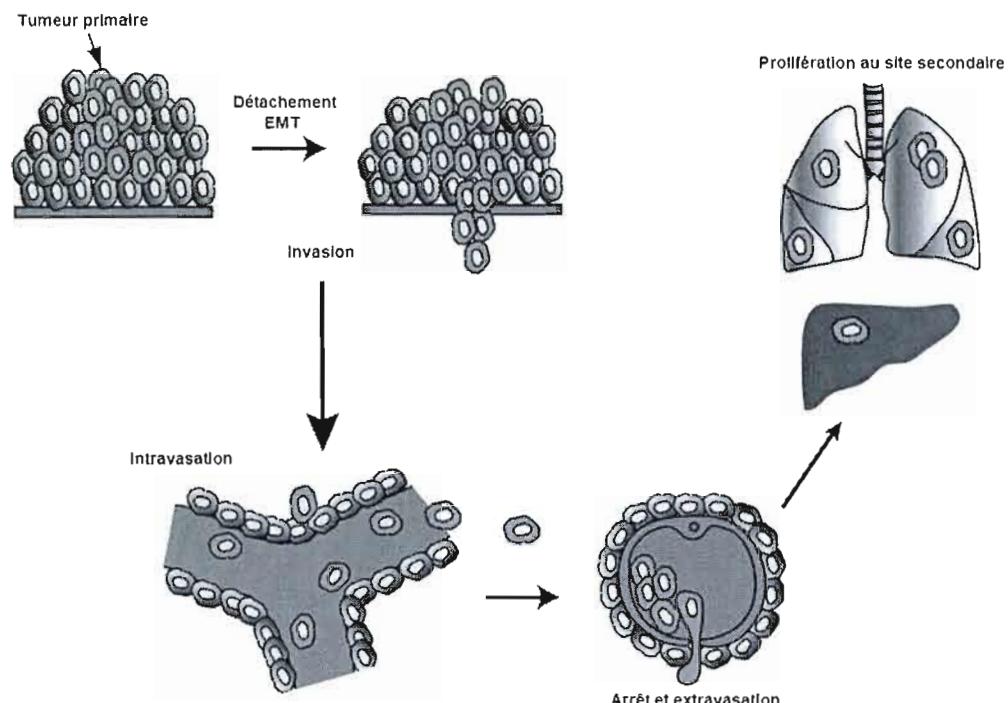


Figure 3. La cascade métastatique.

Au cours de la cascade métastatique, des cellules de la tumeur primaire se détachent, grâce à la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) et rejoignent la circulation sanguine. Ces cellules voyagent dans le sang jusqu'à l'arrêt dans un lit capillaire trop étroit pour leur passage. Ces cellules sortent de la circulation sanguine et restent quiescentes. Quand les conditions sont adéquates, les micrométastases colonisent le tissu et établissent une métastase. Adapté de Hunter, Crawford et Alsarraj (2008).

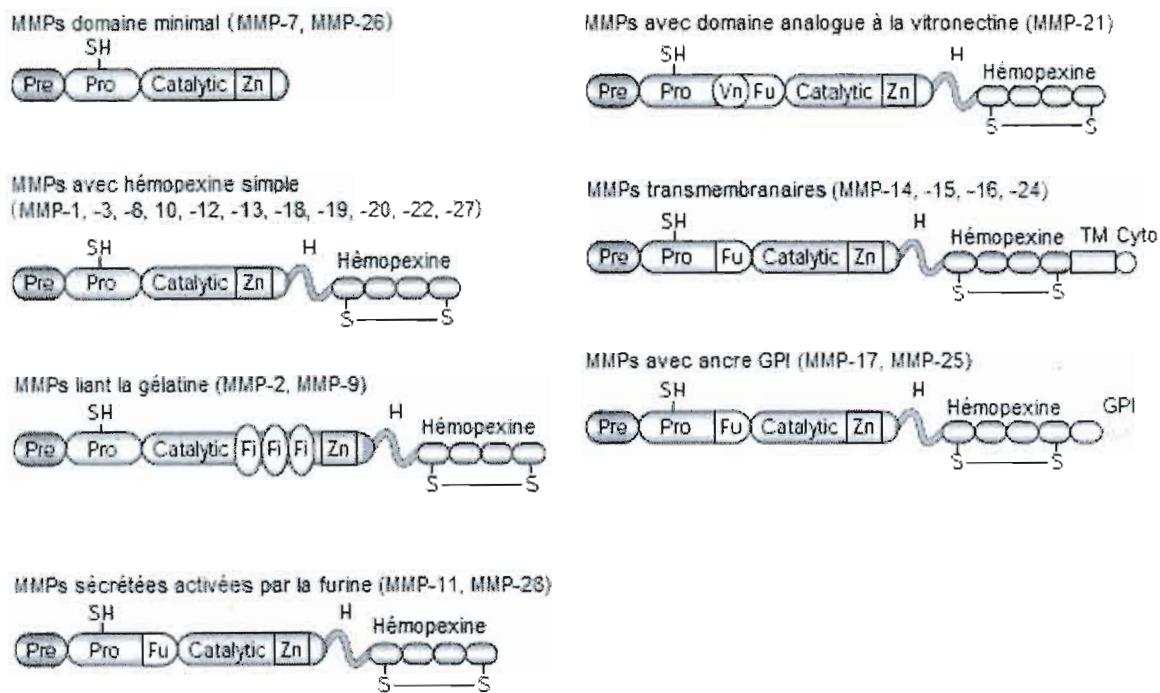


Figure 4. Classification et structure des MMPs.

Les MMPs sont classées en 7 groupes structuraux : deux groupes de MMPs membranaires et cinq groupes de MMPs sécrétées. Le prédomaine cible les MMPs en cours de synthèse vers le réticulum endoplasmique. Le prodomaine empêche l'activité du domaine catalytique lors de la synthèse de la protéine. Certaines MMPs sont absentes de la classification, comme MMP-4, MMP-5 et MMP-6, car elles ont été définies ultérieurement comme identiques à d'autres MMPs. Les MMPs membranaires ont également une appellation distincte, soit MT1-MMP à MT6-MMP.

Légende : Catalytic, domaine catalytique; Cyto, domaine cytoplasmique; Fi, fibronectine; Fu, domaine de liaison à la furine; GPI, glycophosphatidylinositol; H, région charnière; Pre, pré-domaine; Pro, prodomaine; Vn, vitronectine; Zn, Site de liaison au zinc. Adapté de Egeblad et Werb (2002).

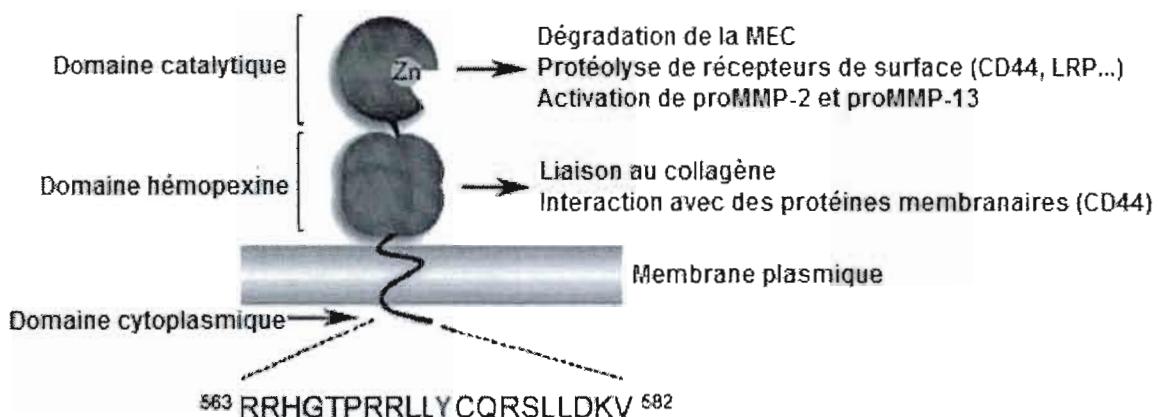


Figure 5. Structure active de MT1-MMP.

La MMP-14, aussi appelée MT1-MMP, possède un domaine catalytique qui contient un site de liaison pour le zinc. Ce domaine est responsable de l'activité endopeptidase de la protéine. Le domaine hémopexine est responsable de la liaison de MT1-MMP avec des protéines partenaires. Un domaine transmembranaire ancre la protéine dans la membrane plasmique. Enfin, le domaine cytoplasmique comporte 20 acides aminés, dont une tyrosine phosphorylable identifiée en rouge, et permet le recrutement de partenaires de signalisation intracellulaire. Adapté de Gingras et Béliveau (2010)

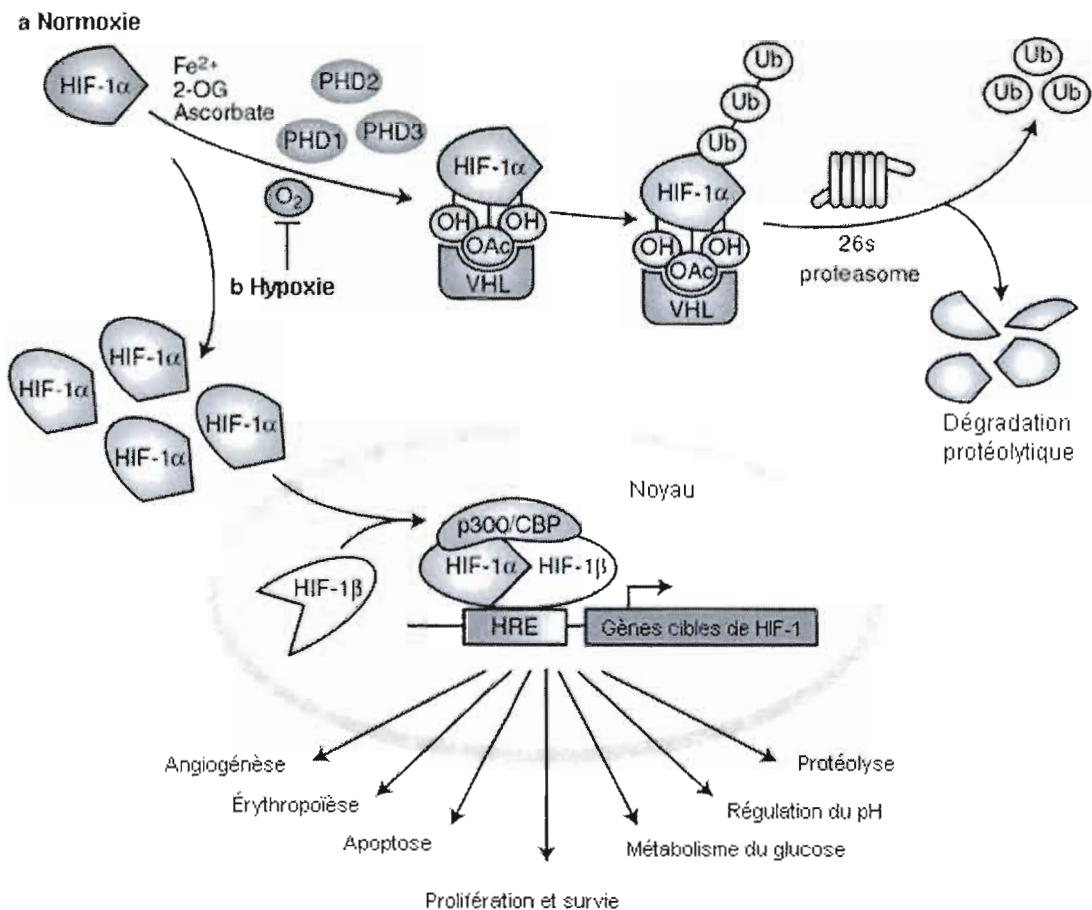


Figure 6. Régulation du facteur de transcription HIF-1.

En présence d'oxygène, le facteur HIF-1 α est hydroxylé sur un résidu proline de son domaine de dégradation à l'oxygène (ODD). Cette hydroxylation augmente l'affinité de HIF-1 α pour pVHL, une E3 ubiquitine ligase qui cible HIF-1 α vers la dégradation protéosomale. En conditions hypoxiques, la tension d'oxygène est très faible et ne permet plus l'hydroxylation de HIF-1 α , qui s'accumule alors dans le cytoplasme et transloque vers le noyau, où il se lie à une séquence consensus sur le promoteur de ses gènes cibles, en formant un complexe avec HIF-1 β et p300/CBP. Légende: PHD, Prolyl hydroxylase domain-containing protein; Ub, Ubiquitine; HRE, Hypoxia response element; pVHL, protéine de Von Hippel-Lindau; p300/CBP, Creb binding protein. Adapté de Carroll et Ashcroft (2005).

Tableau I. Gènes cibles du facteur de transcription HIF-1.Adapté de Lee *et al.* (2004)

Fonctions	Gènes
Prolifération cellulaire	Cyclin G2, IGF2, IGF-BP1, IGF-BP-2, IGF-BP-3, WAF-1, TGF-a, TGF-b3
Survie cellulaire	ADM, EPO, IGF2, IGF-BP1, IGF-BP-2, IGF-BP-3, NOS2, TGF-a, VEGF
Apoptose	NIP3, NIX, RTP801
Mobilité	ANF/GPI, c-MET, LRP1, TGF-a
Structure cytosquelettique	KRT14, KRT18, KRT19, VIM
Adhésion cellulaire	MIC2
Érythropoïèse	EPO
Angiogénèse	EG-VEGF, ENG, LEP, LRP1, TGF-b3, VEGF
Tonus vasculaire	a1B-adrenergic receptor, ADM, ET1, Haem oxygenase-1, NOS2
Régulation transcriptionnelle	DEC1, DEC2, ETS-1, NUR77
Régulation du pH	Carbonic anhydrase 9
Régulation de HIF-1	P35srj
Homéostasie épithéliale	Intestinal trefoil factor
Résistance aux drogues	MDR1
Métabolisme des nucléotides	Adenylate kinase 3, Ecto-5'-nucleotidase
Métabolisme du fer	Ceruloplasmin, Transferrin, Tranferrin receptor
Métabolisme du glucose	HK1, HK2, AMF/GPI, ENO1, GLUT1, GAPDH, LDHA, PFKBF3, PFKL, PGK1, PKM, TPI, ALDA, ALDC
Métabolisme de la MEC	CATHD, Collagen type V (a1), FN1, MMP2, PAI1, Prolyl-4-hydroxylase a (1), UPAR
Métabolisme énergétique	LEP
Métabolisme des aminoacides	Transglutaminase 2

Légende :

ADM, adrenomedullin; ALDA, aldolase A; ALDC, aldolase C; AMF, autocrine motility factor; CATHD, cathepsin D; EG-VEGF, endocrine gland-derived VEGF; ENG, endoglin; ET1, endothelin-1; ENO1, enolase 1; EPO, erythropoietin; FN1, fibronectin 1; GLUT1, glucose transporter 1; GLUT3, glucose transporter 3; GAPDH, glyceraldehyde-3-P-dehydrogenase; HK1, hexokinase 1; HK2, hexokinase 2; IGF2, insulin-like growth-factor 2; IGF-BP1, IGF-factor-binding-protein 1; IGF-BP2, IGF-factor-binding-protein 2; IGF-BP3, IGF-factor-binding-protein 3; KRT14, keratin 14; KRT18, keratin 18; KRT19, keratin 19; LDHA, lactate dehydrogenase A; LEP, leptin; LRP1, LDL-receptor-related protein 1; MDR1, multidrug resistance 1; MMP2, matrix metalloproteinase 2; NOS2, nitric oxide synthase 2; PFKBF3, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase-3; PFKL, phosphofructokinase L; PGK 1, phosphoglycerate kinase 1; PAI1, plasminogen-activator inhibitor 1; PKM, pyruvate kinase M; TGF-a, transforming growth factor-a; TGF-b3, transforming growth factor-b3; TPI, triosephosphate isomerase; VEGF, vascular endothelial growth factor; UPAR, urokinase plasminogen activator receptor; VEGFR2, VEGF receptor-2; VIM, vimentin.

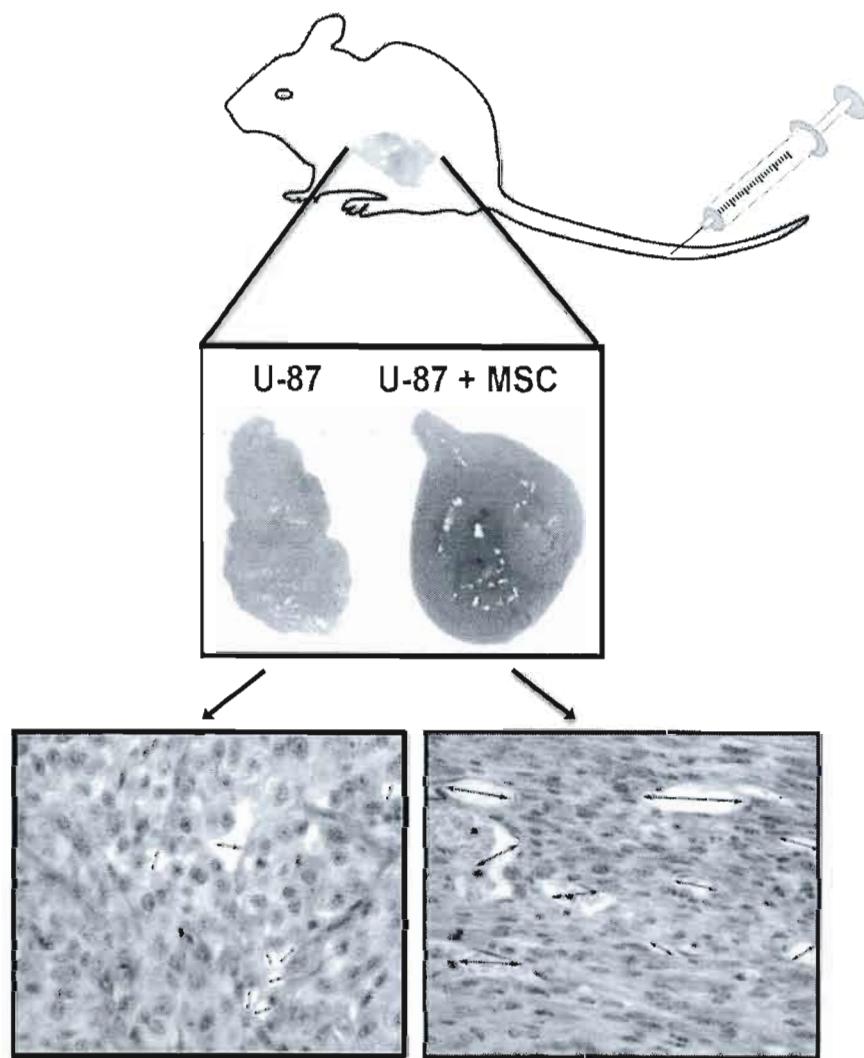


Figure 7. Contribution des MSC à la vascularisation tumorale.

Des MSC injectées dans la veine de la queue de souris ont été recrutée vers des tumeurs expérimentales et ont participé à leur vascularisation et leur croissance. La coloration hématoxyline-éosine des coupes histologiques montre l'augmentation du nombre de vaisseaux sanguins et de la taille de leur lumière. Enfin, des photographies fluorescentes ont montré la localisation périvasculaire des MSC fluorescentes (non montré). Adapté de (Annabi *et al.*, 2004a)

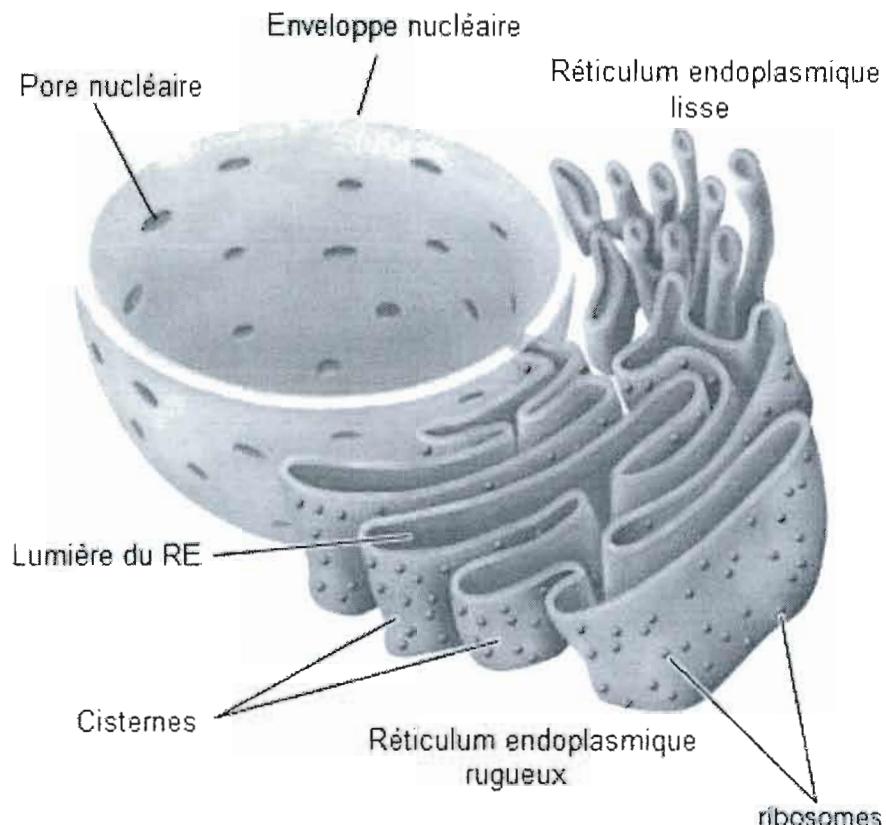


Figure 8. Structure du réticulum endoplasmique.

Le réticulum endoplasmique (RE) est une structure membranaire en continuité avec la membrane nucléaire. Sa forme réticulée offre une grande surface de contact avec le cytoplasme et permet la fixation d'une grande quantité de ribosomes, qui assurent la synthèse des protéines vers la lumière endoplasmique. La membrane du RE permet également le bourgeonnement de vésicules contenant les protéines nouvellement synthétisées et qui migrent vers le complexe golgien et la membrane plasmique. Adapté de l'Encyclopédie Britannica (Rogers, 2011)

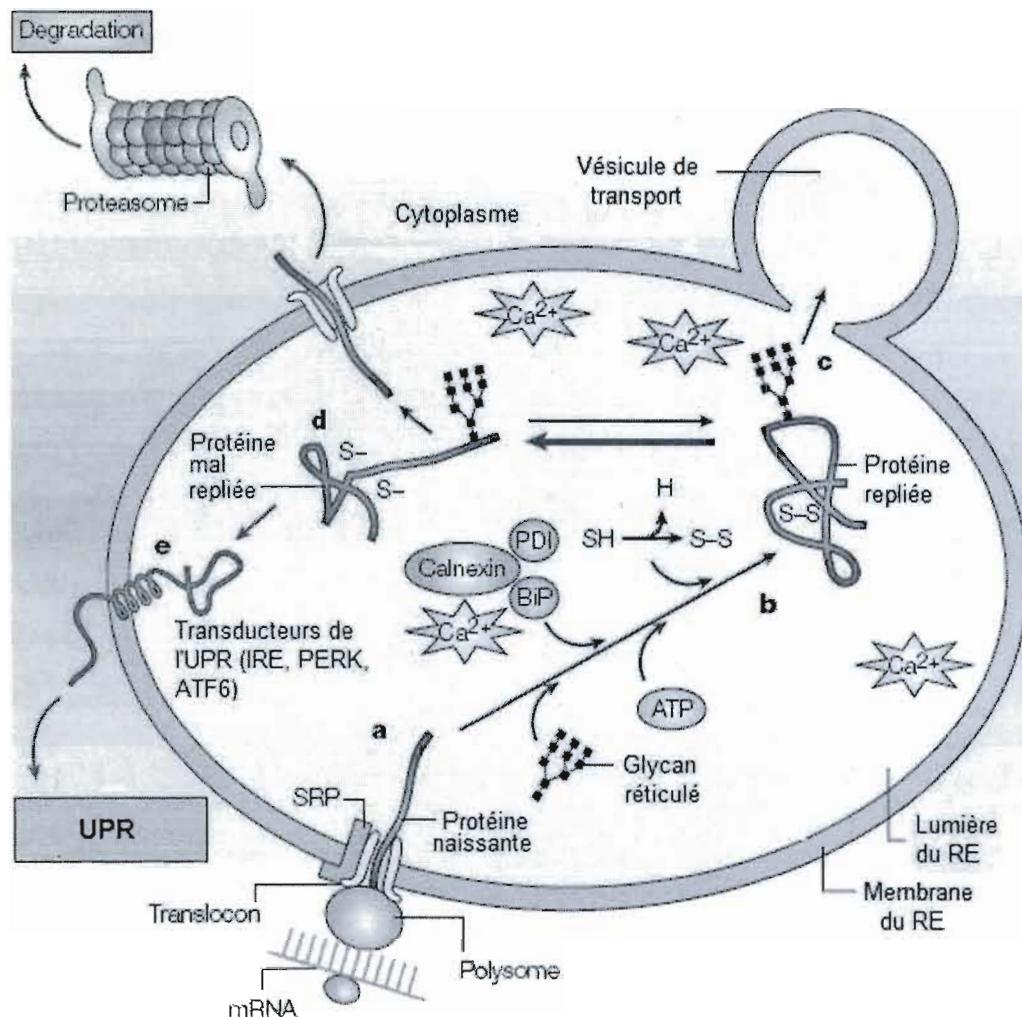


Figure 9. Repliement des protéines dans le RE en conditions physiologiques.

Les protéines destinées à la sécrétion sont synthétisées et transloquées dans la lumière du RE par des pores appelés translocons. Les protéines chaperons comme la calnexine, PDI et BiP (GRP78) protègent les protéines de l'environnement oxydant très riche en calcium et favorisent leur repliement adéquat. Ces protéines quittent ensuite le RE via des vésicules de transport. Les protéines 'mal repliées' sont rétrotransloquées vers le cytoplasme pour être dégradées par le protéasome. L'accumulation de protéines mal repliées dans la lumière du RE déclenche l'UPR via les protéines transductrices de l'UPR.

Légende : ATP, adénosine triphosphate; PDI, *protein disulphide isomerase*; RE, réticulum endoplasmique; UPR, *Unfolded protein response*. Adapté de Ma et Hendershot (2004).

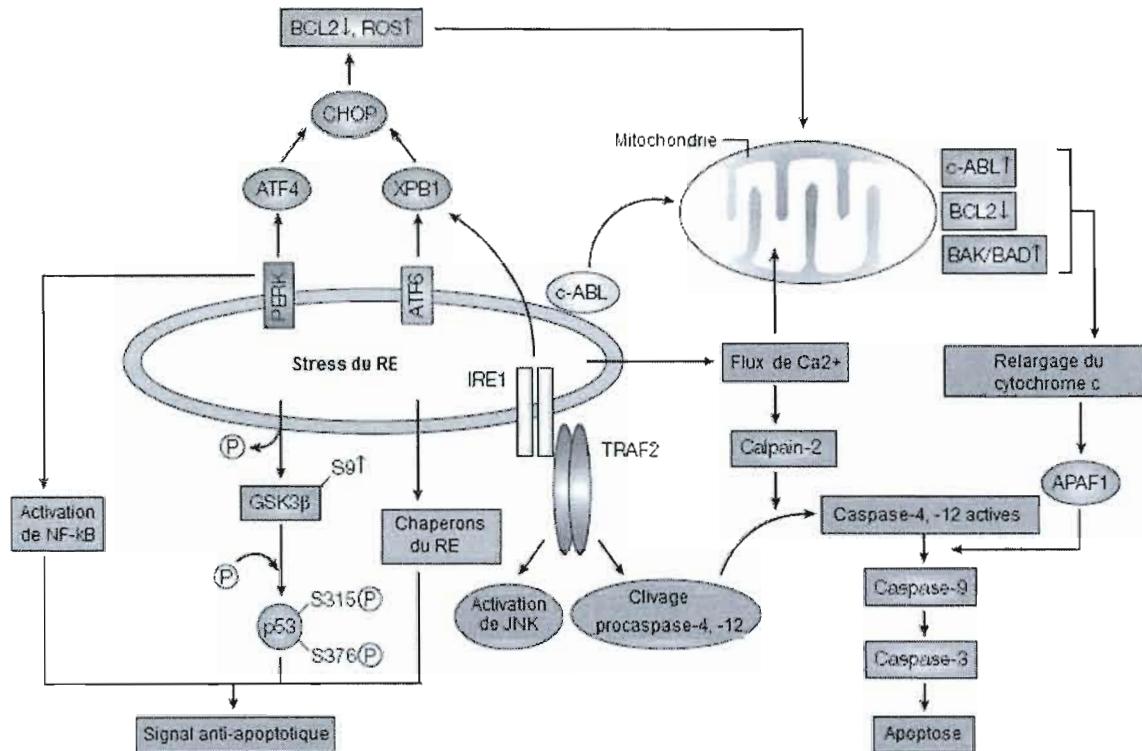


Figure 10. Actions pro- et anti-apoptotiques du stress endoplasmique.

