

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

RÉGULATION DE L'AUTOPHAGIE DANS LES CELLULES DE
GLIOBLASTOME HUMAIN U87 : UN NOUVEAU RÔLE CRUCIAL POUR LE
DOMAINE CYTOPLASMIQUE DE MT1-MMP

THÈSE

PRÉSENTÉE

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DU DOCTORAT EN BIOCHIMIE

PAR

JONATHAN PRATT

JUIN 2016

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse 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.07-2011). 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.»

*« Il n'y a que deux façons de vaincre le cancer :
aimer et continuer à sourire quoi qu'il advienne ».*

Alice Parizeau, Écrivaine [1930-1990]

À tous ceux et celles qui combattent chaque jour...

REMERCIEMENTS

13 décembre 2008...date qui a été décisive dans mon choix de carrière et dans l'orientation de mon chemin de vie. Mon grand-père a succombé à un cancer des poumons avec de multiples métastases à l'âge de 68 ans. Ayant déjà entrepris mon baccalauréat en biochimie, je me suis promis de m'engager dans la recherche contre le cancer afin de faire la différence dans la vie des gens atteints par cette maladie.

À l'arrivée de la session Hiver 2010, le professeur Borhane Annabi m'a donné la chance de découvrir le vaste monde de l'oncologie. J'ai terminé mes études sous-graduées et j'ai débuté une maîtrise dans le laboratoire du professeur Annabi. L'originalité et l'innovation du projet de recherche m'ont permis d'effectuer un passage accéléré au doctorat. Depuis les 5 dernières années, M. Annabi a donc joué un rôle clé, tant dans ma vie personnelle que professionnelle, en me transmettant d'innombrables qualités et valeurs que je crois essentielles pour un chercheur. Persévérance, fougue, détermination, rigueur scientifique et passion sont des mots qui prennent tout leurs sens quand on entre dans son laboratoire ou dans son bureau. Ses fameuses phrases comme : « Tout est sous contrôle? » et « Tu tiens le coup? » ont été pour moi un signe d'attention, de préoccupation et de soutien constant et resteront gravées dans ma mémoire. Je remercie donc chaleureusement mon directeur de recherche, Dr Borhane Annabi, pour son temps, son engagement et son dévouement envers moi ainsi que pour tous les moments d'échanges scientifiques et sur la vie en générale. Comme il l'a toujours si bien dit dans les rencontres de début d'année : « Si vous êtes prêts à adopter ma philosophie, vous embarquez dans le train. Sinon, vous débarquez! ». Aujourd'hui, je peux confirmer qu'acheter un billet pour ce train a été la meilleure décision que je pouvais prendre pour m'assurer un début de carrière scientifique très prometteur. Merci mille fois!

Je tiens aussi à remercier tous les gens qui ont contribué au succès des travaux présentés dans cette thèse. À l'UQAM, je remercie les professeurs René Roy et Steve Bourgault pour leur contribution scientifique et technique. Ensuite, je tiens à remercier M. Denis Flipo pour son temps et son expertise scientifique dans les domaines de la microscopie et la cytométrie en flux. Je tiens également à remercier les professeurs Sarah Jenna, Joanne Paquin, Richard Desrosiers, Diana Averill, Marc Lussier et Nicolas Pilon qui m'ont aidé non seulement à acquérir de solides connaissances en matière de biochimie, mais aussi à développer mon sens critique à travers les différents cours suivis pendant mes études graduées.

Évidemment, un environnement de travail stimulant est un élément essentiel afin de bien mener à terme un projet d'envergure comme celui-ci. De manière chronologique, je tiens donc à remercier tous les collègues de travail dont j'ai eu la chance de côtoyer : Éric, Élizabeth, Sabrina, Naoufal, Hind, Rima, Alain, Michel, Aroua, Hana, Paula, Laurence, Chirine, Djahida, Pascale, les deux Samuel, Bayader, Mustapha, Clémence, David, Cyndia, Évelyne, Nicolas, Julie, Annie, Khadidja et Sylvie pour votre temps, vos questions, votre bonne humeur et surtout pour votre attitude positive et fêtarde que vous apportiez chaque jour dans le laboratoire.

Je réserve un merci tout spécial à M. Sébastien Proulx-Bonneau, ancien collègue de travail et superviseur lors de mon premier stage dans le laboratoire, pour m'avoir appris toutes les techniques de base dans le laboratoire et aussi pour m'avoir transmis son éthique de travail et sa curiosité. Ensuite, je ne peux passer sous silence une extraordinaire demoiselle que j'ai côtoyée depuis mon arrivée dans le laboratoire. Pour tous ces moments passés dans la salle de culture au 3^e étage, dans le laboratoire, dans le bureau et dans les différents congrès (dont les fameuses journées GEPROM) à se raconter des histoires et à rire aux éclats jusqu'à en pleurer, Amélie Vézina, je te remercie du fond du cœur.

Je tiens aussi à remercier les différents organismes subventionnaires (CRSNG, FRQNT) pour le soutien financier du projet de recherche. J'aimerais également remercier ces mêmes organismes ainsi que la fondation de l'UQAM pour les différents prix et bourses que j'ai obtenus au fil de mes études universitaires. Je dois aussi remercier le centre de recherche BioMed pour le prix qui m'a été attribué lors du 9^e colloque annuel en 2013.

Je désire aussi remercier les membres du jury qui ont consacré leur précieux temps à lire et à évaluer cette thèse.

Dans un ordre plus personnel, je tiens absolument à réserver mes remerciements les plus importants envers mes parents, Lise Ferland et Robert Pratt, et ma sœur, Jennifer, sans qui je n'aurais jamais eu la chance d'entreprendre cette longue et périlleuse route universitaire. Un grand merci pour tous les sacrifices que vous avez faits et que vous faites encore pour me donner la vie la plus facile possible. Vous avez toujours été derrière moi pour me soutenir dans les hauts et les bas de la vie. Je vous remercie du plus profond de mon cœur de m'avoir donné la vie et surtout d'être présents à chaque seconde de mon existence. Je vous dois absolument tout.

Finalement, mon dernier remerciement est le plus spécial. Durant les trois dernières années passées dans le laboratoire, une femme extraordinaire m'est tombée dans l'oeil. Cette femme sensible, attentionnée, respectueuse, charmante, généreuse, aventureuse et extrêmement jolie m'a donné le goût de continuer et de me surpasser. Elle prend soin de moi comme la prunelle de ses yeux. Elle est mon rayon de soleil. Grâce à elle, je suis devenu un meilleur homme. Je veux donc remercier infiniment cette collègue de travail qui est devenue, au courant de l'année 2015, ma fiancée et mon épouse. Amira Ouanouki, je t'aime de tout mon cœur et je te remercie d'être toujours là pour moi et d'avoir accepté de vivre ta vie avec moi.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	X
LISTE DES TABLEAUX.....	XIII
LISTE DES ABBRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	XIV
RÉSUMÉ	XVIII
CHAPITRE I	
LE CANCER	1
1.1 Généralités.....	1
1.2 Tumeurs cérébrales.....	5
1.2.1 Types, grades et caractéristiques des tumeurs cérébrales	5
1.2.2 Tumeurs astrocytaires	8
1.3 Les glioblastomes multiformes.....	12
1.3.1 Types de glioblastomes	12
1.3.2 Traitements conventionnels et stratégies thérapeutiques	14
1.3.3 Phénotype de résistance	18
CHAPITRE II	
L'AUTOPHAGIE.....	23
2.1 Généralités.....	23
2.2 Mécanismes de l'autophagie	25
2.2.1 Macroautophagie.....	26
2.2.2 Microautophagie	29
2.2.3 Autophagie médiée par les protéines chaperones	31
2.3 Fonctions de l'autophagie.....	32
2.3.1 Fonctions physiologiques.....	32
2.3.2 Fonctions pathologiques	33

2.4	Autophagie et cancer	35
2.4.1	Induction et régulation de l'autophagie dans le cancer	37
2.4.2	Rôle de l'autophagie dans le cancer	41
CHAPITRE III		
LES MÉTALLOPROTÉASES MATRICIELLES		46
3.1	La matrice extracellulaire	46
3.2	Les propriétés et caractéristiques des MMPs	47
3.2.1	Structure et activation des MMPs	47
3.2.2	Régulation des MMPs	52
3.2.3	Fonctions des MMPs	55
3.3	MT1-MMP	59
3.3.1	Activation et régulation	59
3.3.2	Fonctions de MT1-MMP	64
3.3.3	Le domaine cytoplasmique et ses protéines d'interaction	68
CHAPITRE IV		
PROJET DE RECHERCHE		
4.1	Problématique	70
4.2	Hypothèses de travail	72
4.3	Objectifs de recherche	73
CHAPITRE V		
ARTICLE 1 : CONCANAVALIN-A-INDUCED AUTOPHAGY BIOMARKERS		
REQUIRES MEMBRANE TYPE-1 MATRIX METALLOPROTEINASE		
INTRACELLULAR SIGNALLING IN GLIOBLASTOMA CELLS		74
5.1	Contributions	74
5.2	Résumé	76
5.3	Abstract	77
5.4	Introduction	78
5.5	Results	80
5.6	Discussion	84
5.7	Material and methods	88

5.9	Figures	92
CHAPITRE VI		
ARTICLE 2 : INDUCTION OF AUTOPHAGY BIOMARKER BNIP3 REQUIRES A JAK2/STAT3 AND MT1-MMP SIGNALING INTERPLAY IN CONCAVALIN-A-ACTIVATED U87 GLIOBLASTOMA CELLS.		
		99
6.1	Contributions	99
6.2	Résumé	101
6.3	Abstract.....	102
6.4	Introduction	103
6.5	Material and methods	106
6.6	Results	110
6.7	Discussion.....	114
6.8	Conclusion.....	117
6.9	Acknowledgements	117
6.10	Figures	118
CHAPITRE VII		
ARTICLE 3 : EVIDENCE OF MTCBP-1 INTERACTION WITH THE CYTOPLASMIC DOMAIN OF MT1-MMP : IMPLICATIONS IN THE AUTOPHAGY CELL INDEX OF HIGH-GRADE GLIOBLASTOMA.		
		126
7.1	Contributions	126
7.2	Résumé	128
7.3	Abstract.....	129
7.4	Introduction	130
7.5	Material and methods	133
7.6	Results	138
7.7	Discussion.....	143
7.8	Acknowledgements	146
7.9	Figures	147

CHAPITRE VIII	
DISCUSSION	160
8.1 L'autophagie, une stratégie thérapeutique contre le glioblastome?	164
8.2 Existe-t-il une redondance fonctionnelle entre les MT-MMPs?	170
8.3 Vers un ciblage fonctionnel et thérapeutique des MT-MMPs.....	175
CONCLUSION.....	179
APPENDICE A : AUTRES CONTRIBUTIONS SCIENTIFIQUES	181
APPENDICE B : ARTICLE EN PRÉPARATION	185
APPENDICE C : CHAPITRE DE LIVRE	214
APPENDICE D : PARTICIPATION À DES CONGRÈS SCIENTIFIQUES	266
BIBLIOGRAPHIE.....	268

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1	Caractéristiques biochimiques fondamentales des cellules cancéreuses. 4
1.2	Principales altérations génétiques induites au cours de la progression tumorale astrocytaire. 11
1.3	Exemple d'un cerveau de patient atteint d'un glioblastome récurrent qui a subi une thérapie combinant le carboplatine et le bevacizumab..... 17
2.1	Les causes et les conséquences de l'induction de l'autophagie. 25
2.2	Schématisation des trois types d'autophagie non sélective (NSA). 27
2.3	L'implication de l'autophagie dans différentes pathologies. 34
2.4	L'induction de l'autophagie dans le cancer : Une lame à double-tranchant. .. 36
2.5	Rôles pro- et anti-tumoraux de l'autophagie dans différents stades du cancer. 43
3.1	Représentation de la structure des 24 métalloprotéases matricielles (MMPs) humaines classées par famille. 49
3.2	Éléments de régulation dans le promoteur du gène MMP-14 humain (MT1-MMP). 61
3.3	Structure de MT1-MMP et rôles/fonctions de ses domaines catalytiques, hémopexine et cytoplasmique. 65
3.4	Mécanisme d'activation de la proMMP-2..... 67
5.1	High cell surface mannopyranoside residues contribute to lectin-induced autophagy. 92
5.2	Concanavalin-A triggers proMMP-2 activation and autophagy. 93
5.3	Concanavalin-A-induced autophagy is independent of MT1-MMP extracellular catalytic function. 94

5.4	Gene silencing of MT1-MMP gene expression antagonizes Concanavalin-A-induced autophagy.	95
5.5	The intracellular cytosolic domain of MT1-MMP is required to trigger autophagy.	96
5.6	Concanavalin-A-induced autophagy related genes are reduced in siMT1-MMP transfected U87 cells.	97
5.7	Transcriptional regulation of BNIP3, ATG3, ATG12, ATG16L1 and ATG16L2 expression is signalled through MT1-MMP's intracellular domain.	98
6.1	Gene silencing of MT1-MMP inhibits BNIP3 induction by Concanavalin-A.	118
6.2	JAK2 inhibition antagonizes Concanavalin-A-induced acidic vacuole formation and BNIP3 expression.	119
6.3	MT1-MMP expression is required to trigger STAT3 phosphorylation by Concanavalin-A.....	120
6.4	Schematic representation of the correlation between MT1-MMP, BNIP3, and STAT3 phosphorylation status.....	121
6.5	The intracellular domain of MT1-MMP is required to trigger BNIP3 expression.....	122
6.6	JAK2 is required to regulate BNIP3 but not MT1-MMP transcription upon Concanavalin-A treatment.	123
6.7	MT1-MMP-mediated induction of BNIP3 and of STAT3 phosphorylation requires JAK2.....	124
6.8	A MT1-MMP-JAK-STAT signalling axis regulates BNIP3 expression.	125
7.1	MT1-MMP and MTCBP-1 gene expression profiling in grades I-IV brain tumour tissues.....	147
7.2	FRET- and SPR-based evidence of MTCBP-1 recruitment and interaction with MT1-MMP's cytoplasmic domain in U87 glioblastoma cells.....	148
7.3	MT1-MMP overexpression triggers autophagy events and is abrogated by MTCBP-1.....	150
7.4	Overexpression of MTCBP-1 inhibits MT1-MMP-mediated induction of LC3 puncta.	151

7.5	Concanavalin-A-induced autophagy requires MT1-MMP and is abrogated by MTCBP-1 overexpression.....	153
7.6	Overexpression of recombinant MTCBP-1 reduces the MT1-MMP/MTCBP-1 ratio and regulates MT1-MMP-mediated autophagy.....	155
7.S1	Validation of recombinant MTCBP-1 expression in U87 glioblastoma-transfected cells.....	156
7.S2	Immunoprecipitation of recombinant MTCBP-1 by MT1-MMP in MTCBP-1 overexpressing U87 glioblastoma cells.....	157
7.S3	Validation of recombinant MT1-MMP and MTCBP-1 protein overexpression efficacy in U87 glioblastoma cells.....	158
7.S4	Quantification of puncta formation confirms that overexpression of MTCBP-1 inhibits MT1-MMP-mediated induction of LC3 puncta.....	159
8.1	Stratégies thérapeutiques utilisées contre le cancer en ciblant l'autophagie.	166
8.2	Scénarios de thérapies anti-cancer impliquant une interaction entre les processus d'apoptose et d'autophagie.....	168
8.3	Alignement des séquences protéiques des domaines cytoplasmiques des 6 MT-MMPs.....	172
8.4	Schéma récapitulatif intégrant les trois articles présentés dans les chapitres III, IV et V.....	180
B.1	MT1-MMP and LRP-1 gene expression profiling in grades I-IV brain tumour tissues.....	203
B.2	Silencing of MT1-MMP increases An2 internalization.....	204
B.3	Inhibition of MMP by broad-range inhibitors triggers An2 internalization.	205
B.4	MT1-MMP overexpression decreased An2 internalization.....	206
B.5	MT1-MMP-mediated shedding of LRP-1 requires MMP catalytic function.....	207

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Classification des tumeurs du système nerveux central (SNC) selon l’OMS... 7	
3.1 Implications des métalloprotéases matricielles (MMPs) dans diverses pathologies. 57	
8.1 Niveaux d’expression relatifs des six MT-MMPs en fonction du grade tumoral. 171	

LISTE DES ABBRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ADAM	<i>A disintegrin and metalloproteinase</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AG490	Tyrphostin, inhibiteur sélectif de la kinase JAK2
AKT	Protéine kinase B
AMP	Adénosine monophosphate
AMPK	Protéine kinase activée par l'AMP
ARN	Acide ribonucléique
ARNi	ARN interférant
ATG	Gène relatif à l'autophagie
ATP	Adénosine triphosphate
AVO	<i>Acidic vesicular organelle</i>
BECN1	Beclin-1
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BNIP3	<i>BCL-2/E1B 19 kDa interacting protein 3</i>
BNIP3L	<i>BCL-2/E1B 19 kDa interacting protein 3-like</i>
BSA	Albumine sérique bovine
CGA	<i>Cancer Genome Atlas</i>
CD	Cluster de différenciation
CMA	Autophagie médiée par les protéines chaperones
ConA	Concanavoline-A
COX	Cyclo-oxygénase
CQ	Chloroquine
CSC	Cellules souches cancéreuses

DAPI	4',6'-diamidino-2-phénylindole
DRAM	<i>Damage-regulated autophagy modulator</i>
ECL	<i>Enhanced chemoluminescence</i>
EGCG	(-) Épigallocatechine Gallate
EGFR	Récepteur du facteur de croissance épidermal
e-MI	Microautophagie endosomale
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
ESCRT	<i>endosomal sorting complexes required for transport</i>
FAK	Focal adhesion kinase
FRET-AP	<i>Förster Resonance Energy Transfer - Acceptor Photobleaching</i>
G6PT	Transporteur du glucose-6-phosphate
GADD	<i>growth arrest- and DNA damage-inducible gene</i>
GAPDH	glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GBM	Glioblastome multiforme
GFP	Protéine de fluorescence verte
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GSC	CSC provenant du glioblastome
HCQ	Hydroxychloroquine
HIF	Facteur inductible par l'hypoxie
HSP	Protéine de choc thermique
IDH	Isocitrate déshydrogénase
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
JAK	<i>Janus kinase</i>
K _d	Constante de dissociation
KFERQ	Motif reconnu par les protéines chaperones de la CMA
LAMP-2A	<i>lysosome-associated membrane protein type 2A</i>
LC3	<i>Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3</i>
LDL	Lipoprotéine de faible densité

LDLR	Récepteur du LDL
LE-MI	Microautophagie endosomale tardive
LRP-1	<i>LDLR-related protein 1</i>
MAPK	Protéine kinase activée par les mitogènes
mARN	ARN messenger
MDR	<i>Multi-drug resistance</i>
MEC	Matrice extracellulaire
miARN	MicroARN
MMP	Métalloprotéase matricielle
MSC	Cellule souche mésenchymateuse
MTCBP-1	<i>MT1-MMP cytoplasmic tail binding protein-1</i>
MT-MMP	Métalloprotéase matricielle de type membranaire
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
MVB	Corps multivésiculaire
NF- κ B	Nuclear factor-kappa B
NSA	Autophagie non-sélective
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
p/q	bras chromosomique court/long
p53	Protéine suppresseuse de tumeur de 53 kDa
PARP	poly (ADP-ribose) polymérase
PBS	Tampon phosphate salin
PC	Proprotéine convertase
PDGFR	Récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes
PE	Phosphatidyléthanolamine
PGE2	Prostaglandine E2
PIP2	phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate
PIP3	phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate
PMN	<i>Piecemeal microautophagy of the nucleus</i>
ProMMP	Forme zymogène d'une métalloprotéase matricielle

PTEN	<i>Phosphatase and Tensin homolog</i>
RE	Réticulum endoplasmique
RhoA	<i>Ras homolog gene family A</i>
ROI	Région d'intérêt
ROS	Espèce réactive de l'oxygène
RT	Radiothérapie
RT-PCR	Transcription Inverse - Réaction en Chaîne de la Polymérase
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SDS-PAGE	Gel électrophorétique de polyacrylamide-SDS
SNC	Système nerveux central
SPR	Résonance plasmonique de surface
SRC	<i>Rous sarcoma tyrosine kinase</i>
STAT	Transducteur du signal et activateur de la transcription
TBST	Tampon tris salin avec tween
TEM	Transition épithélio-mésenchymateuse
TGF- β	Facteur de croissance transformant-Béta
TIMP	Inhibiteur tissulaire des métalloprotéases matricielles
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TMZ	Témozolomide
TNF	Facteur de nécrose tumoral
T-PA	Activateur tissulaire du plasminogène
TSG	Gène suppresseur de tumeur
U-PA	Activateur du plasminogène de type urokinase
UPR	<i>Unfolded protein response</i>
VEGF	facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
WGA	Agglutinine du germe de blé

RÉSUMÉ

Le glioblastome multiforme (GBM) est considéré comme la tumeur cérébrale la plus agressive, invasive et infiltrante de toutes les tumeurs primaires chez l'adulte. Ce type de cancer touche plusieurs milliers de personnes à travers le monde chaque année et il demeure encore aujourd'hui un fléau pour les chercheurs, car la survie moyenne des patients qui en sont atteints est d'environ 1 an. Cette triste réalité, causée par un manque de traitements efficaces, est due à l'hétérogénéité moléculaire et aux propriétés intrinsèques des cellules cancéreuses qui composent le glioblastome. Parmi celles-ci, un nouveau processus cellulaire, nommé autophagie, a vu le jour au début des années 90. Celui-ci, permettant à la fois un recyclage accru du contenu protéique non fonctionnel et une meilleure utilisation de l'énergie métabolique, a été caractérisé comme étant très important au niveau physiologique, mais aussi dans plusieurs pathologies comme le cancer.

Par ailleurs, depuis plusieurs années, notre laboratoire s'intéresse aux fonctions moléculaires de MT1-MMP, une métalloprotéase matricielle de type membranaire fortement exprimée au niveau du cancer du cerveau. Plusieurs études ont d'ailleurs démontré que celle-ci joue un rôle clé dans la progression tumorale en activant d'autres métalloprotéases matricielles (MMPs) solubles par le biais de son domaine catalytique, mais aussi en promouvant la migration cellulaire et l'angiogenèse tumorale grâce à l'activation de certaines voies de signalisation médiées par son domaine cytoplasmique. Ce dernier possède aussi plusieurs partenaires d'interaction dont les actions et la régulation sont inconnues à ce jour. Attendu que la protéine MT1-MMP et que l'autophagie sont deux joueurs clés dans le développement du cancer et dans la résistance aux traitements, l'objectif principal de cette thèse était de découvrir si MT1-MMP pouvait contribuer à la régulation de l'autophagie et dans l'affirmative, d'étudier les mécanismes moléculaires à la base de cette régulation.

Ainsi, les résultats de mon premier article ont permis de conclure que l'autophagie est signalée par le domaine cytoplasmique de MT1-MMP lorsque celle-ci se retrouve ancrée à la membrane plasmique. D'abord, nous avons utilisé la concanavaleine A, une lectine connue pour induire l'expression de MT1-MMP. Nous avons découvert que la ConA induisait l'autophagie dans les cellules de glioblastome humain U87. À l'aide d'inhibiteurs et d'ARN interférants dirigés contre MT1-MMP, nous avons pu déterminer que cette induction était médiée par MT1-MMP, mais indépendante de son domaine catalytique. Enfin, une étude structure-fonction a permis de confirmer que c'est le domaine cytoplasmique de MT1-MMP qui est responsable de l'induction de l'autophagie en activant les gènes de la famille ATG ainsi que la protéine mitochondriale BNIP3.

Ensuite, les résultats de mon deuxième article ont permis de déterminer le mécanisme moléculaire reliant MT1-MMP à BNIP3 et l'autophagie. En utilisant la ConA en

combinaison avec des inhibiteurs ciblant les kinases de la famille JAK, nous avons découvert que l'inhibition de la kinase JAK2 court-circuitait l'axe de signalisation MT1-MMP/BNIP3. Étant donné que JAK2 phosphoryle STAT3, l'utilisation d'un ARN interférant contre STAT3 a aussi affecté l'axe MT1-MMP/BNIP3. Pour terminer, la répression de JAK2 par un ARN interférant combinée à la surexpression de la protéine complète de MT1-MMP ont permis de conclure qu'il existe un axe de signalisation MT1-MMP/JAK2/STAT3/BNIP3.

Enfin, les résultats de mon troisième article ont mené à une découverte d'envergure, car nous avons caractérisé l'affinité de MTCBP-1 pour le domaine cytoplasmique de MT1-MMP ainsi que son action inhibitrice sur l'induction de l'autophagie. Tout d'abord, à l'aide d'ADNc générés à partir de biopsies de patients atteints d'un astrocytome de grade I à IV, nous avons pu déterminer que les niveaux d'expression de MT1-MMP et de MTCBP-1 sont inversement proportionnels en fonction du grade tumoral cérébral. Par la suite, plusieurs techniques permettant de déceler une interaction entre deux protéines, dont le FRET-AP, le SPR et la co-IP, ont permis de conclure que MTCBP-1 interagissait avec la portion intracellulaire de MT1-MMP. Enfin, l'utilisation du marqueur autophagique LC3 a confirmé que l'interaction entre MT1-MMP et MTCBP-1 entraîne bel et bien une inactivation de l'autophagie.

En conclusion, nos travaux ont permis d'approfondir les connaissances dans la biologie du cancer du cerveau, dans le domaine de la transduction des signaux intracellulaires ainsi que dans le ciblage des fonctions signalétiques de MT1-MMP. Enfin, même si certains aspects nécessitent une investigation approfondie, ces travaux auront un impact majeur sur le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant les mécanismes de radio- et chimiorésistance des glioblastomes.

Mots-clés : Glioblastome, Chimiorésistance, Autophagie, MT1-MMP, BNIP3, JAK/STAT, MTCBP-1

CHAPITRE I

LE CANCER

1.1 Généralités

Au cours de l'évolution, le cancer est devenu la maladie la plus répandue dans les pays occidentaux. Heureusement, depuis quelques années, plusieurs organismes à but non lucratif tels que Leucan (Cancers pédiatriques), la Société canadienne du cancer (Le relais pour la vie), la Fondation du cancer du sein (La course à la vie CIBC) et Movember (Cancer de la prostate) se sont joints main dans la main afin d'organiser des levées de fonds et des activités promotionnelles pour venir en aide aux gens atteints de cette terrible maladie. Sans grand étonnement, le cancer figure aujourd'hui parmi les principales causes de mortalité et de morbidité dans le monde. En effet, selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), en 2012, plus de 14 millions de personnes ont été diagnostiquées avec un cancer et plus de 8,2 millions de personnes en sont décédées. Ce qui est plus inquiétant encore, c'est que l'OMS prévoit une augmentation de 70% de personnes atteintes durant les 20 prochaines années, passant de 14 à 22 millions (Stewart, B. W. et Wild. 2014). À l'échelle nationale, on prévoit que 196 900 Canadiens recevront un diagnostic de cancer en 2015 et que 78 000 Canadiens en mourront (Comité consultatif de la Société canadienne du cancer. 2015). C'est donc dire que le cancer est en constante évolution et c'est pourquoi on se doit de découvrir les failles de cette terrible maladie afin de trouver des solutions concrètes et efficaces. Malheureusement, malgré les quelques 3 135 577 études répertoriées sous le terme de recherche « cancer » sur le site du National Center for

Biotechnology Information (NCBI), les avenues thérapeutiques efficaces se font rares pour plusieurs types de cancer.

D'abord, il est important de souligner qu'à tout moment, une personne peut être atteinte par un cancer. En effet, même si les ADN polymérases responsables de la réplication de l'ADN de toutes les cellules possèdent une fidélité accrue, il se crée en moyenne un million de cellules mutées chaque jour (Béliveau et Gingras. 2014, p.16). Si elles ne sont pas corrigées, ces cellules mutées peuvent en engendrer d'autres en se multipliant, ce qui aurait pour effet de créer une tumeur au sein du tissu sain. Par contre, il se peut qu'une mutation n'affecte ni la structure ni la fonction des gènes, on la qualifie alors de mutation silencieuse. C'est pourquoi, la descendance génétique a un impact important dans les probabilités de développer un cancer, car les mutations non corrigées s'accumulent, non seulement de générations en générations, mais aussi à l'intérieur de notre propre code génétique. Outre les prédispositions génétiques, plusieurs facteurs extérieurs, tels que le vieillissement, le tabagisme, les rayons du soleil, la pollution, la consommation d'alcool, la sédentarité, l'obésité, la mauvaise alimentation incluant la consommation de viande rouge et de produits conservés dans du sel, ont démontré une corrélation directe avec la probabilité de développer un cancer (Béliveau et Gingras. 2014, p.32-33).

Par ailleurs, le développement de la génomique, et des techniques de laboratoire inhérents, a permis d'identifier des dizaines de mutations pouvant mener à un même type de cancer. Il s'avère donc très difficile de cibler efficacement le protocole de traitement qui soignera le patient à 100%. En effet, cette hétérogénéité génétique des cancers amène donc un certain niveau de complexité dans la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires qui les caractérisent. De plus, le manque de tests de dépistage combiné au nombre très limité de biomarqueurs font en sorte que les patients sont souvent diagnostiqués trop tard dans la progression de la maladie. Par conséquent, même si les technologies scientifiques ont grandement évolué dans la

dernière décennie, on retrouve encore plusieurs types de cancer qui sont difficilement traitables, voire incurables. Malgré tous les efforts déployés pour venir à bout de cette maladie, on doit faire face quotidiennement à un défi de taille. Un taux de récurrence important a également été constaté pour la plupart des patients en rémission d'un cancer due à une inefficacité thérapeutique soudaine causée par les divers mécanismes de résistance employés par les cellules cancéreuses en réponse aux traitements (Kumar *et al.*, 2012). Heureusement, les connaissances reliées à la biologie du cancer ont connu une expansion phénoménale au cours des dernières décennies. Elles ont permis de cibler quelques dix caractéristiques biochimiques fondamentales du cancer, représentées à la figure 1.1, pour lesquelles plusieurs études ont mené à la mise en place d'un meilleur ciblage pharmacologique et thérapeutique. Même si plusieurs médicaments sont présentement testés dans divers essais cliniques, il reste néanmoins beaucoup à faire puisque plusieurs cancers sont toujours incurables à ce jour (Hanahan et Weinberg. 2011; Figure 1.1). C'est le cas, notamment, du cancer de la prostate, du cancer du poumon, du cancer du sein et du cancer du cerveau (Edwards *et al.*, 2013; Zeng, T. *et al.*, 2015).

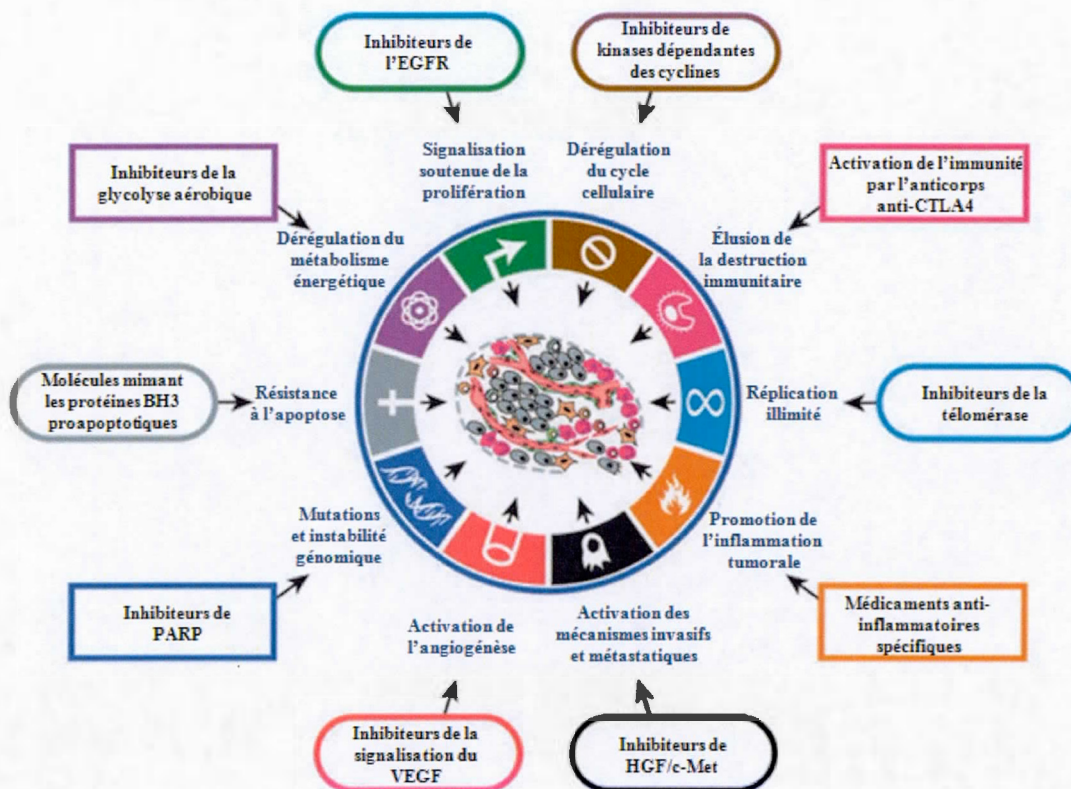


Figure 1.1 Caractéristiques biochimiques fondamentales des cellules cancéreuses. Lors de leur transformation, les cellules cancéreuses acquièrent des propriétés qui leur permettent de migrer, de croître, d'envahir les tissus et de déjouer les mécanismes de mort cellulaire. Ces propriétés, représentées en bleu, sont devenues des cibles thérapeutiques très primées pour lesquelles plusieurs stratégies ont été développées, dont quelques unes sont présentement en essais cliniques. Celles-ci sont présentées dans les différents rectangles et ellipses. (EGFR, Epidermal growth factor receptor; CTLA-4, Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4; HGF, Hepatocyte growth factor; VEGF, Vascular endothelial growth factor; PARP, Poly(ADP-ribose) polymerase; BH3, Bcl-2 homology 3). Adapté de (Hanahan et Weinberg, 2011).

1.2 Tumeurs cérébrales

Les tumeurs cérébrales, ou cancer du cerveau, ont un taux d'incidence assez faible comparativement à d'autres types de cancer comme le poumon ou le colon. En effet, en 2015, on estime que 3,000 nouveaux cas seront diagnostiqués au Canada (Comité consultatif de la Société canadienne du cancer. 2015). Ces tumeurs se traduisent par une agglomération de cellules pro-cancéreuses se situant dans une région spécifique du cerveau ou de la moelle épinière. Compte tenu du fait que le cerveau est composé d'un vaste amalgame de cellules spécialisées, les tumeurs cérébrales sont répertoriées selon une classification bien précise. Elles se différencient les unes des autres de par le type cellulaire qu'elles affectent, leur grade tumoral, ainsi que leurs propriétés génétiques intrinsèques.

1.2.1 Types, grades et caractéristiques des tumeurs cérébrales

Comme le cerveau est composé de plusieurs types de cellules différenciées et que chaque type peut acquérir un phénotype cancéreux, il a été important de se doter d'un système permettant de classer les différents types et sous-types de tumeurs cérébrales afin de mieux les caractériser. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a donc établi une classification de tous les types de tumeurs cérébrales (Louis *et al.*, 2007). La classification traditionnelle, développée en 1979, a bien évolué au fil des années. En effet, les progrès scientifiques dans le domaine de l'oncologie ont permis de découvrir que les différentes tumeurs cérébrales possèdent des caractéristiques phénotypiques bien précises. De celles-ci, trois sont à la base de la classification, soit la croissance tumorale, l'extension tumorale et l'étendue de la néovascularisation tumorale (Germano *et al.*, 2010).

Il existe deux types de croissance tumorale, soit la croissance expansive et la croissance infiltrante. Les tumeurs dites expansives sont celles qui croissent en refoulant et en comprimant les tissus avoisinants, tandis que les tumeurs infiltrantes, qui sont généralement plus agressives, évoluent en pénétrant et en grandissant au sein des tissus adjacents. Par la suite, les tumeurs infiltrantes sont séparées en deux catégories d'extension, soit l'extension circonscrite et l'extension diffuse. En fait, la distinction se situe au niveau de la limitation entourant la tumeur. Les tumeurs infiltrantes circonscrites possèdent un périmètre macroscopique bien visible, alors que les tumeurs infiltrantes diffuses se dissipent à travers les tissus, ce qui rend leurs délimitations très difficiles (Claes *et al.*, 2007). Enfin, en plus d'être diffuses, les tumeurs les plus malignes et les plus infiltrantes sont dotées de la capacité de créer de nouveaux vaisseaux sanguins afin de leur permettre une croissance encore plus accrue. Ce phénomène est appelé l'angiogénèse tumorale. Afin de réduire la quantité d'information et ainsi faciliter la classification des tumeurs cérébrales, ces diverses caractéristiques ont été regroupées en ce qu'on appelle « le grade tumoral ». Les grades tumoraux sont au nombre de quatre (I à IV) et représentent le caractère invasif et agressif des différentes tumeurs cérébrales. Depuis la première classification, il y a eu bien d'autres caractéristiques phénotypiques, comme la présence de nécrose, l'atypie cytonucléaire et l'activité mitotique, qui se sont jointes afin de mieux distinguer les tumeurs qui se retrouvaient entre deux grades (Collins. 2004). Enfin, la classification la plus récente, datée de 2007, rassemble maintenant les différentes tumeurs selon leur grade et le type cellulaire qu'elles affectent et est représentée par le tableau 1.1.

Tableau 1.1 Classification des tumeurs du système nerveux central (SNC) selon l'OMS. Repertoriées depuis 1926, les tumeurs du SNC sont séparées en fonction du type cellulaire duquel elles proviennent ainsi que de leur grade tumoral. Cette classification, datant de 2007, représente la dernière établie à ce jour. Les chiffres romains représentent les grades tumoraux. Adapté de (Louis *et al.*, 2007).

Tumeurs astrocytaires	I	II	III	IV	Autres tumeurs neuroépithéliales (suite)	I	II	III	IV
Astrocytome subependymal à cellule géante	•				Neurocytome central		•		
Astrocytome pilocytique	•				Neurocytome extraventriculaire		•		
Astrocytome pilomyxoïde		•			Liponeurocytome cérébelleux		•		
Astrocytome diffus		•			Paragangliome de la moelle épinière	•			
Xanthoastrocytome pléomorphe		•			Tumeur glioneuronale papillaire	•			
Astrocytome anaplasique			•		Tumeur glioneuronale formant une rosette du 4 ^e ventricule	•			
Glioblastome				•					
Glioblastome à cellule géante				•	Tumeurs pinéales				
Gliosarcome				•	Pinéocytome	•			
Tumeurs oligodendrogiales					Tumeur parenchymale pinéale de différenciation intermédiaire		•	•	
Oligodendrogliome		•			Pinéoblastome				•
Oligodendrogliome anaplasique			•		Tumeur papillaire de la région pinéale		•	•	
Tumeurs oligoastrocytiques					Tumeurs embryonnaires				
Oligoastrocytome		•			Médulloblastome				•
Oligoastrocytome anaplasique			•		Tumeur neuroectodermale primitive du SNC (PNET)				•
Tumeurs épendymales					Tumeur rhabdoïde/tératoïde atypique				•
Subépendymome	•				Tumeurs des nerfs crâniens et parépinérières				
Épendymome myxopapillaire	•				Schwannome	•			
Épendymome		•			Neurofibrome	•			
Épendymome anaplasique			•		Périneuriome	•	•	•	
Tumeurs du plexus choroïde					Tumeur périphérique maligne de la gaine nerveuse (MPNST)		•	•	•
Papillome du plexus choroïde	•				Tumeurs méningées				
Papillome du plexus choroïde atypique		•			Méningiome	•			
Carcinome du plexus choroïde			•		Méningiome atypique		•		
Autres tumeurs neuroépithéliales					Méningiome anaplasique/malin			•	
Gliome angiocentrique	•				Hémangiopericytome		•		
Gliome choroïde dans le 3 ^e ventricule		•			Hémangiopericytome anaplasique			•	
Autres tumeurs neuroépithéliales					Hémangioblastome	•			
Gangliocytome	•				Tumeurs de la région sellaire				
Gangliogliome	•				Craniopharyngiome	•			
Gangliogliome anaplasique			•		Tumeur cellulaire granuleuse de la neurohypophyse	•			
Astrocytome et gangliogliome infantile desmoplasique	•				Pituicytome	•			
Tumeur neuroépithéliale dysembryoplasique	•				Oncocytome de l'adénohypophyse	•			

1.2.2 Tumeurs astrocytaires

De tous les types de tumeurs cérébrales, les tumeurs astrocytaires représentent les tumeurs cérébrales primaires les plus fréquentes. Celles-ci font partie de la grande famille des tumeurs neuroépithéliales. Comme son nom l'indique, la tumeur astrocytaire tient son nid au niveau des astrocytes. Ce type de cellules gliales provient d'une différenciation spécifique des glioblastes du tube neural embryonnaire (Rajan et McKay. 1998). Les astrocytes sont réputés pour contribuer au bon fonctionnement du système nerveux central (SNC) en restant en contact avec les capillaires sanguins afin de fournir les éléments nutritifs essentiels aux neurones, comme l'oxygène et le glucose, mais aussi en entourant ceux-ci pour prévenir la propagation des neurotransmetteurs à l'extérieur de la fente synaptique (Araque *et al.*, 2001). Récemment, des chercheurs ont découvert que les astrocytes participent à la régulation de la communication neuronale. En effet, ceux-ci sont en mesure de répondre aux signaux neuronaux en relarguant des gliotransmetteurs, c'est-à-dire des signaux astrocytaires permettant de moduler l'activité neuronale (Giaume *et al.*, 2010; Halassa et Haydon. 2010). Depuis 2010, les diverses études sur les astrocytes nous montrent qu'ils sont une pièce maîtresse dans l'homéostasie cérébrale. Leur activation, basée sur un niveau de calcium intracellulaire élevé, induit une cascade signalétique importante qui touche plusieurs fonctions physiologiques cérébrales (Li, H. *et al.*, 2014). Ainsi, le relargage d'ATP, de glutamate et de D-serine, provenant des astrocytes, assurent un contrôle accru de la plasticité synaptique, du couplage neurovasculaire ainsi que de la régulation de l'activité synaptique excitatrice ou inhibitrice (Araque *et al.*, 2014; Lalo *et al.*, 2014; Rasooli-Nejad *et al.*, 2014). Puisque les astrocytes jouent des rôles importants pour le bon fonctionnement du cerveau, la qualité des communications ainsi que des fonctions neuronales chute drastiquement lorsque ceux-ci deviennent cancéreux. De plus, les diverses

modifications génotypiques et phénotypiques de ces cellules cancéreuses entraînent la formation de tumeurs astrocytaires de différents grades.

Les tumeurs astrocytaires connues sont classées en quatre catégories soit : l'astrocytome pilocytique (grade I), l'astrocytome diffus (grade II), l'astrocytome anaplasique (grade III) et le glioblastome multiforme (grade IV). En fait, ce sont leurs caractéristiques géniques et morphologiques qui permettent de les distinguer.

L'astrocytome pilocytique est une tumeur solide que l'on retrouve particulièrement au niveau pédiatrique. Cette tumeur de grade I est généralement traitée par résection chirurgicale, car elle est bien délimitée et ne présente aucun signe d'infiltration (Louis *et al.*, 2007). Il progresse très rarement vers les grades élevés et les modifications génétiques qui l'accompagnent sont très modestes. En effet, les trois seules altérations connues touchent le chromosome 7 et 17, et l'oncogène BRAF (Jones *et al.*, 2008). Comme il y a très peu d'études sur l'astrocytome de grade I, il est difficile de dire si les gènes présents dans les régions touchées sont importants dans la progression tumorale.

L'astrocytome diffus représente le premier grade de tumeur maligne, soit le grade II. Il est caractérisé par un début d'infiltration dans les tissus avoisinants et une prolifération cellulaire lente. Ce type d'astrocytome est souvent le prélude en matière de mutations et d'altérations chromosomiques importantes. En effet, les délétions des gènes codant pour la protéine p53 (TP53) et pour les enzymes isocitrate déshydrogénases (IDH1 et IDH2) sont considérées comme les premières aberrations génétiques ayant un impact significatif dans la formation et la progression des tumeurs cérébrales (Crespo *et al.*, 2015; Figure 1.2).

L'astrocytome de grade III est qualifié par le terme anaplasique, car les cellules qui le composent perdent leur intégrité cellulaire et les caractéristiques morphologiques. Il

provient de l'évolution de la tumeur diffuse (grade II) et acquiert de nouvelles propriétés cellulaires telles qu'une hausse de l'activité mitotique ainsi que de la densité cellulaire, mais aussi un niveau de polymorphisme nucléaire élevé incluant la multinucléation, la lobulation et l'angulation (Zeng, T. *et al.*, 2015). Les mutations les plus évidentes pour l'astrocytome de grade III se retrouvent plutôt au niveau de la perte d'hétérozygotie du chromosome 10q et de la perte du chromosome 19q (Crespo *et al.*, 2015; Figure 1.2).

Finalement, l'accumulation de toutes ces mutations génétiques entraîne une tumeur encore plus maligne. Cette tumeur, appelée glioblastome, représente l'astrocytome ayant le grade le plus élevé (grade IV). Malgré sa rareté, celui-ci est le plus étudié en raison de sa morbidité élevée et de son pronostic très sombre. Étant donné son hétérogénéité, son haut niveau de complexité et sa forte malignité, le glioblastome est considéré comme le roi de toutes les tumeurs cérébrales connues (Soeda *et al.*, 2015).

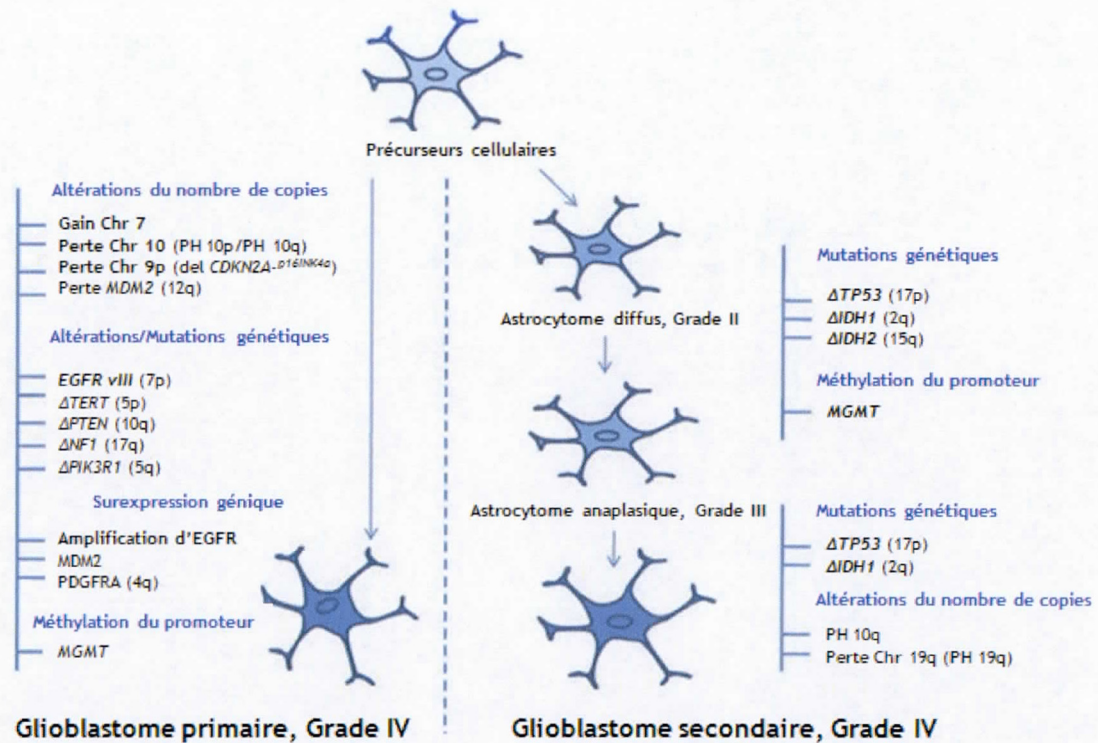


Figure 1.2 Principales altérations génétiques induites au cours de la progression tumorale astrocytaire. Pendant le développement tumoral, plusieurs changements moléculaires ont lieu au niveau du génome des cellules cancéreuses. Ces changements peuvent être des altérations du nombre de copies d'un chromosome, des altérations et/ou mutations génétiques, une surexpression génique et même une méthylation du promoteur d'un gène précis. La progression tumorale astrocytaire se déroule de deux façons pour produire les glioblastomes primaires (*de novo*) ou secondaires (provenant du développement d'une tumeur bénigne) (voir section 1.3.1). (Chr, Chromosome; PH, Perte de l'hétérozygotie; del, délétion; p, bras chromosomique court et q, bras chromosomique long; CDKN2A, cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A; p16INK4a, CDKN2A multiple tumor suppressor; MDM2, E3 ubiquitin-protein ligase; TERT, Telomerase reverse transcriptase; NF1, neurofibromatosis type I; PIK3R1, Phosphoinositide-3-Kinase Regulatory Subunit 1; PDGFRA, Platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide; IDH, Isocitrate déshydrogénase; MGMT, O⁶-méthylguanine–DNA méthyltransférase). Adaptée de (Crespo *et al.*, 2015).

1.3 Les glioblastomes multiformes

Tel que décrit à la section précédente, les glioblastomes multiformes (GBM) sont les tumeurs malignes les plus invasives, résistantes et infiltrantes de toutes les tumeurs cérébrales (Fuller *et al.*, 2002). Ils ont des propriétés caractéristiques qui leur permettent de survivre dans des conditions environnementales tissulaires hostiles, telles que le manque d'oxygène (hypoxie), l'augmentation de l'acidité ainsi que l'inflammation chronique (Colotta *et al.*, 2009; Wilson et Hay. 2011). Ils ont donc appris à s'adapter à ce microenvironnement tumoral par le biais de différents mécanismes de protection. Depuis plusieurs décennies, ceux-ci ont été constamment mis à l'épreuve grâce à l'effervescence du nombre de thérapies et de traitements potentiels. Malgré le nombre impressionnant de cibles thérapeutiques, la tenacité du glioblastome en réponse aux thérapies conventionnelles reflète bien notre faible compréhension des mécanismes de résistance au sein de la communauté de chercheurs spécialistes.

1.3.1 Types de glioblastomes

Depuis le début des études sur les tumeurs cérébrales, les connaissances au niveau de la biologie des glioblastomes n'ont cessé d'évoluer. Les avancements technologiques concernant les « omiques » (protéomique, génomique, métabolomique, etc.) et l'imagerie médicale ont permis de sous-classer ces tumeurs en fonction de leur profil d'expression génique, de leur distribution tissulaire et de leur pronostic clinique (Ohgaki et Kleihues. 2005). En effet, plusieurs études ont démontré qu'il existe deux types de glioblastomes, soit le glioblastome primaire et le glioblastome secondaire.

Le glioblastome primaire se distingue du glioblastome secondaire par sa signature moléculaire très différente mais aussi par le fait qu'il est diagnostiqué comme une

tumeur cérébrale de grade IV n'ayant subi aucune progression tumorale comme c'est le cas pour le glioblastome secondaire. Ce dernier est très rare, car il représente à peine 5 % de tous les cas de glioblastomes diagnostiqués. Comme il est démontré à la figure 1.2, le profil génétique du glioblastome secondaire se caractérise par l'accumulation des mutations génétiques et des altérations chromosomiques qui sont survenues pendant la progression tumorale du grade II au grade IV, tandis que celui du glioblastome primaire est composé d'une combinaison aléatoire de plusieurs altérations génétiques (Li, R. *et al.*, 2015). Par ailleurs, certaines mutations sont désormais reconnues comme biomarqueurs permettant de mieux caractériser le type de glioblastome et d'offrir un meilleur diagnostic. Par exemple, chez les patients atteints d'un glioblastome primaire, le gène *EGFR* est amplifié et le gène *PTEN* est délété. À l'inverse, le gène *IDH1* est muté dans presque 100 % des cas de glioblastomes secondaires (Cancer Genome Atlas Research. 2008; Nobusawa *et al.*, 2009; Ohgaki et Kleihues. 2013).

En plus de ces deux types de glioblastomes, le Cancer Genome Atlas (CGA) a subdivisé les glioblastomes en quatre groupes distincts. Ces sous-groupes se distinguent de par leur profil génétique. Le premier groupe est le glioblastome proneural. Celui-ci est caractérisé par une amplification des gènes *CDK4* et *PDGFRA*, des mutations dans les gènes *IDH1* et *IDH2*, mais surtout par un phénotype de méthylation des îlots CpG associés au gliome (G-CIMP) (Noushmehr *et al.*, 2010). Le deuxième groupe, appelé glioblastome classique, est constitué par une amplification accrue du gène *EGFR* et plus particulièrement du variant *EGFR(VIII)* (Verhaak *et al.*, 2010). Le glioblastome mésenchymal représente le troisième groupe et il est identifié grâce à l'amplification du gène *MET* et de la mutation (ou même délétion) du gène *NF1*. Celui-ci présente aussi une activation accrue des voies de signalisation pro-inflammatoires NF- κ B, STAT3 et TGF- β (Bhat *et al.*, 2013). Le dernier groupe est représenté par le glioblastome neural. Bien qu'il ne possède pas de propriétés particulières qui le distinguent des autres groupes, il est

composé d'un mélange d'altérations génétiques appartenant à ceux-ci (Phillips *et al.*, 2006).

1.3.2 Traitements conventionnels et stratégies thérapeutiques

Depuis quelques années, les traitements et les thérapies anti-cancer ne cessent d'évoluer et de se diversifier. En effet, plusieurs stratégies ont été développées afin de cibler les différentes propriétés des cellules cancéreuses (Hanahan et Weinberg, 2011). Comme les traitements sont sélectionnés sur la base de plusieurs facteurs intrinsèques à la qualité de la tumeur tels que le type de cancer, son emplacement, sa taille, son grade tumoral, son génotype, mais aussi de facteurs propres à chaque patient tels que l'âge, le sexe, le nombre de traitements subis, la résistance face à certains traitements, ces diverses stratégies apportent donc un plus grand éventail de solutions potentielles en vue de permettre un traitement plus personnalisé (Barker *et al.*, 2001; Curran *et al.*, 1993). Dépendamment des facteurs énumérés ci-dessus, les stratégies anti-cancer pouvant être employées sont la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie, l'immunothérapie, l'hormonothérapie, la virothérapie ainsi que les thérapies ciblées.

Le traitement du glioblastome requiert une précision thérapeutique telle que les traitements doivent être choisis spécifiquement en fonction des mutations présentes dans le génotype cancéreux du patient. Présentement, le traitement de pointe des patients nouvellement diagnostiqués avec un glioblastome commence par une résection maximale de la tumeur, suivi de la radiothérapie (RT) et de l'adjuvant témozolomide (TMZ), un agent alkylant de l'ADN et un inducteur d'apoptose (Stupp *et al.*, 2005). Depuis les 20 dernières années, ce traitement a été amélioré grâce à l'optimisation de la précision chirurgicale, du type de radiothérapie ainsi que du « cocktail » chimiothérapeutique. En effet, la découverte de molécules fluorescentes,

telles que l'acide 5-aminolévulinique (ALA) et la fluorescéine de sodium, a permis de distinguer les tissus cancéreux des tissus sains et ainsi optimiser le volume de résection tumorale (Schebesch *et al.*, 2013; Stummer *et al.*, 2000; Stummer *et al.*, 2006). Depuis les années 80, l'essor de techniques telles que la brachythérapie, la radio-immunothérapie, la radiochirurgie stéréotactique fractionnée ou non et la radiothérapie (RT) hyperfractionnée et accélérée, ont permis de régler l'intensité de la RT en fonction du volume de la tumeur (Bernstein *et al.*, 1995; Cardinale *et al.*, 2006; Gobitti *et al.*, 2011; Tsien *et al.*, 2009). Finalement, l'émergence de différents composés cytotoxiques ou antinéoplasiques a permis d'obtenir une diversité thérapeutique importante pour le traitement du GBM. Outre le témozolomide, il existe plusieurs autres molécules qui ont été développées afin de cibler les différentes propriétés du glioblastome. Parmi celles-ci, notons les inhibiteurs de PARP (Iniparib et Veliparib), de MET (XL-184) et de l'EGFR (Gefitinib et Erlotinib) (Liang *et al.*, 2014; Venur *et al.*, 2015; Zhang, Y. *et al.*, 2010).

Par ailleurs, d'autres stratégies intéressantes telles que l'injection d'anticorps monoclonaux, l'immunothérapie innée et l'utilisation de virus oncolytiques, ont été développées pour le traitement du glioblastome (Carlsson *et al.*, 2014). Par exemple, le Bevacizumab (ciblant le VEGF), le Nimotuzumab (ciblant l'EGFR) et l'AMG595 (ciblant l'EGFRvIII) sont des anticorps monoclonaux conjugués ou non qui ont récemment prouvé leur efficacité dans des modèles *in vitro* et *in vivo* et qui sont présentement en essais cliniques (Ferrera *et al.*, 2005; Hamblett *et al.*, 2015; Yang, Q. Y. *et al.*, 2015). Les exemples reliés à l'immunothérapie innée sont plus restreints, car c'est un type de thérapie qui commence à prendre de l'expansion. Néanmoins, il existe quelques agents, comme le DC-Vax L (vaccin utilisant un mélange de cellules dendritiques saines et tumorales) et les vaccins de la série Prophage G-100 et G-200 (vaccin utilisant la protéine de choc thermique gp96), qui stimulent la réponse immunitaire du patient à l'aide de ses propres cellules cancéreuses (Bloch et Parsa. 2014; Crane *et al.*, 2013; Prins *et al.*, 2011; Yu, J. S. *et al.*, 2004). Enfin, les virus

oncolytiques sont devenus une alternative très intéressante afin de cibler uniquement et spécifiquement les cellules cancéreuses qui surexpriment certains récepteurs membranaires comme l'EGFRvIII, le PDGFR et l'IL-13 (Carlsson *et al.*, 2014). En effet, plusieurs virus oncolytiques sont présentement en essais cliniques de phase I pour le traitement du GBM. Parmi ceux-ci, on retrouve l'Herpes Simplex I (HSV-1 M032) et l'adénovirus Delta-24 (DNX-2401) (Fueyo *et al.*, 2000; Roth *et al.*, 2014). De plus, des études récentes ont démontré que ce dernier était plus puissant lorsqu'on y ajoutait un peptide nommé RGD-4C. En effet, celui-ci permet au virus d'accroître son activité oncolytique en augmentant son affinité pour les intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$ (Fueyo *et al.*, 2003). Ce nouveau virus nommé Delta-24-RGD-4C a permis de stabiliser ou de diminuer partiellement ou complètement le glioblastome de 52 % des 24 patients de l'étude clinique (Pol *et al.*, 2013). Ce type de thérapie semble donner de bons résultats puisque 6 patients provenant de cette étude sont toujours en vie suite au traitement, dont 1 qui en est à sa 4^e année de survie post-traitement (Pol *et al.*, 2013).

Malgré les diverses stratégies thérapeutiques mises en place au cours des dernières années, le GBM donne encore du fil à retordre aux oncologues et aux chercheurs, puisque la plupart des traitements proposés sont systémiques et entraînent des effets secondaires importants qui influencent la qualité de vie des patients (Fakhoury. 2015; Lucchiari *et al.*, 2015). Un autre problème majeur dans le traitement du GBM est la barrière hémato-encéphalique (BHE). Celle-ci entrave le passage des médicaments à l'intérieur du cerveau grâce aux mécanismes de résistance régis par les protéines de la famille des *Multi-Drug Resistance proteins* (MDR) et de la P-Glycoprotéine (ABCB1 ou P-gp) (Agarwal *et al.*, 2013). Puisque ces gènes sont surexprimés chez les patients atteints par un GBM, cela entraîne une diminution de la biodistribution des médicaments au niveau du cerveau et diminue considérablement l'efficacité des traitements (Calatozzolo *et al.*, 2012). C'est pourquoi, de nouvelles technologies ont été développées afin de cibler le passage des médicaments à travers cette barrière.

Parmi ces nouvelles approches, on peut justement noter l'émergence des inhibiteurs de transporteurs d'expulsion des médicaments (Tariquidar et Elacridar) et de l'exploitation du transport médié par les récepteurs (GRN1005, ANG4043 et 2B3-101) (Bauer *et al.*, 2012; Drappatz *et al.*, 2013; Gaillard *et al.*, 2014; Sane *et al.*, 2013).

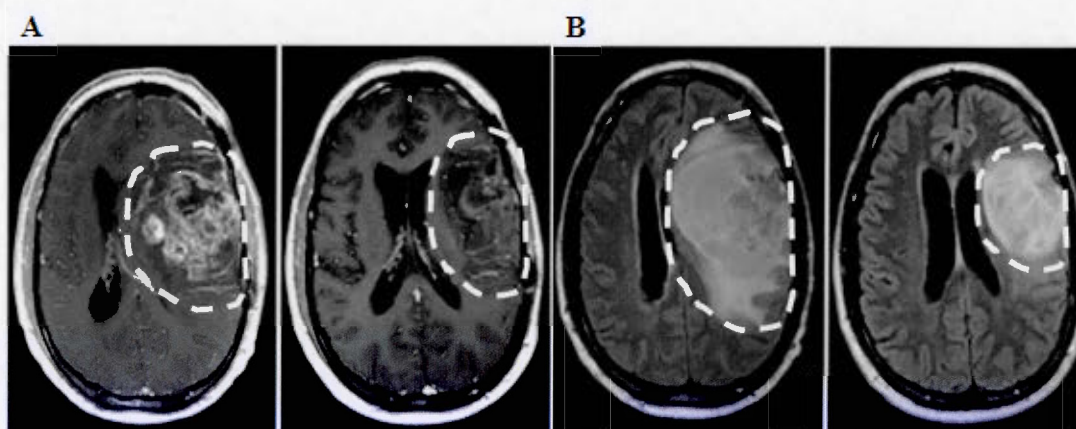


Figure 1.3 Exemple d'un cerveau de patient atteint d'un glioblastome récurrent qui a subi une thérapie combinant le carboplatine et le bevacizumab. Les images prises en A et B ont été obtenues par deux méthodes d'imagerie par résonance magnétique, soit par contraste au Gadolinium en A et par le fluid attenuated inversion recovery (FLAIR) en B. Les images de gauche et de droite représentent, respectivement, le cerveau du patient avant et après le traitement. Fait intéressant, selon les auteurs, la réponse positive du patient face à la thérapie coïncide avec une amélioration importante de quelques-uns de ses symptômes neurologiques (aphasie et hémiparésie). Les pointillés blancs représentent l'emplacement de la tumeur. Adaptée de (Mrugala *et al.*, 2012).

1.3.3 Phénotype de résistance

Malgré le développement phénoménal des médicaments anti-cancer et des méthodes d'administration, les patients atteints d'un glioblastome ne s'en sortent pas et meurent à peu près tous à l'intérieur de 5 ans, qu'ils aient reçu un traitement ou non (Mrugala *et al.*, 2012; Figure 1.3). Cette triste réalité est causée par le fait que les glioblastomes sont en mesure de s'adapter aux traitements en déployant plusieurs stratégies cellulaires et moléculaires leur permettant de survivre et de récidiver pour ainsi mettre fin à la vie des patients (Stupp *et al.*, 2009). C'est ce qu'on appelle « le phénotype de résistance ». Dès qu'ils sont en contact avec un traitement anti-cancer (inhibiteurs, anticorps, agents chimiothérapeutiques, radiation, etc.), les glioblastomes se protègent en utilisant leurs mécanismes de défense. Parmi ceux-ci, notons les mécanismes de réparation de l'ADN (MGMT et le système BER), la surexpression d'EGFR, de Galectin-1 et de Mdm2, les mutations de p53 et de PTEN et l'altération de l'expression de certains microARNs (miARN) et le recrutement des cellules souches cancéreuses (CSC) (Huang, Z. *et al.*, 2010; Messaoudi *et al.*, 2015; Figure 1.4).

La MGMT fait partie des premiers mécanismes de réparation de l'ADN dont se servent les glioblastomes. En effet, lors de la radiothérapie et/ou de la chimiothérapie, les mutations génétiques se produisant dans les cellules cancéreuses sont aussitôt corrigées par la O⁶-méthylguanine DNA méthyltransférase (MGMT), qui est capable de retirer les groupements méthyl, éthyl, isopropyl et butyl qui se retrouvent sur les bases nucléiques (Kaina *et al.*, 2007). Ce mécanisme est à la base même de la résistance à plusieurs agents alkylants utilisés dans le traitement du glioblastome, dont le fameux témozolomide (TMZ) (Park, C. K. *et al.*, 2012). En plus de la MGMT, en cas de dommages à l'ADN causés par les rayons ionisants, les agents oxydants et ces mêmes agents alkylants, les glioblastomes peuvent activer un autre système de

réparation de l'ADN que l'on nomme « réparation d'excision des bases » (BER) (Almeida, K. H. et Sobol. 2007). Celui-ci comprend plusieurs protéines et enzymes, telles que PARP-1, qui en liant l'ADN, permet le recrutement des protéines du complexe BER (XRCC1, ADN polymérase, ligase et flap endonucléase 1) et du même coup la réparation des bases nucléiques excisées (Malanga et Althaus. 2005).

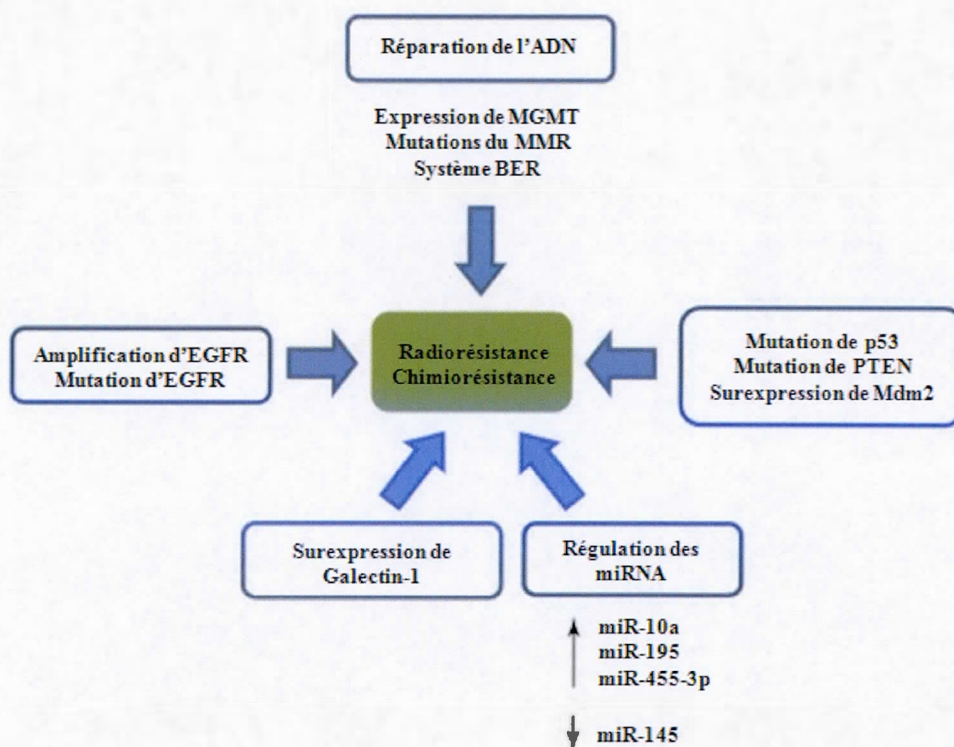


Figure 1.4 Implications de différents acteurs dans la radiorésistance et la chimiorésistance des cellules cancéreuses cérébrales (gliomes). (EGFR, Récepteur du facteur de croissance épidermal; MGMT, O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase; MMR, mismatch repair; PTEN, Phosphatase and TENsin homolog; MDM2, E3 ubiquitin-protein ligase; miRNA, MicroARN). Adaptée de (Messaoudi *et al.*, 2015).

Dans un autre ordre d'idées, la surexpression d'EGFR, de Galectin-1 et de MDM2 et la délétion de p53 et de PTEN permettent aussi aux glioblastomes d'acquérir un phénotype de résistance hautement performant. En effet, la hausse d'EGFR induit l'activation de voies de signalisation importantes pour la prolifération, la migration et l'angiogenèse, telles que RAS/RAF/MAPK et PI3K/AKT/mTOR (Guha *et al.*, 1997; Huang, P. H. *et al.*, 2009; Narita *et al.*, 2002). Même si plusieurs inhibiteurs ont été développés au cours des dernières années (Cetuximab, Erlotinib et Gefitinib), ceux-ci ont été testés en phase clinique I/II et les résultats obtenus ont été très décevants (Neyns *et al.*, 2009; Prados *et al.*, 2009). La Galectin-1, quant à elle, participe à l'activation de multiples processus cellulaires et moléculaires qui mène au phénotype de résistance des glioblastomes (Le Mercier *et al.*, 2010). Elle permet d'enclencher la migration (en interagissant avec les intégrines), la formation de métastases, l'angiogenèse (en activant ORP150, qui contrôle l'activation et la sécrétion du VEGF) (Camby *et al.*, 2005; Rabinovich *et al.*, 2002). De plus, la Galectin-1 contrôle la translocation de la protéine p53 dans le noyau, inhibe les cellules T effectrices (en promouvant l'apoptose) et interagit avec la protéine Ras (Le Mercier *et al.*, 2008; Paz *et al.*, 2001; Rubinstein *et al.*, 2004). Ensuite, comme la protéine MDM2 est fortement exprimée dans les glioblastomes et qu'elle possède une action inhibitrice sur p53, elle permet donc une croissance tumorale accrue ainsi qu'une résistance à la radio- et à la chimiothérapie (Burton, E. C. *et al.*, 2002; Shangary et Wang. 2009; Shchors *et al.*, 2013; Wang, A. L. *et al.*, 2011). Finalement, la mutation de *PTEN* dans les glioblastomes cause une augmentation de la prolifération tumorale, ce qui contribue aussi au phénotype de résistance (Kato *et al.*, 2000; Knobbe *et al.*, 2002). En fait, il existe une régulation très étroite entre *PTEN* et p53 qui n'a plus lieu, car les deux protéines sont mutées. En effet, plusieurs études ont démontré que la restauration de *PTEN* ou de p53 permettrait de sensibiliser les cellules tumorales aux traitements actuels, ce qui en augmenterait leur efficacité (Freeman *et al.*, 2003; Mayo *et al.*, 2002; Stambolic *et al.*, 2001).

L'altération de l'expression des microARNs (miARNs) est une autre composante importante dans le phénotype de résistance des glioblastomes. En effet, certains miARNs sont reconnus pour être des oncogènes, tandis que d'autres sont plutôt des gènes suppresseurs de tumeurs (Babashah et Soleimani. 2011). Plus spécifiquement, il a été découvert que la surexpression des miARNs suivants : miR-21, miR-195, miR-455-3p et miR-10a permettaient aux glioblastomes de résister à la chimiothérapie par le TMZ (Mizoguchi *et al.*, 2013; Shi *et al.*, 2010; Ujifuku *et al.*, 2010). À l'inverse, cette même résistance a lieu dans les glioblastomes lorsque le miR-145 est inhibé (Yang, Y. P. *et al.*, 2012). De plus, les miARNs sont aussi capables d'inférer aux glioblastomes la capacité de résister à la radiothérapie. En effet, des études ont démontré que les miR-1285, 151-5b et 24-1 sont induits suite à l'irradiation et qu'ils contribuent à la croissance tumorale et à la survie des glioblastomes en diminuant la synthèse de p53 et l'apoptose et en promouvant la migration cellulaire et la formation de métastases (Ding *et al.*, 2010; Niemoeller *et al.*, 2011; Tian *et al.*, 2010). Par contre, les miARNs tels que miR-7, miR-181a et miR-100 participent à l'induction de la mort cellulaire des glioblastomes en désactivant la protéine kinase dépendante de l'ADN (DNA-PK) et la protéine kinase ataxia-telangiectasia mutée (ATM), deux protéines responsables de la réparation des cassures des ADN doubles brins et en diminuant la synthèse de la protéine antiapoptotique Bcl-2 (Chen, G. *et al.*, 2010; Kefas *et al.*, 2008; Lee, S. T. *et al.*, 2011; Ng, W. L. *et al.*, 2010).

Par ailleurs, des études ont démontré qu'il existe aussi des cellules pluripotentes au sein des tumeurs cérébrales (Singh, S. K. *et al.*, 2004). Ces cellules, que l'on appelle « cellules souches cancéreuses » (CSC), ont la capacité de proliférer, de se différencier et de s'auto-renouveler sous les conditions extrêmes qu'offre le microenvironnement tumoral (Huang, Z. *et al.*, 2010). En fait, comme les CSC possèdent de hauts niveaux d'expression du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et du facteur dérivé du stroma-1 (SDF-1), elles ne sont pas

considérées comme des cellules souches normales puisqu'elles contribuent à la croissance et à l'angiogénèse tumorale (Folkins *et al.*, 2009). De plus, il a été démontré, autant *in vitro* qu'*in vivo*, que les propriétés tumorigéniques des CSC leur permettent même d'être plus résistantes que les glioblastomes envers la radiothérapie (Bao *et al.*, 2006). En fait, ces propriétés ont été associées à des marqueurs, tels que CD15, EGFR, A2B5, L1CAM (CD171), CD44, Intégrine $\alpha 6$, CXCR4 et CD133, qui permettent d'identifier les CSC provenant du glioblastome (Anido *et al.*, 2010; Bao *et al.*, 2008; Brescia *et al.*, 2013; Jin, F. *et al.*, 2011; Jin, G. *et al.*, 2011; Lathia *et al.*, 2010; Ogden *et al.*, 2008; Ping *et al.*, 2011; Son *et al.*, 2009). Récemment, Tamura et collègues ont démontré que les CSC positives pour le marqueur Prominin-1 (CD133) sont non seulement capables d'initier la prolifération tumorale, mais elles sont aussi induites lors des traitements de radiothérapie et de chimiothérapie, ce qui peut entraîner une récurrence tumorale provoquant ainsi un glioblastome *de novo* (Tamura *et al.*, 2013). La résistance des CSC vient aussi du fait qu'elles sont dotées de mécanismes de réparation de l'ADN plus performants, dont une recombinaison homologue plus efficace et une activation accrue de la réponse aux dommages à l'ADN (Bao *et al.*, 2006; Cheng, L. *et al.*, 2011; Lim *et al.*, 2012). Au niveau moléculaire, les CSC peuvent augmenter leur résistance grâce à l'activation de protéines qui sont fortement exprimées dans la plupart des cancers, telles que la kinase N-terminale c-Jun (JNK), la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) et la protéine kinase C δ (PKC δ). Enfin, la voie de signalisation Notch est aussi régulée à la hausse et permet aux CSC de renforcer leurs processus de survie cellulaire (Fassl *et al.*, 2012; Wang, J. *et al.*, 2010; Yoon, C. H. *et al.*, 2012).