Le stress du réticulum endoplasmique (RE) active une variété de mécanismes biochimiques. D'une part, les protéines PERK, ATF6 et IRE1 activent des processus apoptotiques (représentés en orange). D'autre part, le stress du RE peut aussi activer des processus anti-apoptotiques (représentés en gris). La balance entre les signaux pro- et anti-apoptotiques est finement régulée par des mécanismes encore peu documentés. Adapté de Ma et Hendershot (2004).

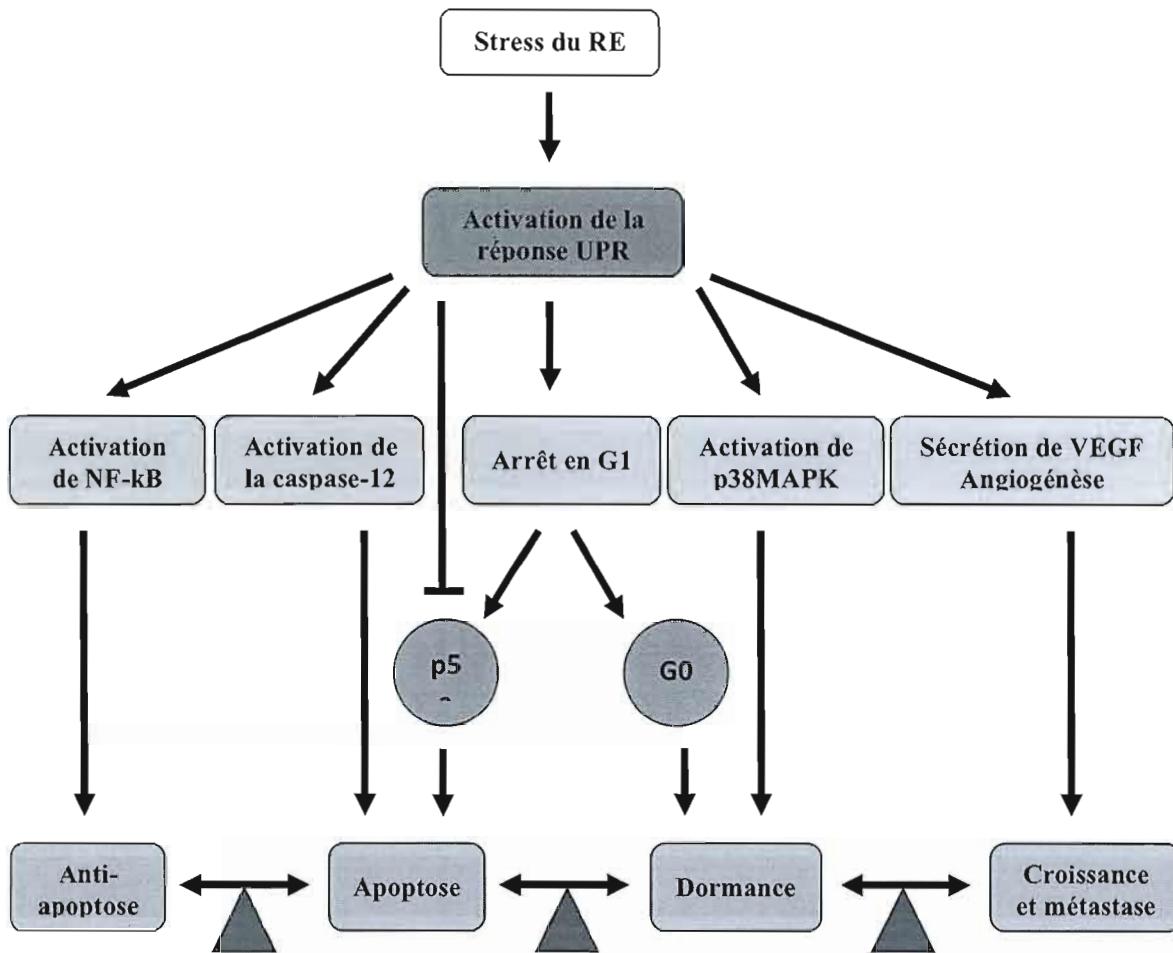


Figure 11. Le stress du RE contrôle la survie et la prolifération des cellules tumorales.
 L'activation de la voie UPR par le stress endoplasmique conduit à l'activation de la voie NF-kB qui prévient l'apoptose et assure la survie des cellules, en plus d'établir un programme transcriptionnel inflammatoire. Certaines caspases sont activées par l'UPR et le gène suppresseur de tumeur p53 est inhibé, favorisant l'apoptose. De plus, l'UPR favorise l'arrêt des cellules au stade G0, mais également la croissance et la prolifération des cellules stressées. La balance entre tous ces processus opposés est finement régulée mais les mécanismes qui favorisent un sort ou l'autre sont encore peu documentés. Adapté de Ma et Hendershot (2004).

CHAPITRE II

PROJET DE RECHERCHE

2.1 Problématique

L'importance des MMPs dans la pathologie néoplasique en ont fait une cible thérapeutique fort prometteuse et de nombreux inhibiteurs de MMPs (MPIs) ont été développés dans les dernières années. L'efficacité de ces MPIs en clinique a toutefois été décevante et n'a pas réussi à améliorer la survie des patients (Kessenbrock, Plaks et Werb, 2010) en plus de présenter de nombreux effets secondaires comme la douleur musculo-squelettique et de l'inflammation accrue (Coussens, Fingleton et Matrisian, 2002). Le ciblage des fonctions non-catalytiques des MMPs suscite donc beaucoup d'intérêt (Strongin, 2010). Par exemple, MT1-MMP, la principale MMP impliquée dans la migration des cellules de glioblastome, agit principalement via son domaine cytoplasmique de 20 acides aminés (Sakamoto et Seiki, 2009). Il est donc primordial de mieux comprendre les fonctions non-catalytiques des MMPs dans la progression tumorale, afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Par ailleurs, le stress du RE est constitutif dans un bon nombre de cancers, dont le cancer du sein (Fernandez *et al.*, 2000), les carcinomes hépatocellulaires (Shuda *et al.*, 2003), les tumeurs gastriques (Song *et al.*, 2001), le carcinome de l'œsophage (Chen *et al.*, 2002), le fibrosarcome (Shen *et al.*, 1987) et le glioblastome multiforme (Ozawa *et al.*, 2001). Le stress endoplasmique et la voie UPR peuvent protéger l'intégrité du RE et promouvoir la survie des cellules cancéreuses, mais ils peuvent aussi déclencher l'apoptose. Les facteurs qui influencent l'une ou l'autre de ces décisions cellulaires sont peu connus et il serait opportun de mieux comprendre les mécanismes moléculaires contrôlant cette balance afin d'envisager des stratégies thérapeutiques ciblant les cellules en condition de stress endoplasmique comme les cellules cancéreuses (Ma et Hendershot, 2004).

Enfin, l'utilisation des MSC comme outil thérapeutique a été envisagée pour le traitement du cancer. En effet, puisque les MSC sont recrutées au site tumoral, plusieurs groupes de recherche ont tenté de modifier génétiquement les MSC afin de les utiliser pour délivrer spécifiquement des molécules cytotoxiques (Galderisi, 2010). Toutefois, les MSC contribuent aussi grandement à la néovascularisation tumorale, à l'évasion immunitaire, à la survie des cellules souches cancéreuses et à la formation des métastases. De plus, la modification des MSC implique souvent l'utilisation de vecteurs rétroviraux, une stratégie qui comporte des risques importants. L'utilisation thérapeutique des MSC se doit d'être bien documentée (Prockop *et al.*, 2010). Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires permettant aux MSC de migrer vers le site tumoral en conditions hypoxiques pourrait permettre le développement de stratégies thérapeutiques afin de limiter la contribution des MSC à la pathologie néoplasique.

2.2 Hypothèses de travail

De nouvelles fonctions non-protéolytiques ont été associées à MT1-MMP dans la progression tumorale. Dans un premier temps, considérant le rôle que joue le stress du RE dans l'induction de l'apoptose, que les cellules de glioblastome sont constitutivement stressées et surexpriment une grande quantité de MT1-MMP qui transite par le RE, nous avons émis l'hypothèse suivante :

Hypothèse #1 : La métalloprotéase MT1-MMP peut jouer un rôle de premier plan dans le contrôle de la balance survie/mort des cellules de glioblastome.

De plus, considérant le recrutement des MSC au site tumoral hypoxique, leur migration médiée en partie par le domaine cytoplasmique de MT1-MMP et leur contribution à la progression tumorale du glioblastome, nous avons émis l'hypothèse suivante :

Hypothèse #2 : L'hypoxie et le facteur de transcription HIF-1 régulent l'expression de protéines de signalisation intracellulaires responsables de la signalisation par le domaine cytoplasmique de MT1-MMP et de la migration des MSC.

2.3 Objectifs de recherche

Dans un premier temps, nous déterminerons l'implication de la métalloprotéase MT1-MMP dans l'induction du stress endoplasmique lors de sa synthèse et de sa maturation dans le RE ainsi que son rôle dans l'apoptose qui découle de la voie UPR. Afin d'atteindre nos objectifs, nous utiliserons la lignée cellulaire de glioblastome multiforme humain U87 disponible commercialement. Cette lignée exprime de hauts niveaux endogènes de MT1-MMP et nous utiliserons des traitements pharmacologiques induisant la voie UPR et mimant les interactions cellulaires avec la MEC. Par la suite, nous évaluerons le rôle de l'hypoxie dans l'expression de la protéine d'échafaudage 3BP2, bien connue pour son rôle central dans la signalisation inflammatoire des lymphocytes T, et déterminerons son implication dans la régulation de la migration des cellules souches mésenchymateuses via MT1-MMP. Nous utiliserons des MSC isolées du fémur et du tibia de souris C57BL/6 femelles qui ont été caractérisées par cytométrie en flux tel que préalablement décrit par notre groupe de recherche (Annabi *et al.*, 2004b). Les résultats de nos travaux, publiés dans les revues scientifiques avec révision par les pairs *Journal of Neuro-Oncology* et *PLoS One*, sont présentés au chapitre III et discutés au chapitre IV.

CHAPITRE III

A ROLE FOR MT1-MMP AS A CELL DEATH SENSOR/EFFECTOR THROUGH THE REGULATION OF ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS IN U87 GLIOBLASTOMA CELLS

Article publié dans la revue scientifique *Journal of Neuro-oncology*

Proulx-Bonneau, S., J. Pratt et B. Annabi. 2010. «A role for MT1-MMP as a cell death sensor/effectector through the regulation of endoplasmic reticulum stress in U87 glioblastoma cells». *J Neurooncol.* DOI: 10.1007/s11060-010-0468-2.

Contributions des co-auteurs :

Proulx-Bonneau : Expérimentation et essais biologiques, analyse des résultats, montage des figures, rédaction du manuscrit.

Pratt : Expérimentation et essais biologiques d'appoint.

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

**A role for MT1-MMP as a cell death sensor/effecto through the regulation of
endoplasmic reticulum stress in U87 glioblastoma cells**

Sébastien Proulx-Bonneau, Jonathan Pratt and Borhane Annabi*

Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Centre de Recherche BioMED, Département de Chimie, Université du Québec à Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8

* To whom correspondence and reprint requests should be directed

Université du Québec à Montréal
Département de Chimie
C.P. 8888, Succ. Centre-ville
Montréal, Québec
CANADA, H3C 3P8
Phone : 514-987-3000 ext. 7610
Fax : 514-987-0246
E-mail : annabi.borhane@uqam.ca

Key words : Endoplasmic reticulum stress, MT1-MMP, Concanavalin-A

ABSTRACT

Recent findings in cell death signalling show that membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP), an MMP known for its involvement in cancer cell invasion and metastasis, can act as a “bioswitch” in the invasion versus cell death decision in brain tumour cells. Given that the endoplasmic reticulum (ER) is a subcellular compartment involved in metabolic control and cell death signalling and that cytoskeleton disruption, as encountered during cancer cell invasion, can lead to ER stress, we questioned whether MT1-MMP contributes to ER stress. We found that MT1-MMP gene silencing or pharmacological inhibition of vesicular trafficking with Brefeldin-A abrogated MT1-MMP cell surface-mediated proMMP-2 activation by the lectin Concanavalin-A (ConA) in U87 glioblastoma cells. ConA, also known to trigger the expression of pro-inflammatory cyclooxygenase (COX)-2 through MT1-MMP signalling from the plasma membrane, failed to do so when MT1-MMP was prevented from reaching the cell surface by Brefeldin-A. Gene silencing of MT1-MMP antagonized the expression of ConA-induced COX-2 and of the ER stress marker glucose-related protein 78 (GRP78), further suggesting that plasma membrane localization of MT1-MMP contributes to signalling ER stress. MT1-MMP maturation, which partially occurs during its trafficking from the ER to the plasma membrane, showed correlation of the 60 kDa MT1-MMP with GRP78 expression. Finally, Brefeldin-A treatment of glioblastoma cells led to Akt dephosphorylation; this effect was reversed when MT1-MMP was silenced. Collectively, our results provide a molecular rationale for a new role for MT1-MMP in the regulation of cancer cell death processes through ER stress signalling.

The abbreviations used are : Concanavalin-A, ConA; ECM, extracellular matrix; ER, endoplasmic reticulum; GRP78, glucose-related protein 78; MT1-MMP, membrane type 1 matrix metalloproteinase.

INTRODUCTION

The endoplasmic reticulum (ER) is a membrane-bound organelle present in all eukaryotic cells. Recently, ER stress signalling has been linked to disease states involving insulin resistance and disordered lipid metabolism, and to hypoxia tolerance in tumour progression (Koumenis, 2006 ; Marciniak et Ron, 2006). Accordingly, tumour cells often show evidence of constitutive ER stress, possibly due to hypoxia and glucose depletion (Linder et Shoshan, 2005). Moreover, the ATP depleting agents and ER stress inducers 2-Deoxyglucose and 5-Thioglucose have been shown to inhibit MMP-2 secretion from U87 glioblastoma-derived cells (Belkaid *et al.*, 2006), a process known to contribute to tumour development (Chintala, Tonn et Rao, 1999). In addition to its role as a multifunctional metabolic compartment that controls entry and release of calcium, sterol biosynthesis, apoptosis and the release of arachidonic acid (Csala, Banhegyi et Benedetti, 2006 ; Szegezdi *et al.*, 2006), the ER is primarily known as the site of synthesis and folding of secreted, membrane-bound, and some organelle-targeted proteins (Strasser et Puthalakath, 2008). Despite its complex organization, the ER is a continuous membrane compartment whose architecture depends upon microtubule dynamics (Vedrenne et Hauri, 2006). In accordance with this, the microtubulin cytoskeleton and the centrosomes (the microtubulin cytoskeleton-organizing centers) were found to be essential for the trafficking and internalization of the membrane-bound matrix metalloproteinase MT1-MMP (Remacle *et al.*, 2005), involved in brain tumour cell invasion, extracellular matrix (ECM) degradation and cell-ECM interaction (Sato, Takino et Miyamori, 2005).

The expression levels of several members of the MMP family have been shown to correlate with the grade level of gliomas, including that of MT1-MMP, the best-characterized MT-MMP. While most MMPs are secreted, the MT-MMPs are membrane-associated and a number of them have cytoplasmic domains which were recently shown to bear important functions in cellular signalling (Annabi *et al.*, 2004b ; Belkaid *et al.*, 2007 ; Gingras *et al.*, 2001). Aside from its well-known roles in the activation of proMMP-2 and in intrinsic proteolytic activity towards ECM molecules, many new functions of MT1-MMP have recently been associated with PGE₂-induced angiogenesis (Alfranca *et al.*, 2008), platelet-

mediated calcium mobilization (Fortier *et al.*, 2008a), regulation of proinflammatory signalling (Annabi *et al.*, 2009 ; Sina *et al.*, 2010) and radioresistance in both glioma cells (Wick *et al.*, 2002 ; Wild-Bode *et al.*, 2001) and endothelial cells (Annabi *et al.*, 2003a). More importantly, a role for MT1-MMP as a cell death/survival bioswitch has been inferred (Belkaid *et al.*, 2007 ; Fortier *et al.*, 2008b) although the mechanisms and biological significance are poorly understood.

Interactions between carbohydrate-binding proteins (lectins) and the oligosaccharide moieties of glycoproteins at the cell surface are involved in numerous cellular recognition processes including development, differentiation, morphogenesis and cell migration. We used the lectin from *Canavalia ensiformis* (Concanavalin-A, ConA), one of the most abundant lectins known (Lin et Levitan, 1991), to mimic the biological lectin/carbohydrate interactions that regulate ECM protein recognition. As such, ConA is routinely used to trigger MT1-MMP-mediated activation of latent proMMP-2 (Lafleur *et al.*, 2006 ; Yu *et al.*, 1997 ; Zucker *et al.*, 2002), and was found to increase the sub-G1 cell cycle phase and to trigger cell death. All these events are indicative of a potential role for MT1-MMP in cell surface clustering that affects cell survival (Currie *et al.*, 2007). Whether any MT1-MMP-mediated signalling that leads to ER stress is a factor in ConA-induced cell death remains unknown.

In the present study, we provide evidence for MT1-MMP as an actor in the early signalling cascade that leads to ER stress, as reflected by the increase in the ER stress marker glucose-related protein 78 (GRP78). We show that ConA treatment also regulated the proinflammatory cyclooxygenase (COX)-2 expression concomitantly with ER stress. Vesicular trafficking evidence, with the use of Brefeldin-A, further enabled us to assess the requirement of MT1-MMP at the cell surface in order to trigger ConA-mediated ER stress. The use of the lectin ConA, as an MT1-MMP-inducing agent, further linked MT1-MMP-mediated intracellular signalling to proinflammatory COX-2 expression that could account for the cell survival and inflammatory balance responsible for the therapy resistance phenotype of glioblastoma cells.

MATERIALS AND METHODS

Materials : Sodium dodecylsulfate (SDS) and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma (Oakville, ON). Cell culture media was obtained from Invitrogen (Burlington, ON). Electrophoresis reagents were purchased from Bio-Rad (Mississauga, ON). The enhanced chemiluminescence (ECL) reagents were from Amersham Pharmacia Biotech (Baie d'Urfé, QC). Micro bicinchoninic acid protein assay reagents were from Pierce (Rockford, IL). The polyclonal antibody against COX-2 was from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI). The polyclonal antibody against MT1-MMP was from Chemicon (Temecula, CA). The polyclonal antibodies against Akt and phosphorylated-Akt were purchased from Cell Signalling (Danvers, MA). The monoclonal antibody against GRP78 was from New England Biolabs (Pickering, ON). The GAPDH antibody was from Advanced Immunochemicals (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 : The human U87 glioblastoma cell line was purchased from American Type Culture Collection (Manassas, VA) and maintained in Eagle's Minimum Essential Medium containing 10% (v/v) calf serum (HyClone Laboratories, Logan, UT), 1 mM sodium pyruvate, 2 mM glutamine, 100 units/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin. Cells were incubated at 37°C with 95% air and 5% CO₂.

Total RNA isolation, cDNA synthesis and real-time quantitative RT-PCR : Total RNA was extracted from cell monolayers using TriZol reagent (Life Technologies, Gaithersburg, MD). For cDNA synthesis, 2 µg of total RNA were reverse-transcribed 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 QuantiTect primer sets were provided by Qiagen (Valencia, CA) : MT1-MMP

(Hs_Mmp14_1_SG QT00001533) and β -actin (Hs_Actb_2_SG QT01680476). GAPDH primer sets were synthesized by Biocorp (Dollard-des-Ormeaux, QC) with the following sequences: forward CCATCACCATCTTCCAGGAG and reverse CCTGCTTCACCACCTTCTTG. The relative quantities of target gene mRNA compared against two internal controls, GAPDH and β -actin RNA, were measured by following a ΔC_T method employing an amplification plot (fluorescence signal vs. cycle number). The difference (ΔC_T) between the mean values in the triplicate samples of target gene and those of GAPDH and β -actin mRNAs were calculated by iQ5 Optical System Software version 2.0 (Bio-Rad, Hercules, CA) and the relative quantified value (RQV) was expressed as $2^{-\Delta C_T}$.

Transfection method and RNA interference: Cells were transiently transfected with 20 nM siRNA against MT1-MMP (Hs_MMPI4_6 HP validated siRNA, SI03648841) or scrambled sequences (AllStar Negative Control siRNA, 1027281) using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, ON). MT1-MMP-specific gene knockdown was evaluated by qRT-PCR as described above. Small interfering RNA and mismatch siRNA were synthesized by Qiagen and annealed to form duplexes.

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

Immunoblotting procedures : Proteins from control and treated cells were separated by SDS-PAGE. After electrophoresis, proteins were electrotransferred to polyvinylidene difluoride membranes which were then blocked for 1 hr at room temperature with 5% non-fat dry milk in Tris-buffered saline (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5) containing 0.3%

Tween-20 (TBST). Membranes were further washed in TBST and incubated with the primary antibodies (1/1,000 dilution) in TBST containing 3% bovine serum albumin and 0.1% sodium azide, followed by a 1 hr incubation with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse IgG (1/2,500 dilution) in TBST containing 5% non-fat dry milk. Immunoreactive material was visualized by enhanced chemiluminescence (Amersham Biosciences, Baie d'Urfée, QC).

Immunofluorescent microscopy : U87 cells were serum-starved in media containing vehicle or 100 ng/mL Brefeldin-A for 24 hours. Brefeldin effect was compared to that of siMT1-MMP-transfected cells as described above. Media was then removed and cells fixed in formalin phosphate buffer (Fisher Scientific, Ottawa, ON) for 20 minutes, then blocked 1 hour in 1% BSA/PBS. Immunostaining was performed for 1 hour with the anti-MT1-MMP catalytic domain antibody 1:200 in 1% BSA/PBS (Millipore, Laval, QC), followed by 1:200 anti-mouse-alex Fluor 488 (Invitrogen, ON), and fluorescence examined by microscopy.

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

Brefeldin-A inhibits cell surface localization of MT1-MMP. The efficacy of Brefeldin-A as an inhibitor of vesicular trafficking was first assessed. U87 cells were treated with vehicle or Brefeldin-A and cell surface localization of MT1-MMP evaluated by immunofluorescence as described in the Methods section. We demonstrate, in fixed non-permeabilized cells, that untreated cells had cell surface fluorescent staining with anti-MT1-MMP antibody directed against its extracellular catalytic domain (Fig.1, control). In contrast, significantly diminished staining was found in either Brefeldin-A-treated cells (Fig.1, Brefeldin), or in cells where MT1-MMP expression was silenced (Fig.1, siMT1-MMP). These data support the cell surface localization of MT1-MMP and that Brefeldin-A prevented efficient targeting of MT1-MMP to the plasma membrane.

Concanavalin-A triggers MT1-MMP gene expression. Concanavalin-A (ConA) is a well-documented lectin which, through its binding to carbohydrate moieties on cell surface proteins, elicits very efficient *in vitro* induction of MT1-MMP expression (Belkaid *et al.*, 2007 ; Sina, Lord-Dufour et Annabi, 2009). Serum-starved U87 glioblastoma cells were therefore treated with ConA, Brefeldin-A, or a combination of both. Total RNA was then isolated and MT1-MMP gene expression assessed using qRT-PCR. We found that ConA effectively induced MT1-MMP gene expression, while Brefeldin was ineffective at doing so (Fig.2A, Mock). When MT1-MMP gene expression was silenced, the MT1-MMP transcript levels were accordingly decreased under all conditions and ConA's ability to induce MT1-MMP was abrogated (Fig.2A, siMT1-MMP). Brefeldin's effect on MT1-MMP trafficking to the cell surface was also evaluated. Cell lysates were generated and MT1-MMP protein expression was assessed using immunodetection as described in the Methods section. In agreement with the gene expression data, we found that ConA-treated cells exhibited increased MT1-MMP protein expression as reflected by the mature 55kDa form (Fig.2B, upper panel). Brefeldin treatment trapped the unprocessed 60 kDa form of MT1-MMP, which intracellular trapped form is in agreement with previous reports highlighting the required molecular maturation and subsequent trafficking to the plasma membrane (Atkinson, Roghi et Murphy, 2006 ; Wu *et al.*, 2007). In order to evaluate the impact of cellular compartment

targeting of MT1-MMP, the levels of proMMP-2 activation were assessed in the conditioned media by gelatin zymography as described in the Methods section. We observed that ConA treatment resulted in an increase in proMMP-2 activation, while the combined Brefeldin/ConA treatment resulted in lower activation of proMMP-2 in agreement with the fact that MT1-MMP remained trapped within the cell (Fig.2B, lower panel). Brefeldin-A treatment alone did not affect cell surface localized MT1-MMP functions in proMMP-2 activation (data not shown). Gene silencing of MT1-MMP significantly abrogated any ConA-mediated proMMP-2 activation (Fig.2B).

Brefeldin-A inhibits MT1-MMP trafficking to the plasma membrane. Most of the MT1-MMP functions are performed at the cell surface and include ECM degradation and activation of latent proMMPs as well as hydrolysis of cell surface receptors (Belkaid *et al.*, 2007 ; Gingras *et al.*, 2001). MT1-MMP's intracellular domain enables additional functions in signal transduction including activation of signalling pathways such as ERK (Gingras *et al.*, 2001), NK-kB (Annabi *et al.*, 2009 ; Sina *et al.*, 2010), and RhoA (Meriane *et al.*, 2006). We assessed the relevance of MT1-MMP localization at the plasma membrane on the expression of COX-2 and GRP78. ConA and Brefeldin-A treatment of U87 cells all led to increased GRP78 expression (Fig.3A, upper panel). Only ConA treatment was able to also trigger COX-2 expression (Fig.3A, middle panel). This suggests that both ConA-induced MT1-MMP synthesis or Brefeldin-A ER trapping of MT1-MMP lead to ER stress while only cell surface localization of MT1-MMP enables ConA to trigger signalling that leads to COX-2 expression in agreement with previous reports (Annabi *et al.*, 2009 ; Sina *et al.*, 2010). The importance of MT1-MMP expression was further confirmed through gene silencing strategies, where cells transfected with MT1-MMP siRNA not only inhibited ConA and Brefeldin-A from inducing GRP78 (Fig.3B, black bars) but also inhibited ConA-induced COX-2 expression (Fig.3C, black bars).

MT1-MMP proteolytic processing does not contribute to the induction of endoplasmic reticulum stress by Concanavalin-A. The importance of MT1-MMP maturation through proteolytic processing was next assessed using ConA and Brefeldin-A treatment. MT1-MMP proteolytic processing was first triggered by ConA, which is known to trigger

proteolytic processing of the 60 kDa immature MT1-MMP form to a 55 kDa processed form (Fortier *et al.*, 2008b ; Sina, Lord-Dufour et Annabi, 2009 ; Sina *et al.*, 2010 ; Yu *et al.*, 1997). Serum-starved cells were treated for 18 hours, and ConA (Fig.4A, filled circles) was found to rapidly induce the expression of the processed 55 kDa form of MT1-MMP, while expression of the 60 kDa form remained largely unchanged through that same time period as compared to non-treated cells (open circles) (Fig.4A, left and middle panels). GRP78 expression was also found to be rapidly (< 2 hours) induced and to reach a plateau at 4 hours (Fig.4A, right panel). When correlations were performed between the levels of GRP78 and of the 60 kDa MT1-MMP (Fig.4B, left panel) or between the levels of GRP78 and 55 kDa MT1-MMP (Fig.4B, right panel), no significant correlations were found, with respective correlation factors of $r^2=0.39$ and $r^2=0.31$ respectively. This suggests that cell surface localization of MT1-MMP, rather than proteolytic processing, may contribute to the ER stress induction processes.

Inhibition of MT1-MMP cell surface localization by Brefeldin-A triggers endoplasmic reticulum stress. MT1-MMP maturation occurs along its trafficking from the ER to the cell surface (Zucker *et al.*, 2002). Furthermore, we showed above that MT1-MMP gene silencing abrogated the ability of Brefeldin-A to trigger ER stress (Fig.3). We next investigated which MT1-MMP form affects ER stress induction upon Brefeldin-A treatment. Cells were treated with Brefeldin-A for 18 hours as described in the Methods section. Intracellular trapping through the inhibition of vesicular trafficking of MT1-MMP led to increased expression of the 60 kDa form of MT1-MMP, while the level of the 55 kDa form decreased with time (Fig.5A, left and middle panels). Brefeldin-A also time-dependently led to GRP78 expression (Fig.5A, right panel). When correlations were assessed, we found that GRP78 expression was directly correlated with that of the 60 kDa MT1-MMP form trapped within the ER (Fig.5B, left panel), while an inverse, non-significant correlation was observed between GRP78 and the 55 kDa MT1-MMP form (Fig.5B, right panel). Collectively, this lends further support to a role for MT1-MMP in the ER stress processes and highlights the 60 kDa MT1-MMP form among the major contributors.

Endoplasmic reticulum trapping of MT1-MMP triggers cell death signalling. The effect on cell survival of the MT1-MMP-mediated signalling that leads to ER stress was next assessed. The phosphorylation status of Akt is a well established marker that enables assessment of the cell signalling regulating survival. Cells were treated with either ConA, Brefeldin-A, or a combination of both and phosphorylated Akt levels were then measured in cell lysates. As expected, high phosphorylated Akt levels were observed in the control conditions of Mock or siMT1-MMP-transfected cells (Fig.6A). When cells were treated with ConA, Akt phosphorylation decreased (Fig.6B) in agreement with the pro-apoptotic actions of ConA (Currie *et al.*, 2007 ; Fortier *et al.*, 2008b). Brefeldin-A treatment of the cells also led to decreased Akt phosphorylation levels in Mock cells, but this effect was abrogated when MT1-MMP was silenced (Fig.6B). Altogether, this suggests that MT1-MMP trapping within the ER by Brefeldin-A is in part responsible for the cell death signalling triggered by Brefeldin-A.

DISCUSSION

Gliomas remain a great challenge in oncology today as they account for more than 50% of all brain tumours and are by far the most common primary brain tumours in adults (Stewart, 2002). Moreover, the mechanisms involved in the resistance of migrating glioblastoma cells to chemotherapy or to radiation-induced cell death have long been recognized (Berens et Giese, 1999), and still receive much attention (Lefranc, Brotchi et Kiss, 2005). While diffuse infiltration of glioma cells into normal brain tissue is considered to be a main reason for the unfavorable outcomes for patients with malignant gliomas, it was recently reported that MT1-MMP was up-regulated in glioma-associated microglia rather than in glioma cells themselves, the pathological consequences of which suggest that gliomas induce and exploit microglial MT1-MMP expression for tumour expansion (Markovic *et al.*, 2009). Overexpression of MT1-MMP was, in fact, found to be lethal for glioma cells in agreement with our current study but the specific subcellular requirements in the MT1-MMP-mediated cell death signalling still remain undefined.

Our data provide vesicular trafficking evidence linking MT1-MMP's role in cell death signalling to protein maturation from the ER to the plasma membrane (Fig.7). We conclude that MT1-MMP is an absolute requirement for lectin-induced ER stress and COX-2 expression, and that failure of MT1-MMP to localize at the plasma membrane abrogated signalling leading to COX-2 expression. Induction of ER stress was also abrogated when either MT1-MMP expression was silenced or when the mature 60 kDa form of MT1-MMP was trapped within the ER (Fig.3 and Fig.4B). Accordingly, the processing of the prodomain leading to MT1-MMP activation was demonstrated to be accomplished while the *de novo* synthesized MT1-MMP proenzyme is on its way to the plasma membrane, possibly through the known association of furin with the Golgi compartment and the secretory vesicles (Golubkov *et al.*, 2010). As a consequence in tumourigenic processes, it is hypothesized that MT1-MMP may become active inside cancer cells prior to its presentation at the cell surface. The implications of such observations are that, in addition to regulating pericellular proteolysis, MT1-MMP could cleave crucial co-compartmentalized substrate proteins.

Concomitantly, MT1-MMP could also trigger cell death signalling directly in the course of protein processing in cancer cells.

The intracellular metabolic compartments regulating cell survival and invasiveness are of particular interest since tumour cells must adapt to hypoxic stress by upregulating a variety of genes involved in glucose uptake, glycolysis and angiogenesis, all essential to maintaining nutrient availability and intracellular ATP levels (Ziemer *et al.*, 2001). Aside from mitochondria and lysosomes, the ER is also very important in this respect as it is now recognized as an important sensor of cellular stress and it plays a key role in the release and activation of death factors such as cathepsins, calpains, and other proteases through intracellular calcium flux (Broker, Kruyt et Giaccone, 2005). When experiencing cellular stresses, maintenance of cytoarchitecture is required for cell survival since its perturbation by Cytochalasin-D- or ConA-mediated MT1-MMP mechanisms diminished cell survival but were correlated to MT1-MMP's ability to activate proMMP-2 (Belkaid *et al.*, 2007 ; Hinoue *et al.*, 2005 ; Preaux *et al.*, 2002). In fact, MT1-MMP's intracellular domain has been demonstrated to be an absolute requirement for transducing the intracellular signalling that leads to cell death (Belkaid *et al.*, 2007 ; Currie *et al.*, 2007). Finally, a caspase-dependent mechanism has recently been associated with MT1-MMP function in endothelial cell morphogenic differentiation (Langlois *et al.*, 2005), and confirms that MT1-MMP acts as a cell death sensor/effectector that signals ECM degradation processes.

Along with vesicular trafficking evidence for a role for MT1-MMP in ER stress induction, we also showed that COX-2 expression was regulated, in part, through MT1-MMP. In human glioblastoma, COX-2 performs important functions in tumourigenesis (Deininger *et al.*, 1999) and inhibitors of eicosanoid biosynthesis have been shown to suppress cell proliferation and to promote astrocytic differentiation (Wilson, Anderson et Seed, 1990). Since COX-2 protein is overexpressed in the majority of gliomas, it is therefore considered an attractive therapeutic target (New, 2004 ; Sminia *et al.*, 2005). Paradoxically, the effectiveness of direct COX-2 inhibitors on glioma cell proliferation and radioresponse enhancement has been shown to be independent of COX-2 protein expression (Kuipers *et al.*,

2007). This evidence suggests that alternate initiator molecules, possibly involving cell surface transducing mechanisms, are associated with therapy resistance and involved in the regulation of COX-2 expression. Whether MT1-MMP (our data), or any cell surface carbohydrate structures, are involved in such regulation remains to be confirmed. Nevertheless, it becomes tempting to suggest that targeting MT1-MMP pleiotropic intracellular transducing functions that, among other targets, lead to COX-2 expression may help design or optimize current therapeutic strategies.

Poor chemosensitivity and the development of chemoresistance remain major obstacles to successful chemotherapy of malignant gliomas. GRP78, which maintains ER homeostasis and suppresses stress-induced apoptosis, is expressed at low levels in normal adult brain, but is significantly elevated in malignant glioma specimens and human malignant glioma cell lines, correlating with their rate of proliferation. Down-regulation of GRP78 by small interfering RNA lead to a slowdown in glioma cell growth, and knockdown of GRP78 in glioblastoma cell lines induces CHOP and activates caspase-7 in temozolomide-treated cells (Pyrko *et al.*, 2007). Here, we show a correlation between MT1-MMP intracellular signaling that leads to GRP78 expression and that may act as a cell death sensor/effect. Our results further show that combination of drugs capable of suppressing MT1-MMP and/or induction of GRP78 might represent a novel approach to eliminate residual tumor cells after surgery and increase the effectiveness of malignant glioma chemotherapy. As an example, aggravated ER stress has proved to enhance glioblastoma cell killing by the proteasome inhibitor bortezomib in combination with COX-2 inhibitor celecoxib (Kardosh *et al.*, 2008).

In summary, we highlight new functions of MT1-MMP in cell death signalling, as previously reported (Belkaid *et al.*, 2007 ; Currie *et al.*, 2007 ; Fortier *et al.*, 2008b), which may potentially be linked to those of the ER-mediated stress signalling. We believe that this signalling axis may not be exclusive to one cell type, and that it may regulate cell mobilization processes through metabolic and/or cell survival control such as have been demonstrated for endothelial cells (Langlois *et al.*, 2005) and for bone marrow-derived

stromal cells (Currie *et al.*, 2007). Our study further indicates a molecular axis linking the invasive phenotype of brain tumour cells to their potential metabolic control through the ER. By revealing tumour-specific metabolic shifts in tumour cells, metabolic profiling studies will further enable drug developers to identify the metabolic steps that control cell proliferation, thus aiding the identification of new anti-cancer targets and screening of lead compounds for anti-proliferative metabolic effects.

ACKNOWLEDGEMENTS

BA holds a Canada Research Chair in Molecular Oncology from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). SPB is a Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT) awardee. JP is a Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) awardee. This study was funded by a grant from the NSERC to BA.

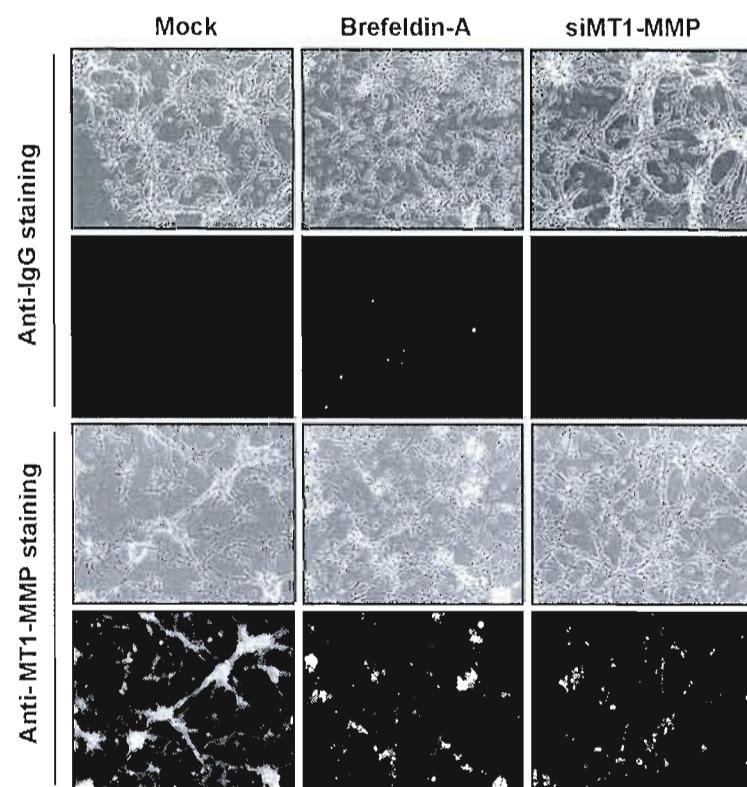


Fig.1 : Brefeldin-A inhibits cell surface localization of MT1-MMP.

U87 glioblastoma-derived cells were serum starved and treated with vehicle or 100 ng/mL Brefeldin-A for 18 hours. U87 cells were also transfected with siMT1-MMP. Anti-IgG or anti-MT1-MMP catalytic antibody staining was performed as described in the Methods section, and phase contrast visible cells or MT1-MMP-associated cell surface fluorescence acquired by microscopy.

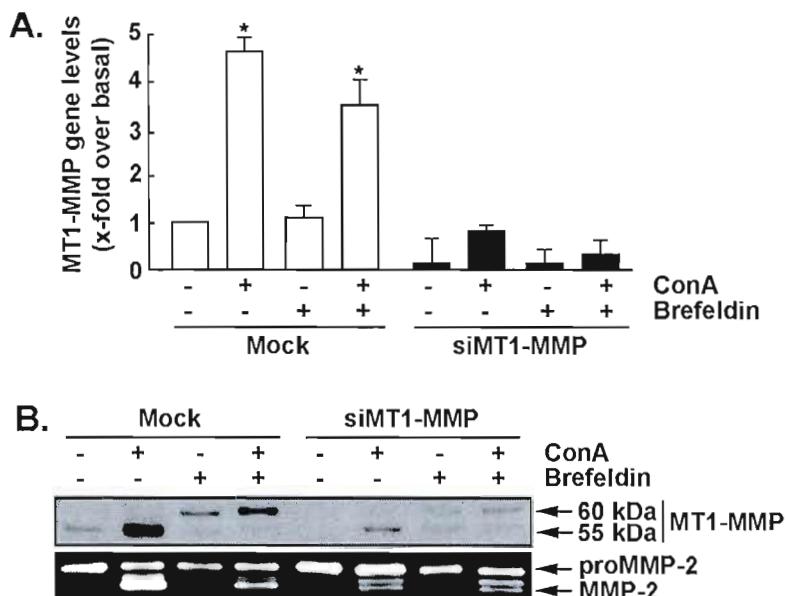


Fig.2 : Concanavalin-A triggers MT1-MMP gene expression.

U87 glioblastoma-derived cells were serum starved and treated with 30 µg/mL Concanavalin-A (ConA), 100 ng/mL Brefeldin-A, or a combination of both for 18 hours. (A) Total RNA isolation and qRT-PCR were performed as described in the Methods section to assess MT1-MMP gene expression in Mock- (white bars) or siMT1-MMP-transfected cells (black bars). (B) Cell lysates as well as conditioned media were isolated as described in the Methods section in order to perform MT1-MMP immunodetection (top) and gelatin zymography (bottom) to assess proMMP-2 activation states.

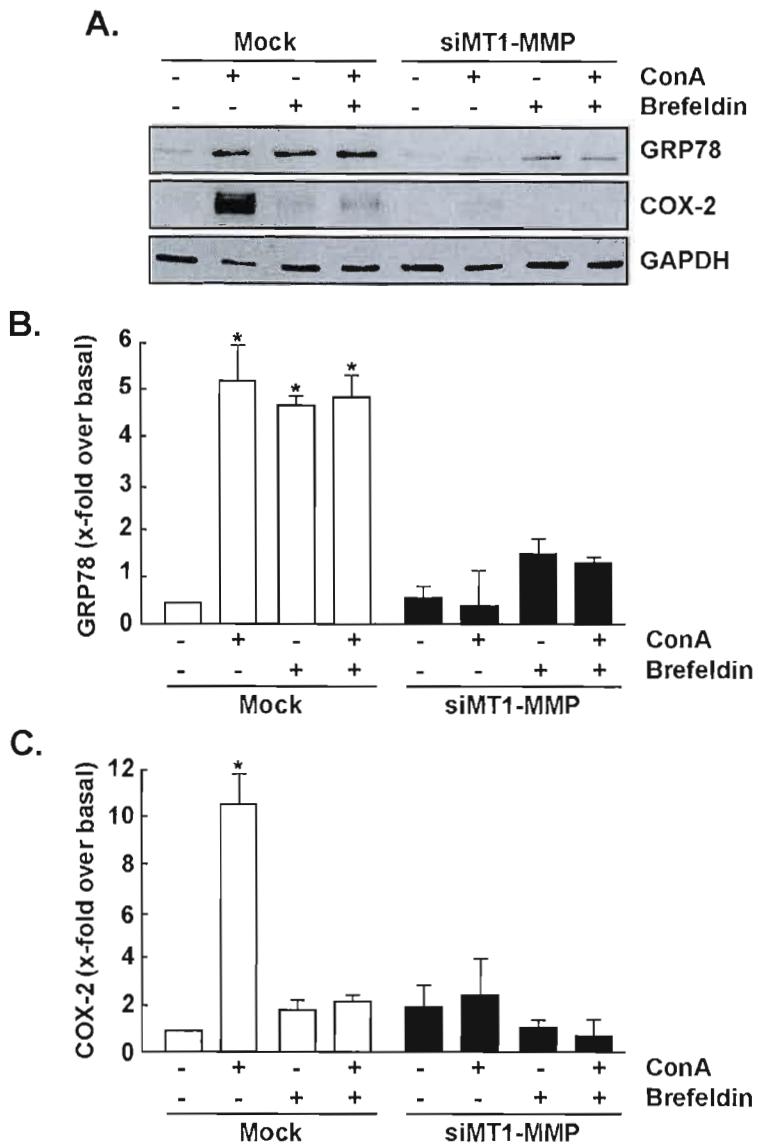


Fig.3 : Brefeldin inhibits MT1-MMP trafficking to the plasma membrane.

U87 glioblastoma-derived cells were serum starved and treated with 30 µg/mL Concanavalin-A (ConA), 100 ng/mL Brefeldin-A or a combination of both for 18 hours. (A) Cell lysates were isolated as described in the Methods section to assess GRP78, COX-2 and GAPDH expression in Mock- (white bars) or siMT1-MMP-transfected cells (black bars) by Western blot. Scanning densitometry was used to assess the extent of (B) GRP78 or (C) COX-2 protein expression.

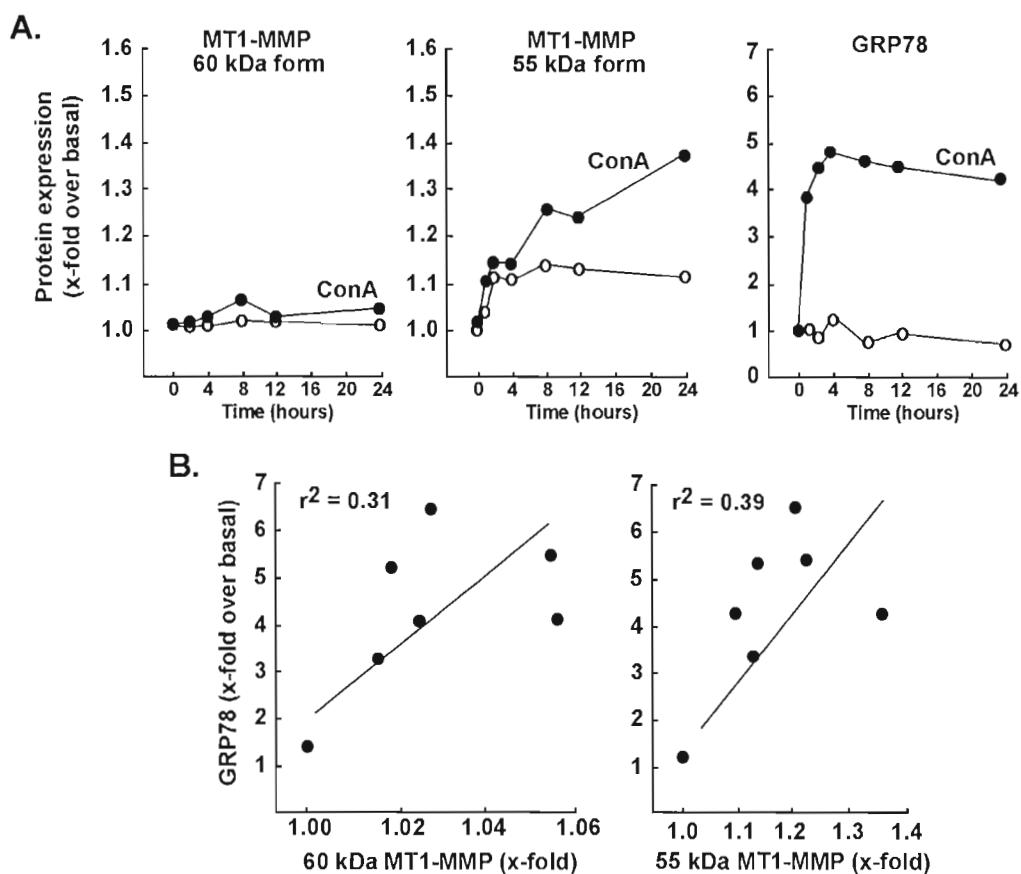


Fig.4 : MT1-MMP proteolytic processing does not contribute to the induction of endoplasmic reticulum stress by Concanavalin-A.

U87 glioblastoma-derived cells were serum starved for 18 hours in the absence (open circles) or presence (closed circles) of 30 µg/mL ConA. Cell lysates were then isolated at different time points as described in the Methods section. (A) The 60 kDa and 55 kDa forms of MT1-MMP, and GRP78 were immunodetected and scanning densitometry data performed. (B) Correlation plots were made between expression levels of GRP78 and either the 60 kDa MT1-MMP or the 55 kDa MT1-MMP.

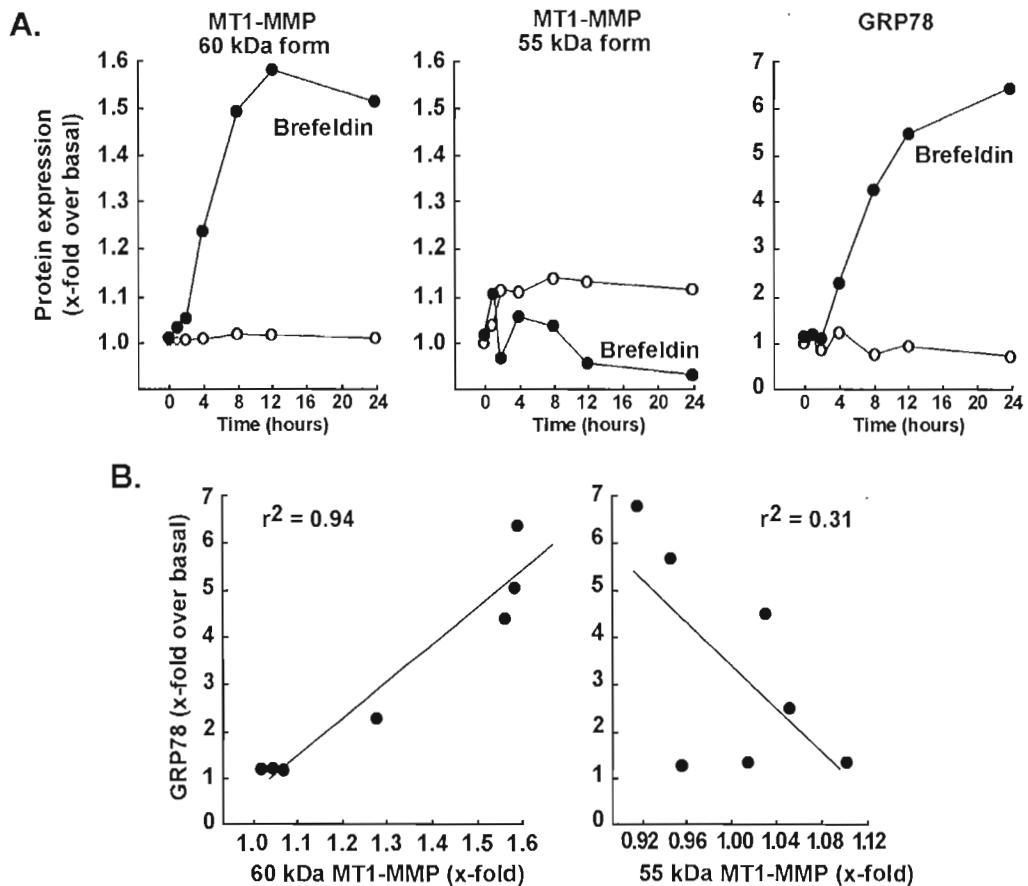


Fig.5 : Inhibition of MT1-MMP vesicular trafficking triggers endoplasmic reticulum stress.

U87 glioblastoma-derived cells were serum starved for 24 hours in the absence (open circles) or presence (closed circles) of 100 ng/mL Brefeldin-A. Cell lysates were then isolated at different time points as described in the Methods section. (A) The 60 kDa and 55 kDa forms of MT1-MMP, and GRP78 were immunodetected and scanning densitometry data was performed. (B) Correlation plots were made between expression levels of GRP78 and either the 60 kDa MT1-MMP or the 55 kDa MT1-MMP.

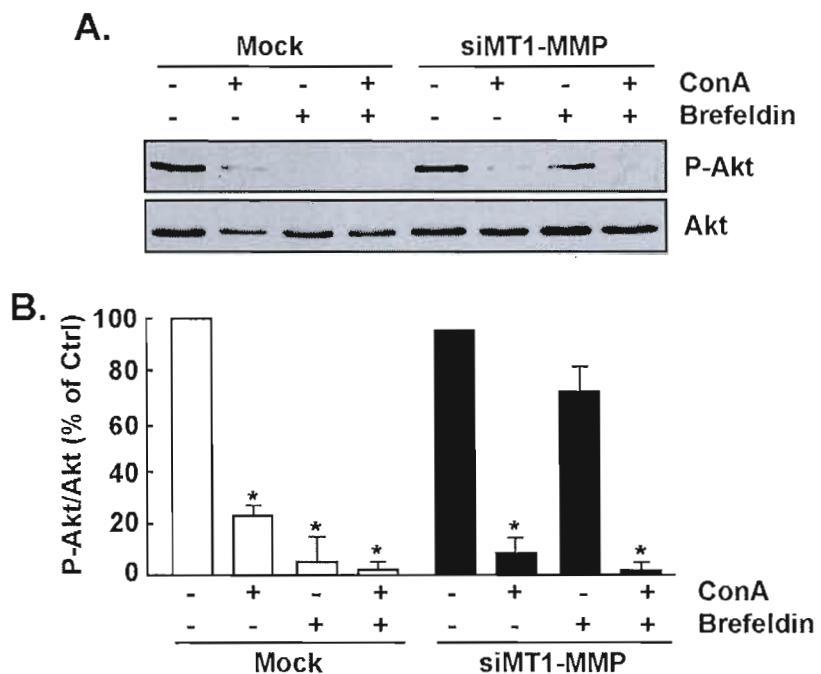


Fig.6 : Endoplasmic reticulum trapping of MT1-MMP triggers cell death signalling.

U87 glioblastoma-derived cells were serum starved and treated with 30 µg/mL Concanavalin-A (ConA), 100 ng/mL Brefeldin-A, or a combination of both for 18 hours. (A) Cell lysates were isolated as described in the Methods section and used to detect Akt and phosphorylated Akt from Mock- or siMT1-MMP-transfected cells by Western blot. (B) Scanning densitometry was used to assess the extent of Akt phosphorylation in Mock- (white bars) or siMT1-MMP-transfected cells (black bars).

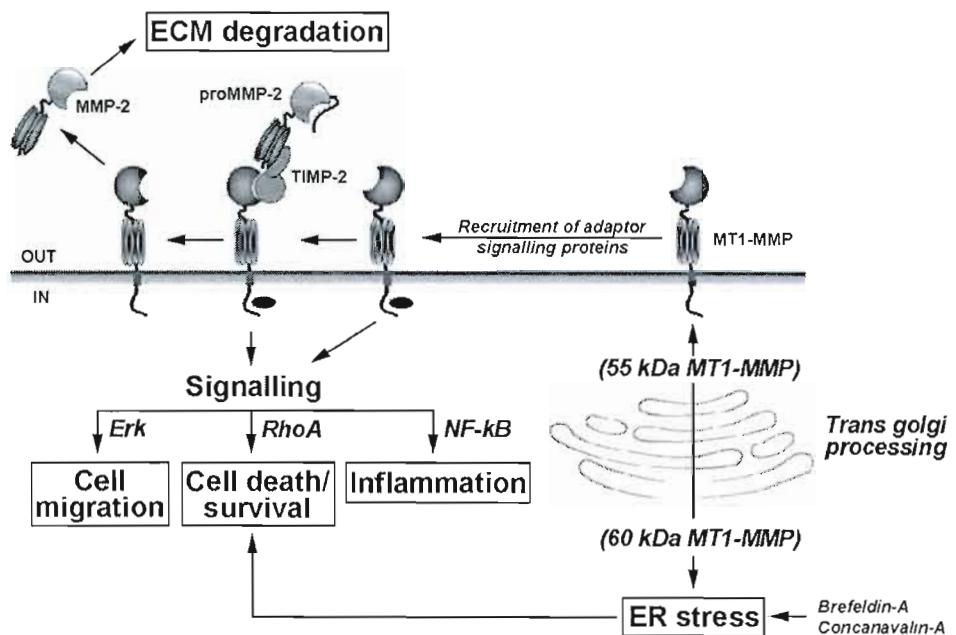


Fig.7 : Schematic representation of the possible mechanisms involved in MT1-MMP-mediated ER stress and cell death signalling in U87 glioblastoma cells.

Cellular stress induction such as hypoxia, or pharmacological stress inducers such as Concanavalin-A or Brefeldin-A can trigger ER stress that can consequently lead to cell death. Our study provides evidence for the involvement of ER-trapped 60 kDa MT1-MMP in the induction of ER stress. MT1-MMP furin-mediated trans golgi proteolytic processing (Golubkov *et al.*, 2010) can lead to the generation of a 55kDa MT1-MMP at the cell surface. Recruitement of adaptor signalling proteins (Gingras *et al.*, 2008 ; Nyalendo *et al.*, 2007) is thought to regulate subsequent MT1-MMP-mediated functions in ECM degradation through TIMP-2/proMMP-2 activation, or signalling that leads to the regulation of cell migration (Erk, (Annabi *et al.*, 2004b ; Gingras *et al.*, 2001)) cell death/survival (RhoA, (Annabi *et al.*, 2005)), or inflammation (NF- κ B, (Annabi *et al.*, 2009 ; Sina *et al.*, 2010)).