En plus de ces mécanismes de résistance, les glioblastomes multiformes se sont dotés d'une capacité à déréguler un processus extrêmement important au niveau du métabolisme cellulaire et de la balance survie/mort cellulaire qui leur permettent de résister face aux différents traitements conventionnels. Ce processus se nomme l'autophagie.

CHAPITRE II

L' AUTOPHAGIE

2.1 Généralités

L'autophagie a été découverte au début des années 60 grâce, notamment, aux travaux de recherche de M. Christian de Duve, prix nobel pour la découverte des lysosomes et des peroxysomes. En effet, les diverses études portant sur l'organisation et la dynamique des lysosomes, menées par les professeurs De Duve, Porter et Hruban, ont permis de découvrir qu'il existe un mécanisme physiologique permettant aux cellules de digérer et de métaboliser leur contenu intracellulaire (Swift et Hruban. 1964). C'est en 1963 que le terme « Autophagie » a été utilisé pour la première fois. Ensuite, comme la technologie de l'époque était à un stade assez primitif, les recherches sur l'autophagie ont été mises sur la glace pendant plus de 25 ans. Au début des années 90, l'intérêt envers cet important processus cellulaire a refait surface grâce à la découverte des gènes responsables de la formation et de la régulation de l'autophagosome chez la levure (Klionsky et Codogno. 2013). Depuis ce jour, l'autophagie est un des sujets les plus étudiés à travers le monde. En fait, plus de 19 500 articles scientifiques ont été publiés et ce, dans différents domaines, tels que les maladies neurodégénératives, les maladies cardio-vasculaires, les maladies liées aux désordres métaboliques et le cancer.

L'origine du mot autophagie provient des mots grecs *auto* « soi-même » et *phagein* « manger ». Cette étymologie donne, au mot autophagie, une connotation assez

macabre, mais d'une incroyable justesse. En effet, l'autophagie se définit comme étant un processus catabolique permettant aux cellules de recycler leurs constituants cellulaires, tels que les organelles et les protéines cytoplasmiques à l'aide de la voie de dégradation lysosomale (Dong *et al.*, 2010). Elle peut être sélective ou non-sélective (NSA), c'est-à-dire qu'elle peut être dirigée contre un organite en particulier comme la mitochondrie (mitophagie) ou le peroxysome (pexophagie) ou contre n'importe quelle composante du cytoplasme cellulaire (Hou *et al.*, 2013). De plus, l'autophagie peut être déclenchée par divers stress intra- et extracellulaires et est au cœur de l'activation d'une multitude de processus physiologiques et/ou pathologiques permettant aux cellules d'avoir une gestion énergétique accrue ainsi qu'une meilleure régulation de la balance survie/mort cellulaire (King, 2012; Figure 2.1).

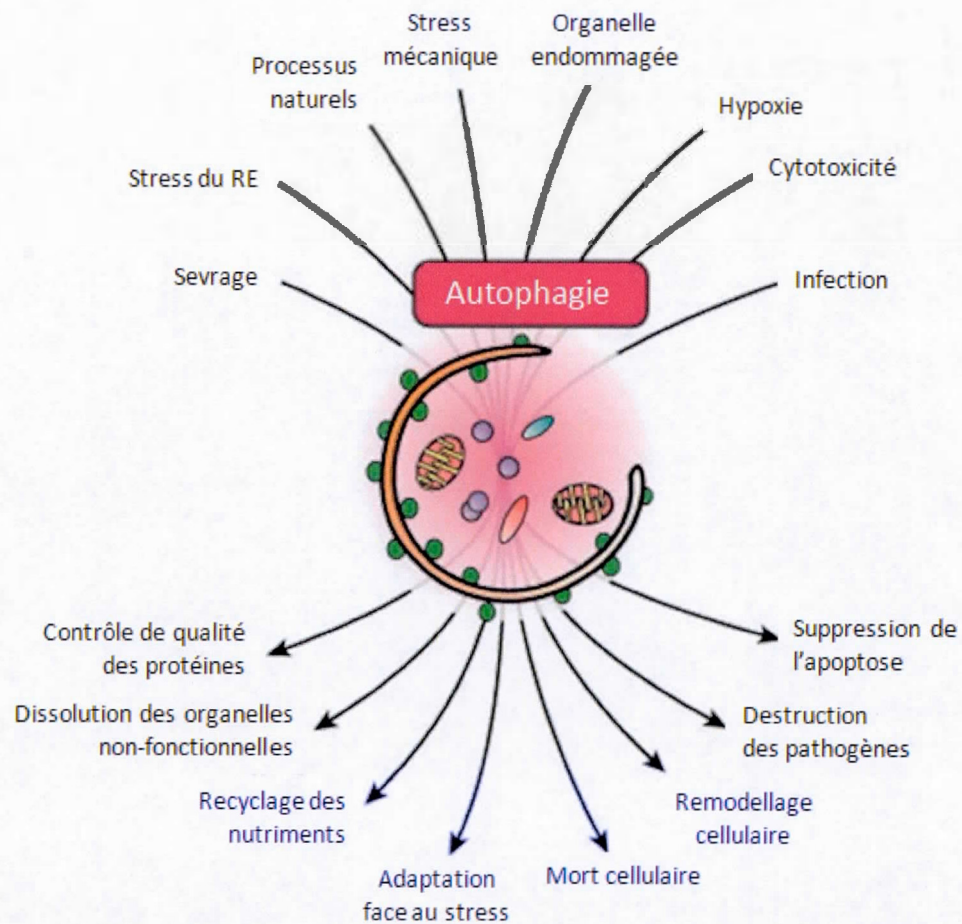


Figure 2.1 Les causes et les conséquences de l'induction de l'autophagie. (RE, Réticulum endoplasmique). Adaptée de (King. 2012).

2.2 Mécanismes de l'autophagie

En plus de participer au maintien de l'homéostasie cellulaire (Figure 2.1), l'autophagie peut aussi avoir lieu de différentes manières en fonction du niveau énergétique métabolique des cellules ainsi que de la taille et de la quantité d'éléments à dégrader. Il existe donc plusieurs types d'autophagie, tels que la macroautophagie,

la microautophagie et l'autophagie médiée par les protéines chaperones (CMA) (Boya *et al.*, 2013).

2.2.1 Macroautophagie

La macroautophagie est le type d'autophagie le plus étudié et le plus caractérisé chez les cellules eucaryotes. Ce type d'autophagie sert surtout à dégrader et à recycler les composantes cellulaires cytoplasmiques de forte taille, telles que le réticulum endoplasmique rugueux (RER), l'appareil de Golgi, la mitochondrie ainsi que les différentes macromolécules (sucres, lipides et protéines) présentes dans le cytoplasme des cellules. Cette dégradation permet ensuite aux cellules de pouvoir réutiliser les acides aminés afin de maintenir une synthèse protéique accrue, ce qui leur donne la possibilité de survivre dans des conditions de sevrage ou de carence nutritionnelle (Klionsky *et al.*, 2011). Comme le démontre la figure 2.2, la macroautophagie consiste en l'engloutissement des constituants cellulaires à l'intérieur d'une vésicule autophagique, appelée autophagosome, qui se fusionne à un lysosome, ce qui permet la digestion de ces constituants par les hydrolases acides présentes dans les lysosomes (Klionsky. 2005). Au niveau moléculaire, la macroautophagie fait intervenir plus d'une quarantaine de protéines qui sont séparées en cinq complexes protéiques : le complexe de la protéine ULK1 (kinase Unc-51-like), le complexe PI3K de classe III, le complexe WIPI-1/ATG9, le complexe de conjugaison d'ATG12 et le complexe de conjugaison de LC3. Ces complexes s'enclenchent en cascade et doivent tous être présents pour que la macroautophagie ait lieu et soit fonctionnelle (Tanida. 2011).

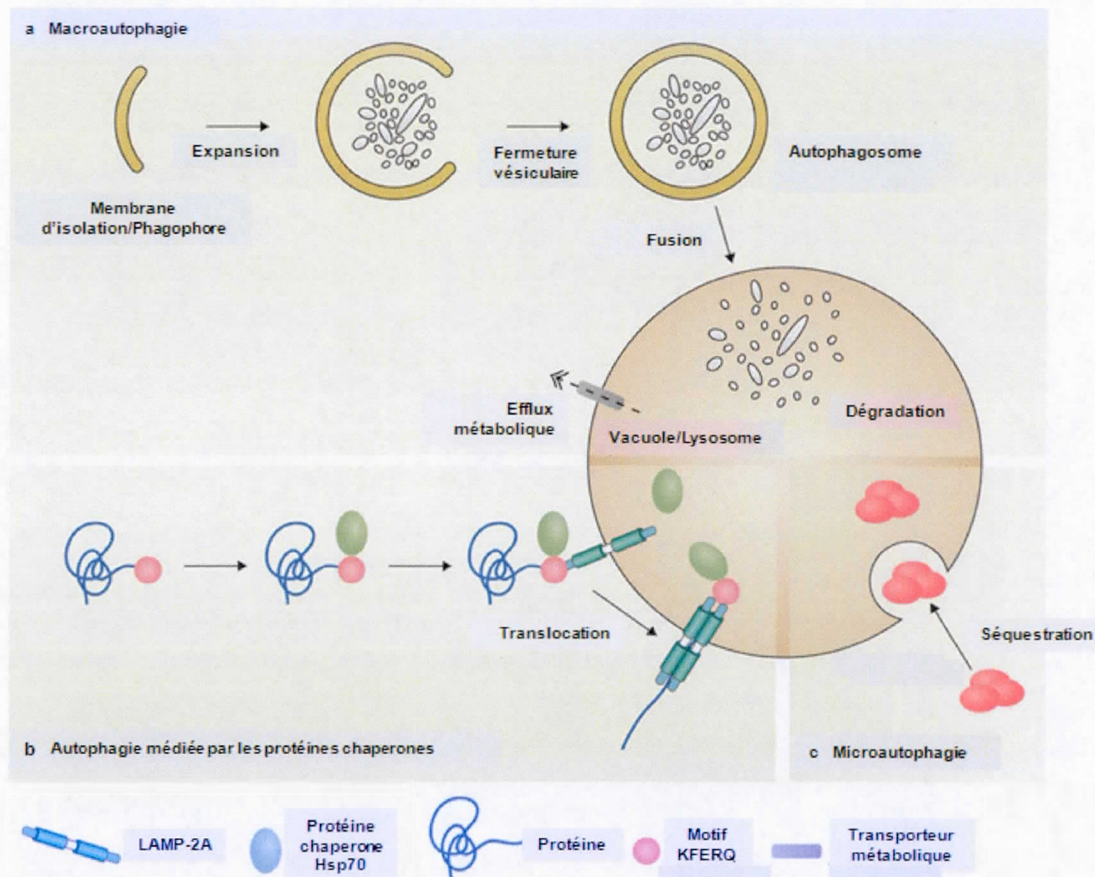


Figure 2.2 Schématisation des trois types d'autophagie non sélective (NSA). A) La macroautophagie représente le type d'autophagie le plus fréquent chez les mammifères. Elle fait intervenir une vésicule membranaire, appelée l'autophagosome, qui transporte les constituants cellulaires jusqu'au lysosome où se produit leur dégradation. (sous-section 2.2.1) B) L'autophagie médiée par les protéines chaperones est le type d'autophagie qui utilise les protéines de choc thermique (Hsp70) et les récepteurs LAMP-2A pour effectuer la translocation des constituants cellulaires du cytoplasme jusqu'au lysosome où se produit leur dégradation. (sous-section 2.2.3) C) La microautophagie est le type d'autophagie qui entraîne la dégradation des constituants cellulaires grâce à leur séquestration à l'intérieur d'une invagination produite dans le lysosome. (sous-section 2.2.2) Adaptée de (Boya *et al.*, 2013).

L'induction de l'autophagie débute par une désactivation des kinases mTOR (complexe mTORC1) et PI3K (classe I) qui entraîne une déphosphorylation d'ATG13. (Hosokawa *et al.*, 2009) Celui-ci se lie ensuite au complexe formé de ULK1, FIP200, ATG13 et ATG101 (Mizushima *et al.*, 2011). Ceci mène à l'activation du second complexe. Ce dernier, composé de PIK3C3, BECN1, PIK3R4, AMBRA1 et d'ATG14, est à la base de la formation de la vésicule autophagique. En fait, le complexe PI3K de classe III est le plus important, car il permet le recrutement des autres complexes afin de compléter la formation de la vésicule qui sera alors appelée, l'autophagosome (Hayashi-Nishino *et al.*, 2009). Le premier complexe recruté est celui de la protéine membranaire ATG9. Avec l'aide des protéines WIPI1/2, ATG2 et de VMP1, ATG9 va donc permettre la liaison de tous les complexes au futur autophagosome (Polson *et al.*, 2010). Les deux derniers complexes sont formés par les protéines ubiquitin-like, ATG12 et LC3, ainsi que les protéines impliquées dans leurs modifications post-traductionnelles (Geng et Klionsky. 2008). La protéine LC3 subit d'abord un clivage protéolytique par la protéase ATG4. Par la suite, elle est activée grâce à ATG7 (enzyme E1-like) et conjuguée au phosphatidyléthanolamine (PE) par ATG3 (enzyme E2-like) (Kirisako *et al.*, 2000). Quant à ATG12, elle est aussi activée via ATG7 et conjuguée à ATG5 par ATG10 (enzyme E2-like). Le mini-complexe ATG12-ATG5 va se lier de façon non covalente avec ATG16L1 pour ensuite se dimériser et s'unir au complexe LC3-PE pour former l'autophagosome (Fujita *et al.*, 2008; Hanada *et al.*, 2007). Finalement, lorsque l'autophagosome se fusionne au lysosome, toute la machinerie se désassemble et les complexes se dissocient les uns des autres afin de prévenir la fusion accidentelle entre un lysosome et un autophagosome incomplet (Ichimura et Komatsu. 2010).

2.2.2 Microautophagie

Contrairement à la macroautophagie, la microautophagie a été davantage caractérisée dans les cellules eucaryotes inférieures, telles que les levures. Elle se distingue des autres types d'autophagie par le fait qu'elle ne se sert d'aucune construction vacuolaire (autophagosome) pour parvenir à la dégradation du matériel cellulaire. Au niveau mécanistique, la microautophagie ressemble étrangement au phénomène d'endocytose. (Figure 2.2) Elle débute par la création d'une importante invagination au sein de la membrane d'un lysosome/endosome tardif ou d'un corps multivésiculaire (MVB), qu'on appelle particulièrement le « tube autophagique », pour ensuite permettre l'internalisation du contenu intracellulaire à dégrader dans la lumière du lysosome/endosome tardif et finalement procéder à sa digestion (Kunz *et al.*, 2004; Muller *et al.*, 2000). Bien que les mécanismes cellulaires soient bien caractérisés, les mécanismes moléculaires impliqués dans la microautophagie sont très peu connus. En fait, tant chez les mammifères que chez la levure, il existe une panoplie d'informations concernant la possible implication de certaines protéines et/ou complexes protéiques dans la régulation de la microautophagie sélective ou non.

Parmi les acteurs clés dans l'induction et la régulation de la microautophagie non-sélective chez la levure (*Saccharomyces Cerevisiae*), notons les GTPases relatives à la dynamine, telles Vps1p, les complexes signalétiques TOR (target of rapamycin) et EGO (rapamycin-induced growth arrest) et les complexes VTC (chaperons transporteurs de vacuole) (Dubouloz *et al.*, 2005; Uttenweiler *et al.*, 2005; Uttenweiler *et al.*, 2007). En ce qui concerne la microautophagie sélective, la grande quantité d'information jumelée au fait que les protéines impliquées soient différentes en fonction de l'organelle qui est dégradée rendent plus difficile la compréhension des mécanismes moléculaires. Par exemple, Mdm38 et Atg32 sont à la base de la régulation de la micromitophagie (microautophagie de la mitochondrie) (Kanki *et al.*,

2009; Nowikovsky *et al.*, 2007). Par contre, la régulation de la PMN (autophagie fragmentaire du noyau), communément appelée la micronucléophagie, se fait principalement par Vac8 et Nvj1, deux protéines interagissantes qui agissent de concert en créant des jonctions nucléo-vacuolaires (NV) (Roberts *et al.*, 2003).

Chez les mammifères, les informations concernant les protéines impliquées dans l'induction et la régulation de la microautophagie arrivent au compte-gouttes. Puisque très peu d'études ont été publiées sur le sujet, certaines informations proviennent d'hypothèses qui ont été confirmées ou infirmées depuis (Mijaljica *et al.*, 2011). Le meilleur exemple est que la microautophagie pourrait avoir lieu dans les endosomes tardifs plutôt que dans les lysosomes. En effet, Santambrogio et Cuervo émettaient l'hypothèse que la dégradation des protéines cytoplasmiques se faisait dans les endosomes tardifs, car elles ont été incapables de reproduire la même dégradation dans des lysosomes isolés. Plus tard, avec l'aide de collaborateurs, ils ont été en mesure d'identifier un processus "microautophagy-like" qui s'effectuait dans les endosomes tardifs (Kawamura *et al.*, 2012; Sahu *et al.*, 2011). Après coup, plusieurs études ont confirmé ce processus et ont commencé à en caractériser les mécanismes moléculaires. Maintenant appelée la e-MI (microautophagie endosomale) ou la LE-MI (microautophagie endosomale tardive), celle-ci possède les mêmes propriétés caractéristiques de la microautophagie traditionnelle, mais elle s'effectue dans les endosomes tardifs. Son processus est différent de la microautophagie classique, car elle endocytose les protéines cytoplasmiques et les organelles qui ont un motif KFERQ dans leurs structures primaires protéiques avec l'aide de protéines chaperones (Kaushik et Cuervo. 2008). Toutefois, elle se distingue de la CMA par le fait qu'elle n'utilise aucun récepteur, comme cette dernière le fait avec LAMP-2A. Par ailleurs, dans les 5 dernières années, plusieurs acteurs clés de la e-MI ont été mis en évidence. De ceux-ci, notons la protéine GTPase, Rab7, et les complexes protéiques ESCRT-I et ESCRT-III de la famille des complexes ESCRT (endosomal

sorting complexes required for transport) (Kawamura *et al.*, 2012; Shpilka et Elazar, 2011).

2.2.3 Autophagie médiée par les protéines chaperones

L'autophagie médiée par les protéines chaperones (CMA) est le dernier type d'autophagie connu au niveau des cellules de mammifères. Elle est très sélective dans le sens où elle reconnaît seulement un certain nombre de macromolécules. Un peu comme le fait la e-MI, ce type d'autophagie permet la dégradation des protéines et/ou peptides contenant un motif KFERQ ou KFERQ-like. Néanmoins, à l'instar de la e-MI, la CMA utilise des protéines médiatrices (chaperons) qui vont transporter ces molécules jusqu'au lysosome et ainsi permettre leur digestion par le biais d'un mécanisme bien spécifique. (Figure 2.2) En effet, ce processus commence par une interaction entre la protéine chaperone hsc70, une protéine de la famille des protéines de choc thermique hsp90, et la séquence peptidique cible de la protéine à dégrader (Terlecky *et al.*, 1992). Cette reconnaissance est un processus dépendant de l'ATP et se fait grâce à la participation de protéines co-chaperones qui assurent le maintien de la structure du complexe hsc70/protéine à dégrader et permettent la liaison au récepteur lysosomal LAMP-2A. À ce jour, les co-chaperones connues sont au nombre de cinq, mais il existe plusieurs isoformes de chacun, ce qui permet une régulation optimale de la CMA. Les premiers, hsp40 et hsp90, sont deux membres de la famille des protéines de choc thermique et sont responsables de l'activité de HSC70 et du bon déroulement de la protéine (Agarraberes et Dice, 2001). La protéine interagissante avec HSC70 (HIP), la protéine organisatrice HSC70-HSP90 (HOP) et la protéine athanogène 1 associée à BCL-2 (BAG-1), sont les trois autres co-chaperons qui s'occupent de la régulation de la formation et de la dissociation du complexe chaperons/protéine en stimulant l'interaction entre la protéine contenant la séquence KFERQ (ou KFERQ-like), HSC70 et HSC90, et arrêtant le cycle

ATPasique de HSC70 permettant à la protéine de pénétrer à l'intérieur du lysosome (Alberti *et al.*, 2003; Salvador *et al.*, 2000).

Finalement, la translocation de la protéine dans le lysosome s'effectue à l'aide du récepteur LAMP-2A. Celui-ci est formé de sous-unités, nommées lys-HSC70 (HSC70 lysosomale) et lys-hsp90 (hsp90 lysosomale), qui s'assemblent en un complexe protéique de 700 kDa (Bandyopadhyay *et al.*, 2008). La liaison de la protéine avec le récepteur induit cette multimérisation et permet la translocation de celle-ci qui est ensuite dégradée via les hydrolases lysosomales (Bandyopadhyay *et al.*, 2008).

2.3 Fonctions de l'autophagie

2.3.1 Fonctions physiologiques

Comme il a été mentionné plus tôt, une fine régulation de l'autophagie est essentielle afin de maintenir une bonne homéostasie cellulaire et tissulaire (Kroemer *et al.*, 2010). En effet, plusieurs processus physiologiques nécessitent l'intervention de l'autophagie pour subvenir aux besoins énergétiques des tissus. Entre autres, l'autophagie joue un rôle important pendant la grossesse, car elle permet de réguler le niveau de nutriments disponibles pour le fœtus lorsque le placenta de la mère cesse son apport (Kuma *et al.*, 2004). L'autophagie est aussi essentielle durant le développement et la différenciation, car elle permet, durant la période pré-implantation, de dégrader les composantes du cytoplasme de l'oocyte, d'éliminer les ARN messagers de la mère et la mitochondrie paternelle (Al Rawi *et al.*, 2011; Sato et Sato. 2011; Tsukamoto *et al.*, 2008). De surcroît, l'autophagie est aussi nécessaire à la différenciation des érythrocytes, lymphocytes et adipocytes (Ravikumar *et al.*,

2010). Elle permet également d'éliminer les corps apoptotiques pendant le développement embryonnaire (Qu *et al.*, 2007). Par ailleurs, l'autophagie est aussi utilisée pour contrôler l'homéostasie des cellules immunitaires et ainsi contribuer à la régulation de l'auto-tolérance (Nedjic *et al.*, 2009). Finalement, de récentes études ont démontré que l'autophagie aurait aussi un rôle potentiel dans le vieillissement et permettrait donc une plus grande longévité en limitant l'accumulation de protéines mal-repliées et en réduisant les dommages causés à la mitochondrie (Rubinsztein *et al.*, 2011).

2.3.2 Fonctions pathologiques

Évidemment, comme l'autophagie permet le recyclage de toutes les aberrations cellulaires (protéines agrégées ou mal-repliées, organelles endommagées, etc.), il est facile de croire que sa dérégulation entraîne des conséquences dramatiques voire catastrophiques (Kim, K. H. et Lee. 2014). En effet, la dérégulation de l'autophagie est au cœur d'une multitude de maladies neurodégénératives, telles que la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer, la maladie d'Huntington, mais aussi dans des maladies de désordre métabolique comme la fibrose du foie, l'obésité, le diabète de type 2, la résistance à l'insuline (Hidvegi *et al.*, 2010; Yang, S. *et al.*, 2012; Figure 2.3). Au niveau du cœur, une régulation déficiente des processus autophagiques cause des problèmes graves tels que l'hypertension, l'insuffisance cardiaque, l'hypertrophie cardiaque et des lésions liées à la reperfusion ischémique (Nakai *et al.*, 2007). De plus, comme l'autophagie participe à l'élimination des pathogènes intracellulaires (bactéries, virus, parasites, etc.), sa dérégulation entraîne une baisse de l'immunité innée de même qu'une prédisposition à être atteint par la maladie de Crohn (Virgin et Levine. 2009). Enfin, la dérégulation de l'autophagie est aussi associée au cancer. Toutefois, son implication a été caractérisée comme une lame à double tranchant, car elle induit à la fois des mécanismes pro-tumoraux (oncogènes) et anti-tumoraux

(gènes suppresseurs de tumeurs) dépendamment du stade de progression du cancer et dans quel contexte il survient (White et DiPaola. 2009).

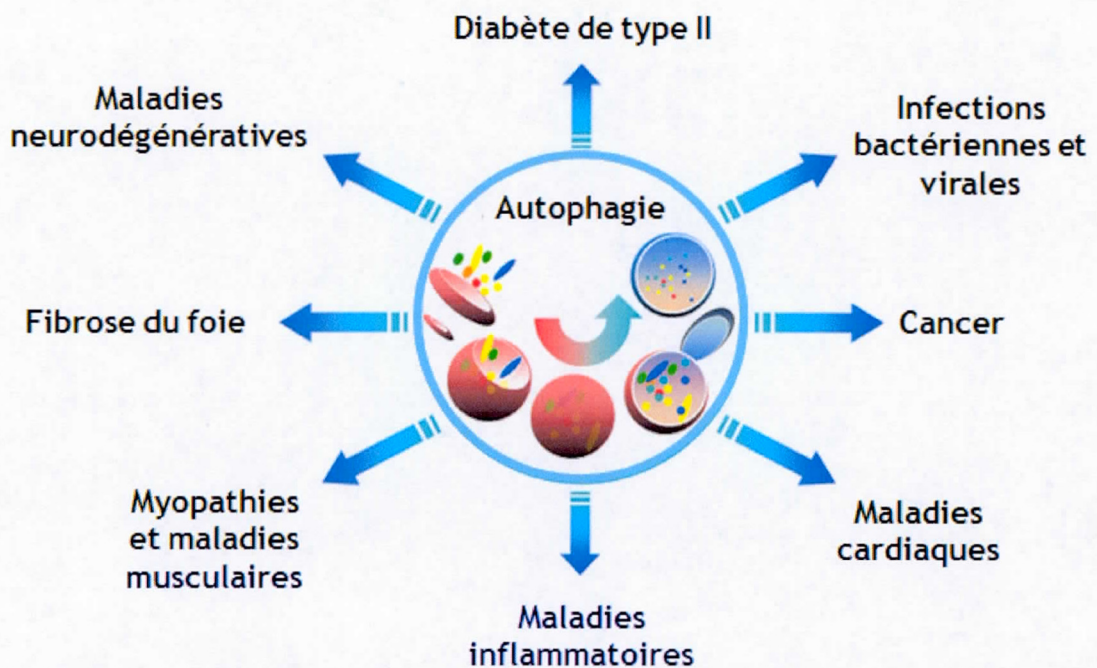


Figure 2.3 L'implication de l'autophagie dans différentes pathologies. Lorsque les voies de signalisation ou les protéines qui régulent l'autophagie sont défectueuses, mutées ou absentes, cela peut entraîner un arrêt du recyclage des composantes intracellulaires non-fonctionnelles, une accumulation de protéines mal-repliées et d'importants désordres métaboliques. À l'opposé, la fine régulation de l'autophagie peut aussi contribuer à certaines pathologies en dégradant les constituants cellulaires, voire même la cellule au complet, si elle est trop affectée pour survivre. Adaptée de (Homma *et al.*, 2011).

2.4 Autophagie et cancer

L'évolution des thérapies anti-cancer, combinée à l'essor des connaissances reliées au phénotype de résistance, ont permis de découvrir que les cellules cancéreuses, et en particulier les glioblastomes, sont capables de s'adapter à un environnement métabolique stressant en employant plusieurs moyens de défense hautement efficaces, dont l'autophagie (Goldsmith *et al.*, 2014). En fait, les différentes évidences scientifiques démontrent que l'autophagie aurait un double rôle au niveau du cancer (promotion de la tumeur et suppression de la tumeur) et dépendrait du type de cancer, du contexte et de stade de progression (Thorburn *et al.*, 2014; Figure 2.4). D'ailleurs, plusieurs molécules utilisées dans les essais cliniques (Everolimus, Rapamycine, Erlotinib, Chloroquine (CQ) et Hydroxychloroquine (HCQ) et dans les thérapies anti-cancer actuelles (Bevacizumab (Avastin) et Témazolomide (TMZ) sont reconnues comme étant d'excellents inducteurs et inhibiteurs de l'autophagie (Avalos *et al.*, 2014; Fung *et al.*, 2012; Hu, Y. L. *et al.*, 2012; Natsumeda *et al.*, 2011; Thomson *et al.*, 2009; Townsend *et al.*, 2012). Néanmoins, les réponses très variables et les cas de résistance face à ces traitements démontrent bien que les connaissances actuelles sur la régulation de l'autophagie ne sont pas complètement à jour.

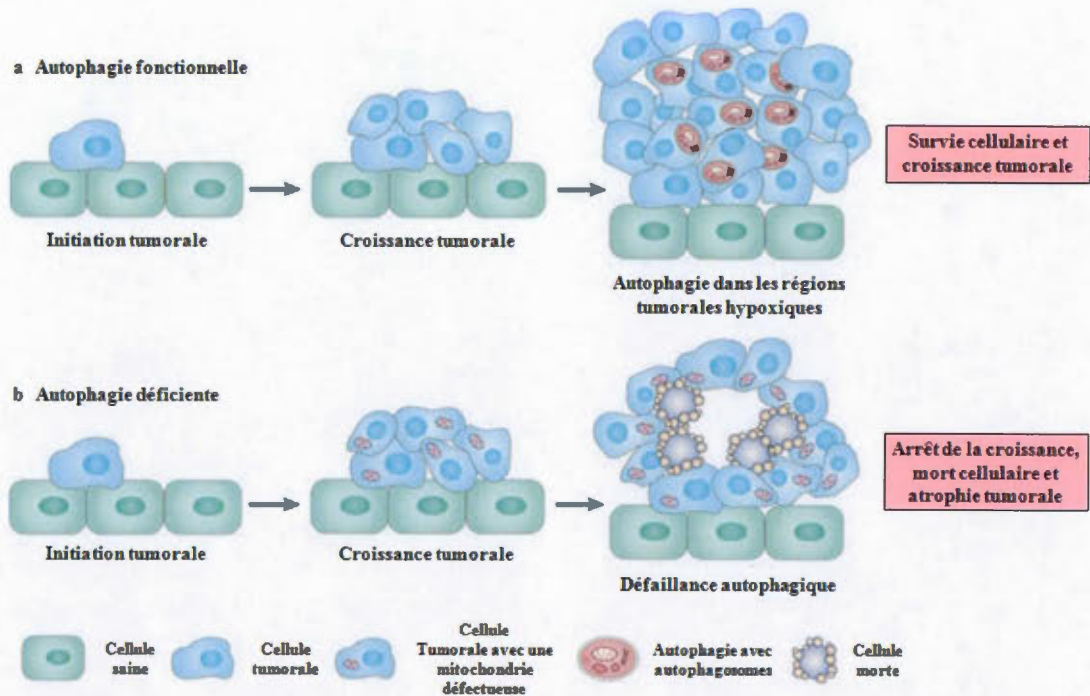


Figure 2.4 L'induction de l'autophagie dans le cancer : Une lame à double-tranchant. A) Dans les cellules cancéreuses où l'autophagie est fonctionnelle, l'induction de l'autophagie par l'hypoxie permet une croissance tumorale soutenue. B) Dans les cellules cancéreuses où l'autophagie est déficiente, l'induction de l'autophagie par l'hypoxie entraîne une accumulation de mitochondries endommagées, ce qui mène à un arrêt de la croissance tumorale et à une atrophie de la tumeur due à une augmentation de la mort cellulaire. Adaptée de (White. 2012).

2.4.1 Induction et régulation de l'autophagie dans le cancer

Bien que le rôle de l'autophagie dans le cancer est un sujet d'actualité, elle est encore très loin d'être couverte en raison du nombre important de protéines et de voies de signalisation qui la régulent. De plus, il existe aussi d'autres facteurs, tels que les rôles pro- et anti-autophagiques méconnus de certaines protéines appartenant à d'autres processus cellulaires tels que la caspase-8, la caspase-3, la B-cell CLL/Lymphoma 2 (BCL-2), la BCL-2/Adenovirus E1B 19 kDa interacting protein 3 (BNIP3) (et les autres protéines de type BH3-only), la protéine kinase-1 associée à la mort (DAPK1) et la protéine inhibitrice de l'apoptose liée au chromosome X, qui influencent sa régulation et qui font en sorte qu'il est difficile de statuer sur les bénéfices et les inconvénients de celle-ci (Betin et Lane. 2009; Galluzzi *et al.*, 2015; Wirawan *et al.*, 2010). De plus, diverses études ont inféré que l'autophagie serait à la fois un mécanisme protecteur (permettant la survie cellulaire) et un mécanisme de mort cellulaire (mort cellulaire programmée de type II) (Chen, N. et Karantza. 2011; Debnath *et al.*, 2005; Levy et Thorburn. 2011). Finalement, pour ajouter un autre niveau de complexité, certains régulateurs de l'autophagie, tels que le transducteur du signal et activateur de la transcription 3 (STAT3), le facteur inductible par l'hypoxie 1 α (HIF-1 α), le récepteur à l'estrogène β (ER β) et le facteur de transcription GATA4 peuvent être associés à la fois à la tumorigenèse et à la suppression de la tumeur (Guido *et al.*, 2012; Kobayashi *et al.*, 2010; Kroemer *et al.*, 2010; Pietrocola *et al.*, 2013; Yang, Z. *et al.*, 2014). Dans les cellules cancéreuses, la régulation de l'autophagie s'effectue via une panoplie d'acteurs moléculaires (protéines et voies de signalisation) qui, grâce à leur activation ou leur inhibition, permettent le déclenchement d'une cascade d'évènements signalétiques menant à la survie ou à la mort par autophagie (Nagelkerke *et al.*, 2015).

Une des voies de signalisation les plus importantes pour le contrôle de l'induction de l'autophagie est sans contredit la voie PI3K/AKT/mTOR. En phosphorylant le phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate (PIP2) en phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate (PIP3), PI3K induit l'activation de la kinase dépendante du phosphoinositide 1 (PDK1) qui, à son tour, phosphoryle la protéine kinase B (AKT). Cette dernière va ensuite activer le complexe mTORC1 en phosphorylant PRAS40 (proline-rich Akt/PKB substrate 40 kDa) (Sini *et al.*, 2010). Fait intéressant, AKT peut aussi réprimer l'autophagie de deux façons : soit en phosphorylant le facteur de transcription Forkhead box 3 (FOXO3) entraînant une diminution de l'expression des gènes ATG, soit en inhibant la dimérisation des « Tuberos sclerosis proteins » 1 et 2 (TSC1/2), ce qui permet l'activation de Rheb (Ras homolog enriched in brain) et du complexe mTORC1 (Brunet *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2009). Par ailleurs, il existe une autre kinase qui se retrouve en amont du complexe mTORC1 et qui compétitionne avec AKT. Il s'agit de la protéine kinase activée par l'adénosine monophosphate (AMP) (AMPK). Celle-ci active l'autophagie en phosphorylant Raptor, ce qui désactive le complexe mTORC1 (Gwinn *et al.*, 2008). Elle induit aussi l'autophagie en phosphorylant directement ULK1 (Kim, J. *et al.*, 2011). Elle exerce même un contrôle positif sur TSC1/2 pour permettre l'inactivation de Rheb et induire l'autophagie par la répression de mTORC1 (Kaper *et al.*, 2006).

Il existe aussi d'autres familles de protéines qui sont impliquées dans la régulation de l'autophagie, telles que les protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK) et les protéines faisant partie de la « Unfolded protein response ». En effet, les trois kinases faisant partie de la famille des MAPK, c-Jun N-terminale (JNK), régulée par un signal extracellulaire (ERK) et p38, ont toutes des fonctions particulières qui leur permettent d'influencer les processus autophagiques. JNK est capable d'activer l'autophagie en phosphorylant BCL-2, l'empêchant de se lier à Beclin-1, mais aussi en induisant directement l'expression d'ATG5 et de p53 (Byun *et al.*, 2009; Park, K. J. *et al.*, 2009). ERK1/2 (p44/p42), qui se retrouve en aval d'une voie de signalisation

bien connue au niveau du cancer (RAS/MEK/ERK), participe à l'activation de l'autophagie en phosphorylant la protéine d'interaction Ga (GAIP) et en inhibant le complexe mTORC1 (Cagnol et Chambard. 2010; Maddodi *et al.*, 2010). En ce qui concerne la kinase p38, plusieurs études ont démontré qu'elle joue un rôle particulier dans la régulation de l'autophagie selon le type cellulaire et l'inducteur qui est utilisé, mais aussi selon l'isoforme de p38 qui est analysé. En effet, il a été démontré que la kinase p38 possède quatre isoformes (α , β , γ et δ) et que la p38 α pouvait induire l'autophagie en réduisant les niveaux d'ATP intracellulaires, ce qui active les mécanismes AMPK dépendants (Matrone *et al.*, 2010). De plus, la participation de p38 est requise lorsque le glucose ou la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont utilisés comme inducteurs de l'autophagie (Liu *et al.*, 2009; Moruno-Manchon *et al.*, 2013). Par contre, l'inhibition de p38 par un petit ARN interférant (ARNi) ou par le SB202190, un inhibiteur pharmacologique de p38, induit l'autophagie chez certains types cellulaires (Comes *et al.*, 2007). Les protéines de la famille UPR, la kinase du réticulum endoplasmique PKR-like (Barre et Perkins. 2010), le facteur de transcription activateur 6 (ATF6) et l'enzyme requise pour l'inositol-1 (IRE1) jouent aussi un rôle essentiel dans la régulation de l'autophagie. En effet, PERK active les facteurs de transcription ATF4 et CHOP/GADD153 (C/EBP homologous protein/growth arrest and DNA damage-inducible gene 153) qui régulent l'expression de LC3 et ATG5 (Rouschop *et al.*, 2010). Elle induit aussi l'autophagie en régulant Beclin-1 et LC3 afin de prévenir la mort causée par le détachement cellulaire (anoïkis) (Avivar-Valderas *et al.*, 2011). Enfin, en travaillant de concert, ATF6 et IRE1 sont capables d'induire l'autophagie en activant des mécanismes AMPK, JNK et p38 dépendants (Choi *et al.*, 2010; Ogata *et al.*, 2006).

Fait intéressant, plusieurs études ont démontré que différentes protéines et voies de signalisation importantes dans le développement tumoral, et plus précisément dans le phénotype de résistance du glioblastome, jouent aussi un rôle clé dans la régulation de l'autophagie. En effet, l'activation des protéines HIF-1, NF- κ B, p53, PTEN, c-

MET, c-MYC, GSK3 β et les kinases de la famille SRC ainsi que des voies de signalisation JAK/STAT et Wnt/ β -Catenin permet de réguler certains effecteurs importants dans la régulation du processus autophagique (Nagelkerke *et al.*, 2015). D'abord, le facteur inductible par l'hypoxie-1 (HIF-1) contribue à l'induction de l'autophagie par l'hypoxie en activant plusieurs effecteurs, tels BNIP3, BNIP3L, AMPK et REDD1 (Bellot *et al.*, 2009; Emerling *et al.*, 2009; Horak *et al.*, 2010). Ensuite, des études ont démontré que les facteurs de transcription NF- κ B, p53 et STAT3 ont des actions autant pro-autophagiques qu'anti-autophagiques dépendamment du type cellulaire étudié et de la localisation du facteur de transcription. En effet, NF- κ B est, à la fois, capable d'induire l'autophagie via l'induction du UPR et de la réprimer en activant mTOR (Djavaheri-Mergny *et al.*, 2006; Nivon *et al.*, 2009). La localisation nucléaire de p53 induit l'autophagie par l'activation des effecteurs AMPK, DRAM (Damage-regulated autophagy modulator), BAX et PUMA (Chen, N. et Karantza. 2011). En revanche, la translocation de p53 au niveau du cytoplasme atténue la réponse autophagique par des mécanismes encore inconnus à ce jour (Tang, J. *et al.*, 2015). Par rapport à STAT3, une étude démontre que celui-ci inhibe l'autophagie en interagissant avec la protéine kinase R (PKR), ce qui court-circuite la voie PRK-eIF2 α qui est connue pour induire l'autophagie (Shen *et al.*, 2012). Toutefois, avec l'aide de NF- κ B, STAT3 est aussi en mesure de transcrire certains gènes de la famille ATG, ce qui stimule la production de l'autophagosome (You *et al.*, 2015).

D'autres effecteurs, présentés ci-haut, ont des effets unilatéraux en ce qui concerne l'autophagie. Effectivement, PTEN et c-MYC font partie des inducteurs, tandis que c-MET, GSK3 β , les kinases de la famille SRC et la voie Wnt/ β -Catenin sont du côté des inhibiteurs. En inhibant et en activant, respectivement, AKT et la voie UPR, PTEN et c-MYC sont des régulateurs importants du processus autophagique (Arico *et al.*, 2001; Hart *et al.*, 2012). De plus, en activant la voie PI3K/AKT/mTOR et en modulant la protéine Endophilin B1 (BIF-1), c-MET et GSK3 β possèdent, elles aussi,

une action répressive sur l'autophagie (Kitajima *et al.*, 2008; Yang, J. *et al.*, 2010). Enfin, la voie Wnt/ β -Catenin et les kinases de la famille SRC sont cruciales pour la régulation à la baisse de l'autophagie, car leur inhibition respective favorise d'une part la stimulation de l'AMPK dépendante de LKB1, et d'autre part l'inactivation des voies PI3K/AKT/mTOR et RAS/MEK/ERK (Ahn et Lee. 2011; Chang, H. W. *et al.*, 2013; Zheng *et al.*, 2013).

2.4.2 Rôle de l'autophagie dans le cancer

Plusieurs recherches ont confirmé que l'autophagie exerce un double rôle au sein de plusieurs types de cancer (White. 2012; Figure 2.4). En fait, dépendamment du stade de développement, de l'organe affecté et des caractéristiques intrinsèques de la tumeur, l'autophagie peut être autant bénéfique que délétère pour la cellule (White. 2012). En effet, l'induction de l'autophagie entraîne diverses conséquences cellulaires et métaboliques (vues précédemment à la figure 2.1) qui vont affecter le développement d'un cancer en modulant le caractère pro-tumoral ou anti-tumoral des cellules qui y contribuent (Panda *et al.*, 2015).

Durant le développement tumoral, les cellules cancéreuses doivent aussi être en mesure de déjouer les mécanismes innés de mort cellulaire pour assurer leur survie et leur croissance cellulaire au sein de la tumeur. C'est pourquoi, elles utilisent l'autophagie afin d'acquérir une résistance accrue au phénomène d'apoptose et, du même coup, diminuer leur sensibilité à l'anoïkis (mort cellulaire causée par le détachement cellulaire), notamment par l'activation de l'AMPK et la régulation des voies de signalisation des MAPK et de PI3K/AKT (Ng, T. L. *et al.*, 2012). Fait intéressant, une étude *in vivo* réalisée avec des cellules cancéreuses de l'ovaire a démontré que l'autophagie joue aussi un rôle important pendant le phénomène de dormance. En fait, c'est le suppresseur de tumeur « Aplasia Ras homolog member I »

(Roohbakhsh *et al.*, 2015) qui, en activant les mécanismes pro-autophagiques, permet aux cellules présentes dans le microenvironnement tumoral de survivre (Lu, Z. *et al.*, 2008). Finalement, au fur et à mesure que la tumeur prend de l'expansion, l'activation de l'autophagie permet aux cellules tumorales de survivre en conservant un bas niveau d'activité cellulaire et en utilisant les nutriments fournis par les cellules stromales environnantes recrutées au sein de la tumeur (Goldsmith *et al.*, 2014).

Bien qu'elle participe activement au développement tumoral, l'autophagie peut aussi agir comme un processus anti-tumoral. En effet, comme l'autophagie occupe un rôle important dans l'homéostasie cellulaire, elle est capable de réduire le potentiel de croissance des tumeurs en diminuant le stress oxydatif, les dommages à l'ADN ainsi qu'à la mitochondrie, la nécrose et l'inflammation mais aussi en augmentant la sénescence et la mort cellulaire par autophagie (Panda *et al.*, 2015; Figure 2.5).

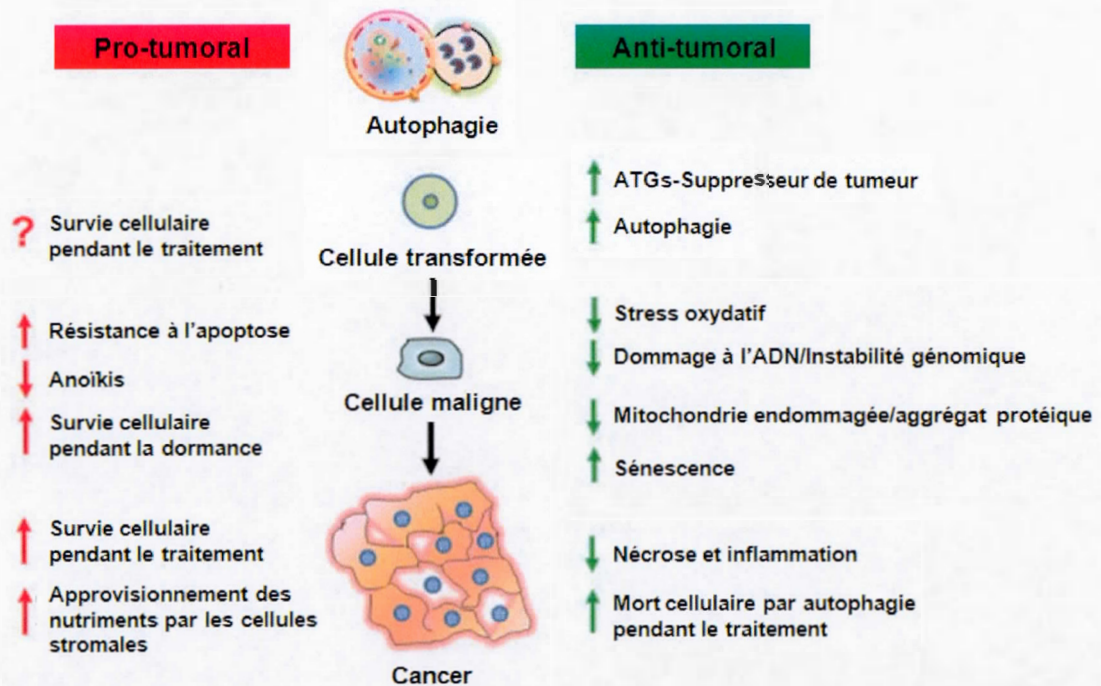


Figure 2.5 Rôles pro- et anti-tumoraux de l'autophagie dans différents stades du cancer. Au cours du développement tumoral, l'autophagie agit comme une arme à double-tranchant pour les cellules cancéreuses, car elle affecte non seulement les processus qui favorisent leur croissance, mais aussi ceux qui la restreignent. ATGs : Gènes relatifs à l'autophagie. Adaptée de (Panda *et al.*, 2015).

D'abord, le stress oxydatif est un facteur majeur dans le développement d'un cancer, car il permet de générer une production élevée en espèces réactives de l'oxygène (ROS), ce qui entraîne des perturbations au niveau de la structure des organelles et des dommages génomiques importants (Karantza-Wadsworth *et al.*, 2007). L'autophagie, et plus particulièrement la mitophagie, serait donc enclenchée afin de permettre la régulation du niveau intracellulaire des ROS en dégradant les mitochondries endommagées et les agrégats protéiques. Cette dégradation protéosomale est possible grâce à la PTEN-Induced putative kinase 1 (PINK1) et à la E3 ligase parkin (PARK2) qui agissent de concert afin de permettre l'ubiquitination des membranes externes des mitochondries (Fujiwara *et al.*, 2008). Ensuite, en ce qui

concerne les dommages à l'ADN et à la mitochondrie, les études démontrent que l'inhibition de l'autophagie entraînent plusieurs conséquences importantes telles que l'instabilité chromosomique (cassures de double brin d'ADN, anomalies centrosomiques et augmentation du contenu génomique), la génération de ROS et la diminution de l'efficacité des mécanismes de réparation de l'ADN (Mathew, R. *et al.*, 2007). C'est pourquoi, les cellules déficientes en autophagie ont une probabilité plus élevée de contribuer à la formation de la tumeur, puisqu'elles sont résistantes aux processus anti-tumoraux orchestrés par l'autophagie. La nécrose et l'inflammation font aussi partie des processus cellulaires qui sont atténués par l'autophagie. En effet, plusieurs études ont démontré que lorsque les cellules sont en état de stress cellulaire (hypoxie, manque de nutriments, etc.), l'autophagie joue un rôle anti-tumoral en limitant la mort nécrotique des cellules qui sont résistantes à l'apoptose, en réduisant l'inflammation au sein de la tumeur et en diminuant la capacité migratoire des cellules pro-inflammatoires (lymphocytes T, macrophages, etc.), ce qui entraîne une baisse du stress métabolique et un arrêt de la croissance tumorale (Degenhardt *et al.*, 2006; DeNardo *et al.*, 2009). En plus de restreindre les processus cellulaires favorisant la tumorigénèse, l'autophagie participe aussi à l'induction de la sénescence cellulaire, c'est-à-dire un arrêt complet et irréversible du cycle cellulaire menant à une baisse importante de la prolifération des cellules (Deschenes-Simard *et al.*, 2014). En effet, il a été démontré que la sénescence induite par les oncogènes et les dommages à l'ADN est principalement médiée par ATG5 et ATG7, puisque lorsqu'elles sont réprimées, les cellules échappent plus facilement à la sénescence (Young *et al.*, 2009). Par ailleurs, une étude a aussi démontré qu'un autre membre de la famille des ATG, ULK3, est capable d'induire à la fois l'autophagie et la sénescence (Young *et al.*, 2009). Finalement, lorsque le stress devient trop important, certaines cellules ne sont plus capables de survivre et meurent grâce à une suractivation de l'autophagie qui dégrade entièrement leur contenu cellulaire, ce qu'on appelle « la mort cellulaire programmée de type II » ou mort cellulaire par autophagie (Morselli *et al.*, 2011).

Par ailleurs, de récentes études ont démontré l'impact des modifications épigénétiques sur la régulation de l'autophagie dans le cancer (Suva *et al.*, 2013). En effet, dans divers cancers, l'hyperméthylation de l'ADN freine la transcription de plusieurs gènes suppresseurs de tumeur (TSGs) qui régulent l'autophagie, tels que protocadherin 17 (PCDH17), SRY (sex determining region Y)-box 1 (SOX1), Klotho, Beclin1 (BECN1) et argininosuccinate synthetase-1 (ASS1) favorisant ainsi la tumorigénèse (Delage *et al.*, 2012; Hu, X. *et al.*, 2013; Li, K. K. *et al.*, 2013; Li, Z. *et al.*, 2010; Xie *et al.*, 2013). De plus, la régulation de l'autophagie est aussi affectée par les différentes modifications post-traductionnelles, telles que la méthylation, l'acétylation, la phosphorylation et l'ubiquitination que subissent les histones (van Engeland *et al.*, 2011). En contrôlant l'activité des histones, les enzymes responsables de leur modification telles que les histones acétyltransférases (HATs), les histones déacétylases (HDACs) et les histones méthyltransférases (HMTs) jouent un rôle clé dans la régulation de l'autophagie, ce qui influence le développement tumoral (Fullgrabe *et al.*, 2013; Lee, I. H. et Finkel. 2009; Li, Z. et Zhu. 2014; Sebti *et al.*, 2014; Yi *et al.*, 2012).

Finalement, une recherche exhaustive de la littérature nous démontre qu'il existe plusieurs acteurs moléculaires ayant été mis en évidence pour leurs rôles prépondérants dans la régulation de l'autophagie, mais aussi dans le développement des glioblastomes multiformes. Parmi ceux-ci, une famille de protéines, largement caractérisée pour leur rôle dans le remodelage de la matrice extracellulaire, s'est démarquée dans les dernières années puisque dix de ses membres ont fait l'objet d'études comparatives entre leurs expressions/fonctions et leur impact sur les processus autophagiques. Ce sont les métalloprotéases matricielles (MMPs).

CHAPITRE III

LES MÉTALLOPROTÉASES MATRICIELLES

3.1 La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) est une infrastructure tissulaire très bien organisée et complexe constituée par un ensemble de biomolécules sécrétées dans les espaces intercellulaires afin de créer un réseau reliant ainsi toutes les cellules entre elles menant à la formation des tissus (Kim, S. H. *et al.*, 2011). Elle est composée de plusieurs protéines, structurales ou non, qui sont impliquées dans une multitude de processus physiologiques, tels que la migration cellulaire, la prolifération cellulaire, la différenciation cellulaire et même la cicatrisation et l'angiogenèse (Lu, P. *et al.*, 2012). Celles-ci sont constamment renouvelées en fonction du processus biologique qui est mis en branle créant ainsi un remodelage dynamique de la MEC (Larsen *et al.*, 2006). De récentes études ont démontré l'importance de la régulation des composantes de la MEC, notamment au niveau du vieillissement, ce qui en fait maintenant une cible de prédilection surtout dans les cas de guérison et de régénération tissulaire (Kular *et al.*, 2014). Les principaux constituants que l'on retrouve dans la MEC sont le collagène, l'élastine, la fibronectine, la laminine, la tenascine, l'acide hyaluronique, mais aussi les intégrines, les facteurs de croissance, les protéoglycanes et les métalloprotéases matricielles (MMPs) (Bosman et Stamenkovic. 2003).

3.2 Les propriétés et caractéristiques des MMPs

Les métalloprotéases matricielles ont été caractérisées comme étant des acteurs essentiels dans l'homéostasie de la MEC. Ces endopeptidases zinc-dépendantes sont divisées en plusieurs familles et sont répertoriées selon les substrats qu'elles dégradent (Singh, D. *et al.*, 2015). Celles-ci possèdent des structures complexes composées de plusieurs domaines qui leur confèrent un emplacement et des fonctions particulières (Apte et Parks. 2015). De plus, les MMPs jouent des rôles importants au niveau de plusieurs processus physiologiques importants tels que l'angiogenèse et le développement embryonnaire (Annabi *et al.*, 2002b). Par contre, lorsqu'elles sont exprimées à la hausse, les MMPs peuvent exercer leurs fonctions dans plusieurs pathologies telles que les cardiomyopathies, la cirrhose du foie, l'athérosclérose, les maladies neuroinflammatoires et, bien sûr, le cancer (Amalinei *et al.*, 2010). Malheureusement, les MMPs sont très difficiles à cibler puisqu'elles possèdent, à la fois, des propriétés communes et des propriétés spécifiques selon le type de substrat et de protéines qu'elles peuvent lier ou cliver, leur localisation et leur régulation (Klein et Bischoff. 2011; Li, Y. *et al.*, 2006).

3.2.1 Structure et activation des MMPs

Selon la base de données MEROPS, les MMPs sont classées dans la sous-famille des matrixines et plus précisément dans la famille des métalloprotéases zinc-dépendantes M10 (Nagase *et al.*, 2006; Rawlings *et al.*, 2014). Au nombre de 24 isoformes, les MMPs sont représentées en catégories distinctes : les stromélysines, les collagénases, les matrilysines, les gélatinases, les convertases activables (membranaires et solubles) et les autres MMPs (Sternlicht et Werb. 2001; Figure 3.1). De façon générale, les MMPs possèdent, au minimum, les deux domaines suivants, soit le propeptide et le domaine catalytique. Le propeptide est un domaine conservé de 80 acides aminés qui

contient une séquence PRCXXPD, dont une cystéine cruciale pour le maintien de la latence des MMPs sécrétées (Velasco *et al.*, 1999). De plus, chaque MMP possède un domaine catalytique contenant trois résidus histidines conservés (HEXXHXXGXXH), ce qui leur permet de lier les substrats se présentant dans la pochette enzymatique (Ra et Parks. 2007). Par ailleurs, le domaine catalytique de toutes les collagénases comportent trois acides aminés importants pour la liaison et le clivage des différents types de collagène, soit une tyrosine (Y), un acide aspartique (D) et une glycine (G) (Overall et Lopez-Otin. 2002). De plus, toutes les MMPs, exceptées MMP-7, MMP-23 (A et B) et MMP-26, sont dotées d'une région charnière riche en proline et d'un domaine hémopexine C-terminal, formé d'une structure en hélice à quatre pales dont chaque pale est composé de quatre feuillets- β antiparallèles et d'une hélice- α . Ce domaine est d'ailleurs important pour le clivage de certains types de collagène (Bode. 1995). Plus spécifiquement, les gélatinases (MMP-2 et MMP-9) possèdent trois motifs fibronectine de type II dans leur domaine catalytique, ce qui facilitent leur liaison à la gélatine et au collagène (Bode *et al.*, 1999). De plus, certaines MMPs (MMP-14, MMP-15, MMP-16 et MMP-24) possèdent un domaine transmembranaire ainsi qu'un domaine cytoplasmique, tandis que d'autres MMPs (MMP-17 et MMP-25) ont une extension C-terminale hydrophobique qui agit comme un signal d'ancrage glycosylphosphatidylinositol (Massova *et al.*, 1998). Par ailleurs, même si la plupart des MMPs solubles sont sécrétées à l'extérieur des cellules, des études ont démontré que certaines MMPs (MMP-1, MMP-2 et MMP-11) sont aussi exprimées à l'intérieur des cellules et pourraient agir comme des régulateurs protéiques intracellulaires (Kwan *et al.*, 2004; Limb *et al.*, 2005; Luo, D. *et al.*, 2002).

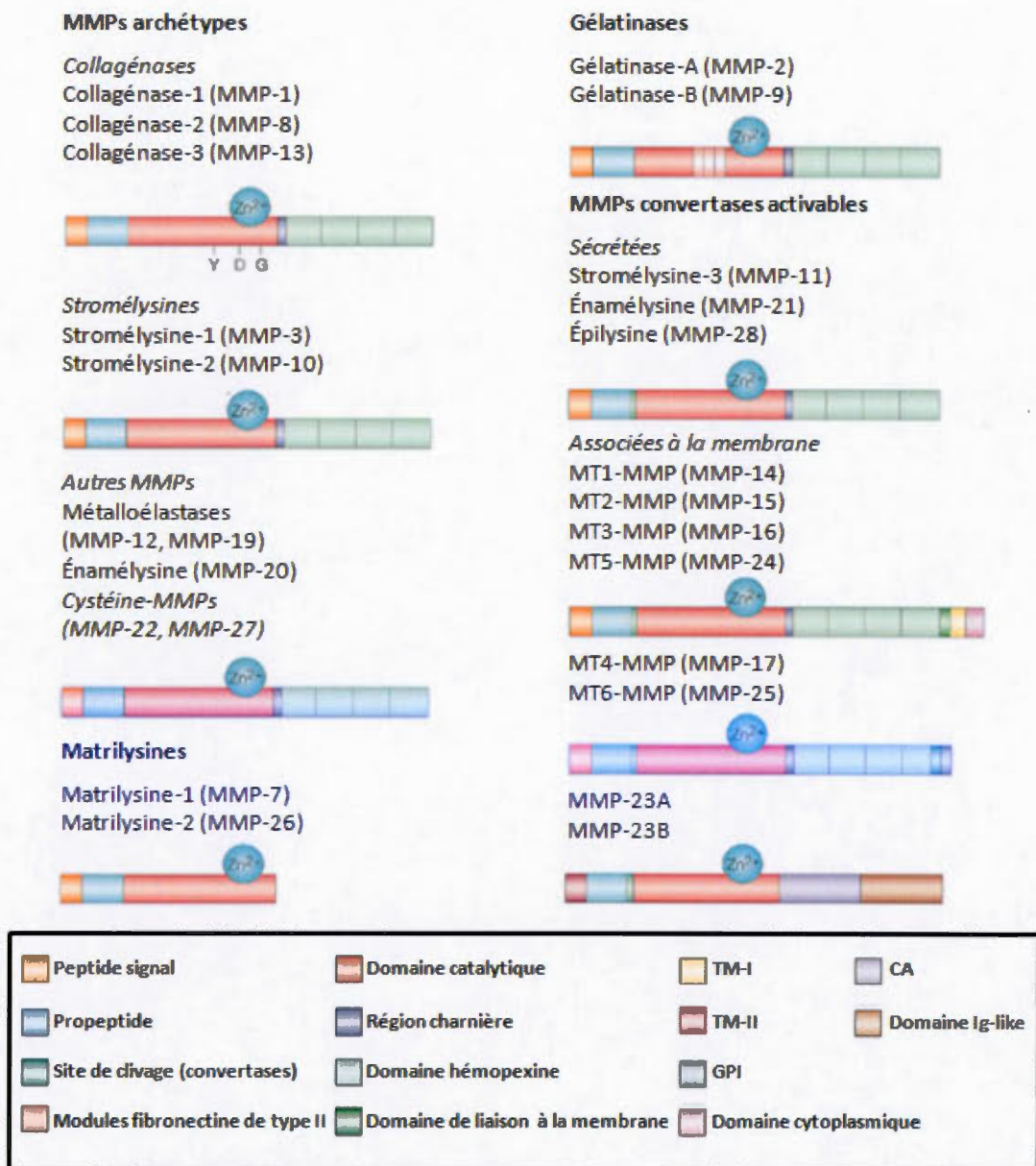


Figure 3.1 Représentation de la structure des 24 métalloprotéases matricielles (MMPs) humaines classées par famille. Les 4 familles représentées sont : les MMPs archétypes, les Matrilysines, les Gélatinases et les MMPs convertases activables. Celles-ci sont classées en fonction des domaines qu'elles possèdent. (TM, Transmembranaire; GPI, Glycosylphosphatidylinositol; CA, Cysteine-Array; Ig, Immunoglobuline). Adaptée de (Overall et Lopez-Otin. 2002).

Les MMPs sont produites à l'état de zymogène, c'est-à-dire qu'elles sont inactives. Cet état est créé grâce à une cystéine conservée, se retrouvant dans le domaine propeptide de chaque MMP, qui interagit avec l'ion Zn^{2+} situé dans la poche enzymatique de leur domaine catalytique (Tallant *et al.*, 2010). En fait, tout ceci est contrôlé par le résidu glutamate se retrouvant dans la séquence du domaine catalytique mentionnée plus-haut. Il permet l'activation d'une molécule d' H_2O lié à l'ion Zinc (Zn^{2+}), fournissant ainsi un nucléophile capable de cliver les liens peptidiques et de modifier la cystéine en cystéine-thiol, ce qui stabilise l'interaction entre cette dernière et l'ion zinc (Ra et Parks. 2007). Pour être activées, les proMMPs doivent absolument procéder à l'élimination de l'interaction thiol- Zn^{2+} (aussi appelé « cysteine-switch »). Pour ce faire, trois mécanismes peuvent être utilisés : 1) le clivage du domaine propeptide par une autre protéase; 2) la réduction du thiol par des oxydants ou des agents non-physiologiques tels que les agents alkylants, les ions métalliques lourds et les composés disulfurés; 3) la perturbation allostérique du zymogène (Ra et Parks. 2007).

La méthode classique d'activation des proMMPs est sans contredit le clivage du domaine propeptide. Plusieurs protéases sont connues pour effectuer ce clivage. Parmi celles-ci, notons la furine, les MMPs actives et les protéases à serine, telles que la plasmine, la kallikréine et les chymases des mastocytes (famille MCP) (Janssens et Lijnen. 2006; Saunders *et al.*, 2005; Tchougounova *et al.*, 2005; Thomas, G. J. *et al.*, 2002). La furine est une protéase de la famille des proprotéines convertases subtilisin-like (SPC) présente dans le réseau trans-golgien qui reconnaît et clive les séquences RXKR et RRKR situées entre les domaines propeptide et catalytique des proMMPs, ce qui, *de facto*, permet leur activation (Bassi *et al.*, 2000). Ensuite, de nombreuses études ont démontré que les MMPs actives sont elles-même capables de cliver le domaine propeptide de leurs consœurs. En effet, malgré le fait que toutes les études aient été réalisées dans des modèles *in vitro*, 8 MMPs (1, 2, 3, 7, 10, 14, 15 et

16) ont été en mesure de cliver d'autres MMPs qui étaient sous leur forme latente (Imai *et al.*, 1995; Nagase *et al.*, 2006; Saunders *et al.*, 2005). Par ailleurs, il existe d'autres protéases capables d'activer les MMPs latentes. En effet, des études *in vivo* ont démontré que l'activateur du plasminogène de type urokinase (U-PA) permet la conversion du plasminogène en plasmine et active les proMMPs 3, 9, 12 et 13 (Carmeliet *et al.*, 1997). De plus, les chymases des mastocytes contribuent aussi à l'activation de plusieurs MMPs latentes, car Tchougounova et collègues ont noté une diminution de l'activation des gélatinases MMP-2 et MMP-9 chez les souris mast cell chymase-4^{-/-} (MCP-4^{-/-}) (Tchougounova *et al.*, 2005).

Les agents oxydants sécrétés par les cellules du système immunitaire, telles que les leucocytes, participent aussi à la régulation de la balance activation/inactivation des MMPs en oxydant les thiols du domaine propeptide d'une MMP (Siwik et Colucci. 2004). Ce dernier est ensuite clivé de manière autolytique en modifiant les acides aminés importants pour l'activité catalytique de cette MMP (Siwik et Colucci. 2004). En fait, plusieurs études ont démontré que les ROS peuvent conduire à l'activation des proMMPs. Par exemple, l'acide hypochloreux (HOCl) et le peroxy-nitrate induisent le clivage autolytique et subséquent l'activation des proMMPs-1, -2, -7 et -9 (Fu, X. *et al.*, 2001; Okamoto *et al.*, 1997). Par ailleurs, d'autres agents chimiques, tels que le dodécylsulfate de sodium (SDS) et l'acétate 4-aminophénylmercurique (Partridge *et al.*, 2012), peuvent entraîner le « cysteine switch » (Klein et Bischoff. 2011).

Les proMMPs peuvent aussi être activées de par leur interaction avec des composantes de la MEC, telles que les protéoglycanes ou les intégrines (Brezillon *et al.*, 2013). En effet, des études ont démontré que certaines chaînes glycosaminoglycanes (GAG) comme les chaînes héparan sulfates (HS) et chondroïtin sulfates (CS) régulent l'activité catalytique de certaines protéases présentes dans la MEC telles que la thrombine, l'antithrombine III, le facteur Xa, la tryptase, la

chymase et la cathepsin B, ce qui provoque un clivage protéolytique des proMMPs et mène à leur activation (Almeida, P. C. *et al.*, 2001; Capila et Linhardt. 2002; Hallgren *et al.*, 2000; Winberg *et al.*, 2003). Finalement, les proMMPs peuvent aussi subir des modifications post-traductionnelles, ce qui entraîne un changement conformationnel du zymogène et facilite sa conversion en état actif. Ainsi, cette perturbation allostérique permet aux proMMPs de s'activer elles-mêmes en retirant leur domaine propeptide par clivage autolytique (Ra et Parks. 2007).

3.2.2 Régulation des MMPs

Afin de maintenir l'homéostasie tissulaire intacte, il existe aussi des mécanismes permettant de contrôler le niveau d'expression des MMPs activées. En fait, la régulation de l'activité et de l'expression des MMPs s'effectuent de trois manières distinctes : 1) la modulation de l'expression génique; 2) la compartimentalisation et 3) l'inhibition par des inhibiteurs protéiques naturels.

D'abord, il est important de préciser que la majorité des MMPs ne sont pas transcrites de façon constitutive. En effet, la transcription de la plupart des MMPs nécessite une stimulation de la part de divers facteurs externes, tels que les cytokines pro-inflammatoires, les hormones et certains facteurs de croissance (EGFR, TGF- β , TNF- α et l'IL-1 β) (Tallant *et al.*, 2010). De plus, des études ont démontré que des molécules bioactives peuvent aussi participer à la transcription de certaines MMPs. Ainsi, la prostaglandine E2 (PGE2) et les lipoprotéines de faible densité (LDL) oxydées induisent à la hausse la transcription des MMPs-1, -2, -9 et -14, et des MMP-1 et -9, respectivement (Alfranca *et al.*, 2008; Huang, Y. *et al.*, 1999; Ito *et al.*, 2004; Kim, K. W. *et al.*, 2005; Xu, X. P. *et al.*, 1999; Yen *et al.*, 2011). Par ailleurs, certaines conditions du micro-environnement cellulaire, telles que l'hypoxie/réoxygénation et l'hyperglycémie peuvent moduler à la hausse ou à la

baisse le niveau de transcription des MMPs (Ben-Yosef *et al.*, 2002; Tsai *et al.*, 2013). Toutefois, il est important de rappeler que l'activité transcriptionnelle des MMPs est gérée par l'activité des divers facteurs de transcription (TFs) qui possèdent un domaine de liaison figurant dans les régions promotrices des diverses MMPs. Ainsi, plusieurs TFs, telles que les protéines activatrices 1 et 2 (AP1 et AP2), NF- κ B, la famille ETS, le facteur de cellule-T 4 (TCF4), la protéine à doigt de zinc associée à CAS (Azad *et al.*, 2008), p53, le « Core-binding factor A1 » (CBFA1), l'élément inhibiteur du TGF- β (TIE) et l'élément riche en AG, peuvent réguler à la hausse et à la baisse l'expression de certaines MMPs (Benderdour *et al.*, 2002; Crawford *et al.*, 2001; Nakamoto *et al.*, 2000; Overall et Lopez-Otin. 2002). En plus de ces régulateurs, des études récentes ont inféré qu'il existe d'autres mécanismes de régulation des MMPs qui seraient plus complexes. En effet, il ne faut pas sous-estimer les polymorphismes des promoteurs, les mécanismes de régulation épigénétiques et les processus post-transcriptionnels affectant la stabilité de l'ARNm, l'efficacité de la traduction protéique et la régulation par les microARNs (Chen, K. C. *et al.*, 2011; Chou *et al.*, 2013; Labrie et St-Pierre. 2013; Yan et Boyd. 2007; Zhang, B. *et al.*, 1999).

La compartimentalisation est un autre élément important qui permet de contrôler l'expression et l'activité des MMPs. Pour bien fonctionner, les MMPs possèdent des mécanismes de sécrétion spécifiques qui leur permettent de réguler leur localisation péricellulaire (Ra et Parks. 2007). Outre les MMPs de type membranaire (MT-MMPs), certaines MMPs se lient avec des molécules présentes dans la membrane cellulaire qui, à leur tour, lient leurs substrats. C'est le cas, notamment, de la MMP-2 avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, de la MMP-1 avec l'intégrine $\alpha_2\beta_1$, de la MMP-9 avec CD44 et de la MMP-7 avec des protéoglycanes à la surface; avec CD151 et avec le cholestérol (Brooks *et al.*, 1996; Dumin *et al.*, 2001; Shiomi *et al.*, 2005; Stricker *et al.*, 2001; Yamamoto *et al.*, 2006; Yu, Q. et Stamenkovic. 2000; Yu, W. H. *et al.*, 2002). En fait, il a été suggéré que ces diverses molécules agissent comme des protéines

d'ancrage qui permettent de stabiliser les proMMPs à la membrane et de changer leur conformation tridimensionnelle, ce qui a pour effet de briser le lien cystéine-Zn²⁺-thiol et de les activer (Shiomi *et al.*, 2005). De plus, selon cette même étude, les proMMPs auraient tendance à s'activer lorsqu'elles sont en présence de leurs substrats, car la seule façon de détecter la MMP-7 active, c'est lorsque la proMMP-7 est incubée avec la transferrine carboxyméthylée, un substrat de prédilection *in vitro* (Shiomi *et al.*, 2005).

Enfin, lorsque les MMPs actives sont sécrétées dans l'espace extracellulaire ou ancrées à la membrane plasmique, leur activité peut aussi être contrôlée par des inhibiteurs naturels présents à la surface ou dans l'espace extracellulaire, tels que l' α 2-macroglobuline (α 2-M), les quatre membres de la famille des inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases (TIMPs) et d'autres protéines ayant des fonctions inhibitrices (Nagase *et al.*, 2006). L' α 2-M, une glycoprotéine de 725 kDa contenant quatre sous-unités identiques de 180 kDa, permet de recycler les MMPs actives en les engouffrant dans sa macroglobuline, ce qui déclenche un processus d'endocytose médié, entre autres, par le récepteur relié aux lipoprotéines de faible densité-1 (LRP-1) (Strickland *et al.*, 1990). En ce qui concerne les TIMPs, ceux-ci exercent leur inhibition en formant des complexes 1:1 avec les MMPs actives, ce qui entraîne leur inactivation (Brew et Nagase, 2010). De plus, plusieurs études ont démontré que les TIMPs ont une sélectivité et une spécificité très différentes. Par exemple, TIMP-1 inhibe très difficilement les MMPs membranaires de type-1, -3, -5 et la MMP-19, tandis que TIMP-2 et TIMP-3 le font efficacement. La nécessité des TIMPs a aussi été étudiée et les résultats ont démontré, de façon impressionnante, que l'invalidation génique de TIMP-1 (TIMP-1^{-/-}) ou de TIMP-2 (TIMP-2^{-/-}) n'affecte en rien les processus physiologiques de la souris, car celles-ci ne présentent aucun signe anormal. Par contre, les souris null pour TIMP-3 (TIMP-3^{-/-}) ont montré des dommages alvéolaires importants ainsi qu'une forte augmentation de l'apoptose dans

les cellules épithéliales mammaires lorsque celles-ci étaient sevrées (Fata *et al.*, 2001; Leco *et al.*, 2001).

Par ailleurs, des études ont permis d'identifier plusieurs protéines qui pourraient aussi agir comme inhibiteur naturel de certaines MMPs. Ainsi, la MMP-2 serait inhibée par la protéine précurseure β -amyloïde, le « procollagen C-terminal proteinase enhancer » (PCPE), la protéine « Reversion-inducing cysteine-rich protein with kazal motifs » (RECK) et le tissue factor pathway inhibitor-2 (Tfpi-2) (Herman *et al.*, 2001; Higashi et Miyazaki. 2003; Mott *et al.*, 2000; Oh *et al.*, 2001). De plus, RECK et Tfpi-2 seraient aussi capables d'inhiber les MMPs-9 et 14, et la MMP-1, respectivement (Herman *et al.*, 2001; Oh *et al.*, 2001). Finalement, des études ont aussi révélé que le domaine NC1 du collagène de type IV ainsi que le domaine de liaison à la laminine de l'agrin pourraient agir comme inhibiteur non-sélectif des MMPs, car leur structure ressemble étrangement à celles des différents membres de la famille des TIMPs (Petitclerc *et al.*, 2000; Stetefeld *et al.*, 2001). Toutefois, les mécanismes moléculaires liés à l'inhibition des MMPs par ces protéines ne sont pas bien connus ou sont controversés (Du *et al.*, 2003; Murphy et Nagase. 2008).

3.2.3 Fonctions des MMPs

Étant donné la grande variabilité ainsi que le nombre important des MMPs, nous sommes en droit d'imaginer que celles-ci sont présentes dans un grand nombre de processus biologiques. En fait, lors de la découverte des MMPs, les scientifiques ont pensé que celles-ci n'étaient utiles que dans la dégradation et le renouvellement des constituants de la MEC (Murphy et Nagase. 2008). Cependant, on sait aujourd'hui que les MMPs occupent un rôle central dans l'homéostasie cellulaire en agissant de plusieurs façons (dégradation de récepteurs, clivage de biomolécules menant à la création de chémo-attractant et même clivage de protéines clés dans certains

processus cellulaires) (Butler et Overall. 2009). Au cours des vingt dernières années, des études ont démontré que les MMPs sont indispensables pour le bon fonctionnement de plusieurs fonctions physiologiques, telles que l'embryogénèse, la cicatrisation, le développement osseux et l'apoptose, mais elles sont aussi impliquées dans de nombreuses maladies (Klein et Bischoff. 2011; Tableau 3.1).