REFERENCES

- Alfranca, A., J. M. Lopez-Oliva, L. Genis, D. Lopez-Maderuelo, I. Mirones, D. Salvado, A. J. Quesada, A. G. Arroyo et J. M. Redondo. 2008. «PGE2 induces angiogenesis via MT1-MMP-mediated activation of the TGFbeta/Alk5 signaling pathway». *Blood*, vol. 112, no 4, p. 1120-1128.
- Annabi, B., M. Bouzeghrane, R. Moumdjian, A. Moghrabi et R. Beliveau. 2005. «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*, vol. 94, no 4, p. 906-916.
- Annabi, B., C. Laflamme, A. Sina, M. P. Lachambre et R. Beliveau. 2009. «A MT1-MMP/NF-kappaB signaling axis as a checkpoint controller of COX-2 expression in CD133+ U87 glioblastoma cells». *J Neuroinflammation*, vol. 6, p. 8.
- Annabi, B., Y. T. Lee, C. Martel, A. Piloret, J. P. Bahary et R. Beliveau. 2003. «Radiation induced-tubulogenesis in endothelial cells is antagonized by the antiangiogenic properties of green tea polyphenol (-) epigallocatechin-3-gallate». *Cancer Biol Ther*, vol. 2, no 6, p. 642-649.
- Annabi, B., S. Thibeault, R. Moumdjian et R. Beliveau. 2004. «Hyaluronan cell surface binding is induced by type I collagen and regulated by caveolae in glioma cells». *J Biol Chem*, vol. 279, no 21, p. 21888-21896.
- Atkinson, S. J., C. Roghi et G. Murphy. 2006. «MT1-MMP hemopexin domain exchange with MT4-MMP blocks enzyme maturation and trafficking to the plasma membrane in MCF7 cells». *Biochem J*, vol. 398, no 1, p. 15-22.
- Belkaid, A., J. C. Currie, J. Desgagnes et B. Annabi. 2006. «The chemopreventive properties of chlorogenic acid reveal a potential new role for the microsomal glucose-6-phosphate translocase in brain tumor progression». *Cancer Cell Int*, vol. 6, p. 7.
- Belkaid, A., S. Fortier, J. Cao et B. Annabi. 2007. «Necrosis induction in glioblastoma cells reveals a new "bioswitch" function for the MT1-MMP/G6PT signaling axis in proMMP-2 activation versus cell death decision». *Neoplasia*, vol. 9, no 4, p. 332-340.
- Berens, M. E., et A. Giese. 1999. «"...those left behind." Biology and oncology of invasive glioma cells». *Neoplasia*, vol. 1, no 3, p. 208-219.

- Broker, L. E., F. A. Kruyt et G. Giaccone. 2005. «Cell death independent of caspases: a review». *Clin Cancer Res*, vol. 11, no 9, p. 3155-3162.
- Chintala, S. K., J. C. Tonn et J. S. Rao. 1999. «Matrix metalloproteinases and their biological function in human gliomas». *Int J Dev Neurosci*, vol. 17, no 5-6, p. 495-502.
- Csala, M., G. Banhegyi et A. Benedetti. 2006. «Endoplasmic reticulum: a metabolic compartment». *FEBS Lett*, vol. 580, no 9, p. 2160-2165.
- Currie, J. C., S. Fortier, A. Sina, J. Galipeau, J. Cao et B. Annabi. 2007. «MT1-MMP down-regulates the glucose 6-phosphate transporter expression in marrow stromal cells: a molecular link between pro-MMP-2 activation, chemotaxis, and cell survival». *J Biol Chem*, vol. 282, no 11, p. 8142-8149.
- Deininger, M. H., M. Weller, J. Streffer, M. Mittelbronn et R. Meyermann. 1999. «Patterns of cyclooxygenase-1 and -2 expression in human gliomas in vivo». *Acta Neuropathol*, vol. 98, no 3, p. 240-244.
- Fortier, S., D. Labelle, A. Sina, R. Moreau et B. Annabi. 2008a. «Silencing of the MT1-MMP/ G6PT axis suppresses calcium mobilization by sphingosine-1-phosphate in glioblastoma cells». *FEBS Lett*, vol. 582, no 5, p. 799-804.
- Fortier, S., M. Touaibia, S. Lord-Dufour, J. Galipeau, R. Roy et B. Annabi. 2008b. «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*, vol. 18, no 2, p. 195-204.
- Gingras, D., N. Bousquet-Gagnon, S. Langlois, M. P. Lachambre, B. Annabi et R. Beliveau. 2001. «Activation of the extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) cascade by membrane-type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP)». *FEBS Lett*, vol. 507, no 2, p. 231-236.
- Gingras, D., M. Michaud, G. Di Tomasso, E. Beliveau, C. Nyalendo et R. Beliveau. 2008. «Sphingosine-1-phosphate induces the association of membrane-type 1 matrix metalloproteinase with p130Cas in endothelial cells». *FEBS Lett*, vol. 582, no 3, p. 399-404.
- Golubkov, V. S., P. Cieplak, A. V. Chekanov, B. I. Ratnikov, A. E. Aleshin, N. V. Golubkova, T. I. Postnova, I. A. Radichev, D. V. Rozanov, W. Zhu, K. Motamedchaboki et A. Y. Strongin. 2010. «Internal Cleavages of the Autoinhibitory

- Prodomain Are Required for Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase Activation, although Furin Cleavage Alone Generates Inactive Proteinase». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, no 36, p. 27726-27736.
- Hinoue, A., T. Takigawa, T. Miura, Y. Nishimura, S. Suzuki et K. Shiota. 2005. «Disruption of actin cytoskeleton and anchorage-dependent cell spreading induces apoptotic death of mouse neural crest cells cultured in vitro». *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, vol. 282, no 2, p. 130-137.
- Kardosh, A., E. B. Golden, P. Pyrko, J. Uddin, F. M. Hofman, T. C. Chen, S. G. Louie, N. A. Petasis et A. H. Schonthal. 2008. «Aggravated endoplasmic reticulum stress as a basis for enhanced glioblastoma cell killing by bortezomib in combination with celecoxib or its non-coxib analogue, 2,5-dimethyl-celecoxib». *Cancer Res*, vol. 68, no 3, p. 843-851.
- Koumenis, C. 2006. «ER stress, hypoxia tolerance and tumor progression». *Curr Mol Med*, vol. 6, no 1, p. 55-69.
- Kuipers, G. K., B. J. Slotman, L. E. Wedekind, T. R. Stoter, J. Berg, P. Sminia et M. V. Lafleur. 2007. «Radiosensitization of human glioma cells by cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition: independent on COX-2 expression and dependent on the COX-2 inhibitor and sequence of administration». *Int J Radiat Biol*, vol. 83, no 10, p. 677-685.
- Lafleur, M. A., F. A. Mercuri, N. Ruangpanit, M. Seiki, H. Sato et E. W. Thompson. 2006. «Type I collagen abrogates the clathrin-mediated internalization of membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) via the MT1-MMP hemopexin domain». *J Biol Chem*, vol. 281, no 10, p. 6826-6840.
- Langlois, S., G. Di Tomasso, D. Boivin, C. Roghi, G. Murphy, D. Gingras et R. Beliveau. 2005. «Membrane type 1-matrix metalloproteinase induces endothelial cell morphogenic differentiation by a caspase-dependent mechanism». *Exp Cell Res*, vol. 307, no 2, p. 452-464.
- Lefranc, F., J. Brotchi et R. Kiss. 2005. «Possible future issues in the treatment of glioblastomas: special emphasis on cell migration and the resistance of migrating glioblastoma cells to apoptosis». *J Clin Oncol*, vol. 23, no 10, p. 2411-2422.
- Lin, S. S., et I. B. Levitan. 1991. «Concanavalin A: a tool to investigate neuronal plasticity». *Trends Neurosci*, vol. 14, no 7, p. 273-277.

- Linder, S., et M. C. Shoshan. 2005. «Lysosomes and endoplasmic reticulum: targets for improved, selective anticancer therapy». *Drug Resist Updat*, vol. 8, no 4, p. 199-204.
- Marciniak, S. J., et D. Ron. 2006. «Endoplasmic reticulum stress signaling in disease». *Physiol Rev*, vol. 86, no 4, p. 1133-1149.
- Markovic, D. S., K. Vinnakota, S. Chirasani, M. Synowitz, H. Raguet, K. Stock, M. Sliwa, S. Lehmann, R. Kalin, N. van Rooijen, K. Holmbeck, F. L. Heppner, J. Kiwit, V. Matyash, S. Lehnardt, B. Kaminska, R. Glass et H. Kettenmann. 2009. «Gliomas induce and exploit microglial MT1-MMP expression for tumor expansion». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 106, no 30, p. 12530-12535.
- Meriane, M., S. Duhamel, L. Lejeune, J. Galipeau et B. Annabi. 2006. «Cooperation of matrix metalloproteinases with the RhoA/Rho kinase and mitogen-activated protein kinase kinase-1/extracellular signal-regulated kinase signaling pathways is required for the sphingosine-1-phosphate-induced mobilization of marrow-derived stromal cells». *Stem Cells*, vol. 24, no 11, p. 2557-2565.
- New, P. 2004. «Cyclooxygenase in the treatment of glioma: its complex role in signal transduction». *Cancer Control*, vol. 11, no 3, p. 152-164.
- Nyalendo, C., M. Michaud, E. Beaulieu, C. Roghi, G. Murphy, D. Gingras et R. Beliveau. 2007. «Src-dependent phosphorylation of membrane type I matrix metalloproteinase on cytoplasmic tyrosine 573: role in endothelial and tumor cell migration». *J Biol Chem*, vol. 282, no 21, p. 15690-15699.
- Preaux, A. M., P. D'Ortho M, M. P. Bralet, Y. Laperche et P. Mavier. 2002. «Apoptosis of human hepatic myofibroblasts promotes activation of matrix metalloproteinase-2». *Hepatology*, vol. 36, no 3, p. 615-622.
- Pyrko, P., A. H. Schonthal, F. M. Hofman, T. C. Chen et A. S. Lee. 2007. «The unfolded protein response regulator GRP78/BiP as a novel target for increasing chemosensitivity in malignant gliomas». *Cancer Res*, vol. 67, no 20, p. 9809-9816.
- Remacle, A. G., D. V. Rozanov, P. C. Baciu, A. V. Chekanov, V. S. Golubkov et A. Y. Strongin. 2005. «The transmembrane domain is essential for the microtubular trafficking of membrane type-I matrix metalloproteinase (MT1-MMP)». *J Cell Sci*, vol. 118, no Pt 21, p. 4975-4984.

- Sato, H., T. Takino et H. Miyamori. 2005. «Roles of membrane-type matrix metalloproteinase-1 in tumor invasion and metastasis». *Cancer Sci*, vol. 96, no 4, p. 212-217.
- Sina, A., S. Lord-Dufour et B. Annabi. 2009. «Cell-based evidence for aminopeptidase N/CD13 inhibitor actinonin targeting of MT1-MMP-mediated proMMP-2 activation». *Cancer Letters*, vol. 279, no 2, p. 171-176.
- Sina, A., S. Proulx-Bonneau, A. Roy, L. Poliquin, J. Cao et B. Annabi. 2010. «The lectin concanavalin-A signals MT1-MMP catalytic independent induction of COX-2 through an IKK γ /NF- κ B-dependent pathway». *Journal of Cell Communication and Signaling*, vol. 4, no 1, p. 31-38.
- Sminia, P., T. R. Stoter, P. van der Valk, P. H. Elkhuizen, T. M. Tadema, G. K. Kuipers, W. P. Vandertop, M. V. Lafleur et B. J. Slotman. 2005. «Expression of cyclooxygenase-2 and epidermal growth factor receptor in primary and recurrent glioblastoma multiforme». *J Cancer Res Clin Oncol*, vol. 131, no 10, p. 653-661.
- Stewart, L. A. 2002. «Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials». *Lancet*, vol. 359, no 9311, p. 1011-1018.
- Strasser, A., et H. Puthalakath. 2008. «Fold up or perish: unfolded protein response and chemotherapy». *Cell Death Differ*, vol. 15, no 2, p. 223-225.
- Szegezdi, E., S. E. Logue, A. M. Gorman et A. Samali. 2006. «Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis». *EMBO Rep*, vol. 7, no 9, p. 880-885.
- Vedrenne, C., et H. P. Hauri. 2006. «Morphogenesis of the endoplasmic reticulum: beyond active membrane expansion». *Traffic*, vol. 7, no 6, p. 639-646.
- Wick, W., A. Wick, J. B. Schulz, J. Dichgans, H. P. Rodemann et M. Weller. 2002. «Prevention of irradiation-induced glioma cell invasion by temozolomide involves caspase 3 activity and cleavage of focal adhesion kinase». *Cancer Res*, vol. 62, no 6, p. 1915-1919.
- Wild-Bode, C., M. Weller, A. Rimner, J. Dichgans et W. Wick. 2001. «Sublethal irradiation promotes migration and invasiveness of glioma cells: implications for radiotherapy of human glioblastoma». *Cancer Res*, vol. 61, no 6, p. 2744-2750.

- Wilson, D. E., K. M. Anderson et T. M. Seed. 1990. «Ultrastructural evidence for differentiation in a human glioblastoma cell line treated with inhibitors of eicosanoid metabolism». *Neurosurgery*, vol. 27, no 4, p. 523-531.
- Wu, Y. I., H. G. Munshi, S. J. Snipas, G. S. Salvesen, R. Fridman et M. S. Stack. 2007. «Activation-coupled membrane-type 1 matrix metalloproteinase membrane trafficking». *Biochem J*, vol. 407, no 2, p. 171-177.
- Yu, M., E. T. Bowden, J. Sitlani, H. Sato, M. Seiki, S. C. Mueller et E. W. Thompson. 1997. «Tyrosine phosphorylation mediates ConA-induced membrane type 1-matrix metalloproteinase expression and matrix metalloproteinase-2 activation in MDA-MB-231 human breast carcinoma cells». *Cancer Res*, vol. 57, no 22, p. 5028-5032.
- Ziemer, L. S., C. J. Koch, A. Maity, D. P. Magarelli, A. M. Horan et S. M. Evans. 2001. «Hypoxia and VEGF mRNA expression in human tumors». *Neoplasia*, vol. 3, no 6, p. 500-508.
- Zucker, S., M. Hymowitz, C. E. Conner, E. A. DiYanni et J. Cao. 2002. «Rapid trafficking of membrane type 1-matrix metalloproteinase to the cell surface regulates progelatinase a activation». *Lab Invest*, vol. 82, no 12, p. 1673-1684.

3.2 A concerted HIF-1 α /MT1-MMP signalling axis regulates the expression of the 3BP2 adaptor protein in hypoxic mesenchymal stromal cells

Article publié dans la revue scientifique *PLoS One*

Proulx-Bonneau, S., A. Guezguez et B. Annabi. 2011. « A concerted HIF-1 α /MT1-MMP signalling axis regulates the expression of the 3BP2 adaptor protein in hypoxic mesenchymal stromal cells ». *PLoS One*. Soumission # PONE-D-11-05842.

Contributions des co-auteurs :

Proulx-Bonneau : Expérimentation et essais biologiques, analyse des résultats, montage des figures, rédaction du manuscrit.

Guezguez : Expérimentation et essais biologiques, analyse des résultats.

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

A concerted HIF-1 α /MT1-MMP signalling axis regulates the expression of the 3BP2 adaptor protein in hypoxic mesenchymal stromal cells

Sébastien Proulx-Bonneau, Amel Guezguez, 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; Fax : (514) 987-0246; E-mail : annabi.borhane@uqam.ca

Running title : Hypoxia induces 3BP2 expression

Key words : Mesenchymal stromal cells, hypoxia, MT1-MMP, tumours.

ABSTRACT

Increased plasticity, migratory and immunosuppressive abilities characterize mesenchymal stromal cells (MSC) which enable them to be active participants in the development of hypoxic solid tumours. Our understanding of the oncogenic adaptation of MSC to hypoxia however lacks the identification and characterization of specific biomarkers. In this study, we assessed the hypoxic regulation of 3BP2/SH3BP2 (Abl SH3-binding protein 2), an immune response adaptor/scaffold protein which regulates leukocyte differentiation and motility. Gene silencing of 3BP2 abrogated MSC migration in response to hypoxic cues and generation of MSC stably expressing the transcription factor hypoxia inducible factor 1alpha (HIF-1 α) resulted in increased endogenous 3BP2 expression as well as cell migration. Analysis of the 3BP2 promoter sequence revealed only one potential HIF-1 α binding site within the human but none in the murine sequence. An alternate early signalling cascade that regulated 3BP2 expression was found to involve membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) transcriptional regulation which gene silencing abrogated 3BP2 expression in response to hypoxia. Collectively, we provide evidence for a concerted HIF-1 α /MT1-MMP signalling axis that explains the induction of adaptor protein 3BP2 and which may link protein binding partners together and stimulate oncogenic MSC migration. These mechanistic observations support the potential for malignant transformation of MSC within hypoxic tumour stroma and may contribute to evasion of the immune system by a tumour.

INTRODUCTION

Mesenchymal stromal cells (MSC), most commonly isolated from the bone marrow, are a population of pluripotent adult stem cells that can differentiate into many mesenchymal phenotypes [1, 2]. In fact, recruitment of MSC by experimental vascularizing tumours resulted in the incorporation of MSC within the tumor architecture [3, 4] which, combined to intrinsic immunomodulatory mechanisms, implies that they must also respond to tumour-derived growth factor cues [5, 6]. Importantly, the microenvironment and stroma required for the evolution and progression of solid tumours has been investigated over the past few years, and MSC, which are the progenitors of stromal cells and fibroblasts, have been found to interact with cancer cells [7]. Consequently, their potential contribution to tumour development implies that MSC must adapt to the low oxygen environment and nutrient deprivation that characterizes hypoxic tumours.

Homing of MSC to tumours is thought to be among the earliest phenomenon of MSC-cancer interactions, as was recently reported in a mouse model where injected human MSC could be found preferentially migrating to implanted human melanoma tumours [3]. Subsequently, studies have shown MSC homing to tumours and even to sites of metastasis [8]. Furthermore, cotransplantation of MSC with melanoma cells in mice enhanced tumour engraftment and growth [9]. These data are in agreement with observations that vascular progenitors derived from bone marrow stromal cells are recruited by tumours both *in vivo* and *in vitro* [5]. The sum of this evidence, in line with their increased ability to migrate under an atmosphere of low oxygen [10], suggests that MSC are active participants in the development of hypoxic solid tumours.

In order to survive within the stressful hypoxic tumour microenvironment, cells have developed a coordinated set of responses orchestrating their adaptation to hypoxia. The outcomes of such cellular responses to hypoxia are aggressive disease, resistance to therapy,

and decreased patient survival [11]. A critical mediator of the hypoxic response is the transcription factor hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) which upregulates expression of proteins that promote angiogenesis, anaerobic metabolism, and many other survival pathways [12]. Regulation of HIF-1 α , a component of the HIF-1 heterodimer, occurs at multiple levels including translation, degradation, and transcriptional activation, and serves as a testimony to the central role of HIF-1. Unfortunately, the roles played by many of the individual molecular components which merge these different signals remain undefined. Adaptor proteins which link protein binding partners together and stimulate formation of signalling complexes [13] play an important role in the regulation of multiple intracellular signalling pathways that regulate cell mobilization, oncogenesis, metabolic and immunologic adaptative capacities. Among these, the adaptor protein 3BP2 was originally identified as a protein that interacts with the Src homology (SH) 3 domain of the protein tyrosine kinase Abl [14]. 3BP2 is predominantly expressed in hematopoietic/lymphoid tissues and its SH2 domain has been shown to associate in vitro with Syk, ZAP70, linker for activation of T cells, Grb2, phospholipase C γ 1, and cbl from activated T cell lysates [15]. Whether any 3BP2 functions are linked to MSC's oncogenic transformation activities, including extracellular matrix (ECM) degradation and directed cell migration, is currently unknown.

While most of the matrix metalloproteinases (MMP) are secreted, MT1-MMP is a membrane-associated MMP regulated by hypoxia [10] and, aside from its well-known role in the activation of proMMP-2 and intrinsic proteolytic activity towards ECM molecules, drives MSC mobilization [16, 17]. More importantly, its cytoplasmic domain was recently shown to link adaptor protein p130Cas [18] and Src-mediated events through the phosphorylation of its intracellular domain [19]. In light of such scaffolds taking place in MT1-MMP cellular signalling, MT1-MMP functions associated with platelet-mediated calcium mobilization [20], regulation of cell death/survival bioswitch [21, 22], and regulation of proinflammatory signalling [23, 24] have been reported. Given that hypoxia is a condition that promotes oncogenic processes, we questioned whether any HIF-1 α /3BP2/MT1-MMP signalling axis may contribute to the hypoxic adaptation of MSC.

MATERIALS AND METHODS

Materials. Sodium dodecylsulfate (SDS) and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma (Oakville, ON). Cell culture media were obtained from Life Technologies (Burlington, ON). Electrophoresis reagents were purchased from Bio-Rad (Mississauga, ON). The enhanced chemiluminescence (ECL) reagents, protein G- and A-coupled sepharose were from Amersham Pharmacia Biotech (Baie d'Urfé, QC). Micro bicinchoninic acid protein assay reagents were from Pierce (Rockford, IL). The polyclonal antibodies were purchased and generated against the MT1-MMP catalytic domain (Chemicon), the MT1-MMP cytoplasmic domain (Abcam), 3BP2 (Abcam) and GAPDH (Advanced Immunochemicals).

Cell cultures and experimental hypoxic conditions : This study was approved by the “Comité Institutionnel des Risques Biologiques” through the delivery of a written certificate (#10-CIRB-53.3.5). Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (MSC) were isolated from the whole femur and tibia bone marrow of C57BL/6 female mice; cells were cultured and characterized by flow cytometry as previously described [25]. cDNA construct generation and transduction of the MSC-HIF-1 α was performed and extensively described previously [26]. Hypoxic culture conditions were attained by incubation of confluent cells in an anaerobic box for up to 48 hours [26]. The oxygen was maintained at 1% by a compact gas oxygen controller Proox model 110 (Reming Bioinstruments Co., Redfield, NY) with a residual gas mixture composed of 94% N₂ and 5% CO₂. Re-oxygenation was kept at its minimum through rapid processing (less than 10 seconds) of the hypoxic cells for total RNA and protein extractions. Serum starvation is classically performed by culturing the cells in high glucose Dulbecco’s modified Eagle’s medium (DMEM; GibcoBRL) and 100 units/ml Penicillin/Streptomycin, and from which the 10% inactivated fetal bovine serum (iFBS) (Hyclone Laboratories, Logan, UT) was removed.

Immunoblotting procedures : Cells from MSC or MSC-HIF-1 α were lysed and proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). After electrophoresis, proteins were electrotransferred to polyvinylidene difluoride membranes and

immunoreactive material was visualized by enhanced chemiluminescence as described previously [26].

Cell survival and migration assays : MSC lysed in Apo-Alert lysis buffer (Clontech, Palo Alto, CA) were assessed for apoptotic cell death by the fluorometric caspase-3 activity as previously described by us [25]. Upon treatment, floating cells were aspirated and removed. Adherent MSC or MSC-HIF-1 α were then trypsinized and viability evaluated by Trypan blue exclusion staining. Majority of the cells were found viable and seeding of 10⁵ viable cells was performed on 0.15% gelatin/PBS precoated Transwells (Corning/Costar; Acton, MA; 8- μ m pore size) assembled in 24-well Boyden chambers which were filled with 600 ml of serum-free media. Cell migration was allowed to proceed for 6-24 hours at 37°C in 5% CO₂. The migration was quantified by analyzing at least ten random fields per filter for each independent experiment as described previously [26].

Total RNA isolation, cDNA synthesis and real-time quantitative RT-PCR : Total RNA was extracted from MSC monolayers using TRIzol reagent (Life Technologies, Gaithersburg, MD). For cDNA synthesis, 1 μ g 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 Icycler 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): HIF-1 α (Mm_Hif1a_1_SG QT01039542), 3BP2 (Mm_Sh3bp2_1_SG QT00100464), MT1-MMP (Mm_Mmp14_1_SG QT01064308), VEGF (Mm_Vegfa_1_SG QT00100464), b-Actin (Mm_Actb_2_SG QT01136772). The relative quantities of target gene mRNA against an internal control, b-Actin RNA, were measured by following a ΔC_T method employing an amplification plot (fluorescence signal vs. cycle number). The difference (ΔC_T) between the mean values in the triplicate samples of target gene and those of b-Actin 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^{- ΔC_T} .

Transfection method and RNA interference : MSC were transiently transfected with 20 nM siRNA against HIF-1 α (Mm_Hif1a_1 HP siRNA, SI00193011), MT1-MMP (Mm_Mmp14_2 HP siRNA, SI00177800), 3BP2 (Mm_Sh3bp2_4 HP siRNA, SI00204218) or scrambled sequences (AllStar Negative Control siRNA, 1027281) using Lipofectamine 2000 transfection reagent (Invitrogen, CA). HIF-1 α -, 3BP2- and MT1-MMP-specific gene knockdown was evaluated by qRT-PCR as described above. Small interfering RNA and mismatch siRNA were synthesized by QIAGEN and annealed to form duplexes.

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

Hypoxic culture conditions upregulate 3BP2 gene expression. MSC were serum-starved and cultured under hypoxic conditions as described in the Methods section. Total RNA was then extracted and qRT-PCR performed. We found that hypoxia significantly induced HIF-1 α transcript levels (Fig.1, black bars) in agreement with previous reports [26, 27]. Moreover, 3BP2, VEGF and MT1-MMP gene expression were also induced. These observations suggest that 3BP2 transcriptional regulation occurs in MSC upon low oxygen tension culture conditions. Whether HIF-1 α was specifically involved in direct 3BP2 gene regulation was next explored through sequence promoter analysis. An approximate 1,000 bp sequence upstream of the ATG coding sequence of the respective human (NCBI source NC_000004.11 and located on human chromosome 4 at location 2,821,348-2,822,347) and murine (NCBI source NC_000071.5 and located on mouse chromosome 5 at location 3,488,412-3,489,415) 3BP2 gene promoter sequence was analyzed for HIF putative transcription factor binding sites with PROMO 3.0 (<http://alggen.lsi.upc.es/>) using version 8.3 of the TRANSFAC database. Only one core consensus sequence of the hypoxia responsive elements (A_G)CGT(G_C)C (-28/-23) was found in the human. None was found in the murine sequence analyzed (data not shown). This suggests that alternate players may be involved in the molecular cascade that leads to 3BP2 expression through HIF.

Gene silencing of HIF-1 α antagonizes the effects of hypoxia on 3BP2 gene and protein expression. In order to assess the potential contribution of HIF-1 α to 3BP2 gene and protein expression regulation under hypoxic culture conditions, gene silencing strategies were employed to specifically and efficiently down-regulate HIF-1 α gene expression in MSC (Fig.2A, left panel). Such knockdown did not trigger apoptotic cell death as assessed through caspase-3 activity (Fig.2A, right panel). Mock (scrambled mismatched siRNA) or siHIF-1 α -transfected MSC were generated by transient transfection as described in the Methods section. Cells were then cultured under hypoxic culture conditions for 48 hours, total RNA was extracted and qRT-PCR was used to assess 3BP2 gene expression. While 3BP2 gene expression was induced by hypoxia in Mock-transfected cells, we found that its gene

expression was efficiently reduced in siHIF-1 α -transfected MSC (Fig.2B). 3BP2 protein expression was also assessed in Mock- and in siHIF-1 α -transfected cells that were subsequently cultured under hypoxic conditions (Fig.2C). While 3BP2 protein expression was increased by hypoxia with a maximal plateau expression occurring between 24 and 48 hours in Mock cells, those cells where HIF-1 α gene expression was abrogated (>78%) were unable to increase 3BP2 (Fig.2D). The relevance of HIF-1 α was also assessed on the transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) and of membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP), two important players in MSC survival and mobilization processes [10, 16, 17]. Both the VEGF and MT1-MMP transcript levels were found induced by hypoxic culture conditions, while such regulation was abrogated in siHIF-1 α -transfected MSC (data not shown). Consequently, expression of HIF-1 α is required for 3BP2 gene and protein regulation upon hypoxia.

3BP2 silencing abrogates MSC migration in response to hypoxic culture conditions.

In order to assess any 3BP2-mediated cellular impact, cell migration was monitored under normoxic or hypoxic culture conditions. 3BP2 gene silencing was performed (Fig.3A, upper and middle panels) and found not to trigger apoptotic cell death (Fig.3A, lower panel). While 3BP2 silencing did not affect basal MSC migration under normoxic conditions (Fig.3B), cells in which 3BP2 expression was abrogated were unable to respond to hypoxic cues (Fig.3C, black bars). This suggests that 3BP2 is required for the hypoxic adaptation of MSC that is reflected by an increase in MSC migration.

Constitutive expression of an oxygen-dependent degradation domain HIF-1 α mutant triggers 3BP2 gene and protein expression. Recently, experimental evidence has shown that upregulation of HIF-1 α plays a pivotal role in hypoxia-induced MSC mobilization, possibly acting via its downstream genes VEGF and SDF-1 α [28]. To date, no demonstration of the direct role of HIF-1 α overexpression itself was performed. In order to recreate the hypoxic culture conditions that trigger HIF-1 α expression in MSC, we generated a deletion mutant of HIF-1 α (HIF-1 α Δ ODD) which causes constitutive expression of HIF-1 α , and stably

transfected MSC with such construct as described in the Methods section. We found that MSC constitutively and stably expressing HIF-1 α ΔODD (MSC-HIF-1a) exhibited an increased intrinsic ability to migrate (Fig.4A). Such increased migratory potential has been documented previously by us [10, 26] and, although speculative, may potentially involve autocrine regulation through hypoxia-regulated growth factor expression. This may provide efficient mobilization and adaptive behaviour of MSC to oxygen deprived environment. When cell lysates and total RNA were extracted from MSC or MSC-HIF-1a, we found that 3BP2 protein (Fig.4B) and gene (Fig.4C) expression were significantly increased in MSC-HIF-1a cells. Noteworthy, 3BP2 gene silencing abrogated MSC-HIF-1a migration to levels equivalent to basal MSC migration (Fig.4D). This observation confirms that 3BP2 expression is among the mediators involved in the response to hypoxic cues and downstream of HIF-1 α signaling.

MT1-MMP is a prerequisite for hypoxia-mediated expression of 3BP2 in MSC.

Classical roles for MT1-MMP are those involved in directed ECM degradation and subsequent cell migration [29]. New alternate roles highlight MT1-MMP as a signalling molecule since its intracellular cytoplasmic domain has been shown to trigger RhoA and Erk transduction pathways [30, 31]. Moreover, increases in MT1-MMP expression correlated with increased MSC migration in response to hypoxia [10]. Since siHIF-1a abrogated both 3BP2 (Fig.2) and MT1-MMP (not shown) expression in response to hypoxia, we tested whether a signalling axis might regulate crosstalk between MT1-MMP and 3BP2. We first used gene silencing strategies to down-regulate MT1-MMP gene expression and to assess its specific contribution to 3BP2 gene regulation under hypoxic culture conditions. MSC were transiently transfected with scrambled sequences (Mock) or with MT1-MMP siRNA as described in the Methods section. Cells were then cultured under normoxic or hypoxic culture conditions, total RNA was extracted and qRT-PCR was used to assess MT1-MMP and HIF-1 α gene expression. We found that MT1-MMP gene expression was significantly reduced in siMT1-MMP transfected cells while HIF-1 α gene expression remained unaffected (Fig.5A). 3BP2 gene expression was then assessed in Mock-transfected and in siMT1-MMP-transfected MSC in response to hypoxic culture conditions. We found that 3BP2 gene

expression was induced by in Mock-transfected cells reaching a plateau at 12 hours of hypoxia, while such induction was abrogated in siMT1-MMP-transfected cells (Fig.5B). 3BP2 protein expression data were also analyzed and support those of the gene expression regulation of 3BP2 in that siMT1-MMP-transfected MSC did not exhibit increased 3BP2 expression due to hypoxia (Fig.5C). Consequently, expression of MT1-MMP is a prerequisite for 3BP2 transcriptional regulation upon hypoxia.

MT1-MMP overexpression upregulates 3BP2 gene and protein expression. To test whether MT1-MMP-mediated signalling was involved in the regulation of 3BP2 expression, we short-circuited hypoxia-mediated signalling by directly overexpressing either a full-length wild-type (Wt) recombinant MT1-MMP or its cytoplasmic-truncated form (D-cyto) in MSC. Total RNA was thereafter extracted and 3BP2 gene expression assessed by qRT-PCR and compared to Mock-transfected MSC. 3BP2 gene expression was increased in Wt-MT1-MMP-transfected MSC but not in cells that overexpressed the D-cyto-MT1-MMP (Fig.6A). Expression of both recombinant proteins, which retained their extracellular catalytic domain intact, led to functional activation of proMMP-2 at the cell surface as assessed by zymography of the respective conditioned media (Fig.6B). Transfection efficiency was further assessed by measuring expression of the individual MT1-MMP recombinant forms. Full length and D-cyto-MT1-MMP forms were detected when membranes were probed with anti-MT1-MMP generated against the catalytic domain (Fig.6C), while only the full length MT1-MMP was detected when using the anti-MT1-MMP cytoplasmic domain antibody (Fig.6C). Using the anti-3BP2 protein expression further confirmed the signalling axis that exists between cell surface MT1-MMP and intracellular induction of 3BP2, as only the Wt form of MT1-MMP led to increased protein levels of 3BP2 (Fig.6C).

DISCUSSION

Molecular markers associated with MSC are thought to characterize the brain tumour-initiating cells involved in the development of hypoxic solid tumours such as glioblastomas [32], the most common and aggressive primary brain cancer [33]. It is also believed that a subset of primary glioblastomas derive from transformed stem cells possessing MSC-like properties and retaining partial phenotypic aspects of the MSC nature within the tumours' hypoxic environment [32]. Accordingly, exogenously delivered human MSC were found to localize to human gliomas after intravascular delivery [4]. While VEGF-A was demonstrated to contribute to glioma-induced migration of human MSC [34], this raises the possibility that endogenous MSC may further be recruited into hypoxic gliomas during tumorigenesis and may contribute to the physiological growth of brain tumours *in situ*. More recently, MSC implanted directly within the central nervous system (CNS) to treat experimental autoimmune encephalomyelitis were found to produce local pathology of yet unknown consequences as reflected by the formation of cellular masses within brain parenchyma [35]. Caution therefore arises as of future MSC transplantations within inflamed CNS that characterize neurodegenerative and tumor conditions [36]. Nevertheless, these adaptive cellular conditions have significant pathological implications towards hypoxic solid tumour development. In fact, brain tumour-derived cells which are under hypoxic stress develop an adaptive response that includes an increased rate of glycolysis and angiogenesis or undergo cell death by promoting apoptosis and/or necrosis [37]. The metabolic flexibility that enables MSC to survive under conditions characterized by hypoxia was recently shown to involve a microsomal glucose-6-phosphate transporter [26], a protein not only regulating intracellular glucose cycling but also involved in the regulation of cell survival and chemotaxis through ATP-dependent calcium flux [20, 21, 38].

While MSC are usually cultured under normoxic conditions (21% oxygen), their *in vivo* (patho)physiological "niches" have a much lower oxygen tension. Because of their plasticity, stem cells are particularly sensitive to their environments, and oxygen tension therefore becomes one developmentally important stimulus in stem cell biology as it will play a role in the intricate balance between cellular proliferation and commitment towards

differentiation [39, 40]. Under hypoxic conditions, the major transcription factor affecting gene regulation in stem cells is HIF-1 [41]. This transcription factor in turn upregulates expression of several genes involved in angiogenesis, such as bFGF, VEGF, and the VEGF receptors Flk-1 and Flt-1, as well as components of the plasminogen system including the urokinase receptor, and the inhibition of plasminogen activator 1 [41, 42]. Other transcription factors activated by hypoxia include early growth response-1 (Egr-1), which regulates MT1-MMP transcription [43, 44]. Interestingly, MSC isolated from Egr-1^{-/-} mice abrogated MT1-MMP functions in cell survival [25]. In the present study, we show that gene silencing of HIF-1 α suppressed MT1-MMP as well as 3BP2 gene induction by hypoxia. Prior silencing of MT1-MMP gene expression also abrogated 3BP2 gene expression by hypoxia. This is suggestive of a cascade of molecular events triggered by HIF, and leading to MT1-MMP-mediated upregulation and possible recruitment of 3BP2 to the plasma membrane that may, in part, explain increased MSC migration. Interestingly, Egr-1 was recently shown to regulate HIF-1 α gene expression during hypoxia [45]. While MT1-MMP was shown to trigger the expression of VEGF, which is also a target gene product of HIF-1 and may possibly contribute to an autocrine regulation of increased cell migration [46, 47], we propose that MT1-MMP-mediated regulation of 3BP2 expression may be a key modulator in the proteolytic and cell migratory oncogenic and immunomodulatory responses of MSC under hypoxic conditions.

3BP2 is an adaptor/scaffold protein thought to regulate immune receptor-mediated signal transduction [48, 49], and that takes part in various cellular functions such as apoptosis [48] cell differentiation [50], several signalling pathways [51], reorganization of actin cytoskeleton, cell motility and cell adhesion [50]. Most of the above-mentioned functions are also commonly shared by MT1-MMP in angiogenic processes [52]. Interestingly, 3BP2 silencing is also associated with impaired activation of multiple signalling events downstream of RANK, including actin reorganization, Src, ERK, and JNK phosphorylation, and up-regulation of osteoclastogenic factors [50]. Given the absence of predicted HIF-1 α binding sequence within the 3BP2 gene promoter, one may consequently hypothesize alternate signal transduction triggers to be involved in MSC adaptation upon low oxygen environment. In

fact, our data confirm that hypoxia-mediated induction of 3BP2 requires a concerted MT1-MMP and HIF-1 α signalling. Among the possible chronological events taking place in this HIF-1 α /MT1-MMP/3BP2 signalling axis, one can envision a recruitment and binding of 3BP2 at the membrane. Preliminary data arising from immunoprecipitation experiments performed in cells transfected with Wt-or D-cyto-MT1-MMP cDNA suggest direct binding of 3BP2 to the cytoplasmic domain of MT1-MMP (not shown). While recruitment of adaptor proteins such as p130Cas and the kinase activity of Src [18, 19] to MT1-MMP suggest that such scaffolds already take place in MT1-MMP-mediated cellular signalling, further studies will be required to better understand the (patho)physiological impact of such dynamic.

Finally, studies have indicated the ability of stem cell populations, including MSC, to inhibit or downregulate immune responses *in vitro* and *in vivo* [53]. MSC have recently been reported to inhibit naive and memory antigen-specific T cells [54]. The immunosuppressive qualities of MSC, which may facilitate evasion of the immune system by a tumour, may in part involve major histocompatibility complex (MHC) class I. Interestingly, phenotypic characterization of MSC by flow cytometry showed expression of MHC class I alloantigens, but failed to elicit T cell proliferative responses due to active suppressive mechanisms [55]. Recently, shedding of the tumour cell surface MHC class I chain-related molecule A by MT1-MMP, a membrane bound matrix metalloproteinase, was demonstrated to regulate sensitivity of tumour cells to NK cell killing, a process which may add to tumour immune evasion and contribute to tumour progression [56]. Such cell surface proteolytic activity of MT1-MMP was also shown in MSC to contribute to cleavage of CD44, another cell adhesion molecule expressed at the cell surface of MSC, and to promote cell migration [31, 57].

MSC present a promising tool for cell therapy as proven effective in pre-clinical studies. In fact, they are currently being tested in US FDA-approved clinical trials for myocardial infarction, stroke, meniscus injury, limb ischemia, graft-versus-host disease and autoimmune disorders [58]. Clinical trials for MSC injection into the CNS to treat traumatic brain injury and stroke are also currently ongoing. Whether hypoxia/ischemia alteration of MSC may influence endogenous or exogenously transplanted MSC biodistribution fate remains however to be better investigated. Intravenous infusion of MSC was found to reduce

brain damage after transient global cerebral ischemia *in vivo* [59]. These neuroprotective features of MSC are likely to occur through some paracrine regulation mechanisms [60]. In support to the MSC paracrine recruitment, MSC transplantation provided trophic support to an ischemia/reperfusion injured liver model by stimulating regeneration [61]. Therapeutic efficacy through MSC mobilization was also demonstrated in a hindlimb ischemia model [62].

Hypoxia is a tissue-specific condition that can promote oncogenic processes. Indeed, in the bone marrow, the hypoxic environment is important for maintaining the stemness, cell cycle, survival and metabolism of MSC and HSC (Eliasson et Jonsson, 2010). Moreover, the low oxygen tension is thought to protect the genomic integrity of stem cell populations by limiting the production of reactive oxygen species by the mitochondrial respiration (Kaufman, 2010). However, countless evidences provide a role for hypoxia in the mobilization and migration of MSC to the peripheral blood (Liu *et al.*, 2011) and to tumors (Ceradini et Gurtner, 2005 ; Du *et al.*, 2008). In tumoral context, hypoxia might promote oncogenic progression because of the heterotypic interactions within the tumor stroma. Indeed, hypoxic cancer cells secrete various cytokines, such as IL-6, VEGF, PDGF and FGF, that attract and promote MSC proliferation and differentiation into tumor-supporting cells (Finger et Giaccia, 2010 ; Rattigan *et al.*, 2010). The complex nature of the hypoxic tumor microenvironment makes it pro-oncogenic for MSC, as opposed to the hypoxic niche of the bone marrow, which preserves their integrity and function.

In conclusion, our study provides unexpected original molecular evidence linking the adaptor protein 3BP2 to oncogenic transformation contribution of MSC in response to hypoxia. A schematic representation is shown to summarize the possible signalling mechanism that is triggered upon MSC hypoxic cues and that could possibly lead to 3BP2 recruitment to MT1-MMP and to MSC migration (Fig.7). Furthermore, we document a new molecular signalling axis driven by the intracellular domain of MT1-MMP in concert with signalling requiring HIF-1 α , and which adds to the new roles of MT1-MMP as recently described in energy-dependent regulation through non-proteolytic mechanisms [69]. The sum of this evidence supports, in part, the oncogenic and immunomodulatory adaptive

mechanisms that could eventually be targeted in MSC that contribute to hypoxic tumour development.

Acknowledgments : BA holds a Canada Research Chair in Molecular Oncology from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). SPB is a Fonds de Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT) awardee. This study was funded by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to BA.

Author disclosure statement : The authors indicate no potential conflicts of interests, competing financial interests, or commercial associations.

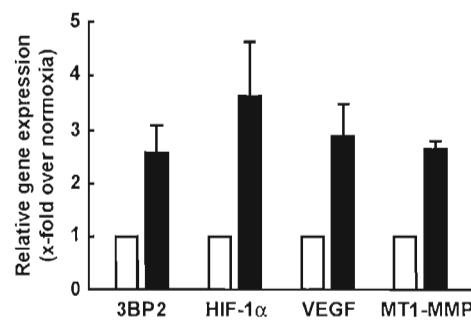


Fig.1 : Hypoxic culture conditions upregulate 3BP2 gene expression.

Subconfluent MSC were serum-starved and cultured under normoxic (5% CO₂ and 95% air; white box) or hypoxic (1% O₂, 5% CO₂ and 94% N₂; black box) conditions for 18 hours. Total RNA was extracted and quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction was performed in order to assess 3BP2, HIF-1 α , VEGF and MT1-MMP gene expression levels.

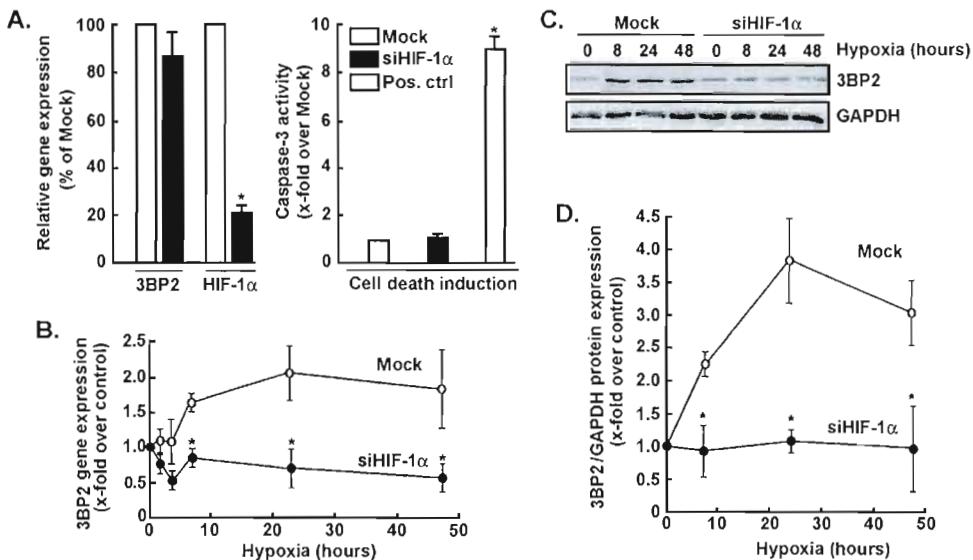


Fig.2 : Gene silencing of HIF-1 α antagonizes the effects of hypoxia on 3BP2 gene and protein expression.

MSC were transiently transfected with scrambled sequences (Mock, white bars, open circles) or HIF-1 α siRNA (black bars, closed circles) as described in the Methods section. Cells were then cultured under normal or hypoxic culture conditions. (A) Apoptotic cell death was assessed using the fluorometric caspase-3 activity assay as described in the Methods section. Concanavalin-A-treated MSC (grey bars) was used as a positive inducer of caspase-3 [16]. Total RNA was extracted, and qRT PCR was used to assess 3BP2 and HIF-1 α transcript levels. (B) 3BP2 gene expression was assessed by qRT-PCR in Mock-transfected and in siHIF-1 α -transfected cells that were subsequently cultured under hypoxic conditions. (C) Mesenchymal stromal cells were transiently transfected with scrambled sequences or HIF-1 α siRNA as described in the Methods section. Cells were then cultured under normal or hypoxic culture conditions, cell lysates were isolated, western blotting and immunodetection was performed with anti-3BP2 and anti-GAPDH antibodies. (D) Scanning densitometry was used to assess protein expression described in panel C, and the ratio of 3BP2/GAPDH expression was represented.

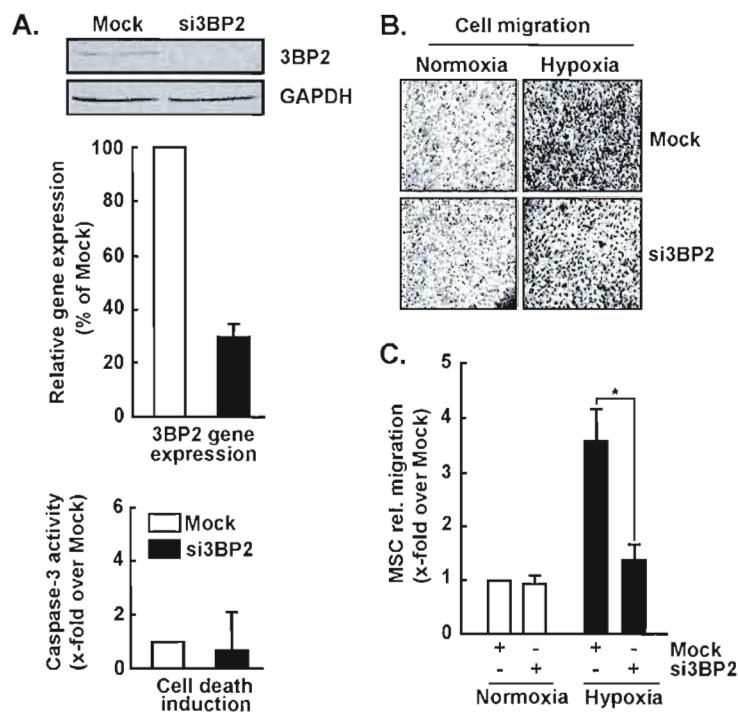


Fig.3 : 3BP2 silencing abrogates MSC migration in response to hypoxic culture conditions.

MSC were transiently transfected with scrambled sequences or with 3BP2 siRNA as described in the Methods section. (A) Immunoblotting of 3BP2 protein expression was evaluated in cell lysates from Mock (white bars) and siRNA (black bars) experiments. Total RNA was extracted, and qRT-PCR was used to assess 3BP2 gene expression knockdown efficiency. Apoptotic cell death was assessed by the fluorometric caspase-3 activity as described in the Methods section. (B) Cells were harvested and seeded onto Boyden chambers using gelatin-coated filters to assess cell migration under normal or hypoxic culture conditions. (C) Cell migration was quantified as described in the Methods section and expressed as x-fold induction over Mock-transfected cells.

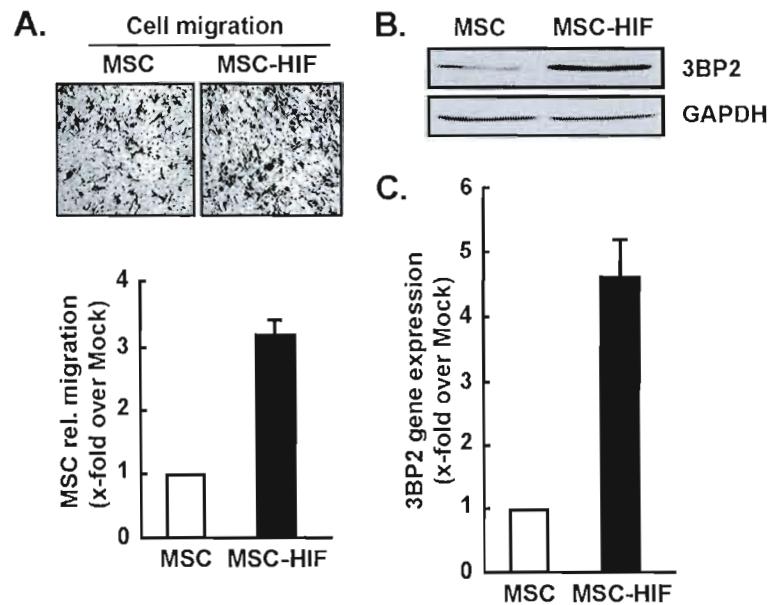


Fig.4 : Stable expression of HIF-1 α increases 3BP2 basal expression and MSC migration.

MSC stably expressing a Δ ODD HIF-1 α mutant (MSC-HIF) were generated as described in the Methods section. (A) Basal migration of MSC and MSC-HIF was performed as described in the Methods section. (B) Cell lysates were isolated, western blotting and immunodetection was performed with anti-3BP2 and anti-GAPDH antibodies as described in the Methods section. (C) Total RNA was extracted, and qRT-PCR was used to assess 3BP2 gene expression. (D) Cell migration was quantified as described in the Methods section in Mock- (white bars) and si3BP2- (black bars) transfected MSC or MSC-HIF-1 α .

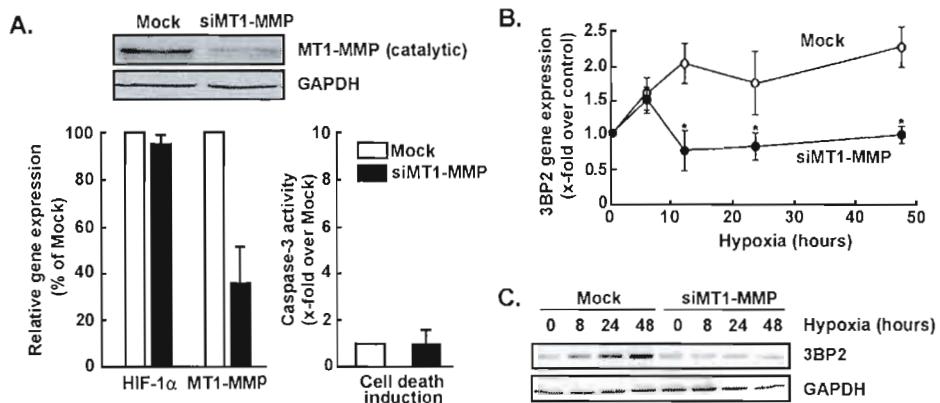


Fig.5 : Gene silencing of MT1-MMP antagonizes the effects of hypoxia on 3BP2 gene expression.

MSC were transiently transfected with scrambled sequences (Mock, white bars) or MT1-MMP siRNA (black bars) as described in the Methods section. Cells were then cultured under normal or hypoxic culture conditions. (A) Immunoblotting of MT1-MMP protein expression was evaluated in cell lysates from siRNA experiments. Total RNA was extracted, and qRT-PCR was used to assess 3BP2, HIF-1 α and MT1-MMP. Apoptotic cell death was assessed using the fluorometric caspase-3 activity assay as described in the Methods section. (B) 3BP2 and HIF-1 α gene expression were assessed by qRT-PCR in Mock-transfected (open circles) and in siMT1-MMP-transfected (closed circles) cells that were subsequently cultured under hypoxic conditions. (C) MSC were transiently transfected with either scrambled sequences or MT1-MMP siRNA as described in the Methods section. Cells were then cultured under normal or hypoxic culture conditions, cell lysates were isolated, western blotting and immunodetection were performed with anti-3BP2 and anti-GAPDH antibodies.

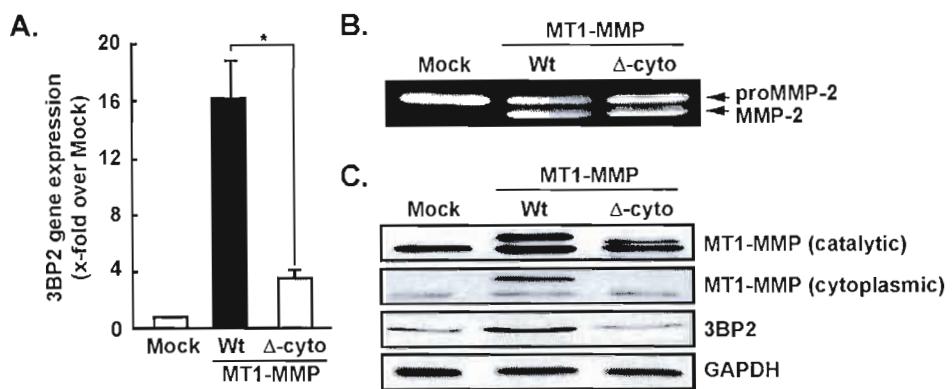


Fig.6 : 3BP2 induction requires MT1-MMP cytoplasmic domain-mediated signalling.

(A) MSC were transiently transfected with pcDNA3.1 (Mock, white bars), a plasmid encoding full length MT1-MMP (Wt, black bars), or a plasmid encoding for a cytoplasmic domain-deleted form of MT1-MMP (Δ -cyto, grey bars). Cells were then cultured under normal culture conditions, total RNA was extracted, and qRT-PCR was used to assess 3BP2 gene expression. (B) Gelatin zymography of the conditioned media was used to demonstrate efficient cell surface targeting of the respective Wt and Δ -cyto MT1-MMP recombinant proteins and subsequent ability to retain extracellular catalytic functions and to activate the secreted latent proMMP-2 into active MMP-2. (C) Cell lysates were isolated, western blotting and immunodetection was performed with antibodies recognizing the MT1-MMP catalytic or cytoplasmic domain, anti-3BP2 and anti-GAPDH as described in the Methods section.

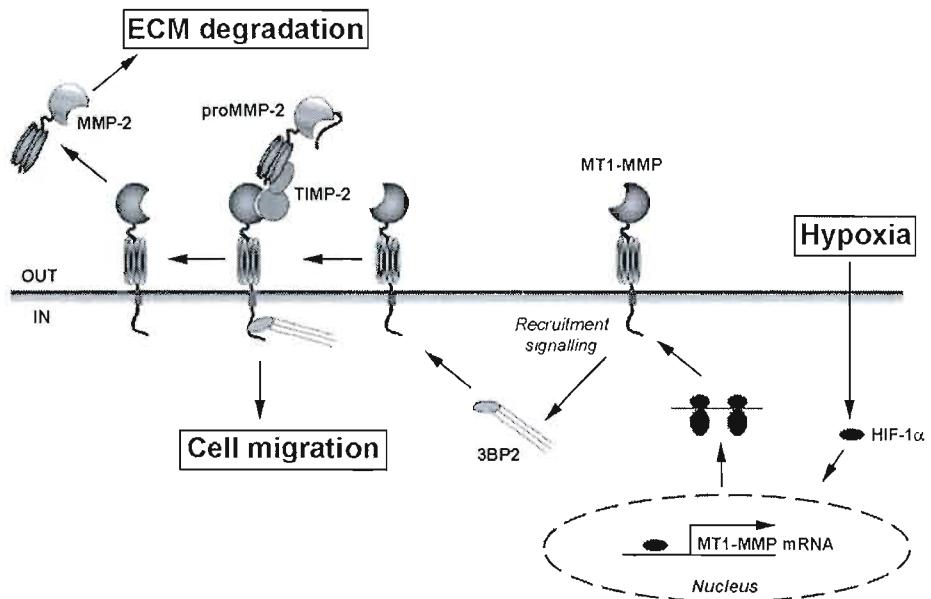


Fig.7 : Putative mechanisms involved in 3BP2 response to hypoxia and recruitment by MT1-MMP.

Scheme summarizing the mechanisms involved in 3BP2 response to hypoxia and potential recruitment by MT1-MMP. Hypoxia induces HIF-1 α , which then upregulates MT1-MMP gene transcription, MT1-MMP synthesis and targeting to the plasma membrane. The intracellular domain of MT1-MMP is mandatory to signal potential 3BP2 recruitment and to trigger both cell migration and extracellular matrix (ECM) degradation. proMMP-2, latent form of matrix metalloproteinase-2; MMP-2, active form of matrix metalloproteinase-2; TIMP-2, tissue inhibitor of MMP-2.

REFERENCES

- 1 Prockop DJ. (1997). Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276:71-74.
- 2 Horwitz EM, K Le Blanc, M Dominici, I Mueller, I Slaper-Cortenbach, FC Marini, RJ Deans, DS Krause, A Keating. (2005). Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 7:393-395.
- 3 Studeny M, Marini FC, Champlin RE, Zompetta C, Fidler IJ, Andreeff M. (2002). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors. *Cancer Res* 62:3603-3608.
- 4 Nakamizo A, F Marini, T Amano, A Khan, M Studeny, J Gumin, J Chen, S Hentschel, G Vecil, J Dembinski, M Andreeff, FF Lang. (2005). Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Res* 65:3307-3318.
- 5 Annabi B, E Naud, YT Lee, N Eliopoulos, J Galipeau. (2004). Vascular progenitors derived from murine bone marrow stromal cells are regulated by fibroblast growth factor and are avidly recruited by vascularizing tumors. *J Cell Biochem* 91:1146-1158.
- 6 Birnbaum T, J Roider, CJ Schankin, CS Padovan, C Schichor, R Goldbrunner, A Straube. (2007). Malignant gliomas actively recruit bone marrow stromal cells by secreting angiogenic cytokines. *J Neurooncol* 83:241-247.
- 7 Yen BL, ML Yen. (2008). Mesenchymal Stem Cells and Cancer - for Better or for Worse? *J Cancer Mol* 4:5-9.
- 8 Dwyer RM, SM Potter-Beirne, KA Harrington, AJ Lowery, E Hennessy, JM Murphy, FP Barry, T O'Brien, MJ Kerin. (2007). Monocyte chemotactic protein-1 secreted by primary breast tumors stimulates migration of mesenchymal stem cells. *Clin Cancer Res* 13:5020-5027.