Tableau 3.1 Implications des métalloprotéases matricielles (MMPs) dans diverses pathologies. Plusieurs études ont été réalisées dans le but de corréler l'expression des MMPs et les pathologies énumérées ci-dessous. Pour ce faire, des mesures d'expression protéique des différentes MMPs ont été prises chez des patients souffrant de ces pathologies. De plus, des souris KO pour certaines MMPs ont démontré leur importance dans la protection de ces mêmes maladies. Le tableau résumé donc l'ensemble des données recueillies chez l'Homme et chez la souris. Créer à partir de (Klein et Bischoff. 2011); (Amalinei *et al.*, 2010) et (Vargova *et al.*, 2012).

	Pathologies	MMPs impliquées
Problèmes cardiaques	Athérosclérose	1, 2, 3, 8, 9, 10 et 13
	Resténose	2, 3, 9 et 14
	Hypertension	1, 2 et 9
	Arrêt cardiaque	1, 2, 3, 8, 9, 13 et 14
	Anévrisme	2, 9, 11, 12 et 14
Problèmes pulmonaires	Hypertension artérielle pulmonaire	2, 9, 12 et 13
	Emphysème et Bronchite chronique (COPD)	1, 2, 8, 9, 12 et 14
	Asthme	2, 3, 8, 9 et 14
	Fibrose pulmonaire idiopathique (IPF)	1, 2 et 9
Problèmes rhumatiques	Arthrite rhumatoïde	1, 3 et 13
	Lupus érythémateux disséminé	2 et 9
	Sclérose systémique	3 et 9
Autres problèmes	Alzheimer	3
	Cancer	1, 2, 3, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 24 et 25
	Diabète	2, 9, 14 et 24
	Hyperkératose	1

Comme il a été mentionné ci-haut, les MMPs sont au coeur de nombreux processus physiologiques grâce à leurs habiletés à dégrader un grand nombre de récepteurs et/ou protéines faisant partie de la MEC. Ainsi, l'activation de plusieurs voies de signalisation dépend de ces dernières. Par exemple, lors d'une blessure, le processus de cicatrisation nécessite grandement le soutien de plusieurs MMPs. En effet, des études ont démontré que la répression des MMPs 1, 3, 7, 10 et 11 entraînait des désordres importants au niveau de la réparation tissulaire (Fray *et al.*, 2003; Klein et Bischoff. 2011; Salmela *et al.*, 2004). De plus, en clivant le collagène de type II et le protéoglycan Aggrecan, deux composantes majeures du cartilage, les MMPs 9 et 13 exercent un grand rôle au niveau du développement osseux (Klein et Bischoff. 2011; Leeman *et al.*, 2002; Vu *et al.*, 1998). Ensuite, des études ont démontré que lorsque les MMPs 2, 7, 8, 9, 10 et 12 sont inhibées, cela occasionne de graves problèmes au niveau de la migration cellulaire dû à un manque de chimioattractants et à une baisse de la dégradation des composantes situées dans la membrane basale, telles que la laminine-5 (Klein et Bischoff. 2011; Krampert *et al.*, 2004). Les MMPs sont aussi utilisées dans la régulation (à la hausse comme à la baisse) de l'angiogenèse. Plusieurs études ont effectivement démontré que les MMPs 2, 9, 12 et 15 peuvent : 1) relarguer une forme active du VEGF, 2) générer des structures tubulaires et 3) dégrader le plasminogène afin de permettre la libération d'angiostatine (Houghton *et al.*, 2006; Klein et Bischoff. 2011; Lafleur *et al.*, 2002). Par ailleurs, la MMP-8 a été démontré comme étant un acteur principal dans la reconstruction et le remodelage de la paroi utérine après l'accouchement (Balbin *et al.*, 1998). De plus, durant le cycle de reproduction chez la femme, les MMPs 9 et 11 seraient à la base de l'implantation de l'embryon dans l'utérus, mais aussi dans la remodelage de l'endomètre (Dubois *et al.*, 2000). Finalement, des études ont montré, via des expériences *in vitro* et de souris KO, que les MMPs possèdent aussi d'importantes fonctions au niveau de la régulation de plusieurs autres processus physiologiques, tels que l'apoptose (MMPs 3, 11 et 15), l'adipogénèse (MMP-11), la transition épithélio-mésenchymateuse (MMPs 3 et 7) et l'immunité innée (MMP-7) (Klein et Bischoff. 2011).

3.3 MT1-MMP

La MT1-MMP, aussi appelée MMP14, est une protéine de 60 kDa faisant partie de la famille des MMPs membranaires grâce à son domaine transmembranaire (Overall et Lopez-Otin. 2002). Elle est encodée par une seule copie génique localisée sur le chromosome 14. Elle est la pionnière de son groupe, car elle a été découverte la première en 1994. Depuis ce temps, la MT1-MMP est devenue la MMP la plus étudiée et la plus caractérisée puisqu'elle se retrouve dans plusieurs types cellulaires et qu'elle est fortement exprimée dans plusieurs cancers (Itoh et Seiki. 2006). Elle est d'ailleurs la MMP qui possède le plus grand nombre de substrats affectant ainsi de nombreux signaux tant extracellulaires qu'intracellulaires, ce qui en fait une cible thérapeutique de choix (Barbolina et Stack. 2008). Malgré tout, plusieurs inhibiteurs sélectifs de MMP14 ont été développés et montraient des effets thérapeutiques prometteurs, mais les résultats cliniques ont été désastreux. De plus, la génération de souris KO pour MT1-MMP (MT1-MMP^{-/-}) ont permis de découvrir que celle-ci est bien plus qu'une simple collagénase. En fait, son absence entraîne des défauts majeurs au niveau cranio-facial, de l'arthrite, de l'ostéopénie, de la fibrose des tissus mous, du nanisme et de la mort prématurée, tandis que sa surexpression confère des propriétés tumorigéniques aux cellules saines en périphérie de la tumeur (Holmbeck *et al.*, 1999; Soulie *et al.*, 2005). Ces études démontrent donc que la régulation de l'expression de MT1-MMP est essentielle aussi bien au niveau physiologique que pathologique.

3.3.1 Activation et régulation

Les mécanismes qui régulent l'expression membranaire et l'activité de MT1-MMP sont complexes. En effet, pour être active à la membrane, la MT1-MMP doit, suite à sa production dans le réticulum endoplasmique rugueux (RER), subir un clivage

protéolytique orchestré par la furine et/ou les proprotéines convertases (PCs) ressemblant à la furine (Pei et Weiss. 1995). En fait, le mécanisme d'activation de MT1-MMP s'effectue en deux étapes. La première étape consiste à cliver les deux régions appâts du domaine propeptide de MT1-MMP qui sont caractérisées par deux lysines situées en position 50 et 61, respectivement (Strongin. 2010). La deuxième étape fait intervenir un autre clivage protéolytique dépendant de la furine. Cette fois-ci, c'est la séquence inhibitrice R¹⁰⁸RKR¹¹¹ (représentée par le site de clivage par les convertases dans la figure 3.3) qui est retirée laissant place au domaine catalytique N-terminal débutant par une tyrosine (Y¹¹²) (Yana et Weiss. 2000).

Outre les mécanismes d'activation de la MT1-MMP, sa régulation au niveau génique et protéique joue aussi un grand rôle dans le niveau d'expression de celle-ci. D'ailleurs, il existe de nombreux effecteurs capables de réguler l'expression et l'activité de MT1-MMP tels que des facteurs de transcription, des protéines intracellulaires, des protéines membranaires ainsi que des microARNs (Itoh. 2015).

D'emblée, il est important de mentionner qu'il existe plus d'une dizaine de facteurs de transcription possédant au moins un site de liaison sur le promoteur du gène de MMP14 (Haas *et al.*, 1999; Overall et Lopez-Otin. 2002). Par contre, les études répertoriées démontrent que les facteurs de transcription NF- κ B, EGR1, PEA3, SP1 et C/EBP ont un réel impact sur l'expression génique de MT1-MMP (Overall et Lopez-Otin. 2002; Figure 3.2). En effet, il a été démontré que le collagène ainsi que *v-src* induisent MT1-MMP en activant EGR1 et SP1, respectivement (Cha *et al.*, 2000; Haas *et al.*, 1999). Ensuite, Cowden Dahl et collègues ont prouvé que l'EGFR induit une forte accumulation de PEA3 au niveau du noyau, ce qui conduit aussi à une augmentation de l'expression génique de MT1-MMP (Cowden Dahl *et al.*, 2007). Plus récemment, une étude a démontré que l'IL-1 β est capable d'induire C/EBP, ce qui active la transcription de MT1-MMP et ainsi augmente son expression génique (Petrella et Vincenti. 2012). Finalement, il a été démontré dans plusieurs modèles

cellulaires que NF- κ B participe également à l'augmentation de l'expression génique de MT1-MMP par le biais d'une induction au TNF- α (Roy *et al.*, 2013). Fait intéressant, bien qu'il ne possède aucun site de liaison sur le promoteur de MT1-MMP, SNAIL, un facteur de transcription ayant un rôle important dans la régulation de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), exercerait aussi un contrôle sur l'expression de MT1-MMP (Qin *et al.*, 2015).

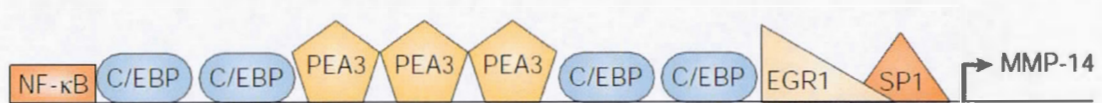


Figure 3.2 Éléments de régulation dans le promoteur du gène MMP-14 humain (MT1-MMP). Parmi tous les facteurs de transcription ayant au moins un site de liaison sur le promoteur du gène de MMP14, ceux qui ont démontré un réel impact sur l'expression génique de MT1-MMP ont été schématisés dans la figure. (NF- κ B, *Nuclear Factor Kappa B*; C/EBP, *CCAAT/enhancer binding protein*; EGR1, *Early growth response protein-1*). *Les facteurs de transcription PEA3 et SP1 n'ont pas de noms spécifiques. Adaptée de (Overall et Lopez-Otin. 2002).

Un autre facteur influençant l'expression et l'activité de MT1-MMP est la régulation par les protéines cytoplasmiques. En effet, de récentes études ont démontré que le niveau d'expression de certaines protéines affecte celle de MT1-MMP. Par exemple, lorsqu'on réprime l'expression génique d'ADAM12, on note une réduction de l'expression membranaire de MT1-MMP (Albrechtsen *et al.*, 2013). Par contre, lorsqu'on surexprime ADAM12, on remarque une hausse significative de l'expression de MT1-MMP à la membrane, mais aussi de son activité (Albrechtsen *et al.*, 2013). De plus, le transport vésiculaire de MT1-MMP influence aussi son expression membranaire ainsi que son activité. Des études ont effectivement démontré que les Rab GTPases 5a, 8a et 14 sont particulièrement importantes pour le transport de MT1-MMP vers les podosomes (Wiesner *et al.*, 2013). D'autres protéines participant aux processus endocytiques et contrôlant le recyclage des protéines membranaires, comme les clathrines et les cavéolines, peuvent aussi

influencer l'expression et l'activité de MT1-MMP (Jiang *et al.*, 2001; Uekita *et al.*, 2001). D'ailleurs, il a été démontré que la palmitoylation de la cystéine en position 574 du domaine cytoplasmique de MT1-MMP est une modification post-traductionnelle importante pour son endocytose par la voie dépendante de la clathrine (Anilkumar *et al.*, 2005). Fait intéressant, Itoh et collègues ont démontré que la dimérisation de MT1-MMP, processus clé dans l'activation de la proMMP-2 (voir figure 3.4), est contrôlée par les Rho GTPases Cdc42 et Rac1 (Itoh *et al.*, 2011). Par ailleurs, une étude a révélé que des exosomes caractérisés par les protéines TSG101 et CD29 (Intégrine β 1) seraient à la base d'un mécanisme de recyclage permettant à MT1-MMP de retourner à la membrane après avoir été internalisé (Hakulinen *et al.*, 2008). Enfin, de récentes études ont démontré que YB-1, NEDD9-Arf6, Wnt, CLIC3, N-WASP, Gli1 et Aquaporin-3 (AQP-3) font aussi partie des protéines intracellulaires participant à la régulation de l'expression de MT1-MMP (Liao *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2014; Loskutov *et al.*, 2015; Lovett *et al.*, 2010; Macpherson *et al.*, 2014; Xu, H. *et al.*, 2011; Yu, X. *et al.*, 2012). Cependant, les mécanismes moléculaires sont très peu caractérisés à ce jour.

En plus des protéines intracellulaires, plusieurs études ont prouvé que la présence de certaines protéines et/ou récepteurs membranaires affecte aussi l'expression et/ou l'activité de MT1-MMP. Pour débiter, Miyamori et collègues ont démontré que les claudins (1, 2, 3 et 5), tout comme les TIMPs, diminuent l'activité de MT1-MMP en se liant à son domaine catalytique (Miyamori *et al.*, 2001). Un autre groupe de recherche a découvert que la lumican a elle aussi un effet répresseur sur MT1-MMP en liant son domaine catalytique (Pietraszek *et al.*, 2014). À l'opposé, CD44 a été démontré comme étant un récepteur favorisant l'expression et l'activité de MT1-MMP dans les lamellipodes en se liant à son domaine hémapexine (Mori *et al.*, 2002). Récemment, une étude a inféré que le complexe FAK-p130Cas était capable d'interagir avec MT1-MMP, ce qui permettait de la maintenir activée et ainsi de dégrader la MEC présente dans les adhérences focales (Wang, Y. et McNiven. 2012).

De plus, une étude datant de 2009 a démontré une forte corrélation entre l'Endo180, un récepteur de l'endocytose du collagène, et l'activité catalytique de MT1-MMP (Messaritou *et al.*, 2009). Toutefois, aucun mécanisme n'a été trouvé depuis. Finalement, il existe aussi des récepteurs qui, lorsqu'ils sont liés à leurs ligands, enclenchent une cascade d'évènements signalétiques qui mène à l'augmentation ou la diminution de l'expression de MT1-MMP. Parmi ceux-ci, notons l'ER α , récepteur du 17 β -estradiol (E2), l'EP4, récepteur de la prostaglandine E2 (PGE2) et le TLR-2, récepteur de plusieurs molécules pro-inflammatoires (Bouris *et al.*, 2015; Kassem *et al.*, 2014; Vinnakota *et al.*, 2013). Par ailleurs, il est important de mentionner que plusieurs agents pharmacologiques tels que les esters de phorbol, la concanavoline-A et l'As₄O₆ (TAO) sont utilisés depuis quelques années pour induire ou pour moduler l'expression de MT1-MMP (Gwak *et al.*, 2014; Park, J. M. *et al.*, 2007; Sina *et al.*, 2010).

Enfin, il existe une autre famille de biomolécules capables de moduler l'expression de MT1-MMP, les microARNs (MiARNs). En fait, depuis la découverte et l'émergence des MiARNs, plusieurs études ont démontré leur impact dans une panoplie de processus cellulaires, affectant de nombreuses protéines et voies de signalisation (Bandres *et al.*, 2007). Ainsi, diverses études montrent que plus d'une quinzaine de MiARNs affectent non seulement l'expression génique de MT1-MMP, mais aussi son expression protéique. Parmi eux, se retrouvent les MiARNs 9 (Zhang, H. *et al.*, 2012), 10b (Nakayama *et al.*, 2013), 34a (Jia *et al.*, 2014), 133a (Akanuma *et al.*, 2014), 200 (Soubani *et al.*, 2012), 335 (Rojas *et al.*, 2015), 337-3p (Xiang *et al.*, 2015b) et 584-5p (Xiang *et al.*, 2015a).

3.3.2 Fonctions de MT1-MMP

Étant donné que MT1-MMP est exprimée dans un large éventail de tissus et types cellulaires, il est normal que celle-ci possède de nombreuses fonctions (Itoh. 2015). De plus, les diverses études démontrant la capacité que possède MT1-MMP à lier un ligand (protéine membranaire, cytoplasmique ou récepteur) et à le cliver n'ont fait qu'allonger la liste, déjà longue, des fonctions de MT1-MMP. Comme il a été mentionné dans le début de la section 3.3, les souris KO pour MT1-MMP ont montré différentes anomalies physiques qui témoignent de l'importance fonctionnelle de cette MMP (Holmbeck *et al.*, 1999).

Comme on peut le voir sur la figure 3.3, MT1-MMP possède plusieurs domaines qui jouent des rôles importants au niveau de la protéolyse de certaines biomolécules, mais aussi dans la régulation de la signalisation extra- et intracellulaire. Les trois domaines les plus importants sont vraisemblablement le catalytique (CA), l'hémopexine (Hpx) et le cytoplasmique (CT).

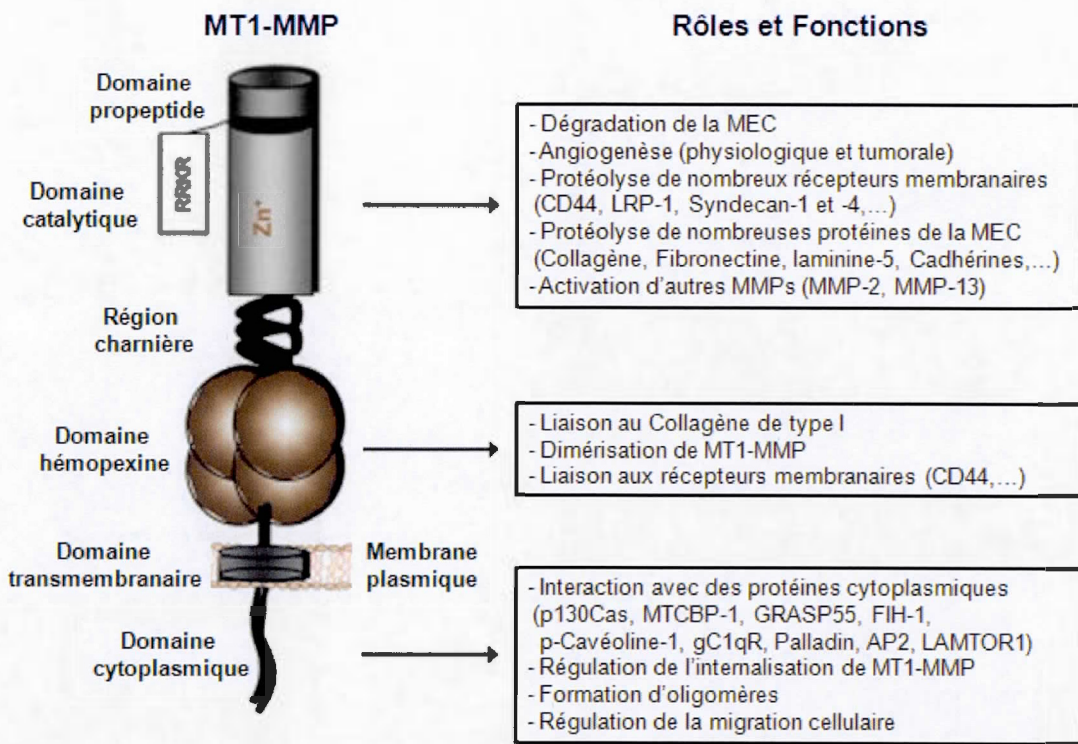


Figure 3.3 Structure de MT1-MMP et rôles/fonctions de ses domaines catalytiques, hémopexine et cytoplasmique. La structure du zymogène de MT1-MMP (60 kDa) comporte six domaines bien distincts. La séquence RRKR représente le site de clivage par les proprotéines convertases (PCs). Une fois le domaine propeptide retiré (111 acides aminés), la MT1-MMP activée (55 kDa) peut exécuter ses fonctions extra- et intracellulaires. Les fonctions des domaines CA, Hpx et CT sont énumérées dans les encadrés à droite et les informations proviennent des différentes études mentionnées dans les sous-sections 3.3.2 et 3.3.3. Adaptée de (Koziol *et al.*, 2012).

Les fonctions occupées par le domaine catalytique de MT1-MMP sont plutôt d'ordre protéolytique, comme en témoignent les nombreuses études qui ont été faites sur sa capacité à dégrader la MEC, ses composantes ainsi que plusieurs récepteurs et autres protéines membranaires. Tout d'abord, une des premières molécules caractérisée comme étant une cible du domaine CA de MT1-MMP est la proMMP-2 (Itoh *et al.*, 2001). D'ailleurs, le mécanisme d'activation de cette MMP a été le sujet de recherche

de nombreux chercheurs et le modèle le plus accepté est présenté dans la figure 3.4 (Itoh. 2015). Ensuite, il a été démontré que MT1-MMP est en mesure de cliver et de dégrader ADAM9, une métalloprotéase qui régule la signalisation de FGFR2 (récepteur du facteur de croissance fibroblastique 2) (Chan *et al.*, 2012). Une autre MMP sensible à l'action du domaine CA de MT1-MMP est la proMMP-13. Même si son mécanisme d'activation n'est pas très bien connu, il semble que celui-ci n'implique pas TIMP-2, comme pour la proMMP-2 (Knauper *et al.*, 2002). En plus de certaines métalloprotéases, MT1-MMP clive aussi plusieurs biomolécules présentes à la membrane plasmique ou dans la MEC. Ainsi, il a été démontré que MT1-MMP clive la chaîne $\gamma 2$ de la laminine-5, ce qui a pour effet de relâcher un fragment ressemblant à l'EGF qui, en se liant au récepteur de l'EGF (EGFR), active la motilité cellulaire (Gilles *et al.*, 2001; Schenk *et al.*, 2003). Ensuite, une étude a démontré que MT1-MMP clive la partie N-terminale du domaine de liaison de l'héparine du facteur de croissance HB-EGF, ce qui promouvoit le caractère invasif des cellules en créant un facteur de croissance indépendant de l'héparine (Koshikawa *et al.*, 2010). De plus, depuis des années, MT1-MMP a souvent fait le titre des articles scientifiques où il était question de migration cellulaire. Les protéines membranaires telles que CD44 (un récepteur à l'acide hyaluronique), Syndecan-1 et Syndecan-4 (deux protéoglycans possédant des chaînes héparan-sulfates), l'intégrine αV et ICAM-1 (Intracellular adhesion molecule-1) sont toutes des cibles du domaine CA de MT1-MMP et leur protéolyse entraîne effectivement une hausse de la migration cellulaire (Deryugina *et al.*, 2002; Endo *et al.*, 2003; Kajita *et al.*, 2001; Manon-Jensen *et al.*, 2013; Sithu *et al.*, 2007).

L'angiogenèse fait aussi partie des processus cellulaires auxquels MT1-MMP prend part en stimulant l'expression de VEGF-A et en dégradant des composantes péricellulaires de la MEC (Chun *et al.*, 2004; Hiraoka *et al.*, 1998; Sounni *et al.*, 2002). Le domaine CA de MT1-MMP est aussi responsable du clivage de la protéine multifonctionnelle gC1qR et de LRP-1 (Low density lipoprotein receptor (LDLR)-

related protein-1), un récepteur responsable de l'endocytose d'une panoplie de ligands, tels que les thrombospondines 1 et 2, l' α 2-macroglobuline (α 2-M), l'u-PA et le t-PA (Rozanov *et al.*, 2002; Rozanov *et al.*, 2004). Le domaine CA de MT1-MMP est aussi impliqué dans la régulation de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) ainsi que l'inflammation, puisque cette MMP est capable de cliver les cadhérines N et E, mais aussi la cytokine proTNF- α et la chimiokine IL-8 (Barbolina et Stack. 2008; Tam *et al.*, 2004). Finalement, en dégradant la fibronectine et le delta-like 1 (Dll-1), un ligand de Notch, la portion catalytique de MT1-MMP a aussi un impact dans la régulation de la voie de signalisation Notch ainsi que dans la fusion myoblastique (Jin, G. *et al.*, 2011; Ohtake *et al.*, 2006).

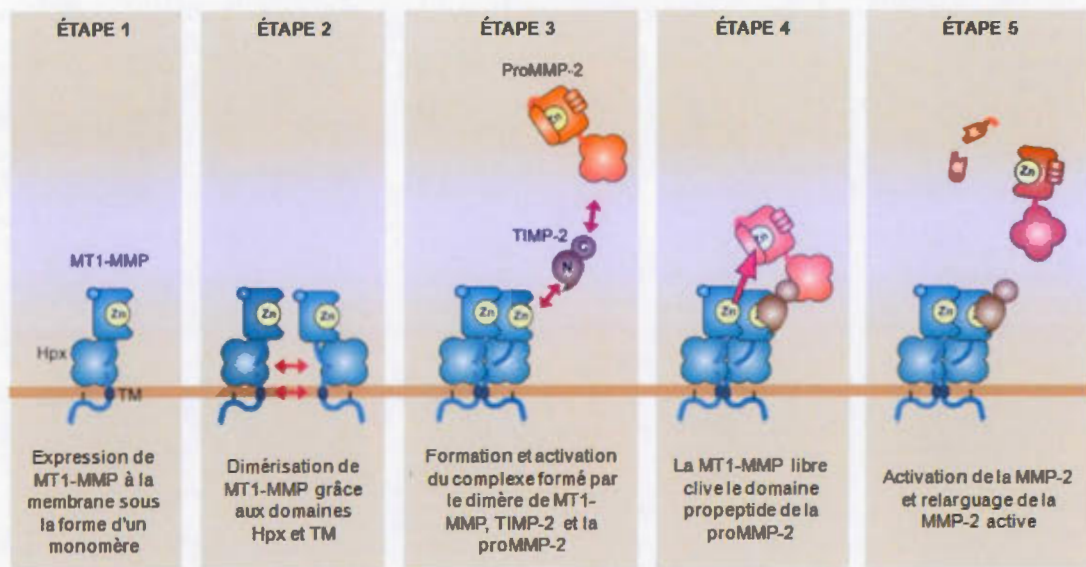


Figure 3.4 Mécanisme d'activation de la proMMP-2. Lors des deux premières étapes du mécanisme d'activation de la proMMP-2, deux molécules de MT1-MMP doivent nécessairement être ancrées à la membrane plasmique pour se dimériser via leurs domaines hémopexine (Hpx) et transmembranaire (TM). Lors de la troisième étape, il y a formation d'un complexe ternaire entre le dimère de MT1-MMP, la protéine TIMP-2 et la forme latente de MMP-2 (ProMMP-2). Ensuite, la MT1-MMP libre clive le prodomaine de la proMMP-2 à l'aide de son domaine catalytique actif, ce qui entraîne l'activation de la MMP-2. Enfin, la MMP-2 active est relarguée dans la matrice extracellulaire. (Zn, Zinc). Adaptée de (Itoh. 2015).

En ce qui concerne les domaines hémopexine (Hpx) et cytoplasmique (CT), ce sont eux qui s'occupent des diverses fonctions non-protéolytiques de MT1-MMP. Essentiellement, la seule fonction importante du domaine Hpx est de stabiliser et de faciliter le clivage de récepteurs, tels que CD44 et le collagène (Suenaga *et al.*, 2005). De plus, des études ont démontré que le domaine Hpx doit se lier au domaine Hpx d'une autre MT1-MMP pour procéder à l'activation de la proMMP-2 (Tochowicz *et al.*, 2011). Par ailleurs, il est aussi responsable du renouvellement protéique de MT1-MMP (Toth *et al.*, 2002).

3.3.3 Le domaine cytoplasmique et ses protéines d'interaction

Depuis sa découverte, MT1-MMP a été énormément étudié pour ses domaines catalytique et hémopexine, car ceux-ci occupent des rôles centraux dans une panoplie de processus tant physiologiques que pathologiques. Les mécanismes moléculaires décrivant les fonctions extracellulaires de MT1-MMP ont d'ailleurs été le titre de nombreux articles scientifiques et sont encore aujourd'hui très primés. Par contre, comme les essais cliniques utilisant des inhibiteurs ciblant spécifiquement le domaine catalytique de MT1-MMP ont donné lieu à des résultats assez modestes, au début des années 2000, les chercheurs ont commencé à s'intéresser au petit domaine cytoplasmique de MT1-MMP. En effet, les 20 acides aminés de la queue cytoplasmique de MT1-MMP ont fait l'objet de nombreuses études, notamment en ce qui concerne sa régulation à la membrane (internalisation/recyclage), la formation d'oligomères, la migration cellulaire, mais aussi dans l'induction de voies de signalisation, telles que ERK (Galvez *et al.*, 2004; Gingras *et al.*, 2001; Lehti *et al.*, 2002; Uekita *et al.*, 2001). Donc, comme il possède de nombreuses fonctions intracellulaires, le domaine cytoplasmique de MT1-MMP est devenu une cible thérapeutique primée et certains groupes de recherche en ont profité pour voir s'il était possible de réguler ces fonctions grâce à des protéines adaptatrices dont le mode

d'action serait d'interagir avec ce dernier (Uekita *et al.*, 2001). Pour ce faire, plusieurs techniques permettant de confirmer l'interaction entre deux protéines, telles que le Yeast two hybrid (Y2H), le GST pull-down, la co-immunoprécipitation (Co-IP) ont été utilisées et ont démontré qu'il existe pas moins d'une dizaine de protéines pouvant lier le domaine cytoplasmique de MT1-MMP. (Figure 3.3) Cependant, il est important de noter que toutes ces protéines n'ont aucune ressemblance au niveau de leur structure, ce qui complexifie la découverte de nouveaux ligands.

Parmi les protéines d'interaction connues pour avoir une liaison avec le domaine cytoplasmique de MT1-MMP, il y a la sous-unité $\mu 2$ de la protéine adaptatrice AP2 (Uekita *et al.*, 2001). Celle-ci est d'ailleurs importante pour le recyclage de MT1-MMP dans les vésicules pourvues de clathrines. Ensuite, d'autres études ont démontré que p130Cas ainsi que la forme phosphorylée de la Cavéoline-1 (p-cavéoline-1) sont aussi des ligands de la portion intracellulaire de MT1-MMP (Gingras *et al.*, 2008; Labrecque *et al.*, 2004). Une étude a démontré que LAMTOR1 (p27RF-Rho) interagissait aussi avec le domaine cytoplasmique de MT1-MMP afin de contrôler l'activation de RhoA (Hoshino *et al.*, 2009). De plus, Rozanov et collègues ont démontré que le domaine cytoplasmique de MT1-MMP pouvait aussi lier la protéine gC1qR, un régulateur de la compartimentalisation cellulaire (Rozanov *et al.*, 2002). De surcroît, MTCBP-1 (MT1-MMP cytoplasmic tail binding protein-1) fait aussi partie du groupe des protéines pouvant lier la portion cytoplasmique de MT1-MMP (Uekita *et al.*, 2004). Récemment, plusieurs études ont montré que les protéines FIH-1 (Facteur inhibant HIF-1), GRASP55 (Golgi reassembly stacking protein 55) et palladin (cytoskeletal associated protein) pouvaient aussi lier le domaine cytoplasmique de MT1-MMP (Roghi *et al.*, 2010; Sakamoto et Seiki. 2010; von Nandelstadh *et al.*, 2014).

CHAPITRE IV

PROJET DE RECHERCHE

4.1 Problématique

Encore aujourd'hui, les glioblastomes font partie des cancers les plus difficiles à éradiquer à cause de leur grande capacité à résister et survivre aux sources intenses de stress (Belda-Iniesta *et al.*, 2006). En effet, le traitement le plus efficace disponible à ce jour est l'administration du témozolomide (TMZ) couplée à la radiothérapie. Malheureusement, à cause des différents mécanismes de résistance des glioblastomes, celui-ci ne prolonge la vie des patients que de deux ans tout au plus (Johannessen et Bjerkvig, 2012). En fait, comme ces mécanismes sont complexes, peu caractérisés et mettent en branle une quantité phénoménale de protéines et de voies de signalisation, le ciblage thérapeutique n'est donc pas spécifique et entraîne souvent des effets secondaires importants (Alexandru-Abrams *et al.*, 2014). De plus, le faible taux de survie est une indication claire de l'absence de biomarqueurs fiables et a comme conséquence un diagnostic tardif de la maladie. Il est donc impératif d'expandre nos connaissances envers la régulation des mécanismes de résistance ainsi que sur les acteurs moléculaires qui sont à la base de ceux-ci.

Un nouveau processus cellulaire s'est vu attribuer un rôle important au sein de plusieurs pathologies, incluant le cancer. Celui-ci, nommé autophagie, est très en vogue depuis le début des années 2000 et a permis de mieux comprendre comment les cellules peuvent survivre en cas de stress, qu'il soit de type endogène ou exogène (Karsli-Uzunbas *et al.*, 2014; Li, L. *et al.*, 2015). Même si les mécanismes d'induction et de régulation de l'autophagie sont relativement bien caractérisés au

niveau physiologique et dans certaines maladies telles que les dysfonctions cardiaques, le diabète et les maladies neurogénératives, ils ne le sont pas dans les glioblastomes (Barlow et Thomas. 2015; Gonzalez-Polo *et al.*, 2015; Pillai *et al.*, 2014). En effet, avec le peu d'évidences disponibles dans la littérature, il devient opportun de vérifier l'impact qu'a l'autophagie dans les mécanismes de résistance des glioblastomes et de voir comment ce processus pourrait être ciblé à des fins thérapeutiques.

Par ailleurs, en raison de leur forte présence au sein des tumeurs cérébrales de haut grade, les MMPs ont également fait l'objet de plusieurs études fondamentales et ont mené à la création de quelques dizaines d'inhibiteurs ciblant leurs fonctions catalytiques (Folgueras *et al.*, 2004). Les études cliniques ne donnant que des résultats décevants, les chercheurs ont dû se résigner à élucider les fonctions potentielles des autres domaines des MMPs. De plus, les MT-MMPs sont devenues de plus en plus une cible thérapeutique de choix dû au fait qu'elles interagissent avec des protéines membranaires et aussi qu'elles possèdent, pour la plupart, un domaine cytoplasmique peu documenté. Ainsi, les diverses recherches sur le domaine hémapexine et sur le domaine cytoplasmique de MT1-MMP ont donné lieu à d'intéressantes découvertes (Basu *et al.*, 2012; Nyalendo *et al.*, 2007). En effet, en plus de son rôle important dans l'induction de la migration, dans son auto-régulation et dans l'induction de la nécrose, celle-ci est en mesure de se lier à des protéines intracellulaires via son domaine cytoplasmique (Currie *et al.*, 2007; Gingras *et al.*, 2001; Uekita *et al.*, 2001). Il est donc primordial de déterminer quelles sont les fonctions exercées par le domaine cytoplasmique de MT1-MMP dans les glioblastomes ainsi que de comprendre comment les protéines qui interagissent avec ce dernier peuvent influencer la régulation de ces fonctions. La caractérisation de ces nouvelles fonctions et de la relation entre le domaine cytoplasmique de MT1-MMP et ses protéines d'interaction nous permettra ainsi de développer de nouvelles approches thérapeutiques.

4.2 Hypothèses de travail

Depuis quelques années, les recherches entourant le domaine cytoplasmique de MT1-MMP ont donné lieu à des découvertes phénoménales. En effet, la découverte de ses nouvelles fonctions non-protéolytiques telles que l'induction de plusieurs voies de signalisation, la régulation de divers processus physiologiques et pathologiques et l'interaction avec des protéines intracellulaires laissent place maintenant à la caractérisation de nouveaux mécanismes moléculaires et de nouvelles fonctions qui pourraient en partie expliquer le phénotype radio- et chimiorésistant des glioblastomes. De plus, de nombreuses études portant sur la régulation de l'autophagie dans divers types de cancer ont conclu qu'il pouvait y avoir une corrélation avec le niveau d'expression de certaines MMPs. Par contre, aucune étude n'a fait la démonstration que l'autophagie pouvait être régulée par une MMP. Ainsi, la première hypothèse que nous émettons est la suivante :

Hypothèse #1 : Le domaine cytoplasmique de MT1-MMP signale l'induction de l'autophagie dans les cellules de glioblastomes humains.

Ensuite, considérant que l'autophagie est régulée par de nombreuses voies de signalisation et qu'elle implique plusieurs protéines effectrices telles que BNIP3, l'implication de MT1-MMP dans ce processus cellulaire nécessite une caractérisation des mécanismes moléculaires sous-jacents. Considérant que des études ont établi une corrélation entre l'expression de BNIP3 et la phosphorylation de STAT3 (Akla *et al.*, 2012; Bulcao *et al.*, 2010), la deuxième hypothèse que nous émettons est la suivante :

Hypothèse #2 : Le domaine cytoplasmique de MT1-MMP induit une cascade de transduction de signaux impliquant la voie JAK2-STAT3 qui mène à l'induction de BNIP3 dans les glioblastomes humains.

Finalement, l'identification de protéines ayant la capacité d'interagir avec le domaine cytoplasmique de MT1-MMP a permis d'envisager la possibilité d'interférer dans ses fonctions non-protéolytiques et ainsi jouer sur sa contribution dans le potentiel invasif

et agressif des glioblastomes. Par conséquent, la dernière hypothèse que nous émettons est la suivante :

Hypothèse #3 : MTCBP-1 régule l'autophagie signalée par MT1-MMP en interagissant avec son domaine cytoplasmique.

4.3 Objectifs de recherche

En premier lieu, nous allons étudier l'impact de MT1-MMP, et plus particulièrement son domaine cytoplasmique, sur l'induction de l'autophagie et de ses biomarqueurs par la Concanavoline-A dans les cellules de glioblastome multiforme humain (U87). Comme la ConA est reconnue dans la littérature pour induire à la fois l'autophagie (Chang *et al.*, 2007), mais aussi l'expression génique et protéique de MT1-MMP (Yu, M. *et al.*, 1997), cette lectine provenant du haricot sabre (*Canavalia Ensiformis*) sera notre agent pharmacologique de choix. De plus, la lignée cellulaire de glioblastome multiforme humain U87 sera utilisée parce qu'elle exprime de hauts niveaux de MT1-MMP endogène et l'autophagie y a été très peu documentée. En second lieu, nous déterminerons le rôle du domaine cytoplasmique de MT1-MMP dans l'induction de BNIP3, un biomarqueur de l'autophagie reconnu pour être induit par la ConA, ainsi que le mécanisme moléculaire (l'axe de signalisation) qui est à la base de cette induction. En dernier lieu, nous étudierons l'impact de MTCBP-1, une protéine très peu caractérisée mais reconnue pour interagir avec le domaine cytoplasmique de MT1-MMP dans des cellules de fibrosarcome humain HT1080, sur la régulation de l'autophagie médiée par MT1-MMP (Uekita *et al.*, 2004). Nous allons donc utiliser plusieurs techniques, dont le Förster Resonance Energy Transfer-Acceptor Photobleaching (FRET-AP), la résonance plasmonique de surface et l'immunoprécipitation (IP), pour valider l'interaction entre MTCBP-1 et la portion intracellulaire de MT1-MMP pour ensuite confirmer son effet sur l'autophagie signalée par MT1-MMP.

CHAPITRE V

ARTICLE 1 : CONCANAVALIN-A-INDUCED AUTOPHAGY BIOMARKERS REQUIRES MEMBRANE TYPE-1 MATRIX METALLOPROTEINASE INTRACELLULAR SIGNALLING IN GLIOBLASTOMA CELLS

5.1 Contributions

Cet article a été publié dans la revue scientifique *Glycobiology*.

*Les références de cet article seront incorporées à la section Bibliographie.

La référence complète de l'article est sous cette forme :

Pratt J., Roy R. & Annabi B. *Concanavalin-A-induced autophagy biomarkers requires membrane type-1 matrix metalloproteinase intracellular signalling in glioblastoma cells*. (2012) *Glycobiology*. 22(9) : 1245-1255

Jonathan Pratt : Expérimentation et essais biologiques, analyse des résultats, montage des figures, rédaction du manuscrit

René Roy : Expertise, analyse des résultats et co-financement du projet

Borhane Annabi : Analyse des résultats, montage des figures, rédaction du manuscrit, conception et co-financement du projet

**Concanavalin-A-induced autophagy biomarkers requires membrane
type-1 matrix metalloproteinase intracellular signalling in
glioblastoma cells**

Jonathan Pratt¹, René Roy² and Borhane Annabi^{1*}

*¹Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Centre de Recherche BioMED and ²Centre
de Recherche PharmaQAM, 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

5.2 Résumé

Divers essais pré-cliniques pour le développement des thérapies anti-cancer soutiennent que la Concanavaline-A (ConA), une lectine provenant de la plante *Canavalia Ensiformis*, possède des propriétés anti-néoplasiques qui ciblent les processus apoptotiques et autophagiques de plusieurs types de cancer. Étant donné que la MT1-MMP, une métalloprotéase matricielle ancrée à la membrane, est une glycoprotéine fortement exprimée dans les glioblastomes qui contribue à la signalisation pro-apoptotique dans les cellules cancéreuses cérébrales, nous avons investigué sur l'impact que pourrait avoir MT1-MMP sur l'autophagie. Des 4 lectines testées, seule la ConA, bien documentée pour lier les mannopyranosides et glycopyranosides mais aussi pour induire l'expression de MT1-MMP, a entraîné une hausse dans la production de vacuoles acides autophagiques (AVO) tel que démontré avec le marquage à l'acridine orange. Bien que l'inhibition de la fonction catalytique de MT1-MMP par l'ilomastat ou l'actinonine n'ait pas eu d'effet sur la production d'AVO induite par la ConA, la répression génique de MT1-MMP a complètement inhibé les effets de celle-ci. La surexpression de la forme complète de MT1-MMP (Wt-MT1-MMP) a mené à l'activation de la proMMP-2 ainsi qu'à la production de puncta GFP-LC3, indiquant la formation d'autophagosomes, tandis que la forme délétée du domaine cytoplasmique de MT1-MMP (Δ Cyto-MT1-MMP) a simplement activé la proMMP-2 signifiant que l'induction de l'autophagie serait médiée par celui-ci. La ConA a entraîné une hausse de l'expression génique de BNIP3, ATG3, ATG12 et ATG16L1 qui étaient toutes supprimées lorsque MT1-MMP était réprimé. Enfin, les données obtenues au niveau moléculaire confirment les effets pro-autophagiques de la ConA dans les cellules de glioblastome et révèlent une nouvelle fonction pour MT1-MMP dans l'induction de l'autophagie qui est souvent caractéristique de la réponse cellulaire obtenue lors des traitements de chimiothérapie.

Mots-clés : Autophagie, MT1-MMP, Concanavaline-A, BNIP3, Glioblastome

5.3 Abstract

Pre-clinical trials for cancer therapeutics support the anti-neoplastic properties of the lectin from *Canavalia ensiformis* (Concanavalin-A, ConA) in targeting apoptosis and autophagy in a variety of cancer cells. Given that MT1-MMP, a plasma membrane-anchored matrix metalloproteinase is a glycoprotein strongly expressed in radioresistant and chemoresistant glioblastoma, mediates pro-apoptotic signalling in brain cancer cells, we investigated whether MT1-MMP could also signal autophagy. Among the four lectins tested, we found that the mannosylated/glycosylated-binding ConA, which is also well documented to trigger MT1-MMP expression, increases autophagic acidic vacuoles formation as demonstrated by Acridine Orange cell staining. While siRNA-mediated MT1-MMP gene silencing effectively reversed ConA-induced autophagy, inhibition of the MT1-MMP extracellular catalytic function with Actinonin or Ilomastat did not. Conversely, direct overexpression of the recombinant Wt-MT1-MMP protein triggered proMMP-2 activation and GFP-LC3 puncta indicative of autophagosomes formation, while deletion of MT1-MMP's cytoplasmic domain disabled such autophagy induction. ConA-treated U87 cells also showed an upregulation of BNIP3 and of autophagy-related gene members ATG3, ATG12 and ATG16L1, which respective inductions were reversed when MT1-MMP gene expression was silenced. Altogether, we provide molecular evidence supporting the pro-autophagic mechanism of action of ConA in glioblastoma cells. We also highlight new signal transduction functions of MT1-MMP within apoptotic and autophagic pathways that often characterize cancer cell responses to chemotherapeutic drugs.

Key words : Autophagy, MT1-MMP, Concanavalin-A, BNIP3, Glioblastoma

5.4 Introduction

The expression level of numerous members of the matrix metalloproteinase (MMP) family has been shown to correlate with the grade level of gliomas, including that of the membrane type 1 (MT1)-MMP (Pagenstecher *et al.*, 2001). Most MMPs are produced and released outside the cell, however the MT-MMPs are anchored to the cell membrane and a number of them possess a cytoplasmic domain recognized to contribute to important intracellular signalling functions (Gingras *et al.*, 2001; Li, X. Y. *et al.*, 2008). More importantly, glioma-associated microglia has been shown to induce and exploit MT1-MMP expression for tumor expansion, while MT1-MMP overexpression in the glioma cells was rather found lethal (Markovic *et al.*, 2009). Besides its well-known roles in the activation of proMMP-2 and in intrinsic proteolytic activity towards extracellular matrix (ECM) molecules, many other functions have been assigned to MT1-MMP. In recent years, fundamental new roles of MT1-MMP have been documented in bioactive lipophospholipid signaling (Annabi *et al.*, 2009a), NF- κ B-mediated cyclooxygenase (COX)-2 regulation (Annabi *et al.*, 2009c; Han *et al.*, 2001; Sina *et al.*, 2010), radioresistance in both glioma (Wick *et al.*, 2002; Wild-Bode *et al.*, 2001) and endothelial cells (Annabi *et al.*, 2003a), and as a cell death sensor/effector (Belkaid *et al.*, 2007; Currie *et al.*, 2007; Proulx-Bonneau *et al.*, 2011b). More importantly, a role for MMPs in autophagic cell death has been suggested (Augustin *et al.*, 2009), but the exact mechanisms and their biological significance in this process remain poorly understood.

Current conventional cancer therapies fail to mediate their effects in a target-specific fashion (Quant *et al.*, 2010; Sampson *et al.*, 2011). Among the reasons, the extremely unfavorable prognosis for patients suffering from glioblastomas was strongly correlated to inefficient targeting of their intrinsic apoptosis resistance phenotype. Besides apoptosis-based therapies, induction of autophagic cell death is

becoming an alternative and emerging concept to trigger glioma cell death and to exploit caspase-independent programmed cell death pathways for the development of novel glioma therapies (Kogel *et al.*, 2010). Induction of autophagic cell death may therefore help stop tumour development and optimize cancer treatment modalities (Ceteci *et al.*, 2011; Chen, L. *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2011). Interestingly, recent evidence indicates the clinically approved antibiotic minocycline, a highly lipid-soluble antibacterial known for its superior ability to cross the blood-brain barrier, to act as a promising new candidate for adjuvant therapy against malignant gliomas by reducing MT1-MMP expression (Markovic *et al.*, 2011). More importantly, minocycline effectively inhibited tumor growth and induced autophagy in a xenograft tumor model of C6 glioma cells (Liu, W. T. *et al.*, 2011). Whether an intrinsic role can there of be attributed to MT1-MMP in autophagy processes remains unknown.

Numerous cellular recognition processes including development, differentiation, morphogenesis and cell migration, are regulated upon interactions between carbohydrate-binding proteins (lectins) and cell surface oligosaccharide moieties of glycoproteins (Kohn *et al.*, 2004). In the present study, we used the lectin from *Canavalia ensiformis* (Concanavalin-A, ConA), commonly used to trigger both MT1-MMP-mediated activation of latent proMMP-2 (Lafleur *et al.*, 2006; Lin et Levitan. 1991; Yu, M. *et al.*, 1997; Zucker *et al.*, 2002), and cell death events (Wild-Bode *et al.*, 2001). Given ConA has been shown to bear potential anti-neoplastic properties (Lei et Chang. 2009; Li, W. W. *et al.*, 2011), we assessed the role of MT1-MMP in the ConA-mediated signalling of autophagy processes. We show through structure-function studies the direct requirement of the intracellular domain of recombinant MT1-MMP constructs in autophagy induction. Differential autophagy-related gene arrays enabled us to further link MT1-MMP-mediated signalling to BCL2/adenovirus E1B 19 kDa interacting protein 3 (BNIP3), and to identify autophagy-related genes ATG3, ATG12 and ATG16-L1 expressions among candidates involved in the autophagic cell death of glioblastoma cells.

5.5 Results

High cell surface mannopyranoside residues contribute to lectin-induced autophagy. Given the documented cell death inducing potential of plant lectins (Fu, L. L. *et al.*, 2011), we further tested their potential to trigger autophagy. Serum-starved U87 glioblastoma cells were treated with the following four lectins : *Canavalia ensiformis*, *Phaseolus max L.*, *Arachis Hypogaea*, and *Triticum vulgare*, and then stained with Acridine Orange. While chromatin staining remained unchanged (Fig.1A, upper panels in green), we observed that significant acidic vesicular organelles (AVO) formation (Fig.5.1A, lower panels in red) was specifically associated with ConA (*Canavalia ensiformis*). Given the lectin specific and distinctive cell surface carbohydrate moieties interaction potential (Fig.5.1B), one can safely speculate that such autophagy induction may necessitate high mannosyl residues, and that AVO formation correlates with autophagosome formation as visualized through electronic microscopy of untreated and ConA-treated cells (Fig.5.1C).

Concanavalin-A triggers proMMP-2 activation and autophagy. Concanavalin-A is a well-documented lectin which, through its binding to carbohydrate moieties on cell surface glycoproteins, elicits very efficient *in vitro* induction of MT1-MMP expression (Annabi *et al.*, 2009c; Fortier *et al.*, 2008; Sina *et al.*, 2010). Serum-starved U87 glioblastoma cells were therefore treated with increasing concentrations of ConA and then stained with Acridine Orange. Pictures of U87 treated cells were taken using fluorescent microscopy as described in the Methods section. ConA was found to dose-dependently increase the production of acidic vesicular organelles (Fig.5.2A). Then, proMMP-2 activation into MMP-2 was assessed by gelatin zymography in response to increasing concentrations of ConA (Fig.5.2B). When proMMP-2 activation (MMP-2 / proMMP-2 ratio) was plotted

against Acridine Orange staining intensity, a positive linear correlation ($r^2=0.98$) was observed (Fig.5.2C). Treatment of serum-starved U87 glioblastoma cells with ConA for up to 24 hours revealed increasing production of acidic vesicular organelles, while no effect was observed in untreated control cells (Fig.5.2D).

Concanavalin-A-induced autophagy is independent of MT1-MMP catalytic function. A structure-function study was next used to address whether MT1-MMP's catalytic domain is responsible for the ConA-induced autophagy. U87 cells were treated with Ilomastat, a broad range MMP inhibitor known to target MT1-MMP extracellular domain catalytic functions, or Actinonin, an aminopeptidase N/CD13 inhibitor known to target MT1-MMP-mediated proMMP-2 activation (Sina *et al.*, 2009) and stained with Acridine Orange. We show that Ilomastat and Actinonin were unable to reverse the effect of ConA-induced autophagy (Fig.5.3A and B), although both efficiently inhibited MT1-MMP-mediated proMMP-2 activation into MMP-2 (Fig.5.3C). These results suggest that MT1-MMP's extracellular catalytic domain is not involved in the induction of autophagy.

MT1-MMP gene silencing antagonizes Concanavalin-A-induced autophagy. Concanavalin-A is well known to trigger autophagy (Chang *et al.*, 2007) and MT1-MMP expression (Yu, M. *et al.*, 1997). In order to delineate the specific contribution of MT1-MMP to ConA-induced autophagy, gene silencing was performed using either a scrambled sequence of siRNA (siScrambled) or a siRNA directed against MT1-MMP gene expression (siMT1-MMP). We observed that serum-starved U87 glioblastoma cells treated with ConA triggered MT1-MMP gene expression in both Mock and siScrambled conditions (Fig.5.4A). In contrast, siMT1-MMP-transfected cells invalidated ConA's ability to trigger MT1-MMP gene expression. MT1-MMP gene silencing also abrogated the functional role of MT1-MMP in ConA-induced proMMP-2 activation into MMP-2 as assessed by gelatin zymography (Fig.5.4B). Staining for acidic vesicular organelles with Acridine Orange (Fig.5.4C) revealed that

MT1-MMP gene silencing efficiently abrogated ConA's ability to trigger autophagy (Fig.5.4D). Collectively, this suggests that MT1-MMP is an important contributor to ConA-mediated autophagy.

The intracellular domain of MT1-MMP is required to signal autophagy.

Given that MT1-MMP is important for ConA-induced autophagy and that we excluded MT1-MMP's extracellular domain functions, we next wished to assess the direct contribution of MT1-MMP in autophagy induction. More specifically, design of structure-function approaches, using recombinant MT1-MMP constructs, was performed using cDNA encoding either full length Wt-MT1-MMP, a cytoplasmic-deleted (Δ -Cyto)-MT1-MMP, or a cytoplasmic domain and transmembrane domain (Δ -TM) soluble MT1-MMP. Transient transfections were performed in U87 glioblastoma cells which were subsequently serum-starved. Acridine Orange staining (Fig.5.5A) revealed that only the Wt-MT1-MMP overexpression enabled autophagy, while the Δ -Cyto-MT1-MMP and Δ -TM-MT1-MMP forms had no effect (Fig.5.5B). The respective conditioned media and cell lysates were used to validate the overexpression and function of the overexpressed recombinant proteins. Only Wt-MT1-MMP and Δ -Cyto-MT1-MMP were able to constitutively activate proMMP-2 (Fig.5.5C, upper panel), while only the Δ -TM-MT1-MMP was detected in the conditioned media (Fig.5.5C, 2nd panel). Green fluorescent protein-light chain 3 (pEGFP-LC3) puncta was also used to assess autophagosome formation. Cells were co-transfected with a plasmid encoding pEGFP-LC3 combined to either Wt-MT1-MMP, Δ -Cyto-MT1-MMP or Δ -TM-MT1-MMP cDNA plasmids as described above. Significant puncta, indicative of autophagosome formation, were only observed within cells overexpressing Wt-MT1-MMP or cells that were treated with ConA (Fig.5.5D).

ConA-induced autophagy triggers specific MT1-MMP-mediated autophagy related genes. In light of the evidence that MT1-MMP contributes to ConA-mediated autophagy, we used a gene array approach to identify ConA-induced autophagy gene targets. Transcriptional profiling was performed and, among the 89 autophagy and autophagosome formation-related genes (Itakura et Mizushima. 2010), we found BNIP3, ATG3, ATG12 and ATG16L1 to be up-regulated, while ATG16L2 gene expression was down-regulated (Fig.5.6, left panel). When ConA treatment was performed in siMT1-MMP-transfected cells, expression of these 4 genes returned to basal levels (Fig.5.6, right panel). Specific contribution of MT1-MMP in the transcriptional regulation of those 4 genes was further confirmed in transfected cells. A single cDNA amplicon was found when qRT-PCR was performed for BNIP3, ATG3, ATG12 and ATG16L1 (Fig.5.7A). Only Wt-MT1-MMP enabled gene expression increases, while the Δ -Cyto-MT1-MMP remained ineffective (Fig.5.7B). In conclusion, BNIP3 and the ATG gene members 3, 12, 16L1, can therefore be considered under MT1-MMP-mediated transcriptional control in ConA-treated cells.

5.6 Discussion

There is accumulating evidences implicating autophagy in cancer, neurodegenerative diseases, infectious as well as cardiovascular diseases (Kroemer et Levine. 2008; Mizushima *et al.*, 2008). While the specific roles of MMP in autophagy still remain to be unraveled, chemical modulators of autophagy such as the selective MMP-2 inhibitor ARP101 (Jo *et al.*, 2011), seem to offer some potential for treatment of these diseases although the precise molecular mechanism of action remains unknown. Interestingly, we recently reported the molecular mechanism of action of Brefeldin-A, another well-known autophagy regulator, through sequestration of MT1-MMP and induction of endoplasmic reticulum (ER) stress (Proulx-Bonneau *et al.*, 2011b). This new role of a membrane-bound MMP in transducing Brefeldin-induced ER stress signalling is supported by the emerging data which indicate that ER stress is also a potent inducer of macroautophagy (Matus *et al.*, 2008; Yin *et al.*, 2012). It is currently debated whether such process either enhances cell survival or commits cells to non-apoptotic death (Hoyer-Hansen et Jaattela. 2007).

In cancer cells, induction of autophagy serves as an adaptive response that can lead to chemoresistance mechanisms and increased cell survival (Reuter *et al.*, 2010), many of the features also associated to high cellular MT1-MMP levels (Trog *et al.*, 2006). Thus, the inhibition of autophagy combined with inducers of metabolic stress or chemotherapeutic agents could enhance effective anticancer therapy by inhibiting stress adaptation and increasing cell killing. Pharmacological approaches have demonstrated that diet-derived EGCG, a polyphenol shown to trigger autophagy (Li, W. *et al.*, 2011) and to sensitize cells to radiation (McLaughlin *et al.*, 2006), as well as mTOR inhibitors such as rapamycin, can be used to increase the radiosensitivity of glioblastoma cells by the induction of autophagy (Zhuang *et al.*, 2009). In support to

a possible role for MT1-MMP in intracellular transduction events regulation, rapamycin was recently shown to upregulate MT1-MMP expression in PTEN(+/-) cells via PI3K activity (Kim, S. *et al.*, 2010). Tumor suppressors like Beclin-1, PTEN and p53 are also crucial players in the induction and regulation of autophagy (Liu, J. J. *et al.*, 2011). Our current study in fact provides evidence that MT1-MMP's intracellular domain is an absolute requirement for lectin-induced autophagy. Such evidence is further supported by the demonstration that failure of MT1-MMP to localize at the plasma membrane trigger ER stress and abrogated COX-2 expression (Proulx-Bonneau *et al.*, 2011b). 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 (Proulx-Bonneau *et al.*, 2011b). As a consequence in tumorigenic processes, it is hypothesized that MT1-MMP may become either active inside cancer cells prior to its presentation at the cell surface, or to transduce some crucial signalling once anchored to the plasma membrane. Whether combined regulation of pericellular proteolysis, and cleavage of crucial intracellular compartmentalized substrate proteins also involves MT1-MMP-mediated autophagic processes remain to be determined. Finally, lectin-targeted cell surface receptor-type glycoproteins often induce their intracellular signaling once oligomerized (Lehti *et al.*, 2002; Rozanov *et al.*, 2001). How such a phenomenon occurs in ConA-mediated MT1-MMP intracellular signaling mechanism still remains speculative. It is thought that MT1-MMP glycosylation status affects its substrate targeting properties (Wu *et al.*, 2004) and autolysis (Remacle *et al.*, 2006). Whether, such MT1-MMP oligomerization occurs upon ConA treatment was however not observed in our experimental conditions.

Generation of nutrients and energy in response to starvation or other metabolic stress conditions is observed in tumor cells upon autophagy processes in order to promote cell survival. In response to numerous stress conditions, autophagy is therefore able to protect dormant cells so that to resume growth in more favorable

conditions (Mathew, Robin *et al.*, 2007). The diffuse infiltrative phenotype of gliomas into normal brain tissue of patients (Stewart, L. A., 2002), combined to the recently reported presence of glioma-initiating cells, may all be conditions that favor the initiation and recurrence of glioblastoma (Zhuang *et al.*, 2011). Accordingly, autophagy was also shown to play an essential role in the regulation of glioma-initiating cells tumorigenic potential (Zhuang *et al.*, 2011). Given that groups currently defining staging for neoplasms assess and incorporate measures of the presence of apoptosis, autophagy, and necrosis (Demaria *et al.*, 2010), this suggests autophagy could be considered as a promising therapeutic target in specifically-defined subsets of glioblastomas. As such, the documented anti-proliferative and anti-tumor activities of ConA against a variety of cancer cells have been reported, where numerous signalling axis have been shown to transduce some of its effects through IKK-NF- κ B-COX-2, SHP-2-MEK-1-ERK, and SHP-2-Ras-ERK (Li, W. W. *et al.*, 2011). Interestingly, evidence that MT1-MMP also activates a number of common intracellular signal pathways including the ERK pathway, the focal adhesion kinase (FAK), Src, RhoA/ROK, Rac and NF- κ B pathways has been reported (Takino *et al.* 2004; Annabi *et al.* 2005; Sato *et al.* 2005; Sounni and Noel 2005; Annabi *et al.* 2009b). More importantly, numerous scaffolding and intracellular signaling proteins have also been found to be recruited and to interact with MT1-MMP's intracellular domain. Among others, these include gC1qR (Rozaanov *et al.*, 2002), Caveolin-1 (Labrecque *et al.*, 2004), MTCBP-1 (Hirano *et al.*, 2005), actin-cortactin (Artym *et al.*, 2006), the radixin FERM domain (Terawaki *et al.*, 2008), 3BP2 (Proulx-Bonneau *et al.*, 2011a), and the adaptor protein p130Cas (Gingras *et al.*, 2008). Although structural evidence for the transducing impact of the ⁵⁷¹LLY⁵⁷³ intracellular domain of MT1-MMP has been provided, combined to transcriptional regulation evidence of VEGF (Sounni *et al.*, 2004), Smad1 (Freudenberg et Chen. 2007), or tumor suppressor Dickkopf-3 (Saeb-Parsy *et al.*, 2008), it has yet to be further documented on how autophagy biomarkers transcriptional regulation is performed by MT1-MMP.

Our current data also highlight, for the first time, an MT1-MMP-mediated transcriptional regulation of autophagy biomarkers BNIP3, ATG3, ATG12, ATG16L1, ATG16L2 upon ConA treatment. This was demonstrated indirectly through a differential gene array approach (Fig.5.5), and confirmed directly upon overexpression of the Wt-MT1-MMP recombinant protein (Fig.5.6). Given the recent report that BNIP3 acts as transcriptional repressor of apoptosis-inducing factor expression and prevents cell death in human malignant gliomas (Burton, T. R. *et al.*, 2009), our data further link the possible contribution of MT1-MMP to the radioresistance and chemotherapeutic resistance index of brain tumours. In fact, BNIP3 is expressed at high levels in solid tumors, including glioblastoma, where its nuclear location is believed to confer a survival advantage to glioma cells (Burton, T. R. *et al.*, 2006). BNIP3 up-regulation under hypoxic conditions by the transcription factor HIF-1 remains open for debate (Namas *et al.*, 2011; Zhao, Y. *et al.*, 2012), although demonstrated to locate within hypoxic regions of tumours (Sowter *et al.*, 2001). Given the recent MT1-MMP demonstrated role in hypoxia-regulated events (Proulx-Bonneau et Annabi. 2011; Proulx-Bonneau *et al.*, 2011a), it becomes tempting to assume possible similar events taking place in the MT1-MMP-mediated regulation of BNIP3 in autophagy. Altogether, these biological findings shed light on new perspectives of ConA as a potential anti-neoplastic agent targeting apoptosis, autophagy and anti-angiogenesis in pre-clinical or clinical trials for cancer therapeutics.

5.7 Material and methods

Materials : Protein assays were performed with the micro bicinchoninic acid protein assay reagents (Pierce, 23235), and standard curves generated with bovine serum albumin (BSA; Calbiochem, 2980). All lectins were purchased from Sigma-Aldrich Canada.

Cell culture : The human U87 glioblastoma cell line (American Type Culture Collection, HTB-14) were maintained in Eagle's Minimum Essential Medium (Wisent, 320-006CL) containing 10% (v/v) calf serum (HyClone Laboratories, SH30541.03), 1 mM sodium pyruvate (Sigma-Aldrich Canada, P2256), 2 mM glutamine (Gibco, 25030), 100 units/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin (Wisent, 250-202-EL). 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, 15596-018). For cDNA synthesis, 2 µg of total RNA were reverse-transcribed using a high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, 4368814). 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, 170-8884). DNA amplification was carried out using an Icyler iQ5 (Bio-Rad) 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 : MT1-MMP (Hs_Mmp14_1_SG QT00001533), BNIP3 (Hs_BNIP3_1_SG QT00024178), ATG3 (Hs_ATG3_1_SG QT00069769), ATG12 (Hs_ATG12_1_SG QT00035854), ATG16L1 (Hs_ATG16L1_1_SG QT00085442), ATG16L2 (Hs_ATG16L2_1_SG QT00005915), GAPDH (Hs_GAPDH_2_SG QT01192646), and β-actin (Hs_Actb_2_SG QT01680476). 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) and the relative quantified value (RQV) was expressed as $2^{-\Delta C_T}$.

Human autophagy PCR array : The Human Autophagy RT² Profiler PCR Arrays (SA Biosciences, PAHS-084A,) were used according to the manufacturer's protocol. The detailed list of these key autophagy-related genes can be found on the manufacturer's website (http://www.sabiosciences.com/rt_pcr_product/HTML/PAHS-084A.html). Using real-time quantitative PCR, we reliably analyzed expression of a focused panel of genes related to autophagy. Relative gene expressions were calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, in which C_t indicates the fractional cycle number where the fluorescent signal reaches detection threshold. The 'delta-delta' method uses the normalized ΔC_t value of each sample, calculated using a total of five endogenous control genes (*B2M*, *HPRT1*, *RPL13A*, *GAPDH*, and *ACTB*). Fold change values are then presented as average fold change = $2^{(\text{average } \Delta\Delta C_t)}$ for genes in Concanavalin-A-treated U87 glioblastoma cells relative to control U87 cells in both siScrambled- and siMT1-MMP-transfected cells. Detectable PCR products were obtained and defined as requiring <35 cycles. The resulting raw data were then analyzed using the PCR Array Data Analysis Template (<http://www.sabiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php>). This integrated web-based software package automatically performs all $\Delta\Delta C_t$ based fold-change calculations from our uploaded raw threshold cycle data.

Transfection method and RNA interference : Cells were transiently transfected with 20 nM siRNA against MT1-MMP (Hs_MMP14_6 HP validated siRNA;

QIAGEN, SI03648841) or scrambled sequences (AllStar Negative Control siRNA; QIAGEN, 1027281) using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, 11668). MT1-MMP-specific gene knockdown was evaluated by qRT-PCR as described above.

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

Immunoblotting procedures : The following electrophoresis reagents were used : Sodium dodecylsulfate (SDS; Sigma-Aldrich Canada, L3771), acrylamide (Bioshop, ACR001.1), and bis-acrylamide (Bioshop, BIS001.100). Proteins from control and treated cells were separated by SDS-PAGE. After electrophoresis, proteins were electrotransferred to polyvinylidene difluoride membranes (Millipore, IPVH00010) 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; Bioshop, TWN510-500). Membranes were further washed in TBST and incubated with the MT1-MMP (Millipore, AB6004) and GAPDH (Clone 6C5; Millipore, MAB374) primary antibodies (1/1,000 dilution) in TBST containing 3% bovine serum albumin and 0.1% sodium azide (Sigma-Aldrich Canada, S2002), followed by a 1 hr incubation with horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit (Jackson ImmunoResearch Laboratories, 711-035-152) or goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, 115-035-062) at 1/2,500 dilutions in TBST

containing 5% non-fat dry milk. Immunoreactive material was visualized by enhanced chemiluminescence (Amersham Pharmacia Biotech, RPN3004).

Detection of acidic vesicular organelles (AVO) and of GFL-LC3 puncta : U87 cells were serum-starved in media containing the different conditions of transfections (siRNA, cDNA plasmid recombinant forms of MT1-MMP) or treatments with Concanavalin-A (ConA; Sigma-Aldrich Canada, L7647). Acridine Orange (0.5 ug/mL; Sigma-Aldrich Canada, A6014) was added to each well, cells were incubated for 10 minutes at 37°C in the dark. Fluorescence was then examined by microscopy. Transient cell transfection with pEGFP-LC3 (generously provided by Dr Patrick Labonté, INRS-IAF, Qc), Wt-MT1-MMP, Δ -Cyto-MT1-MMP, and Δ TM-MT1-MMP cDNA plasmids was performed using lipofectamine 2000 as previously described (Proulx-Bonneau *et al.*, 2011b).

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.

5.8 Acknowledgements

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

5.9 Figures

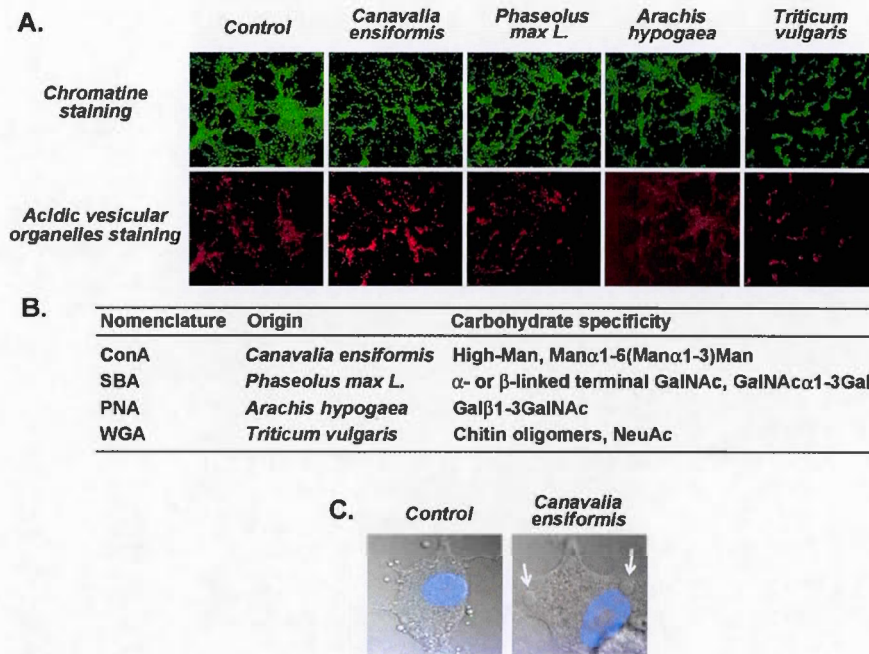


Figure 5.1 High cell surface mannopyranoside residues contribute to lectin-induced autophagy. Serum-starved U87 were treated for 24 hours with 30 μ g/ml of the following four lectins : *Canavalia ensiformis*, *Phaseolus max L.*, *Arachis Hypogaea*, and *Triticum vulgaris*. (A) Chromatin staining (green) and acidic vesicular organelles staining (red) was performed. (B) Description of the carbohydrate specificity for each lectin tested. (C) Electronic microscopy pictures of autophagosomes formation (white arrows). Nucleus staining was performed with DAPI attaining (blue).

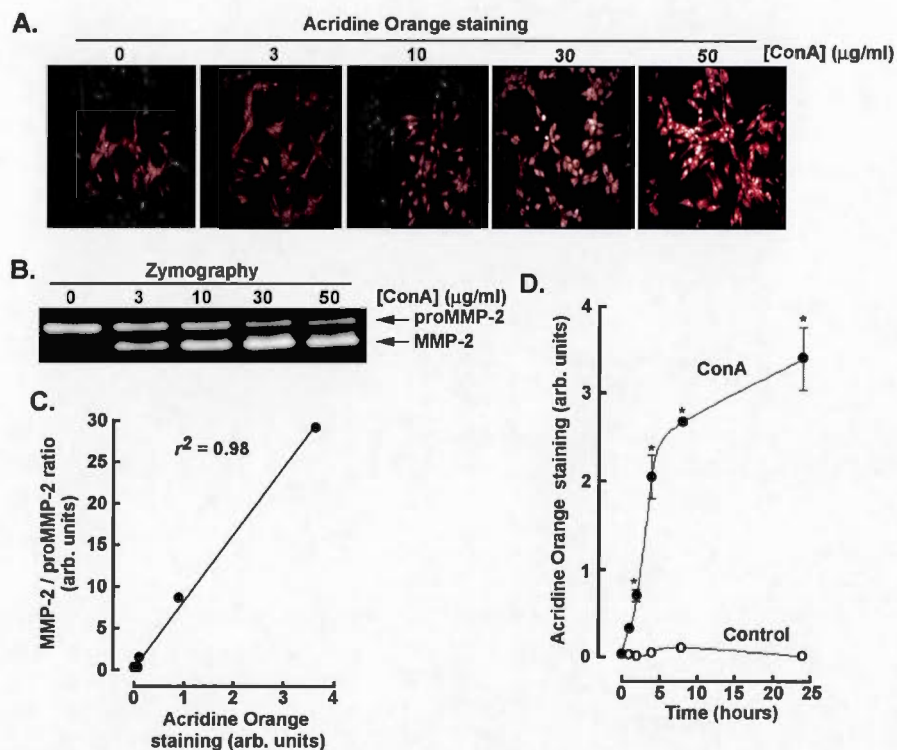


Figure 5.2 Concanavalin-A triggers proMMP-2 activation and autophagy. Serum-starved U87 glioblastoma cells were treated with increasing concentrations of Concanavalin-A for 24 h. (A) Cells were stained with Acridine Orange as described in the Methods section, and acidic vacuole formation examined by fluorescent microscopy. (B) Conditioned media were isolated and gelatin zymography performed to assess the extent of proMMP-2 activation into MMP-2. (C) Scanning densitometry was performed from the zymogram and correlations plot made between MMP-2/proMMP-2 ratios and Acridine Orange staining. (D) Acridine Orange staining was quantified in control (open circles) and 30 µg/ml ConA-treated (closed circles) U87 glioblastoma cells for different time points.

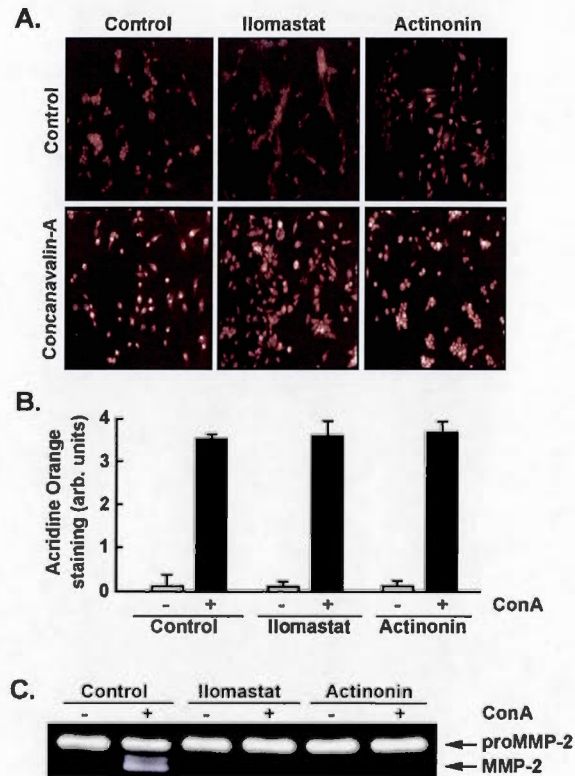


Figure 5.3 Concanavalin-A-induced autophagy is independent of MT1-MMP extracellular catalytic function. Serum-starved U87 glioblastoma cells were treated with vehicle or 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ConA, 25 μM Ilomastat, 30 μM Actinonin or a combination of ConA with either Ilomastat or Actinonin for 24 h. (A) Cells were stained with Acridine Orange as described in the Methods section, and fluorescence examined by microscopy. (B) Scanning densitometry was performed on the pictures in (A) in order to assess the extent of acidic vacuoles formation in control (white bars) and ConA-treated cells (black bars). (C) Conditioned media were isolated and gelatin zymography performed to assess the extent of proMMP-2 activation into MMP-2.