- 9 Djouad F, P Plence, C Bony, P Tropel, F Apparailly, J Sany, D Noël, C Jorgensen. (2003). Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* 102:3837-3844.
- 10 Annabi B, YT Lee, S Turcotte, E Naud, RR Desrosiers, M Champagne, N Eliopoulos, J Galipeau, R Bélineau. (2003). Hypoxia promotes murine bone-marrow-derived stromal cell migration and tube formation. *Stem Cells* 21:337-347.
- 11 Chi JT, Z Wang, DS Nuyten, EH Rodriguez, ME Schaner, A Salim, Y Wang, GB Kristensen, A Helland, AL Børresen-Dale, A Giaccia, MT Longaker, T Hastie, GP Yang, MJ van de Vijver, PO Brown. (2006). Gene expression programs in response to hypoxia: cell type specificity and prognostic significance in human cancers. *PLoS Med* 3:e47.
- 12 Koh MY, TR Spivak-Kroizman, G Powis. (2010). HIF-1alpha and cancer therapy. *Recent Results Cancer Res* 180:15-34.
- 13 Mylotte LA, AM Duffy, M Murphy, T O'Brien, A Samali, F Barry, E Szegezdi. (2008). Metabolic flexibility permits mesenchymal stem cell survival in an ischemic environment. *Stem Cells* 26:1325-1336.
- 14 Ren R, BJ Mayer, P Cicchetti, D Baltimore. (1993). Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site. *Science* 259:1157-1161.
- 15 Deckert M, S Tartare-Deckert, J Hernandez, R Rottapel, A Altman. (1998). Adaptor function for the Syk kinases-interacting protein 3BP2 in IL-2 gene activation. *Immunity* 9:595-605.
- 16 Annabi B, S Thibeault, YT Lee, N Bousquet-Gagnon, N Eliopoulos, S Barrette, J Galipeau, R Bélineau. (2003). Matrix metalloproteinase regulation of sphingosine-1-phosphate-induced angiogenic properties of bone marrow stromal cells. *Exp Hematol*. 31:640-649

- 17 Karow M, T Popp, V Egea, C Ries, M Jochum, P Neth. (2009). Wnt signalling in mouse mesenchymal stem cells: impact on proliferation, invasion and MMP expression. *J Cell Mol Med* 13:2506-2520.
- 18 Gingras D, M Michaud, G Di Tomasso, E Bélieau, C Nyalendo, R Bélieau. (2008) Sphingosine-1-phosphate induces the association of membrane-type 1 matrix metalloproteinase with p130Cas in endothelial cells. *FEBS Lett* 582;399-404.
- 19 Nyalendo C, M Michaud, E Beaulieu, C Roghi, G Murphy, D Gingras, R Bélieau. (2007). Src-dependent phosphorylation of membrane type I matrix metalloproteinase on cytoplasmic tyrosine 573: role in endothelial and tumor cell migration. *J Biol Chem* 282:15690-15699.
- 20 Fortier S, D Labelle, A Sina, R Moreau, B Annabi. (2008). Silencing of the MT1-MMP/ G6PT axis suppresses calcium mobilization by sphingosine-1-phosphate in glioblastoma cells. *FEBS Lett* 582:799–804.
- 21 Belkaid A, S Fortier, J Cao, B Annabi. (2007). Necrosis induction in glioblastoma cells reveals a new "bioswitch" function for the MT1-MMP/G6PT signaling axis in proMMP-2 activation versus cell death decision. *Neoplasia* 9:332–430.
- 22 Fortier S, M Touaibia, S Lord-Dufour, J Galipeau, R Roy, B Annabi. (2008). 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* 18:195–204.
- 23 Annabi B, C Laflamme, A Sina, MP Lachambre, R Bélieau. (2009). A MT1-MMP/NF-kappaB signaling axis as a checkpoint controller of COX-2 expression in CD133+ U87 glioblastoma cells. *J Neuroinflammation* 6:8.
- 24 Sina A, S Proulx-Bonneau, A Roy, L Poliquin, J Cao, B Annabi. (2010). The lectin concanavalin-A signals MT1-MMP catalytic independent induction of COX-2 through an IKKgamma/NF-kappaB-dependent pathway. *J Cell Commun Signal* 2010;4:31-38.

- 25 Currie JC, S Fortier, A Sina, J Galipeau, J Cao, B Annabi. (2007). MT1-MMP down-regulates the glucose 6-phosphate transporter expression in marrow stromal cells: a molecular link between pro-MMP-2 activation, chemotaxis, and cell survival. *J Biol Chem* 282:8142-8149.
- 26 Lord-Dufour S, IB Copland, LC Levros Jr, M Post, A Das, C Khosla, J Galipeau, E Rassart, B Annabi. (2009). Evidence for transcriptional regulation of the glucose-6-phosphate transporter by HIF-1 α : Targeting G6PT with mumbaistatin analogs in hypoxic mesenchymal stromal cells. *Stem Cells* 27:489-497.
- 27 Belaiba RS, S Bonello, C Zähringer, S Schmidt, J Hess, T Kietzmann, A Görlach. (2007) Hypoxia up-regulates hypoxia-inducible factor-1 α transcription by involving phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor kappaB in pulmonary artery smooth muscle cells. *Mol Biol Cell* 18:4691-4697.
- 28 Liu L, Yu Q, Lin J, Lai X, Cao W, Du K, Wang Y, Wu K, Hu Y, Zhang L, Xiao H, Duan Y, Huang H. (2011) HIF-1 α is essential for hypoxia-induced mesenchymal stem cell mobilization into the peripheral blood. *Stem Cells Dev.* (in press)
- 29 Strongin AY. (2010). Proteolytic and non-proteolytic roles of membrane type-1 matrix metalloproteinase in malignancy. *Biochim Biophys Acta* 1803:133-141.
- 30 Annabi B, M Bouzeghrane, R Moumdjian, A Moghrabi, R Béliveau. (2005). 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* 94:906-916.
- 31 Annabi B, S Thibeault, R Moumdjian, R Béliveau. (2004). Hyaluronan cell surface binding is induced by type I collagen and regulated by caveolae in glioma cells. *J Biol Chem* 279:21888-21896.
- 32 Tso CL, P Shintaku, J Chen, Q Liu, J Liu, Z Chen, K Yoshimoto, PS Mischel, TF Cloughesy, LM Liau, SF Nelson. (2006). Primary glioblastomas express mesenchymal stem-like properties. *Mol Cancer Res* 2006;4:607-619.

- 33 Van Meir EG, CG Hadjipanayis, AD Norden, HK Shu, PY Wen, JJ Olson. (2010). Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. CA Cancer J Clin 60:166-193.
- 34 Schichor C, Birnbaum T, Etminan N, Schnell O, Grau S, Miebach S, Aboody K, Padovan C, Straube A, Tonn JC, Goldbrunner R. (2006) Vascular endothelial growth factor A contributes to glioma-induced migration of human marrow stromal cells (hMSC). Exp Neurol. 199:301-310.
- 35 Grigoriadis N, Lourbopoulos A, Lagoudaki R, Frischer JM, Polyzoidou E, Touloumi O, Simeonidou C, Deretzi G, Kountouras J, Spandou E, Kotta K, Karkavelas G, Tascos N, Lassmann H. (2011) Variable behavior and complications of autologous bone marrow mesenchymal stem cells transplanted in experimental autoimmune encephalomyelitis. Exp Neurol. In press.
- 36 Snyder EY. (2011) The risk of putting something where it does not belong: Mesenchymal stem cells produce masses in the brain. Exp Neurol. In press.
- 37 Oliver L, C Olivier, FB Marhuenda, M Campone, FM Vallette. (2009). Hypoxia and the malignant glioma microenvironment: regulation and implications for therapy. Curr Mol Pharmacol 2:263-284.
- 38 Belkaid A, JC Currie, J Desgagnés, B Annabi. (2006). The chemopreventive properties of chlorogenic acid reveal a potential new role for the microsomal glucose-6-phosphate translocase in brain tumor progression. Cancer Cell Int 6:7.
- 39 Potier E, E Ferreira, R Andriamananjona, JP Pujol, K Oudina, D Logeart-Avramoglou, H Petite. (2007). Hypoxia affects mesenchymal stromal cell osteogenic differentiation and angiogenic factor expression. Bone 40:1078-1087.
- 40 Rosová I, M Dao, B Capoccia, D Link, JA Nolta. (2008). Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. Stem Cells 26:2173-2182.

- 41 Ramirez-Bergeron DL, MC Simon. (2001). Hypoxia-inducible factor and the development of stem cells of the cardiovascular system. *Stem Cells* 19:279-286.
- 42 Koong AC, NC Denko, KM Hudson, C Schindler, L Swiersz, C Koch, S Evans, H Ibrahim, QT Le, DJ Terris, AJ Giaccia. (2000). Candidate genes for the hypoxic tumor phenotype. *Cancer Res* 60:883-887.
- 43 Yan SF, J Lu, YS Zou, J Soh-Won, DM Cohen, PM Buttrick, DR Cooper, SF Steinberg, N Mackman, DJ Pinsky, DM Stern. (1999). Hypoxia-associated induction of early growth response-1 gene expression. *J Biol Chem* 274:15030-15040.
- 44 Haas TL, D Stitelman, SJ Davis, SS Apté, JA Madri. (1999). Egr-1 mediates extracellular matrix-driven transcription of membrane type 1 matrix metalloproteinase in endothelium. *J Biol Chem* 274:22679-22685.
- 45 Sperandio S, J Fortin, R Sasik, L Robitaille, J Corbeil, I de Belle. (2009). The transcription factor Egfr regulates the HIF-1alpha gene during hypoxia. *Mol Carcinog* 48:38-44.
- 46 Deryugin, EI, L Soroceanu, AY Strongin. (2002). Up-regulation of vascular endothelial growth factor by membrane-type 1 matrix metalloproteinase stimulates human glioma xenograft growth and angiogenesis. *Cancer Res* 62:580-588.
- 47 Sounni NE, L Devy, A Hajitou, F Frankenne, C Munaut, C Gilles, C Deroanne, EW Thompson, JM Foidart, A Noel. (2002). MTI-MMP expression promotes tumor growth and angiogenesis through an up-regulation of vascular endothelial growth factor expression. *FASEB J* 16:555-564.
- 48 Chen G, ID Dimitriou, J La Rose, S Ilangumaran, WC Yeh, G Doody, M Turner, J Gommerman, R Rottapel. (2007). The 3BP2 adapter protein is required for optimal B-cell activation and thymus-independent type 2 humoral response. *Mol Cell Biol* 27:3109-3122.

- 49 Shukla U, T Hatani, K Nakashima, K Ogi, K Sada. (2009). Tyrosine phosphorylation of 3BP2 regulates B cell receptor-mediated activation of NFAT. *J Biol Chem* 284:33719-33728.
- 50 Guezguez A, V Prod'homme, X Mouska, A Baudot, C Blin-Wakkach, R Rottapel, M Deckert. (2010). 3BP2 Adapter protein is required for receptor activator of NF κ B ligand (RANKL)-induced osteoclast differentiation of RAW264.7 cells. *J Biol Chem* 285:20952-20963.
- 51 Le Bras S, C Moon, I Foucault, JP Breittmayer, M Deckert. (2007). Abl-SH3 binding protein 2, 3BP2, interacts with CIN85 and HIP-55. *FEBS Lett* 581:967-974.
- 52 Langlois S, G Di Tomasso, D Boivin, C Roghi, G Murphy, D Gingras, R Bélieau. (2005). Membrane type 1-matrix metalloproteinase induces endothelial cell morphogenic differentiation by a caspase-dependent mechanism. *Exp Cell Res* 307:452-464.
- 53 Batten P, NA Rosenthal, MH Yacoub. (2007). Immune response to stem cells and strategies to induce tolerance. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 362:1343-1356.
- 54 Krampera M, S Glennie, J Dyson, D Scott, R Laylor, E Simpson, F Dazzi. (2003). Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood* 101:3722-3729.
- 55 Klyushnenkova E, JD Mosca, V Zernetkina, MK Majumdar, KJ Beggs, DW Simonetti, RJ Deans, KR McIntosh. (2005). T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression. *J Biomed Sci* 12:47-57.
- 56 Liu G, CL Atteridge, X Wang, AD Lundgren, JD Wu. (2010). The membrane type matrix metalloproteinase MMP14 mediates constitutive shedding of MHC class I chain-related molecule A independent of A disintegrin and metalloproteinases. *J Immunol* 184:3346-3350.

- 57 Kajita M, Y Itoh, T Chiba, H Mori, A Okada, H Kinoh, M Seiki. (2001). Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration. *J Cell Biol* 153:893-904.
- 58 Joyce N, Annett G, Wirthlin L, Olson S, Bauer G, Nolta JA. (2010). Mesenchymal stem cells for the treatment of neurodegenerative disease. *Regen Med*. 5:933-946.
- 59 Perasso L, Cogo CE, Giunti D, Gandolfo C, Ruggeri P, Uccelli A, Balestrino M. (2010). Systemic administration of mesenchymal stem cells increases neuron survival after global cerebral ischemia in vivo (2VO). *Neural Plast*. 2010:534925.
- 60 Uccelli A, Benvenuto F, Laroni A, Giunti D. (2011). Neuroprotective features of mesenchymal stem cells. *Best Pract Res Clin Haematol*. 24:59-64.
- 61 Kanazawa H, Fujimoto Y, Teratani T, Iwasaki J, Kasahara N, Negishi K, Tsuruyama T, Uemoto S, Kobayashi E. (2011). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells ameliorate hepatic ischemia reperfusion injury in a rat model. *PLoS One*. 6:e19195.
- 62 Zhang Y, Zhang R, Li Y, He G, Zhang D, Zhang F. (2011). Simvastatin augments the efficacy of therapeutic angiogenesis induced by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a murine model of hindlimb ischemia. *Mol Biol Rep*. In press.
- 63 Eliasson P, Jonsson JI. (2010). The hematopoietic stem cell niche: low in oxygen but a nice place to be. *J Cell Physiol* 222:17-22.
- 64 Kaufman DS. (2010). HIF hits Wnt in the stem cell niche. *Nat Cell Biol* 12:926-927.
- 65 Du R, Lu KV, Petritsch C, Liu P, Ganss R, Passegue E, Song H, Vandenberg S, Johnson RS, Werb Z, Bergers G. (2008). HIF1alpha induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. *Cancer Cell* 13:206-220.
- 66 Ceradini DJ, Gurtner GC. (2005). Homing to hypoxia: HIF-1 as a mediator of progenitor cell recruitment to injured tissue. *Trends Cardiovasc Med* 15:57-63.

- 67 Rattigan Y, Hsu JM, Mishra PJ, Glod J, Banerjee D. (2010). Interleukin 6 mediated recruitment of mesenchymal stem cells to the hypoxic tumor milieu. Experimental cell research 316:3417-3424.
- 68 Finger EC, Giaccia AJ. (2010). Hypoxia, inflammation, and the tumor microenvironment in metastatic disease. Cancer Metastasis Rev 29:285-293.
- 69 Sakamoto T, M Seiki. (2010). A membrane protease regulates energy production in macrophages by activating hypoxia-inducible factor-1 via a non-proteolytic mechanism. J Biol Chem 285:29951-29964.

CHAPITRE V

DISCUSSION

Le gliome est une pathologie mortelle très grave et représente la tumeur gliale primaire du cerveau la plus fréquente chez l'adulte (Surawicz *et al.*, 1999). Le GBM est le plus agressif des gliomes. Sa résection chirurgicale est difficile en raison des contours diffus et du caractère infiltrant de la tumeur. De plus, l'efficacité de certains agents cytotoxiques tel le témozolomide est réduite en raison de la barrière hémato-encéphalique (Van Meir *et al.*, 2010) et les cellules deviennent alors rapidement radiorésistantes (Wild-Bode *et al.*, 2001). Enfin, le GBM est extrêmement envahissant et caractérisé par un microenvironnement inflammatoire qui favorise la survie, la migration et la prolifération des cellules cancéreuses (Kuipers *et al.*, 2007). Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires responsables du phénotype résistant des cellules de GBM s'avère donc primordiale afin de concevoir de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Rappel de la problématique

Les MMPs jouent un rôle considérable dans la progression tumorale. Au chapitre I, une courte revue de la littérature sur le sujet a mis en évidence le rôle des MMPs dans la transition épithélio-mésenchymateuse, la survie, la prolifération et la migration des cellules tumorales. Les MMPs contribuent en outre à l'angiogenèse tumorale et à la création du microenvironnement inflammatoire caractéristique du GBM (Amalinei *et al.*, 2010 ; Hu *et al.*, 2007). Ainsi, des stratégies thérapeutiques ont été développées afin d'atténuer la contribution des MMPs à l'angiogénèse et à la métastase. Notamment, des inhibiteurs de la fonction catalytique des MMPs (MPIs) ont été conçus. Ces derniers se sont toutefois révélés inefficaces en plus d'engendrer d'importants effets secondaires (Kessenbrock, Plaks et Werb, 2010), entre autres parce que ces MPIs ont une biodisponibilité réduite, sont peu spécifiques et ciblent toutes les MMPs qui s'avèrent être importantes pour le fonctionnement physiologique normal (Coussens, Fingleton et Matrisian, 2002). Néanmoins, de nombreuses

études attribuent un rôle prédominant à MT1-MMP dans la migration et l'invasion des cellules tumorales. MT1-MMP devient alors une cible thérapeutique prometteuse (Sabeh, Shimizu-Hirota et Weiss, 2009) particulièrement en regard de ses fonctions de signalisation, telles que l'activation du TGF- β , le relargage protéolytique de l'EGF ou l'induction de l'EMT par la dégradation de l'E-cadhérine (Dallas *et al.*, 2002 ; Mu *et al.*, 2002). L'étude des fonctions non-protéolytiques des MMPs, plus particulièrement de MT1-MMP, est donc une avenue prometteuse pour le traitement du GBM.

Un nouveau rôle pour MT1-MMP dans le contrôle de la survie des cellules de GBM

Le RE est une organelle très importante pour le maintien de l'homéostasie métabolique de la cellule. Au chapitre I, le rôle central du RE dans la synthèse des protéines et dans l'homéostasie calcique a été décrit. En contexte tumoral, le cycle cellulaire est accéléré et les cellules doivent synthétiser un grand nombre de protéines afin de contrôler adéquatement leur programme de croissance. De plus, l'hypoxie au centre de la tumeur favorise l'accumulation de protéines mal repliées dans le RE, en raison de la déplétion du glucose, essentiel pour la glycosylation des protéines, et de la perturbation de l'homéostasie calcique (Schroder, 2008). Les cellules de GBM expriment de grandes quantités de MT1-MMP. Nous avons démontré que le transit de MT1-MMP par le RE, tel qu'en conditions de migration cellulaire, impose un stress endoplasmique aux cellules de GBM et peut induire l'apoptose. De plus, le stress du RE conduit au relargage de calcium dans le cytoplasme, ce qui stimule la calcium/calmodulin-dependent kinase- β (CaMKK β), la AMPK et la PKC. Ces kinases favorisent les voies de prolifération et de survie (Hoyer-Hansen et Jaattela, 2007). L'inhibition pharmacologique du trafic vésiculaire impose un grand stress endoplasmique et stimule l'apoptose par la voie UPR, mais la répression génique de MT1-MMP permet de renverser ce stress et la signalisation pro-apoptotique qui en découle, mettant en évidence le rôle primordial de MT1-MMP dans ces processus. Le stress du RE et la voie UPR peuvent protéger l'intégrité du RE et promouvoir la survie des cellules, mais au delà d'une certaine limite, ils induisent plutôt l'apoptose (Ma et Hendershot, 2004). Les facteurs qui contrôlent cette « décision cellulaire » sont encore peu connus.

Le traitement actuel du GBM repose sur la radiothérapie et l'administration de témozolomide, une molécule qui forme des adduits O6-méthylguanine dans l'ADN et empêche sa réPLICATION (Lefranc, Facchini et Kiss, 2007). En plus de mourir par apoptose, les cellules de GBM irradiées meurent par autophagie (Daido *et al.*, 2005). Il s'avère que le stress du RE induit également l'autophagie comme mécanisme de protection. Les vésicules autophagiques permettent de dégrader les protéines mal repliées et de fournir des nutriments pour la cellule (Ding et Yin, 2008). Quand le stress endoplasmique est trop grand, les cellules activent alors les voies apoptotiques (Ma *et al.*, 2002). Le témozolomide potentialise également la mort cellulaire des cellules de GBM en stimulant le stress du RE et l'autophagie (Lefranc, Facchini et Kiss, 2007). Une équipe de recherche a aussi mis au jour l'induction du stress endoplasmique, de la voie UPR et de l'autophagie par l'irradiation des cellules (He *et al.*, 2009). La MT1-MMP étant impliquée dans la radiorésistance des cellules de GBM (Wild-Bode *et al.*, 2001), il est tentant de lui attribuer un rôle primordial dans le contrôle de la balance survie/mort de ces cellules via le RE. En réponse à la radiothérapie, MT1-MMP pourrait promouvoir la survie des cellules en favorisant l'autophagie.

Un axe de signalisation HIF-1 α /3BP2/MT1-MMP dans la migration des MSC

Le GBM est une tumeur considérée hypoxique car, en son centre, la tension d'oxygène est très faible et l'apport en nutriments est réduit. Les cellules du centre de ces tumeurs sont souvent nécrotiques (Jensen, 2009). Ces cellules doivent adapter leur métabolisme afin de survivre avec peu de nutriments et d'oxygène, en plus d'avoir un rythme métabolique accéléré. L'effet Warburg, une caractéristique des cellules cancéreuses, a été défini comme étant la reprogrammation du métabolisme énergétique des cellules afin de limiter l'utilisation de la respiration mitochondriale et favoriser la glycolyse et la fermentation lactique (Semenza, 2010). En outre, les MSC sont recrutées au site tumoral et participent à la néovascularisation de la tumeur (Spaeth *et al.*, 2009). Elles sont dotées de mécanismes d'adaptation métabolique à l'hypoxie, rencontrée dans la moelle osseuse et au centre des tumeurs. Contrairement aux cellules différencierées, les MSC ne dépendent pas de la glycolyse aérobie pour produire l'ATP durant leur transformation, mais plutôt de la fermentation lactique (Funes *et al.*, 2007). Ces cellules sont donc judicieusement positionnées pour

contribuer au développement du GBM hypoxique. La migration des MSC en réponse à l'hypoxie est dépendante de MT1-MMP, mais pas seulement de son domaine catalytique (Currie *et al.*, 2007 ; Liu *et al.*, 2011 ; Sakamoto et Seiki, 2009). Toutefois, les mécanismes moléculaires liant l'hypoxie et la signalisation migratoire sont peu connus. Nos travaux ont mis en évidence un axe de signalisation HIF-1 α /3BP2/MT1-MMP dans la migration des MSC en réponse à l'hypoxie. La protéine d'échafaudage 3BP2 est induite par l'hypoxie et favorise la migration des MSC en réponse à l'hypoxie, un phénomène renversé par sa répression génique. Cette protéine est bien connue pour son rôle dans la mobilisation des cellules inflammatoires (Deckert *et al.*, 1998) et dans la différenciation des ostéoclastes (Lietman, Yin et Levine, 2008). Grâce à ses domaines d'affinité SH2 et SH3, elle peut réunir différentes protéines de signalisation cellulaire, en particulier un récepteur transmembranaire comportant une tyrosine phosphorylée et une protéine de signalisation cytosolique comportant un domaine riche en proline. Son domaine PH lui permet d'être recrutée à la membrane plasmique, à proximité des récepteurs avec lesquelles elle est susceptible d'interagir (Ren *et al.*, 1993).

Le domaine cytoplasmique de MT1-MMP est très important pour l'induction de la signalisation pro-inflammatoire dans les cellules souches cancéreuses de glioblastome et sa délétion empêche l'activation de la voie de NF-kB par MT1-MMP (Annabi *et al.*, 2009). Bien que nos résultats ne permettent pas encore de montrer la liaison directe de MT1-MMP avec 3BP2, il est fort possible que la phosphorylation de la seule tyrosine du domaine cytoplasmique de MT1-MMP permette sa liaison avec 3BP2, via son domaine SH2. En condition hypoxique, nous avons montré que 3BP2 est surexprimée et qu'elle induit la migration des MSC, un phénotype renversé par la répression génique de 3BP2. Des données récentes laissent croire que, via son domaine SH3, 3BP2 s'associe avec la phospholipase C γ 2 (PLC γ 2) (Lietman, Yin et Levine, 2008). De façon intéressante, la PLC γ 2 est primordiale à la formation des podosomes, des structures membranaires riches en actine qui contribuent à la migration cellulaire et au remodelage de l'ECM (Wang *et al.*, 2010). Il est tentant de suggérer que cet axe de signalisation HIF-1 α /3BP2/MT1-MMP pourrait impliquer la PLC γ 2. En somme, nos résultats attribuent pour la première fois un rôle à 3BP2 dans la biologie des cellules souches et dans la progression tumorale (Figure 12).

Conclusions et perspectives

Globalement, nous avons documenté deux fonctions non-protéolytiques de MT1-MMP dans la progression tumorale, qui permettraient d'envisager de nouvelles fonctions signalétiques non-catalytiques de MT1-MMP (Figure 13). Nous avons montré l'implication de MT1-MMP dans l'induction du stress endoplasmique et l'apoptose par la voie du RE. Toutefois, les mécanismes moléculaires de cette contribution sont encore inconnus. Il serait pertinent de documenter l'impact des domaines catalytique, hémopexine et cytoplasmique de MT1-MMP sur le stress du RE. Pour ce faire, des plasmides mutants de MT1-MMP comportant des délétions de ses différents domaines et exprimés par leur promoteur endogène pourraient s'avérer utiles. De plus, considérant le rôle de la protéine adaptatrice 3BP2 dans la migration des MSC en hypoxie, il serait pertinent d'évaluer l'implication de cette protéine dans les cellules de GBM hypoxiques. Grâce à des analyses protéomiques et MS/MS, il serait important d'identifier les protéines partenaires de 3BP2 dans l'axe MT1-MMP/3BP2, car les médiateurs de la migration cellulaire en aval de ce complexe sont encore inconnus. La PLC γ 2 pourrait être une de ces protéines partenaires. Des stratégies thérapeutiques inhibitrices de ces partenaires de signalisation en aval pourraient être envisagées, plutôt que l'inhibition de MT1-MMP par les MPIs à large spectre qui se sont montrés inefficaces, afin de limiter la migration et la mobilisation des MSC et leur participation à la progression du glioblastome.

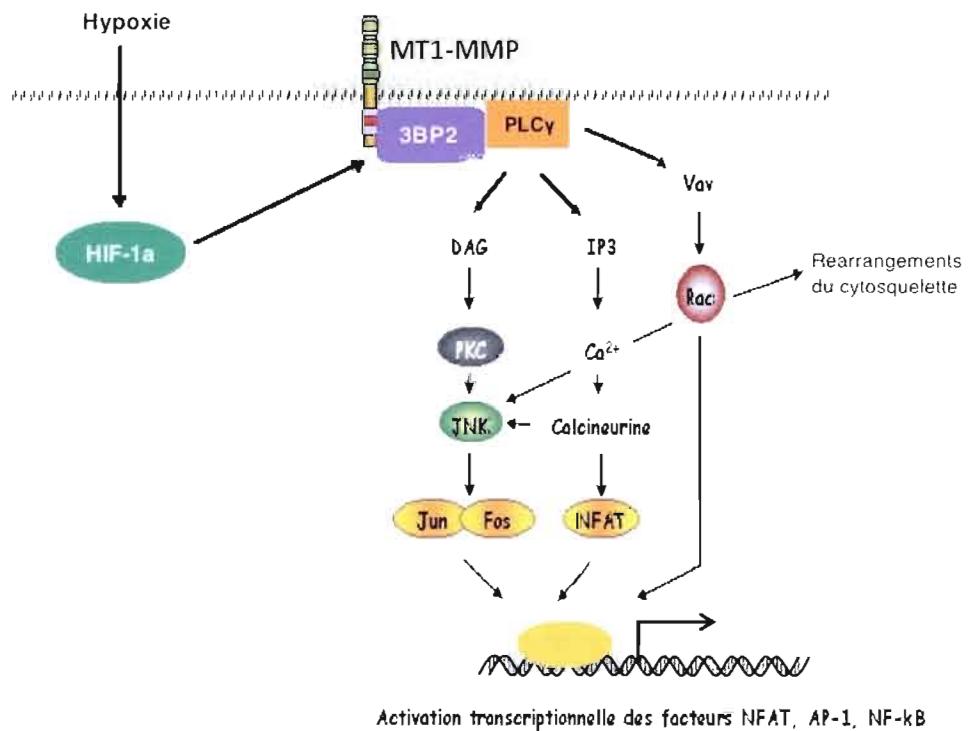


Figure 5.1 Fonctions cellulaires de la protéine adaptatrice 3BP2.

La protéine adaptatrice 3BP2 est principalement connue pour ses fonctions de signalisation dans la mobilisation des cellules inflammatoires. La liaison de ligands extracellulaires sur des récepteurs transmembranaires permet la phosphorylation de tyrosines sur leur domaine cytoplasmique. 3BP2 est recrutée et permet d'activer les voies de signalisation inflammatoires en aval. Nous avons montré que 3BP2 est également impliquée dans la migration cellulaire en réponse à l'hypoxie. Nos données suggèrent la liaison de 3BP2 au domaine cytoplasmique de MT1-MMP.

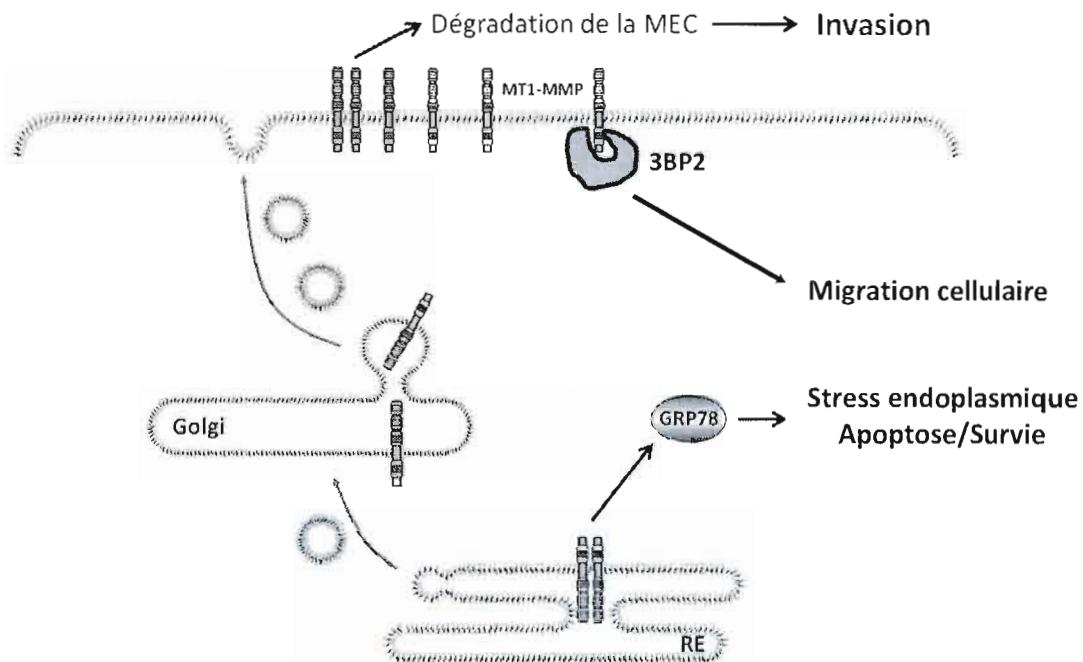


Figure 13. Nouvelles fonctions cytoplasmiques de MT1-MMP.

En plus de ses fonctions classiques de dégradation de la matrice extracellulaire, MT1-MMP possède aussi des fonctions non-catalytiques importantes dans la progression néoplasique. Nous avons mis en évidence un rôle pour MT1-MMP dans la régulation de l'apoptose des cellules de GBM via le stress du réticulum endoplasmique, lors de son trafic dans cette organelle. De plus, le domaine cytoplasmique de MT1-MMP comporte 20 acides aminés, dont une tyrosine phosphorylable, et est judicieusement positionné pour recruter des partenaires intracellulaires et initier des cascades de signalisation cellulaire. Nous avons mis en évidence un axe de signalisation HIF-1 α /MT1-MMP/3BP2 dans la régulation du phénotype migratoire des MSC en hypoxie.

RÉFÉRENCES

- Adesnik, M., M. Lande, T. Martin et D. D. Sabatini. 1976. «Retention of mRNA on the endoplasmic reticulum membranes after in vivo disassembly of polysomes by an inhibitor of initiation». *J Cell Biol*, vol. 71, no 1, p. 307-313.
- Akiyoshi, S., H. Inoue, J. Hanai, K. Kusanagi, N. Nemoto, K. Miyazono et M. Kawabata. 1999. «c-Ski acts as a transcriptional co-repressor in transforming growth factor-beta signaling through interaction with smads». *J Biol Chem*, vol. 274, no 49, p. 35269-35277.
- Alfranca, A., J. M. Lopez-Oliva, L. Genis, D. Lopez-Maderuelo, I. Mirones, D. Salvado, A. J. Quesada, A. G. Arroyo et J. M. Redondo. 2008. «PGE2 induces angiogenesis via MT1-MMP-mediated activation of the TGF β /Alk5 signaling pathway». *Blood*, vol. 112, no 4, p. 1120-1128.
- Amalinei, C., I. D. Caruntu, S. E. Giusca et R. A. Balan. 2010. «Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions». *Rom J Morphol Embryol*, vol. 51, no 2, p. 215-228.
- Ame-Thomas, P., H. Maby-El Hajjami, C. Monvoisin, R. Jean, D. Monnier, S. Caulet-Maugendre, T. Guillaudeux, T. Lamy, T. Fest et K. Tarte. 2007. «Human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and lymphoid organs support tumor B-cell growth: role of stromal cells in follicular lymphoma pathogenesis». *Blood*, vol. 109, no 2, p. 693-702.
- Annabi, B., M. Bouzeghrane, R. Moumdjian, A. Moghrabi et R. Beliveau. 2005. «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*, vol. 94, no 4, p. 906-916.
- Annabi, B., C. Laflamme, A. Sina, M. P. Lachambre et R. Beliveau. 2009. «A MT1-MMP/NF-kappaB signaling axis as a checkpoint controller of COX-2 expression in CD133+ U87 glioblastoma cells». *J Neuroinflammation*, vol. 6, p. 8.
- Annabi, B., Y. T. Lee, C. Martel, A. Pilorget, J. P. Bahary et R. Beliveau. 2003a. «Radiation induced-tubulogenesis in endothelial cells is antagonized by the antiangiogenic properties of green tea polyphenol (-) epigallocatechin-3-gallate». *Cancer Biol Ther*, vol. 2, no 6, p. 642-649.

- Annabi, B., Y. T. Lee, S. Turcotte, E. Naud, R. R. Desrosiers, M. Champagne, N. Eliopoulos, J. Galipeau et R. Beliveau. 2003b. «Hypoxia promotes murine bone-marrow-derived stromal cell migration and tube formation». *Stem Cells*, vol. 21, no 3, p. 337-347.
- Annabi, B., E. Naud, Y. T. Lee, N. Eliopoulos et J. Galipeau. 2004a. «Vascular progenitors derived from murine bone marrow stromal cells are regulated by fibroblast growth factor and are avidly recruited by vascularizing tumors». *J Cell Biochem*, vol. 91, no 6, p. 1146-1158.
- Annabi, B., S. Thibeault, R. Moumdjian et R. Beliveau. 2004b. «Hyaluronan cell surface binding is induced by type I collagen and regulated by caveolae in glioma cells». *J Biol Chem*, vol. 279, no 21, p. 21888-21896.
- Atkinson, S. J., C. Roghi et G. Murphy. 2006. «MT1-MMP hemopexin domain exchange with MT4-MMP blocks enzyme maturation and trafficking to the plasma membrane in MCF7 cells». *Biochem J*, vol. 398, no 1, p. 15-22.
- Attisano, L., et J. L. Wrana. 2002. «Signal transduction by the TGF-beta superfamily». *Science*, vol. 296, no 5573, p. 1646-1647.
- Bassik, M. C., L. Scorrano, S. A. Oakes, T. Pozzan et S. J. Korsmeyer. 2004. «Phosphorylation of BCL-2 regulates ER Ca²⁺ homeostasis and apoptosis». *EMBO J*, vol. 23, no 5, p. 1207-1216.
- Batten, P., N. A. Rosenthal et M. H. Yacoub. 2007. «Immune response to stem cells and strategies to induce tolerance». *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, vol. 362, no 1484, p. 1343-1356.
- Beckermann, B. M., G. Kallifatidis, A. Groth, D. Frommhold, A. Apel, J. Mattern, A. V. Salnikov, G. Moldenhauer, W. Wagner, A. Diehlmann, R. Saffrich, M. Schubert, A. D. Ho, N. Giese, M. W. Buchler, H. Friess, P. Buchler et I. Herr. 2008. «VEGF expression by mesenchymal stem cells contributes to angiogenesis in pancreatic carcinoma». *Br J Cancer*, vol. 99, no 4, p. 622-631.
- Beckman, R. A., et L. A. Loeb. 2005. «Genetic instability in cancer: theory and experiment». *Semin Cancer Biol*, vol. 15, no 6, p. 423-435.

- Belkaid, A., J. C. Currie, J. Desgagnes et B. Annabi. 2006. «The chemopreventive properties of chlorogenic acid reveal a potential new role for the microsomal glucose-6-phosphate translocase in brain tumor progression». *Cancer Cell Int*, vol. 6, p. 7.
- Belkaid, A., S. Fortier, J. Cao et B. Annabi. 2007. «Necrosis induction in glioblastoma cells reveals a new "bioswitch" function for the MT1-MMP/G6PT signaling axis in proMMP-2 activation versus cell death decision». *Neoplasia*, vol. 9, no 4, p. 332-340.
- Berens, M. E., et A. Giese. 1999. «"...those left behind." Biology and oncology of invasive glioma cells». *Neoplasia*, vol. 1, no 3, p. 208-219.
- Bissell, M. J., et M. H. Barcellos-Hoff. 1987. «The influence of extracellular matrix on gene expression: is structure the message?». *J Cell Sci Suppl*, vol. 8, p. 327-343.
- Bode, W., C. Fernandez-Catalan, H. Tschesche, F. Grams, H. Nagase et K. Maskos. 1999. «Structural properties of matrix metalloproteinases». *Cell Mol Life Sci*, vol. 55, no 4, p. 639-652.
- Broker, L. E., F. A. Kruyt et G. Giaccone. 2005. «Cell death independent of caspases: a review». *Clin Cancer Res*, vol. 11, no 9, p. 3155-3162.
- Brooke, G., M. Cook, C. Blair, R. Han, C. Heazlewood, B. Jones, M. Kambouris, K. Kollar, S. McTaggart, R. Pelekanos, A. Rice, T. Rossetti et K. Atkinson. 2007. «Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells». *Semin Cell Dev Biol*, vol. 18, no 6, p. 846-858.
- Brummer, T., C. Schmitz-Peiffer et R. J. Daly. 2010. «Docking proteins». *FEBS J*, vol. 277, no 21, p. 4356-4369.
- Buday, L., et P. Tompa. 2010. «Functional classification of scaffold proteins and related molecules». *FEBS J*, vol. 277, no 21, p. 4348-4355.
- Carroll, V. A., et M. Ashcroft. 2005. «Targeting the molecular basis for tumour hypoxia». *Expert Rev Mol Med*, vol. 7, no 6, p. 1-16.
- Ceradini, D. J., et G. C. Gurtner. 2005. «Homing to hypoxia: HIF-1 as a mediator of progenitor cell recruitment to injured tissue». *Trends Cardiovasc Med*, vol. 15, no 2, p. 57-63.

Chambers, A. F., et L. M. Matrisian. 1997. «Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis». *J Natl Cancer Inst*, vol. 89, no 17, p. 1260-1270.

Chambers, Ann F., Alan C. Groom et Ian C. MacDonald. 2002. «Metastasis: Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites». *Nature Reviews Cancer*, vol. 2, no 8, p. 563-572.

Chen, C. R., Y. Kang et J. Massague. 2001. «Defective repression of c-myc in breast cancer cells: A loss at the core of the transforming growth factor beta growth arrest program». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 98, no 3, p. 992-999.

Chen, X., Y. Ding, C. G. Liu, S. Mikhail et C. S. Yang. 2002. «Overexpression of glucose-regulated protein 94 (Grp94) in esophageal adenocarcinomas of a rat surgical model and humans». *Carcinogenesis*, vol. 23, no 1, p. 123-130.

Chintala, S. K., J. C. Tonn et J. S. Rao. 1999. «Matrix metalloproteinases and their biological function in human gliomas». *Int J Dev Neurosci*, vol. 17, no 5-6, p. 495-502.

Chow, D. C., L. A. Wenning, W. M. Miller et E. T. Papoutsakis. 2001. «Modeling pO(2) distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. II. Modified Kroghian models». *Biophys J*, vol. 81, no 2, p. 685-696.

Comité directeur des Statistiques sur le cancer (2010). Statistiques canadiennes sur le cancer. Toronto, Société canadienne du cancer: 135 p

Cordes, N., B. Hansmeier, C. Beinke, V. Meineke et D. van Beuningen. 2003. «Irradiation differentially affects substratum-dependent survival, adhesion, and invasion of glioblastoma cell lines». *Br J Cancer*, vol. 89, no 11, p. 2122-2132.

Coussens, L. M., B. Fingleton et L. M. Matrisian. 2002. «Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations». *Science*, vol. 295, no 5564, p. 2387-2392.

Coussens, L. M., et Z. Werb. 1996. «Matrix metalloproteinases and the development of cancer». *Chem Biol*, vol. 3, no 11, p. 895-904.

Cox, J. S., et P. Walter. 1996. «A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response». *Cell*, vol. 87, no 3, p. 391-404.

- Csala, M., G. Banhegyi et A. Benedetti. 2006. «Endoplasmic reticulum: a metabolic compartment». *FEBS Lett.*, vol. 580, no 9, p. 2160-2165.
- Currie, J. C., S. Fortier, A. Sina, J. Galipeau, J. Cao et B. Annabi. 2007. «MT1-MMP down-regulates the glucose 6-phosphate transporter expression in marrow stromal cells: a molecular link between pro-MMP-2 activation, chemotaxis, and cell survival». *J Biol Chem.*, vol. 282, no 11, p. 8142-8149.
- Daido, S., A. Yamamoto, K. Fujiwara, R. Sawaya, S. Kondo et Y. Kondo. 2005. «Inhibition of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit radiosensitizes malignant glioma cells by inducing autophagy». *Cancer Research*, vol. 65, no 10, p. 4368-4375.
- Dallas, S. L., J. L. Rosser, G. R. Mundy et L. F. Bonewald. 2002. «Proteolysis of latent transforming growth factor-beta (TGF-beta)-binding protein-1 by osteoclasts. A cellular mechanism for release of TGF-beta from bone matrix». *The Journal of biological chemistry*, vol. 277, no 24, p. 21352-21360.
- Dameron, K. M., O. V. Volpert, M. A. Tainsky et N. Bouck. 1994. «Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1». *Science*, vol. 265, no 5178, p. 1582-1584.
- Deckert, M., S. Tartare-Deckert, J. Hernandez, R. Rottapel et A. Altman. 1998. «Adaptor function for the Syk kinases-interacting protein 3BP2 in IL-2 gene activation». *Immunity*, vol. 9, no 5, p. 595-605.
- Deininger, M. H., M. Weller, J. Streffer, M. Mittelbronn et R. Meyermann. 1999. «Patterns of cyclooxygenase-1 and -2 expression in human gliomas in vivo». *Acta Neuropathol.*, vol. 98, no 3, p. 240-244.
- Deryugina, E. I., et J. P. Quigley. 2006. «Matrix metalloproteinases and tumor metastasis». *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 25, no 1, p. 9-34.
- Desplaces, A., et M. F. Poupon. 1994. «[The metastatic process]». *Bull Cancer*, vol. 81, no 9, p. 751-754.

- Ding, W. X., et X. M. Yin. 2008. «Sorting, recognition and activation of the misfolded protein degradation pathways through macroautophagy and the proteasome». *Autophagy*, vol. 4, no 2, p. 141-150.
- Djouad, F., P. Plence, C. Bony, P. Tropel, F. Apparailly, J. Sany, D. Noel et C. Jorgensen. 2003. «Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals». *Blood*, vol. 102, no 10, p. 3837-3844.
- Dobson, C. M. 2004. «Principles of protein folding, misfolding and aggregation». *Semin Cell Dev Biol*, vol. 15, no 1, p. 3-16.
- Doll, R., et R. Peto. 1978. «Cigarette smoking and bronchial carcinoma: dose and time relationships among regular smokers and lifelong non-smokers». *J Epidemiol Community Health*, vol. 32, no 4, p. 303-313.
- Du, R., K. V. Lu, C. Petritsch, P. Liu, R. Ganss, E. Passegue, H. Song, S. Vandenberg, R. S. Johnson, Z. Werb et G. Bergers. 2008. «HIF1alpha induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion». *Cancer Cell*, vol. 13, no 3, p. 206-220.
- Dufour, A., N. S. Sampson, S. Zucker et J. Cao. 2008. «Role of the hemopexin domain of matrix metalloproteinases in cell migration». *J Cell Physiol*, vol. 217, no 3, p. 643-651.
- Dwyer, R. M., S. M. Potter-Birne, K. A. Harrington, A. J. Lowery, E. Hennessy, J. M. Murphy, F. P. Barry, T. O'Brien et M. J. Kerin. 2007. «Monocyte chemotactic protein-1 secreted by primary breast tumors stimulates migration of mesenchymal stem cells». *Clin Cancer Res*, vol. 13, no 17, p. 5020-5027.
- Egeblad, M., et Z. Werb. 2002. «New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression». *Nat Rev Cancer*, vol. 2, no 3, p. 161-174.
- Egeblad, Mikala, Elizabeth S. Nakasone et Zena Werb. 2010. «Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism». *Dev Cell*, vol. 18, no 20627072, p. 884-901.
- Eliasson, P., et J. I. Jonsson. 2010. «The hematopoietic stem cell niche: low in oxygen but a nice place to be». *J Cell Physiol*, vol. 222, no 1, p. 17-22.

- Fernandez, P. M., S. O. Tabbara, L. K. Jacobs, F. C. Manning, T. N. Tsangaris, A. M. Schwartz, K. A. Kennedy et S. R. Patierno. 2000. «Overexpression of the glucose-regulated stress gene GRP78 in malignant but not benign human breast lesions». *Breast Cancer Res Treat*, vol. 59, no 1, p. 15-26.
- Ferrara, N. 2009. «Vascular endothelial growth factor». *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 29, no 6, p. 789-791.
- Finger, E. C., et A. J. Giaccia. 2010. «Hypoxia, inflammation, and the tumor microenvironment in metastatic disease». *Cancer Metastasis Rev*, vol. 29, no 2, p. 285-293.
- Folkman, J. 2002. «Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis». *Semin Oncol*, vol. 29, no 6, p. 15-18.
- , 2006. «Angiogenesis». *Annu Rev Med*, vol. 57, p. 1-18.
- Forget, M. A., R. R. Desrosiers et R. Beliveau. 1999. «Physiological roles of matrix metalloproteinases: implications for tumor growth and metastasis». *Can J Physiol Pharmacol*, vol. 77, no 7, p. 465-480.
- Fortier, S., D. Labelle, A. Sina, R. Moreau et B. Annabi. 2008a. «Silencing of the MT1-MMP/ G6PT axis suppresses calcium mobilization by sphingosine-1-phosphate in glioblastoma cells». *FEBS Lett*, vol. 582, no 5, p. 799-804.
- Fortier, S., M. Touaibia, S. Lord-Dufour, J. Galipeau, R. Roy et B. Annabi. 2008b. «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*, vol. 18, no 2, p. 195-204.
- Funes, J. M., M. Quintero, S. Henderson, D. Martinez, U. Qureshi, C. Westwood, M. O. Clements, D. Bourboulia, R. B. Pedley, S. Moncada et C. Boshoff. 2007. «Transformation of human mesenchymal stem cells increases their dependency on oxidative phosphorylation for energy production». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, no 15, p. 6223-6228.

- Galderisi, Umberto. 2010. «The bad and the good of mesenchymal stem cells in cancer: Boosters of tumor growth and vehicles for targeted delivery of anticancer agents». *World Journal of Stem Cells*, vol. 2, no 1, p. 5.
- Gaut, J. R., et L. M. Hendershot. 1993. «The modification and assembly of proteins in the endoplasmic reticulum». *Curr Opin Cell Biol*, vol. 5, no 4, p. 589-595.
- Gialeli, C., A. D. Theocharis et N. K. Karamanos. 2011. «Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting». *FEBS J*, vol. 278, no 1, p. 16-27.
- Gialeli, Ch, D. Kletsas, D. Mavroudis, H. P. Kalofonos, G. N. Tzanakakis et N. K. Karamanos. 2009. «Targeting epidermal growth factor receptor in solid tumors: critical evaluation of the biological importance of therapeutic monoclonal antibodies». *Curr Med Chem*, vol. 16, no 29, p. 3797-3804.
- Gingras, D., N. Bousquet-Gagnon, S. Langlois, M. P. Lachambre, B. Annabi et R. Beliveau. 2001. «Activation of the extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) cascade by membrane-type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP)». *FEBS Lett*, vol. 507, no 2, p. 231-236.
- Gingras, D., M. Michaud, G. Di Tomasso, E. Beliveau, C. Nyalendo et R. Beliveau. 2008. «Sphingosine-1-phosphate induces the association of membrane-type 1 matrix metalloproteinase with p130Cas in endothelial cells». *FEBS Lett*, vol. 582, no 3, p. 399-404.
- Gingras, Denis, et Richard Béliveau. 2010. «Emerging concepts in the regulation of membrane-type 1 matrix metalloproteinase activity☆». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, vol. 1803, no 1, p. 142-150.
- Glick, A. B., W. C. Weinberg, I. H. Wu, W. Quan et S. H. Yuspa. 1996. «Transforming growth factor beta 1 suppresses genomic instability independent of a G1 arrest, p53, and Rb». *Cancer Res*, vol. 56, no 16, p. 3645-3650.
- Golubkov, V. S., P. Cieplak, A. V. Chekanov, B. I. Ratnikov, A. E. Aleshin, N. V. Golubkova, T. I. Postnova, I. A. Radichev, D. V. Rozanov, W. Zhu, K. Motamedchaboki et A. Y. Strongin. 2010. «Internal Cleavages of the Autoinhibitory Prodomain Are Required for Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase Activation, although Furin Cleavage Alone Generates Inactive Proteinase». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, no 36, p. 27726-27736.

- Gross, J., et C. M. Lapiere. 1962. «Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 48, p. 1014-1022.
- Hanahan, D., et J. Folkman. 1996. «Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis». *Cell*, vol. 86, no 3, p. 353-364.
- Hanahan, Douglas, et Robert A Weinberg. 2011. «Hallmarks of Cancer: The Next Generation». *Cell*, vol. 144, no 5, p. 646-674.
- Harding, H. P., Y. Zhang, A. Bertolotti, H. Zeng et D. Ron. 2000. «Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response». *Mol Cell*, vol. 5, no 5, p. 897-904.
- He, L., S. O. Kim, O. Kwon, S. J. Jeong, M. S. Kim, H. G. Lee, H. Osada, M. Jung, J. S. Ahn et B. Y. Kim. 2009. «ATM blocks tunicamycin-induced endoplasmic reticulum stress». *FEBS Letters*, vol. 583, no 5, p. 903-908.
- Heldin, C. H., K. Miyazono et P. ten Dijke. 1997. «TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins». *Nature*, vol. 390, no 6659, p. 465-471.
- Hinoue, A., T. Takigawa, T. Miura, Y. Nishimura, S. Suzuki et K. Shiota. 2005. «Disruption of actin cytoskeleton and anchorage-dependent cell spreading induces apoptotic death of mouse neural crest cells cultured in vitro». *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, vol. 282, no 2, p. 130-137.
- Hoyer-Hansen, M., et M. Jaattela. 2007. «Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium». *Cell death and differentiation*, vol. 14, no 9, p. 1576-1582.
- Hu, J., P. E. Van den Steen, Q. X. Sang et G. Opdenakker. 2007. «Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases». *Nat Rev Drug Discov*, vol. 6, no 6, p. 480-498.
- Huang, L. E., J. Gu, M. Schau et H. F. Bunn. 1998. «Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 95, no 14, p. 7987-7992.

- Hunter, K. W., N. P. Crawford et J. Alsarraj. 2008. «Mechanisms of metastasis». *Breast Cancer Res*, vol. 10 Suppl 1, p. S2.
- Igbokwe, A., et D. H. Lopez-Terrada. 2011. «Molecular testing of solid tumors». *Arch Pathol Lab Med*, vol. 135, no 1, p. 67-82.
- Jensen, R. L. 2009. «Brain tumor hypoxia: tumorigenesis, angiogenesis, imaging, pseudoprogression, and as a therapeutic target». *J Neurooncol*, vol. 92, no 3, p. 317-335.
- Jiang, Y., B. N. Jahagirdar, R. L. Reinhardt, R. E. Schwartz, C. D. Keene, X. R. Ortiz-Gonzalez, M. Reyes, T. Lenvik, T. Lund, M. Blackstad, J. Du, S. Aldrich, A. Lisberg, W. C. Low, D. A. Largaespada et C. M. Verfaillie. 2002. «Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow». *Nature*, vol. 418, no 6893, p. 41-49.
- Jones, R. G., et C. B. Thompson. 2009. «Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth». *Genes Dev*, vol. 23, no 5, p. 537-548.
- Kalluri, R. 2003. «Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis». *Nat Rev Cancer*, vol. 3, no 6, p. 422-433.
- Kardosh, A., E. B. Golden, P. Pyrko, J. Uddin, F. M. Hofman, T. C. Chen, S. G. Louie, N. A. Petasis et A. H. Schonthal. 2008. «Aggravated endoplasmic reticulum stress as a basis for enhanced glioblastoma cell killing by bortezomib in combination with celecoxib or its non-coxib analogue, 2,5-dimethyl-celecoxib». *Cancer Res*, vol. 68, no 3, p. 843-851.
- Kaufman, D. S. 2010. «HIF hits Wnt in the stem cell niche». *Nat Cell Biol*, vol. 12, no 10, p. 926-927.
- Ke, Q., et M. Costa. 2006. «Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)». *Mol Pharmacol*, vol. 70, no 5, p. 1469-1480.
- Kessenbrock, K., V. Plaks et Z. Werb. 2010. «Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment». *Cell*, vol. 141, no 1, p. 52-67.
- Kinnaird, T., E. Stabile, M. S. Burnett, C. W. Lee, S. Barr, S. Fuchs et S. E. Epstein. 2004. «Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of

arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms». *Circ Res*, vol. 94, no 5, p. 678-685.

Kirkin, V., N. Cahuzac, F. Guardiola-Serrano, S. Huault, K. Luckeath, E. Friedmann, N. Novac, W. S. Wels, B. Martoglio, A. O. Hueber et M. Zornig. 2007. «The Fas ligand intracellular domain is released by ADAM10 and SPPL2a cleavage in T-cells». *Cell Death Differ*, vol. 14, no 9, p. 1678-1687.

Koumenis, C. 2006. «ER stress, hypoxia tolerance and tumor progression». *Curr Mol Med*, vol. 6, no 1, p. 55-69.

Koumenis, C., C. Naczki, M. Koritzinsky, S. Rastani, A. Diehl, N. Sonenberg, A. Koromilas et B. G. Wouters. 2002. «Regulation of protein synthesis by hypoxia via activation of the endoplasmic reticulum kinase PERK and phosphorylation of the translation initiation factor eIF2alpha». *Mol Cell Biol*, vol. 22, no 21, p. 7405-7416.

Kuipers, G. K., B. J. Slotman, L. E. Wedekind, T. R. Stoter, J. Berg, P. Sminia et M. V. Lafleur. 2007. «Radiosensitization of human glioma cells by cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition: independent on COX-2 expression and dependent on the COX-2 inhibitor and sequence of administration». *Int J Radiat Biol*, vol. 83, no 10, p. 677-685.

Kulik, G., A. Klippel et M. J. Weber. 1997. «Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt». *Mol Cell Biol*, vol. 17, no 3, p. 1595-1606.

Lafleur, M. A., F. A. Mercuri, N. Ruangpanit, M. Seiki, H. Sato et E. W. Thompson. 2006. «Type I collagen abrogates the clathrin-mediated internalization of membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) via the MT1-MMP hemopexin domain». *J Biol Chem*, vol. 281, no 10, p. 6826-6840.

Laird, P. W. 2005. «Cancer epigenetics». *Hum Mol Genet*, vol. 14 Spec No 1, p. R65-76.

Langlois, S., G. Di Tomasso, D. Boivin, C. Roghi, G. Murphy, D. Gingras et R. Beliveau. 2005. «Membrane type 1-matrix metalloproteinase induces endothelial cell morphogenic differentiation by a caspase-dependent mechanism». *Exp Cell Res*, vol. 307, no 2, p. 452-464.

Ledford, H. 2011. «Cancer theory faces doubts». *Nature*, vol. 472, no 7343, p. 273.