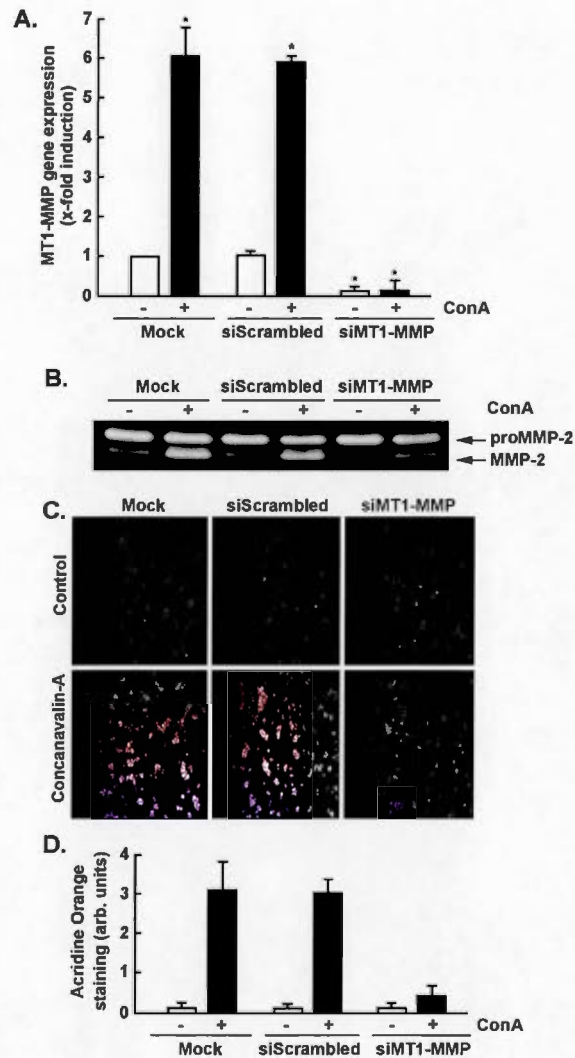


Figure 5.4 Gene silencing of MT1-MMP gene expression antagonizes Concanavalin-A-induced autophagy. Gene silencing was performed with either siScrambled or siMT1-MMP in U87 glioblastoma cells, or with lipofectamine treatment only (Mock). Cells were then serum-starved in the presence (black bars) or absence (white bars) of 30 μ g/ml ConA. (A) Total RNA was isolated and qRT-PCR performed as described in the Methods section to assess MT1-MMP gene expression. (B) Conditioned media were isolated and gelatin zymography performed to assess the extent of proMMP-2 activation into MMP-2. (C) Cells were stained with Acridine Orange as described in the Methods section, and fluorescence examined by microscopy. (D) Scanning densitometry was performed on the pictures in (C) in order to assess the extent of acidic vacuoles formation in control (white bars) and ConA-treated cells (black bars).

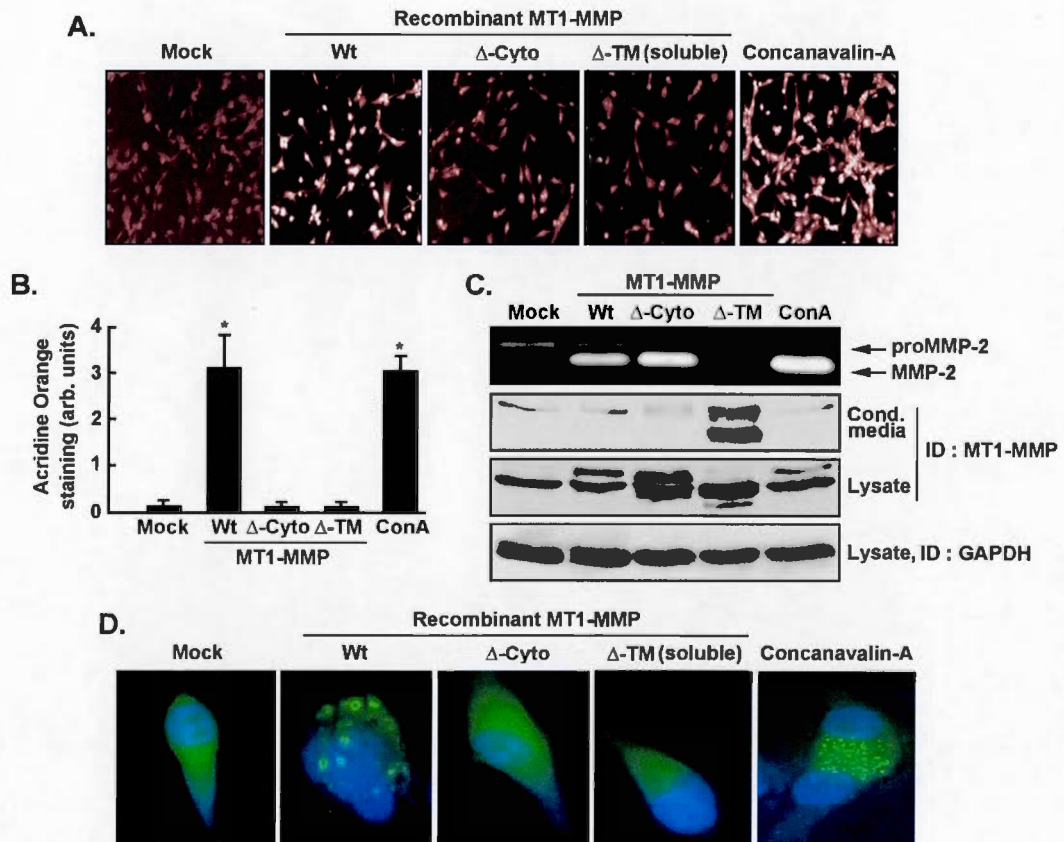


Figure 5.5 The intracellular cytosolic domain of MT1-MMP is required to trigger autophagy. U87 glioblastoma cells were transiently transfected with cDNA plasmids encoding either full length Wt-MT1-MMP, a cytoplasmic-deleted (Δ -Cyto)-MT1-MMP, a cytoplasmic domain and transmembrane domain (Δ -TM) soluble MT1-MMP, or empty pcDNA (Mock). (A) Serum-starved cells were stained with Acridine Orange as described in the Methods section, and (B) scanning densitometry performed on the pictures in order to assess the extent of acidic vacuoles formation. (C) Conditioned media as well as cell lysates were isolated as described in the Methods section in order to perform gelatin zymography (top), or to perform MT1-MMP immunodetection in the conditioned media (2nd from top) and in the lysates (2nd from bottom), and GAPDH (bottom). (D) Photomicrographs showing the intracellular distribution of exogenous LC3. Cells were transiently co-transfected with a pEGFP-LC3-expressing plasmid and either Wt-MT1-MMP, Δ -Cyto-MT1-MMP, Δ -TM-MT1-MMP, or empty pcDNA (control), or treated with ConA. Samples were fixed 24 hours later and nuclei counterstained with Hoechst 33342. Characteristic punctates of pEGFP-LC3 staining can be observed in Wt-MT1-MMP-transfected and ConA-treated cells.

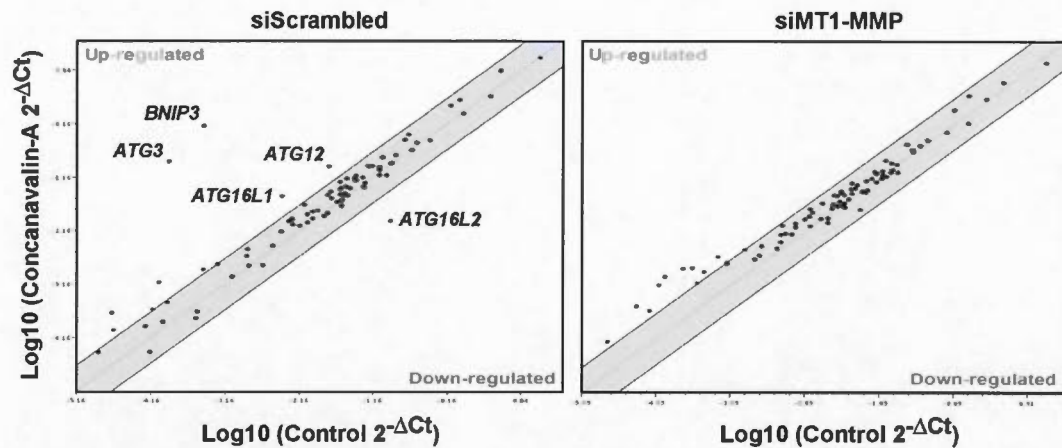


Figure 5.6 Concanavalin-A-induced autophagy related genes are reduced in siMT1-MMP transfected U87 cells. Gene silencing was performed with either siScrambled or siMT1-MMP in U87 glioblastoma cells. Cells were then serum-starved in the presence or absence of 30 $\mu\text{g/ml}$ ConA for 24 h. Total RNA isolation and qRT-PCR were performed as described in the Methods section to assess expression of a subset of 84 different autophagy-related genes using a human autophagy PCR array.

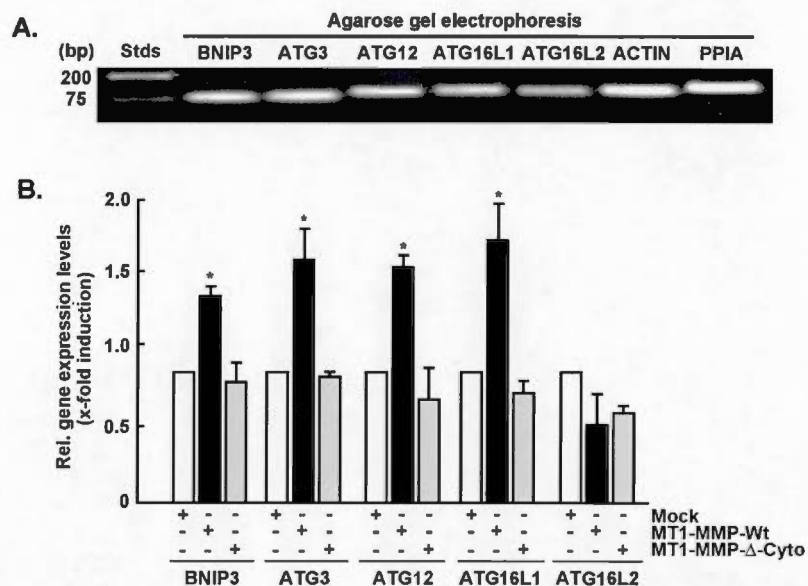


Figure 5.7 Transcriptional regulation of BNIP3, ATG3, ATG12, ATG16L1 and ATG16L2 expression is signalled through MT1-MMP's intracellular domain. U87 glioblastoma cells were transiently transfected with cDNA plasmids encoding either full length Wt-MT1-MMP, a cytoplasmic-deleted (Δ -Cyto)-MT1-MMP, or empty pcDNA (Mock). Cells were then serum-starved for 24 h. Total RNA isolation and qRT-PCR were performed as described in the Methods section. (A) Amplicon for each gene were loaded onto an agarose gel to show BNIP3, ATG3, ATG12, ATG16L1 and ATG16L2 specific amplification. (B) Gene expressions in Wt-MT1-MMP- (black bars) and Δ Cyto-MT1-MMP-transfected cells (grey bars) were compared to that of Mock (white bars) transfected cells.

CHAPITRE VI

ARTICLE 2 : INDUCTION OF AUTOPHAGY BIOMARKER BNIP3 REQUIRES A JAK2/STAT3 AND MT1-MMP SIGNALING INTERPLAY IN CONCANAVALIN-A-ACTIVATED U87 GLIOBLASTOMA CELLS.

6.1 Contributions

Cet article a été publié dans la revue scientifique *Cellular Signalling*.

*Les références de cet article seront incorporées à la section Bibliographie.

La référence complète de cet article est sous cette forme :

Pratt J. & Annabi B. *Induction of biomarker BNIP3 requires a JAK2/STAT3 and MT1-MMP signaling interplay in Concanavalin-A-activated U87 glioblastoma cells.* (2014) *Cellular Signalling*. 26(5) : 917-924

Jonathan Pratt : Expérimentation et essais biologiques, analyse des résultats, montage des figures, rédaction du manuscrit

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

**Induction of autophagy biomarker BNIP3 requires a JAK2/STAT3
and MT1-MMP signaling interplay in Concanavalin-A-activated U87
glioblastoma cells**

Jonathan Pratt 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

6.2 Résumé

Les lectines provenant de diverses plantes sont considérées depuis quelques années comme de potentiels agents anti-tumoraux grâce à leur faculté d'induire la mort cellulaire par autophagie. Étant donné que la métalloprotéase matricielle membranaire de type 1 (MT1-MMP) a été reconnue pour réguler l'expression du biomarqueur autophagique Bcl-2/Adenovirus E1B 19 kDa interacting protein 3 (BNIP3), nous avons investigué sur les mécanismes moléculaires reliant MT1-MMP à BNIP3 dans les cellules de glioblastome humain U87. D'abord, le traitement à la Concanavaleine-A (ConA) entraînait une augmentation du nombre de vacuoles acides ainsi que de l'expression génique et protéique de MT1-MMP et de BNIP3. Ensuite, l'inhibition de l'expression de BNIP3 par une dose-réponse à l'AG490, un inhibiteur sélectif de la kinase JAK2, a permis d'émettre l'hypothèse que l'induction de BNIP3 par la ConA était probablement médiée par un membre de la famille des STAT. En effet, la phosphorylation de STAT3 et l'expression de BNIP3 médiées par la ConA étaient fortement diminuées lorsque MT1-MMP ou STAT3 étaient réprimés. Les analyses corrélatives ont démontré que les événements signalétiques dépendants de STAT3 se produisaient après l'induction de MT1-MMP. Par la suite, la surexpression de la protéine recombinante complète de MT1-MMP (Wt-MT1-MMP) a entraîné une hausse significative de l'expression de BNIP3. De plus, une étude structure-fonction a confirmé que la phosphorylation de STAT3 et de l'expression de BNIP3 étaient médiées par le domaine cytoplasmique de MT1-MMP. Finalement, un criblage des kinases de la famille JAK (JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2) a confirmé que seul JAK2 était nécessaire dans la cascade de signalisation. Enfin, notre étude a permis de comprendre comment MT1-MMP signale l'autophagie, un processus contribuant au phénotype de résistance des cellules tumorales cérébrales.

Mots clés : Glioblastome, concanavaleine-A, autophagie, JAK/STAT, MT1-MMP, BNIP3

6.3 Abstract

Plant lectins have been considered as possible anti-tumor drugs because of their property to induce autophagic cell death. Given that expression of membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) has been found to regulate expression of the autophagy biomarker Bcl-2/adenovirus E1B 19 kDa interacting protein 3 (BNIP3), we sought to investigate possible signalling interplay mechanisms between MT1-MMP and BNIP3 in Concanavalin-A lectin-activated U87 glioblastoma cells. ConA induced acidic vacuole organelles formation as well as BNIP3 and MT1-MMP gene and protein expression, whereas only BNIP3 expression was dose-dependently inhibited by the JAK2 tyrosine kinase inhibitor AG490 suggesting a requirement for some STAT-mediated signalling. Gene silencing of MT1-MMP and of STAT3 abrogated ConA-induced STAT3 phosphorylation and BNIP3 expression. Correlative analysis shows that STAT3 signalling events occur downstream from MT1-MMP induction. Overexpression of a full length MT1-MMP recombinant protein led to increased BNIP3 gene and protein expression. The cytoplasmic domain of MT1-MMP was also found necessary for transducing STAT3 phosphorylation. Among JAK1, JAK2, JAK3, and TYK2, only JAK2 gene silencing abrogated ConA's effects on MT1-MMP and BNIP3 gene and protein expression. Our study elucidates how MT1-MMP signals autophagy, a process which could contribute to the chemoresistance phenotype in brain cancer cells.

Key words : Glioblastoma, concanavalin-A, autophagy, JAK/STAT, MT1-MMP, BNIP3

6.4 Introduction

Distinct from apoptosis, autophagy is an evolutionarily conserved, multi-step lysosomal degradation process in which cells degrade long-lived proteins and damaged organelles (Wang, S. Y. *et al.*, 2011). Recently, high expression levels of the Bcl-2/E1B 19 kDa interacting protein 3 (BNIP3), a key regulator of cell death/autophagy and an effector of a necrosis-like atypical death program, were reported in glioblastoma multiforme (GBM) and found to confer a survival advantage to brain tumor cells (Burton, T. R. *et al.*, 2009). As GBM is also characterized by regions of hypoxia and often by large necrotic areas, such continuous or excessive stress ultimately results in autophagy-induced cell death. Accordingly, under stress conditions BNIP3 can translocate from the nucleus to the cytoplasm where it disrupts mitochondrial functions and leads to cell death (Kubli *et al.*, 2007). BNIP3 can also act as an inducer of autophagy in many cell types and under different environmental conditions including hypoxia (Azad *et al.*, 2008; Kanzawa *et al.*, 2005; Park, C. W. *et al.*, 2013). BNIP3 can also suppress the mTOR signalling pathway to mediate autophagic cell death in glioma cells (Byun *et al.*, 2009). Contrarily, BNIP3 also increased cell survival under hypoxic stress by translocating to the nucleus of human glial cells (Burton, T. R. *et al.*, 2006; Hu, Y. L. *et al.*, 2012). Thus, current opinion regarding the role of autophagy in tumorigenesis is that it can be either a tumor suppressor or a tumor promoter depending on the tumor type and stage (Bhutia *et al.*, 2013).

Chemotherapy and radiotherapy were recently reported to upregulate BNIP3 expression and to ultimately trigger apoptotic cell death in colorectal cancer cells (Deng *et al.*, 2012). Given the signaling crosstalk between apoptosis and autophagy (Booth *et al.*, 2014), therapies that could produce the induction of autophagy-dependent cell death in gliomas may therefore become of interest. Interestingly, plant

lectins have been documented as causing autophagic cell death and, as such, have been considered as possible anti-tumor drugs (Liu, Z. *et al.*, 2013). Among these lectins, numerous studies have demonstrated that concanavalin A, a $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -dependent and mannose/glucose-binding legume lectin, can induce apoptotic cell death via the mitochondrial pathway in diverse types of cancer cells, including human melanoma A375 cells and human hepatocellular carcinoma HepG2 cells (Li, W. W. *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2009). Recently, ConA was reported to up-regulate COX-2 and to down-regulate Akt expression via the IKK/NF- κ B-dependent pathway in U87 glioblastoma cells (Sina *et al.*, 2010). Other studies have demonstrated that cell death can occur through BNIP-3-mediated mitochondrial autophagy. In agreement with this, ConA-treated U87 glioblastoma cells exhibited up-regulated expression of BNIP3, ATG3, ATG12 and ATG16-L1, and these inductions were reversed when expression of membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP), a plasma membrane-anchored matrix metalloproteinase, was silenced (Pratt *et al.*, 2012). Interestingly, while ConA has been shown to trigger the phosphorylation of STAT3 in mesenchymal stromal cells, regulation of BNIP3 was also found to be linked to JAK/STAT signaling (Akla *et al.*, 2012; Bulcao *et al.*, 2010).

Among the subclass of matrix metalloproteinases anchored to the cell membrane by a transmembrane domain (Fillmore *et al.*, 2001), MT1-MMP possesses a cytoplasmic domain that plays critical roles in transducing several intracellular signaling pathways (Gingras et Beliveau. 2010). Moreover, this cytoplasmic domain is important for MT1-MMP internalization and recycling processes at the plasma membrane where it is believed to localize in invadopodia (Galvez *et al.*, 2004; Nakahara *et al.*, 1997). Although a role for MT1-MMP has been suggested as a cell death sensor/effector through the regulation of endoplasmic reticulum stress in U87 glioblastoma cells (Proulx-Bonneau *et al.*, 2011b), and in necrosis (Belkaid *et al.*, 2007), the exact MT1-MMP-mediated signaling that leads to induction of autophagic proteins like BNIP3 (Pratt *et al.*, 2012) remains unknown. In the present study, we

used the lectin ConA from *Canavalia ensiformis* to mimic biological lectin/carbohydrate interactions and to also induce MT1-MMP gene expression (Fortier *et al.*, 2008). Furthermore, we investigated whether any MT1-MMP/JAK/STAT signaling interplay may be involved in the pro-autophagic actions of ConA in glioblastoma cells.

6.5 Material and methods

Materials :

Sodium dodecylsulfate (SDS), Concanavalin A, 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 were from Amersham Pharmacia Biotech (Baie d'Urfé, QC). Micro bicinchoninic acid protein assay reagents were from Pierce (Rockford, IL). The JAK family tyrosine kinase inhibitor Tofacitinib (CP-690550) was from Cedarlane (Burlington, ON) while AG490 was from Calbiochem (La Jolla, CA). Anti-STAT3 (79D7) and anti-phospho-STAT3 (Tyr705) polyclonal antibodies were from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). The polyclonal antibody against the MT1-MMP catalytic domain was from Chemicon (Temecula, CA). The monoclonal anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) antibody was from Advanced Immunochemicals (Long Beach, CA). The polyclonal antibody against BNIP3 was from EMD Millipore (Billerica, MA). The polyclonal antibody against JAK2 was from New England Biolabs (Pickering, ON). 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, 100 units/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin. Cells were incubated at 37°C with 95% air and 5% CO₂.

Immunofluorescent microscopy :

U87 cells were seeded on cover slips, transiently transfected with a siRNA against MT1-MMP or a siRNA control and then treated (or not) with 30 µg/ml Concanavalin-A for 24 hours. Media was removed and cells were fixed in formalin phosphate buffer (Fisher Scientific, Ottawa, ON) for 20 min, permeabilized with Triton X-100 for 5 min and then blocked for 1h in 1% BSA/PBS. Immunostaining was performed for 1h with the anti-BNIP3 antibody 1:200 in 1% BSA/PBS, followed by 1:200 anti-rabbit-alexa Fluor 488 (Invitrogen, ON). A solution of 10 µg/ml DAPI diluted in PBS was used to stain the nuclei. Fluorescence was then examined by microscopy.

Gelatin zymography :

Gelatin zymography was used to assess the extracellular levels of the latent proMMP-2 and active MMP-2 activities. Briefly, an aliquot (20 µl) 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 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'Urfé, QC).

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

Total RNA was extracted from cell monolayers using TriZol reagent (Life Technologies, CA). 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 SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad). DNA amplification was carried out using a CFX connect Real-Time System (Bio-Rad) and product detection was performed by measuring binding of the fluorescent dye EvaGreen to double stranded DNA. The QuantiTect primer sets were provided by QIAGEN : MT1-MMP (Hs_Mmp14_1_SG QT00001533), BNIP3 (Hs_BNIP3_1_SG QT00024178), JAK1 (Hs_JAK1_1_SG QT00050225), JAK2 (Hs_JAK2_1_SG QT00062650), JAK3 (Hs_JAK3_1_SG QT00078673), TYK2 (Hs_TYK2_1_SG QT00012978), GAPDH (Hs_GAPDH_2_SG QT01192646), β-actin (Hs_Actb_2_SG QT01680476) and PPIA (Hs_PPIA_4_SG QT01866137). The relative quantities of target gene mRNA compared against two internal controls chosen from GAPDH, β-actin or PPIA RNA, were measured by following a Δ CT method employing an amplification plot (fluorescence signal vs. cycle number). The difference (Δ C_T) between the mean values in the triplicate samples of target gene and those of GAPDH and β-actin mRNAs were calculated by CFX manager Software version 2.1 (Bio-Rad) 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_MMP14_6 HP validated siRNA; QIAGEN, SI03648841), against STAT3 (Hs_STAT3_7 HP validated siRNA; QIAGEN, SI02662338), against JAK1 (Hs_JAK1_5 HP validated siRNA; QIAGEN, SI00605514), against JAK2 (Hs_JAK2_7 HP validated siRNA; QIAGEN, SI02659657), against JAK3 (Hs_JAK3_5 HP validated siRNA; QIAGEN, SI00604800), against TYK2 (Hs_TYK2_5 HP validated siRNA; QIAGEN, SI02223221) or scrambled sequences (AllStar Negative Control siRNA; QIAGEN, 1027281) using Lipofectamine 2000 transfection reagent (Invitrogen, CA). MT1-MMP-, JAK- and STAT3-specific gene knockdowns were evaluated by qRT-PCR as described above.

Detection of acidic vesicular organelles (AVO) :

U87 cells were serum-starved in media containing specific treatments with Concanavalin-A alone or in combination with AG490 or Tofacitinib. Acridine Orange (0.5 µg/mL; Sigma-Aldrich, ON) was added to each well and cells were incubated for 15 minutes at 37°C in the dark. Fluorescence was then 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.

6.6 Results

Gene silencing of MT1-MMP inhibits BNIP3 induction by Concanavalin-A.

Among the autophagy biomarkers screened, BNIP3 gene expression has been found to be significantly induced by ConA along with ATG3, ATG12, ATG16L1 (Pratt *et al.*, 2012). Although MT1-MMP was found to contribute to BNIP3 transcriptional regulation, no information is available regarding effects at the protein level. U87 glioblastoma cells were therefore transiently transfected with either specific siRNA to silence MT1-MMP gene expression (siMT1-MMP) or with a non-specific sequence (siScrambled). Immunofluorescent staining was performed to detect BNIP3 expression (Fig.1A, upper panels), which was induced in ConA-treated cells (Fig.6.1B) and repressed when MT1-MMP gene expression was silenced (Fig.6.1A, lower panels; Fig.6.1B). This was further confirmed by immunoblotting of the cell lysates where both MT1-MMP and BNIP3 protein expression was induced by ConA, a condition also known to trigger latent proMMP-2 processing into active MMP-2 (Fig.6.1C, upper panel). Finally, qRT-PCR was also performed and confirmed the protein and immunostaining results described above as well as the efficient MT1-MMP gene silencing (Fig.6.1D).

JAK2 inhibition antagonizes ConA-induced acidic vacuole formation and BNIP3 expression.

Since ConA had recently been shown to trigger autophagy in part through a JAK/STAT signalling pathway in hepatoma cells (Li, W. W. *et al.*, 2011) and in glioblastoma cells (Pratt *et al.*, 2012), we tested whether the JAK2 tyrosine kinase inhibitor AG490, as well as the JAK inhibitor Tofacitinib affected autophagy induction. We found that ConA-induced BNIP3 gene expression was dose-dependently inhibited by AG490, while ConA-induced MT1-MMP gene expression remained unaffected (Fig.6.2A). In contrast, Tofacitinib was inefficient at

downregulating either of the ConA-induced genes. When MT1-MMP-mediated proMMP-2 activation was assessed upon ConA treatment, neither of the JAK inhibitors tested inhibited the extracellular MT1-MMP catalytic functions (Fig.6.2B). Finally, when cells were immunostained for BNIP3 or stained with Acridine Orange to monitor acidic vacuole organelle (AVO) formation, we observed that both AG490 and Tofacitinib efficiently antagonized ConA-induced AVO formation, while only AG490 abrogated ConA-induced BNIP3 expression (Fig.6.2C). Altogether, these observations suggest that JAK2 inhibition abrogates ConA-induced BNIP3 transcriptional regulation but not that of MT1-MMP. Varying degrees of contribution from the various JAK family members seem to be involved in the overall autophagic process.

MT1-MMP expression is required to trigger STAT3 phosphorylation by ConA.

Since BNIP3, but not MT1-MMP, gene expression was abrogated upon AG490 treatment and that inhibition of JAK2 led to decreased BNIP3 protein expression (Fig.6.2), we used gene silencing strategies to downregulate either MT1-MMP (siMT1-MMP) or STAT3 (siSTAT3) expression. We found that, in siScrambled-transfected cells, increasing concentrations of ConA led to increased proMMP-2 activation, MT1-MMP and BNIP3 protein expression (Fig.6.3A, upper panels). MT1-MMP silencing inhibited ConA-induced proMMP-2 activation as well as BNIP3 induction (Fig.6.3A, middle panels). When STAT3 was silenced, proMMP-2 activation and MT1-MMP were unaffected, while ConA-induced BNIP3 expression was abrogated (Fig.6.3A, lower panels). In order to evaluate the functional impact of MT1-MMP silencing on STAT3 activation, we monitored STAT3 phosphorylation (Fig.3B), which was transiently induced by ConA, peaking at 4 hours (Fig.6.3C), and significantly abrogated when MT1-MMP expression was silenced (Fig.6.3D). Densitometric analysis of the immunoblots allowed us to directly correlate the extent of STAT3 phosphorylation with the level of BNIP3 expression in siScrambled-transfected cells (Fig.6.4A, open circles), while silencing of MT1-MMP abrogated

both STAT3 phosphorylation and BNIP3 induction (Fig.6.4A, closed circles). On the other hand, MT1-MMP expression also directly correlated with BNIP3 expression (Fig.6.4B, open circles), while STAT3 silencing only abrogated BNIP3 induction by ConA but not the induction of MT1-MMP (Fig.6.4B, closed circles).

The intracellular domain of MT1-MMP is required to trigger BNIP3 expression.

Given the crucial role of MT1-MMP in the relay of ConA-mediated signaling, we next assessed the direct effect of recombinant MT1-MMP overexpression on BNIP3 expression. Cells were transiently transfected with cDNA plasmids encoding either the full length MT1-MMP (Wt) or the cytoplasmic-deleted MT1-MMP (Δ Cyto) recombinant proteins. When immunostaining of BNIP3 was performed (Fig.6.5A), we found that overexpression of Wt-MT1-MMP significantly triggered BNIP3 expression, whereas expression of the Δ Cyto-MT1-MMP was ineffective (Fig.6.5B). Overexpression and appropriate plasma membrane localization of both MT1-MMP recombinant forms were functionally confirmed by zymography since both were able to catalyse conversion of the proMMP-2 latent form into its active MMP-2 form (Fig.6.5C). However, deletion of the MT1-MMP intracellular domain abrogated both BNIP3 expression and STAT3 phosphorylation (Fig.6.5C). Extraction of total RNA followed by qRT-PCR analysis shows that the intracellular domain of MT1-MMP is required to trigger BNIP3 transcriptional regulation (Fig.6.5D).

JAK2 is required in Concanavalin-A-mediated BNIP3 but not MT1-MMP transcriptional regulation.

In order to assess their potential contributions to ConA-mediated STAT3 phosphorylation, we next used siRNA strategies to silence gene expression of the JAK family kinase members JAK1, JAK2, JAK3, and TYK2. Silencing was effectively achieved for all four genes as gene expression was reduced by 62-85% (Fig.6.6A), without affecting the cells' capacity to activate proMMP-2 in response to

ConA treatment (Fig.6.6B). We found that BNIP3 gene expression was significantly reduced only under conditions where JAK2 was silenced (Fig.6C, left panel) while MT1-MMP remained unaffected (Fig.6.6C, right panel). Furthermore, when JAK2 gene expression was silenced, overexpression of the Wt-MT1-MMP recombinant protein was unable to trigger either STAT3 phosphorylation or BNIP3 expression (Fig.6.7).

6.7 Discussion

Our current study documents the transducing functions of MT1-MMP in triggering JAK/STAT signaling, which in turn effectively regulates the transcriptional regulation and expression of the autophagy biomarker BNIP3 and which induces autophagic acidic vacuole formation in ConA-activated glioblastoma cells. JAK/STAT signaling is involved in numerous cancers and has proven to be an important pathway through which cancer cells survive, proliferate and increase their tumorigenicity (Stechishin *et al.*, 2013). Supporting this, inhibition of the JAK2/STAT3 signaling pathway was reported to impede the migratory and invasive potential of human glioblastoma cells (Senft *et al.*, 2011), and to slow disease progression in orthotopic xenografts of human glioblastoma brain tumor stem cells (Stechishin *et al.*, 2013). In addition to the role it plays in angiogenesis and metastatic processes (Chang, Q. *et al.*, 2013), the MT1-MMP-to-JAK/STAT signaling axis may therefore be viewed as a new autophagy regulator that could lead to survival of cancer cells (Jonchere *et al.*, 2013; Yoon, S. *et al.*, 2010).

The new signal transducing role ascribed to the intracellular domain of MT1-MMP, in contrast to its classical and well-documented extracellular hydrolytic functions, is thus receiving much attention. In fact, numerous MT1-MMP cytoplasmic domain binding proteins have been identified and include the μ 2 subunit of adapter protein 2, gC1qR, p130Cas, MTCBP-1 and the phosphorylated form of caveolin-1 (Gingras *et al.*, 2008; Labrecque *et al.*, 2004; Rozanov *et al.*, 2002; Uekita *et al.*, 2004; Uekita *et al.*, 2001). The cytoplasmic domain of MT1-MMP has been shown to trigger multiple signalling pathways including the activation of ERK cascade (Gingras *et al.*, 2001), the induction of a RhoA/ROK (Annabi *et al.*, 2005) as well as the early signalling cascade that leads to endoplasmic reticulum stress (Proulx-Bonneau *et al.*, 2011b) and proinflammatory phenotype (Sina *et al.*, 2010).

The cytoplasmic domain of MT1-MMP was further demonstrated to ultimately promote invasion activity of MT1-MMP by preventing its internalization (Uekita *et al.*, 2001). Unfortunately, it remains unknown whether any of the above-mentioned MT1-MMP intracellular binding intermediates are involved in autophagy regulation or in autophagy biomarker induction such as would seem to be the case for BNIP3 induction in this study.

BNIP3 is in fact an atypical representative of the Bcl-2 protein family and a regulator of non-apoptotic programmed cell death (Swoboda et Strzadala. 2009). BNIP3 was demonstrated to interact with LC3 and to promote autophagy of both mitochondria and endoplasmic reticulum (Hanna, R. A. *et al.*, 2012). BNIP3 was also shown to participate in the activation of autophagy by mediating 6-thioguanine and 5-fluorouracil-induced autophagy (Zeng, X. et Kinsella. 2010). As our current study correlates BNIP3 expression with the induction of AVO both by ConA and directly upon MT1-MMP overexpression, our data suggest that BNIP3 expression may serve as an autophagy biomarker consequent to MT1-MMP-mediated signaling in glioblastoma cells. To this end, we demonstrated that BNIP3 expression levels are correlated with a signaling cascade where MT1-MMP is a major contributor and which required phosphorylation of STAT3. Interestingly, increased JAK2/STAT3 signaling was also correlated with increased apoptosis through upregulation of BNIP3 gene expression (Bulcao *et al.*, 2010). Further support to our contention that MT1-MMP functions in BNIP3 expression was previously demonstrated when upregulation of BNIP3 and of autophagy-related gene members ATG3, ATG12 and ATG16-L1 expression in ConA-treated U87 cells was reversed when MT1-MMP gene expression was silenced (Pratt *et al.*, 2012). Finally, the pharmacological JAK inhibitors AG490 and Tofacitinib enabled us to confirm the requirement for JAK2 in the induction of BNIP3. Whether any recruitment and/or interaction between JAK2 and MT1-MMP are required remains unknown. Structure-function analysis from this study minimally confirms the mandatory requirement for the cytoplasmic domain of

MT1-MMP in the induction of BNIP3. Whether this structural requirement involves recruitment and/or interaction with specific intracellular intermediates is currently under investigation.

Recycling of cytosolic proteins and/or specific organelles is believed to be a means for cancer cells to escape apoptosis-mediated cell death in order to survive and continue their growth under stressful conditions (Liu, W. M. *et al.*, 2013). Given its strong expression in glioblastoma cells, MT1-MMP was inferred to contribute, in part, to the acquisition of an invasive, radio- and chemoresistant phenotype of brain cancer cells (Fillmore *et al.*, 2001). It therefore becomes tempting to suggest that the MT1-MMP-mediated signaling that leads to autophagy enables those cancer cells to escape cell death. In contrast, MT1-MMP has been in turn shown to induce endothelial cell morphogenic differentiation by a caspase-dependent mechanism (Langlois *et al.*, 2005), and its recombinant overexpression in human osteoblastic SaOS-2 cells to induce apoptosis (Luo, X. H. *et al.*, 2003). Furthermore, previous necrosis induction studies in glioblastoma cells also revealed a "bioswitch" function for a MT1-MMP/G6PT signaling axis (Belkaid *et al.*, 2007). Finally, ConA was found to increase the sub-G1 cell cycle population and to trigger cell death and this was thought to require MT1-MMP (Currie *et al.*, 2007). How the balance between MT1-MMP-mediated pro-apoptotic and pro-survival signaling is performed still remains to be further explored.

6.8 Conclusion

Among strategies developed to target MT1-MMP, the chemopreventive properties of diet-derived (-)-epigallocatechin-gallate (EGCG) were recently found to not only inhibit JAK/STAT signaling (Senggunprai *et al.*, 2014), but to also alter MT1-MMP-mediated intracellular signaling through suppression of JAK/STAT (Zgheib *et al.*, 2013). In fact, EGCG has been well documented to target MT1-MMP-mediated functions in proMMP-2 activation (Dell'Aica *et al.*, 2002), cell migration (Annabi *et al.*, 2002a), CD44 cell surface shedding (Annabi *et al.*, 2005), as well as in the transcriptional control of proangiogenic cytokine expression (Zgheib *et al.*, 2013). Assuming MT1-MMP-mediated autophagy may be considered as an escape mechanism that would prevent cancer cell death, it is plausible that EGCG could efficiently inhibit MT1-MMP functions and sensitize cancer cells to pro-apoptotic radio- or chemotherapeutic modalities. In conclusion, the MT1-MMP-mediated signaling crosstalk between autophagy and cell death/survival has now to be considered in tailoring new pharmacological interventions aimed at reducing glioma growth using combined modalities or compounds with multiple functional targets.

6.9 Acknowledgements

BA holds a Canada Research Chair in Molecular Oncology from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). JP is a Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) awardee. The authors declare no conflict of interest.

6.10 Figures

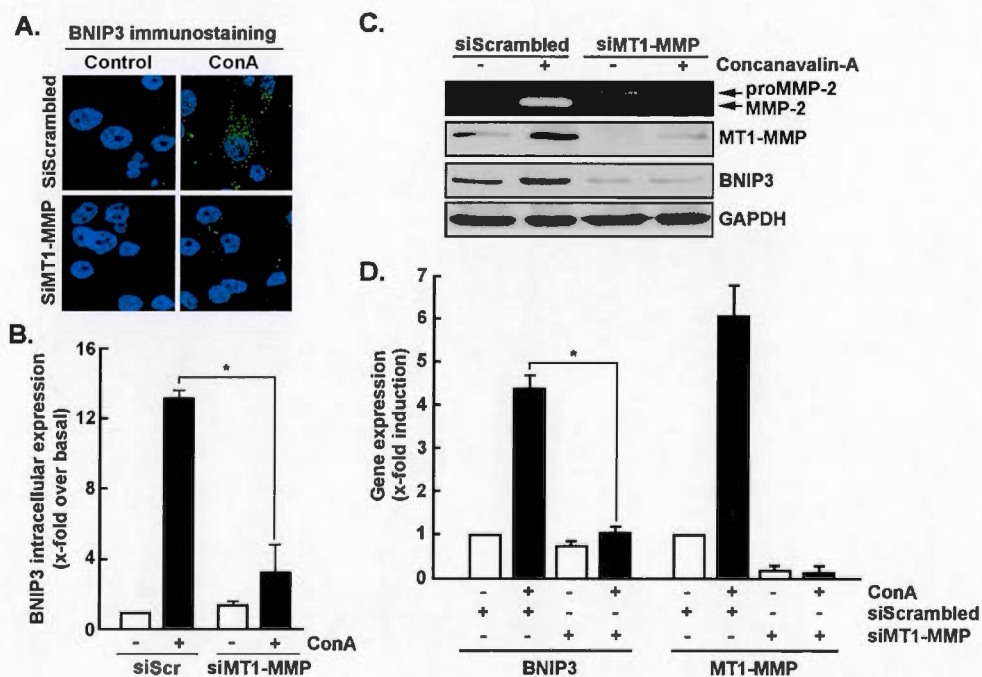


Figure 6.1 Gene silencing of MT1-MMP inhibits BNIP3 induction by Concanavalin-A. Gene silencing was performed with either siScrambled (siScr) or siMT1-MMP in U87 glioblastoma cells. Cells were then serum-starved in the presence or absence of 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Concanavalin-A for 24h. A) Immunostaining with anti-BNIP3 antibody and DAPI nuclear staining were performed as described in the Methods section, and B) BNIP3 intracellular fluorescence was measured by microscopy and quantified. C) Conditioned media was harvested in order to perform gelatin zymography (upper panel) and cell lysates isolated as described in the Methods section in order to perform MT1-MMP, BNIP3 and GAPDH immunodetection. D) Total RNA was extracted and qRT-PCR performed as described in the Methods section to assess MT1-MMP and BNIP3 gene expression.

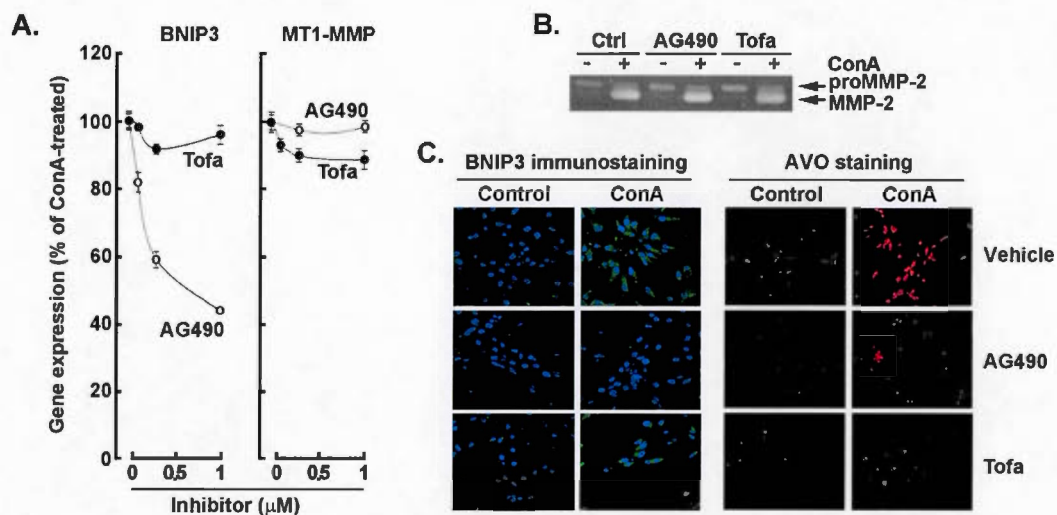


Figure 6.2 JAK2 inhibition antagonizes Concanavalin-A-induced acidic vacuole formation and BNIP3 expression. A) Serum-starved U87 cells were treated for 30 minutes with various concentrations of AG490 or Tofacitinib (Tofa, CP-690550) and then treated with 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of ConA for 24h. Total RNA isolation and qRT-PCR were performed as described in the Methods section to assess MT1-MMP and BNIP3 gene expressions. B) Serum-starved U87 were pretreated with vehicle or 1 μM AG490 or Tofacitinib (Tofa) for 30 minutes, and then treated with 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of ConA for 24h. Conditioned media was isolated as described in the Methods section in order to assess proMMP-2 activation. C) Serum-starved U87 cells were treated as described in B). Immunostaining with anti-BNIP3 antibody and DAPI (nucleus) were performed as described in the Methods section, and phase contrast BNIP3 intracellular fluorescence was acquired by microscopy. Acidic vesicular organelles (AVO) staining was performed and fluorescence acquired by microscopy.

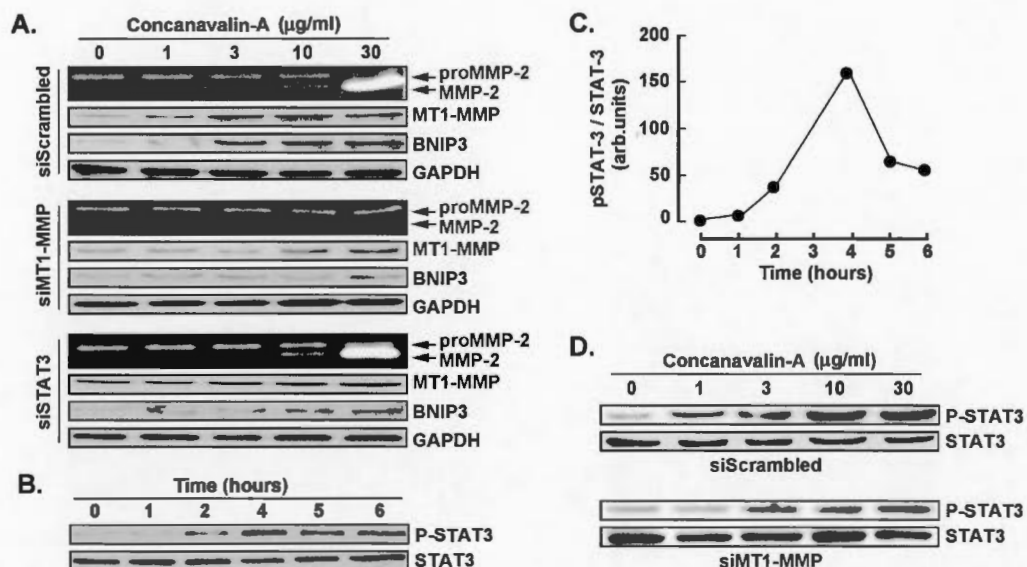


Figure 6.3 MT1-MMP expression is required to trigger STAT3 phosphorylation by Concanavalin-A. A) U87 cells were transiently transfected with siScrambled, siMT1-MMP or siSTAT3 for 24h. Serum-starved cells were then treated with various concentrations of Concanavalin-A. Conditioned media were isolated and proMMP-2 activation assessed by zymography as described in the Methods section. Cell lysates were prepared and used to perform MT1-MMP, BNIP3 and GAPDH immunodetection. B) Serum-starved U87 cells were treated with 30 $\mu\text{g/mL}$ Concanavalin-A for up to 6 hours. Cell lysates were tested to assess P-STAT3 and STAT3 expression. Densitometric measurement was performed from a representative experiment and shows the P-STAT3/STAT3 ratio C). D) U87 cells were transiently transfected with siScrambled or siMT1-MMP for 24h. Serum-starved cells were then treated with various concentrations of Concanavalin-A. Cell lysates were used to assess P-STAT3 and STAT3 expression.

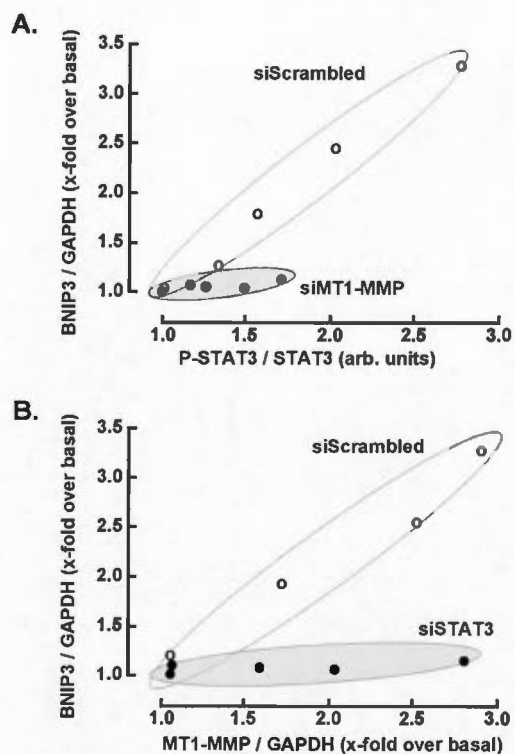


Figure 6.4 Schematic representation of the correlation between MT1-MMP, BNIP3, and STAT3 phosphorylation status. Correlative analysis was performed with representative densitometric data extracted from Fig.3. A) Correlative analysis between BNIP3/GAPDH and P-STAT3/STAT3 for each of the five Concanavalin-A concentrations used to treat siScrambled-transfected cells (white dots) and siMT1-MMP-transfected cells (black dots). B) Correlative analysis between BNIP3/GAPDH and MT1-MMP/GAPDH for each of the five Concanavalin-A concentrations used to treat siScrambled-transfected cells (white dots) and siSTAT3-transfected cells (black dots).

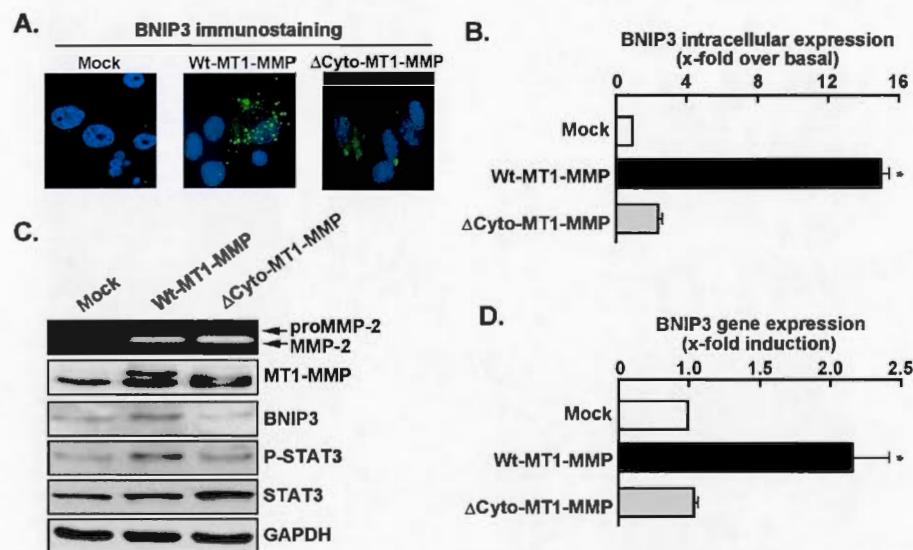


Figure 6.5 The intracellular domain of MT1-MMP is required to trigger BNIP3 expression. A) U87 cells were transiently transfected with plasmid cDNAs encoding either a full length MT1-MMP recombinant protein (Wt-MT1-MMP), a cytoplasmic domain-deleted MT1-MMP recombinant protein (Δ Cyto-MT1-MMP) or with an empty pcDNA vector (Mock). Immunostaining with anti-BNIP3 antibody and DAPI were performed as described in the Methods section, and BNIP3 intracellular fluorescence acquired by microscopy. B) Quantification of the intracellular expression of BNIP3 as observed in A). C) Cell lysates as well as conditioned media were isolated as described in the Methods section in order to respectively perform MT1-MMP, BNIP3, P-STAT3, STAT3 and GAPDH immunodetections or gelatin zymography to assess proMMP-2 activation status. D) Total RNA isolation and qRT-PCR were performed as described in the Methods section in order to assess BNIP3 gene expression.

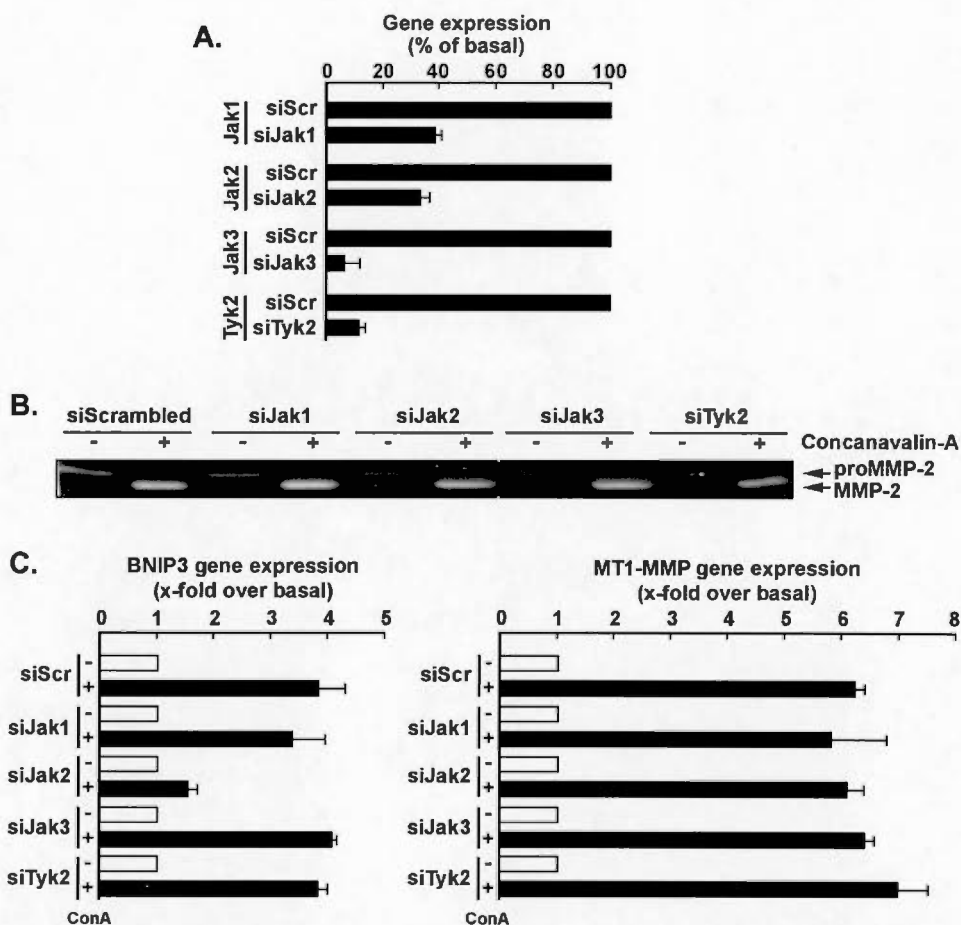


Figure 6.6 JAK2 is required to regulate BNIP3 but not MT1-MMP transcription upon Concanavalin-A treatment. U87 cells were transiently transfected with siScrambled (siScr), siJAK1, siJAK2, siJAK3 or siTyk2 for 24h. Serum-starved cells were then treated (or not) with 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Concanavalin-A. A) Total RNA was isolated, cDNA synthesized and qPCR performed as described in the Methods section to validate JAK1, JAK2, JAK3 and Tyk2 gene expression decreases. B) Conditioned media were isolated and gelatin zymography performed in order to assess proMMP-2 activation status. C) qRT-PCR were performed to assess BNIP3 and MT1-MMP gene expressions in vehicle or ConA-treated cells.

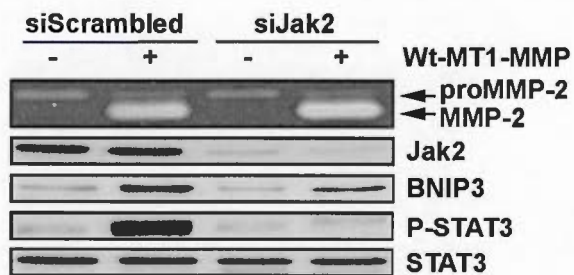


Figure 6.7 MT1-MMP-mediated induction of BNIP3 and of STAT3 phosphorylation requires JAK2. U87 cells were transiently transfected with siScrambled or siJAK2 for 24h. Then, cells were further transiently transfected with a cDNA plasmid encoding the full length Wt-MT1-MMP recombinant protein (Wt-MT1-MMP) or with an empty vector. Cell lysates as well as conditioned media were isolated in order to perform JAK2, BNIP3, P-STAT3 and STAT3 immunodetection as well as gelatin zymography to assess proMMP-2 activation status.

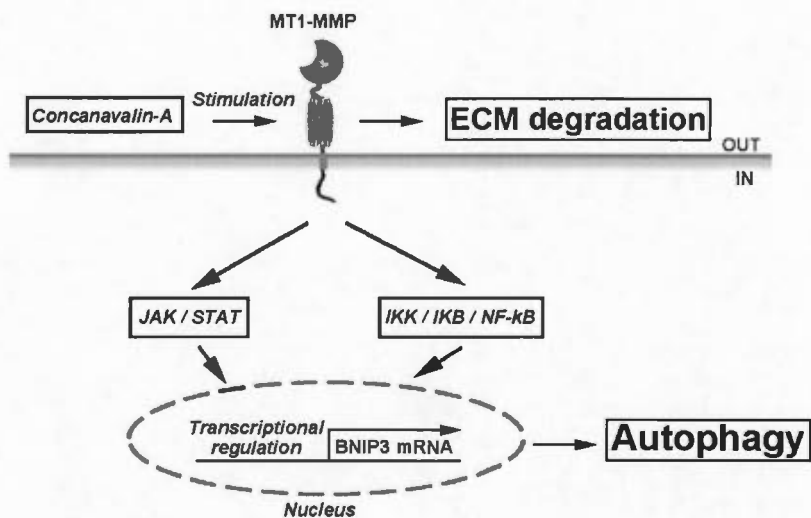


Figure 6.8 A MT1-MMP-JAK-STAT signalling axis regulates BNIP3 expression. Summarized scheme showing the potential mechanism of action of Concanavalin-A-induced BNIP3 expression in U87 glioblastoma cells. MT1-MMP, is a cell surface matrix metalloproteinase which, upon stimulation triggers JAK/STAT (this study; Akla *et al.*, 2012) and other signalling pathways such as that involving IKK/I κ B/NF- κ B (Sina *et al.*, 2010). Collectively, these signaling pathways may trigger autophagy and this is, in part, reflected by induction of BNIP3.

CHAPITRE VII

ARTICLE 3 : EVIDENCE OF MTCBP-1 INTERACTION WITH THE CYTOPLASMIC DOMAIN OF MT1-MMP : IMPLICATIONS IN THE AUTOPHAGY CELL INDEX OF HIGH-GRADE GLIOBLASTOMA.

7.1 Contributions

Cet article a été publié dans la revue scientifique *Molecular Carcinogenesis*.

*Les références de cet article seront incorporées à la section Bibliographie.

La référence complète de cet article est sous cette forme :

Pratt J. Iddir M. Bourgault S. & Annabi B. *Evidence of MTCBP-1 interaction with the cytoplasmic domain of MT1-MMP : Implications in the autophagy cell index of high-grade glioblastoma.* (2016) *Molecular carcinogenesis.* 55(2) : 148-160

Jonathan Pratt : Expérimentation et essais biologiques, analyse des résultats, montage des figures, rédaction du manuscrit

Mustapha Iddir : Expérimentation et essais biologiques et analyse des résultats

Steve Bourgault : Analyse des résultats et rédaction du manuscrit

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

**Evidence of MTCBP-1 interaction with the cytoplasmic domain of MT1-MMP :
Implications in the autophagy cell index of high grade glioblastoma**

Jonathan Pratt¹, Mustapha Iddir¹, Steve Bourgault² and Borhane Annabi¹

*From the ¹Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Centre de recherche Biomed, and
²Centre de recherche Pharmaqam, 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

7.2 Résumé

Le développement tumoral astrocytaire est en partie lié à la dérégulation des processus autophagiques. De plus, de récentes études ont démontré que MT1-MMP, une métalloprotéase de type membranaire contribuant au phénotype invasif des cellules tumorales cérébrales, est capable d'enclencher une cascade de signalisation intracellulaire menant à l'induction de l'autophagie. Les fonctions signalétiques de MT1-MMP nécessite son domaine cytoplasmique, et l'identification récente de MTCBP-1, une protéine cytoplasmique de 19 kDa impliquée dans l'inhibition de la migration cellulaire induite par MT1-MMP, suggère que la modulation de la signalisation médiée par le domaine cytoplasmique de MT1-MMP pourrait affecter d'autres processus carcinogéniques. Des ADNc générés à partir de biopsies de tumeurs cérébrales de grade I à IV ont révélé une corrélation directe entre les niveaux géniques de MT1-MMP et le grade tumoral, tandis que ceux de MTCBP-1 montrent exactement l'inverse. Ensuite, les techniques de transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET) et de résonance plasmonique de surface ont permis de confirmer que la délétion du domaine cytoplasmique de MT1-MMP empêchait MTCBP-1 d'interagir avec ce dernier. La surexpression de la protéine recombinante de MT1-MMP (Wt-MT1-MMP) a quant à elle entraîné une hausse de la production de vacuoles acidiqes autophagiques (AVO) et de la formation de puncta GFP-LC3. Cette augmentation a complètement été neutralisée lorsque MTCBP-1 était surexprimé. Par conséquent, nos données mettent en lumière un nouveau rôle pour MTCBP-1 dans la régulation de l'autophagie médiée par MT1-MMP. La corrélation inverse entre l'expression de MT1-MMP et celle de MTCBP-1 obtenues dans les divers grades tumoraux pourrait aussi contribuer à la diminution de l'index autophagique dans les tumeurs de haut grade.

Mots clés : Tumeur cérébrale, métalloprotéase matricielle, chimiorésistance

7.3 Abstract

Progression of astrocytic tumors is, in part, related to their dysregulated autophagy capacity. Recent evidence indicates that upstream autophagy signaling events can be triggered by MT1-MMP, a membrane-bound matrix metalloproteinase that contributes to the invasive phenotype of brain cancer cells. The signaling functions of MT1-MMP require its intracellular domain, and recent identification of MTCBP-1, a cytoplasmic 19 kDa protein involved in the inhibition of MT1-MMP-mediated cell migration, suggests that modulation of MT1-MMP cytoplasmic domain-mediated signaling may affect other carcinogenic processes. Using qPCR and screening of cDNA generated from brain tumor tissues of grades I, II, III, and IV, MT1-MMP gene expression was found to correlate with increased grade of tumors. Inversely, MTCBP-1 expression decreased with increasing grade of brain tumor. Confocal microscopy and fluorescence resonance energy transfer (FRET) analysis revealed that overexpressing a cytoplasmic-deleted MT1-MMP recombinant protein mutant prevented MTCBP-1 recruitment to the intracellular leaf of plasma membrane in U87 glioblastoma cells. The interaction between MTCBP-1 and the 20 amino acids peptide representing the MT1-MMP cytoplasmic domain was confirmed by surface plasmon resonance. Overexpression of a full-length Wt-MT1-MMP triggered acidic autophagy vesicle formation and autophagic puncta formation for green fluorescent microtubule-associated protein 1 light chain 3 (GFP-LC3). Autophagic vesicles and GFP-LC3 puncta formation were abrogated in the presence of MTCBP-1. Our data elucidate a new role for MTCBP-1 regulating the intracellular function of MT1-MMP-mediated autophagy. The inverse correlation between MTCBP-1 and MT1-MMP expression with brain tumor grades could also contribute to the decreased autophagic index observed in high grade tumors.

Keywords: Brain tumor, matrix metalloproteinase, chemoresistance

7.4 Introduction

Astrocytic tumors are the most common primary brain tumor type in humans. The World Health Organization (WHO) classifies pilocytic astrocytoma multiforme as grade I, diffuse astrocytoma as grade II, anaplastic astrocytoma as grade III, and glioblastoma multiforme as grade IV (Louis *et al.*, 2007). Progression from a low (I and II)- to a high (III and IV)-grade tumor has been associated with various molecular alterations (Colman et Aldape. 2008). Among these alterations, defective autophagy, shown via reduced expression of the Beclin-1 and LC3B-II autophagy biomarkers, has been suggested to correlate with reduced survival times of patients with astrocytic tumors (Huang, X. *et al.*, 2010). On the other hand, induction of autophagy processes by pro-autophagic drugs is also becoming an emerging concept to trigger cell death in high grade gliomas and to exploit caspase-independent programmed cell death pathways for the development of novel brain tumor therapies (Kogel *et al.*, 2010). Although high-grade gliomas are characterized with reduced expression of autophagy-related proteins when compared to low-grade gliomas, it is still unclear whether dysregulation of autophagy in advanced brain cancer would promote survival or death upon various therapeutic settings.

A low autophagy index in tumorigenesis has been inferred by recent studies where autophagic capacity was decreased during the progression of many tumors. Supporting this, autophagy could be induced in those tumors by numerous anti-tumor agents, ultimately leading to apoptotic cell death (Paglin *et al.*, 2001; Takeuchi *et al.*, 2005; Yang, Z. J. *et al.*, 2011). The intrinsic molecular mechanisms involved remain, however, largely unknown. In fact, very few upstream signaling events have been shown to link apoptotic (type I) to autophagic (type II) cell death in high-grade gliomas. An interesting link between type I and type II cell death was, however, recently found to involve the CCAAT/enhancer binding protein (EBP) homologous

transcription factor C/EBP homologous protein/growth arrest and DNA damage-inducible gene 153 (GADD153) in the regulation of apoptosis and autophagy (Emdad *et al.*, 2011). MT1-MMP, a membrane type-1 matrix metalloproteinase, is also among the biomarkers documented to trigger both apoptotic and autophagic signaling events (Annabi *et al.*, 2003c; Augustin *et al.*, 2009; Langlois *et al.*, 2005; Markovic *et al.*, 2009; Pratt *et al.*, 2012). In fact, given the recent link between endoplasmic reticulum (ER) stress, apoptosis and autophagy (Benbrook et Long. 2012; Schleicher *et al.*, 2010), MT1-MMP's intracellular signaling roles become even more relevant as ER stress was also found to be induced in glioblastoma cells overexpressing MT1-MMP (Proulx-Bonneau *et al.*, 2011b). Finally, exploiting the altered metabolism that characterizes brain tumor cells (Galeffi et Turner. 2012; Wolf *et al.*, 2010), MT1-MMP was found to transcriptionally downregulate the expression of a microsomal glucose-6-phosphate transporter, whose elevated expression in glioblastoma controls cell survival (Belkaid *et al.*, 2006), and whose downregulation in cells overexpressing MT1-MMP triggered cell death (Belkaid *et al.*, 2007).

How MT1-MMP-mediated downstream signaling events are controlled and which intracellular components are involved in MT1-MMP transducing functions is currently poorly understood. MT1-MMP's intracellular domain-mediated signaling was already shown to trigger events that led to phosphorylation of signaling intermediates including signal transducer and activator of transcription 3 (Zgheib *et al.*, 2013), extracellular signal-regulated kinase (Gingras *et al.*, 2001), and nuclear factor-kappa B (Sina *et al.*, 2010), as well as inducing the expression of RhoA (Annabi *et al.*, 2005). Whether such MT1-MMP-mediated events require intracellular binding partners to interact with the 20 amino acid intracellular domain of MT1-MMP remains unknown. In fact, several MT1-MMP cytoplasmic domain binding proteins have been identified and include the μ 2 subunit of adaptor protein 2 (Uekita *et al.*, 2001), gC1qR (Rozanov *et al.*, 2002), p130Cas (Gingras *et al.*, 2008) and the phosphorylated form of caveolin-1 (Labrecque *et al.*, 2004). MT1-MMP cytoplasmic

tail-binding protein-1 (MTCBP-1), a new member of the Cupin superfamily, was also suggested as a possible multifunctional protein acting as an invasion suppressor and was shown to be down-regulated in tumors (Uekita *et al.*, 2004). Although preliminary evidence suggested that it bound to the MT1-MMP cytoplasmic domain, little is known regarding its capacity to affect the intracellular signaling events triggered by MT1-MMP.

In the current study, we first addressed the possible correlative interrelationship that would link MT1-MMP and MTCBP-1 expression using clinically-validated grade I to grade IV human brain tumor tissues. We next used fluorescence resonance energy transfer by acceptor photobleaching (FRET-AP) and surface plasmon resonance analysis to evaluate the requirement of the MT1-MMP cytoplasmic domain for MTCBP-1 recruitment and interaction. Finally, we tested the functional impact of MTCBP-1 on MT1-MMP-mediated autophagy signaling in glioblastoma cells.

7.5 Material and methods

Materials : Sodium dodecylsulfate (SDS) and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON). Cell culture media was obtained from Life Technologies (Burlington, ON). Electrophoresis reagents were purchased from Bio-Rad (Mississauga, ON). The HyGLO™ chemiluminescent HRP antibody detection reagents were from Denville Scientific Inc. (Metuchen, NJ). Micro bicinchoninic acid protein assay reagents were from Pierce (Rockford, IL). The polyclonal antibodies against MTCBP-1 and GAPDH were purchased from Cell Signaling (Danvers, MA). The monoclonal anti-MT1-MMP catalytic domain antibody clone 3G4.2 was from EMD Millipore (Billerica, MA). The anti-Turbo-GFP antibody was from Origene (Rockville, MD). The polyclonal anti-TIMP-2 antibody was from Chemicon International (Temecula, 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, 100 units/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin. Cells were incubated at 37°C with 95% air and 5% CO₂.

Transfection method and RNA interference : Cells were transiently transfected with 20 nM siRNA against MT1-MMP (Hs_MMP14_6 HP validated siRNA; QIAGEN, SI03648841) or scrambled sequences (AllStar Negative Control siRNA; QIAGEN, 1027281) using Lipofectamine 2000 transfection reagent (Invitrogen, CA). MT1-MMP-specific gene knockdown was evaluated both by qRT-

PCR and typically ranged over 90% of inhibition of gene expression (not shown) as well as through the functional activation of latent proMMP-2 into active MMP-2 by gelatin zymography.

TissueScan cDNA arrays of grades I-IV brain tumour tissues : TissueScan™ cancer and normal tissue cDNA arrays were purchased from OriGene (Rockville, MD), covering 43 clinical samples of the four stages of brain cancer as well as normal tissues, and were used to assess MT1-MMP and MTCBP-1 gene expression according to the manufacturer's recommendation. Tissue cDNAs in each array are synthesized from high quality total RNAs of pathologist-verified tissues, normalized and validated with β -actin in two sequential qPCR analyses, and accompanied by clinical information for 18 WHO grade I, 11 WHO grade II, 10 WHO grade III, and 2 WHO grade IV brain tumours.

Gelatin zymography : Gelatin zymography was used to assess the extent of proMMP-2 gelatinolytic activity and activation status as previously described (Zgheib *et al.*, 2013). Briefly, an aliquot (20 μ l) of the culture medium was subjected to SDS-PAGE in a gel containing 0.1 mg/ml gelatin, a substrate that is efficiently hydrolyzed by proMMP-2 and MMP-2. The gels were then incubated in 2.5% Triton X-100 and rinsed in nanopure distilled H₂O. Gels were further incubated at 37°C for 20 hrs in 20 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 0.02% Brij-35, 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.6, then stained with 0.1% Coomassie Brilliant blue R-250 and destained in 10% acetic acid, 30% methanol in H₂O. 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 chemiluminescence.

Immunofluorescent microscopy : U87 cells were harvested on cover slips, transiently transfected with a combination of cDNA plasmids encoding for a full length Wt-MT1-MMP recombinant protein (Wt-MT1-MMP), a deleted-cytoplasmic domain recombinant protein (Δ cyto-MT1-MMP), green fluorescent protein (GFP), GFP-LC3, GFP-mCherry-LC3 or a chimeric GFP-MTCBP-1. Media was removed and cells were fixed in 10% formalin phosphate buffer (Fisher Scientific, Ottawa, ON) for 20 min, and then blocked for 1 hr in 1% BSA/PBS/ NaN_3 . Immunostaining was performed for 1 hr with the anti-MT1-MMP antibody 1:200 in 1% BSA/PBS/ NaN_3 , followed by 1:200 Rhodamine Red-X donkey anti-mouse IgG (Invitrogen, ON). A solution of 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DAPI diluted in PBS was used to stain the nuclei. Fluorescence was then examined by microscopy.

Detection of acidic vesicular organelles (AVO) and of GFP-LC3 puncta : U87 glioblastoma cells were serum-starved in media containing the different conditions of transfections (siRNA, cDNA plasmid encoding recombinant forms of MT1-MMP) or treatments with Concanavalin-A (ConA; Sigma-Aldrich Canada, L7647). Acridine Orange (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Sigma-Aldrich Canada, A6014) was added to each well, cells were incubated for 15 min at 37°C in the dark. Fluorescence was then examined by flow cytometry in FL3-H upper quadrants. Transient cell transfection with pEGFP-LC3 or pEGFP-m-Cherry-LC3 (generously provided by Dr Patrick

Labonté, INRS-IAF, Qc), Wt-MT1-MMP, or Δ cyto-MT1-MMP cDNA plasmids was performed using lipofectamine 2000 as previously described (Proulx-Bonneau *et al.*, 2011b). Fluorescence of GFP-LC3 puncta was then examined by flow cytometry in FL1-H lower right quadrants.

FRET acceptor bleaching microscopy : Acceptor bleaching experiments were performed using a Nikon Eclipse Ti confocal microscope. Fluorescence images of the fixed cells were taken as single optical sections using a 63X Planapochromat (NA = 1.4) oil immersion objective focused to the middle of the cell along the Z axis. The pinhole size was adjusted to 1.5 Airy units. The cells overexpressing GFP fusion proteins (GFP alone or GFP-MTCBP-1) were imaged using a 488 nm laser line excitation and a 530DF30 filter for emission. Alexa Fluor 568-coupled secondary antibody was used to assess the overexpressed cell surface-localized recombinant Wt-MT1-MMP or Δ cyto-MT1-MMP proteins using a 561 nm laser line excitation and a LongPass (LP570) filter for emission. Images were analyzed using NIS-Elements 4.0 C software from Nikon. Bleaching experiments were performed as follows: A region of interest (ROI) was chosen at the cell membrane (Yellow ellipse), inside the cell (Blue rectangle) and outside the cell (Background). Before starting the repetitive bleaching procedure, three prebleaching images were recorded in both channels. Afterwards, the power of the 561 nm laser line was set to 5% and 100% for the imaging and bleaching illuminations, respectively. Five consecutive cycles of one second of bleaching in the region of interest and 1 sec of sequential imaging acquisitions of the green and red channels were performed. These FRET acceptor bleaching experiments were performed on 10 cells from each condition and for 3 different regions of interest, for a total of 30 FRET analysis for each condition of co-transfections.

Surface plasmon resonance analysis : SPR analyses were performed using a Biacore T200 instrument (GE Healthcare). MTCBP-1 recombinant protein (Fitzgerald industries international, Acton, MA) was immobilized on a carboxymethylated dextran CM5 sensor chip (GE Healthcare) using an amine-coupling strategy. Briefly, the sensor chip surface was activated with a 1:1 mixture of N-hydroxysuccinimide and 3-(N,Ndimethylamino)-propyl-N-ethylcarbodiimide. MTCBP-1 solution (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was injected at a flow rate of 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ using HBS-N running buffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.4) to reach a level of immobilization of 400 RU. Surfaces (protein and reference) were blocked by the injection of an ethanolamine solution. Binding kinetics of a peptide encompassing the entire intracellular cytoplasmic domain of MT1-MMP (RRHGTPRRLLYCQRSLLDKV) and of a relative scrambled peptide (YHLSPQPRKEKRVYYKRTAR) over the MTCBP-1 sensor chip was evaluated in HBS-N buffer at increased concentrations (6.25 to 100 μM) at a flow rate of 20 $\mu\text{L}/\text{min}$. The sensor chip was regenerated by injecting 20 μL of a 10 mM glycine solution, pH 3. Binding sensograms were obtained by subtraction of the reference flow cell. Experiments were performed in duplicate and data analysis was performed using the BIAevaluation software package (GE Healthcare).

Statistical data analysis : FRET data are representative of 30 FRET analysis on 10 cells from each condition. For all the other experiments, three independent experiments were performed and 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 respective figures.