- Lee, A. S. 1992. «Mammalian stress response: induction of the glucose-regulated protein family». *Curr Opin Cell Biol*, vol. 4, no 2, p. 267-273.
- Lee, G. Y., et C. T. Lim. 2007. «Biomechanics approaches to studying human diseases». *Trends Biotechnol*, vol. 25, no 3, p. 111-118.
- Lee, J. W., S. H. Bae, J. W. Jeong, S. H. Kim et K. W. Kim. 2004. «Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions». *Exp Mol Med*, vol. 36, no 1, p. 1-12.
- Lefranc, F., J. Brotchi et R. Kiss. 2005. «Possible future issues in the treatment of glioblastomas: special emphasis on cell migration and the resistance of migrating glioblastoma cells to apoptosis». *J Clin Oncol*, vol. 23, no 10, p. 2411-2422.
- Lefranc, F., V. Facchini et R. Kiss. 2007. «Proautophagic drugs: a novel means to combat apoptosis-resistant cancers, with a special emphasis on glioblastomas». *The oncologist*, vol. 12, no 12, p. 1395-1403.
- Lietman, S., L. Yin et M. Levine. 2008. «SH3BP2 is an activator of NFAT activity and osteoclastogenesis». *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 371, no 4, p. 644-648.
- Lin, S. S., et I. B. Levitan. 1991. «Concanavalin A: a tool to investigate neuronal plasticity». *Trends Neurosci*, vol. 14, no 7, p. 273-277.
- Linder, S., et M. C. Shoshan. 2005. «Lysosomes and endoplasmic reticulum: targets for improved, selective anticancer therapy». *Drug Resist Updat*, vol. 8, no 4, p. 199-204.
- Liu, L., Q. Yu, J. Lin, X. Lai, W. Cao, K. Du, Y. Wang, K. Wu, Y. Hu, L. Zhang, H. Xiao, Y. Duan et H. Huang. 2011. «HIF-1alpha is essential for hypoxia-induced mesenchymal stem cell mobilization into the peripheral blood». *Stem Cells Dev*.
- Louis, D. N., H. Ohgaki, O. D. Wiestler, W. K. Cavenee, P.-C. Burger, A. Jouvet, B. W. Scheithauer et P. Kleihues. 2007. «The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system». *Acta Neuropathol*, vol. 114, no 2, p. 97-109.

- Ma, Y., J. W. Brewer, J. A. Diehl et L. M. Hendershot. 2002. «Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response». *Journal of molecular biology*, vol. 318, no 5, p. 1351-1365.
- Ma, Y., et L. M. Hendershot. 2004. «The role of the unfolded protein response in tumour development: friend or foe?». *Nat Rev Cancer*, vol. 4, no 12, p. 966-977.
- Mac Gabhann, F., et A. S. Popel. 2008. «Systems biology of vascular endothelial growth factors». *Microcirculation*, vol. 15, no 8, p. 715-738.
- Marciniak, S. J., et D. Ron. 2006. «Endoplasmic reticulum stress signaling in disease». *Physiol Rev*, vol. 86, no 4, p. 1133-1149.
- Maretzky, T., K. Reiss, A. Ludwig, J. Buchholz, F. Scholz, E. Proksch, B. de Strooper, D. Hartmann et P. Saftig. 2005. «ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 102, no 26, p. 9182-9187.
- Markovic, D. S., K. Vinnakota, S. Chirasani, M. Synowitz, H. Raguet, K. Stock, M. Sliwa, S. Lehmann, R. Kalin, N. van Rooijen, K. Holmbeck, F. L. Heppner, J. Kiwit, V. Matyash, S. Lehnardt, B. Kaminska, R. Glass et H. Kettenmann. 2009. «Gliomas induce and exploit microglial MT1-MMP expression for tumor expansion». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 106, no 30, p. 12530-12535.
- Martinou, M., E. Giannopoulou, G. Malatara, A. A. Argyriou, H. P. Kalofonos et D. Kardamakis. 2011. «Ionizing radiation affects epidermal growth factor receptor signalling and metalloproteinase secretion in glioma cells». *Cancer Genomics Proteomics*, vol. 8, no 1, p. 33-38.
- Masson, N., C. Willam, P. H. Maxwell, C. W. Pugh et P. J. Ratcliffe. 2001. «Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation». *EMBO J*, vol. 20, no 18, p. 5197-5206.
- Maxwell, P. H., M. S. Wiesener, G. W. Chang, S. C. Clifford, E. C. Vaux, M. E. Cockman, C. C. Wykoff, C. W. Pugh, E. R. Maher et P. J. Ratcliffe. 1999. «The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis». *Nature*, vol. 399, no 6733, p. 271-275.

- Meriane, M., S. Duhamel, L. Lejeune, J. Galipeau et B. Annabi. 2006. «Cooperation of matrix metalloproteinases with the RhoA/Rho kinase and mitogen-activated protein kinase kinase-1/extracellular signal-regulated kinase signaling pathways is required for the sphingosine-1-phosphate-induced mobilization of marrow-derived stromal cells». *Stem Cells*, vol. 24, no 11, p. 2557-2565.
- Mitsiades, N., W. H. Yu, V. Poulaki, M. Tsokos et I. Stamenkovic. 2001. «Matrix metalloproteinase-7-mediated cleavage of Fas ligand protects tumor cells from chemotherapeutic drug cytotoxicity». *Cancer Res*, vol. 61, no 2, p. 577-581.
- Moustakas, A., et C. H. Heldin. 2007. «Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression». *Cancer Sci*, vol. 98, no 10, p. 1512-1520.
- Mu, D., S. Cambier, L. Fjellbirkeland, J. L. Baron, J. S. Munger, H. Kawakatsu, D. Sheppard, V. C. Broaddus et S. L. Nishimura. 2002. «The integrin alpha(v)beta8 mediates epithelial homeostasis through MT1-MMP-dependent activation of TGF-beta1». *J Cell Biol*, vol. 157, no 3, p. 493-507.
- Mylotte, L. A., A. M. Duffy, M. Murphy, T. O'Brien, A. Samali, F. Barry et E. Szegezdi. 2008. «Metabolic flexibility permits mesenchymal stem cell survival in an ischemic environment». *Stem Cells*, vol. 26, no 5, p. 1325-1336.
- Nakamizo, A., F. Marini, T. Amano, A. Khan, M. Studeny, J. Gumin, J. Chen, S. Hentschel, G. Vecil, J. Dembinski, M. Andreeff et F. F. Lang. 2005. «Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas». *Cancer Res*, vol. 65, no 8, p. 3307-3318.
- Nakamura, M., S. Miyamoto, H. Maeda, G. Ishii, T. Hasebe, T. Chiba, M. Asaka et A. Ochiai. 2005. «Matrix metalloproteinase-7 degrades all insulin-like growth factor binding proteins and facilitates insulin-like growth factor bioavailability». *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 333, no 3, p. 1011-1016.
- Naumov, G. N., I. C. MacDonald, P. M. Weinmeister, N. Kerkvliet, K. V. Nadkarni, S. M. Wilson, V. L. Morris, A. C. Groom et A. F. Chambers. 2002. «Persistence of solitary mammary carcinoma cells in a secondary site: a possible contributor to dormancy». *Cancer Res*, vol. 62, no 7, p. 2162-2168.
- Naumov, G. N., J. L. Townson, I. C. MacDonald, S. M. Wilson, V. H. Bramwell, A. C. Groom et A. F. Chambers. 2003. «Ineffectiveness of doxorubicin treatment on

- solitary dormant mammary carcinoma cells or late-developing metastases». *Breast Cancer Res Treat*, vol. 82, no 3, p. 199-206.
- New, P. 2004. «Cyclooxygenase in the treatment of glioma: its complex role in signal transduction». *Cancer Control*, vol. 11, no 3, p. 152-164.
- Nishihara, A., J. I. Hanai, N. Okamoto, J. Yanagisawa, S. Kato, K. Miyazono et M. Kawabata. 1998. «Role of p300, a transcriptional coactivator, in signalling of TGF-beta». *Genes Cells*, vol. 3, no 9, p. 613-623.
- Nyalendo, C., E. Beaulieu, H. Sartelet, M. Michaud, N. Fontaine, D. Gingras et R. Beliveau. 2008. «Impaired tyrosine phosphorylation of membrane type 1-matrix metalloproteinase reduces tumor cell proliferation in three-dimensional matrices and abrogates tumor growth in mice». *Carcinogenesis*, vol. 29, no 8, p. 1655-1664.
- Nyalendo, C., M. Michaud, E. Beaulieu, C. Roghi, G. Murphy, D. Gingras et R. Beliveau. 2007. «Src-dependent phosphorylation of membrane type I matrix metalloproteinase on cytoplasmic tyrosine 573: role in endothelial and tumor cell migration». *J Biol Chem*, vol. 282, no 21, p. 15690-15699.
- Ohoka, N., S. Yoshii, T. Hattori, K. Onozaki et H. Hayashi. 2005. «TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death». *EMBO J*, vol. 24, no 6, p. 1243-1255.
- Okamura, K., Y. Kimata, H. Higashio, A. Tsuru et K. Kohno. 2000. «Dissociation of Kar2p/BiP from an ER sensory molecule, Ire1p, triggers the unfolded protein response in yeast». *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 279, no 2, p. 445-450.
- Ozawa, K., Y. Tsukamoto, O. Hori, Y. Kitao, H. Yanagi, D. M. Stern et S. Ogawa. 2001. «Regulation of tumor angiogenesis by oxygen-regulated protein 150, an inducible endoplasmic reticulum chaperone». *Cancer Res*, vol. 61, no 10, p. 4206-4213.
- Ozdamar, B., R. Bose, M. Barrios-Rodiles, H. R. Wang, Y. Zhang et J. L. Wrana. 2005. «Regulation of the polarity protein Par6 by TGFbeta receptors controls epithelial cell plasticity». *Science*, vol. 307, no 5715, p. 1603-1609.
- Page-McCaw, A., A. J. Ewald et Z. Werb. 2007. «Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling». *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 8, no 3, p. 221-233.

- Palazzo, A., R. Iacobelli et E. Cortesi. 2010. «Past, present and future of targeted therapy in solid tumors». *Curr Cancer Drug Targets*, vol. 10, no 5, p. 433-461.
- Parks, W. C., C. L. Wilson et Y. S. Lopez-Boado. 2004. «Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity». *Nat Rev Immunol*, vol. 4, no 8, p. 617-629.
- Patenaude, A., J. Parker et A. Karsan. 2010. «Involvement of endothelial progenitor cells in tumor vascularization». *Microvasc Res*, vol. 79, no 3, p. 217-223.
- Peschon, J. J., J. L. Slack, P. Reddy, K. L. Stocking, S. W. Sunnarborg, D. C. Lee, W. E. Russell, B. J. Castner, R. S. Johnson, J. N. Fitzner, R. W. Boyce, N. Nelson, C. J. Kozlosky, M. F. Wolfson, C. T. Rauch, D. P. Cerretti, R. J. Paxton, C. J. March et R. A. Black. 1998. «An essential role for ectodomain shedding in mammalian development». *Science*, vol. 282, no 5392, p. 1281-1284.
- Pittenger, M. F., A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig et D. R. Marshak. 1999. «Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells». *Science*, vol. 284, no 5411, p. 143-147.
- Potter, R. F., et A. C. Groom. 1983. «Capillary diameter and geometry in cardiac and skeletal muscle studied by means of corrosion casts». *Microvasc Res*, vol. 25, no 1, p. 68-84.
- Preaux, A. M., P. D'Ortho M, M. P. Bralet, Y. Laperche et P. Mavier. 2002. «Apoptosis of human hepatic myofibroblasts promotes activation of matrix metalloproteinase-2». *Hepatology*, vol. 36, no 3, p. 615-622.
- Prockop, D. J., M. Brenner, W. E. Fibbe, E. Horwitz, K. Le Blanc, D. G. Phinney, P. J. Simmons, L. Sensebe et A. Keating. 2010. «Defining the risks of mesenchymal stromal cell therapy». *Cytotherapy*, vol. 12, no 5, p. 576-578.
- Pyrko, P., A. H. Schonthal, F. M. Hofman, T. C. Chen et A. S. Lee. 2007. «The unfolded protein response regulator GRP78/BiP as a novel target for increasing chemosensitivity in malignant gliomas». *Cancer Res*, vol. 67, no 20, p. 9809-9816.
- Raffo, D., O. Pontiggia et M. Simian. 2011. «Role of MMPs in Metastatic Dissemination: Implications for Therapeutic Advances». *Curr Pharm Biotechnol*.

- Rameshwar, P. 2010. «Breast cancer cell dormancy in bone marrow: potential therapeutic targets within the marrow microenvironment». *Expert Rev Anticancer Ther*, vol. 10, no 2, p. 129-132.
- Rattigan, Y., J. M. Hsu, P. J. Mishra, J. Glod et D. Banerjee. 2010. «Interleukin 6 mediated recruitment of mesenchymal stem cells to the hypoxic tumor milieu». *Experimental Cell Research*, vol. 316, no 20, p. 3417-3424.
- Raza, A., M. J. Franklin et A. Z. Dudek. 2010. «Pericytes and vessel maturation during tumor angiogenesis and metastasis». *Am J Hematol*, vol. 85, no 8, p. 593-598.
- Remacle, A. G., D. V. Rozanov, P. C. Baciu, A. V. Chekanov, V. S. Golubkov et A. Y. Strongin. 2005. «The transmembrane domain is essential for the microtubular trafficking of membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP)». *J Cell Sci*, vol. 118, no Pt 21, p. 4975-4984.
- Ren, R., B. J. Mayer, P. Cicchetti et D. Baltimore. 1993. «Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site». *Science*, vol. 259, no 5098, p. 1157-1161.
- Rogers, Kara (2011). Endoplasmic Reticulum (ER). Encyclopedia Britannica: <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/187020/endoplasmic-reticulum> p
- Roybal, C. N., S. Yang, C. W. Sun, D. Hurtado, D. L. Vander Jagt, T. M. Townes et S. F. Abcouwer. 2004. «Homocysteine increases the expression of vascular endothelial growth factor by a mechanism involving endoplasmic reticulum stress and transcription factor ATF4». *J Biol Chem*, vol. 279, no 15, p. 14844-14852.
- Rozanov, D. V., A. Y. Savinov, V. S. Golubkov, T. I. Postnova, A. Remacle, S. Tomlinson et A. Y. Strongin. 2004a. «Cellular membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) cleaves C3b, an essential component of the complement system». *J Biol Chem*, vol. 279, no 45, p. 46551-46557.
- Rozanov, D. V., S. Sikora, A. Godzik, T. I. Postnova, V. Golubkov, A. Savinov, S. Tomlinson et A. Y. Strongin. 2004b. «Non-proteolytic, receptor/ligand interactions associate cellular membrane type-1 matrix metalloproteinase with the complement component Clq». *J Biol Chem*, vol. 279, no 48, p. 50321-50328.

- Sabeh, F., R. Shimizu-Hirota et S. J. Weiss. 2009. «Protease-dependent versus -independent cancer cell invasion programs: three-dimensional amoeboid movement revisited». *The Journal of Cell Biology*, vol. 185, no 1, p. 11-19.
- Sahin, U., G. Weskamp, K. Kelly, H. M. Zhou, S. Higashiyama, J. Peschon, D. Hartmann, P. Saftig et C. P. Blobel. 2004. «Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands». *J Cell Biol*, vol. 164, no 5, p. 769-779.
- Sakamoto, S., R. O. McCann, R. Dhir et N. Kyprianou. 2010. «Talin1 promotes tumor invasion and metastasis via focal adhesion signaling and anoikis resistance». *Cancer Res*, vol. 70, no 5, p. 1885-1895.
- Sakamoto, T., et M. Seiki. 2009. «Cytoplasmic tail of MT1-MMP regulates macrophage motility independently from its protease activity». *Genes Cells*, vol. 14, no 5, p. 617-626.
- Sato, H., T. Takino et H. Miyamori. 2005. «Roles of membrane-type matrix metalloproteinase-1 in tumor invasion and metastasis». *Cancer Sci*, vol. 96, no 4, p. 212-217.
- Schroder, M. 2008. «Endoplasmic reticulum stress responses». *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, vol. 65, no 6, p. 862-894.
- Schroder, M., et R. J. Kaufman. 2005. «The mammalian unfolded protein response». *Annu Rev Biochem*, vol. 74, p. 739-789.
- Semenza, G. L. 2010. «HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism». *Curr Opin Genet Dev*, vol. 20, no 1, p. 51-56.
- Shen, J., C. Hughes, C. Chao, J. Cai, C. Bartels, T. Gessner et J. Subjeck. 1987. «Coinduction of glucose-regulated proteins and doxorubicin resistance in Chinese hamster cells». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 84, no 10, p. 3278-3282.
- Short, B., N. Brouard, T. Occhiodoro-Scott, A. Ramakrishnan et P. J. Simmons. 2003. «Mesenchymal stem cells». *Arch Med Res*, vol. 34, no 6, p. 565-571.
- Shuda, M., N. Kondoh, N. Imazeki, K. Tanaka, T. Okada, K. Mori, A. Hada, M. Arai, T. Wakatsuki, O. Matsubara, N. Yamamoto et M. Yamamoto. 2003. «Activation of the ATF6, XBP1 and grp78 genes in human hepatocellular carcinoma: a possible

involvement of the ER stress pathway in hepatocarcinogenesis». *J Hepatol*, vol. 38, no 5, p. 605-614.

Sidrauski, C., et P. Walter. 1997. «The transmembrane kinase Ire1 β is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response». *Cell*, vol. 90, no 6, p. 1031-1039.

Sina, A., S. Lord-Dufour et B. Annabi. 2009. «Cell-based evidence for aminopeptidase N/CD13 inhibitor actinonin targeting of MT1-MMP-mediated proMMP-2 activation». *Cancer Letters*, vol. 279, no 2, p. 171-176.

Sina, A., S. Proulx-Bonneau, A. Roy, L. Poliquin, J. Cao et B. Annabi. 2010. «The lectin concanavalin-A signals MT1-MMP catalytic independent induction of COX-2 through an IKK γ /NF-kappaB-dependent pathway». *J Cell Commun Signal*, vol. 4, no 1, p. 31-38.

Sminia, P., T. R. Stoter, P. van der Valk, P. H. Elkhuijsen, T. M. Tadema, G. K. Kuipers, W. P. Vandertop, M. V. Lafleur et B. J. Slotman. 2005. «Expression of cyclooxygenase-2 and epidermal growth factor receptor in primary and recurrent glioblastoma multiforme». *J Cancer Res Clin Oncol*, vol. 131, no 10, p. 653-661.

Song, M. S., Y. K. Park, J. H. Lee et K. Park. 2001. «Induction of glucose-regulated protein 78 by chronic hypoxia in human gastric tumor cells through a protein kinase C-epsilon/ERK/AP-1 signaling cascade». *Cancer Res*, vol. 61, no 22, p. 8322-8330.

Spaeth, E. L., J. L. Dembinski, A. K. Sasser, K. Watson, A. Klopp, B. Hall, M. Andreeff et F. Marini. 2009. «Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression». *PLoS One*, vol. 4, no 4, p. e4992.

Stampfer, M. R., J. Garbe, G. Levine, S. Lichtsteiner, A. P. Vasserot et P. Yaswen. 2001. «Expression of the telomerase catalytic subunit, hTERT, induces resistance to transforming growth factor beta growth inhibition in p16INK4A(-) human mammary epithelial cells». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 98, no 8, p. 4498-4503.

Steel, G. J., D. M. Fullerton, J. R. Tyson et C. J. Stirling. 2004. «Coordinated activation of Hsp70 chaperones». *Science*, vol. 303, no 5654, p. 98-101.

- Sternlicht, M. D., et Z. Werb. 2001. «How matrix metalloproteinases regulate cell behavior». *Annu Rev Cell Dev Biol*, vol. 17, p. 463-516.
- Stewart, L. A. 2002. «Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials». *Lancet*, vol. 359, no 9311, p. 1011-1018.
- Strand, S., P. Vollmer, L. van den Abeelen, D. Gottfried, V. Alla, H. Heid, J. Kuball, M. Theobald, P. R. Galle et D. Strand. 2004. «Cleavage of CD95 by matrix metalloproteinase-7 induces apoptosis resistance in tumour cells». *Oncogene*, vol. 23, no 20, p. 3732-3736.
- Strasser, A., et H. Puthalakath. 2008. «Fold up or perish: unfolded protein response and chemotherapy». *Cell Death Differ*, vol. 15, no 2, p. 223-225.
- Stratton, M. R. 2011. «Exploring the genomes of cancer cells: progress and promise». *Science*, vol. 331, no 6024, p. 1553-1558.
- Stratton, M. R., P. J. Campbell et P. A. Futreal. 2009. «The cancer genome». *Nature*, vol. 458, no 7239, p. 719-724.
- Strongin, A. Y. 2010. «Proteolytic and non-proteolytic roles of membrane type-1 matrix metalloproteinase in malignancy». *Biochim Biophys Acta*, vol. 1803, no 1, p. 133-141.
- Stupp, R., W. P. Mason, M. J. van den Bent, M. Weller, B. Fisher, M. J. Taphoorn, K. Belanger, A. A. Brandes, C. Marosi, U. Bogdahn, J. Curschmann, R. C. Janzer, S. K. Ludwin, T. Gorlia, A. Allgeier, D. Lacombe, J. G. Cairncross, E. Eisenhauer et R. O. Mirimanoff. 2005. «Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma». *N Engl J Med*, vol. 352, no 10, p. 987-996.
- Surawicz, T. S., B. J. McCarthy, V. Kupelian, P. J. Jukich, J. M. Bruner et F. G. Davis. 1999. «Descriptive epidemiology of primary brain and CNS tumors: results from the Central Brain Tumor Registry of the United States, 1990-1994». *Neuro-oncology*, vol. 1, no 1, p. 14-25.
- Suzuki, M., G. Raab, M. A. Moses, C. A. Fernandez et M. Klagsbrun. 1997. «Matrix metalloproteinase-3 releases active heparin-binding EGF-like growth factor by

- cleavage at a specific juxtamembrane site». *J Biol Chem*, vol. 272, no 50, p. 31730-31737.
- Szegezdi, E., S. E. Logue, A. M. Gorman et A. Samali. 2006. «Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis». *EMBO Rep*, vol. 7, no 9, p. 880-885.
- Tallant, C., A. Marrero et F. X. Gomis-Ruth. 2010. «Matrix metalloproteinases: fold and function of their catalytic domains». *Biochim Biophys Acta*, vol. 1803, no 1, p. 20-28.
- Tauchi, T., M. Kizaki, S. Okamoto, H. Tanaka, M. Tanimoto, K. Inokuchi, T. Murayama, Y. Saburi, M. Hino, M. Tsudo, T. Shimomura, Y. Isobe, K. Oshimi, K. Dan, K. Ohyashiki et Y. Ikeda. 2010. «Seven-year follow-up of patients receiving imatinib for the treatment of newly diagnosed chronic myelogenous leukemia by the TARGET system». *Leuk Res*.
- Thiery, Jean Paul, et Jonathan P. Sleeman. 2006. «Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions». *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 7, no 2, p. 131-142.
- Valtieri, M., et A. Sorrentino. 2008. «The mesenchymal stromal cell contribution to homeostasis». *J Cell Physiol*, vol. 217, no 2, p. 296-300.
- Van Meir, E. G., C. G. Hadjipanayis, A. D. Norden, H. K. Shu, P. Y. Wen et J. J. Olson. 2010. «Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma». *CA Cancer J Clin*, vol. 60, no 3, p. 166-193.
- Vander Heiden, Matthew G., Lewis C. Cantley et Craig B. Thompson. 2009. «Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation». *Science*, vol. 324, no 19460998, p. 1029-1033.
- Vedrenne, C., et H. P. Hauri. 2006. «Morphogenesis of the endoplasmic reticulum: beyond active membrane expansion». *Traffic*, vol. 7, no 6, p. 639-646.
- Vineis, P., A. Schatzkin et J. D. Potter. 2010. «Models of carcinogenesis: an overview». *Carcinogenesis*, vol. 31, no 10, p. 1703-1709.

- Volpert, O. V., V. Stellmach et N. Bouck. 1995. «The modulation of thrombospondin and other naturally occurring inhibitors of angiogenesis during tumor progression». *Breast Cancer Res Treat*, vol. 36, no 2, p. 119-126.
- Wakefield, L. M., et A. B. Roberts. 2002. «TGF-beta signaling: positive and negative effects on tumorigenesis». *Curr Opin Genet Dev*, vol. 12, no 1, p. 22-29.
- Wakefield, L. M., et M. B. Sporn. 1990. «Suppression of carcinogenesis: a role for TGF-beta and related molecules in prevention of cancer». *Immunol Ser*, vol. 51, p. 217-243.
- Waldhauer, I., D. Goehlsdorf, F. Gieseke, T. Weinschenk, M. Wittenbrink, A. Ludwig, S. Stevanovic, H. G. Rammensee et A. Steinle. 2008. «Tumor-associated MICA is shed by ADAM proteases». *Cancer Res*, vol. 68, no 15, p. 6368-6376.
- Wang, J., G. Yin, P. Menon, J. Pang, E. M. Smolock, C. Yan et B. C. Berk. 2010. «Phosphorylation of G protein-coupled receptor kinase 2-interacting protein 1 tyrosine 392 is required for phospholipase C-gamma activation and podosome formation in vascular smooth muscle cells». *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, vol. 30, no 10, p. 1976-1982.
- Wang, X. Z., et D. Ron. 1996. «Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase». *Science*, vol. 272, no 5266, p. 1347-1349.
- Warburg, O. 1956. «On respiratory impairment in cancer cells». *Science*, vol. 124, no 3215, p. 269-270.
- Weaver, A. M. 2006. «Invadopodia: specialized cell structures for cancer invasion». *Clin Exp Metastasis*, vol. 23, no 2, p. 97-105.
- Weinberg, Robert A. 2007. *The biology of cancer*. New York: Garland Science, xix, 796 p.
- Weiss, S. J., G. Peppin, X. Ortiz, C. Ragsdale et S. T. Test. 1985. «Oxidative autoactivation of latent collagenase by human neutrophils». *Science*, vol. 227, no 4688, p. 747-749.
- Werb, Z. 2010. «The extracellular matrix and disease: An interview with Zena Werb. Interviewed by Kristin H. Kain». *Dis Model Mech*, vol. 3, no 9-10, p. 513-516.

- Wick, W., A. Wick, J. B. Schulz, J. Dichgans, H. P. Rodemann et M. Weller. 2002. «Prevention of irradiation-induced glioma cell invasion by temozolomide involves caspase 3 activity and cleavage of focal adhesion kinase». *Cancer Res*, vol. 62, no 6, p. 1915-1919.
- Wild-Bode, C., M. Weller, A. Rimner, J. Dichgans et W. Wick. 2001. «Sublethal irradiation promotes migration and invasiveness of glioma cells: implications for radiotherapy of human glioblastoma». *Cancer Res*, vol. 61, no 6, p. 2744-2750.
- Wilson, D. E., K. M. Anderson et T. M. Seed. 1990. «Ultrastructural evidence for differentiation in a human glioblastoma cell line treated with inhibitors of eicosanoid metabolism». *Neurosurgery*, vol. 27, no 4, p. 523-531.
- Woessner, J. F., et Hideaki Nagase. 2000. *Matrix metalloproteinases and TIMPs*. Coll. «Protein profile». Oxford ; New York: Oxford University Press, xiii, 223 p. p.
- Wu, Y. I., H. G. Munshi, S. J. Snipas, G. S. Salvesen, R. Fridman et M. S. Stack. 2007. «Activation-coupled membrane-type 1 matrix metalloproteinase membrane trafficking». *Biochem J*, vol. 407, no 2, p. 171-177.
- Yu, M., E. T. Bowden, J. Sitlani, H. Sato, M. Seiki, S. C. Mueller et E. W. Thompson. 1997. «Tyrosine phosphorylation mediates ConA-induced membrane type 1-matrix metalloproteinase expression and matrix metalloproteinase-2 activation in MDA-MB-231 human breast carcinoma cells». *Cancer Res*, vol. 57, no 22, p. 5028-5032.
- Yu, Q., et I. Stamenkovic. 2000. «Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis». *Genes Dev*, vol. 14, no 2, p. 163-176.
- Zhu, W., W. Xu, R. Jiang, H. Qian, M. Chen, J. Hu, W. Cao, C. Han et Y. Chen. 2006. «Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth in vivo». *Exp Mol Pathol*, vol. 80, no 3, p. 267-274.
- Ziemer, L. S., C. J. Koch, A. Maity, D. P. Magarelli, A. M. Horan et S. M. Evans. 2001. «Hypoxia and VEGF mRNA expression in human tumors». *Neoplasia*, vol. 3, no 6, p. 500-508.
- Zinszner, H., M. Kuroda, X. Wang, N. Batchvarova, R. T. Lightfoot, H. Remotti, J. L. Stevens et D. Ron. 1998. «CHOP is implicated in programmed cell death in response

to impaired function of the endoplasmic reticulum». *Genes Dev*, vol. 12, no 7, p. 982-995.

Zucker, S., M. Hymowitz, C. E. Conner, E. A. DiYanni et J. Cao. 2002. «Rapid trafficking of membrane type 1-matrix metalloproteinase to the cell surface regulates progelatinase a activation». *Lab Invest*, vol. 82, no 12, p. 1673-1684.