7.6 Results

High grade brain tumors express low MTCBP-1 and high MT1-MMP. The classification of brain tumors is based on the premise that each type of tumor results from the abnormal growth of a specific cell type. To the extent that the behavior of a tumor correlates with basic cell type, tumor classification often dictates the choice of therapy and predicts prognosis. The WHO grading system classifies grade I brain tumors as benign and slow growing, while grade IV are the most malignant (Louis *et al.*, 2007). In order to evaluate the extent of MT1-MMP and MTCBP-1 expression in all four brain tumor grades, we used a cDNA tissue array to assess the transcript levels of each of these biomarkers. We found that MTCBP-1 was highly expressed in low invasive grade I brain tumor tissues and tended to decrease in highly invasive high grade tumors (Fig.7.1A, right panel). Inversely, MT1-MMP expression increased with the tumor grade (Fig.7.1A, left panel) in accordance with previous observations reporting that increased MT1-MMP expression predicts poor survival in human glioma (Wang, L. *et al.*, 2013). A scheme of the molecular signature characterizing the current hypothesized models of low MT1-MMP/MTCBP-1 expression ratio in low grade brain tumors versus high MT1-MMP/MTCBP-1 expression ratio is depicted (Fig.7.1B). Whether overexpressing MTCBP-1 in U87 cells derived from high grade glioblastoma translates into colocalization with MT1-MMP at the plasma membrane, and how this affects MT1-MMP-mediated autophagy was next investigated.

FRET- and SPR-based evidence of MTCBP-1 interaction with MT1-MMP's cytoplasmic domain in U87 glioblastoma cells. In order to accurately determine MTCBP-1's capacity to interact with the intracellular domain of MT1-MMP, the protein expression of a recombinant form of MTCBP-1 was first validated in transiently-transfected U87 glioblastoma cells with various amounts of a cDNA

plasmid encoding MTCBP-1 fused to green fluorescent protein (GFP). When cell lysates were electrophoresed and immunoblotting performed, we found that immunoreactive material increased dose-dependently with maximal expression reached at 1 μ g of plasmid DNA, and that the protein could be detected using either an anti-MTCBP-1 antibody or an anti-turbo-GFP antibody (Fig.7.S1A, in the supplemental data section). Fluorescence microscopy also enabled us to confirm the expression of the recombinant GFP-MTCBP-1 protein (Fig.7.S1B, in the supplemental data section). Using confocal microscopy and fluorescence resonance energy transfer (FRET) analysis, we next looked for evidence of interaction between MTCBP-1 and MT1-MMP. We performed transient co-transfections with combinations of cDNA plasmids encoding Wt-MT1-MMP with GFP or with GFP-MTCBP-1, as well as co-transfections of cDNA plasmids encoding a cytoplasmic-deleted form of MT1-MMP (Δ cyto-MT1-MMP) also with GFP or GFP-MTCBP-1 in U87 glioblastoma cells. As expected, the co-expression of GFP alone with either Wt-MT1-MMP or Δ cyto-MT1-MMP, the latter being demonstrated by increased red labeling at the cell surface, did not show any significant changes in green fluorescence (Fig.7.2A and C). Interestingly, only co-expression of GFP-MTCBP-1 with Wt-MT1-MMP showed an increased green fluorescence after acceptor bleaching, suggesting that MTCBP-1 is recruited and interacts with the cytoplasmic domain of recombinant MT1-MMP (Fig.7.2B and D). To confirm FRET in the region of interest (ROI) only, measurements in the control region (blue rectangles) and in the ROI (yellow ellipse) were taken. None of the co-transfections revealed any significant changes in the green or red emission fluorescence in the control region, confirming that there are no diffused FRET signals outside the ROI (Fig.7.2E and F). FRET between GFP-MTCBP-1 and Wt-MT1-MMP (Fig.2H, open circles) is confirmed by the increase in 488 nm green fluorescence, while the other co-transfections didn't show any changes in any fluorescence filter (Fig.7.2G and H). Finally, surface plasmon resonance analyses were performed in order to monitor the

interaction between a 20 amino acids peptide encompassing the entire MT1-MMP's cytoplasmic domain and MTCBP-1 immobilized on the sensor chip surface. Using a steady-state affinity model, we found that the peptide encoding the MT1-MMP cytoplasmic sequence interacted with MTCBP-1 with a K_D of 12.8 μM (Fig.7.2I, right panel). In a control experiment, injection of a scrambled 20 amino acids sequence peptide with similar physicochemical properties (net charge at physiological pH, hydrophobicity index, theoretical pI, molecular weight) resulted in a sensorgram showing no significant interaction (Fig.7.2I, left panel), strongly suggesting that the peptide derived from MT1-MMP's cytoplasmic domain interacted specifically but with moderate affinity with MTCBP-1. Co-immunoprecipitation experiments have also been performed using anti-MT1-MMP antibody to immunoprecipitate recombinant MTCBP-1 from MTCBP-1-transfected cells (Fig.7.S2, in the supplemental data section).

MT1-MMP overexpression triggers autophagy events and is abrogated by MTCBP-1. Given the close proximity of MTCBP-1 and MT1-MMP, we sought to functionally characterize the effects of their interaction by assessing the newly identified autophagy-mediated events triggered by MT1-MMP (Pratt *et al.*, 2012). To this end, we overexpressed the full length Wt-MT1-MMP or the Δcyto -MT1-MMP forms alone or in combination with GFP or GFP-MTCBP-1 (Fig.7.3A, top three upper panels). Proper membrane location and functional validation of both MT1-MMP recombinant constructs was confirmed by gelatin zymography, where latent proMMP-2 activation into MMP-2 was visualized (Fig.7.3A, lowest panel). Recombinant MTCBP-1 protein expression was also only observed in GFP-MTCBP-1-transfected cells but not in GFP-transfected cells (Fig.7.3A) and did not alter MT1-MMP's capacity to activate proMMP-2, in accordance with previous reports (Uekita *et al.*, 2004). Given its role in the regulation of MT1-MMP auto-proteolytic activity, the tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) expression profiling was

monitored and found not to be altered (Fig.7.3A). Moreover, the auto-proteolytic activity of MT1-MMP was also found unaltered given similar levels of the 43-kDa inactive fragment of MT1-MMP were assessed (Fig.7.S3, in the supplemental data section). Altogether, this suggests that the MT1-MMP/TIMP-2 complex is unaltered and functional in any given conditions tested. When autophagy acidic vesicles formation was assessed (Fig.7.3B), we found that Acridine Orange staining significantly increased upon Wt-MT1-MMP overexpression, and this was abrogated by co-expressing MTCBP-1 (Fig.7.3C). Neither Δ cyto-MT1-MMP nor MTCBP-1 overexpression triggered significant increases in Acridine Orange staining, confirming the absolute requirement for the intracellular domain of MT1-MMP. Measurement of GFP-LC3 puncta formation in cells overexpressing a combination of Wt-MT1-MMP, Δ cyto-MT1-MMP, GFP, or GFP-MTCBP-1 was also performed and visualized either by fluorescent microscopy (Fig.7.4A and B) or measured by a decrease in fluorescence by flow cytometry (Fig.7.4C). In support of the Acridine Orange staining, we found that puncta formation occurred only in those cells overexpressing Wt-MT1-MMP, and that overexpression of MTCBP-1 abrogated Wt-MT1-MMP-induced LC3 puncta (Fig.7.4B), and as reflected by a decrease in the geometric mean (GMean) of fluorescence (Fig.7.4C). The quantification of total punctae/cells has also been performed for all the experimental conditions and the analysis provided in the supplemental figure Fig.7.S4. Altogether, these data suggest that the balance between MT1-MMP-mediated signaling and MTCBP-1 expression may contribute to the autophagic index of the cancer cell.

Concanavalin-A-induced autophagy requires MT1-MMP and is abrogated by MTCBP-1 overexpression. Concanavalin-A is a lectin well documented to trigger MT1-MMP expression and to induce autophagy (Annabi *et al.*, 2002a; Lei et Chang, 2007). We therefore evaluated the impact of MT1-MMP gene silencing in control and ConA-treated cells. Effective silencing of MT1-MMP altered ConA's capacity to

trigger proMMP-2 activation (Fig.7.5A) confirming its involvement in ConA functions, and was further found to abrogate ConA induction of autophagic vacuole formation (Fig.7.5B and C). We next assessed the impact of MTCBP-1 overexpression upon ConA's capacity to induce autophagic acidic vesicles. Cells were therefore transiently-transfected with cDNA plasmids expressing either GFP or GFP-MTCBP-1, then treated or not with various concentrations of ConA (Fig.7.5D). We found induction of autophagic acidic vesicles in all cells which had not incorporated GFP (Fig.7.5E, upper panel, closed circles) or which had not incorporated GFP-MTCBP-1 (Fig.7.5E, upper panel, and open circles). On the other hand, while fluorescent cells which expressed GFP were still found sensitive to autophagic acidic vesicle formation (Fig.7.5E, lower panel, closed circles), those which had overexpressed GFP-MTCBP-1 became resistant to ConA-mediated induction of autophagy (Fig.7.5E, lower panel and open circles). Interestingly, several main regulators of autophagy (LC3, ATG3, ATG5, ATG12, ATG16L1, BNIP3), which expression was tested by qRT-PCR, were not found induced by ConA, neither affected by MTCBP-1 in U251 cells, an alternate glioblastoma cell line which gene and protein profiles differ from those of U87 cells (data not shown).

7.7 Discussion

Resistance to apoptotic cell death, a hallmark of most cancers, has driven the search for novel targets in cancer therapy. The autophagy pathway is among such targets currently being explored in multiple cancers including gliomas, and is a promising avenue for further therapeutic development (Kaza *et al.*, 2012). A better understanding of autophagy regulation and of autophagy-inducing mechanisms is therefore an emerging area of interest in brain cancer research. Given that progression of astrocytic tumors into more aggressive and chemoresistant phenotypes is, in part, related to their decreased autophagic capacity (Huang, X. *et al.*, 2010), appropriate modulation of autophagy may therefore sensitize tumor cells to anticancer therapy (Shingu *et al.*, 2009). In this study, we highlight novel MT1-MMP-to-MTCBP-1-mediated mechanisms, showing enhanced MT1-MMP expression in high grade tumors and enhanced MTCBP-1 expression in low grade tumors (Fig.7.1A). Since we have also shown that MTCBP-1 abrogates MT1-MMP-mediated signaling that triggered autophagy, our data suggest that high grade brain tumors may possibly exhibit unregulated MT1-MMP-mediated autophagy processes that may enable these cancers to escape cell death-inducing therapeutic modalities that trigger, in part, cell autophagy. Together with the fact that cellular stresses such as hypoxia induce both autophagy (Brahimi-Horn *et al.*, 2011) and MT1-MMP (Annabi *et al.*, 2003b; Proulx-Bonneau *et al.*, 2011a), these adaptive mechanisms may help established tumors to survive (Eskelinen. 2011).

Our study further sheds light on the dual pro-apoptotic and autophagic capacities of biomarkers, such as MT1-MMP, that exhibit both properties. For instance, small-interfering RNA-mediated gene silencing of CHOP/GADD153 resulted in increased cell viability, decreased upregulation of LC3II and of cleaved

caspase-3, and inhibition of apoptosis and autophagy (Emdad *et al.*, 2011). In support of this, the dual role of MT1-MMP in apoptosis as well as in autophagy was shown through direct and indirect evidence (Belkaid *et al.*, 2007; Langlois *et al.*, 2005; Pratt *et al.*, 2012; Proulx-Bonneau *et al.*, 2011b). Beyond the evidence that MT1-MMP bears combined pro-apoptotic and pro-autophagic transducing properties, our study highlights an unreported role for MTCBP-1, in addition to its ability to inhibit MT1-MMP-mediated cell invasion (Uekita *et al.*, 2004), in abrogating MT1-MMP's ability to trigger autophagy. Given that MTCBP-1 expression is low in highly invasive tumors, this observation strengthens the concept that high grade brain tumors possess cell death-escaping properties, possibly through dysregulated autophagy. In support of this, an oligonucleotide microarray of metastasis-related genes in genistein-treated HCC1395 breast cancer cells demonstrated upregulated expression of MTCBP-1 (Lee, W. Y. *et al.*, 2007). Given that genistein can induce both apoptotic and autophagic cell death (Gossner *et al.*, 2007); it has the potential to circumvent chemoresistance due to alterations in apoptotic signaling. Whereas a variety of other food components including vitamin D, selenium, curcumin, and resveratrol have also been shown to stimulate autophagy vacuolization (Singletary et Milner. 2008), it remains difficult to determine if induction of autophagy is a protumorigenic or antitumorigenic response.

While the Kd constants, as determined by SPR, may appear insufficient to infer efficient interaction between MTCBP1 and MT1-MMP *in vivo*, we still provide evidence for MTCBP-1 and MT1-MMP interaction using immunoprecipitation approaches. The SPR-derived constants most likely relate to the fact that the peptide derived from MT1-MMP does not necessarily adopt a precise and optimal secondary structure in the absence of the remaining protein. Moreover, the interaction observed *in vivo* between MTCBP1 and MT1-MMP may probably also mostly occur in the vicinity of the plasma membrane, a somewhat hydrophobic environment. In sharp contrast, the SPR assays are required to be performed in aqueous solution. These

conditions may therefore prevent the MT1-MMP-derived peptide to adopt a precise 3D conformation allowing for perfect positioning of the residues side chains involved in the interaction. Nevertheless, our current SPR data show that a short peptide derived from MT1-MMP can interact specifically with a relatively good affinity with MTCBP-1, in contrast to a scrambled sequence peptide with similar net charge and molecular weight.

Our study also supports the possible development of therapeutic strategies targeting the transducing events mediated by MT1-MMP's intracellular domain. Structure-function studies have already confirmed that MT1-MMP induces the expression of biomarkers such as cyclooxygenase-2 in inflammation (Annabi *et al.*, 2009b; Proulx-Bonneau *et al.*, 2011b), BNIP-3 in autophagy (Pratt *et al.*, 2012), endothelial tubulogenesis (Pilorget *et al.*, 2005), and apoptosis (Belkaid *et al.*, 2007). ConA was also confirmed to trigger autophagy (Lei et Chang. 2007) and to, in part, require MT1-MMP-mediated signaling (this study). Interestingly, inhibition of the intracellular domain Tyr573 phosphorylation of MT1-MMP by either genistein (Li, L. *et al.*, 1997; Yu, M. *et al.*, 1997) or through site-directed mutagenesis approaches (Zgheib *et al.*, 2013), inhibited ConA-mediated or recombinant MT1-MMP's transducing functions. Furthermore, ConA-induced signaling cascades, in which MT1-MMP served as an intermediate, were also recently found to be triggered and highlighted a role for transcription factors including NF- κ B (Sina *et al.*, 2010), STAT3 (Akla *et al.*, 2012), and HIF-1 α (Proulx-Bonneau *et al.*, 2011a). Pharmacological strategies targeting MT1-MMP functions recently included the use of tetra- and hexavalent mannosides which inhibited the pro-apoptotic effects of ConA (Fortier *et al.*, 2008), epigallocatechin-3-gallate which inhibited colony-stimulating factor-2, and -3 expression (Zgheib *et al.*, 2013). Whether these agents also modulate MT1-MMP-mediated autophagy remains to be explored. Finally, gene silencing of p130cas, another MT1-MMP interacting partner in endothelial cells

(Gingras *et al.*, 2008) whose expression is associated with poor clinical outcome in human ovarian carcinoma (Nick *et al.*, 2011), decreased tumor growth through stimulation of combined apoptotic and autophagic cell death (Nick *et al.*, 2011).

In conclusion, our data suggest that the signaling balance that is involved in the modulation of the autophagy index is crucial in dictating the survival or death decision that cells take during metabolic adaptation and tumor progression (Janji *et al.*, 2013). The MT1-MMP-to-MTCBP-1 expression ratio may be one of these “go-no-go” decision making processes (schematized in Fig.7.6). Although our study does not exclude the contribution of a potential yet unidentified third partner, our FRET analysis data allows us to confidently confirm the molecular proximity of MTCBP-1 and MT1-MMP intracellular domain at angstrom distances ranging from 10-100 Å (Sekar et Periasamy. 2003), while our SPR analysis data evidences specific interaction between MTCBP-1 and the intracellular MT1-MMP domain. We believe that identification and functional characterization of intracellular MT1-MMP binding partners, such as MTCBP-1, may enable the development of future therapeutic strategies aimed at exploiting intracellular MT1-MMP transducing functions which contribute to the invasive and chemoresistant phenotype of glioblastoma.

7.8 Acknowledgements

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

7.9 Figures

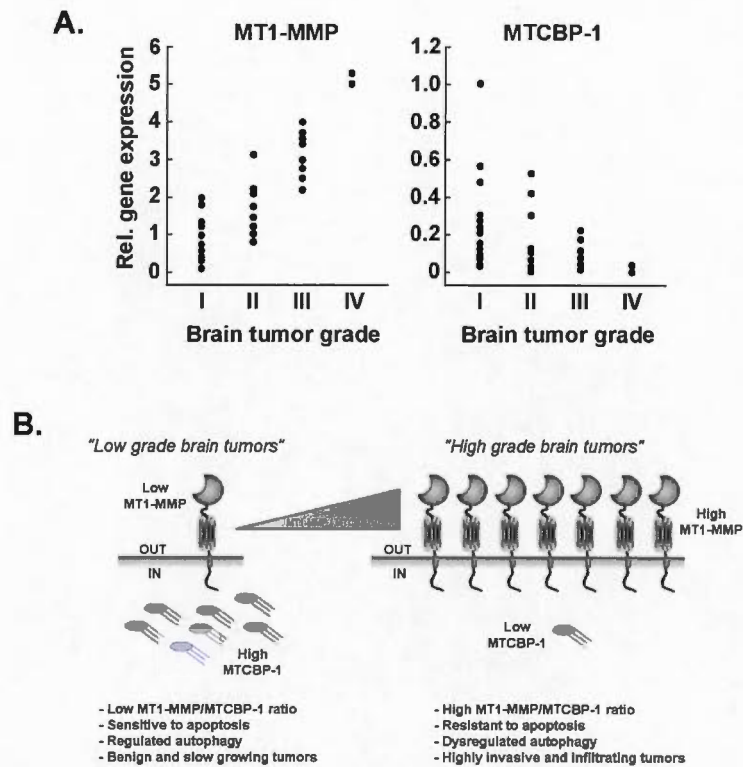


Figure 7.1 MT1-MMP and MTCBP-1 gene expression profiling in grades I-IV brain tumour tissues. A) TissueScan™ cancer and normal tissue cDNA arrays from 43 clinical samples covering four stages of brain cancer were used to compare MT1-MMP and MTCBP-1 gene expression. Tissue cDNAs in each array were synthesized from high quality total RNAs of pathologist-verified tissues, normalized and validated with β -actin and provided with clinical information for 18 WHO grade I, 11 WHO grade II, 10 WHO grade III, and 2 WHO grade IV brain tumours. B) Scheme summarizing the hypothesis that MT1-MMP-to-MTCBP-1 ratio may be indicative of high grade tumors resistance to cell death. Low grade astrocytic tumors are benign and slow growing tumors characterized by regulated autophagy, sensitivity to apoptosis and a low MT1-MMP/MTCBP-1 ratio. Transition to highly invasive and infiltrating high grade tumors is characterized by dysregulated autophagy, resistance to apoptosis, and high MT1-MMP/MTCBP-1 ratios. We hypothesize new functions of MTCBP-1 in the regulation of MT1-MMP-mediated autophagy signalling, and suggest that the MT1-MMP-to-MTCBP-1 ratio may contribute to the acquisition of a cell death resistant phenotype in high grade brain tumors.

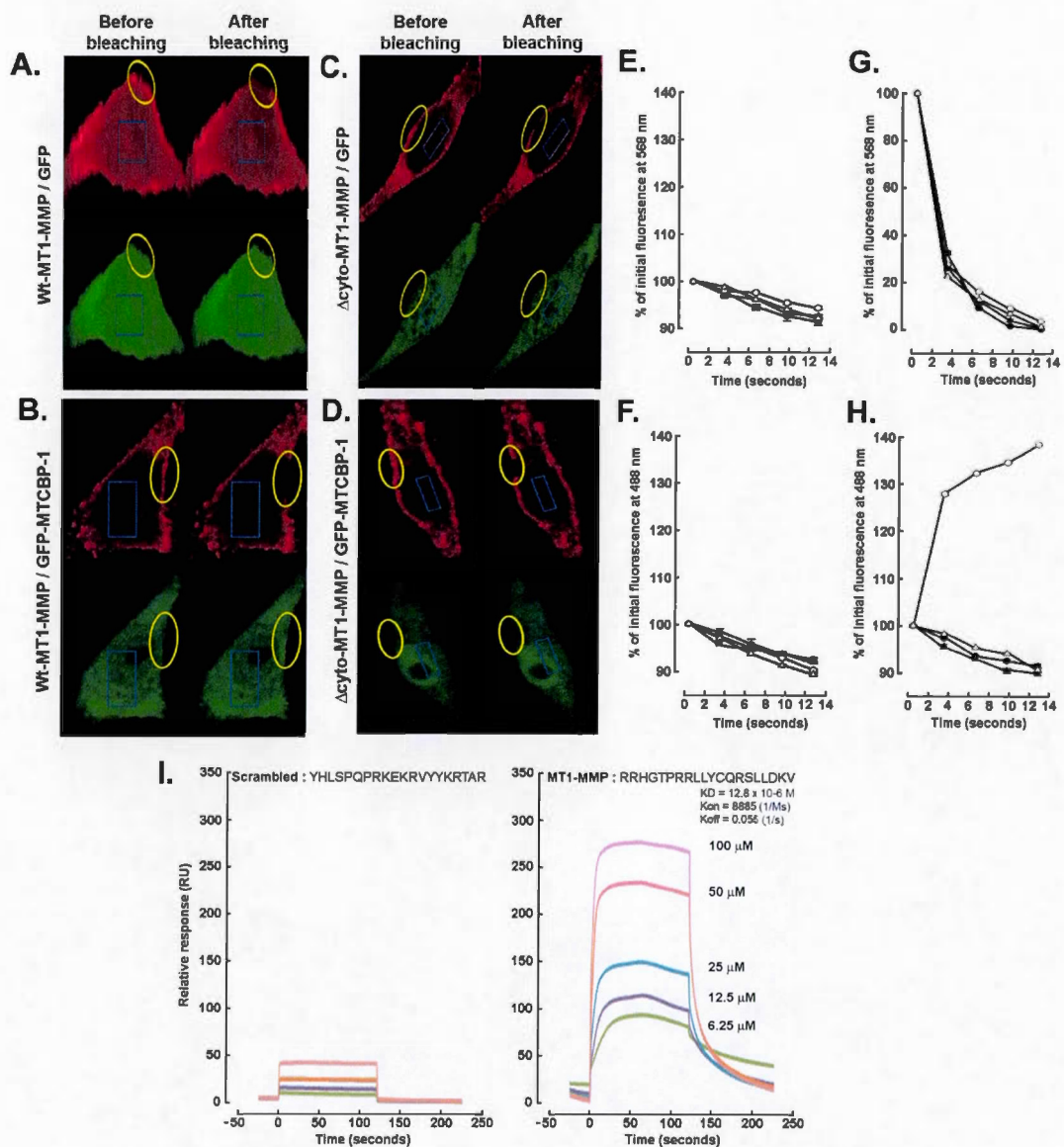


Figure 7.2 FRET- and SPR-based evidence of MTCBP-1 recruitment and interaction with MT1-MMP's cytoplasmic domain in U87 glioblastoma cells. U87 glioblastoma cells were transiently transfected with combinations of plasmid cDNAs encoding either a full length MT1-MMP recombinant protein (Wt-MT1-MMP), a cytoplasmic domain-deleted MT1-MMP recombinant protein (Δ cyto-MT1-MMP), a GFP recombinant protein and a GFP-MTCBP-1 recombinant protein. Cells were prepared for FRET acceptor bleaching procedure as described in the Methods section. A-D) Photobleaching was performed at 561 nm and images were taken before and after acceptor bleaching in 488 nm green fluorescence and in 568 nm red

fluorescence. Blue rectangles and yellow ellipses represent respectively the control region and the region of interest (ROI). E-H) Measurements of the FRET signals were taken for 5 cycles (see the Methods section) for the 488 nm green fluorescence and the 568 nm red fluorescence for the control region and the ROI (G-H). The different co-transfection conditions are as follows : Δ (Wt-MT1-MMP/GFP), \blacktriangle (Δ cyto-MT1-MMP/GFP), \circ (Wt-MT1-MMP/GFP-MTCBP-1) and \bullet (Δ cyto-MT1-MMP/GFP-MTCBP-1). Interactions of a peptide encompassing the entire MT1-MMP's intracellular cytoplasmic domain (I, right panel) and of a relative 20 amino acid scrambled sequence peptide (I, left panel) to MTCBP-1 were detected by surface plasmon resonance analysis. MTCBP-1 was immobilized on a CM5 sensor chip and peptides were injected with concentrations ranging from 6.25 to 100 μ M. The reference-subtracted response curves were analyzed using the BIAevaluation software package and fit to a steady-state affinity model.

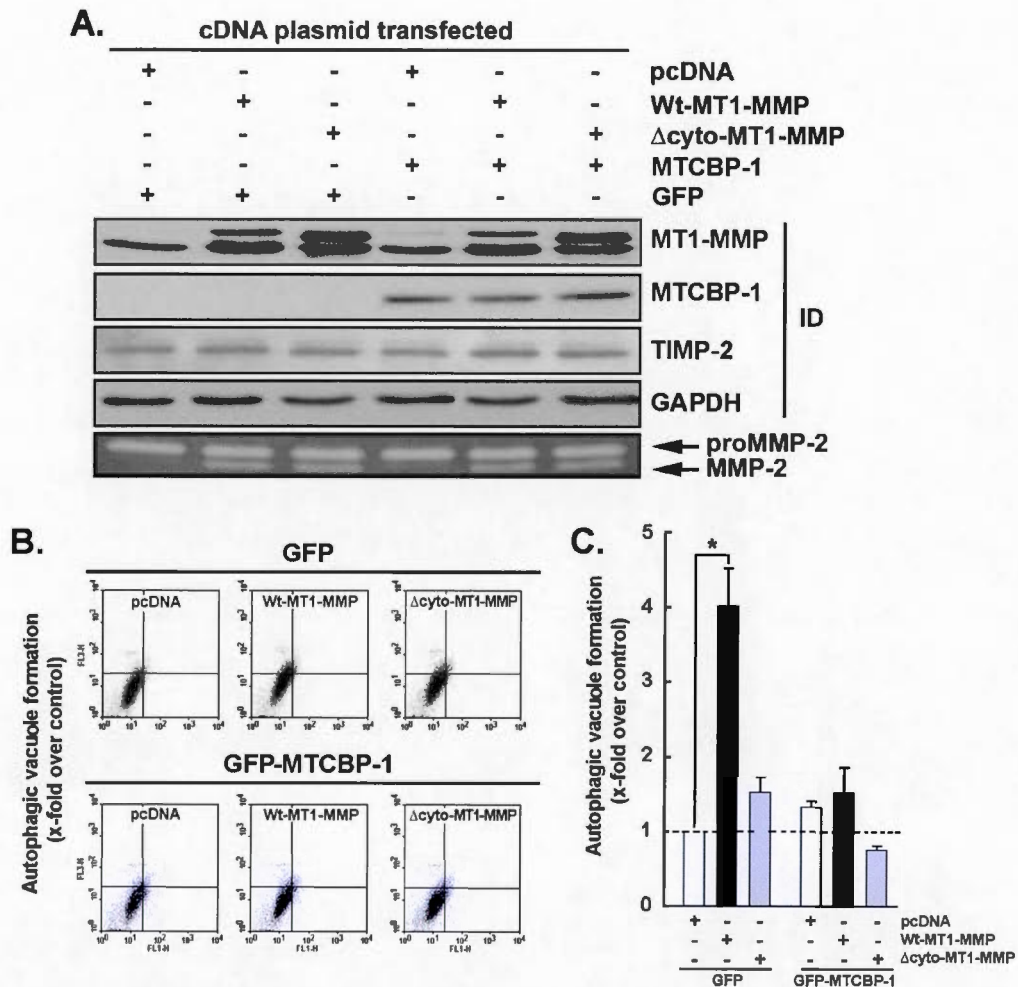


Figure 7.3 MT1-MMP overexpression triggers autophagy events and is abrogated by MTCBP-1. A) U87 glioblastoma cells were transiently transfected with combinations of plasmid cDNAs encoding either a full length MT1-MMP recombinant protein (Wt-MT1-MMP), a cytoplasmic domain-deleted MT1-MMP recombinant protein (Δ cyto-MT1-MMP), a GFP recombinant protein, a GFP-MTCBP-1 recombinant protein, or with an empty pcDNA vector (Mock). Cell lysates as well as conditioned media were isolated as described in the Methods section in order to perform MT1-MMP, MTCBP-1 and GAPDH immunodetections or gelatin zymography to assess proMMP-2 activation status (cropped blots/gels are shown for the 4 panels and full-length blots/gels can be seen at supplemental Fig.7.S3). B) Cells were stained with Acridine Orange, while acidic vacuole formation (FL3-H) and GFP-associated fluorescence (FL1-H) were examined by flow cytometry as described in the Methods section. C) A representative histogram of the extent of autophagic vacuole formation is shown.

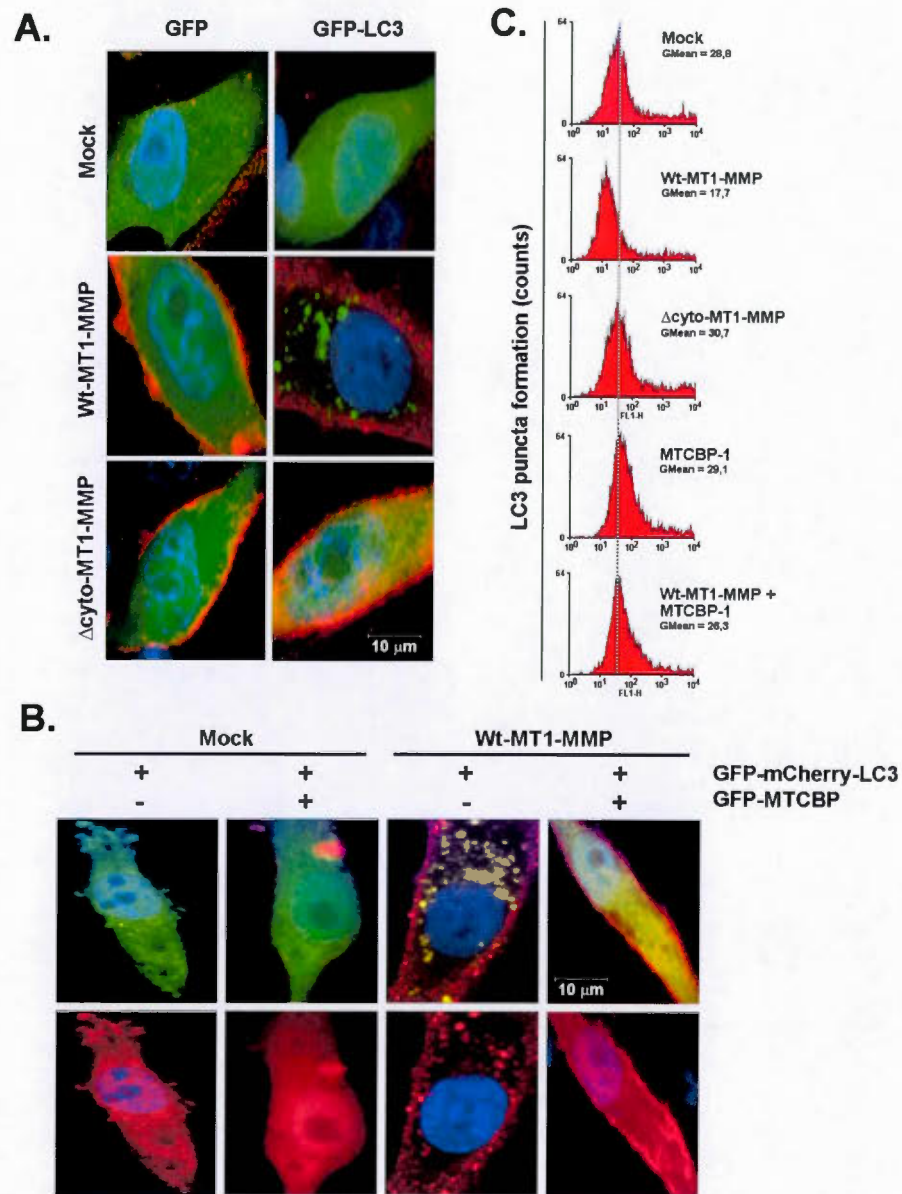


Figure 7.4 Overexpression of MTCBP-1 inhibits MT1-MMP-mediated induction of LC3 puncta. A) U87 glioblastoma cells were transiently co-transfected with cDNA plasmids encoding either a full length Wt-MT1-MMP, a cytoplasmic-deleted Δ cyto-MT1-MMP, or empty pcDNA (Mock) in combination with either a plasmid encoding GFP or a plasmid cDNA encoding pEGFP-LC3. Samples were fixed 24 hours later, immunostaining was performed for recombinant MT1-MMP expression at cell surface membranes (in red), and nuclei counterstained with Hoechst 33342 (in blue). Photomicrographs showing the intracellular distribution of exogenous LC3 (in

green) were taken using a fluorescence microscope. Characteristic punctate of pEGFP-LC3 staining can be observed in Wt-MT1-MMP-transfected. B) Similar transient co-transfections were performed with combinations of plasmid cDNAs encoding Wt-MT1-MMP, GFP-MTCBP-1, or GFP-mCherry-LC3. C) Puncta formation was also assessed by flow cytometry and reflected by a decrease in the geometric mean of fluorescence as compared to the Mock condition.

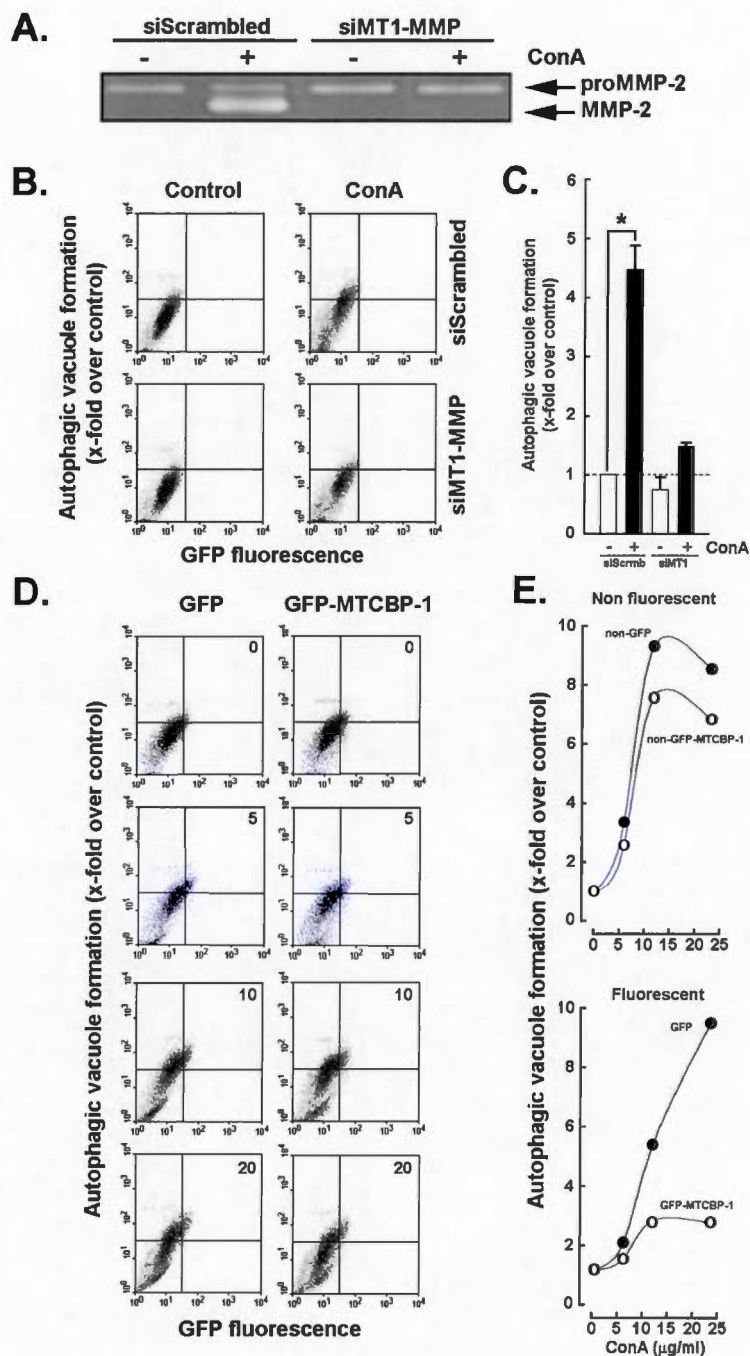


Figure 7.5 Concanavalin-A-induced autophagy requires MT1-MMP and is abrogated by MTCBP-1 overexpression. A) Conditioned media was isolated from serum-starved U87 cells transiently transfected with either siScrambled or siMT1-MMP siRNAs as described in the Methods section in order to assess ConA-mediated

proMMP-2 activation. B) Gene silencing was performed with either siScrambled or siMT1-MMP in U87 glioblastoma cells. Cells were then serum-starved in the presence or absence of 30 $\mu\text{g/ml}$ ConA for 24 hrs, stained with Acridine Orange and acidic vacuole formation (FL3-H) examined by flow cytometry as described in the Methods section. C) A representative histogram of the extent of autophagic vacuole formation is shown. D) U87 glioblastoma cells were transiently transfected with cDNA plasmids encoding either recombinant GFP or recombinant GFP-MTCBP-1, then treated with various concentrations of Concanavalin-A (ConA concentrations in $\mu\text{g/ml}$ indicated in the upper right quadrants). Cells were then stained with Acridine Orange and acidic vacuole formation (FL3-H) examined by flow cytometry as described in the Methods section. GFP-positive cells were assessed in FL1-H upper right and lower right quadrants, while acidic vacuole formation was assessed in upper left FL3-H quadrants. E) Representative plots of acidic vacuole formation in GFP-negative (non-fluorescent) cells that remained untransfected are shown in the upper panel from GFP-transfected (closed circles) and from GFP-MTCBP-1-transfected (open circles) cells. Acidic vacuole formation was also monitored in GFP-positive cells shown in the lower panel from GFP-transfected (closed circles) and from GFP-MTCBP-1-transfected (open circles) cells.

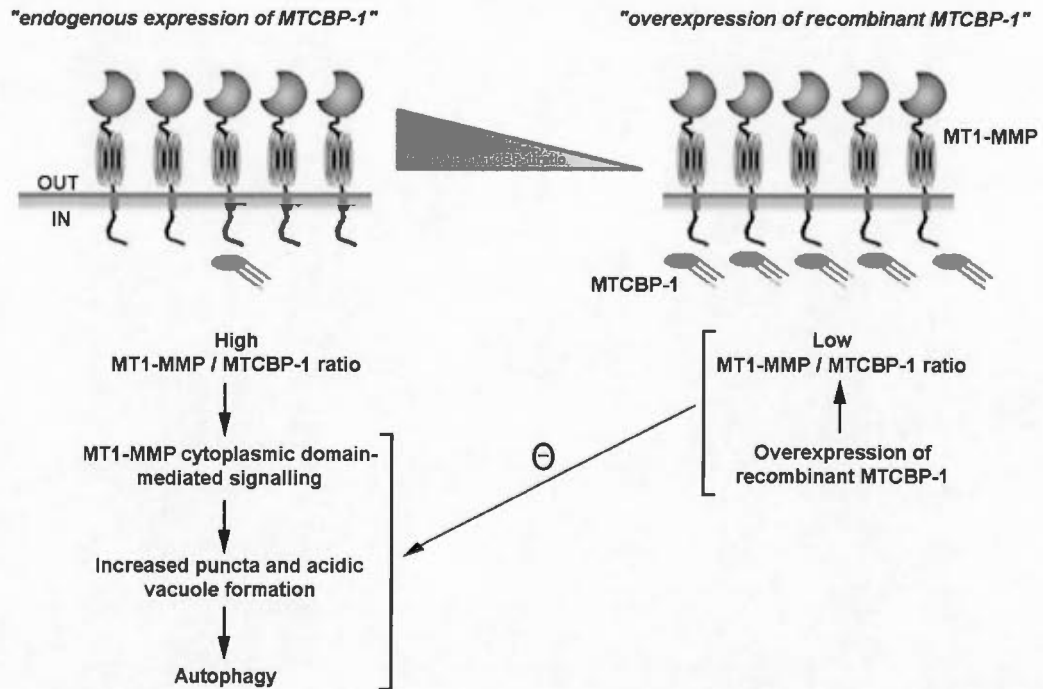


Figure 7.6 Overexpression of recombinant MTCBP-1 reduces the MT1-MMP/MTCBP-1 ratio and regulates MT1-MMP-mediated autophagy. Summarized scheme of the possible mechanism by which MTCBP-1 may regulate MT1-MMP-mediated autophagy. Endogenous expression in high grade brain tumours of MT1-MMP is elevated, while that of MTCBP-1 is low (Fig.7.1A). The consequent high MT1-MMP/MTCBP-1 ratio condition therefore favors disregulated MT1-MMP-mediated autophagy and potential resistance to cell death. On the other hand, overexpression of recombinant MTCBP-1 lowers the MT1-MMP/MTCBP-1 ratio which more closely approximates that condition observed in low grade brain tumors (Fig.1A). Our data show that MTCBP-1 functionally controls (-) MT1-MMP's intracellular-mediated induction of processes that characterize autophagy, and may control brain cancer cells invasive phenotype.

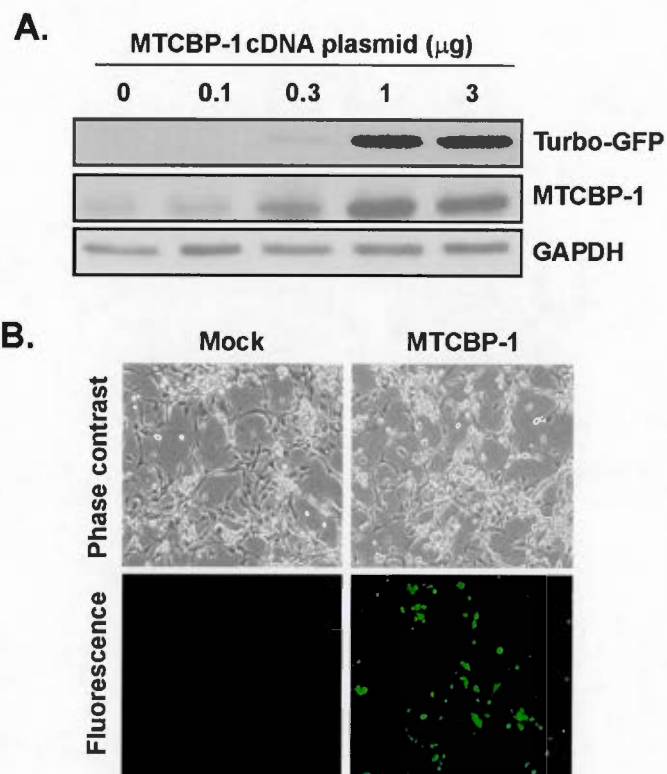


Figure 7.S1 Validation of recombinant MTCBP-1 expression in U87 glioblastoma-transfected cells. A) U87 glioblastoma cells were transiently transfected with various amounts of a plasmid cDNA encoding either a full length GFP-MTCBP-1 recombinant protein. Cell lysates were isolated as described in the Methods section in order to respectively perform GFP, MTCBP-1, and GAPDH immunodetections. B) Fluorescent microscopy was also used to measure expression of recombinant GFP-MTCBP-1 in Mock (empty pcDNA vector) or MTCBP-1-transfected cells.

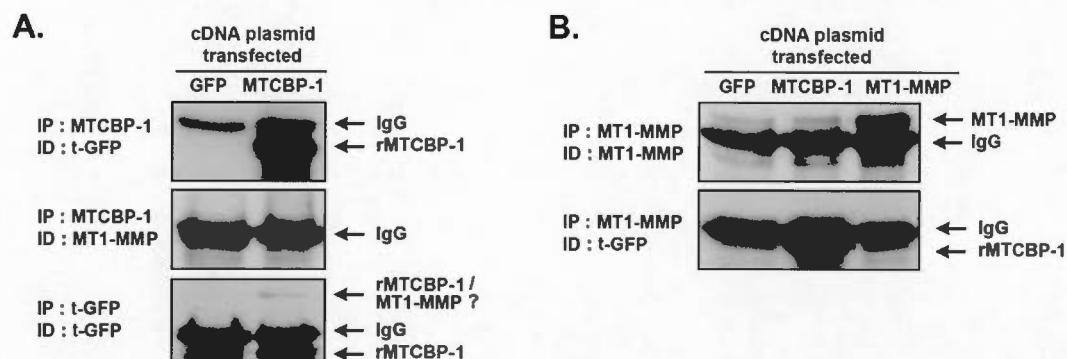


Figure 7.S2 Immunoprecipitation of recombinant MTCBP-1 by MT1-MMP in MTCBP-1 overexpressing U87 glioblastoma cells. Cell lysates were isolated from U87 glioblastoma cells that were transiently transfected with a cDNA plasmid encoding either GFP or a GFP-MTCBP-1 recombinant protein. Immunoprecipitation (IP) with either A) anti-MTCBP-1 or B) anti-MT1-MMP antibodies, and subsequent immunodetection (ID) were performed as indicated. IgG, immunoglobulin heavy chain (~50 kDa); rMTCBP-1, recombinant GFP-MTCBP-1 protein; t-GFP, anti-turbo-GFP antibody.

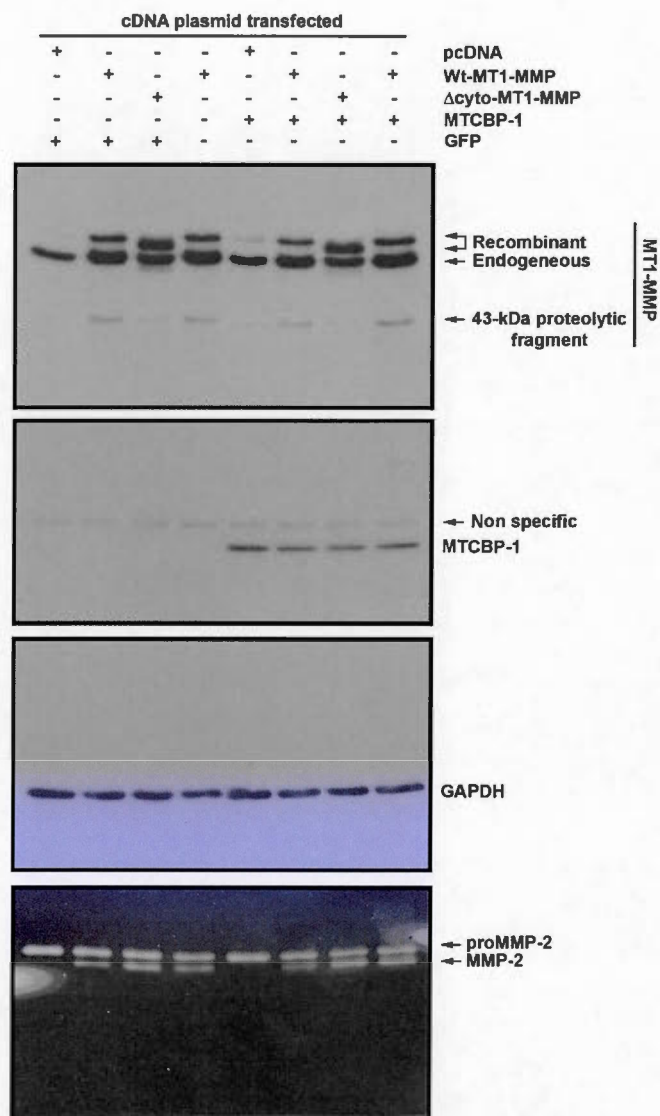


Figure 7.S3 Validation of recombinant MT1-MMP and MTCBP-1 protein overexpression efficacy in U87 glioblastoma cells. A) U87 glioblastoma cells were transiently transfected with combinations of plasmid cDNAs encoding a full length MT1-MMP recombinant protein (Wt-MT1-MMP), a cytoplasmic domain-deleted MT1-MMP recombinant protein (Δ cyto-MT1-MMP), a GFP recombinant protein, a GFP-MTCBP-1 recombinant protein, or with an empty pcDNA vector (Mock). Cell lysates as well as conditioned media were isolated as described in the Methods section in order to perform MT1-MMP, MTCBP-1 and GAPDH immunodetections (all three detections were performed from the same blot) or gelatin zymography to assess proMMP-2 activation status (cropped blots/gels from a representative experiment have been used to generate Fig.7.3 in the study).

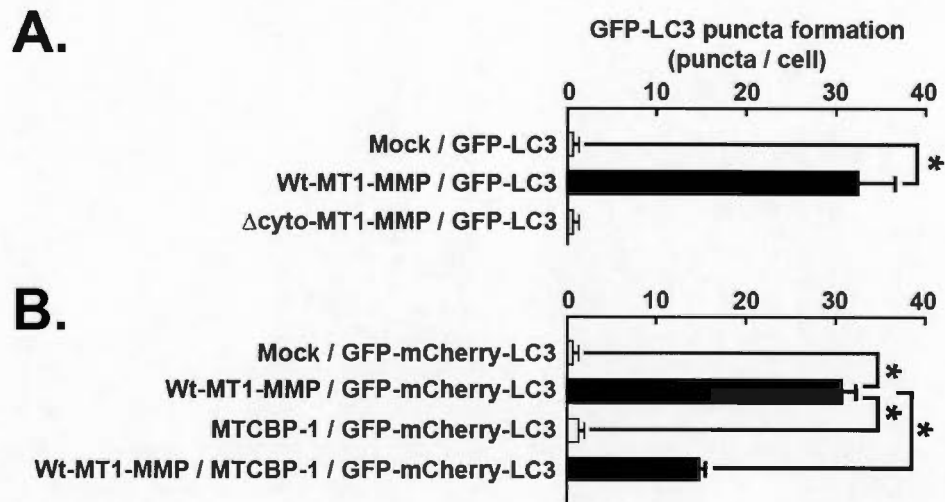


Figure 7.S4 Quantification of puncta formation confirms that overexpression of MTCBP-1 inhibits MT1-MMP-mediated induction of LC3 puncta. A) U87 glioblastoma cells were transiently co-transfected with cDNA plasmids encoding either a full length Wt-MT1-MMP, a cytoplasmic-deleted Δ cyto-MT1-MMP, or empty pcDNA (Mock) in combination with either a plasmid encoding GFP or a plasmid cDNA encoding pEGFP-LC3. Photomicrographs showing the intracellular distribution of exogenous LC3 (in green) were taken using a fluorescence microscope. Characteristic punctate of pEGFP-LC3 staining can be observed in Wt-MT1-MMP-transfected. B) Similar transient co-transfections were performed with combinations of plasmid cDNAs encoding Wt-MT1-MMP, GFP-MTCBP-1, or GFP-mCherry-LC3. Quantification of LC3 puncta was performed using Image J software. Mean of positive pixels/total pixel cell (%) \pm S.D. of three fields of view per sample are shown.

CHAPITRE VIII

DISCUSSION

Les tumeurs astrocytaires, plus particulièrement le glioblastome, sont encore un sujet très préoccupant dans notre société, puisque le nombre de personnes atteintes augmente sans cesse et les traitements efficaces et curatifs manquent à l'appel. Bien que les thérapies présentement utilisées ont un certain impact positif sur le taux de survie relatif, la biologie du cancer du cerveau demeure un domaine extrêmement complexe et incompris (Zeng, T. *et al.*, 2015). En effet, la découverte des caractéristiques pouvant affecter le développement tumoral cérébral tels que les mutations géniques, les mécanismes de défense ainsi que la dérégulation de certains processus physiologiques n'a fait qu'augmenter le nombre de cibles thérapeutiques potentielles sans pour autant y avoir de remèdes (Kogel *et al.*, 2010; Thomas, A. A. *et al.*, 2014). Pourtant, plusieurs milliers de composés (inhibiteurs d'enzymes, anticorps monoclonaux, etc.) ont été formulés et testés dans différentes études cliniques, mais aucun de ceux-ci n'a donné de résultats probants (Bastien *et al.*, 2015). En fait, ces études cliniques sont arrivées à la conclusion que les cellules cancéreuses, et spécifiquement les cellules de glioblastome, se sont dotées de mécanismes de résistance qui leur permettent de s'adapter aux changements moléculaires et cellulaires occasionnés par les thérapies anti-cancer et ainsi échapper aux processus de mort cellulaire (Haar *et al.*, 2012). C'est pourquoi, nous devons non seulement caractériser davantage les mécanismes fondamentaux qui sont à la base de la survie des glioblastomes, mais aussi approfondir nos connaissances envers les diverses

fonctions que peuvent occuper les acteurs moléculaires qui régissent le phénotype de résistance de ceux-ci.

Les résultats obtenus au cours de mes études doctorales pointent justement dans cette direction. En effet, en découvrant une nouvelle fonction pour le domaine cytoplasmique de MT1-MMP, nous venons de repousser les limites des connaissances actuelles en ce qui a trait aux rôles importants qu'occupent les MMPs, et particulièrement les MT-MMPs, au sein des tumeurs cérébrales. De plus, les études présentées dans les chapitre V, VI et VII de la présente thèse indiquent que l'induction de l'autophagie par MT1-MMP implique non seulement une des voies de signalisation les plus importantes pour la survie cellulaire (JAK/STAT), mais peut être aussi contrôlée par une protéine intracellulaire qui est très peu exprimée dans les glioblastomes (MTCBP-1). Ces résultats sont donc majeurs pour la recherche fondamentale, puisqu'ils améliorent notre compréhension des mécanismes biologiques impliqués dans la survie des glioblastomes. Par contre, certains aspects sont restés en suspens et d'autres ont été négligés et ce, pour les trois articles. D'abord, la méthodologie employée pour étudier l'autophagie comportait certaines lacunes et aurait pu être améliorée. En effet, l'utilisation systématique de l'acridine orange ne prouve pas hors de tout doute qu'il s'agit bel et bien d'une induction de l'autophagie, puisque c'est le nombre de lysosomes qui est mesuré et non pas la production d'autophagosomes. Il aurait été opportun d'utiliser des anticorps mesurant spécifiquement le flux autophagique, tels que l'anti-LC3, l'anti-p62 et l'anti-Beclin-1. Ensuite, comme les photos n'étaient pas optimales en microscopie électronique à balayage, il aurait été nécessaire d'utiliser la microscopie électronique à transmission et ce, non pas juste pour le traitement à la ConA, mais aussi pour toutes les autres conditions expérimentales (Wt-MT1-MMP, Δ Cyto-MT1-MMP, MTCBP-1, AG490 + ConA, Tofacitinib + ConA et les différents siARN pour MT1-MMP et la famille des kinases JAK). Ensuite, l'expérimentation et les explications fournies au sujet de l'axe de signalisation reliant MT1-MMP, JAK2, STAT3 et BNIP3 n'étaient pas complètes.

Par exemple, la nature de la relation entre MT1-MMP et JAK2 ainsi que la chronologie des événements cellulaires entre les quatre protéines n'ont pas été clairement déterminées. D'ailleurs, une simple immunoprécipitation aurait pu être effectuée pour valider une possible interaction entre MT1-MMP et JAK2. Un autre aspect qui a été quelque peu négligé concernait le rôle de chacun des acides aminés du domaine cytoplasmique de MT1-MMP. En fait, comme la littérature mentionne l'existence de trois acides aminés pouvant être phosphorylés (Thr567, Tyr573 et Ser577), il aurait été intéressant d'utiliser des constructions plasmidiques de la protéine MT1-MMP où chacun de ces acides aminés auraient été mutés afin de valider lesquels sont, à la fois, importants pour l'induction de l'autophagie, mais aussi au niveau de l'interaction avec MTCBP-1. De plus, la caractérisation fonctionnelle de MTCBP-1 dans les cellules U87 n'était pas très étendue. En effet, son rôle au niveau de l'expression de BNIP3 et des autres gènes responsables de la formation de l'autophagosome n'a pas été étudiée et aurait pu permettre de consolider davantage les conclusions du troisième article. Finalement, bien que les U87 étaient un bon modèle pour mener à terme mon étude, l'utilisation d'une seule lignée cellulaire a restreint celle-ci à un génotype particulier. Donc, l'utilisation d'autres lignées cellulaires de glioblastomes humains, telles que les U251, les TG98 et les U373 auraient certainement permis d'étendre les conclusions des trois articles à plus d'un génotype et ainsi émettre un postulat plus général sur la régulation de l'autophagie dans les glioblastomes humains.

Malgré le fait que l'autophagie ait été bien caractérisée dans plusieurs pathologies, sa contribution au niveau des mécanismes de régulation de la survie et de la mort cellulaire des glioblastomes en condition basale ou en réaction à une thérapie anti-cancer n'a pas été étudiée en profondeur. En effet, comme il y a très peu d'études qui ont été réalisées sur la régulation de l'autophagie dans les tumeurs cérébrales, le manque d'informations fait en sorte qu'il est difficile d'établir une thérapie ciblée contre ce processus cellulaire (Li, C. *et al.*, 2015; Sharma *et al.*, 2014).

Ensuite, les diverses études menées dans notre laboratoire sur l'implication du domaine cytoplasmique de MT1-MMP dans la transduction de signaux intracellulaires ont donné droit à d'innovantes perspectives. Effectivement, la présence de cette courte séquence de 20 acides aminés ancrée à la membrane plasmique est particulièrement intéressante puisqu'en entraînant l'activation de plusieurs voies de signalisation importantes dans le cancer telles que JAK/STAT, PI3K/AKT, RhoA/ROK et RAS/MEK/ERK, elle permet à MT1-MMP d'être désormais considérée comme un acteur clé dans la régulation des mécanismes moléculaires reliés au phénotype agressif, radio- et chimiorésistant des glioblastomes (Gingras *et al.*, 2001; Pratt et Annabi. 2014; Proulx-Bonneau *et al.*, 2011b). Cependant, malgré les innombrables études effectuées sur MT1-MMP ainsi que sur son domaine cytoplasmique, nous sommes en mesure de soulever plusieurs interrogations quant à la façon dont la cascade de signalisation est mise en branle dans un processus cellulaire précis. Par exemple, dans l'induction de la migration cellulaire, qu'est-ce qui se passe réellement pour que la protéine ERK soit phosphorylée quand MT1-MMP est exprimée de manière constitutive à la membrane plasmique (Nyalendo *et al.*, 2007)? Ou alors, quel est le lien direct entre la portion intracellulaire de MT1-MMP et la protéine JAK2 (Pratt et Annabi. 2014)? Par conséquent, il serait primordial de caractériser davantage le domaine cytoplasmique de MT1-MMP en focussant sur l'impact de chacun des 20 acides aminés sur l'activation des voies de signalisation mentionnées plus haut, mais aussi sur ses liaisons avec différentes protéines d'interaction. De cette façon, nous pourrions contribuer à améliorer l'efficacité du ciblage thérapeutique de MT1-MMP.

Finalement, en recherchant dans la littérature, nous pouvons nous apercevoir qu'il existe cinq autres MT-MMPs et que trois d'entre elles possèdent un domaine cytoplasmique. Bien qu'elles ne soient pas nombreuses, les études traitant de MMP-15 (MT2-MMP), 16 (MT3-MMP), 17 (MT4-MMP), 24 (MT5-MMP) et 25 (MT6-

MMP) ont révélé quelques similitudes avec MT1-MMP, notamment au niveau de leur aptitude à dégrader des substrats présents dans la MEC, mais aussi d'importantes différences, telles que leurs niveaux d'expression protéique et la composition de leurs domaines cytoplasmiques (Fillmore *et al.*, 2001). Il serait donc vraiment intéressant de concentrer nos efforts à : 1) découvrir si elles jouent un rôle dans la transduction de signaux intracellulaires au même titre que MT1-MMP; 2) vérifier, s'il y a lieu, quels processus cellulaires sont induits par celles-ci; 3) évaluer, s'il y a lieu, leurs protéines d'interaction et les comparer avec celles de MT1-MMP; et 4) étudier leurs rôles dans les tumeurs cérébrales.

8.1 L'autophagie, une stratégie thérapeutique contre le glioblastome?

Comme il a été décrit dans l'introduction, la régulation de l'autophagie dans le cancer est extrêmement complexe, car elle fait intervenir de nombreuses protéines et voies de signalisation qui ont des actions similaires mais aussi contraires. De plus, selon le type de tumeur, l'autophagie peut induire une survie accrue des cellules, une mort cellulaire importante ou même la sénescence (Xu, D. W. *et al.*, 2015). C'est pourquoi diverses stratégies thérapeutiques ont été adoptées dans le but de piéger ces cellules en fonction de la réponse cellulaire qu'elles développent. À ce titre, en 2005, Kondo et collègues avaient présenté trois façons de cibler les cellules cancéreuses et d'entraîner leur mort en utilisant leurs propriétés autophagiques intrinsèques (Kondo *et al.*, 2005). Ces méthodes, représentées dans la figure 8.1, sont à la base de nombreuses thérapies anti-cancer et ont aussi permis de développer diverses plateformes thérapeutiques afin de cibler efficacement les glioblastomes (Hori *et al.*, 2015; Tang, T. K. *et al.*, 2015; Zhang, X. *et al.*, 2014).

En effet, de récentes études ont démontré que plusieurs molécules d'origine naturelle ou synthétique, telles que le parthenolide, le FTY720, AD1 (un dérivé de la

colchicine) et la thioridazine, sont en mesure de provoquer la mort des cellules par une suractivation de l'autophagie (Cheng, H. W. *et al.*, 2015; Fang *et al.*, 2015; Tang, T. K. *et al.*, 2015; Zhang, L. *et al.*, 2015a). Bien que ces études aient été réalisées dans des modèles *in vitro* et *in vivo*, cette stratégie, qui s'apparente avec la méthode schématisée à la figure 8.1b, s'avère très prometteuse pour les études cliniques puisqu'elle s'attaque directement à la tumorigénèse ainsi qu'aux processus de survie cellulaire des glioblastomes. De plus, Catalano et Collègues ont démontré que la modulation à la hausse de l'autophagie bloque la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), ce qui entraîne une réduction des propriétés invasives et migratoires des glioblastomes ainsi qu'une perte du phénotype agressif et radiorésistant de ceux-ci (Catalano *et al.*, 2015).

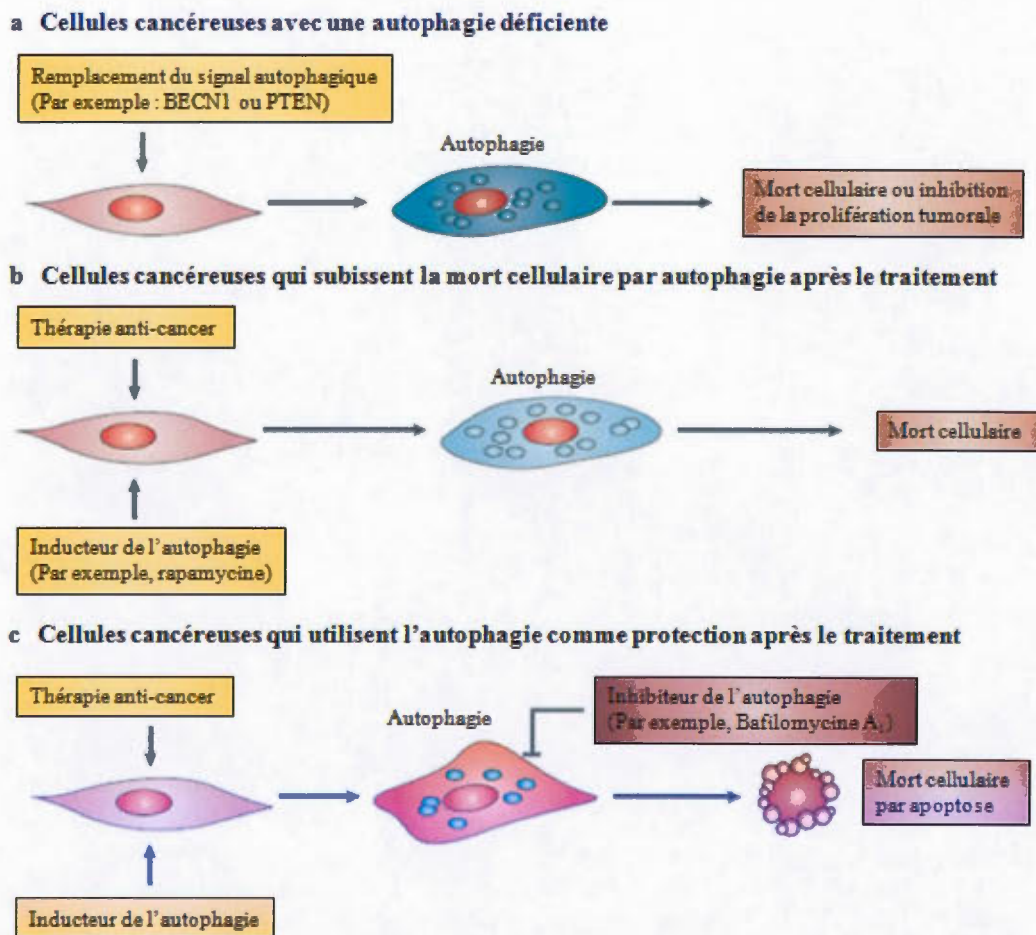


Figure 8.1 Stratégies thérapeutiques utilisées contre le cancer en ciblant l'autophagie. BECN1, Beclin-1; PTEN, *Phosphatase and Tensin homolog*. Adaptée de (Kondo *et al.*, 2005).

D'un autre côté, puisque les traitements utilisés depuis les 15-20 dernières années (Carboplatine, Cisplatine, Bevacizumab, Témazolomide, Radiothérapie, etc.) induisent tous l'autophagie, certains chercheurs ont trouvé opportun de les combiner avec des inhibiteurs autophagiques de manière à réduire la capacité de survie des cellules cancéreuses et ainsi favoriser les processus de mort cellulaire (Hori *et al.*, 2015; Li, C. *et al.*, 2015; Wojton *et al.*, 2014). Bien que peu études aient été réalisées dans les glioblastomes, celles-ci démontrent que l'inhibition de l'autophagie par la

chloroquine (CQ), l'hydroxychloroquine (HCQ), le curcumin ou bien le resvératrol peut aussi entraîner la mort cellulaire de ces derniers en les sensibilisant aux agents thérapeutiques actuels (Yuan *et al.*, 2015; Zanotto-Filho *et al.*, 2015). En effet, cette stratégie, dérivée de la méthode présentée dans la figure 8.1c, a beaucoup de potentiel, car elle cible directement un des mécanismes de résistance des glioblastomes. Néanmoins, le problème majeur reste toujours de trouver de petites molécules, comme le PHA-848125, qui vont être en mesure d'inhiber les processus autophagiques induits par les traitements conventionnels tout en traversant la barrière hémato-encéphalique (Albanese *et al.*, 2013). De plus, comme les types de glioblastomes divergent énormément en fonction du nombre de mutations possibles ainsi que des caractéristiques propres au patient (Âge, Sexe, etc.), il s'avère impératif de concevoir de nouvelles combinaisons thérapeutiques qui cibleraient plusieurs processus de mort cellulaire en même temps (Faried *et al.*, 2014). D'ailleurs, Panda et collègues ont illustré différents scénarios thérapeutiques, représentés dans la figure 8.2, ciblant les processus autophagiques et apoptotiques qui pourraient être utilisés pour traiter le glioblastome (Panda *et al.*, 2015). Finalement, bien que quelques études cliniques de phase I et II portant sur les combinaisons thérapeutiques TMZ/CQ et TMZ/HCQ sont présentement en cours, une des premières conclusions est qu'il faut trouver des inhibiteurs de l'autophagie plus spécifiques et efficaces que la CQ et l'HCQ, car les doses utilisées sont très élevées et cela entraîne d'autres problèmes de santé tels que l'anorexie, la constipation, la diarrhée, la fatigue excessive et la nausée (Ozpolat et Benbrook. 2015).

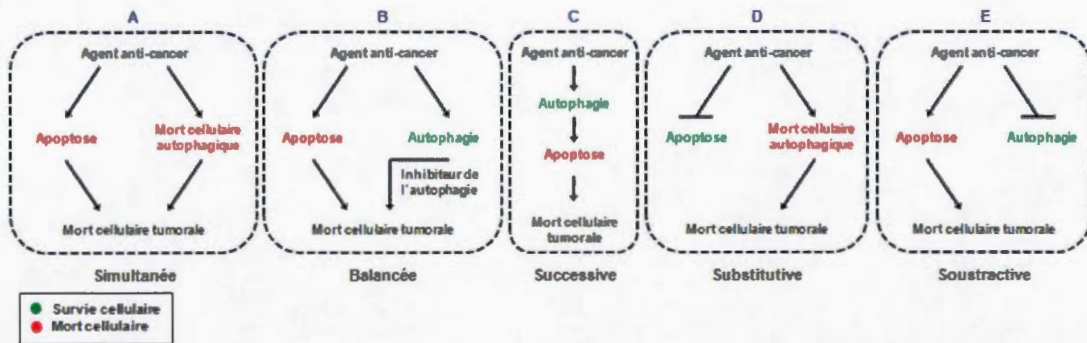


Figure 8.2 Scénarios de thérapies anti-cancer impliquant une interaction entre les processus d'apoptose et d'autophagie. Comme nous savons maintenant que les cellules cancéreuses possèdent des mécanismes de résistance, les prochaines thérapies anti-cancer devront être composées de plusieurs molécules servant à induire ou à inhiber les processus autophagiques et apoptotiques selon les propriétés cancéreuses du patient. Les schémas de A à E représentent donc les manières de cibler ces deux processus cellulaires en fonction de leur effets sur la régulation de la survie/mort cellulaire des glioblastomes. Adaptée de (Panda *et al.*, 2015).

Afin de cibler efficacement les processus autophagiques dans les glioblastomes, il sera crucial d'approfondir les rôles qu'exercent chacune des protéines impliquées dans la mise en place de ceux-ci. De cette façon, il serait plus évident de concentrer nos efforts à développer des inhibiteurs spécifiques pour des protéines qui n'influenceraient aucun autre processus cellulaire. En effet, bien qu'ils empêchent l'autophagie, les inhibiteurs lysomotropiques (CQ et HCQ), utilisés dans les études cliniques, accentuent la toxicité des agents anti-cancéreux et peuvent affecter d'autres processus cellulaires en augmentant le stress intracellulaire des cellules saines (Zhang, Y. *et al.*, 2015). Par ailleurs, les différentes études relevées dans la littérature ont démontré une utilisation constante des inhibiteurs bloquant soit les phases précoces (3-MA ou siBECLIN1) ou tardives de l'autophagie (CQ ou siRAB7) (Li, C. *et al.*, 2015). Par conséquent, il serait intéressant d'analyser comment les protéines de structure du processus autophagique affectent l'évolution et le traitement des tumeurs cérébrales. Donc, en utilisant des techniques d'ARN interférant pour les différents gènes responsables de la formation de l'autophagosome tels que ATG3, ATG5,

ATG12, ATG7, ATG10 et ATG16, pour ne nommer que ceux-là, nous pourrions vérifier leurs effets sur la survie relative des glioblastomes issus de diverses lignées cellulaires (U87, U373, TG98, C6, etc.). De plus, l'effet de ces « knockdowns » sur les autres processus de mort cellulaire, apoptose et nécrose, pourrait aussi être vérifié. Ainsi, cette étude à large spectre permettrait de mieux comprendre comment les protéines autophagiques participent à la régulation de la survie dans les glioblastomes. Ensuite, pour valider si les effets obtenus sont extrapolables chez l'humain, nous pourrions utiliser des souris et implanter des cellules où chaque gène mentionné plus haut (ATG3, ATG5, ATG7, ATG10, ATG12, ATG16) serait invalidé. En les traitant ou non avec le TMZ ou d'autres agents chimiothérapeutiques (ou même en les combinant avec l'irradiation), on pourrait vérifier l'impact de ces gènes sur la survie relative des souris suite aux traitements et examiner quels sont les patrons d'expression des protéines liées aux processus de mort cellulaire. De cette façon, cela pourrait améliorer grandement notre compréhension au niveau des mécanismes moléculaires qui sont mis en branle lorsque les patients reçoivent les traitements au TMZ et ainsi favoriser un meilleur ciblage thérapeutique.

Dans le même ordre d'idées, il serait aussi opportun d'évaluer le patron d'expression des protéines pro- et anti-autophagiques des tumeurs cérébrales. En effet, de récentes études ont démontré plusieurs corrélations entre la tumorigenèse et l'expression ou la mutation de certaines protéines clés dans les processus autophagiques, telles que BECLIN1 et LC3 (Kaza *et al.*, 2012). Cependant, il manque d'informations quant à la régulation des autres protéines participant à la formation de l'autophagosome ainsi qu'à la régulation de l'autophagie. Heureusement, une technique a déjà été développée pour produire des souris présentant des mutations dans différents oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs au niveau des astrocytes corticaux ou des cellules souches neurales. Une fois ces cellules mises en culture et que certains paramètres tels que la prolifération, la transformation ainsi que la réponse à certaines drogues aient été mesurés, ces cellules seront implantées dans le cerveau de souris

immunocompétentes (McNeill *et al.*, 2014). Nous pourrions donc utiliser la même technique pour parvenir à nos fins. Ainsi, en fonction de la progression tumorale, les souris seraient sacrifiées à intervalles données afin d'obtenir des homogénats représentatifs d'astrocytomes de différents grades (II à IV), desquels l'expression génique et protéique serait analysée chez toutes les protéines affectant l'autophagie.

8.2 Existe-t-il une redondance fonctionnelle entre les MT-MMPs?

Depuis la découverte des 6 membres de la famille des MT-MMPs, la littérature nous montre qu'il existe plusieurs fonctions catalytiques communes entre celles-ci. Le clivage et l'activation de la proMMP-2 en est un bon exemple. En effet, outre MT4-MMP (English *et al.*, 2000), il a été démontré que MT1-MMP (Itoh *et al.*, 2008), MT2-MMP (Morrison *et al.*, 2001), MT3-MMP (Shofuda *et al.*, 2001), MT5-MMP (Llano *et al.*, 1999; Pei. 1999) et MT6-MMP (Nie et Pei. 2003) ont également la capacité de cliver le prodomaine de la proMMP-2 et ainsi relarguer sa forme active (MMP-2). Par contre, le mécanisme par lequel cette activation a lieu ne semble pas être le même pour toutes les MT-MMPs. Effectivement, à l'instar de MT1-MMP (Itoh. 2015), MT2-MMP (Morrison et Overall. 2006) et MT3-MMP (Zhao, H. *et al.*, 2004) n'ont pas nécessairement besoin de former un complexe ternaire avec TIMP-2 et la proMMP-2, car cette dernière peut interagir et être maintenue à la membrane plasmique par les chaînes de chondroïtin sulfate (CS) de certains protéoglycans (Iida *et al.*, 2007). Hormis l'activation de la proMMP-2, l'hydrolyse des composantes de la MEC fait aussi partie des aptitudes catalytiques de toutes les MT-MMPs, à l'exception de MT4-MMP qui est connue pour dégrader la fibrine et le fibrinogène (Zucker *et al.*, 2003). En effet, bien que les séquences de leurs domaines catalytiques soient sensiblement différentes, plusieurs MT-MMPs possèdent les mêmes substrats protéiques (Sounni et Noel. 2005).

Outre leur redondance fonctionnelle en ce qui a trait à leurs actions catalytiques, les MT-MMPs ont aussi plusieurs différences sur lesquelles peu de chercheurs ont porté leur attention et qu'il faudrait absolument documenter et caractériser (Hernandez-Barrantes *et al.*, 2002). La première différence repose sur le patron d'expression des MT-MMPs dans les cellules cérébrales saines et tumorales. En effet, plusieurs études ont démontré que les niveaux d'expression des six MT-MMPs sont très diversifiés et qu'ils varient selon le grade tumoral (Fillmore *et al.*, 2001). D'ailleurs, le tableau 8.1 montre clairement l'hétérogénéité dans les patrons d'expression des MT-MMPs. Cependant, le nombre d'études portant sur les MT-MMPs étant très faible (à l'exception de MT1-MMP), il est prématuré de conclure quoi que ce soit quant à la corrélation entre leurs niveaux d'expression et le développement et/ou la progression d'une maladie. Il serait donc justifié d'aller vérifier les diverses fonctions (catalytiques, cytoplasmiques, etc.) de celles-ci, ce qui améliorerait grandement la compréhension des mécanismes moléculaires reliées à certaines pathologies où les MT-MMPs sont fortement exprimées.

Tableau 8.1 Niveaux d'expression relatifs des six MT-MMPs en fonction du grade tumoral. GBM; Glioblastome multiforme. *Le mot « Normal » fait référence au cerveau sain. Produit à partir des études repertoriées dans (Fillmore *et al.*, 2001), (Souhail et Noel. 2005) et (Sohail *et al.*, 2008).

	Grades tumoraux			
	Normal	I-II (Astrocytome)	III (Astrocytome anaplasique)	IV (Glioblastome)
MT1-MMP	-	+	+++	++++
MT2-MMP	-	-	++	+++
MT3-MMP	++++	+++	++	+
MT4-MMP	++++	++	+	+
MT5-MMP	-	+	++	+++
MT6-MMP	-	-	++	+++

Une autre différence importante entre les MT-MMPs se situe au niveau de la structure de leur domaine cytoplasmique. Il est primordial de se rappeler que les MT-MMPs sont catégorisées en deux sous-classes : celles qui possèdent un domaine cytoplasmique bien défini comportant une vingtaine d'acides aminés (MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP et MT5-MMP) (Hanna, J. *et al.*, 2010), et celles qui possèdent une courte séquence d'acides aminés pouvant se lier à la membrane plasmique grâce à un groupement glycosylphosphatidylinositol (MT4-MMP et MT6-MMP) (Zucker *et al.*, 2003). Il est donc peu probable que ces dernières soient dotées de quelconque fonction intracellulaire. Par contre, on peut se poser la question : « Qu'en est-il de MT2-MMP, MT3-MMP et MT5-MMP? » En effet, bien que ces trois protéines possèdent une séquence cytoplasmique similaire à MT1-MMP (Figure 8.3), elles n'ont pas fait l'objet d'une recherche exhaustive comme l'a fait MT1-MMP. C'est pourquoi, il est impératif de concentrer nos efforts sur l'élucidation des différents rôles que peuvent jouer ces trois protéines.

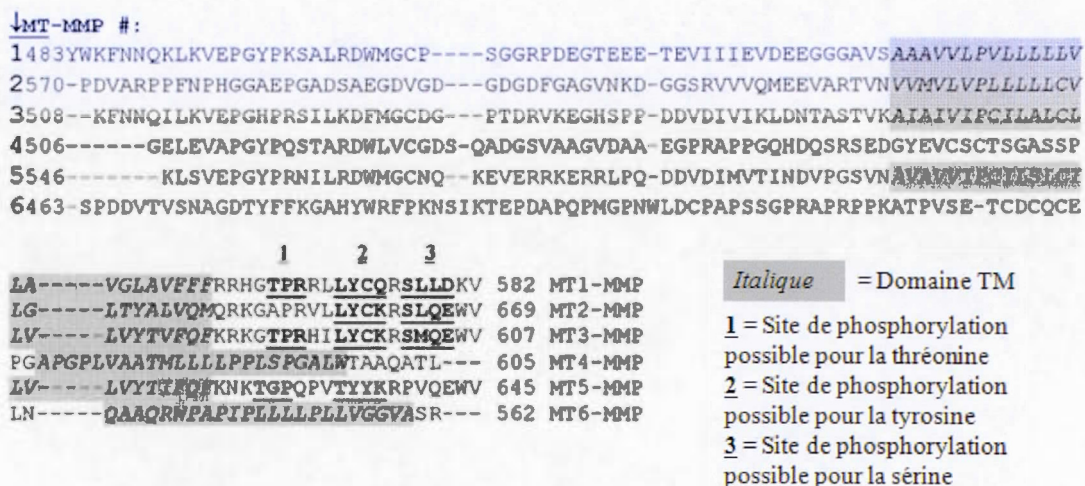


Figure 8.3 Alignement des séquences protéiques des domaines cytoplasmiques des 6 MT-MMPs. TM; Domaine transmembranaire. Adaptée de (Fillmore *et al.*, 2001)

Comme beaucoup de questions demeurent en suspens, une première approche serait de valider les fonctions intracellulaires des domaines cytoplasmiques des trois MT-MMPs. Comme pour l'étude menée sur MT1-MMP dans les chapitres 5, 6 et 7, nous pourrions tout d'abord utiliser des plasmides encodant les séquences complètes (WT) de MT2-MMP, MT3-MMP et MT5-MMP et d'autres plasmides encodant les mêmes séquences où les acides aminés formant les domaines cytoplasmiques seraient tronqués (Δ Cyto). Ensuite, il s'agira de cultiver des lignées cellulaires cancéreuses ou non, de les transfecter avec les différentes constructions plasmidiques et d'en vérifier l'effet produit sur divers processus cellulaires tels que la prolifération, l'invasion, la migration, la survie/mort cellulaire, l'autophagie, etc. Suivant les effets obtenus, les mécanismes moléculaires ainsi que leurs protéines clés qui sont affectés seraient explorés.

Par la suite, à l'aide des techniques d'immunoprécipitation et de « pull-down », nous pourrions examiner quelles sont les protéines qui interagissent avec les domaines cytoplasmiques de MT2-MMP, MT3-MMP et MT5-MMP et valider si les protéines d'interaction de MT1-MMP lient également les 3 autres MT-MMPs. Par le fait même, on pourrait analyser le rôle de chacun des acides aminés présents dans leurs séquences cytoplasmiques en utilisant des constructions plasmidiques où chacun des acides aminés seraient mutés en alanine et en effectuant les mêmes expériences que celles décrites dans le paragraphe ci-dessus. Par ailleurs, la figure 8.3 démontre qu'il existe trois sites de phosphorylation potentiels sur MT1-MMP (T567, Y573 et S577) et une cystéine pouvant être palmitoylée (C574). Comme ces acides aminés ont fait l'objet de plusieurs études démontrant leurs impacts sur la localisation de la protéine elle-même ainsi que dans la transduction des signaux intracellulaires (Anilkumar *et al.*, 2005; Lehti *et al.*, 2000; Nyalendo *et al.*, 2007), et qu'aucune étude n'a été menée sur les sites de phosphorylation possibles contenus dans les séquences des trois autres MT-MMPs, il serait important de valider si les mêmes phénomènes se produisent pour MT2-MMP, MT3-MMP et MT5-MMP.

Enfin, il serait intéressant de voir quels sont les inducteurs/modulateurs géniques et protéiques de ces trois MT-MMPs au niveau des cellules de glioblastome et/ou des cellules contribuant au phénotype de résistance telles que les GSCs et les cellules souches mésenchymateuses (MSCs). En effet, en survolant la littérature, on se rend compte que la plupart des études, dont l'objet était d'évaluer l'impact de MT1-MMP dans un processus cellulaire ou un mécanisme moléculaire donné, utilisaient soit des agents pharmacologiques tels que la concanavoline-A, le phorbol 12-myristate 13-acétate, l'agglutinine du germe de blé (WGA) et le facteur de croissance transformant- β (TGF- β) ou bien des modulations dans les conditions environnantes spécifiques telles que l'hypoxie et la déprivation de sérum à titre d'inducteur génique et/ou protéique (Gervasi *et al.*, 1996; Park, M. J. *et al.*, 2000; Sina *et al.*, 2010; Stawowy *et al.*, 2004). On pourrait donc vérifier si les modulateurs connus pour MT1-MMP, tels que la protéine ADAM-12, l'atorvastatin, un médicament communément appelé Lipitor, et l'épigallocatechine 3-gallate (EGCG), sont les mêmes pour les autres MT-MMPs et, par le fait même, comparer les niveaux d'expression (génique et protéique) de toutes les MT-MMPs en les analysant par qRT-PCR et par immunobuvardage de type Western (Albrechtsen *et al.*, 2013; Yongjun *et al.*, 2013; Zgheib *et al.*, 2013). Par ailleurs, étant donné le nombre restreint d'informations sur les séquences promotrices de MT2-, MT3- et MT5-MMP, il serait fort intéressant d'analyser quels sont les facteurs de transcription qui régulent celles-ci. Enfin, comme les MT-MMPs sont fortement exprimées dans plusieurs processus physiologiques et pathologiques, il serait intéressant d'examiner le niveau d'expression et d'activité de ces mêmes facteurs de transcription lorsque ces processus sont activés.

8.3 Vers un ciblage fonctionnel et thérapeutique des MT-MMPs

Depuis plus d'une vingtaine d'années, les MMPs sont le centre d'intérêt de plusieurs laboratoires de recherche et de compagnies pharmaceutiques, car les différentes fonctions qu'elles occupent se sont multipliées à un rythme impressionnant. C'est d'ailleurs ce qui explique pourquoi il y a un essor incroyable dans le développement d'inhibiteurs catalytiques ciblant les MMPs. Toutefois, bien que les études *in vitro* aient révélé des effets probants, les essais cliniques et pré-cliniques n'ont pas donné les résultats escomptés (Kessenbrock *et al.*, 2010). Étant donné les divers rôles physiologiques et pathologiques des MMPs, et en particulier les MT-MMPs, celles-ci restent tout de même des cibles thérapeutiques très prometteuses (Singh, D. *et al.*, 2015). C'est pourquoi les chercheurs se sont tournés vers le développement d'inhibiteurs du domaine hémapexine des MT-MMPs. En effet, de récentes études ont démontré que l'inhibition du domaine hémapexine de MT1-MMP, par le biais d'anticorps ou de petites molécules, affecte grandement ses fonctions catalytiques ainsi que le développement tumoral (Basu *et al.*, 2012; Remacle *et al.*, 2012). Par contre, nous croyons qu'il faudrait aussi cibler les domaines hémapexines des autres MT-MMPs afin d'éviter le piège de la redondance fonctionnelle entre celles-ci. En fait, pourquoi ne pas faire d'une pierre deux coups en ciblant aussi le domaine cytoplasmique des MT-MMPs? Cette librairie d'inhibiteurs ouvrirait donc la porte à de nouveaux traitements contre les cancers malins qui sont caractérisés par une expression marquée de plusieurs MMPs et MT-MMPs.

Ensuite, une autre manière de cibler efficacement les MMPs et les MT-MMPs pourrait se faire par la prévention de l'apparition du cancer plutôt que par le traitement. En effet, les quelques centaines d'ouvrages et de publications, qui ont été réalisés sur la prévention de différents types de cancer grâce aux molécules naturelles provenant de l'alimentation, démontrent bel et bien les effets bénéfiques de celles-ci,

car elles ciblent plusieurs processus cellulaires favorisant la progression tumorale tels que la migration, l'angiogenèse et la prolifération, mais aussi à la phosphorylation des récepteurs PDGFR- β et VEGFR-2, tous deux fortement exprimés dans divers types de cancer (Labbe *et al.*, 2009; Lamy *et al.*, 2012; Lamy *et al.*, 2010; Lamy *et al.*, 2014). Plus récemment, une revue de la littérature effectuée par Zhang et collègues en octobre 2015 suggère qu'une panoplie de molécules naturelles issues de notre diète parviendraient à inhiber l'expression génique et protéique de plusieurs acteurs moléculaires de la transition épithélio-mésenchymateuse, une étape cruciale dans le phénotype invasif et agressif des tumeurs cancéreuses (Zhang, L. *et al.*, 2015b). De plus, certaines voies de signalisation, telles que PI3K/AKT et JAK/STAT ainsi que certaines protéines pro-tumorigéniques telles que SRC et NF- κ B, ont aussi fait l'objet de diverses études utilisant des molécules naturelles (Li, W. *et al.*, 2013; Zgheib *et al.*, 2013). Par ailleurs, en traitant les cellules cancéreuses avec de l'EGCG (provenant du thé vert), du resvératrol (provenant du raisin), de la curcumine (pigment polyphénolique du curcuma), de l'héspéridine (provenant des agrumes) ou de la β -carotène (provenant de la carotte ou de la patate douce), certains chercheurs ont démontré que ces molécules agissent aussi sur certaines MMPs en inhibant leur expression ou bien leur activité (Kim, Y. S. *et al.*, 2014; Lee, A. Y. *et al.*, 2015; Li, W. *et al.*, 2013; Roohbakhsh *et al.*, 2015; Zgheib *et al.*, 2013). Par contre, comme les effets n'ont été vérifiés que pour MMP-2, MMP-9, MT1-MMP et MT2-MMP, il serait intéressant d'examiner si l'expression et/ou l'activité des autres MMPs, en particulier MT3-MMP et MT5-MMP, sont aussi affectées. Par conséquent, bien que les mécanismes d'inhibition des molécules naturelles ne sont pas tout à fait connus au niveau de la régulation des différentes MT-MMPs et des MMPs de façon générale, en modifiant simplement nos habitudes alimentaires, nous pourrions accroître notre protection envers les divers types de cancer en ciblant de manière systématique l'expression et l'activité des MMPs et des MT-MMPs.

Un autre volet qui pourrait être très intéressant à examiner est le lien entre ces mêmes molécules phytochimiques et les protéines connues pour interagir avec les domaines cytoplasmiques des différentes MT-MMPs. En effet, un bref survol de la littérature nous indique qu'il y a très peu d'études sur le sujet. Parmi celles-ci, une étude réalisée avec des cellules de cancer du sein (HCC1395) démontre que la génistéine, issue de la fève de soja, entraîne une hausse de l'expression génique de MTCBP-1 (Lee, W. Y. *et al.*, 2007). Deux questions peuvent alors se poser : Est-ce que la génistéine augmente aussi l'expression des autres protéines d'interaction de MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP et MT5-MMP et est-ce que d'autres composés phytochimiques peuvent induire l'expression de l'ensemble des protéines d'interaction de MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP et MT5-MMP? À l'aide de la méthode du criblage à haut débit, il serait intéressant de traiter des cellules cancéreuses (glioblastomes et autres) avec les milliers de molécules naturelles connues pour avoir un impact direct sur le cancer telles que l'acide éllagique (fraise), le diallyl sulfide (ail), le limonène (agrumes), le resvératrol (raisin), la delphinidine (bleuet), le sulforaphane (brocoli) et l'indole-3-carbinol (chou) et d'en examiner les effets sur l'expression des protéines connues pour interagir avec les domaines cytoplasmiques des MT-MMPs (1, 2, 3 et 5) et de celles à venir (Béliveau et Gingras. 2005, p.65-76).

Finalement, bien que nous ayons démontré que la surexpression de MT1-MMP entraîne l'induction de l'autophagie et de la protéine mitochondriale BNIP3, il reste encore beaucoup de questions à répondre et d'hypothèses à valider (Pratt et Annabi. 2014; Pratt *et al.*, 2012). D'abord, quel est le type d'autophagie qui est induit par MT1-MMP? Cette question est légitime puisqu'il existe plusieurs types d'autophagie et que les mécanismes autophagiques n'ont pas été examinés au cours de mes études doctorales. Donc, nous pourrions surexprimer MT1-MMP dans des cellules glioblastomes (ou autres) et examiner l'expression des différents marqueurs de chaque type d'autophagie. Nous pourrions aussi procéder au marquage des diverses organelles pouvant être éliminées par autophagie, telles que le réticulum

endoplasmique et la mitochondrie, et vérifier par microscopie confocale à fluorescence le comportement de celles-ci suite à la surexpression de MT1-MMP. Par ailleurs, il serait intéressant de voir s'il y a une corrélation entre un type d'autophagie en particulier et le phénotype de résistance des cellules de glioblastome. Une autre question, qui est demeurée sans réponse précise, concerne le sort des cellules lorsque l'autophagie est enclenchée par la surexpression de MT1-MMP. Bien qu'aucune cytotoxicité n'a été observée suite à la surexpression des diverses protéines recombinantes, il n'en demeure pas moins que nous ne savons pas si l'autophagie induite par MT1-MMP enclenche des mécanismes de survie ou de mort cellulaire. De plus, comme les études sont contradictoires en ce qui concerne la survie ou la mort des cellules cancéreuses où MT1-MMP est surexprimée, la microscopie électronique en temps réel pourrait nous aider à analyser le comportement de ces cellules où le niveau d'expression de MT1-MMP serait modifié grâce à un ARN interférant dirigé contre MT1-MMP (siMT1-MMP) ou bien à des plasmides encodant diverses formes de la protéine recombinante MT1-MMP (WT, Δ Cyto, Δ Cata, E240A, etc.) pour valider l'apport des différents domaines et acides aminés critiques dans la séquence protéique de MT1-MMP. Ainsi, nous serions en mesure de mieux caractériser le rôle de cette fameuse MMP dans la régulation des mécanismes impliqués dans le contrôle de la survie et de la mort cellulaire afin de permettre un meilleur ciblage des fonctions de MT1-MMP et, nous l'espérons, des autres MT-MMPs.

CONCLUSION

Le glioblastome représente encore aujourd'hui un grave problème dont les pistes de solution sont de moins en moins présentes et manquent à l'appel. Bien qu'il y ait eu énormément de progrès tant du côté scientifique que technique, les nombreux essais cliniques démontrent un taux de réussite excessivement faible en terme d'efficacité thérapeutique. En effet, l'élaboration de thérapies novatrices basées sur l'administration de composés naturels et synthétiques induisant la mort cellulaire est dépassée. Il faut maintenant approfondir encore plus les connaissances actuelles afin de permettre le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pouvant cibler et utiliser les propriétés des glioblastomes contre eux-mêmes. C'est exactement ce que démontrent les travaux publiés dans cette thèse.

Nos travaux sont novateurs puisqu'ils ont fait la toute première démonstration du rôle direct d'une métalloprotéase matricielle, en l'occurrence MT1-MMP, dans la régulation de l'autophagie (Figure 8.4). En plus de découvrir un nouveau mécanisme moléculaire décrivant l'association entre MT1-MMP et les protéines effectrices de l'autophagie (BNIP3 et la famille des protéines ATG), ces travaux ont aussi démontré une façon potentiellement efficace de cibler les fonctions intracellulaires de celles-ci en utilisant des protéines naturellement exprimées dans les cellules saines comme MTCBP-1. (Figure 8.4) Néanmoins, comme il a été précisé dans la section Discussion, nos travaux ouvrent la porte à plusieurs thématiques intéressantes telles que la régulation des fonctions intracellulaires des MT-MMPs par leurs protéines d'interaction, la découverte de toutes les fonctions médiées par les domaines cytoplasmiques de chaque MT-MMP ainsi que les mécanismes moléculaires qui leur sont associées et l'utilisation des molécules naturelles à des fins de ciblage

pharmacologique fonctionnel des MT-MMPs. Finalement, il est crucial de mettre plus d'efforts sur la compréhension de la régulation des mécanismes de résistance des glioblastomes ainsi que sur leurs contributeurs, comme le recrutement des cellules souches (MSCs ou CSCs) au sein des tumeurs, dans le but de développer de nouvelles cibles thérapeutiques et ainsi progresser petit à petit vers un traitement efficace contre ce terrible cancer.

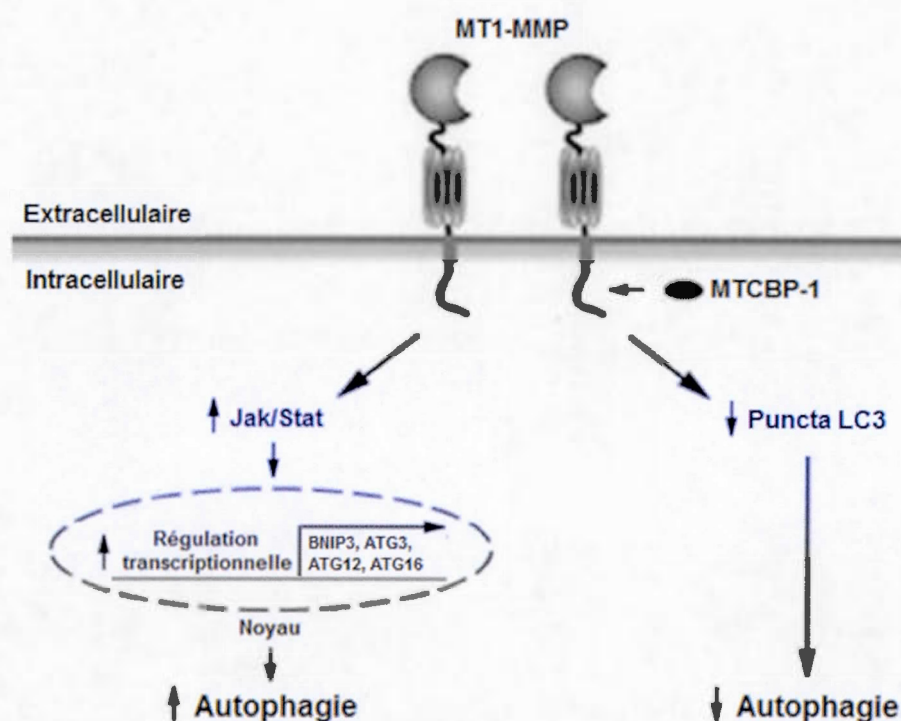
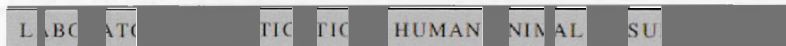


Figure 8.4 Schéma récapitulatif intégrant les trois articles présentés dans les chapitres III, IV et V. La surexpression de MT1-MMP entraîne une cascade de signalisation menant à l'induction de l'autophagie (Pratt *et al.*, 2012). Cette cascade est médiée par le domaine cytoplasmique de MT1-MMP qui, à l'aide de la voie de signalisation JAK/STAT, régule à la hausse l'expression de certains marqueurs de l'autophagie (Pratt et Annabi, 2014). Cependant, la régulation de l'autophagie par le domaine cytoplasmique de MT1-MMP peut être antagonisée grâce à une protéine connue sous le nom de MTCBP-1. Effectivement, en interagissant avec le domaine cytoplasmique de MT1-MMP, MTCBP-1 empêche celui-ci de transduire les signaux intracellulaires menant à l'induction de l'autophagie (Pratt *et al.*, 2015).

APPENDICE A : AUTRES CONTRIBUTIONS SCIENTIFIQUES

Article publié dans la revue scientifique : *Journal of Neurooncology*

J Neurooncol (2011) 104:33–43
DOI 10.1007/s11060-010-0468-2



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

Sébastien Proulx-Bonneau · Jonathan Pratt ·
Borhane Annabi

Received: 23 August 2010 / Accepted: 8 November 2010 / Published online: 19 November 2010
© Springer Science+Business Media, LLC. 2010

Contributions des auteurs :

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

Jonathan Pratt : Expérimentation et essais biologiques d'appoint

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

Article publié dans la revue scientifique : *Experimental cell research*

EXPERIMENTAL CELL RESEARCH 318 (2012) 2498–2506



Available online at www.sciencedirect.com

SciVerse ScienceDirect

Journal homepage: www.elsevier.com/locate/yexcr



Research Article

Concanavalin-A triggers inflammatory response through JAK/STAT3 signalling and modulates MT1-MMP regulation of COX-2 in mesenchymal stromal cells

Naoufal Akla, Jonathan Pratt, Borhane Annabi*

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

Contributions des auteurs :

Naoufal Akla : Expérimentation et essais biologiques, analyse des résultats, montage des figures, rédaction du manuscrit

Jonathan Pratt : Expérimentation et analyse des résultats

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

Article publié dans la revue scientifique : *Gene regulation and systems biology*



Gene Regulation and
Systems Biology

Tetracycline Derivative Minocycline Inhibits Autophagy and Inflammation in Concanavalin-A-Activated Human Hepatoma Cells

Michel Desjarlais¹, Jonathan Pratt¹, Amine Lounis², Catherine Mounier², Khadidja Haidara¹ and Borhane Annabi¹

¹Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Département de Chimie, Université du Québec à Montréal, Québec, Canada. ²Département des Sciences Biologiques, Centre de Recherche BioMed, Université du Québec à Montréal, Québec, Canada.

Contributions des auteurs :

Michel Desjarlais : Expérimentation et essais biologiques, analyse des résultats, montage des figures et rédaction du manuscrit

Jonathan Pratt : Expérimentation, analyse des résultats et rédaction du manuscrit

Amine Lounis : Expérimentation et analyse des résultats

Catherine Mounier : Analyse des résultats, rédaction du manuscrit et conception du projet

Khadidja Haidara : Analyse des résultats, rédaction du manuscrit et conception du projet

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

Article publié dans la revue scientifique : *Biomarkers in cancer*

Impact of Concanavalin-A-Mediated Cytoskeleton Disruption on Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein-1 Internalization and Cell Surface Expression in Glioblastomas



Samuel Burke Nanni, Jonathan Pratt, David Beauchemin, Khadidja Haidara and Borhane Annabi

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

ABSTRACT: The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP-1) is a multiligand endocytic receptor, which plays a pivotal role in controlling cytoskeleton dynamics during cancer cell migration. Its rapid endocytosis further allows efficient clearance of extracellular ligands. Concanavalin-A (ConA) is a lectin used to trigger *in vitro* physiological cellular processes, including cytokines secretion, nitric oxide production, and T-lymphocytes activation. Given that ConA exerts part of its effects through cytoskeleton remodeling, we questioned whether it affected LRP-1 expression, intracellular trafficking, and cell surface function in grade IV U87 glioblastoma cells. Using flow cytometry and confocal microscopy, we found that loss of the cell surface 600-kDa mature form of LRP-1 occurs upon ConA treatment. Consequently, internalization of the physiological α 2-macroglobulin and the synthetic angiopep-2 ligands of LRP-1 was also decreased. Silencing of known mediators of ConA, such as the membrane type-1 matrix metalloproteinase, and the Toll-like receptors (TLR)-2 and TLR-6 was unable to rescue ConA-mediated LRP-1 expression decrease, implying that the loss of LRP-1 was independent of cell surface relayed signaling. The ConA-mediated reduction in LRP-1 expression was emulated by the actin cytoskeleton-disrupting agent cytochalasin-D, but not by the microtubule inhibitor nocodazole, and required both lysosomal- and ubiquitin-proteasome system-mediated degradation. Our study implies that actin cytoskeleton integrity is required for proper LRP-1 cell surface functions and that impaired trafficking leads to specialized compartmentation and degradation. Our data also strengthen the biomarker role of cell surface LRP-1 functions in the vectorized transport of therapeutic angiopep bioconjugates into brain cancer cells.

Contributions des auteurs :

Samuel Burke Nanni : Expérimentation et essais biologiques, analyse des résultats, montage des figures et rédaction du manuscrit

Jonathan Pratt : Expérimentation, analyse des résultats et rédaction du manuscrit

David Beauchemin : Analyse des résultats et rédaction du manuscrit

Khadidja Haidara : Analyse des résultats et rédaction du manuscrit

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

APPENDICE B : ARTICLE EN PRÉPARATION

**Evidence for a MT1-MMP/LRP-1 expression balance that regulates Angiopep-2
internalization in glioblastoma: Potential impact in low grade brain tumor
therapy**

¹Jonathan Pratt, ²Michel Demeule, ¹Khadidja Haidara and ¹Borhane Annabi

From the ¹Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Centre de recherche BIOMED,
Département de chimie, Université du Québec à Montréal, ²Angiochem Inc, Québec,
Canada.

Jonathan Pratt : pratt.jonathan.2@courrier.uqam.ca

Michel Demeule : mdemeule@angiochem.com

Khadidja Haidara : haidara.khadidja@uqam.ca

Borhane Annabi : annabi.borhane@uqam.ca

Correspondence should be directed to : Borhane Annabi, Chaire en Prévention et
Traitement du Cancer, 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 : MT1-MMP regulates Angiopep-2 internalization

Abstract

Progression from a low (I and II)- to a high (III and IV)-grade brain tumor has been associated with various molecular alterations that prevent efficient treatments. Angiopep-2 (An2) is a brain-penetrating peptide that crosses the blood-brain barrier and that is internalized within the brain tumor compartment through interaction with the LDL receptor-related protein-1 (LRP-1). This mechanism allows for efficient delivery of An2-drug-conjugates within brain tumors. It is currently unknown whether low-grade brain tumors can also respond to such a delivery platform. Given that LRP-1 is proteolytically shed from the cell surface through matrix metalloproteinase (MMP) activity from the cell surface, it is currently further unknown how a given MMP expression status may alter An2 internalization within brain cancer cells. In this study, we screened cDNAs generated from human brain tumor tissues of grades I, II, III, and IV, and found membrane type-1 (MT1)-MMP expression to increase from grades I to IV, while that of LRP-1 tended to decrease. MMP inhibitors such as Ilomastat, Doxycyclin and Actinonin significantly increased *in vitro* An2 internalization within a human grade IV U87 glioblastoma cell model. Transient siRNA-mediated gene silencing of MT1-MMP triggered increased An2 uptake, while recombinant MT1-MMP overexpression reduced both cell surface recognition and internalization of An2. Consequently, cell surface LRP-1 expression was also reduced in MT1-MMP overexpressing cells, while Ilomastat prevented LRP-1 cell surface decreases and restored An2 uptake to basal levels. Shed LRP-1 was immunodetected in the conditioned media from MT1-MMP-transfected cells. Collectively, our data suggest that the MT1-MMP functional status alters An2 internalization processes through LRP-1 regulation and prompts for the evaluation of An2-drug-conjugates delivery strategies in the treatment of low-grade and low-MT1-MMP expressing brain tumors.

Keywords : BBB, MT1-MMP, LRP-1, Glioblastoma, Angiopep-2

Introduction

Glioblastomas are the most aggressive primary brain tumors characterized by histopathological heterogeneity. They are one of the most challenging cancers to treat due, in part, to their protection by the blood-brain barrier and their capacity to survive under strict environmental conditions (Dubois, L et al, 2014). High-resolution sequencing technologies have shown that these tumors also feature significant inter-tumoral molecular heterogeneity. Molecular subtyping of these tumors has revealed several predictive and prognostic biomarkers. However, inter-tumoral heterogeneity may undermine the use of single biopsy analysis for determining tumor genotype and has implications for potential targeted therapies. To date, tumor resection followed by radiotherapy and temozolomide-based chemotherapy is the only treatment that shows benefits by doubling the survival time of the patients and by blocking the cancer progression for 3-4 years for some patients (Wick, W et al, 2012). Developing new therapies is therefore of impact importance, as many of the different strategies optimized in the last decades are far behind advances in the other cancer fields (Ajaz, M et al, 2014). Hence, analyzing the different proteins involved in the maintenance of the blood-brain barrier integrity and of the survival mechanisms, such as the matrix metalloproteinases superfamily, is essential to understand the molecular biology of glioblastoma. The clinical relevance and theories of tumoral molecular heterogeneity in glioblastoma are discussed.

The matrix metalloproteinases (MMPs) are a family of enzymes that plays a key role in hydrolyzing the extracellular matrix (ECM) in several physiological and pathological processes such as wound healing, embryogenesis, and tumor invasion (Pahwa, S et al, 2014). Among the MMP members, MT1-MMP (also known as MMP-14) was the first membrane-anchored MMP identified and is the most extensively studied. While its extracellular catalytic domain is involved in a myriad of biological processes such as ECM remodelling and cell migration involved in

angiogenesis, metastasis, and tissue infiltration/invasion, in both normal and tumor tissues (Pratt, J et al, 2015; Gingras, D et al, 2010; Gialeli, C et al, 2011), its recently documented intracellular signalling domain mediates the control of apoptosis, autophagy, as well as inflammatory processes all associated with a therapy resistant phenotype (Sina, A et al, 2010; Proulx-Bonneau, S et al, 2011; Pratt, J et al., 2012). Accordingly, MT1-MMP expression/function is therefore often correlated with a poor cancer survival prognosis. In brain cancer, our knowledge of its expression within tumor grades and functional impact on drug delivery efficacy within the tumor compartment remains limited.

MMPs proteolytic activity is tightly controlled by a family of specific inhibitors named tissue inhibitors of MMPs (TIMPs) (Gomez, DE et al., 1997). However, an additional regulatory pathway controlling the extent of soluble MMPs involves the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP-1), a member of the LDL receptor family and a membrane receptor displaying both scavenging and signaling functions (Herz, J and DK Strickland, 2001). Furthermore, LRP-1 is also involved in the recycling of MMP-13, MMP-2-thrombospondin 2 complexes, and MMP-9-TIMP-1 upon their internalization and subsequent degradation (Yamamoto K. et al., 2015). These phenomena are controlled by the receptor associated protein (RAP), a chaperon protein which displays a high affinity to LRP-1 (Hahn-Dantona E et al., 2001). LRP-1 activity/expression at the cell surface is further controlled by shedding processes that consist of proteolytic cleavage of LRP-1's extracellular domain, which are executed by sheddases. Interestingly, the first LRP-1 sheddase identified was a MMP (Quinn KA, et al., 1999). Accordingly, later studies demonstrated that several MMPs including MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP, MT4-MMP and ADAM-12 were able to cleave and inactivate LRP-1 (Rozanov et al., 2004; Liu Q. et al., 2009; Selvais C. et al., 2009; Emonard, L. et al., 2014).

LRP-1 was also recently found to efficiently enable the 19 amino acid brain-penetrant peptide, called Angiopep-2 (An2), to cross the blood-brain barrier (BBB) and to eventually be targeted to brain tumors (Demeule M. et al., 2008). Conjugation of this peptide to small therapeutic molecules such as paclitaxel, doxorubicin or etoposide significantly increased their internalization across the BBB upon systemic administration (Che C. et al., 2010; Demeule, M et al, 2007). Given that recent evidence suggests that LRP-1 is a substrate of MT1-MMP, we questioned how the MT1-MMP-to-LRP-1 expression balance may alter *in vitro* An2 internalization within human glioblastoma cells.

Material and methods

Materials : Sodium dodecylsulfate (SDS) and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON). Cell culture media was obtained from Life Technologies (Burlington, ON). Electrophoresis reagents were purchased from Bio-Rad (Mississauga, ON). The HyGLO™ chemiluminescent HRP antibody detection reagents were from Denville Scientific Inc. (Metuchen, NJ). Micro bicinchoninic acid protein assay reagents were from Pierce (Rockford, IL). The MMP inhibitors Ilomastat and Actinonin were purchased from Merck Millipore (Etobicoke, ON) and Sigma-Aldrich Canada, respectively. Doxycycline was also from Sigma-Aldrich Canada. Angiopep-2 was synthesized by Angiochem Inc (Montreal, Qc). The monoclonal anti-MT1-MMP catalytic domain antibody clone 3G4.2 was from EMD Millipore (Billerica, MA). The antibody against LRP Heavy Chain mouse (8G1) was from Calbiochem (San Diego, CA). The PE mouse antibodies against human CD91 and IgG1 κ Isotype were purchased from BD Biosciences (Mississauga, ON). Horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit and anti-mouse IgG secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA). Ultracel 10K centrifugal filters were purchased from Merck Millipore (Etobicoke, ON) All other reagents were from Sigma-Aldrich Canada.

Cell culture : The human U87 glioblastoma cell line (American Type Culture Collection, HTB-14) was maintained in Eagle's Minimum Essential Medium (Wisent, 320-006CL) containing 10 % (v/v) calf serum (HyClone Laboratories, SH30541.03), 1mM sodium pyruvate (Sigma-Aldrich Canada, P2256), 100 units/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin (Wisent, 250-202-EL). Cells were incubated at 37°C with 95% air and 5% CO₂.

TissueScan cDNA arrays of grades I-IV brain tumor tissues : TissueScan™ cancer and normal tissue cDNA arrays were purchased from OriGene (Rockville,

MD), covering 43 clinical samples of the four stages of brain cancer as well as normal tissues, and were used to assess MT1-MMP and LRP-1 gene expression according to the manufacturer's recommendation. Tissue cDNAs in each array are synthesized from high quality total RNAs of pathologist-verified tissues, normalized and validated with β -actin in two sequential qPCR analyses, and accompanied by clinical information for 18 WHO grade I, 11 WHO grade II, 10 WHO grade III, and 2 WHO grade IV brain tumors.

Binding and uptake assays of Angiopep-2 using flow cytometry : Cells were incubated with 250 nM of Alexa⁴⁸⁸-An2/Ringer-HEPES or Ringer-HEPES alone for 1 h at 4°C (Binding) or 37 °C (Uptake) in the dark and washed 3 times with PBS/BSA(5%)/EDTA(2nM). Fluorescence was then evaluated by flow cytometry in the FL1-A channel using a C6 Accuri (BD Biosciences, Mississauga, ON).

Binding and uptake assays of Angiopep-2 with confocal microscopy : Cells were incubated with 50 nM of Alexa⁴⁸⁸-An2 or Alexa⁵⁶⁸-An2/EMEM medium without phenol red or EMEM without phenol red alone for 18h at 37°C, 5% CO₂. Cells were fixed in 4% formaldehyde (Fisher Scientific, Ottawa, ON) for 20 min. A solution of 10mg/ml DAPI diluted in PBS was used to stain the nuclei. Fluorescence was then monitored by confocal microscopy on a Nikon Eclipse Ti confocal microscope and using NIS Elements software.

Immunofluorescent microscopy : U87 cells were harvested and cultured on cover slips, transiently transfected with 1 μ g of cDNA plasmid encoding either for a full length GFP-tagged Wt-MT1-MMP recombinant protein (Wt-MT1-MMP-GFP) or a GFP recombinant protein (GFP) and treated or not with 25 μ M Ilomastat. Cells were serum-starved for 24 hours. Media were collected and cells were fixed in 4% formaldehyde (Fisher Scientific, Ottawa, ON) for 20 min and blocked for 1 h in 1% BSA/PBS/NaN₃. Immunostaining was performed in non-permeabilizing conditions

for 1 h with the anti-LRP Heavy Chain antibody (2 $\mu\text{g/ml}$) in 1% BSA/PBS/ NaN_3 , followed by 1:200 Rhodamine Red-X donkey anti-mouse IgG (Invitrogen, ON). A solution of 10 $\mu\text{g/ml}$ DAPI diluted in PBS was used to stain the nuclei. Fluorescence was then examined by confocal microscopy on a Nikon Eclipse Ti confocal microscope and using NIS Elements software.

Measurement of LRP-1 cell-surface expression : Cells were collected and resuspended in a solution of binding buffer. Cells were then incubated with either a PE mouse α -human CD91 or a mouse IgG1 κ Isotype control antibody for 1 h at room temperature in the dark. Cells were washed 3 times with PBS. Fluorescence was then examined by flow cytometry in the FL2-A channel with a C6 accuri (BD Biosciences, Mississauga, ON). The cells were collected and incubated with either the human CD91 antibody coupled to phycoerythrin (LRP-1/PE) or a control antibody (IgG1 κ Isotype ctrl/PE) and processed with a direct flow cytometry analysis to evaluate the membrane expression of LRP-1. The results obtained were quantified as a ratio of the GeoMeans of LRP-1-PE over control PE antibodies.

Gelatin zymography : Gelatin zymography was used to assess the extracellular levels of proMMP-2 and MMP-2 activation. In brief, an aliquot (20 μl) of the culture medium was subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) in a gel containing 0.1 mg/ml gelatin (Sigma-Aldrich Canada). The gels were then incubated in 2.5% Triton X-100 (Bioshop, TRX506.500) and rinsed in nanopure distilled water. Gels were further incubated at 37°C for 20h in 20 mMNaCl, 5 mM CaCl_2 , 0.02% Brij-35, 50 mMTris-HCl buffer, pH 7.6 and then stained with 0.1% Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bioshop, CBB250) and destained in 10% acetic acid and 30% methanol in water. Gelatinolytic activity was detected as unstained bands on a blue background.

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

Total RNA was extracted from cell monolayers using TriZol reagent (Life Technologies, 15596-018). For cDNA synthesis, 2 µg of total RNA were reverse-transcribed using a high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, 4368814). cDNA was stored at -80°C prior to PCR. Gene expression was quantified by real-time quantitative PCR using Sso Fast EvaGreen Supermix (Bio-Rad). DNA amplification was carried out using a CFX connect Real-Time System (Bio-Rad) and product detection was performed by measuring binding of the fluorescent dye EvaGreen to double stranded DNA. The QuantiTect primer sets were provided by QIAGEN : MT1-MMP (Hs_Mmp14_1_SG QT00001533), GAPDH (Hs_GAPDH_2_SG QT01192646), β-actin (Hs_Actb_2_SG QT01680476) and PPIA (Hs_PPIA_4_SG QT01866137). The relative quantities of target gene mRNA compared against two internal controls chosen in these three, GAPDH, β-actin or PPIA RNA, were measured by following a ΔCT method employing an amplification plot (fluorescence signal vs. cycle number). The difference (ΔCT) between the mean values in the triplicate samples of target gene and those of GAPDH and β-actin mRNAs were calculated by CFX manager Software version 2.1 (Bio-Rad) and the relative quantified value (RQV) was expressed as $2^{-\Delta CT}$.

Transfection method and RNA interference :

Cells were transiently transfected with 1 µg of cDNA plasmids encoding either WT-MT1-MMP, WT-MT1-MMP-GFP, GFP or empty vector for 24 hours. For knockdown experiments, cells were transiently transfected with 20 nM siRNA against MT1-MMP (Hs_MMP14_6 HP validated siRNA; QIAGEN, SI03648841) or scrambled sequences (AllStar Negative Control siRNA; QIAGEN, 1027281) using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, 11668). MT1-MMP-specific gene knockdown was evaluated by qRT-PCR as described above.

Immunoblotting procedures : Proteins from control and treated cells were separated by SDS-PAGE. After electrophoresis, proteins were electrotransferred to polyvinylidenedifluoride membranes which were then blocked for 1h at room temperature with 5% non-fat dry milk in Tris-buffered saline (150 mMNaCl, 20 mMTris-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% BSA and 0.1% sodium azide, followed by a 1h incubation with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse IgG (1/5,000 dilution) in TBST containing 5% non-fat dry milk. Immunoreactive material was visualized by ECL (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC).

Statistical data analysis : Data are representative of three or more independent experiments. Statistical significance was assessed using Student's unpaired t-test or 1-way ANOVA with a Dunnett post-test. Probability values of less than 0.05 were considered significant and an asterisk identifies such significance in the figures.

Results

MT1-MMP and LRP-1 gene expression profiling in grades I-IV brain tumour tissues. Understanding the mechanisms underlying An2 internalization in each grade of brain tumor is crucial to develop new and efficient strategies for the treatment of glioblastoma patients. The malignancy and the invasiveness of the brain tumors determine their classification within the WHO grading system. Thus, grade I brain tumors are classified as the most benign and slow growing, while grade IV are the most aggressive tumors (Louis, D et al, 2007). Since all of the four brain tumor grades have their own molecular signature in terms of gene and protein profiles (Louis, D et al, 2007), it is important to characterize the pattern of expression of the major components involved in the internalization processes of An2 in grades I to IV brain tumors. In order to evaluate the intrinsic LRP-1 and MT1-MMP molecular signature in all four brain tumor grades, a "Tissue Scan brain cancer cDNA array" was used to assess their respective transcript levels. We found that LRP-1 was strongly expressed in low invasive grade I brain tumor tissues and decreased in highly invasive higher-grade tumors (Fig.B.1A, right panel). Conversely, MT1-MMP expression increased with the tumor grade (Fig.B.1A, left panel) in accordance with previous observations which reported high MT1-MMP expression correlated with poor survival in human glioma (Amalinei, C et al, 2009). A scheme of the molecular signature characterizing the current hypothesized models of low MT1-MMP/LRP-1 expression ratio versus high MT1-MMP/LRP-1 expression ratio is depicted (Fig.B.1B). We hypothesize that low MT1-MMP-to-LRP1 ratios may favor LRP-1-mediated internalization of An2 in a U87 glioblastoma cell model.

Transient silencing of MT1-MMP increased An2 internalization. In order to assess the impact of MT1-MMP cell surface expression on An2 internalization, transient gene silencing was performed with either a siRNA directed against MT1-MMP (siMT1-MMP) or a scrambled siRNA non-specific sequence (siScrambled) in

human U87 glioblastoma cells. Cells were then incubated with Alexa⁴⁸⁸-labeled-An2 and binding/uptake assays performed as described in the Methods section. Efficient reduction of MT1-MMP was observed (Fig.B.2A) and was correlated with increased An2 binding and uptake in siMT1-MMP-transfected cells (Fig.B.2B). The increased internalization in siMT1-MMP-transfected cells was further confirmed upon confocal microscopy quantification confirming that MT1-MMP repression significantly improved the uptake of Alexa⁴⁸⁸-labeled-An2 (Fig.B.2C). These results suggest that MT1-MMP may actually act as a repressor of An2 internalization processes and that its inhibition may contribute to improving An2-mediated delivery of drug conjugates in clinical settings.

MT1-MMP catalytic function is required to downregulate An2 internalization. Given that MT1-MMP repression triggered An2 internalization, we next assessed whether MT1-MMP overexpression or only MT1-MMP functional inhibition alters An2 internalization. When assessed using fluorescent microscopy (Fig.B.3A), we found that MMP inhibitors Ilomastat (GM6001), a broad range inhibitor of the catalytic activity of MMPs, Doxycyclin, and Actinonin all triggered increased An2 internalization (Fig.B.3B). Efficient functional inhibition of MT1-MMP-mediated proMMP-2 activation was confirmed in Concanavalin-A-treated cells by zymography (Fig.B.3C). Uptake of Alexa488-labeled An2 was also assessed in the presence or absence of MMP inhibitors and, again, confirmed their capacity to induce An2 internalization (Fig.B.3D). Next, recombinant Wt-MT1-MMP-GFP or GFP alone was overexpressed in U87 glioblastoma cells, which were then treated with Alexa⁵⁶⁸-labeled-An2 in the presence or not of Ilomastat (GM6001), a broad range inhibitor of the catalytic activity of MMPs. Visualization of GFP-Wt-MT1-MMP-positive cells was performed and it was observed that these cells had a lower capacity to internalize An2 (Fig.B.4A). Interestingly, Ilomastat thwarted the effects of recombinant MT1-MMP suggesting that catalytic activity of MT1-MMP is required to alter An2 internalization (Fig.B.4A, B). Flow cytometry analysis further revealed

that the binding and uptake of Alexa⁵⁶⁸-labeled-An2 were not affected significantly in cells overexpressing MT1-MMP (Fig.B.4C). Interestingly, Ilomastat strongly triggered the internalization of Alexa⁵⁶⁸-labeled-An2, while it did not affect its binding (Fig.B.4C). Of note, the differences seen in the results obtained by confocal microscopy versus flow cytometry analysis with regards to cells overexpressing Wt-MT1-MMP can be explained by the way that the analysis is performed. Indeed, confocal microscopy shows the behaviour of a single transfected cell, while flow cytometry rather reflects a global fluorescence signal as monitored on 10,000 cell events. Since at best 10-15% of the cells are transfected, the non-significant decrease in the uptake of An2, as observed in Wt-MT1-MMP conditions (Fig.B.4C), may therefore be considered as a very significant effect. To validate the functional state of MT1-MMP, its extracellular catalytic activity was measured using gelatin zymography upon its ability to trigger latent proMMP-2 into active MMP-2 in the cell's conditioned media. As demonstrated, cells overexpressing recombinant Wt-MT1-MMP led to efficient activation of latent proMMP-2, while this was abrogated by Ilomastat (Fig.B.4D).

MT1-MMP's catalytic function is required for cell surface shedding of LRP-1. In order to document the molecular link between MT1-MMP's catalytic activity and its capacity to alter LRP-1-mediated An2 internalization processes, we sought to evaluate MT1-MMP's capacity to shed LRP-1 from the cell surface, a known substrate of MT1-MMP (Lehti, K et al, 2008). U87 glioblastoma cells were transiently transfected with Mock (empty pcDNA vector) or a cDNA encoding the full length MT1-MMP recombinant protein (Wt-MT1-MMP), then cells were treated with Ilomastat or vehicle. Using flow cytometry, we show that LRP-1 cell surface labelling (Fig.B.5B) was decreased in cells overexpressing Wt-MT1-MMP and that Ilomastat prevented that decrease (Fig.B.5B). Lack of Ilomastat effect on cell surface expression of LRP-1 (Fig.B.5A), while An2 internalization was increased (Fig.B.3D) confirms the involvement of MMP-mediated functions. Confocal microscopy was

further used to specifically assess the contribution of those individual cells which overexpressed recombinant MT1-MMP to LRP-1 cell surface shedding. Immunostaining of LRP-1 demonstrated that cell-surface expression was decreased in MT1-MMP-transfected cells and that effect was antagonized by Ilomastat (Fig.B.5A). Finally, to validate the hypothesis that LRP-1 is shed from the cell surface upon MT1-MMP-mediated proteolytic activity, conditioned media was harvested, concentrated, and LRP-1 cleavage products found reduced in Ilomastat-treated cells (Data not shown). These results suggest that MT1-MMP may contribute to the inactivation of LRP-1-mediated An2 internalization in brain tumor cells.

Discussion

Over the last few years, the production of thousands of potential therapeutic prospects that could stop and/or decrease the progression of gliomas has been the main focus of many pharmaceutical companies. Thus, many clinical trials have been done and have shown some promising therapeutic avenues. Several approaches have been used to cross the BBTB (Blood-brain tumor barrier) such as the bradykinin receptor-mediated BBTB opening (Warren, K et al, 2006), the inhibition of drug efflux transporters (Sane, R et al, 2013), the exploitation of receptor mediated transport system (Partridge, WM, 2012) and even the direct-delivery of pharmacological agents into the brain (Markert, J.M et al, 2014; Van Tellingen, O et al, 2015). However, brain cancer researchers are facing two major problems. Firstly, the molecular mechanisms controlling the passage of different molecules across the BBB are not well characterized across the brain-tumor grades, as well as the molecular mechanisms contributing to therapy resistance being poorly understood.

Since gliomas are characterized by many different genotypic modifications, they are highly heterogeneous and very difficult to treat. Moreover, patients diagnosed with gliomas often respond differently to therapies (Lucchiari, C et al, 2015). Therefore, a better comprehension of the molecular mechanisms that regulate the survival fate of glioma cells, such as autophagy (Catalano, M et al, 2015), resistance to apoptosis (Kogel, D et al, 2010), resistance to anoikis (Yang, J et al, 2013) and tumoral angiogenesis (Kessenbrock, K et al, 2010), is needed to efficiently target the weaknesses of each type of glioma. In this study, we highlight the possible implications of receptor mediated drug delivery in glioblastoma. LRP-1-mediated transport of drugs by An2 is a promising method and is already showing good results in clinical studies for the treatment of low-grade gliomas (Drappatz, J et al, 2013). Nonetheless, high-grade gliomas are still able to escape from this kind of therapy because of their phenotypic abilities to decrease LRP-1 expression. Among those,

matrix metalloproteinases (MMPs), a large family known to be highly expressed in brain cancer cells, may act as repressors of receptor-mediated transport systems by degrading specific substrates and/or cell-surface receptors needed to release the drugs inside the cells and thus, decreasing their bioavailability. In our case, we have found that MT1-MMP cleaved LRP-1 and decreased its cell-surface expression as well as the internalization of An2 in U87 glioblastoma cells. (Fig.B.4B and B.5B) Astonishingly, MMP inhibitors such as Ilomastat, Doxycyclin and Actinonin triggered the entrance of An2. (Fig.B.3B) In other words, using MMP inhibitors in high-grade glioma therapies would be very profitable as they will change the phenotype to that of the low-grade gliomas.

Presently, the most common therapy against glioblastoma is the surgical resection followed by radiotherapy and temozolomide-based chemotherapy. Even though, it can stop the cancer progression for some years, glioblastoma multiforme is ultimately fatal (Stupp, R et al, 2009). Furthermore, MT1-MMP, as well as other MMPs, are induced by radiation combined with temozolomide (Kwiatkowska, A et al, 2011). However, recent studies have demonstrated that the inhibition of MT1-MMP by Marimastat, a broad range inhibitor of MMPs, sensitized gliomas to the therapeutic effects mediated by both temozolomide and radiation (Ulasov, I et al, 2013). Besides that, a second hand treatment with cyclophosphamide (CYC), a small molecule known to cross the BBB (Wainwright, D.A et al, 2013), is available for patients who have recurrent glioblastoma that resist to temozolomide treatment, but has shown some modest effects (Chamberlain, M. C. and D. D. Tsao-Wei, 2004). In addition to CYC, many chemical compounds have been designed and optimized to cross the BBB, but the mechanisms by which drugs are immediately expelled were underestimated in these studies (Brasnjevic, I et al, 2009).

The multi-drug resistance (MDR) protein family is known to have an integral role in the BBB, protecting the brain from xenobiotics and external attacks (Agarwal,

S et al, 2013). Indeed, several members of this family, such as the multidrug resistance protein 1 (MDR1), the multidrug-resistance-associated protein 1 (MRP1), the human major vault protein (MVP) and the O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT), are upregulated in high-grade gliomas (Lu, C and Shervington, A, 2008) and are correlated with other major actors in their chemoresistance, such as the epidermal growth factor receptor (EGFR) and glioma-associated oncogene 1 (Gli1) (Cui, D et al, 2010). Even though there is no clear evidence that MMPs are associated with the regulation of MDR proteins in gliomas, some studies have suggested that MMP-2, MMP-9, MMP-11 as well as MT1-MMP expressions are linked to EGFR and/or Gli1 in breast cancer cells (Xu, J.W. et al, 2011; Kwon, Y.J. et al, 2011). Nevertheless, many studies have shown that MT1-MMP has the ability to : activate soluble MMPs, like MMP-2 (Markovic, D.S. et al, 2009); participate in the transduction of intracellular signalling pathways via its cytoplasmic domain (Gingras, D et al, 2001; Pratt, J and Annabi, B, 2014; Belkaid, A et al, 2007; Annabi, B et al, 2009); cleave cell-surface receptors that could serve as an anchor for future therapies using Angiopep-2 and its analogs (Bertrand, Y et al, 2011). In order to facilitate the crossing of An2-conjugated drugs across the BBB, it would be important to investigate the interactions between the positive and the negative regulators of these receptors. As such, LRP-1 is known to be highly expressed in both brain endothelial cells and brain cancer cells, while MT1-MMP is only strongly expressed in brain cancer cells (Strickland, D. K. and S. Ranganathan, 2003). Since the ratio of MT1-MMP/LRP-1 in low-grade gliomas and endothelial cells is very low compared to that of high-grade gliomas, An2 would be internalized with a much better efficiency (Fig.B.1B). Consequently, the inhibition of MMP-14 might be very useful and could not only enhance the chemotherapeutic effects of drugs that are already in clinical trials, but also improve the anticancer treatments by promoting the internalization of An2 in both low-grade- and high-grade glioblastoma.

List of abbreviations

An2, Angiopep2; BBB, Blood-brain barrier; LRP-1, LDL receptor-related protein-1; MMP, Matrix metalloproteinases, MT1-MMP, Membrane type-1 matrix metalloproteinase; WHO, World Health Organization

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

JP, KH and BA designed this study. JP performed all the experiments. All authors have contributed to data analysis, discussions and interpretations of the results. All authors have read and approved the final manuscript.

Funding

JP is a Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) awardee. This work was funded by a Collaborative Research and Development (CRD) grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada to BA (NSERC; RDCPJ 445033-12).

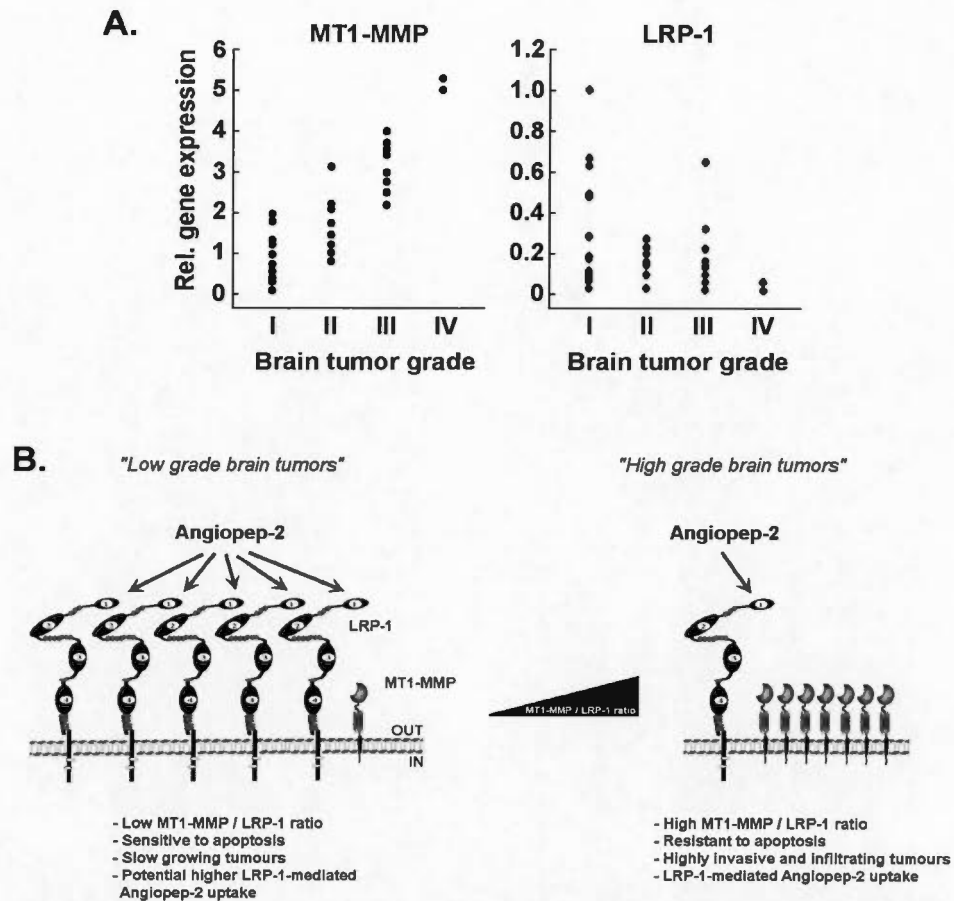


Figure B.1 MT1-MMP and LRP-1 gene expression profiling in grades I-IV brain tumour tissues. A) TissueScan™ cancer and normal tissue cDNA arrays from 43 clinical samples covering four stages of brain cancer were used to assess MT1-MMP and LRP-1 gene expression levels. Tissue cDNAs in each array were synthesized from high quality total RNAs of pathologist-verified tissues, normalized and validated with β -actin and provided with clinical information for 18 WHO grade I, 11 WHO grade II, 10 WHO grade III, and 2 WHO grade IV brain tumours. B) Scheme summarizing the hypothesis that MT1-MMP-to-LRP-1 ratios may be indicative of the therapeutic efficiency of An2-mediated delivery of drug conjugates in low- and high-grade tumors. Low-grade brain tumors are slow growing tumors characterized by a potential higher LRP-1-mediated An2 uptake, an increased sensitivity to apoptosis and a low MT1-MMP/LRP-1 ratio. On the other hand, high-grade brain tumors are highly invasive and infiltrating tumors characterized by a higher resistance to apoptosis, a diminished LRP-1-mediated An2 uptake and a high MT1-MMP/LRP-1 ratio. We hypothesize that the characterization of An2 uptake in a cell model expression low MT1-MMP/LRP-1 ratio will increase our comprehension of the cell surface mechanisms involved in brain tumors.

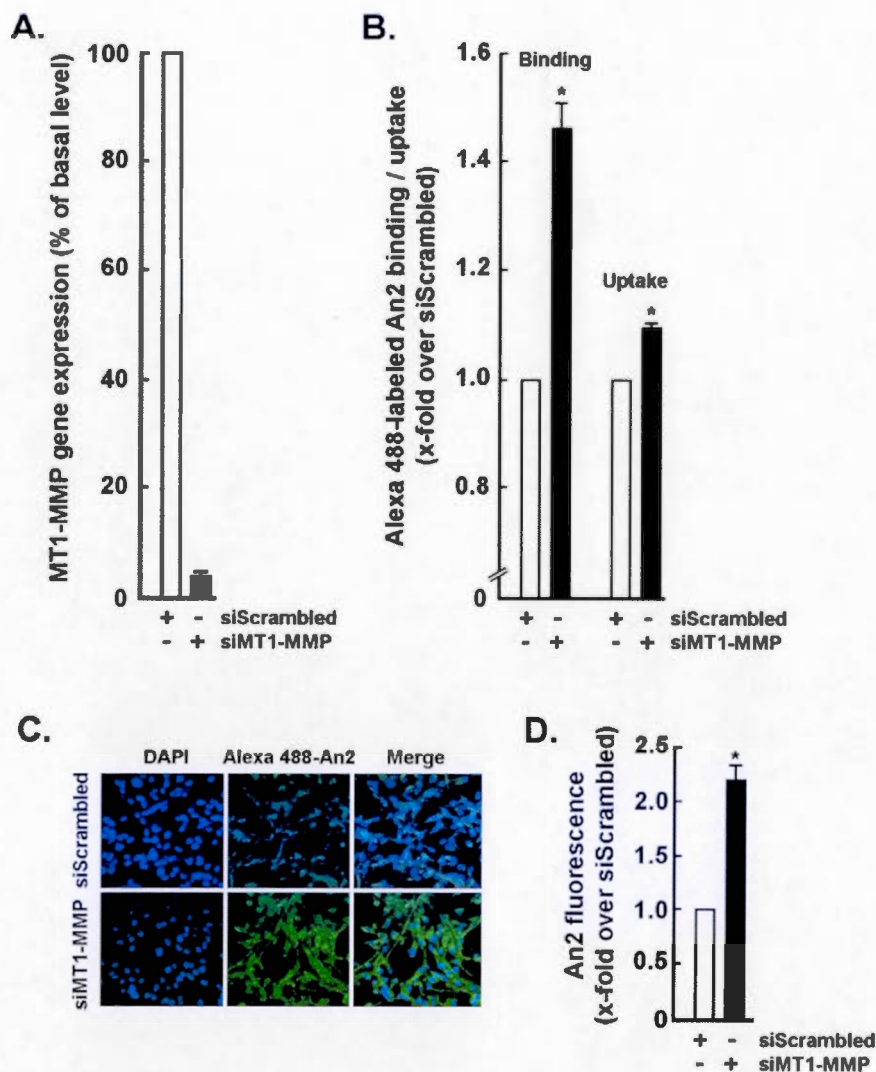


Figure B.2 Silencing of MT1-MMP increases An2 internalization. A) U87 glioblastoma cells were transiently transfected with 20 nM siRNA (either siScrambled or siMT1-MMP) for 24 hours. Cells were then collected and total RNA isolation and qRT-PCR were performed as described in the Methods section to assess MT1-MMP gene expression. B) Cells were transiently transfected as in A) and used to perform a binding/uptake of An2 as described in the Methods section. C,D) Cells were transiently transfected as in A), incubated with 100 nM Alexa⁴⁸⁸-An2 for 18 hours, fixed and counterstained with DAPI (in blue) to visualize the nuclei. Photomicrographs were taken and quantified using the confocal microscopy and the ImageJ software. Quantification represents the ratio of the mean green fluorescence per cell.

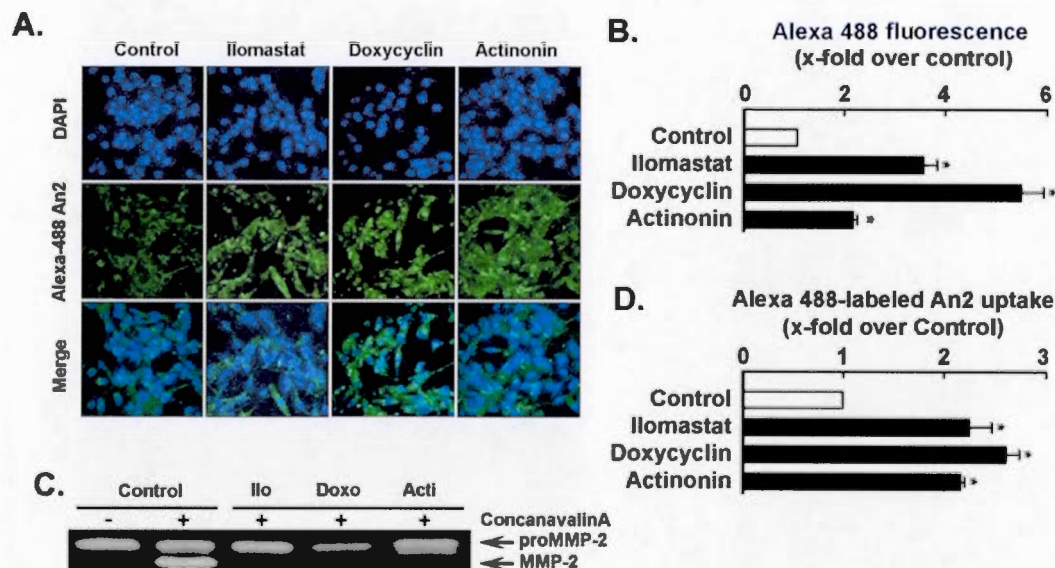


Figure B.3 Inhibition of MMP by broad-range inhibitors triggers An2 internalization. A,B) U87 glioblastoma cells were harvested on cover slips and treated with Ilorestat (25 μ M), Doxycyclin (100 μ M) or Actinonin (100 μ M) for 24 hours. Cells were incubated with 100 nM of Alexa⁴⁸⁸-An2 for 18 hours, fixed and counterstained with DAPI (in blue) to visualize the nuclei. Photomicrographs were taken and quantified using confocal microscopy and the ImageJ software. Quantification represents the ratio of the mean green fluorescence per cell. C) U87 glioblastoma cells were treated as in A) in combination with 30 μ g/ml of Concanavalin-A. Conditioned media were taken in order to perform gelatin zymography, as described in the Methods section, to assess MT1-MMP-mediated proMMP-2 activation status. D) U87 glioblastoma cells were treated as in A) and harvested to perform an uptake assay of An2 as described in the Methods section.

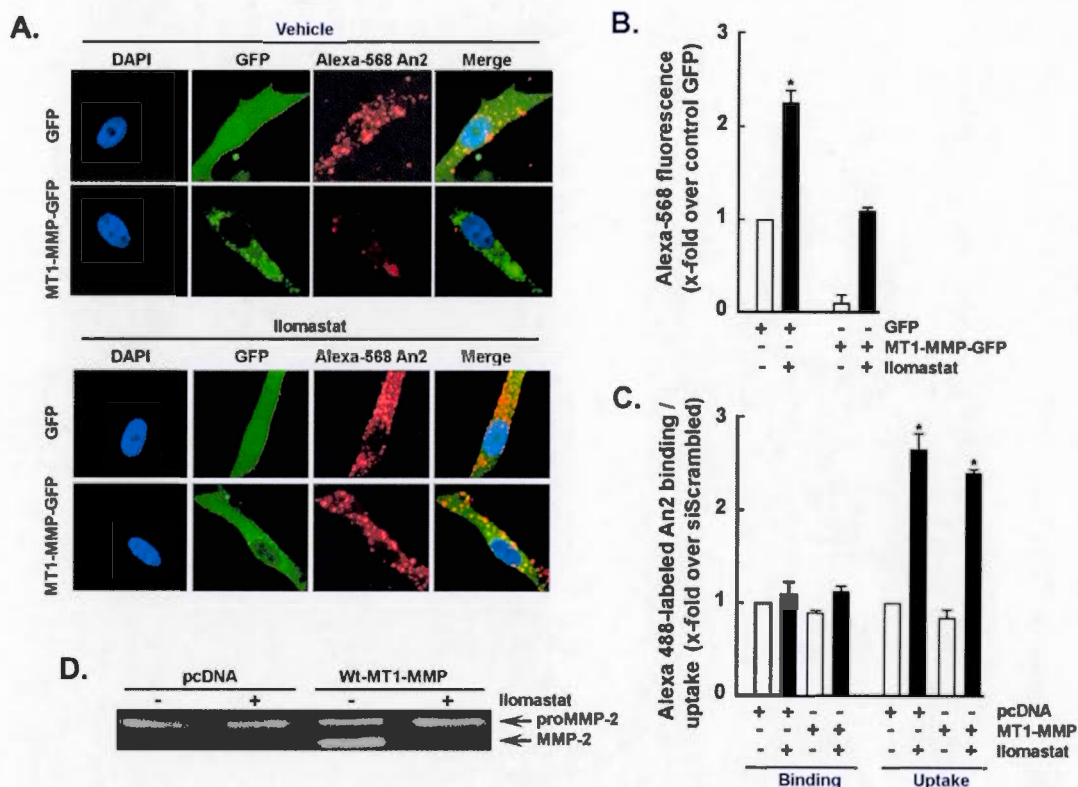


Figure B.4 MT1-MMP overexpression decreased An2 internalization. A,B) U87 glioblastoma cells were transiently transfected with 1 μ g of cDNA plasmids encoding either WT-MT1-MMP-GFP or GFP alone, treated or not with 25 μ M Iloprost for 24 hours, incubated with 100 nM of Alexa⁵⁶⁸-An2 for 18 hours, fixed and counterstained with DAPI (in blue) to visualize the nuclei. Photomicrographs were taken and quantified using the confocal microscopy and the ImageJ software. Quantification represents the ratio of the mean red fluorescence per green fluorescent cell. C) U87 cells were transiently transfected as in A) with cDNA plasmids encoding either full length Wt-MT1-MMP or an empty vector (pc DNA3.1). Cells were then treated or not with 25 μ M Iloprost for 24 hours and used to perform a binding/uptake of An2 as described in the Methods section. D) Conditioned media was isolated from serum-starved U87 cells transiently transfected as in C) in order to assess MT1-MMP-mediated activation of latent proMMP-2 into active MMP-2.

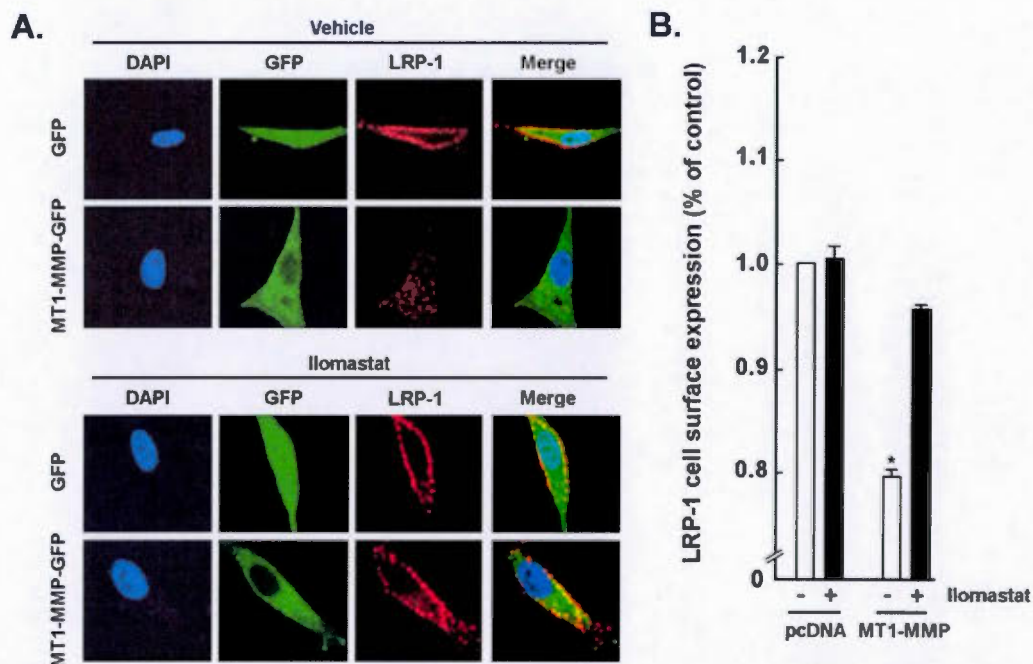


Figure B.5 MT1-MMP-mediated shedding of LRP-1 requires MMP catalytic function. A) U87 glioblastoma cells were transiently transfected with $1\mu\text{g}$ of cDNA plasmids encoding a GFP-tagged full length Wt-MT1-MMP or GFP alone. Cells were treated or not with $25\mu\text{M}$ for 24 hours and fixed. Cell surface LRP-1 immunophenotyping was performed using a LRP-1 heavy chain (515 kDa) primary antibody and a Rhodamine Red-X secondary antibody (in order to display LRP-1 cell surface expression in red). Cells were then counterstained with DAPI (in blue) to visualize the nuclei. Photomicrographs were taken and quantified using the confocal microscopy and the ImageJ software. B) Cells were transiently transfected with $1\mu\text{g}$ of cDNA plasmids encoding either full length Wt-MT1-MMP or an empty vector (pcDNA3.1) and treated or not with $25\mu\text{M}$ Ilomastat for 24 hours. Immunophenotyping of LRP-1 cell surface expression was performed using flow cytometry as described in the Methods section. Results are presented as percentages of LRP-1 cell-surface expression and reported on control (pcDNA 3.1 without Ilomastat).

References

Dubois, L. G., Campanati, L. Righy, C. D'Andrea-Meira, I. Spohr, T. C. Porto-Carreiro, I. Pereira, C.M. Balca-Silva, J. Kahn, S. A. DosSantos, M. F. Oliveira Mde, A. Ximenes-da-Silva, A. Lopes, M. C. Faveret, E. Gasparetto, E. L. Moura-Neto, V. (2014) "Gliomas and the vascular fragility of the blood brain barrier." Front Cell Neurosci **8**: 418.

Wick, W., Wick, A. Schulz, J. B. Dichgans, J. Rodemann, H. P. Weller, M. (2002) "Prevention of irradiation-induced glioma cell invasion by temozolomide involves caspase 3 activity and cleavage of focal adhesion kinase." Cancer Res **62**(6): 1915-1919.

Ajaz, M., Jefferies, S. Brazil, L. Watts, C. Chalmers, A. (2014) "Current and investigational drug strategies for glioblastoma." Clin Oncol (R Coll Radiol) **26**(7): 419-430.

Pahwa, S., Stawikowski, M. J. Fields, G. B. (2014). "Monitoring and Inhibiting MT1-MMP during Cancer Initiation and Progression." Cancers (Basel) **6**(1): 416-435.

Pratt, J., Iddir, M. Bourgault, S. Annabi, B. (2015). "Evidence of MTCBP-1 interaction with the cytoplasmic domain of MT1-MMP: Implications in the autophagy cell index of high-grade glioblastoma." Mol Carcinog.

Gingras, D. and R. Béliveau (2010). "Emerging concepts in the regulation of membrane-type 1 matrix metalloproteinase activity." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research **1803**(1): 142-150.

Gialeli, C., Theocharis, A. D. Karamanos, N. K. (2011). "Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting." FEBS J **278**(1): 16-27.

Sina, A., Proulx-Bonneau, S. Roy, A. Poliquin, L. Cao, J. Annabi, B. (2010). "The lectin concanavalin-A signals MT1-MMP catalytic independent induction of COX-2 through an IKK γ /NF- κ B-dependent pathway." J Cell Commun Signal **4**(1): 31-38.

Proulx-Bonneau, S., Pratt, J. Annabi, B. (2011). "A role for MT1-MMP as a cell death sensor/effector through the regulation of endoplasmic reticulum stress in U87 glioblastoma cells." J Neurooncol **104**(1): 33-43.

Pratt, J., Roy, R. Annabi, B. (2012). "Concanavalin-A-induced autophagy biomarkers requires membrane type-1 matrix metalloproteinase intracellular signaling in glioblastoma cells." Glycobiology **22**(9): 1245-1255.

Gomez, D. E., Alonso, D. F. Yoshiji, H. Thorgeirsson, U. P. (1997). "Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions." Eur J Cell Biol **74**(2): 111-122.

Herz, J. and D. K. Strickland (2001). "LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor." J Clin Invest **108**(6): 779-784.

Yamamoto, K., Murphy, G. Troeberg, L. (2015). "Extracellular regulation of metalloproteinases." Matrix Biol.

Hahn-Dantona, E., Ruiz, J. F. Bornstein, P. Strickland, D. K. (2001). "The low density lipoprotein receptor-related protein modulates levels of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) by mediating its cellular catabolism." J Biol Chem **276**(18): 15498-15503.

Quinn, K. A., Pye, V. J. Dai, Y. P. Chesterman, C. N. Owensby, D. A. (1999). "Characterization of the soluble form of the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP)." Exp Cell Res **251**(2): 433-441.

Rozanov, D. V., Hahn-Dantona, E. Strickland, D. K. Strongin, A. Y. (2004). "The low density lipoprotein receptor-related protein LRP is regulated by membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) proteolysis in malignant cells." J Biol Chem **279**(6): 4260-4268.

Liu, Q., Zhang, J. Tran, H. Verbeek, M. M. Reiss, K. Estus, S. Bu, G. (2009). "LRP1 shedding in human brain: roles of ADAM10 and ADAM17." Mol Neurodegener **4**: 17.

Selvais, C., Gaide Chevronnay, H. P. Lemoine, P. Dedieu, S. Henriët, P. Courtoy, P. J. Marbaix, E. Emonard, H. (2009). "Metalloproteinase-dependent shedding of low-density lipoprotein receptor-related protein-1 ectodomain decreases endocytic clearance of endometrial matrix metalloproteinase-2 and -9 at menstruation." Endocrinology **150**(8): 3792-3799.

Emonard, H., Theret, L. Bennisroune, A. H. Dedieu, S. (2014). "Regulation of LRP-1 expression: make the point." Pathol Biol (Paris) **62**(2): 84-90.

Demeule, M., Currie, J. C. Bertrand, Y. Ché, C. Nguyen, T. Régina, A. Gabathuler, R. Castaigne, J. P. Beliveau, R. (2008). "Involvement of the low-density

lipoprotein receptor-related protein in the transcytosis of the brain delivery vector Angiopep-2." Journal of Neurochemistry **106**(4): 1534-1544.

Che, C., Yang, G. Thiot, C. Lacoste, M. C. Currie, J. C. Demeule, M. Regina, A. Beliveau, R. Castaigne, J. P. (2010). "New Angiopep-modified doxorubicin (ANG1007) and etoposide (ANG1009) chemotherapeutics with increased brain penetration." J Med Chem **53**(7): 2814-2824.

Demeule, M., Regina, A. Che, C. Poirier, J. Nguyen, T. Gabathuler, R. Castaigne, J. P. Beliveau, R. (2007). "Identification and Design of Peptides as a New Drug Delivery System for the Brain." Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **324**(3): 1064-1072.

Louis, D. N., Ohgaki, H. Wiestler, O. D. Cavenee, W. K. Burger, P. C. Jouvett, A. Scheithauer, B. W. Kleihues, P. (2007). "The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system." Acta Neuropathol **114**(2): 97-109.

Amalinei, C., Caruntu, I. D. Giusca, S. E. Balan, R. A. (2010). "Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions." Rom J Morphol Embryol **51**(2): 215-228.

Warren, K., Jakacki, R., Widemann, B., Aikin, A., Libucha, M., Packer, R., Vezina, G., Reaman, G., Shaw, D., Krailo, M., Osborne, C., Cehelsky, J., Caldwell, D., Stanwood, J., Steinberg, S.M., Balis, F.M., 2006. Phase II trial of intravenous lobradimil and carboplatin in childhood brain tumors: a report from the Children's Oncology Group. Cancer Chemother. Pharmacol. **58**, 343–347.

Sane, R., Mittapalli, R.K., Elmquist, W.F., 2013. Development and evaluation of a novel microemulsion formulation of elacridar to improve its bioavailability. J. Pharm. Sci. **102**, 1343–1354.

Pardridge, W.M., 2012. Drug transport across the blood–brain barrier. J. Cereb. BloodFlow Metab. **32**, 1959–1972.

Markert, J.M., Razdan, S.N., Kuo, H.C., Cantor, A., Knoll, A., Karrasch, M., Nabors, L.B., Markiewicz, M., Agee, B.S., Coleman, J.M., Lakeman, A.D., Palmer, C.A., Parker, J.N., Whitley, R.J., Weichselbaum, R.R., Fiveash, J.B., Gillespie, G.Y., 2014. A phase 1 trial of oncolytic HSV-1, G207, given in combination with radiation for recurrent GBM demonstrates safety and radiographic responses. Mol. Ther. **22**, 1048–1055.

Van Tellingen, O., Yetkin-Arik, B. de Gooijer, M. C. Wesseling, P. Wurdinger, T. de Vries, H. E. (2015). "Overcoming the blood-brain tumor barrier for effective glioblastoma treatment." Drug Resist Updat **19**: 1-12.

Lucchiari, C., Botturi, A. Silvani, A. Lamperti, E. Gaviani, P. Innocenti, A. Finocchiaro, C. Y. Masiero, M. Pravettoni, G. (2015). "Cognitive strategies and quality of life of patients with high-grade glioma." Support Care Cancer.

Catalano, M., D'Alessandro, G. Lepore, F. Corazzari, M. Caldarola, S. Valacca, C. Faienza, F. Esposito, V. Limatola, C. Cecconi, F. Di Bartolomeo, S. (2015). "Autophagy induction impairs migration and invasion by reversing EMT in glioblastoma cells." Mol Oncol.

Kogel, D., Fulda, S. Mittelbronn, M. (2010). "Therapeutic exploitation of apoptosis and autophagy for glioblastoma." Anticancer Agents Med Chem **10**(6): 438-449.

Yang, J., Zheng, Z. Yan, X. Li, X. Liu, Z. Ma, Z. (2013). "Integration of autophagy and anoikis resistance in solid tumors." Anat Rec (Hoboken) **296**(10): 1501-1508.

Kessenbrock, K., Plaks, V. Werb, Z. (2010). "Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment." Cell **141**(1): 52-67.

Drappatz, J., Brenner, A. Wong, E. T. Eichler, A. Schiff, D. Groves, M. D. Mikkelsen, T. Rosenfeld, S. Sarantopoulos, J. Meyers, C. A. Fielding, R. M. Elian, K. Wang, X. Lawrence, B. Shing, M. Kelsey, S. Castaigne, J.P. Wen, P. Y. (2013). "Phase I study of GRN1005 in recurrent malignant glioma." Clin Cancer Res **19**(6): 1567-1576.

Stupp, R., Hegi, M. E. Mason, W. P. van den Bent, M. J. Taphoorn, M. J. Janzer, R. C. Ludwin, S. K. Allgeier, A. Fisher, B. Belanger, K. Hau, P. Brandes, A. A. Gijtenbeek, J. Marosi, C. Vecht, C. J. Mokhtari, K. Wesseling, P. Villa, S. Eisenhauer, E. Gorlia, T. Weller, M. Lacombe, D. Cairncross, J. G. Mirimanoff, R. O. (2009). "Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial." Lancet Oncol **10**(5): 459-466.

Kwiatkowska, A., Kijewska, M. Lipko, M. Hibner, U. Kaminska, B. (2011). "Downregulation of Akt and FAK phosphorylation reduces invasion of glioblastoma cells by impairment of MT1-MMP shuttling to lamellipodia and downregulates MMPs expression." Biochim Biophys Acta **1813**(5): 655-667.

Ulasov, I., Thaci, B. Sarvaiya, P. Yi, R. Guo, D. Auffinger, B. Pytel, P. Zhang, L. Kim, C. K. Borovjagin, A. Dey, M. Han, Y. Baryshnikov, A. Y. Lesniak, M. S. (2013). "Inhibition of MMP14 potentiates the therapeutic effect of temozolomide and radiation in gliomas." Cancer Med **2**(4): 457-467.

Wainwright, D. A., Dey, M. Chang, A. Lesniak, M. S. (2013). "Targeting Tregs in Malignant Brain Cancer: Overcoming IDO." Front Immunol **4**: 116.

Chamberlain, M. C. and D. D. Tsao-Wei (2004). "Salvage chemotherapy with cyclophosphamide for recurrent, temozolomide-refractory glioblastoma multiforme." Cancer **100**(6): 1213-1220.

Brasnjevic, I., Steinbusch, H. W. M., Schmitz, C., Martinez-Martinez, P. (2009). "Delivery of peptide and protein drugs over the blood-brain barrier." Progress in Neurobiology **87**(4): 212-251.

Agarwal, S., Manchanda, P. Vogelbaum, M. A. Ohlfest, J. R. Elmquist, W. F. (2013). "Function of the blood-brain barrier and restriction of drug delivery to invasive glioma cells: findings in an orthotopic rat xenograft model of glioma." Drug Metab Dispos **41**(1): 33-39.

Lu, C., Shervington A. Chemoresistance in gliomas. Mol Cell Biochem 2008;312 (1-2):71-80.

Cui, D., Xu, Q. Wang, K. Che, X. (2010). "Gli1 is a potential target for alleviating multidrug resistance of gliomas." J Neurol Sci **288**(1-2): 156-166.

Xu, J. W., Li, Q. Q. Tao, L. L. Cheng, Y. Y. Yu, J. Chen, Q. Liu, X. P. Xu, Z. D. (2011). "Involvement of EGFR in the promotion of malignant properties in multidrug resistant breast cancer cells." Int J Oncol **39**(6): 1501-1509.

Kwon, Y. J., Hurst, D. R. Steg, A. D. Yuan, K. Vaidya, K. S. Welch, D. R. Frost, A. R. (2011). "Gli1 enhances migration and invasion via up-regulation of MMP-11 and promotes metastasis in ERalpha negative breast cancer cell lines." Clin Exp Metastasis **28**(5): 437-449.

Markovic, D. S., Vinnakota, K. Chirasani, S. Synowitz, M. Raguette, H. Stock, K. Sliwa, M. Lehmann, S. Kalin, R. van Rooijen, N. Holmbeck, K. Heppner, F. L. Kiwit, J. Matyash, V. Lehnardt, S. Kaminska, B. Glass, R. Kettenmann, H. (2009). "Gliomas induce and exploit microglial MT1-MMP expression for tumor expansion." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(30): 12530-12535.

Gingras, D., Bousquet-Gagnon, N. Langlois, S. Lachambre, M. P. Annabi, B. Beliveau, R. (2001). "Activation of the extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) cascade by membrane-type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP)." FEBS Lett **507**(2): 231-236.

Pratt, J. and B. Annabi (2014). "Induction of autophagy biomarker BNIP3 requires a JAK2/STAT3 and MT1-MMP signaling interplay in Concanavalin-A-activated U87 glioblastoma cells." Cell Signal **26**(5): 917-924.

Belkaid, A., Fortier, S. Cao, J. Annabi, B. (2007). "Necrosis induction in glioblastoma cells reveals a new "bioswitch" function for the MT1-MMP/G6PT signaling axis in proMMP-2 activation versus cell death decision." Neoplasia **9**(4): 332-340.

Annabi, B., Laflamme, C. Sina, A. Lachambre, M. P. Beliveau, R. (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.

Bertrand, Y., Currie, J. C. Poirier, J. Demeule, M. Abulrob, A. Fatehi, D. Stanimirovic, D. Sartelet, H. Castaigne, J. P. Beliveau, R. (2011). "Influence of glioma tumour microenvironment on the transport of ANG1005 via low-density lipoprotein receptor-related protein 1." Br J Cancer **105**(11): 1697-1707.

Strickland, D. K. and S. Ranganathan (2003). "Diverse role of LDL receptor-related protein in the clearance of proteases and in signaling." J Thromb Haemost **1**(7): 1663-1670.

APPENDICE C : CHAPITRE DE LIVRE

Chapitre publié dans le volume 10 de la série Autophagy : Cancer, Other pathologies, Inflammation, Immunity, Infection and Aging.

CHAPTER

11

Membrane Type-1 Matrix Metalloproteinase-Regulated Autophagy: A Role in Brain Cancer Chemoresistance

*Jonathan Pratt, Michael J. Coady
and Borhane Annabi*

OUTLINE

Abbreviations	217	<i>Matrix Metalloproteinases</i>	219
Introduction	217	Membrane Type-1 Matrix Metalloproteinase	220
<i>Barriers to Brain Cancer Growth Resistance to Current Treatments for Brain Cancer</i>	218 219	Discussion	224
ECM Degradation and Matrix Metalloproteinases: A Link to the Chemoresistance Phenotype	219	<i>Targeting Autophagy to Fight Cancer MTCBP-1</i>	224 226
		References	227

Chapter

**MEMBRANE TYPE-1 MATRIX METALLOPROTEINASE REGULATED
AUTOPHAGY : A ROLE IN BRAIN CANCER CHEMORESISTANCE**

Jonathan Pratt, Michael J. Coady, Borhane Annabi

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

TABLE OF CONTENTS

ABSTRACT

INTRODUCTION

Barriers to brain cancer growth

Resistance to current treatments for brain cancer

ECM DEGRADATION AND MMPs : A LINK TO THE CHEMORESISTANCE

PHENOTYPE

Matrix metalloproteinases

MEMBRANE TYPE 1-MATRIX METALLOPROTEINASE

A role for MT1-MMP as an intracellular transducer of autophagy

Physiological inducers of MT1-MMP: Hypoxia / inflammation

Pharmacological inducers of MT1-MMP : Concanavalin-A / Cytochalasin-D

DISCUSSION

Targeting autophagy to fight cancer

Pharmacological targeting of MT1-MMP

A role for MTCBP in autophagy?

REFERENCES

ABSTRACT

Autophagy is recognized as being involved in several stages of the growth and metastasis of CNS tumors, and can both impede and promote tumor development. In order to adapt to the low oxygen and low nutrients stresses, cancer cells exert autophagic activity which allows them to maintain appropriate nutrients supply, and which plays important roles in the immune response as well as in the control of reactive oxygen species. Consequently, dysregulated autophagy has recently been ascribed as a new hallmark of brain cancer cells that explains, in part, their resistance to current treatments. Among the chemoresistance mechanisms and the key players recently characterized in brain cancer cells, membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) has recently been documented to relay inflammatory and autophagy signaling and may therefore represent a promising target. More importantly, modulation of MT1-MMP's intracellular functions by MTCBP-1, a cytoplasmic MT1-MMP binding partner is believed to regulate the autophagy index from low-to-high grade glioblastomas. In this chapter, we will discuss the global roles and functions of matrix metalloproteinases in autophagy but, more importantly, the importance of MT1-MMP-mediated signaling in autophagy.

INTRODUCTION

Barriers to brain cancer growth

In order for tumors to grow, multiply and metastasis, they must respond to a battery of challenges which serve to eliminate the vast majority of microtumors before they can become established (Vanharanta and Massagué, 2013). In order for a metastatic cell to invade a foreign site, it will require exiting from the blood or lymphatic vessels, enter the new site and form extracellular matrix (ECM) links there (Su *et al.*, 2015). The growing tumor then requires angiogenesis to supply it with sufficient nutrients and oxygen, and it also must be able to continue to replicate without limits, avoiding cellular latency. For this, cancer cells require self-sufficiency with respect to growth signals and must be able to ignore the physiological signals which generally halt proliferation; it must also prevent the apoptosis or necrosis that is often upregulated by these signals. The given solid tumor must be able to withstand not only living within the inflammatory conditions, that are generally produced at its new site, but also to evade the immune attack that is mounted against it. In addition, the cell must reprogram its metabolism to enable it to survive under these hostile conditions and it must be able to withstand the genomic instability that is produced by the response to its untrammelled growth. Finally, the tumor must be able to shed metastatic masses which are able to leave this site. Autophagy plays a role in a number of these barriers, either as part of the barrier to tumor growth or in the tumor's mechanisms for overcoming the barrier; we will discuss a few of them here.

The generation of nutrients and energy in response to starvation or other metabolic stress conditions is required for rapidly-growing tumor cells, which utilize autophagy processes to obtain these nutrients, thus promoting cell survival. In response to numerous stress conditions, autophagy has been shown to protect dormant cells, enabling them to resume growth under more favorable conditions (Mathew and White, 2011). These conditions activate Hypoxia-inducible Factor 1 (HIF-1) and 5'-AMP-activated kinase (AMPK) which stimulate autophagy, thus supplying nutrients for the cell, maintaining homeostatic conditions and allowing the cell to survive (Ávalos *et al.*, 2014). The utility of this mechanism for tumor cells, which are chronically hypoxic and without sufficient blood supply, is obvious.

The autophagy pathways play a role in control of the immune response (Arroyo *et al.*, 2014). Stimulation of microglial Toll-Like Receptors (TLRs) in the central nervous system (CNS) by a stimulatory antigen leads to autophagic activation of these cells and, eventually, to autophagic cell death (Arroyo *et al.*, 2014). mTOR, a central player in autophagic control, has also been shown to be involved in the pro-inflammatory activation of microglia (Lu *et al.*, 2006). While the number and identity of the signaling pathways linking inflammation and tumorigenesis is not clear, the number of inflammatory stimuli is far greater than the number of transcriptional factors that they activate, suggesting that understanding these pathways may provide useful targets for braking tumor growth (Sen, 2011).

The accumulation of reactive oxygen species (ROS) poses a considerable threat to cancer cells as they derange cellular signalling and can directly oxidize lipids

and proteins or cause breaks in DNA; the ROS can arise from internal generation due to enhanced metabolism or are due to necrosis in the cell's environment (Liou and Storz, 2010; Mah and Ryan, 2012). One of the major roles of autophagy in preventing tumor growth is the diminution of ROS levels, thus preventing the oxidations and DNA breaks which would threaten the cell (Kaza *et al.*, 2012). Conversely, the deleterious effects of ROS are enhanced when autophagy is diminished (by use of inhibitors or genetic removal of essential autophagic genes), allowing the accumulation of damaged mitochondria which would normally be destroyed via the autophagosome and thus increasing the ROS load (Giuliani and Dass, 2014).

A number of molecules serve as damage-associated molecular patterns (DAMPs), which are either released into the extracellular space or concentrated in the outer leaflet of the plasma membrane; these include ATP and uric acid (Gallo and Gallucci, 2013). Recognition of the DAMPs by the immune system occurs by a large family of receptors. The production and trafficking of these DAMPs occurs via the autophagic machinery. It has also been suggested that the DAMPs are not simply products of autophagic processing but are also powerful stimulants of it as well (Hou *et al.*, 2013).

One significant barrier to understanding autophagy's role in the control of tumor growth is interplay between the control of apoptosis, necrosis and autophagy (Su *et al.*, 2015). Cancer cells often evade these three methods of destruction by mutation of the factors modulating them, and there is considerable overlap in the identity of the proteins controlling these processes. Though the specific mechanisms

controlling autophagy are complex and remain poorly understood, it is clear that the mTOR complex inhibits autophagy whereas the phosphatase PTEN promotes it; in many tumors, PTEN is one of the initial genes mutated, leading to constitutive inhibition of autophagy along with enhanced translation and cell growth (Bhutia *et al.*, 2013). Similar results are seen for several other proteins which are crucial for autophagy control, such as AKT and DRAM. The resultant lack of autophagy prevents autophagic cell death from removing the proliferating cells in which the mutated proteins have arisen. However, modulation of autophagy is now well-recognized as increasing the lethality of chemotherapy and radiotherapy against tumors (Kaza *et al.*, 2012). In brain tumors, lower expression of beclin-1 has been shown to correlate with decreased apoptosis and increased cell proliferation (Kaza *et al.*, 2012). It is clear that autophagy can act both to enhance and to combat tumor metastasis, depending on both the type of tumor and the specific stage of metastasis (Su *et al.*, 2015).

Resistance to current treatments for brain cancer

Brain cancers, most prominently glioblastoma multiforme, are amongst the most lethal forms of cancer (Persano *et al.*, 2013). Despite decades of research into combatting these diseases, the mortality rate has changed little, largely due to the evolution of a chemoresistance phenotype within the tumors. A number of different mechanisms have been shown to underlie cancer chemoresistance, encompassing different aspects of cell physiology (Housman *et al.*, 2014). Some of these

mechanisms involve inactivation of the drug by chemical modification (or blocking of modifications required to activate the drug), removal of the drug from the cancer cells by active efflux across the cell membrane, or alteration of the drug target itself. Other mechanisms involve repair of the damage induced into the cell's DNA, usually by alkylating agents or platinum, or inhibition of cell death through modulation of apoptosis or autophagy. The extremely unfavorable prognosis for patients suffering from glioblastomas has been strongly correlated to inefficient targeting of their intrinsic apoptosis resistance phenotype (Pratt *et al.*, 2012).

The diffuse infiltrative phenotype of gliomas within the normal brain tissue of patients (Stewart, 2002), combined with the recently reported presence of glioma-initiating cells, are believed to be conditions that favor the initiation and recurrence of glioblastoma (Zhuang *et al.*, 2011). Autophagy was shown to play an essential role in the regulation of tumorigenic potential glioma-initiating cells (Zhuang *et al.*, 2011). Given that groups currently defining staging for neoplasms assess and incorporate measures of the presence of apoptosis, autophagy, and necrosis (Demaria *et al.*, 2010), this suggests autophagy could be considered as a promising therapeutic target for specifically-defined subsets of glioblastomas.

EXTRACELLULAR MATRIX DEGRADATION AND MATRIX METALLOPROTEINASES : A LINK TO THE CHEMORESISTANCE PHENOTYPE

One of the most important biological processes governing a cell's destiny for growth or death is its interaction with the extracellular matrix (ECM). This chapter describes the evidence for HA/CD44v3-mediated activation of the cytoskeleton (e.g., ankyrin and GTPases) and matrix metalloproteinase (MMP) signaling during tumor progression. Interestingly, the protein digestion products produced by MMPs can also stimulate autophagy by inducing ECM detachment and rearrangement (Lock and Debnath, 2008). Even though the mechanisms are not fully understood, recent findings showed that loss of β 1-integrin, EGFR and FAK promotes both autophagy and ECM detachment (Reginato *et al.*, 2003; Gan *et al.*, 2006; Fung *et al.*, 2008). Decorin, the most studied proteoglycan, was further shown to exhibit important functions in both ECM reorganization and induction of autophagy, including EGFR downregulation (Wei *et al.*, 2013). Other members of the proteoglycan family such as endorepellin, syndecans, glypicans, collagens IV and VI and endostatin are also involved in the ECM remodelling, but their role in autophagy is still under investigation (Iozzo and Sanderson, 2011; Neill *et al.*, 2014). Moreover, in normal cells, ECM detachment leads to a specific form of apoptotic cell death called anoikis (Gilmore, 2005). On the other hand, brain cancer cells have the ability to resist anoikis by promoting both autophagy and metastasis (Kenific *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011). Since the mechanisms that link autophagy (and resistance to anoikis) to the

resistance phenotype are not fully understood, it is possible that part of the answer is the involvement of MMPs, which are known to cleave important ECM molecules, like proteoglycans, integrins and adhesion proteins (Taraboletti *et al.*, 2002; Conant *et al.*, 2010; Kesanakurti *et al.*, 2012; Manon-Jensen *et al.*, 2013).

Matrix metalloproteinases

Matrix metalloproteinases (MMPs) are the best-known group of proteolytic enzymes that affect the ECM and they are also the main group of regulating proteases (Theocharis *et al.*, 2014). The MMPs are proteins, produced by 23 human genes, which are related on the basis of structural similarity and function. They *i)* all bind a zinc ion, *ii)* have an initial, latent conformation but are converted to an active conformation following protease activation, *iii)* are inhibited by one or more of the Tissue Inhibitors of MMPs (TIMPs), *iv)* can digest at least one of the ECM proteins and *v)* bear strongly conserved amino acid sequences within their catalytic domains (Andreini *et al.*, 2004). The MMPs are best known for digesting a wide variety of the structural proteins which comprise the ECM, but are also able to digest many other proteins, extending the physiological utility of these proteins. Remodelling of the ECM is one of the principal steps in cancer metastasis and it relies on the activities of proteolytic enzymes for the digestion of the structural proteins and proteoglycans, which explains the different combinations of MMPs expressed in all cells.

Most of the MMPs are soluble proteins, with a highly conserved structure bearing four domains (Bode *et al.*, 1999). The majority bear an N-terminal signal

sequence to enable secretion across the cell membrane, followed by a propeptide domain that may or may not end in a furin cleavage site. The propeptide domain forms a fold which effectively covers the next domain, a catalytic protease domain with strong sequence conservation, containing the zinc binding site. Following the catalytic domain is a hinge region which is usually followed by the last common domain, containing four hemopexin-like repeats, that appears to function in substrate binding to the MMP. The latent, inactive conformation is generally maintained by a cysteine switch sequence in the propeptide region which binds to the zinc ion. After the enzyme has been released as a zymogen, it is activated via proteolysis by other proteases, such as other MMP molecules. The proteolytic activity of MMPs on non-matrix substrates has been shown to cause activation or inactivation of a broad host of signalling molecules, such as chemokines, cytokines and growth factors (Nissinen and Kähäri, 2014). Table 1 lists the nature of the various human MMPs and describes whether their level of expression has been shown to be correlated with autophagy, along with a description of the cell lines or tissues in which the work was performed. It should be noted that high levels of MMPs have been described in tumours of the central nervous system (Forsyth *et al.*, 1999).

Despite the involvement of many MMPs in autophagy, we have voluntarily next concentrated our efforts on the membrane-bound members of this family (MT-MMPs) due to their roles in the modulation of cell signalling; four of these proteins (MMP-14, MMP-15, MMP-16 and MMP-24) contain transmembrane domains and

we have focussed on MMP-14 (MT1-MMP), which is the best-characterized of this class.

MEMBRANE TYPE-1 MATRIX METALLOPROTEINASE

A role for MT1-MMP as an intracellular transducer of autophagy

The Membrane Type-1 MMP (MT1-MMP) is expressed in most tissues and has wide substrate specificity, encompassing many of the proteins found in the ECM. MT1-MMP knockout mice exhibit dysfunctional connective tissue metabolism and abnormal development of teeth and lungs. The complex significance of MT1-MMP in cancer can be seen in that glioma-associated microglia have been shown to induce and exploit MT1-MMP expression for tumor expansion, whereas MT1-MMP overexpression in glioma cells was lethal (Markovic *et al.*, 2009). While this significance may historically be due to its well-known role in the activation of proMMP-2 and its intrinsic proteolytic activity ECM molecules, many other new functions have been assigned to MT1-MMP. Recent roles of MT1-MMP have been shown for bioactive lysophospholipid signaling (Annabi *et al.*, 2009a), nuclear factor-kappa B (NF- κ B)-mediated cyclooxygenase (COX)-2 regulation (Han *et al.*, 2001; Annabi *et al.*, 2009b; Sina *et al.*, 2010), radioresistance in both glioma (Wild-Bode *et al.*, 2001; Wick *et al.*, 2002) and endothelial cells (Annabi *et al.*, 2003a), and as a cell death sensor/effector (Belkaid *et al.*, 2007; Currie *et al.*, 2007; Proulx-Bonneau *et al.*, 2011a). While a role for MMPs in autophagic cell death has been suggested

(Augustin *et al.*, 2009), the exact mechanisms involved and their biological significance remain largely unexplained.

Physiological inducers of MT1-MMP: Hypoxia / inflammation

MT1-MMP is among the biomarkers shown to trigger both apoptotic and autophagic signaling events (Annabi *et al.*, 2003c; Markovic *et al.*, 2009; Pratt *et al.*, 2012). Given the recent link between endoplasmic reticulum (ER) stress, apoptosis and autophagy (Schleicher *et al.*, 2010; Benbrook and Long, 2012), MT1-MMP's intracellular signaling roles become even more relevant since ER stress was also found to be induced in glioblastoma cells overexpressing MT1-MMP (Proulx-Bonneau *et al.*, 2011b). Finally, exploiting the altered metabolism that characterizes brain tumor cells (Wolf *et al.*, 2010; Galeffi and Turner, 2012), MT1-MMP was found to transcriptionally downregulate the expression of a microsomal glucose-6-phosphate transporter, whose elevated expression in glioblastoma controls cell survival (Belkaid *et al.*, 2006), and whose downregulation in cells overexpressing MT1-MMP triggered cell death (Belkaid *et al.*, 2007). In fact, glucose-6-phosphate transporter was recently suggested to act as a key regulator functioning at the autophagy initiation step (Ahn *et al.*, 2015). MT1-MMP activity is physiologically controlled by a number of stressors, including hypoxia and inflammation.

Pharmacological inducers of MT1-MMP : Concanavalin-A / Cytochalasin-D

When using *in vitro* experimental settings, a more practical approach to mimic

such stressors is to use pharmacological means such as exposure to Concanavalin-A (Con-A) or to Cytochalasin-D (Cyto-D). Given that Con-A and Cyto-D are able to induce MT1-MMP expression (Sina *et al.*, 2010), it should be possible to envision that therapeutic targeting of the body's MT1-MMP activity would complement cancer treatment. Since Con-A is known to induce autophagic cell death in many types of cancer, lectin-induced autophagy is therefore one such potential therapeutic avenue (Lei and Chang, 2009). The intracellular events involved in MT1-MMP signal transduction are currently under heavy investigation. MT1-MMP's intracellular domain-mediated signaling triggers events that lead to phosphorylation of numerous signaling intermediates including signal transducer and activator of transcription 3 (Zgheib *et al.*, 2013), extracellular signal-regulated kinase (Gingras *et al.*, 2001), and NF- κ B (Sina *et al.*, 2010), as well as inducing the expression of RhoA (Annabi *et al.*, 2005). It is not known whether these activities require intracellular binding partners to interact with the 20 amino acid intracellular domain of MT1-MMP. However, numerous MT1-MMP cytoplasmic domain binding proteins have been identified, such as the μ 2 subunit of adapter protein 2, gC1qR, p130Cas, MTCBP-1 and the phosphorylated form of caveolin-1 (Annabi *et al.*, 2002; Lei and Chang, 2007; Shingu *et al.*, 2009; Brahimi-Horn *et al.*, 2011; Kaza *et al.*, 2012). The cytoplasmic domain of MT1-MMP was further demonstrated to ultimately promote the invasion activity of MT1-MMP by preventing its internalization (Annabi *et al.*, 2002). It remains unknown whether any of the above-mentioned MT1-MMP intracellular binding intermediates are involved in autophagy regulation or in autophagy

biomarkers induction.

Given the high level of sequence identity between the transmembrane and cytoplasmic regions of the four membrane-type MMPs (see Fig. C.1), it is tempting to speculate that the remaining three such proteins demonstrate autophagy-related activities similar to MT1-MMP. However, we do not know of any investigations which have been carried out with these proteins.

DISCUSSION

Targeting autophagy to fight cancer

Current conventional cancer therapies fail to mediate their effects in a target-specific fashion (Quant *et al.*, 2010; Sampson *et al.*, 2011). One reason is that the extremely unfavorable prognosis for patients suffering from glioblastomas strongly correlated to inefficient targeting of their intrinsic apoptosis resistance phenotype. Aside from apoptosis-based therapies, induction of autophagic cell death is an alternate and emerging concept to trigger glioma cell death and to exploit caspase-independent programmed cell death pathways for the development of novel glioma therapies (Kögel *et al.*, 2010). Induction of autophagic cell death may therefore help stop tumour development and optimize cancer treatment modalities (Ceteci *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012). Interestingly, the clinically approved antibiotic minocycline, a highly lipid-soluble antibacterial known for its ability to cross the blood-brain barrier, is a promising new candidate for adjuvant therapy against malignant gliomas since it reduces MT1-MMP expression (Markovic *et al.*,

2009). More importantly, minocycline effectively inhibited tumor growth and induced autophagy in a xenograft tumor model of C6 glioma cells (Liu *et al.*, 2011b) though it is unknown whether MT1-MMP is involved in this.

While the specific roles of MMP in autophagy still remain to be unraveled, chemical modulators of autophagy such as the selective MMP-2 inhibitor ARP101 (Jo *et al.*, 2011), seem to offer some potential for treatment of these diseases although the precise molecular mechanism of action remains unknown. Interestingly, it was recently reported that the molecular mechanism of action of Brefeldin-A, another well-known autophagy regulator, operates through sequestration of MT1-MMP and induction of endoplasmic reticulum (ER) stress (Proulx-Bonneau *et al.*, 2011b). This new role of a membrane-bound MMP in transducing Brefeldin-induced ER stress signalling is supported by emerging data which indicates that ER stress is also a potent inducer of macroautophagy (Matuset *et al.*, 2008; Yin *et al.*, 2012). It is currently unclear whether this process enhances cell survival or commits cells to non-apoptotic death (Høyer-Hansen and Jäättelä, 2007).

In cancer cells, induction of autophagy serves as an adaptive response that can lead to chemoresistance mechanisms and increased cell survival (Reuter *et al.*, 2010), features also associated with high cellular MT1-MMP levels (Trog *et al.*, 2006). Thus, the inhibition of autophagy combined with inducers of metabolic stress or chemotherapeutic agents could enhance effective anticancer therapy by inhibiting stress adaptation and increasing cell killing. Pharmacological approaches have demonstrated that diet-derived EGCG, a polyphenol shown to trigger autophagy (Li

et al., 2011) and to sensitize cells to radiation (McLaughlin *et al.*, 2006), as well as mTOR inhibitors such as rapamycin, can be used to increase the radiosensitivity of glioblastoma cells by the induction of autophagy (Zhuang *et al.*, 2009). In support of a possible role for MT1-MMP in intracellular transduction events regulation, rapamycin was recently shown to upregulate MT1-MMP expression in PTEN(+/-) cells via PI3K activity (Kim *et al.*, 2010). Tumor suppressors like Beclin-1, PTEN and p53 are also crucial players in the induction and regulation of autophagy (Liu *et al.*, 2011a).

Pharmacological targeting of MT1-MMP

Affecting MT1-MMP might also be possible by targeting proteins which interact with this proteinase, such as BNIP3. BNIP3 is an atypical representative of the Bcl-2 protein family and a regulator of non-apoptotic programmed cell death (Swoboda and Strzadala, 2009), which was demonstrated to interact with LC3 and to promote autophagy of both mitochondria and endoplasmic reticulum (Hanna *et al.*, 2012) as well as to participate in the activation of autophagy by mediating 6-thioguanine and 5-fluorouracil-induced autophagy (Zeng and Kinsella, 2010). BNIP3 expression correlates with the induction of acidic vesicular organelles both by ConA and directly upon MT1-MMP overexpression, suggesting that BNIP3 expression may serve as an autophagy biomarker consequent to MT1-MMP-mediated signaling in glioblastoma cells. Accordingly, BNIP3 expression levels are correlated with a signaling cascade in which MT1-MMP is a major contributor and which requires

phosphorylation of STAT3. Interestingly, increased JAK2/STAT3 signaling was also correlated with increased apoptosis through upregulation of BNIP3 gene expression (Bulcao *et al.*, 2010). Further support that MT1-MMP affects BNIP3 expression was demonstrated when upregulation of BNIP3 and of autophagy-related gene members ATG3, ATG12 and ATG16-L1 expression in ConA-treated U87 cells were reversed when MT1-MMP gene expression was silenced (Pratt *et al.*, 2012). Finally, the pharmacological JAK inhibitors AG490 and Tofacitinib confirmed the requirement for JAK2 in the induction of BNIP3; whether any recruitment and/or interaction between JAK2 and MT1-MMP are required remains unknown. There is a mandatory requirement for the cytoplasmic domain of MT1-MMP in the induction of BNIP3, although whether this structural requirement involves recruitment and/or interaction with specific intracellular intermediates is currently unknown.

Given the recent report that BNIP3 acts as transcriptional repressor of apoptosis-inducing factor expression and prevents cell death in human malignant gliomas (Burton *et al.*, 2009), this links the possible contribution of MT1-MMP to the radioresistance and chemotherapeutic resistance index of brain tumours. BNIP3 is expressed at high levels in solid tumors, including glioblastoma, where its nuclear location is believed to confer a survival advantage to glioma cells (Burton *et al.*, 2006). BNIP3 up-regulation under hypoxic conditions by the transcription factor HIF-1 remains open for debate (Namas *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2012), but was demonstrated to locate within hypoxic regions of tumors (Sowter *et al.*, 2001). Given MT1-MMP's demonstrated role in hypoxia-regulated events (Proulx-Bonneau and

Annabi, 2011; Proulx-Bonneau *et al.*, 2011a), it is tempting to assume similar events taking place in the MT1-MMP-mediated regulation of BNIP3 in autophagy.

The development of therapeutic strategies targeting the transducing events mediated by MT1-MMP's intracellular domain can also be envisioned. Structure-function studies have already confirmed that MT1-MMP induces the expression of biomarkers such as cyclooxygenase-2 in inflammation (Annabi *et al.*, 2009b; Proulx-Bonneau *et al.*, 2011b), BNIP3 in autophagy (Pratt *et al.*, 2012), endothelial tubulogenesis (Pilorget *et al.*, 2005) and apoptosis (Belkaid *et al.*, 2007). ConA was also confirmed to trigger autophagy (Lei and Chang, 2007) and to, in part, require MT1-MMP-mediated signaling; inhibition of the intracellular domain Tyr573 phosphorylation of MT1-MMP by either genistein (Li *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 1997) or through site-directed mutagenesis (Zgheib *et al.*, 2013), inhibited ConA-induced autophagy. The ConA-induced signaling cascades, in which MT1-MMP serves as an intermediate, were also recently found to be triggered and highlighted a role for transcription factors including NF- κ B (Sina *et al.*, 2010), STAT3 (Akla *et al.*, 2012) and HIF-1 α (Proulx-Bonneau *et al.*, 2011a). Pharmacological strategies targeting MT1-MMP functions have used tetra- and hexavalent mannosides, which inhibit the pro-apoptotic effects of ConA (Fortier *et al.*, 2008), and epigallocatechin-3-gallate which inhibits the expression of colony-stimulating factors-2 and -3 (Zgheib *et al.*, 2013). Whether these agents also modulate MT1-MMP-mediated autophagy remains to be seen. Finally, gene silencing of p130cas, another MT1-MMP interacting partner in endothelial cells (Gingras *et al.*, 2008) whose expression is associated with poor

clinical outcome in human ovarian carcinoma (Nick *et al.*, 2011), decreased tumor growth through stimulation of combined apoptotic and autophagic cell death (Nick *et al.*, 2011).

A role for MTCBP-1 in autophagy ?

One protein with an important relationship to MT1-MMP is MTCBP-1; there is increased MT1-MMP expression in high grade tumors but increased MTCBP-1 expression in low grade tumors. In addition, we have shown that MTCBP-1 binds directly to the intracellular domain of MT1-MMP and presumably mediates some of the interactions between MT1-MMP and the signalling mechanisms known to be affected by MT1-MMP, thereby regulating the intracellular function of MT1-MMP-mediated autophagy (Pratt *et al.*, 2015). MTCBP-1 abrogates the MT1-MMP-mediated signaling that triggers autophagy, suggesting that high grade brain tumors may possibly exhibit unregulated MT1-MMP-mediated autophagy processes that enable these cancers to escape the cell death-inducing therapeutic modalities that trigger, in part, cell autophagy. Since cellular stresses such as hypoxia induce both autophagy (Brahimi-Horn *et al.*, 2011) and MT1-MMP (Annabi *et al.*, 2003b; Proulx-Bonneau *et al.*, 2011a), these adaptive mechanisms may help established tumors to survive (Eskelinen, 2011). Beyond the evidence that MT1-MMP shows both pro-apoptotic and pro-autophagic transducing properties, we have shown that MTCBP-1, in addition to inhibiting MT1-MMP-mediated cell invasion (Uekita *et al.*, 2004), abrogated MT1-MMP's ability to trigger autophagy. Given that MTCBP-1 expression

is low in highly invasive tumors, this observation strengthens the concept that high grade brain tumors possess cell death-escaping properties, possibly through dysregulated autophagy. Supporting this, an oligonucleotide microarray of metastasis-related genes in genistein-treated HCC1395 breast cancer cells demonstrated upregulated MTCBP-1 expression (Lee *et al.*, 2007).

The resistance to apoptotic cell death, a hallmark of most cancers, has driven the search for novel targets in cancer therapy. The autophagy pathway is one such target currently being explored in multiple cancers including gliomas, and is a promising avenue for further therapeutic development (Kaza *et al.*, 2012). Better understanding of autophagy regulation and of autophagy-inducing mechanisms is therefore an emerging area of interest in brain cancer research. Given that progression of astrocytic tumors into more aggressive and chemoresistant phenotypes is partly related to their decreased autophagic capacity (Huang *et al.*, 2010), appropriate modulation of autophagy may therefore sensitize tumor cells to anticancer therapy (Shingu *et al.*, 2009).

In conclusion, the signaling balance involved in the modulation of the autophagy index seems crucial in dictating survival or death for cells during metabolic adaptation and tumor progression. The MT1-MMP-to-MTCBP-1 expression ratio may be one of these dichotomous processes. Although we cannot exclude the contribution of potential third partners, FRET analysis data indicates the molecular proximity of MTCBP-1 and MT1-MMP intracellular domain at distances ranging from 10-100 Å while SPR analysis data indicates specific interaction

between MTCBP-1 and the intracellular MT1-MMP domain. We believe that identification and functional characterization of intracellular MT1-MMP binding partners, such as MTCBP-1, may enable the development of future therapeutic strategies aimed at exploiting intracellular MT1-MMP transducing functions which contribute to the invasive and chemoresistant phenotype of glioblastoma.

ABBREVIATIONS

ECM, Extracellular matrix; MMP, Matrix metalloproteinase, MT1-MMP, Membrane type-1 MMP, MTCBP-1, MT1-MMP cytoplasmic binding protein-1, CNS, Central nervous system; HIF-1, Hypoxia inducible factor-1; AMPK, Adenosin monophosphate kinase; TLR, Toll-like receptors; mTOR, mammalian target of rapamycin; ROS, Reactive oxygen species; DNA, Desoxyribonucleic acid; DAMP, Damage-associated molecular pattern; ATP, Adenosin triphosphate; PTEN, Phosphatase and Tensin homolog; AKT, Protein kinase B; DRAM, Damage regulated modulator of autophagy; EGFR, Epidermal growth factor receptor; FAK, Focal adhesion kinase; TIMP, Tissue inhibitor of metalloproteinase; NF- κ B, Nuclear factor kappa B; COX-2, Cyclooxygenase 2; ER, Endoplasmic reticulum; Con-A, Concanavalin-A; Cyto-D, Cytochalasin-D; RhoA, Rho GTPase; gC1qR, Receptor for the globular heads of C1q; p130Cas, Breast cancer anti-estrogen resistance protein 1; ARP101, Inhibitor of MMP-2; EGCG, Epigallocatechin 3-Gallate; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; p53, Tumor protein p53; BNIP3, BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3; Bcl-2, B-cell lymphoma 2; LC3, Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3; JAK2, Janus Kinase 2; STAT3, Signal transducer and activator of transcription 3; ATG, Autophagy related gene; AG490, Tyrphostin (Inhibitor of JAK2); Tyr573, Tyrosine in position 573; FRET, Fluorescence resonance energy transfer; Å, Angstrom; SPR, Surface plasmon resonance; p-70S6K, p-70S6 ribosomal kinase; p62, Nucleoporin p62 complex

REFERENCES

- Ahn HH, Oh Y, Lee H, Lee W, Chang JW, Pyo HK, Nah DH, and Jung YK. 2015. Identification of glucose-6-phosphate transporter as a key regulator functioning at the autophagy initiation step. FEBS Lett.5793: (15)00394-4.
- Akla, N., Pratt, J., and Annabi, B. 2012. Concanavalin-A triggers inflammatory response through JAK/STAT3 signalling and modulates MT1-MMP regulation of COX-2 in mesenchymal stromal cells. Exp. Cell Res.318: 2498–2506.
- Andreini, C., Banci, L., Bertini, I., Luchinat, C., and Rosato, A. 2004. Bioinformatic comparison of structures and homology-models of matrix metalloproteinases. J. Proteome Res.3: 21–31.
- Annabi, B., Bouzegrane, M., Moumdjian, R., Moghrabi, A., and Béliveau, R. 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.
- Annabi, B., Lachambre, M.P., Bousquet-Gagnon, N., Page, M., Gingras, D., and Beliveau, R. 2002. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin 3-gallate inhibits MMP-2 secretion and MT1-MMP-driven migration in glioblastoma cells. Biochim. Biophys. Acta1542: 209–220.
- Annabi, B., Lachambre, M.-P., Plouffe, K., Sartelet, H., and Béliveau, R. 2009a. Modulation of invasive properties of CD133+ glioblastoma stem cells: a role

- for MT1-MMP in bioactive lysophospholipid signaling. Mol. Carcinog.48: 910–919.
- Annabi, B., Laflamme, C., Sina, A., Lachambre, M.-P., and Béliveau, R. 2009b. A MT1-MMP/NF-kappaB signaling axis as a checkpoint controller of COX-2 expression in CD133+ U87 glioblastoma cells. J. Neuroinflammation6: 8.
- Annabi, B., Lee, Y.-T., Martel, C., Pilorget, A., Bahary, J.-P., and Béliveau, R. 2003a. Radiation induced-tubulogenesis in endothelial cells is antagonized by the antiangiogenic properties of green tea polyphenol (-) epigallocatechin-3-gallate. Cancer Biol. Ther.2: 642–649.
- Annabi, B., Lee, Y.-T., Turcotte, S., Naud, E., Desrosiers, R.R., Champagne, M., Eliopoulos, N., Galipeau, J., and Béliveau, R. 2003b. Hypoxia promotes murine bone-marrow-derived stromal cell migration and tube formation. Stem Cells Dayt. Ohio21: 337–347.
- Annabi, B., Thibeault, S., Lee, Y.-T., Bousquet-Gagnon, N., Eliopoulos, N., Barrette, S., Galipeau, J., and Béliveau, R. 2003c. Matrix metalloproteinase regulation of sphingosine-1-phosphate-induced angiogenic properties of bone marrow stromal cells. Exp. Hematol.31: 640–649.
- Arroyo, D.S., Gaviglio, E.A., Peralta-Ramos, J.M., Bussi, C., Rodriguez-Galan, M.C., and Iribarren, P. 2014. Autophagy in inflammation, infection, neurodegeneration and cancer. Int. Immunopharmacol.18: 55–65.
- Augustin, S., Berard, M., Kellaf, S., Peyri, N., Fauvel-Lafève, F., Legrand, C., He, L., and Crépin, M. 2009. Matrix metalloproteinases are involved in both type I

(apoptosis) and type II (autophagy) cell death induced by sodium phenylacetate in MDA-MB-231 breast tumour cells. Anticancer Res.29: 1335–1343.

Ávalos, Y., Canales, J., Bravo-Sagua, R., Criollo, A., Lavandero, S., and Quest, A.F.G. 2014. Tumor suppression and promotion by autophagy. BioMed Res. Int.2014: 603980.

Belkaid, A., Copland, I.B., Massillon, D., and Annabi, B. 2006. Silencing of the human microsomal glucose-6-phosphate translocase induces glioma cell death: potential new anticancer target for curcumin. FEBS Lett.580: 3746–3752.

Belkaid, A., Fortier, S., Cao, J., and Annabi, B. 2007. Necrosis induction in glioblastoma cells reveals a new “bioswitch” function for the MT1-MMP/G6PT signaling axis in proMMP-2 activation versus cell death decision. Neoplasia N. Y. N9: 332–340.

Benbrook, D.M., and Long, A. 2012. Integration of autophagy, proteasomal degradation, unfolded protein response and apoptosis. Exp. Oncol.34: 286–297.

Bhutia, S.K., Mukhopadhyay, S., Sinha, N., Das, D.N., Panda, P.K., Patra, S.K., Maiti, T.K., Mandal, M., Dent, P., Wang, X.-Y., Das, S.K., Sarkar, D., and Fisher, P.B. 2013. Autophagy: Cancer’s Friend or Foe? Adv. Cancer Res.118: 61–95.

- Bode, W., Fernandez-Catalan, C., Tschesche, H., Grams, F., Nagase, H., and Maskos, K. 1999. Structural properties of matrix metalloproteinases. Cell. Mol. Life Sci. CMLS55: 639–652.
- Brahimi-Horn, M.C., Bellot, G., and Pouyssegur, J. 2011. Hypoxia and energetic tumour metabolism. Curr. Opin. Genet. Dev.21: 67–72.
- Bulcao, C.F., D'Souza, K.M., Malhotra, R., Staron, M., Duffy, J.Y., Pandalai, P.K., Jeevanandam, V., and Akhter, S.A. 2010. Activation of JAK-STAT and nitric oxide signaling as a mechanism for donor heart dysfunction. J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.29: 346–351.
- Burton, T.R., Eisenstat, D.D., and Gibson, S.B. 2009. BNIP3 (Bcl-2 19 kDa interacting protein) acts as transcriptional repressor of apoptosis-inducing factor expression preventing cell death in human malignant gliomas. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.29: 4189–4199.
- Burton, T.R., Henson, E.S., Baijal, P., Eisenstat, D.D., and Gibson, S.B. 2006. The pro-cell death Bcl-2 family member, BNIP3, is localized to the nucleus of human glial cells: Implications for glioblastoma multiforme tumor cell survival under hypoxia. Int. J. Cancer J. Int. Cancer118: 1660–1669.
- Caldeira, C., Oliveira, A.F., Cunha, C., Vaz, A.R., Falcão, A.S., Fernandes, A., and Brites, D. 2014. Microglia change from a reactive to an age-like phenotype with the time in culture. Front. Cell. Neurosci.8: 152.
- Ceteci, F., Xu, J., Ceteci, S., Zanucco, E., Thakur, C., and Rapp, U.R. 2011. Conditional expression of oncogenic C-RAF in mouse pulmonary epithelial

- cells reveals differential tumorigenesis and induction of autophagy leading to tumor regression. Neoplasia N. Y. N13: 1005–1018.
- Chen, L., Liu, Q., Huang, Z., Wu, F., Li, Z., Chen, X., and Lin, T. 2012. Tripchlorolide induces cell death in lung cancer cells by autophagy. Int. J. Oncol.40: 1066–1070.
- Conant, K., Wang, Y., Szklarczyk, A., Dudak, A., Mattson, M.P., and Lim, S.T. 2010. Matrix metalloproteinase-dependent shedding of intercellular adhesion molecule-5 occurs with long-term potentiation. Neuroscience166: 508–521.
- Currie, J.-C., Fortier, S., Sina, A., Galipeau, J., Cao, J., and Annabi, B. 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.
- Demaria, S., Pikarsky, E., Karin, M., Coussens, L.M., Chen, Y.-C., El-Omar, E.M., Trinchieri, G., Dubinett, S.M., Mao, J.T., Szabo, E., Krieg, A., Weiner, G.J., Fox, B.A., Coukos, G., Wang, E., Abraham, R.T., Carbone, M., and Lotze, M.T. 2010. Cancer and inflammation: promise for biologic therapy. J. Immunother. Hagerstown Md 199733: 335–351.
- Engelhardt, S., Huang, S.-F., Patkar, S., Gassmann, M., and Ogunshola, O.O. 2015. Differential responses of blood-brain barrier associated cells to hypoxia and ischemia: a comparative study. Fluids Barriers CNS12: 4.
- Eskelinen, E.-L. 2011. The dual role of autophagy in cancer. Curr. Opin. Pharmacol.11: 294–300.

- Forsyth, P.A., Wong, H., Laing, T.D., Rewcastle, N.B., Morris, D.G., Muzik, H., Leco, K.J., Johnston, R.N., Brasher, P.M., Sutherland, G., and Edwards, D.R. 1999. Gelatinase-A (MMP-2), gelatinase-B (MMP-9) and membrane type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) are involved in different aspects of the pathophysiology of malignant gliomas. Br. J. Cancer79: 1828–1835.
- Fortier, S., Touaibia, M., Lord-Dufour, S., Galipeau, J., Roy, R., and Annabi, B. 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. Glycobiology18: 195–204.
- Fung, C., Lock, R., Gao, S., Salas, E., and Debnath, J. 2008. Induction of autophagy during extracellular matrix detachment promotes cell survival. Mol. Biol. Cell19: 797–806.
- Galeffi, F., and Turner, D.A. 2012. Exploiting metabolic differences in glioma therapy. Curr. Drug Discov. Technol.9: 280–293.
- Gallo, P.M., and Gallucci, S. 2013. The dendritic cell response to classic, emerging, and homeostatic danger signals. Implications for autoimmunity. Front. Immunol.4: 138.
- Gan, B., Yoo, Y., and Guan, J.-L. 2006. Association of focal adhesion kinase with tuberous sclerosis complex 2 in the regulation of s6 kinase activation and cell growth. J. Biol. Chem.281: 37321–37329.

- Georgescu, S.P., Aronovitz, M.J., Iovanna, J.L., Patten, R.D., Kyriakis, J.M., and Goruppi, S. 2011. Decreased metalloprotease 9 induction, cardiac fibrosis, and higher autophagy after pressure overload in mice lacking the transcriptional regulator p8. Am. J. Physiol. Cell Physiol.301: C1046–1056.
- Gilmore, A.P. 2005. Anoikis. Cell Death Differ.12 Suppl 2: 1473–1477.
- Gingras, D., Bousquet-Gagnon, N., Langlois, S., Lachambre, M.P., Annabi, B., and Béliveau, R. 2001. Activation of the extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) cascade by membrane-type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP). FEBS Lett.507: 231–236.
- Gingras, D., Michaud, M., Di Tomasso, G., Béliveau, E., Nyalendo, C., and Béliveau, R. 2008. Sphingosine-1-phosphate induces the association of membrane-type 1 matrix metalloproteinase with p130Cas in endothelial cells. FEBS Lett.582: 399–404.
- Girard, B.J., Regan Anderson, T.M., Welch, S.L., Nicely, J., Seewaldt, V.L., and Ostrander, J.H. 2015. Cytoplasmic PELP1 and ERRgamma Protect Human Mammary Epithelial Cells from Tam-Induced Cell Death. PloS One10: e0121206.
- Giuliani, C.M., and Dass, C.R. 2014. Metabolic stress and cancer: is autophagy the common denominator and a feasible target? J. Pharm. Pharmacol.66: 597–614.
- Guo, G.-F., Jiang, W.-Q., Zhang, B., Cai, Y.-C., Xu, R.-H., Chen, X.-X., Wang, F., and Xia, L.-P. 2011. Autophagy-related proteins Beclin-1 and LC3 predict

cetuximab efficacy in advanced colorectal cancer. World J. Gastroenterol. WJG17: 4779–4786.

Hanna, R.A., Quinsay, M.N., Orogo, A.M., Giang, K., Rikka, S., and Gustafsson, Å.B. 2012. Microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) interacts with Bnip3 protein to selectively remove endoplasmic reticulum and mitochondria via autophagy. J. Biol. Chem.287: 19094–19104.

Han, Y.P., Tuan, T.L., Wu, H., Hughes, M., and Garner, W.L. 2001. TNF-alpha stimulates activation of pro-MMP2 in human skin through NF-(kappa)B mediated induction of MT1-MMP. J. Cell Sci.114: 131–139.

Housman, G., Byler, S., Heerboth, S., Lapinska, K., Longacre, M., Snyder, N., and Sarkar, S. 2014. Drug resistance in cancer: an overview. Cancers6: 1769–1792.

Hou, W., Zhang, Q., Yan, Z., Chen, R., Zeh Iii, H.J., Kang, R., Lotze, M.T., and Tang, D. 2013. Strange attractors: DAMPs and autophagy link tumor cell death and immunity. Cell Death Dis.4: e966.

Høyer-Hansen, M., and Jäättelä, M. 2007. Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium. Cell Death Differ.14: 1576–1582.

Huang, X., Bai, H.-M., Chen, L., Li, B., and Lu, Y.-C. 2010. Reduced expression of LC3B-II and Beclin 1 in glioblastoma multiforme indicates a down-regulated autophagic capacity that relates to the progression of astrocytic tumors. J. Clin. Neurosci. Off. J. Neurosurg. Soc. Australas.17: 1515–1519.

- Hui, W., Young, D.A., Rowan, A.D., Xu, X., Cawston, T.E., and Proctor, C.J. 2014. Oxidative changes and signalling pathways are pivotal in initiating age-related changes in articular cartilage. Ann. Rheum. Dis., doi: 10.1136/annrheumdis-2014-206295.
- Iozzo, R.V., and Sanderson, R.D. 2011. Proteoglycans in cancer biology, tumour microenvironment and angiogenesis. J. Cell. Mol. Med.15: 1013–1031.
- Jara, P., Calyeca, J., Romero, Y., Plácido, L., Yu, G., Kaminski, N., Maldonado, V., Cisneros, J., Selman, M., and Pardo, A. 2015. Matrix metalloproteinase (MMP)-19-deficient fibroblasts display a profibrotic phenotype. Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.308: L511–522.
- Jiang, L., Jin, Y., Wang, H., Jiang, Y., and Dong, J. 2014. Glucosamine protects nucleus pulposus cells and induces autophagy via the mTOR-dependent pathway. J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.32: 1532–1542.
- Jo, Y.K., Park, S.J., Shin, J.H., Kim, Y., Hwang, J.J., Cho, D.-H., and Kim, J.C. 2011. ARP101, a selective MMP-2 inhibitor, induces autophagy-associated cell death in cancer cells. Biochem. Biophys. Res. Commun.404: 1039–1043.
- Kaza, N., Kohli, L., and Roth, K.A. 2012. Autophagy in brain tumors: a new target for therapeutic intervention. Brain Pathol. Zurich Switz.22: 89–98.
- Kenific, C.M., Thorburn, A., and Debnath, J. 2010. Autophagy and metastasis: another double-edged sword. Curr. Opin. Cell Biol.22: 241–245.
- Kesanakurti, D., Chetty, C., Rajasekhar Maddirela, D., Gujrati, M., and Rao, J.S. 2012. Functional cooperativity by direct interaction between PAK4 and

MMP-2 in the regulation of anoikis resistance, migration and invasion in glioma. Cell Death Dis.3: e445.

- Kim, S., Huang, W., Mottillo, E.P., Sohail, A., Ham, Y.-A., Conley-Lacomb, M.K., Kim, C.J., Tzivion, G., Kim, H.-R.C., Wang, S., Chen, Y.Q., and Fridman, R. 2010. Posttranslational regulation of membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) in mouse PTEN null prostate cancer cells: Enhanced surface expression and differential O-glycosylation of MT1-MMP. Biochim. Biophys. Acta1803: 1287–1297.
- Kögel, D., Fulda, S., and Mittelbronn, M. 2010. Therapeutic exploitation of apoptosis and autophagy for glioblastoma. Anticancer Agents Med. Chem.10: 438–449.
- Lee, J.-H., Jang, E.J., Seo, H.L., Ku, S.K., Lee, J.R., Shin, S.S., Park, S.-D., Kim, S.C., and Kim, Y.W. 2014. Sauchinone attenuates liver fibrosis and hepatic stellate cell activation through TGF- β /Smad signaling pathway. Chem. Biol. Interact.224C: 58–67.
- Lee, W.-Y., Huang, S.-C., Tzeng, C.-C., Chang, T.-L., and Hsu, K.-F. 2007. Alterations of metastasis-related genes identified using an oligonucleotide microarray of genistein-treated HCC1395 breast cancer cells. Nutr. Cancer58: 239–246.
- Lei, H.-Y., and Chang, C.-P. 2007. Induction of autophagy by concanavalin A and its application in anti-tumor therapy. Autophagy3: 402–404.
- Lei, H.-Y., and Chang, C.-P. 2009. Lectin of Concanavalin A as an anti-hepatoma therapeutic agent. J. Biomed. Sci.16: 10.

- Li, J., Yang, B., Zhou, Q., Wu, Y., Shang, D., Guo, Y., Song, Z., Zheng, Q., and Xiong, J. 2013. Autophagy promotes hepatocellular carcinoma cell invasion through activation of epithelial-mesenchymal transition. Carcinogenesis34: 1343–1351.
- Li, L., Akers, K., Eisen, A.Z., and Seltzer, J.L. 1997. Activation of gelatinase A (72-kDa type IV collagenase) induced by monensin in normal human fibroblasts. Exp. Cell Res.232: 322–330.
- Liou, G.-Y., and Storz, P. 2010. Reactive oxygen species in cancer. Free Radic. Res.44: 479–496.
- Liu, J., Lin, M., Yu, J., Liu, B., and Bao, J. 2011a. Targeting apoptotic and autophagic pathways for cancer therapeutics. Cancer Lett.300: 105–114.
- Liu, W.-T., Lin, C.-H., Hsiao, M., and Gean, P.-W. 2011b. Minocycline inhibits the growth of glioma by inducing autophagy. Autophagy7: 166–175.
- Li, W., Zhu, S., Li, J., Assa, A., Jundoria, A., Xu, J., Fan, S., Eissa, N.T., Tracey, K.J., Sama, A.E., and Wang, H. 2011. EGCG stimulates autophagy and reduces cytoplasmic HMGB1 levels in endotoxin-stimulated macrophages. Biochem. Pharmacol.81: 1152–1163.
- Li, X.-F., Chen, D.-P., Ouyang, F.-Z., Chen, M.-M., Wu, Y., Kuang, D.-M., and Zheng, L. 2015. Increased autophagy sustains the survival and pro-tumourigenic effects of neutrophils in human hepatocellular carcinoma. J. Hepatol.62: 131–139.

- Lock, R., and Debnath, J. 2008. Extracellular matrix regulation of autophagy. Curr. Opin. Cell Biol.20: 583–588.
- Lu, D.-Y., Liou, H.-C., Tang, C.-H., and Fu, W.-M. 2006. Hypoxia-induced iNOS expression in microglia is regulated by the PI3-kinase/Akt/mTOR signaling pathway and activation of hypoxia inducible factor-1alpha. Biochem. Pharmacol.72: 992–1000.
- Mah, L.Y., and Ryan, K.M. 2012. Autophagy and Cancer. Cold Spring Harb. Perspect. Biol.4.
- Manon-Jensen, T., Multhaupt, H.A.B., and Couchman, J.R. 2013. Mapping of matrix metalloproteinase cleavage sites on syndecan-1 and syndecan-4 ectodomains. FEBS J.280: 2320–2331.
- Markovic, D.S., Vinnakota, K., Chirasani, S., Synowitz, M., Raguet, H., Stock, K., Sliwa, M., Lehmann, S., Kälin, R., van Rooijen, N., Holmbeck, K., Heppner, F.L., Kiwit, J., Matyash, V., Lehnardt, S., Kaminska, B., Glass, R., and Kettenmann, H. 2009. Gliomas induce and exploit microglial MT1-MMP expression for tumor expansion. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.106: 12530–12535.
- Mathew, R., and White, E. 2011. Autophagy in tumorigenesis and energy metabolism: friend by day, foe by night. Curr. Opin. Genet. Dev.21: 113–119.
- Matus, S., Lisbona, F., Torres, M., León, C., Thielen, P., and Hetz, C. 2008. The stress rheostat: an interplay between the unfolded protein response (UPR) and autophagy in neurodegeneration. Curr. Mol. Med.8: 157–172.

- McLaughlin, N., Annabi, B., Lachambre, M.-P., Kim, K.S., Bahary, J.-P., Moudjian, R., and Béliveau, R. 2006. Combined low dose ionizing radiation and green tea-derived epigallocatechin-3-gallate treatment induces human brain endothelial cells death. J. Neurooncol.80: 111–121.
- Namas, R.A., Metukuri, M.R., Dhupar, R., Velosa, C., Jefferson, B.S., Myer, E., Constantine, G.M., Billiar, T.R., Vodovotz, Y., and Zamora, R. 2011. Hypoxia-induced overexpression of BNIP3 is not dependent on hypoxia-inducible factor 1 α in mouse hepatocytes. Shock Augusta Ga36: 196–202.
- Neill, T., Schaefer, L., and Iozzo, R.V. 2014. Instructive roles of extracellular matrix on autophagy. Am. J. Pathol.184: 2146–2153.
- Nick, A.M., Stone, R.L., Armaiz-Pena, G., Ozpolat, B., Tekedereli, I., Graybill, W.S., Landen, C.N., Villares, G., Vivas-Mejia, P., Bottsford-Miller, J., Kim, H.S., Lee, J.-S., Kim, S.M., Baggerly, K.A., Ram, P.T., Deavers, M.T., Coleman, R.L., Lopez-Berestein, G., and Sood, A.K. 2011. Silencing of p130cas in ovarian carcinoma: a novel mechanism for tumor cell death. J. Natl. Cancer Inst.103: 1596–1612.
- Nissinen, L., and Kähäri, V.-M. 2014. Matrix metalloproteinases in inflammation. Biochim. Biophys. Acta1840: 2571–2580.
- Ozeki, N., Hase, N., Hiyama, T., Yamaguchi, H., Kawai, R., Kondo, A., Matsumoto, T., Nakata, K., and Mogi, M. 2015. Interleukin-1 β -induced autophagy-related gene 5 regulates proliferation of embryonic stem cell-derived odontoblastic cells. PloS One10: e0124542.

- Persano, L., Rampazzo, E., Basso, G., and Viola, G. 2013. Glioblastoma cancer stem cells: role of the microenvironment and therapeutic targeting. Biochem. Pharmacol.85: 612–622.
- Pilorget, A., Annabi, B., Bouzeghrane, F., Marvaldi, J., Luis, J., and Béliveau, R. 2005. Inhibition of angiogenic properties of brain endothelial cells by platelet-derived sphingosine-1-phosphate. J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.25: 1171–1182.
- Pratt, J., and Annabi, B. 2014. Induction of autophagy biomarker BNIP3 requires a JAK2/STAT3 and MT1-MMP signaling interplay in Concanavalin-A-activated U87 glioblastoma cells. Cell. Signal.26: 917–924.
- Pratt, J., Iddir, M., Bourgault, S., and Annabi, B. 2015. Evidence of MTCBP-1 interaction with the cytoplasmic domain of MT1-MMP: Implications in the autophagy cell index of high-grade glioblastoma. Mol. Carcinog., doi: 10.1002/mc.22264.
- Pratt, J., Roy, R., and Annabi, B. 2012. Concanavalin-A-induced autophagy biomarkers requires membrane type-1 matrix metalloproteinase intracellular signaling in glioblastoma cells. Glycobiology22: 1245–1255.
- Proulx-Bonneau, S., and Annabi, B. 2011. The primary cilium as a biomarker in the hypoxic adaptation of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells: a role for the secreted frizzled-related proteins. Biomark. Insights6: 107–118.

- Proulx-Bonneau, S., Guezguez, A., and Annabi, B. 2011a. A concerted HIF-1 α /MT1-MMP signalling axis regulates the expression of the 3BP2 adaptor protein in hypoxic mesenchymal stromal cells. *PloS One*6: e21511.
- Proulx-Bonneau, S., Pratt, J., and Annabi, B. 2011b. A role for MT1-MMP as a cell death sensor/effector through the regulation of endoplasmic reticulum stress in U87 glioblastoma cells. *J. Neurooncol.*104: 33–43.
- Qipshidze, N., Tyagi, N., Metreveli, N., Lominadze, D., and Tyagi, S.C. 2012. Autophagy mechanism of right ventricular remodeling in murine model of pulmonary artery constriction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*302: H688–696.
- Quant, E.C., Drappatz, J., Wen, P.Y., and Norden, A.D. 2010. Recurrent high-grade glioma. *Curr. Treat. Options Neurol.*12: 321–333.
- Reginato, M.J., Mills, K.R., Paulus, J.K., Lynch, D.K., Sgroi, D.C., Debnath, J., Muthuswamy, S.K., and Brugge, J.S. 2003. Integrins and EGFR coordinately regulate the pro-apoptotic protein Bim to prevent anoikis. *Nat. Cell Biol.*5: 733–740.
- Reuter, S., Gupta, S.C., Chaturvedi, M.M., and Aggarwal, B.B. 2010. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic. Biol. Med.*49: 1603–1616.
- Sampson, J.H., Kaminski, T.J., and Schulman, K.A. 2011. Our failure to advance new treatments for glioma to market. *J. Neurosurg.*115: 245–247; discussion 247.

- Schleicher, S.M., Moretti, L., Varki, V., and Lu, B. 2010. Progress in the unraveling of the endoplasmic reticulum stress/autophagy pathway and cancer: implications for future therapeutic approaches. Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.13: 79–86.
- Sen, E. 2011. Targeting inflammation-induced transcription factor activation: an open frontier for glioma therapy. Drug Discov. Today16: 1044–1051.
- Shingu, T., Fujiwara, K., Böglér, O., Akiyama, Y., Moritake, K., Shinojima, N., Tamada, Y., Yokoyama, T., and Kondo, S. 2009. Inhibition of autophagy at a late stage enhances imatinib-induced cytotoxicity in human malignant glioma cells. Int. J. Cancer J. Int. Cancer124: 1060–1071.
- Sina, A., Proulx-Bonneau, S., Roy, A., Poliquin, L., Cao, J., and Annabi, B. 2010. The lectin concanavalin-A signals MT1-MMP catalytic independent induction of COX-2 through an IKK γ /NF- κ B-dependent pathway. J. Cell Commun. Signal.4: 31–38.
- Song, J., Ahn, C., Chun, C.-H., and Jin, E.-J. 2014. A long non-coding RNA, GAS5, plays a critical role in the regulation of miR-21 during osteoarthritis. J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.32: 1628–1635.
- Song, Z.-C., Zhou, W., Shu, R., and Ni, J. 2012. Hypoxia induces apoptosis and autophagic cell death in human periodontal ligament cells through HIF-1 α pathway. Cell Prolif.45: 239–248.

- Sowter, H.M., Ratcliffe, P.J., Watson, P., Greenberg, A.H., and Harris, A.L. 2001. HIF-1-dependent regulation of hypoxic induction of the cell death factors BNIP3 and NIX in human tumors. Cancer Res.61: 6669–6673.
- 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 Lond. Engl.359: 1011–1018.
- Su, Z., Yang, Z., Xu, Y., Chen, Y., and Yu, Q. 2015. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. Mol. Cancer14: 48.
- Swoboda, E., and Strzadała, L. 2009. [BNIP3 as an atypical representative of the Bcl-2 protein family. Part 1: BNIP3, a regulator of non-apoptotic programmed cell death]. Postępy Hig. Med. Dośw. Online63: 409–417.
- Taraboletti, G., D’Ascenzo, S., Borsotti, P., Giavazzi, R., Pavan, A., and Dolo, V. 2002. Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as membrane vesicle-associated components by endothelial cells. Am. J. Pathol.160: 673–680.
- Tashiro, K., Shishido, M., Fujimoto, K., Hirota, Y., Yo, K., Gomi, T., and Tanaka, Y. 2014. Age-related disruption of autophagy in dermal fibroblasts modulates extracellular matrix components. Biochem. Biophys. Res. Commun.443: 167–172.
- Theocharis, A.D., Gialeli, C., Bouris, P., Giannopoulou, E., Skandalis, S.S., Aletras, A.J., Iozzo, R.V., and Karamanos, N.K. 2014. Cell-matrix interactions: focus

on proteoglycan-proteinase interplay and pharmacological targeting in cancer. FEBS J.281: 5023–5042.

- Tringali, C., Lupo, B., Silvestri, I., Papini, N., Anastasia, L., Tettamanti, G., and Venerando, B. 2012. The plasma membrane sialidase NEU3 regulates the malignancy of renal carcinoma cells by controlling β 1 integrin internalization and recycling. J. Biol. Chem.287: 42835–42845.
- Trog, D., Yeghiazaryan, K., Fountoulakis, M., Friedlein, A., Moenkemann, H., Haertel, N., Schueller, H., Breipohl, W., Schild, H., Leppert, D., and Golubnitschaja, O. 2006. Pro-invasive gene regulating effect of irradiation and combined temozolomide-radiation treatment on surviving human malignant glioma cells. Eur. J. Pharmacol.542: 8–15.
- Uekita, T., Gotoh, I., Kinoshita, T., Itoh, Y., Sato, H., Shiomi, T., Okada, Y., and Seiki, M. 2004. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cytoplasmic tail-binding protein-1 is a new member of the Cupin superfamily. A possible multifunctional protein acting as an invasion suppressor down-regulated in tumors. J. Biol. Chem.279: 12734–12743.
- Vanharanta, S., and Massagué, J. 2013. Origins of Metastatic Traits. Cancer Cell24: 410–421.
- Wei, Y., Zou, Z., Becker, N., Anderson, M., Sumpter, R., Xiao, G., Kinch, L., Koduru, P., Christudass, C.S., Veltri, R.W., Grishin, N.V., Peyton, M., Minna, J., Bhagat, G., and Levine, B. 2013. EGFR-mediated Beclin 1

phosphorylation in autophagy suppression, tumor progression, and tumor chemoresistance. Cell154: 1269–1284.

Weng, T., Xie, Y., Yi, L., Huang, J., Luo, F., Du, X., Chen, L., Liu, C., Chen, D., and Chen, L. 2014. Loss of Vhl in cartilage accelerated the progression of age-associated and surgically induced murine osteoarthritis. Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.22: 1197–1205.

Wick, W., Wick, A., Schulz, J.B., Dichgans, J., Rodemann, H.P., and Weller, M. 2002. Prevention of irradiation-induced glioma cell invasion by temozolomide involves caspase 3 activity and cleavage of focal adhesion kinase. Cancer Res.62: 1915–1919.

Wild-Bode, C., Weller, M., Rimner, A., Dichgans, J., and Wick, W. 2001. Sublethal irradiation promotes migration and invasiveness of glioma cells: implications for radiotherapy of human glioblastoma. Cancer Res.61: 2744–2750.

Wolf, A., Agnihotri, S., and Guha, A. 2010. Targeting metabolic remodeling in glioblastoma multiforme. Oncotarget1: 552–562.

Yamanaka-Tatematsu, M., Nakashima, A., Fujita, N., Shima, T., Yoshimori, T., and Saito, S. 2013. Autophagy induced by HIF1 α overexpression supports trophoblast invasion by supplying cellular energy. PloS One8: e76605.

Yin, J.-J., Li, Y.-B., Wang, Y., Liu, G.-D., Wang, J., Zhu, X.-O., and Pan, S.-H. 2012. The role of autophagy in endoplasmic reticulum stress-induced pancreatic β cell death. Autophagy8: 158–164.

- Yu, M., Bowden, E.T., Sitlani, J., Sato, H., Seiki, M., Mueller, S.C., and Thompson, E.W. 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.57: 5028–5032.
- Zeng, X., and Kinsella, T.J. 2010. BNIP3 is essential for mediating 6-thioguanine- and 5-fluorouracil-induced autophagy following DNA mismatch repair processing. Cell Res.20: 665–675.
- Zgheib, A., Lamy, S., and Annabi, B. 2013. Epigallocatechin gallate targeting of membrane type 1 matrix metalloproteinase-mediated Src and Janus kinase/signal transducers and activators of transcription 3 signaling inhibits transcription of colony-stimulating factors 2 and 3 in mesenchymal stromal cells. J. Biol. Chem.288: 13378–13386.
- Zhang, L., Zhang, Y., Liu, X., Qin, Z., and Yang, J. 2011. Expression of elongation factor-2 kinase contributes to anoikis resistance and invasion of human glioma cells. Acta Pharmacol. Sin.32: 361–367.
- Zhao, Y., Chen, G., Zhang, W., Xu, N., Zhu, J.-Y., Jia, J., Sun, Z.-J., Wang, Y.-N., and Zhao, Y.-F. 2012. Autophagy regulates hypoxia-induced osteoclastogenesis through the HIF-1 α /BNIP3 signaling pathway. J. Cell. Physiol.227: 639–648.

- Zhuang, W., Li, B., Long, L., Chen, L., Huang, Q., and Liang, Z. 2011. Induction of autophagy promotes differentiation of glioma-initiating cells and their radiosensitivity. Int. J. Cancer J. Int. Cancer129: 2720–2731.
- Zhuang, W., Qin, Z., and Liang, Z. 2009. The role of autophagy in sensitizing malignant glioma cells to radiation therapy. Acta Biochim. Biophys. Sin.41: 341–351.

TABLE LEGENDS

Table C.1 : Role of Matrix metalloproteinases (MMPs) in the regulation of autophagy. Studies which have found correlation between a specific MMP and autophagy (e.g. using expression of essential autophagic proteins) are listed along with the cell types (or tissues) used and the effects observed.

FIGURE LEGENDS

Figure C.1 : Alignment of the cytoplasmic regions of the MMPs containing transmembrane domains. The terminal cytoplasmic sequences of the four human MT-MMP proteins are shown after alignment. A black background indicates where an individual amino acid is located in all four of the proteins, a dark grey background indicates where an amino acid is found in three of the four and light grey indicates sequence identity in two of the four proteins. The black bar shown beneath the sequences denotes the location of the transmembrane domain.

Table C.1

Metallo-proteinases (Enzyme type)	Tissues or cell types	Autophagy to MMP correlation	Autophagy biomarkers assessed	References
MMP-1 (Collagenase 1)	Breast cancer cells (MDA-MB-231)	Positive	↑LC3	(Augustin <i>et al.</i> , 2009)
	Human primary RCC, CA-TC and GR-TC	Positive	↑LC3	(Tringali <i>et al.</i> , 2012)
	Human dermal fibroblasts	Positive	↑LC3	(Tashiro <i>et al.</i> , 2014)
MMP-8 (Collagenase 2)	PDLCs	Positive	↑LC3	(Song <i>et al.</i> , 2012)
MMP-13 (Collagenase 3)	Nucleus pulposus (rat spinal column)	Negative	↓LC3 ↑p-mTOR ↑p-70S6K	(Jiang <i>et al.</i> , 2014)
	Mouse knee joints	Negative	↓LC3	(Hui <i>et al.</i> , 2014)
	Human osteoarthritic	Negative	↓Beclin1	(Song <i>et al.</i> ,

	and non-osteoarthritic cartilage		↓ATG7 ↓LC3	(2014)
	Articular chondrocytes from <i>Col2a1-CreER^{T2};Vhl^{fl/fl}</i> mice	Negative	↓Beclin1 ↓LC3	(Weng <i>et al.</i> , 2014)
	Mouse cardiomyocytes	Positive	↑P62 ↑LC3A/B	(Qipshidze <i>et al.</i> , 2012)
MMP-2 (Gelatinase A)	Mouse cardiomyocytes	Positive	↑P62 ↑LC3A/B	(Qipshidze <i>et al.</i> , 2012)
	LX-2 cells, an immortalized human HSCs line	Positive	↑P62 ↑LC3II	(Lee <i>et al.</i> , 2014)
	Human osteoarthritis and non-osteoarthritic cartilage	Negative	↓Beclin1 ↓ATG7 ↓LC3	(Song <i>et al.</i> , 2014)
	Human tongue carcinoma cell	Negative	↓ATG4	(Weng <i>et al.</i> ,

	lines		↓ATG5 ↓LC3II	2014)
	Mixed glial cultures from day-old mice	Negative	↓Beclin ↓LC3II	(Caldeira <i>et al.</i> , 2014)
MMP-9 (Gelatinase B)	Mouse cardio-myocytes	Positive	↑P62 ↑LC3A/B	(Qipshidze <i>et al.</i> , 2012)
	Rat brain endothelial cells (primary ECs)	Positive	↑LC3II	(Engelhardt <i>et al.</i> , 2015)
	Human hepatocellular carcinoma samples from patients	Positive	↑LC3II	(Li <i>et al.</i> , 2015)
	HTR8/SVneo, HchEpC1b (extravillous trophoblasts cell lines)	Positive	↑LC3II	(Yamanaka-Tatematsu <i>et al.</i> , 2013)
	HepG2 and	Positive	↑LC3II	(Li <i>et al.</i> ,

	BEL7402 (Hepatocellular carcinoma cell lines)			2013)
MMP-3 (Stromelysin 1)	P8 ^{-/-} and P8 ^{+/+} mice cardiomyocytes	Positive	↑LC3 ↑conjugation of ATG5-ATG12 ↓p62	(Georgescu <i>et al.</i> , 2011)
	MCF-10A, MCF-7 and 240Lp16sMY cells	Positive	↑LC3	(Girard <i>et al.</i> , 2015)
	Embryonic stem cell-derived odontoblast-like cells	Positive	↑ATG5 ↑LC3 ↑ATG12	(Ozeki <i>et al.</i> , 2015)
	Human osteoarthritis and non-osteoarthritis cartilage	Negative	↓Beclin1 ↓ATG7 ↓LC3	(Song <i>et al.</i> , 2014)

MMP-7 (Matrilysin 1)	Human primary RCC, CA-TC and GR-TC cells	Positive	↑LC3	(Tringali <i>et al.</i> , 2012)
MMP-14 (MT1-MMP)	Glioblastoma cells (U87)	Positive	↑LC3 ↑BNIP3 ↑ATG3 ↑ATG12 ↑ATG16L1 ↓ATG16L2	(Pratt <i>et al.</i> , 2012)
	Glioblastoma cells (U87)	Positive	↑LC3	(Pratt and Annabi, 2014)
	Glioblastoma cells (U87)	Positive	↑LC3	(Pratt <i>et al.</i> , 2015)
MMP-19 (Macrophage elastase)	Primary mouse lung fibroblasts (<i>MMP19</i> ^{+/+} and <i>MMP19</i> ^{-/-})	Positive	↑ATG4c	(Jara <i>et al.</i> , 2015)

Figure C.1

MT1-MMP : EEGGGAVSAAVLEVLLILLVAVGLAVFEERRECTPRRLLYQRSLLDKV
MT2-MMP : EEVARTVNVVMILVELLLLIVIGTYALVCMQRKCAPRVLLYCHRSLQEWV
MT3-MMP : DNTASTVRAIFIVIECILALGIIILVYTVFQEKRRKCTPRHILYCHRSMQEWV
MT5-MMP : NDVPGSVNAVAIVIECILSLGIIILVYTVFQEKNETGEQPVTLYKRPVQEWV



APPENDICE D : PARTICIPATION À DES CONGRÈS SCIENTIFIQUES

Présentations orales :

- **Pratt J. & Annabi B. (2014)** Evidence of MTCBP-1 interaction with the cytoplasmic domain of MT1-MMP : Implications in the autophagy cell index of high grade glioblastoma. *Actes du Colloque « La recherche en santé » (Montréal, QC, Canada) (Provincial conference)*
- **Pratt J. & Annabi B. (2014)** Le domaine cytoplasmique de la métalloprotéase matricielle membranaire de type 1 (MT1-MMP) : un nouveau rôle dans l'induction de l'autophagie dans les glioblastomes. *Actes du 82e Colloque de l'Association Francophone pour le savoir (ACFAS) (Montréal, QC, Canada)*
- **Pratt J. & Annabi B. (2013)** The role of the cytoplasmic domain of MT1-MMP in the intracellular signaling of autophagy in U87 glioblastoma cells. *Actes du 9e Colloque Annuel du Centre de Recherche Biomédicale BioMed-UQAM (Trois-Rivières, QC, Canada)*

Présentations par affiche :

- **Pratt J. Haidara K. Demeule M. & Annabi B. (2015)** Evidence for a MT1-MMP/LRP-1 expression balance that regulates Angiopoep-2 internalization in glioblastoma: Possible impact in low grade brain tumor therapy. *Actes de la 1ère Retraite du Centre de Recherche Biomédicale BioMed-UQAM (St-Adèle, Qc, Canada)*
- **Pratt J. & Annabi B. (2014)** FRET-based evidence reveals interaction between MTCBP-1 and the cytoplasmic domain of MT1-MMP : Implications for the autophagy cell index of high grade glioblastoma. *Actes du 6^e regroupement annuel du GEPROM (Groupe d'études des protéines membranaires) (Montreal, Qc, Canada) (Provincial conference)*
- **Pratt J. & Annabi B. (2013)** Induction of autophagy biomarker BNIP3 requires a JAK2/STAT3 and MT1-MMP signalling interplay in Concanavalin-A-activated U87 glioblastoma cells. *Actes du 13^e regroupement annuel de sciences biomédicales (Montreal, QC, Canada)*
- **Pratt J. & Annabi B. (2012)** A membrane-anchored matrix metalloproteinase MT1-MMP signals Concanavalin-A-induced autophagy in U87 glioblastoma cells. *Actes du 5e regroupement annuel du GEPROM (Groupe d'études des protéines membranaires) (Montreal, Qc, Canada)*

- **Pratt J. & Annabi B.** (2012) Concanavalin-A-induced autophagy biomarkers requires membrane type-1 matrix metalloproteinase intracellular signalling in glioblastoma cells. *Actes du 8^e Colloque Annuel du Centre de Recherche Biomédicale BioMed-UQAM (Montreal, Qc, Canada)*
- **Pratt J. & Annabi B.** (2012) A role for the intracellular domain of MT1-MMP in Concanavalin-A-induced autophagy in U87 glioblastoma cells. *Actes du 12^e regroupement annuel en sciences biomédicales (Montreal, QC, Canada)*
- **Pratt J. & Annabi B.** (2011) A role for the intracellular domain of MT1-MMP in Concanavalin-A-induced autophagy in U87 glioblastoma cells. *Actes de la conférence internationale Zing sur l'autophagie (Xcaret, Mexico)*
- **Pratt J., Proulx-Bonneau S., Noel J. & Annabi B.** (2011) L'induction du stress endoplasmique par la métalloprotéase matricielle MT1-MMP: un rôle dans la régulation de l'apoptose des cellules de glioblastome humain. *Actes du 53^e regroupement annuel du Club de Recherches Cliniques du Québec (Saint-Adèle, QC, Canada)*

BIBLIOGRAPHIE

- Agarraberes, F.A. et Dice, J.F. (2001). «A molecular chaperone complex at the lysosomal membrane is required for protein translocation». *J Cell Sci*, 114(Pt 13), p. 2491-2499
- Agarwal, S., Manchanda, P., Vogelbaum, M.A., Ohlfest, J.R. et Elmquist, W.F. (2013). «Function of the blood-brain barrier and restriction of drug delivery to invasive glioma cells: findings in an orthotopic rat xenograft model of glioma». *Drug Metab Dispos*, 41(1), p. 33-39
- Ahn, J.H. et Lee, M. (2011). «Suppression of autophagy sensitizes multidrug resistant cells towards Src tyrosine kinase specific inhibitor PP2». *Cancer Lett*, 310(2), p. 188-197
- Akanuma, N., Hoshino, I., Akutsu, Y., Murakami, K., Isozaki, Y., Maruyama, T., Yusup, G., Qin, W., Toyozumi, T., Takahashi, M., Suito, H., Hu, X., Sekino, N. et Matsubara, H. (2014). «MicroRNA-133a regulates the mRNAs of two invadopodia-related proteins, FSCN1 and MMP14, in esophageal cancer». *Br J Cancer*, 110(1), p. 189-198
- Akla, N., Pratt, J. et Annabi, B. (2012). «Concanavalin-A triggers inflammatory response through JAK/STAT3 signalling and modulates MT1-MMP regulation of COX-2 in mesenchymal stromal cells». *Exp Cell Res*, 318(19), p. 2498-2506
- Al Rawi, S., Louvet-Vallee, S., Djeddi, A., Sachse, M., Culetto, E., Hajjar, C., Boyd, L., Legouis, R. et Galy, V. (2011). «Postfertilization autophagy of sperm organelles prevents paternal mitochondrial DNA transmission». *Science*, 334(6059), p. 1144-1147
- Albanese, C., Alzani, R., Amboldi, N., Degrassi, A., Festuccia, C., Fiorentini, F., Gravina, G., Mercurio, C., Pastori, W., Brasca, M., Pesenti, E., Galvani, A. et

- Ciomei, M. (2013). «Anti-tumour efficacy on glioma models of PHA-848125, a multi-kinase inhibitor able to cross the blood-brain barrier». *Br J Pharmacol*, 169(1), p. 156-166
- Alberti, S., Esser, C. et Hohfeld, J. (2003). «BAG-1--a nucleotide exchange factor of Hsc70 with multiple cellular functions». *Cell Stress Chaperones*, 8(3), p. 225-231
- Albrechtsen, R., Kveiborg, M., Stautz, D., Vikesa, J., Noer, J.B., Kotzsh, A., Nielsen, F.C., Wewer, U.M. et Frohlich, C. (2013). «ADAM12 redistributes and activates MMP-14, resulting in gelatin degradation, reduced apoptosis and increased tumor growth». *J Cell Sci*, 126(Pt 20), p. 4707-4720
- Alexandru-Abrams, D., Jadus, M.R., Hsu, F.P., Stathopoulos, A. et Bota, D.A. (2014). «Therapeutic targeting of malignant glioma». *Anticancer Agents Med Chem*, 14(8), p. 1075-1084
- Alfranca, A., Lopez-Oliva, J.M., Genis, L., Lopez-Maderuelo, D., Mirones, I., Salvado, D., Quesada, A.J., Arroyo, A.G. et Redondo, J.M. (2008). «PGE2 induces angiogenesis via MT1-MMP-mediated activation of the TGFbeta/Alk5 signaling pathway». *Blood*, 112(4), p. 1120-1128
- Almeida, K.H. et Sobol, R.W. (2007). «A unified view of base excision repair: lesion-dependent protein complexes regulated by post-translational modification». *DNA Repair (Amst)*, 6(6), p. 695-711
- Almeida, P.C., Nantes, I.L., Chagas, J.R., Rizzi, C.C., Faljoni-Alario, A., Carmona, E., Juliano, L., Nader, H.B. et Tersariol, I.L. (2001). «Cathepsin B activity regulation. Heparin-like glycosaminoglycans protect human cathepsin B from alkaline pH-induced inactivation». *J Biol Chem*, 276(2), p. 944-951
- Amalinei, C., Caruntu, I.D., Giusca, S.E. et Balan, R.A. (2010). «Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions». *Rom J Morphol Embryol*, 51(2), p. 215-228

- Anido, J., Saez-Borderias, A., Gonzalez-Junca, A., Rodon, L., Folch, G., Carmona, M.A., Prieto-Sanchez, R.M., Barba, I., Martinez-Saez, E., Prudkin, L., Cuartas, I., Raventos, C., Martinez-Ricarte, F., Poca, M.A., Garcia-Dorado, D., Lahn, M.M., Yingling, J.M., Rodon, J., Sahuquillo, J., Baselga, J. et Seoane, J. (2010). «TGF-beta Receptor Inhibitors Target the CD44(high)/Id1(high) Glioma-Initiating Cell Population in Human Glioblastoma». *Cancer Cell*, 18(6), p. 655-668
- Anilkumar, N., Uekita, T., Couchman, J.R., Nagase, H., Seiki, M. et Itoh, Y. (2005). «Palmitoylation at Cys574 is essential for MT1-MMP to promote cell migration». *FASEB J*, 19(10), p. 1326-1328
- Annabi, B., Bouzegrane, M., Moumdjian, R., Moghrabi, A. et Beliveau, R. (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(4), p. 906-916
- Annabi, B., Lachambre, M.P., Bousquet-Gagnon, N., Page, M., Gingras, D. et Beliveau, R. (2002a). «Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin 3-gallate inhibits MMP-2 secretion and MT1-MMP-driven migration in glioblastoma cells». *Biochim Biophys Acta*, 1542(1-3), p. 209-220
- Annabi, B., Lachambre, M.P., Plouffe, K., Sartelet, H. et Beliveau, R. (2009a). «Modulation of invasive properties of CD133+ glioblastoma stem cells: a role for MT1-MMP in bioactive lysophospholipid signaling». *Mol Carcinog*, 48(10), p. 910-919
- Annabi, B., Laflamme, C., Sina, A., Lachambre, M.P. et Beliveau, R. (2009b). «A MT1-MMP/NF-kappaB signaling axis as a checkpoint controller of COX-2 expression in CD133+ U87 glioblastoma cells». *J Neuroinflammation*, 6, p. 8
- Annabi, B., Laflamme, C., Sina, A., Lachambre, M.P. et Béliveau, R. (2009c). «A MT1-MMP/NF-κB signaling axis as a checkpoint controller of COX-2 expression in CD133(+) U87 glioblastoma cells». *Journal of Neuroinflammation*, 6(1), p. 8

- Annabi, B., Lee, Y.T., Martel, C., Pilorget, A., Bahary, J.P. et Beliveau, R. (2003a). «Radiation induced-tubulogenesis in endothelial cells is antagonized by the antiangiogenic properties of green tea polyphenol (-) epigallocatechin-3-gallate». *Cancer Biol Ther*, 2(6), p. 642-649
- Annabi, B., Lee, Y.T., Turcotte, S., Naud, E., Desrosiers, R.R., Champagne, M., Eliopoulos, N., Galipeau, J. et Beliveau, R. (2003b). «Hypoxia promotes murine bone-marrow-derived stromal cell migration and tube formation». *Stem Cells*, 21(3), p. 337-347
- Annabi, B., Shedid, D., Ghosn, P., Kenigsberg, R.L., Desrosiers, R.R., Bojanowski, M.W., Beaulieu, E., Nassif, E., Moumdjian, R. et Beliveau, R. (2002b). «Differential regulation of matrix metalloproteinase activities in abdominal aortic aneurysms». *J Vasc Surg*, 35(3), p. 539-546
- Annabi, B., Thibeault, S., Lee, Y.T., Bousquet-Gagnon, N., Eliopoulos, N., Barrette, S., Galipeau, J. et Beliveau, R. (2003c). «Matrix metalloproteinase regulation of sphingosine-1-phosphate-induced angiogenic properties of bone marrow stromal cells». *Exp Hematol*, 31(7), p. 640-649
- Apte, S.S. et Parks, W.C. (2015). «Metalloproteinases: A parade of functions in matrix biology and an outlook for the future». *Matrix Biol*,
- Araque, A., Carmignoto, G. et Haydon, P.G. (2001). «Dynamic signaling between astrocytes and neurons». *Annu Rev Physiol*, 63, p. 795-813
- Araque, A., Carmignoto, G., Haydon, P.G., Oliet, S.H., Robitaille, R. et Volterra, A. (2014). «Gliotransmitters travel in time and space». *Neuron*, 81(4), p. 728-739
- Arico, S., Petiot, A., Bauvy, C., Dubbelhuis, P.F., Meijer, A.J., Codogno, P. et Ogier-Denis, E. (2001). «The tumor suppressor PTEN positively regulates macroautophagy by inhibiting the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway». *J Biol Chem*, 276(38), p. 35243-35246
- Artym, V.V., Zhang, Y., Seillier-Moiseiwitsch, F., Yamada, K.M. et Mueller, S.C. (2006). «Dynamic interactions of cortactin and membrane type 1 matrix

metalloproteinase at invadopodia: defining the stages of invadopodia formation and function». *Cancer Res*, 66(6), p. 3034-3043

Augustin, S., Berard, M., Kellaf, S., Peyri, N., Fauvel-Lafeve, F., Legrand, C., He, L. et Crepin, M. (2009). «Matrix metalloproteinases are involved in both type I (apoptosis) and type II (autophagy) cell death induced by sodium phenylacetate in MDA-MB-231 breast tumour cells». *Anticancer Res*, 29(4), p. 1335-1343

Avalos, Y., Canales, J., Bravo-Sagua, R., Criollo, A., Lavandero, S. et Quest, A.F. (2014). «Tumor suppression and promotion by autophagy». *Biomed Res Int*, 2014, p. 603980

Avivar-Valderas, A., Salas, E., Bobrovnikova-Marjon, E., Diehl, J.A., Nagi, C., Debnath, J. et Aguirre-Ghiso, J.A. (2011). «PERK integrates autophagy and oxidative stress responses to promote survival during extracellular matrix detachment». *Mol Cell Biol*, 31(17), p. 3616-3629

Azad, M.B., Chen, Y., Henson, E.S., Cizeau, J., McMillan-Ward, E., Israels, S.J. et Gibson, S.B. (2008). «Hypoxia induces autophagic cell death in apoptosis-competent cells through a mechanism involving BNIP3». *Autophagy*, 4(2), p. 195-204

Babashah, S. et Soleimani, M. (2011). «The oncogenic and tumour suppressive roles of microRNAs in cancer and apoptosis». *Eur J Cancer*, 47(8), p. 1127-1137

Balbin, M., Fueyo, A., Knauper, V., Pendas, A.M., Lopez, J.M., Jimenez, M.G., Murphy, G. et Lopez-Otin, C. (1998). «Collagenase 2 (MMP-8) expression in murine tissue-remodeling processes. Analysis of its potential role in postpartum involution of the uterus». *J Biol Chem*, 273(37), p. 23959-23968

Bandres, E., Agirre, X., Ramirez, N., Zarate, R. et Garcia-Foncillas, J. (2007). «MicroRNAs as cancer players: potential clinical and biological effects». *DNA Cell Biol*, 26(5), p. 273-282

- Bandyopadhyay, U., Kaushik, S., Varticovski, L. et Cuervo, A.M. (2008). «The chaperone-mediated autophagy receptor organizes in dynamic protein complexes at the lysosomal membrane». *Mol Cell Biol*, 28(18), p. 5747-5763
- Bao, S., Wu, Q., Li, Z., Sathornsumetee, S., Wang, H., McLendon, R.E., Hjelmeland, A.B. et Rich, J.N. (2008). «Targeting cancer stem cells through L1CAM suppresses glioma growth». *Cancer Res*, 68(15), p. 6043-6048
- Bao, S., Wu, Q., McLendon, R.E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A.B., Dewhirst, M.W., Bigner, D.D. et Rich, J.N. (2006). «Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response». *Nature*, 444(7120), p. 756-760
- Barbolina, M.V. et Stack, M.S. (2008). «Membrane type 1-matrix metalloproteinase: substrate diversity in pericellular proteolysis». *Semin Cell Dev Biol*, 19(1), p. 24-33
- Barker, F.G., 2nd, Chang, S.M., Larson, D.A., Sneed, P.K., Wara, W.M., Wilson, C.B. et Prados, M.D. (2001). «Age and radiation response in glioblastoma multiforme». *Neurosurgery*, 49(6), p. 1288-1297; discussion 1297-1288
- Barlow, A.D. et Thomas, D.C. (2015). «Autophagy in diabetes: beta-cell dysfunction, insulin resistance, and complications». *Diabetes*, 64(2), p. 252-260
- Barre, B. et Perkins, N.D. (2010). «The Skp2 promoter integrates signaling through the NF-kappaB, p53, and Akt/GSK3beta pathways to regulate autophagy and apoptosis». *Mol Cell*, 38(4), p. 524-538
- Bassi, D.E., Mahloogi, H. et Klein-Szanto, A.J. (2000). «The proprotein convertases furin and PACE4 play a significant role in tumor progression». *Mol Carcinog*, 28(2), p. 63-69
- Bastien, J.I., McNeill, K.A. et Fine, H.A. (2015). «Molecular characterizations of glioblastoma, targeted therapy, and clinical results to date». *Cancer*, 121(4), p. 502-516

- Basu, B., Correa de Sampaio, P., Mohammed, H., Fogarasi, M., Corrie, P., Watkins, N.A., Smethurst, P.A., English, W.R., Ouwehand, W.H. et Murphy, G. (2012). «Inhibition of MT1-MMP activity using functional antibody fragments selected against its hemopexin domain». *Int J Biochem Cell Biol*, 44(2), p. 393-403
- Bauer, M., Zeitlinger, M., Karch, R., Matzneller, P., Stanek, J., Jager, W., Bohmdorfer, M., Wadsak, W., Mitterhauser, M., Bankstahl, J.P., Loscher, W., Koeppe, M., Kuntner, C., Muller, M. et Langer, O. (2012). «Pgp-mediated interaction between (R)-[11C]verapamil and tariquidar at the human blood-brain barrier: a comparison with rat data». *Clin Pharmacol Ther*, 91(2), p. 227-233
- Belda-Iniesta, C., de Castro Carpeno, J., Casado Saenz, E., Cejas Guerrero, P., Perona, R. et Gonzalez Baron, M. (2006). «Molecular biology of malignant gliomas». *Clin Transl Oncol*, 8(17005465), p. 635-641
- Béliveau, R. et Gingras, D. (2005). *Les aliments contre le cancer : la prévention et le traitement du cancer par l'alimentation*. Outremont, Québec : Trécarré.
- Béliveau, R. et Gingras, D. (2014). *Prévenir le cancer : comment réduire les risques*. Montréal (Québec) : Trécarré.
- Belkaid, A., Copland, I.B., Massillon, D. et Annabi, B. (2006). «Silencing of the human microsomal glucose-6-phosphate translocase induces glioma cell death: potential new anticancer target for curcumin». *FEBS Lett*, 580(15), p. 3746-3752
- Belkaid, A., Fortier, S., Cao, J. et Annabi, B. (2007). «Necrosis induction in glioblastoma cells reveals a new "bioswitch" function for the MT1-MMP/G6PT signaling axis in proMMP-2 activation versus cell death decision». *Neoplasia*, 9(4), p. 332-340
- Bellot, G., Garcia-Medina, R., Gounon, P., Chiche, J., Roux, D., Pouyssegur, J. et Mazure, N.M. (2009). «Hypoxia-induced autophagy is mediated through

hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains». *Mol Cell Biol*, 29(10), p. 2570-2581

Ben-Yosef, Y., Lahat, N., Shapiro, S., Bitterman, H. et Miller, A. (2002). «Regulation of endothelial matrix metalloproteinase-2 by hypoxia/reoxygenation». *Circ Res*, 90(7), p. 784-791

Benbrook, D.M. et Long, A. (2012). «Integration of autophagy, proteasomal degradation, unfolded protein response and apoptosis». *Exp Oncol*, 34(3), p. 286-297

Benderdour, M., Tardif, G., Pelletier, J.P., Dupuis, M., Geng, C. et Martel-Pelletier, J. (2002). «A novel negative regulatory element in the human collagenase-3 proximal promoter region». *Biochem Biophys Res Commun*, 291(5), p. 1151-1159

Bernstein, M., Cabantog, A., Laperriere, N., Leung, P. et Thomason, C. (1995). «Brachytherapy for recurrent single brain metastasis». *Can J Neurol Sci*, 22(1), p. 13-16

Betin, V.M. et Lane, J.D. (2009). «Atg4D at the interface between autophagy and apoptosis». *Autophagy*, 5(7), p. 1057-1059

Bhat, K.P., Balasubramaniyan, V., Vaillant, B., Ezhilarasan, R., Hummelink, K., Hollingsworth, F., Wani, K., Heathcock, L., James, J.D., Goodman, L.D., Conroy, S., Long, L., Lelic, N., Wang, S., Gumin, J., Raj, D., Kodama, Y., Raghunathan, A., Olar, A., Joshi, K., Pelloski, C.E., Heimberger, A., Kim, S.H., Cahill, D.P., Rao, G., Den Dunnen, W.F., Boddeke, H.W., Phillips, H.S., Nakano, I., Lang, F.F., Colman, H., Sulman, E.P. et Aldape, K. (2013). «Mesenchymal differentiation mediated by NF-kappaB promotes radiation resistance in glioblastoma». *Cancer Cell*, 24(3), p. 331-346

Bhutia, S.K., Mukhopadhyay, S., Sinha, N., Das, D.N., Panda, P.K., Patra, S.K., Maiti, T.K., Mandal, M., Dent, P., Wang, X.Y., Das, S.K., Sarkar, D. et Fisher, P.B. (2013). «Autophagy: cancer's friend or foe?». *Adv Cancer Res*, 118, p. 61-95

- Bloch, O. et Parsa, A.T. (2014). «Heat shock protein peptide complex-96 (HSPPC-96) vaccination for recurrent glioblastoma: a phase II, single arm trial». *Neuro Oncol*, 16(5), p. 758-759
- Bode, W. (1995). «A helping hand for collagenases: the haemopexin-like domain». *Structure*, 3(6), p. 527-530
- Bode, W., Fernandez-Catalan, C., Tschesche, H., Grams, F., Nagase, H. et Maskos, K. (1999). «Structural properties of matrix metalloproteinases». *Cell Mol Life Sci*, 55(4), p. 639-652
- Booth, L.A., Tavallai, S., Hamed, H.A., Cruickshanks, N. et Dent, P. (2014). «The role of cell signalling in the crosstalk between autophagy and apoptosis». *Cell Signal*, 26(3), p. 549-555
- Bosman, F.T. et Stamenkovic, I. (2003). «Functional structure and composition of the extracellular matrix». *J Pathol*, 200(4), p. 423-428
- Bouris, P., Skandalis, S.S., Piperigkou, Z., Afratis, N., Karamanou, K., Aletras, A.J., Moustakas, A., Theocharis, A.D. et Karamanos, N.K. (2015). «Estrogen receptor alpha mediates epithelial to mesenchymal transition, expression of specific matrix effectors and functional properties of breast cancer cells». *Matrix Biol*, 43, p. 42-60
- Boya, P., Reggiori, F. et Codogno, P. (2013). «Emerging regulation and functions of autophagy». *Nat Cell Biol*, 15(7), p. 713-720
- Brahimi-Horn, M.C., Bellot, G. et Pouyssegur, J. (2011). «Hypoxia and energetic tumour metabolism». *Curr Opin Genet Dev*, 21(1), p. 67-72
- Brescia, P., Ortensi, B., Fornasari, L., Levi, D., Broggi, G. et Pelicci, G. (2013). «CD133 is essential for glioblastoma stem cell maintenance». *Stem Cells*, 31(5), p. 857-869

- Brew, K. et Nagase, H. (2010). «The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity». *Biochim Biophys Acta*, 1803(1), p. 55-71
- Brezillon, S., Pietraszek, K., Maquart, F.X. et Wegrowski, Y. (2013). «Lumican effects in the control of tumour progression and their links with metalloproteinases and integrins». *FEBS J*, 280(10), p. 2369-2381
- Brooks, P.C., Stromblad, S., Sanders, L.C., von Schalscha, T.L., Aimes, R.T., Stetler-Stevenson, W.G., Quigley, J.P. et Cheresch, D.A. (1996). «Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3». *Cell*, 85(5), p. 683-693
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J. et Greenberg, M.E. (1999). «Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor». *Cell*, 96(6), p. 857-868
- Bulcao, C.F., D'Souza, K.M., Malhotra, R., Staron, M., Duffy, J.Y., Pandalai, P.K., Jeevanandam, V. et Akhter, S.A. (2010). «Activation of JAK-STAT and nitric oxide signaling as a mechanism for donor heart dysfunction». *J Heart Lung Transplant*, 29(3), p. 346-351
- Burton, E.C., Lamborn, K.R., Forsyth, P., Scott, J., O'Campo, J., Uyehara-Lock, J., Prados, M., Berger, M., Passe, S., Uhm, J., O'Neill, B.P., Jenkins, R.B. et Aldape, K.D. (2002). «Aberrant p53, mdm2, and proliferation differ in glioblastomas from long-term compared with typical survivors». *Clin Cancer Res*, 8(1), p. 180-187
- Burton, T.R., Eisenstat, D.D. et Gibson, S.B. (2009). «BNIP3 (Bcl-2 19 kDa interacting protein) acts as transcriptional repressor of apoptosis-inducing factor expression preventing cell death in human malignant gliomas». *J Neurosci*, 29(13), p. 4189-4199
- Burton, T.R., Henson, E.S., Baijal, P., Eisenstat, D.D. et Gibson, S.B. (2006). «The pro-cell death Bcl-2 family member, BNIP3, is localized to the nucleus of

- human glial cells: Implications for glioblastoma multiforme tumor cell survival under hypoxia». *Int J Cancer*, 118(7), p. 1660-1669
- Butler, G.S. et Overall, C.M. (2009). «Updated biological roles for matrix metalloproteinases and new "intracellular" substrates revealed by degradomics». *Biochemistry*, 48(46), p. 10830-10845
- Byun, Y.J., Kim, S.K., Kim, Y.M., Chae, G.T., Jeong, S.W. et Lee, S.B. (2009). «Hydrogen peroxide induces autophagic cell death in C6 glioma cells via BNIP3-mediated suppression of the mTOR pathway». *Neurosci Lett*, 461(2), p. 131-135
- Cagnol, S. et Chambard, J.C. (2010). «ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death--apoptosis, autophagy and senescence». *FEBS J*, 277(1), p. 2-21
- Calatuzzolo, C., Pollo, B., Botturi, A., Dinapoli, L., Carosi, M., Salmaggi, A. et Maschio, M. (2012). «Multidrug resistance proteins expression in glioma patients with epilepsy». *J Neurooncol*, 110(1), p. 129-135
- Camby, I., Decaestecker, C., Lefranc, F., Kaltner, H., Gabius, H.J. et Kiss, R. (2005). «Galectin-1 knocking down in human U87 glioblastoma cells alters their gene expression pattern». *Biochem Biophys Res Commun*, 335(1), p. 27-35
- Comité consultatif de la Société Canadienne du Cancer (2015). *Statistiques canadiennes sur le cancer 2015*. Toronto (Ontario): Société canadienne du cancer, 2015
- Cancer Genome Atlas Research Network (2008). «Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways». *Nature*, 455(7216), p. 1061-1068
- Capila, I. et Linhardt, R.J. (2002). «Heparin-protein interactions». *Angew Chem Int Ed Engl*, 41(3), p. 391-412

- Cardinale, R., Won, M., Choucair, A., Gillin, M., Chakravarti, A., Schultz, C., Souhami, L., Chen, A., Pham, H. et Mehta, M. (2006). «A phase II trial of accelerated radiotherapy using weekly stereotactic conformal boost for supratentorial glioblastoma multiforme: RTOG 0023». *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 65(5), p. 1422-1428
- Carlsson, S.K., Brothers, S.P. et Wahlestedt, C. (2014). «Emerging treatment strategies for glioblastoma multiforme». *EMBO Mol Med*, 6(11), p. 1359-1370
- Carmeliet, P., Moons, L., Lijnen, R., Baes, M., Lemaitre, V., Tipping, P., Drew, A., Eeckhout, Y., Shapiro, S., Lupu, F. et Collen, D. (1997). «Urokinase-generated plasmin activates matrix metalloproteinases during aneurysm formation». *Nat Genet*, 17(4), p. 439-444
- Catalano, M., D'Alessandro, G., Lepore, F., Corazzari, M., Caldarola, S., Valacca, C., Faienza, F., Esposito, V., Limatola, C., Cecconi, F. et Di Bartolomeo, S. (2015). «Autophagy induction impairs migration and invasion by reversing EMT in glioblastoma cells». *Mol Oncol*,
- Ceteci, F., Xu, J., Ceteci, S., Zanucco, E., Thakur, C. et Rapp, U.R. (2011). «Conditional expression of oncogenic C-RAF in mouse pulmonary epithelial cells reveals differential tumorigenesis and induction of autophagy leading to tumor regression». *Neoplasia*, 13(11), p. 1005-1018
- Cha, H.J., Okada, A., Kim, K.W., Sato, H. et Seiki, M. (2000). «Identification of cis-acting promoter elements that support expression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) in v-src transformed Madin-Darby canine kidney cells». *Clin Exp Metastasis*, 18(8), p. 675-681
- Chan, K.M., Wong, H.L., Jin, G., Liu, B., Cao, R., Cao, Y., Lehti, K., Tryggvason, K. et Zhou, Z. (2012). «MT1-MMP inactivates ADAM9 to regulate FGFR2 signaling and calvarial osteogenesis». *Dev Cell*, 22(6), p. 1176-1190

- Chang, C.P., Yang, M.C., Liu, H.S., Lin, Y.S. et Lei, H.Y. (2007). «Concanavalin A induces autophagy in hepatoma cells and has a therapeutic effect in a murine in situ hepatoma model». *Hepatology*, 45(2), p. 286-296
- Chang, H.W., Lee, Y.S., Nam, H.Y., Han, M.W., Kim, H.J., Moon, S.Y., Jeon, H., Park, J.J., Carey, T.E., Chang, S.E., Kim, S.W. et Kim, S.Y. (2013). «Knockdown of beta-catenin controls both apoptotic and autophagic cell death through LKB1/AMPK signaling in head and neck squamous cell carcinoma cell lines». *Cell Signal*, 25(4), p. 839-847
- Chang, Q., Bournazou, E., Sansone, P., Berishaj, M., Gao, S.P., Daly, L., Wels, J., Theilen, T., Granitto, S., Zhang, X., Cotari, J., Alpaugh, M.L., de Stanchina, E., Manova, K., Li, M., Bonafe, M., Ceccarelli, C., Taffurelli, M., Santini, D., Altan-Bonnet, G., Kaplan, R., Norton, L., Nishimoto, N., Huszar, D., Lyden, D. et Bromberg, J. (2013). «The IL-6/JAK/Stat3 feed-forward loop drives tumorigenesis and metastasis». *Neoplasia*, 15(7), p. 848-862
- Chen, G., Zhu, W., Shi, D., Lv, L., Zhang, C., Liu, P. et Hu, W. (2010). «MicroRNA-181a sensitizes human malignant glioma U87MG cells to radiation by targeting Bcl-2». *Oncol Rep*, 23(4), p. 997-1003
- Chen, K.C., Wang, Y.S., Hu, C.Y., Chang, W.C., Liao, Y.C., Dai, C.Y. et Juo, S.H. (2011). «OxLDL up-regulates microRNA-29b, leading to epigenetic modifications of MMP-2/MMP-9 genes: a novel mechanism for cardiovascular diseases». *FASEB J*, 25(5), p. 1718-1728
- Chen, L., Liu, Q., Huang, Z., Wu, F., Li, Z., Chen, X. et Lin, T. (2012). «Tripchlorolide induces cell death in lung cancer cells by autophagy». *Int J Oncol*, 40(4), p. 1066-1070
- Chen, N. et Karantza, V. (2011). «Autophagy as a therapeutic target in cancer». *Cancer Biol Ther*, 11(2), p. 157-168
- Cheng, H.W., Liang, Y.H., Kuo, Y.L., Chuu, C.P., Lin, C.Y., Lee, M.H., Wu, A.T., Yeh, C.T., Chen, E.I., Whang-Peng, J., Su, C.L. et Huang, C.Y. (2015). «Identification of thioridazine, an antipsychotic drug, as an antiglioblastoma

and anticancer stem cell agent using public gene expression data». *Cell Death Dis*, 6, p. e1753

- Cheng, L., Wu, Q., Huang, Z., Guryanova, O.A., Huang, Q., Shou, W., Rich, J.N. et Bao, S. (2011). «L1CAM regulates DNA damage checkpoint response of glioblastoma stem cells through NBS1». *EMBO J*, 30(5), p. 800-813
- Choi, C.H., Jung, Y.K. et Oh, S.H. (2010). «Autophagy induction by capsaicin in malignant human breast cells is modulated by p38 and extracellular signal-regulated mitogen-activated protein kinases and retards cell death by suppressing endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis». *Mol Pharmacol*, 78(1), p. 114-125
- Chou, J., Shahi, P. et Werb, Z. (2013). «microRNA-mediated regulation of the tumor microenvironment». *Cell Cycle*, 12(20), p. 3262-3271
- Chun, T.H., Sabeh, F., Ota, I., Murphy, H., McDonagh, K.T., Holmbeck, K., Birkedal-Hansen, H., Allen, E.D. et Weiss, S.J. (2004). «MT1-MMP-dependent neovessel formation within the confines of the three-dimensional extracellular matrix». *J Cell Biol*, 167(4), p. 757-767
- Claes, A., Idema, A.J. et Wesseling, P. (2007). «Diffuse glioma growth: a guerilla war». *Acta Neuropathol*, 114(5), p. 443-458
- Collins, V.P. (2004). «Brain tumours: classification and genes». *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 75 Suppl 2, p. ii2-11
- Colman, H. et Aldape, K. (2008). «Molecular predictors in glioblastoma: toward personalized therapy». *Arch Neurol*, 65(7), p. 877-883
- Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C. et Mantovani, A. (2009). «Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability». *Carcinogenesis*, 30(7), p. 1073-1081

- Comes, F., Matrone, A., Lastella, P., Nico, B., Susca, F.C., Bagnulo, R., Ingravallo, G., Modica, S., Lo Sasso, G., Moschetta, A., Guanti, G. et Simone, C. (2007). «A novel cell type-specific role of p38alpha in the control of autophagy and cell death in colorectal cancer cells». *Cell Death Differ*, 14(4), p. 693-702
- Cowden Dahl, K.D., Zeineldin, R. et Hudson, L.G. (2007). «PEA3 is necessary for optimal epidermal growth factor receptor-stimulated matrix metalloproteinase expression and invasion of ovarian tumor cells». *Mol Cancer Res*, 5(5), p. 413-421
- Crane, C.A., Han, S.J., Ahn, B., Oehlke, J., Kivett, V., Fedoroff, A., Butowski, N., Chang, S.M., Clarke, J., Berger, M.S., McDermott, M.W., Prados, M.D. et Parsa, A.T. (2013). «Individual patient-specific immunity against high-grade glioma after vaccination with autologous tumor derived peptides bound to the 96 KD chaperone protein». *Clin Cancer Res*, 19(1), p. 205-214
- Crawford, H.C., Fingleton, B., Gustavson, M.D., Kurpios, N., Wagenaar, R.A., Hassell, J.A. et Matrisian, L.M. (2001). «The PEA3 subfamily of Ets transcription factors synergizes with beta-catenin-LEF-1 to activate matrix metalloproteinase transcription in intestinal tumors». *Mol Cell Biol*, 21(4), p. 1370-1383
- Crespo, I., Vital, A.L., Gonzalez-Tablas, M., Patino Mdel, C., Otero, A., Lopes, M.C., de Oliveira, C., Domingues, P., Orfao, A. et Tabernerero, M.D. (2015). «Molecular and Genomic Alterations in Glioblastoma Multiforme». *Am J Pathol*, 185(7), p. 1820-1833
- Curran, W.J., Jr., Scott, C.B., Horton, J., Nelson, J.S., Weinstein, A.S., Fischbach, A.J., Chang, C.H., Rotman, M., Asbell, S.O., Krisch, R.E. et et al. (1993). «Recursive partitioning analysis of prognostic factors in three Radiation Therapy Oncology Group malignant glioma trials». *J Natl Cancer Inst*, 85(9), p. 704-710
- Currie, J.C., Fortier, S., Sina, A., Galipeau, J., Cao, J. et Annabi, B. (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(11), p. 8142-8149

- Debnath, J., Baehrecke, E.H. et Kroemer, G. (2005). «Does autophagy contribute to cell death?». *Autophagy*, 1(2), p. 66-74
- Degenhardt, K., Mathew, R., Beaudoin, B., Bray, K., Anderson, D., Chen, G., Mukherjee, C., Shi, Y., Gelinas, C., Fan, Y., Nelson, D.A., Jin, S. et White, E. (2006). «Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis». *Cancer Cell*, 10(1), p. 51-64
- Delage, B., Luong, P., Maharaj, L., O'Riain, C., Syed, N., Crook, T., Hatzimichael, E., Papoudou-Bai, A., Mitchell, T.J., Whittaker, S.J., Cerio, R., Gribben, J., Lemoine, N., Bomalaski, J., Li, C.F., Joel, S., Fitzgibbon, J., Chen, L.T. et Szlosarek, P.W. (2012). «Promoter methylation of argininosuccinate synthetase-1 sensitises lymphomas to arginine deiminase treatment, autophagy and caspase-dependent apoptosis». *Cell Death Dis*, 3, p. e342
- Dell'Aica, I., Dona, M., Sartor, L., Pezzato, E. et Garbisa, S. (2002). «(-)Epigallocatechin-3-gallate directly inhibits MT1-MMP activity, leading to accumulation of nonactivated MMP-2 at the cell surface». *Lab Invest*, 82(12), p. 1685-1693
- Demaria, S., Pikarsky, E., Karin, M., Coussens, L.M., Chen, Y.C., El-Omar, E.M., Trinchieri, G., Dubinett, S.M., Mao, J.T., Szabo, E., Krieg, A., Weiner, G.J., Fox, B.A., Coukos, G., Wang, E., Abraham, R.T., Carbone, M. et Lotze, M.T. (2010). «Cancer and inflammation: promise for biologic therapy». *J Immunother*, 33(4), p. 335-351
- DeNardo, D.G., Barreto, J.B., Andreu, P., Vasquez, L., Tawfik, D., Kolhatkar, N. et Coussens, L.M. (2009). «CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages». *Cancer Cell*, 16(2), p. 91-102
- Deng, Q., Huang, C.M., Chen, N., Li, L., Wang, X.D., Zhang, W., Bi, F., Tang, Q.L., Li, Z.P. et Wang, W. (2012). «Chemotherapy and radiotherapy downregulate the activity and expression of DNA methyltransferase and enhance Bcl-2/E1B-19-kDa interacting protein-3-induced apoptosis in human colorectal cancer cells». *Chemotherapy*, 58(6), p. 445-453

- Deryugina, E.I., Ratnikov, B.I., Postnova, T.I., Rozanov, D.V. et Strongin, A.Y. (2002). «Processing of integrin alpha(v) subunit by membrane type 1 matrix metalloproteinase stimulates migration of breast carcinoma cells on vitronectin and enhances tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase». *J Biol Chem*, 277(12), p. 9749-9756
- Deschenes-Simard, X., Lessard, F., Gaumont-Leclerc, M.F., Bardeesy, N. et Ferbeyre, G. (2014). «Cellular senescence and protein degradation: breaking down cancer». *Cell Cycle*, 13(12), p. 1840-1858
- Ding, J., Huang, S., Wu, S., Zhao, Y., Liang, L., Yan, M., Ge, C., Yao, J., Chen, T., Wan, D., Wang, H., Gu, J., Yao, M., Li, J., Tu, H. et He, X. (2010). «Gain of miR-151 on chromosome 8q24.3 facilitates tumour cell migration and spreading through downregulating RhoGDI A». *Nat Cell Biol*, 12(4), p. 390-399
- Djavaheri-Mergny, M., Amelotti, M., Mathieu, J., Besancon, F., Bauvy, C., Souquere, S., Pierron, G. et Codogno, P. (2006). «NF-kappaB activation represses tumor necrosis factor-alpha-induced autophagy». *J Biol Chem*, 281(41), p. 30373-30382
- Dong, Y., Undyala, V.V., Gottlieb, R.A., Mentzer, R.M., Jr. et Przyklenk, K. (2010). «Autophagy: definition, molecular machinery, and potential role in myocardial ischemia-reperfusion injury». *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 15(3), p. 220-230
- Drappatz, J., Brenner, A., Wong, E.T., Eichler, A., Schiff, D., Groves, M.D., Mikkelsen, T., Rosenfeld, S., Sarantopoulos, J., Meyers, C.A., Fielding, R.M., Elian, K., Wang, X., Lawrence, B., Shing, M., Kelsey, S., Castaigne, J.P. et Wen, P.Y. (2013). «Phase I study of GRN1005 in recurrent malignant glioma». *Clin Cancer Res*, 19(6), p. 1567-1576
- Du, X., Chand, H.S. et Kisiel, W. (2003). «Human tissue factor pathway inhibitor-2 does not bind or inhibit activated matrix metalloproteinase-1». *Biochim Biophys Acta*, 1621(3), p. 242-245

- Dubois, B., Arnold, B. et Opdenakker, G. (2000). «Gelatinase B deficiency impairs reproduction». *J Clin Invest*, 106(5), p. 627-628
- Dubouloz, F., Deloche, O., Wanke, V., Cameroni, E. et De Virgilio, C. (2005). «The TOR and EGO protein complexes orchestrate microautophagy in yeast». *Mol Cell*, 19(1), p. 15-26
- Dumin, J.A., Dickeson, S.K., Stricker, T.P., Bhattacharyya-Pakrasi, M., Roby, J.D., Santoro, S.A. et Parks, W.C. (2001). «Pro-collagenase-1 (matrix metalloproteinase-1) binds the alpha(2)beta(1) integrin upon release from keratinocytes migrating on type I collagen». *J Biol Chem*, 276(31), p. 29368-29374
- Edwards, J., Scoggins, C., McMasters, K. et Martin, R. (2013). «Combined pancreas and liver therapies: resection and ablation in hepato-pancreatico-biliary malignancies». *J Surg Oncol*, 107(7), p. 709-712
- Emdad, L., Qadeer, Z.A., Bederson, L.B., Kothari, H.P., Uzzaman, M. et Germano, I.M. (2011). «Is there a common upstream link for autophagic and apoptotic cell death in human high-grade gliomas?». *Neuro Oncol*, 13(7), p. 725-735
- Emerling, B.M., Weinberg, F., Snyder, C., Burgess, Z., Mutlu, G.M., Viollet, B., Budinger, G.R. et Chandel, N.S. (2009). «Hypoxic activation of AMPK is dependent on mitochondrial ROS but independent of an increase in AMP/ATP ratio». *Free Radic Biol Med*, 46(10), p. 1386-1391
- Endo, K., Takino, T., Miyamori, H., Kinsen, H., Yoshizaki, T., Furukawa, M. et Sato, H. (2003). «Cleavage of syndecan-1 by membrane type matrix metalloproteinase-1 stimulates cell migration». *J Biol Chem*, 278(42), p. 40764-40770
- English, W.R., Puente, X.S., Freije, J.M., Knauper, V., Amour, A., Merryweather, A., Lopez-Otin, C. et Murphy, G. (2000). «Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MMP17) has tumor necrosis factor-alpha convertase

activity but does not activate pro-MMP2». *J Biol Chem*, 275(19), p. 14046-14055

Epstein, A.S., Volandes, A.E., Chen, L.Y., Gary, K.A., Li, Y., Agre, P., Levin, T.T., Reidy, D.L., Meng, R.D., Segal, N.H., Yu, K.H., Abou-Alfa, G.K., Janjigian, Y.Y., Kelsen, D.P. et O'Reilly, E.M. (2013). «A randomized controlled trial of a cardiopulmonary resuscitation video in advance care planning for progressive pancreas and hepatobiliary cancer patients». *J Palliat Med*, 16(6), p. 623-631

Eskelinen, E.L. (2011). «The dual role of autophagy in cancer». *Curr Opin Pharmacol*, 11(4), p. 294-300

Fakhoury, M. (2015). «Drug delivery approaches for the treatment of glioblastoma multiforme». *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, p. 1-9

Fang, K.M., Liu, J.J., Li, C.C., Cheng, C.C., Hsieh, Y.T., Chai, K.M., Lien, Y.A. et Tzeng, S.F. (2015). «Colchicine derivative as a potential anti-glioma compound». *J Neurooncol*, 124(3), p. 403-412

Faried, A., Arifin, M.Z., Ishiuchi, S., Kuwano, H. et Yazawa, S. (2014). «Enhanced expression of proapoptotic and autophagic proteins involved in the cell death of glioblastoma induced by synthetic glycans». *J Neurosurg*, 120(6), p. 1298-1308

Fassl, A., Tagscherer, K.E., Richter, J., Berriel Diaz, M., Alcantara Llaguno, S.R., Campos, B., Kopitz, J., Herold-Mende, C., Herzig, S., Schmidt, M.H., Parada, L.F., Wiestler, O.D. et Roth, W. (2012). «Notch1 signaling promotes survival of glioblastoma cells via EGFR-mediated induction of anti-apoptotic Mcl-1». *Oncogene*, 31(44), p. 4698-4708

Fata, J.E., Leco, K.J., Voura, E.B., Yu, H.Y., Waterhouse, P., Murphy, G., Moorehead, R.A. et Khokha, R. (2001). «Accelerated apoptosis in the Timp-3-deficient mammary gland». *J Clin Invest*, 108(6), p. 831-841

- Ferrera, R., Cuchet, D., Zaupa, C., Revol-Guyot, V., Ovize, M. et Epstein, A.L. (2005). «Efficient and non-toxic gene transfer to cardiomyocytes using novel generation amplicon vectors derived from HSV-1». *J Mol Cell Cardiol*, 38(1), p. 219-223
- Fillmore, H.L., VanMeter, T.E. et Broaddus, W.C. (2001). «Membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs): expression and function during glioma invasion». *J Neurooncol*, 53(2), p. 187-202
- Folgueras, A.R., Pendas, A.M., Sanchez, L.M. et Lopez-Otin, C. (2004). «Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies». *Int J Dev Biol*, 48(5-6), p. 411-424
- Folkins, C., Shaked, Y., Man, S., Tang, T., Lee, C.R., Zhu, Z., Hoffman, R.M. et Kerbel, R.S. (2009). «Glioma tumor stem-like cells promote tumor angiogenesis and vasculogenesis via vascular endothelial growth factor and stromal-derived factor 1». *Cancer Res*, 69(18), p. 7243-7251
- Fortier, S., Touaibia, M., Lord-Dufour, S., Galipeau, J., Roy, R. et Annabi, B. (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(2), p. 195-204
- Fray, M.J., Dickinson, R.P., Huggins, J.P. et Occeleston, N.L. (2003). «A potent, selective inhibitor of matrix metalloproteinase-3 for the topical treatment of chronic dermal ulcers». *J Med Chem*, 46(16), p. 3514-3525
- Freeman, D.J., Li, A.G., Wei, G., Li, H.H., Kertesz, N., Lesche, R., Whale, A.D., Martinez-Diaz, H., Rozengurt, N., Cardiff, R.D., Liu, X. et Wu, H. (2003). «PTEN tumor suppressor regulates p53 protein levels and activity through phosphatase-dependent and -independent mechanisms». *Cancer Cell*, 3(2), p. 117-130
- Freudenberg, J.A. et Chen, W.T. (2007). «Induction of Smad1 by MT1-MMP contributes to tumor growth». *Int J Cancer*, 121(5), p. 966-977

- Fu, L.L., Zhou, C.C., Yao, S., Yu, J.Y., Liu, B. et Bao, J.K. (2011). «Plant lectins: targeting programmed cell death pathways as antitumor agents». *Int J Biochem Cell Biol*, 43(10), p. 1442-1449
- Fu, X., Kassim, S.Y., Parks, W.C. et Heinecke, J.W. (2001). «Hypochlorous acid oxygenates the cysteine switch domain of pro-matrilysin (MMP-7). A mechanism for matrix metalloproteinase activation and atherosclerotic plaque rupture by myeloperoxidase». *J Biol Chem*, 276(44), p. 41279-41287
- Fueyo, J., Alemany, R., Gomez-Manzano, C., Fuller, G.N., Khan, A., Conrad, C.A., Liu, T.J., Jiang, H., Lemoine, M.G., Suzuki, K., Sawaya, R., Curiel, D.T., Yung, W.K. et Lang, F.F. (2003). «Preclinical characterization of the antiglioma activity of a tropism-enhanced adenovirus targeted to the retinoblastoma pathway». *J Natl Cancer Inst*, 95(9), p. 652-660
- Fueyo, J., Gomez-Manzano, C., Alemany, R., Lee, P.S., McDonnell, T.J., Mitlianga, P., Shi, Y.X., Levin, V.A., Yung, W.K. et Kyritsis, A.P. (2000). «A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo». *Oncogene*, 19(1), p. 2-12
- Fujita, N., Itoh, T., Omori, H., Fukuda, M., Noda, T. et Yoshimori, T. (2008). «The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy». *Mol Biol Cell*, 19(5), p. 2092-2100
- Fujiwara, M., Marusawa, H., Wang, H.Q., Iwai, A., Ikeuchi, K., Imai, Y., Kataoka, A., Nukina, N., Takahashi, R. et Chiba, T. (2008). «Parkin as a tumor suppressor gene for hepatocellular carcinoma». *Oncogene*, 27(46), p. 6002-6011
- Fuller, G.N., Hess, K.R., Rhee, C.H., Yung, W.K., Sawaya, R.A., Bruner, J.M. et Zhang, W. (2002). «Molecular classification of human diffuse gliomas by multidimensional scaling analysis of gene expression profiles parallels morphology-based classification, correlates with survival, and reveals clinically-relevant novel glioma subsets». *Brain Pathol*, 12(1), p. 108-116

- Fullgrabe, J., Klionsky, D.J. et Joseph, B. (2013). «Histone post-translational modifications regulate autophagy flux and outcome». *Autophagy*, 9(10), p. 1621-1623
- Fung, C., Chen, X., Grandis, J.R. et Duvvuri, U. (2012). «EGFR tyrosine kinase inhibition induces autophagy in cancer cells». *Cancer Biol Ther*, 13(14), p. 1417-1424
- Gaillard, P.J., Appeldoorn, C.C., Dorland, R., van Kregten, J., Manca, F., Vugts, D.J., Windhorst, B., van Dongen, G.A., de Vries, H.E., Maussang, D. et van Tellingen, O. (2014). «Pharmacokinetics, brain delivery, and efficacy in brain tumor-bearing mice of glutathione pegylated liposomal doxorubicin (2B3-101)». *PLoS One*, 9(1), p. e82331
- Galeffi, F. et Turner, D.A. (2012). «Exploiting metabolic differences in glioma therapy». *Curr Drug Discov Technol*, 9(4), p. 280-293
- Galluzzi, L., Pietrocola, F., Bravo-San Pedro, J.M., Amaravadi, R.K., Baehrecke, E.H., Cecconi, F., Codogno, P., Debnath, J., Gewirtz, D.A., Karantza, V., Kimmelman, A., Kumar, S., Levine, B., Maiuri, M.C., Martin, S.J., Penninger, J., Piacentini, M., Rubinsztein, D.C., Simon, H.U., Simonsen, A., Thorburn, A.M., Velasco, G., Ryan, K.M. et Kroemer, G. (2015). «Autophagy in malignant transformation and cancer progression». *EMBO J*, 34(7), p. 856-880
- Galvez, B.G., Matias-Roman, S., Yanez-Mo, M., Vicente-Manzanares, M., Sanchez-Madrid, F. et Arroyo, A.G. (2004). «Caveolae are a novel pathway for membrane-type 1 matrix metalloproteinase traffic in human endothelial cells». *Mol Biol Cell*, 15(2), p. 678-687
- Geng, J. et Klionsky, D.J. (2008). «The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series». *EMBO Rep*, 9(9), p. 859-864

- Germano, I., Swiss, V. et Casaccia, P. (2010). «Primary brain tumors, neural stem cell, and brain tumor cancer cells: where is the link?». *Neuropharmacology*, 58(6), p. 903-910
- Gervasi, D.C., Raz, A., Dehem, M., Yang, M., Kurkinen, M. et Fridman, R. (1996). «Carbohydrate-mediated regulation of matrix metalloproteinase-2 activation in normal human fibroblasts and fibrosarcoma cells». *Biochem Biophys Res Commun*, 228(2), p. 530-538
- Giaume, C., Koulakoff, A., Roux, L., Holcman, D. et Rouach, N. (2010). «Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions». *Nat Rev Neurosci*, 11(2), p. 87-99
- Gilles, C., Polette, M., Coraux, C., Tournier, J.M., Meneguzzi, G., Munaut, C., Volders, L., Rousselle, P., Birembaut, P. et Foidart, J.M. (2001). «Contribution of MT1-MMP and of human laminin-5 gamma2 chain degradation to mammary epithelial cell migration». *J Cell Sci*, 114(Pt 16), p. 2967-2976
- Gingras, D. et Beliveau, R. (2010). «Emerging concepts in the regulation of membrane-type 1 matrix metalloproteinase activity». *Biochim Biophys Acta*, 1803(1), p. 142-150
- Gingras, D., Bousquet-Gagnon, N., Langlois, S., Lachambre, M.P., Annabi, B. et Beliveau, R. (2001). «Activation of the extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) cascade by membrane-type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP)». *FEBS Lett*, 507(2), p. 231-236
- Gingras, D., Michaud, M., Di Tomasso, G., Beliveau, E., Nyalendo, C. et Beliveau, R. (2008). «Sphingosine-1-phosphate induces the association of membrane-type 1 matrix metalloproteinase with p130Cas in endothelial cells». *FEBS Lett*, 582(3), p. 399-404
- Gobitti, C., Borsatti, E., Arcicasa, M., Roncadin, M., Franchin, G., Minatel, E., Skrap, M., Zanotti, B., Tuniz, F., Cimitan, M., Capra, E., Drigo, A. et Trovo, M.G. (2011). «Treatment of recurrent high-grade gliomas with GliaSite

brachytherapy: a prospective mono-institutional Italian experience». *Tumori*, 97(5), p. 614-619

Goldsmith, J., Levine, B. et Debnath, J. (2014). «Autophagy and cancer metabolism». *Methods Enzymol*, 542, p. 25-57

Gonzalez-Polo, R.A., Pizarro-Estrella, E., Yakhine-Diop, S.M., Rodriguez-Arribas, M., Gomez-Sanchez, R., Pedro, J.M. et Fuentes, J.M. (2015). «Is the modulation of autophagy the future in the treatment of neurodegenerative diseases?». *Curr Top Med Chem*,

Gossner, G., Choi, M., Tan, L., Fogoros, S., Griffith, K.A., Kuenker, M. et Liu, J.R. (2007). «Genistein-induced apoptosis and autophagocytosis in ovarian cancer cells». *Gynecol Oncol*, 105(1), p. 23-30

Guha, A., Feldkamp, M.M., Lau, N., Boss, G. et Pawson, A. (1997). «Proliferation of human malignant astrocytomas is dependent on Ras activation». *Oncogene*, 15(23), p. 2755-2765

Guido, C., Panza, S., Santoro, M., Avena, P., Panno, M.L., Perrotta, I., Giordano, F., Casaburi, I., Catalano, S., De Amicis, F., Sotgia, F., Lisanti, M.P., Ando, S. et Aquila, S. (2012). «Estrogen receptor beta (ERbeta) produces autophagy and necroptosis in human seminoma cell line through the binding of the Sp1 on the phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10 (PTEN) promoter gene». *Cell Cycle*, 11(15), p. 2911-2921

Guo, G.F., Jiang, W.Q., Zhang, B., Cai, Y.C., Xu, R.H., Chen, X.X., Wang, F. et Xia, L.P. (2011). «Autophagy-related proteins Beclin-1 and LC3 predict cetuximab efficacy in advanced colorectal cancer». *World J Gastroenterol*, 17(43), p. 4779-4786

Gwak, H.S., Park, M.J., Park, I.C., Woo, S.H., Jin, H.O., Rhee, C.H. et Jung, H.W. (2014). «Tetraarsenic oxide-induced inhibition of malignant glioma cell invasion in vitro via a decrease in matrix metalloproteinase secretion and protein kinase B phosphorylation». *J Neurosurg*, 121(6), p. 1483-1491

- Gwinn, D.M., Shackelford, D.B., Egan, D.F., Mihaylova, M.M., Mery, A., Vasquez, D.S., Turk, B.E. et Shaw, R.J. (2008). «AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint». *Mol Cell*, 30(2), p. 214-226
- Haar, C.P., Hebbbar, P., Wallace, G.C.t., Das, A., Vandergrift, W.A., 3rd, Smith, J.A., Giglio, P., Patel, S.J., Ray, S.K. et Banik, N.L. (2012). «Drug resistance in glioblastoma: a mini review». *Neurochem Res*, 37(6), p. 1192-1200
- Haas, T.L., Stitelman, D., Davis, S.J., Apte, S.S. et Madri, J.A. (1999). «Egr-1 mediates extracellular matrix-driven transcription of membrane type 1 matrix metalloproteinase in endothelium». *J Biol Chem*, 274(32), p. 22679-22685
- Hakulinen, J., Sankkila, L., Sugiyama, N., Lehti, K. et Keski-Oja, J. (2008). «Secretion of active membrane type 1 matrix metalloproteinase (MMP-14) into extracellular space in microvesicular exosomes». *J Cell Biochem*, 105(5), p. 1211-1218
- Halassa, M.M. et Haydon, P.G. (2010). «Integrated brain circuits: astrocytic networks modulate neuronal activity and behavior». *Annu Rev Physiol*, 72, p. 335-355
- Hallgren, J., Karlson, U., Poorafshar, M., Hellman, L. et Pejler, G. (2000). «Mechanism for activation of mouse mast cell tryptase: dependence on heparin and acidic pH for formation of active tetramers of mouse mast cell protease 6». *Biochemistry*, 39(42), p. 13068-13077
- Hamblett, K.J., Kozlosky, C.J., Siu, S., Chang, W.S., Liu, H., Foltz, I.N., Trueblood, E.S., Meininger, D., Arora, T., Twomey, B., Vonderfecht, S.L., Chen, Q., Hill, J.S. et Fanslow, W.C. (2015). «AMG 595, an Anti-EGFRvIII Antibody-Drug Conjugate, Induces Potent Antitumor Activity against EGFRvIII-Expressing Glioblastoma». *Mol Cancer Ther*, 14(7), p. 1614-1624
- Han, Y.P., Tuan, T.L., Wu, H., Hughes, M. et Garner, W.L. (2001). «TNF-alpha stimulates activation of pro-MMP2 in human skin through NF-(kappa)B mediated induction of MT1-MMP». *J Cell Sci*, 114(Pt 1), p. 131-139

- Hanada, T., Noda, N.N., Satomi, Y., Ichimura, Y., Fujioka, Y., Takao, T., Inagaki, F. et Ohsumi, Y. (2007). «The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy». *J Biol Chem*, 282(52), p. 37298-37302
- Hanahan, D. et Weinberg, Robert A. (2011). «Hallmarks of Cancer: The Next Generation». *Cell*, 144(5), p. 646-674
- Hanna, J., Cheng, A.W., Saha, K., Kim, J., Lengner, C.J., Soldner, F., Cassady, J.P., Muffat, J., Carey, B.W. et Jaenisch, R. (2010). «Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs». *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(20442331), p. 9222-9227
- Hanna, R.A., Quinsay, M.N., Orogo, A.M., Giang, K., Rikka, S. et Gustafsson, A.B. (2012). «Microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) interacts with Bnip3 protein to selectively remove endoplasmic reticulum and mitochondria via autophagy». *J Biol Chem*, 287(23), p. 19094-19104
- Hart, L.S., Cunningham, J.T., Datta, T., Dey, S., Tameire, F., Lehman, S.L., Qiu, B., Zhang, H., Cerniglia, G., Bi, M., Li, Y., Gao, Y., Liu, H., Li, C., Maity, A., Thomas-Tikhonenko, A., Perl, A.E., Koong, A., Fuchs, S.Y., Diehl, J.A., Mills, I.G., Ruggero, D. et Koumenis, C. (2012). «ER stress-mediated autophagy promotes Myc-dependent transformation and tumor growth». *J Clin Invest*, 122(12), p. 4621-4634
- Hayashi-Nishino, M., Fujita, N., Noda, T., Yamaguchi, A., Yoshimori, T. et Yamamoto, A. (2009). «A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation». *Nat Cell Biol*, 11(12), p. 1433-1437
- Herman, M.P., Sukhova, G.K., Kisiel, W., Foster, D., Kehry, M.R., Libby, P. et Schonbeck, U. (2001). «Tissue factor pathway inhibitor-2 is a novel inhibitor of matrix metalloproteinases with implications for atherosclerosis». *J Clin Invest*, 107(9), p. 1117-1126

- Hernandez-Barrantes, S., Bernardo, M., Toth, M. et Fridman, R. (2002). «Regulation of membrane type-matrix metalloproteinases». *Semin Cancer Biol*, 12(2), p. 131-138
- Hidvegi, T., Ewing, M., Hale, P., Dippold, C., Beckett, C., Kemp, C., Maurice, N., Mukherjee, A., Goldbach, C., Watkins, S., Michalopoulos, G. et Perlmutter, D.H. (2010). «An autophagy-enhancing drug promotes degradation of mutant alpha1-antitrypsin Z and reduces hepatic fibrosis». *Science*, 329(5988), p. 229-232
- Higashi, S. et Miyazaki, K. (2003). «Identification of a region of beta-amyloid precursor protein essential for its gelatinase A inhibitory activity». *J Biol Chem*, 278(16), p. 14020-14028
- Hirano, W., Gotoh, I., Uekita, T. et Seiki, M. (2005). «Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cytoplasmic tail binding protein-1 (MTCBP-1) acts as an eukaryotic aci-reductone dioxygenase (ARD) in the methionine salvage pathway». *Genes Cells*, 10(6), p. 565-574
- Hiraoka, N., Allen, E., Apel, I.J., Gyetko, M.R. et Weiss, S.J. (1998). «Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins». *Cell*, 95(3), p. 365-377
- Holmbeck, K., Bianco, P., Caterina, J., Yamada, S., Kromer, M., Kuznetsov, S.A., Mankani, M., Robey, P.G., Poole, A.R., Pidoux, I., Ward, J.M. et Birkedal-Hansen, H. (1999). «MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover». *Cell*, 99(1), p. 81-92
- Homma, K., Suzuki, K. et Sugawara, H. (2011). «The Autophagy Database: an all-inclusive information resource on autophagy that provides nourishment for research». *Nucleic Acids Res*, 39, p. D986-990
- Horak, P., Crawford, A.R., Vadysirisack, D.D., Nash, Z.M., DeYoung, M.P., Sgroi, D. et Ellisen, L.W. (2010). «Negative feedback control of HIF-1 through

- REDD1-regulated ROS suppresses tumorigenesis». *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(10), p. 4675-4680
- Hori, Y.S., Hosoda, R., Akiyama, Y., Sebori, R., Wanibuchi, M., Mikami, T., Sugino, T., Suzuki, K., Maruyama, M., Tsukamoto, M., Mikuni, N., Horio, Y. et Kuno, A. (2015). «Chloroquine potentiates temozolomide cytotoxicity by inhibiting mitochondrial autophagy in glioma cells». *J Neurooncol*, 122(1), p. 11-20
- Hoshino, D., Tomari, T., Nagano, M., Koshikawa, N. et Seiki, M. (2009). «A novel protein associated with membrane-type 1 matrix metalloproteinase binds p27(kip1) and regulates RhoA activation, actin remodeling, and matrigel invasion». *J Biol Chem*, 284(40), p. 27315-27326
- Hosokawa, N., Hara, T., Kaizuka, T., Kishi, C., Takamura, A., Miura, Y., Iemura, S., Natsume, T., Takehana, K., Yamada, N., Guan, J.L., Oshiro, N. et Mizushima, N. (2009). «Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy». *Mol Biol Cell*, 20(7), p. 1981-1991
- Hou, W., Zhang, Q., Yan, Z., Chen, R., Zeh Iii, H.J., Kang, R., Lotze, M.T. et Tang, D. (2013). «Strange attractors: DAMPs and autophagy link tumor cell death and immunity». *Cell Death Dis*, 4, p. e966
- Houghton, A.M., Grisolan, J.L., Baumann, M.L., Kobayashi, D.K., Hautamaki, R.D., Nehring, L.C., Cornelius, L.A. et Shapiro, S.D. (2006). «Macrophage elastase (matrix metalloproteinase-12) suppresses growth of lung metastases». *Cancer Res*, 66(12), p. 6149-6155
- Hoyer-Hansen, M. et Jaattela, M. (2007). «Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium». *Cell Death Differ*, 14(9), p. 1576-1582
- Hu, X., Sui, X., Li, L., Huang, X., Rong, R., Su, X., Shi, Q., Mo, L., Shu, X., Kuang, Y., Tao, Q. et He, C. (2013). «Protocadherin 17 acts as a tumour suppressor inducing tumour cell apoptosis and autophagy, and is frequently methylated in gastric and colorectal cancers». *J Pathol*, 229(1), p. 62-73

- Hu, Y.L., DeLay, M., Jahangiri, A., Molinaro, A.M., Rose, S.D., Carbonell, W.S. et Aghi, M.K. (2012). «Hypoxia-induced autophagy promotes tumor cell survival and adaptation to antiangiogenic treatment in glioblastoma». *Cancer Res*, 72(7), p. 1773-1783
- Huang, P.H., Xu, A.M. et White, F.M. (2009). «Oncogenic EGFR signaling networks in glioma». *Sci Signal*, 2(87), p. re6
- Huang, X., Bai, H.M., Chen, L., Li, B. et Lu, Y.C. (2010). «Reduced expression of LC3B-II and Beclin 1 in glioblastoma multiforme indicates a down-regulated autophagic capacity that relates to the progression of astrocytic tumors». *J Clin Neurosci*, 17(12), p. 1515-1519
- Huang, Y., Mironova, M. et Lopes-Virella, M.F. (1999). «Oxidized LDL stimulates matrix metalloproteinase-1 expression in human vascular endothelial cells». *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19(11), p. 2640-2647
- Huang, Z., Cheng, L., Guryanova, O.A., Wu, Q. et Bao, S. (2010). «Cancer stem cells in glioblastoma--molecular signaling and therapeutic targeting». *Protein Cell*, 1(7), p. 638-655
- Ichimura, Y. et Komatsu, M. (2010). «Selective degradation of p62 by autophagy». *Semin Immunopathol*, 32(4), p. 431-436
- Iida, J., Wilhelmson, K.L., Ng, J., Lee, P., Morrison, C., Tam, E., Overall, C.M. et McCarthy, J.B. (2007). «Cell surface chondroitin sulfate glycosaminoglycan in melanoma: role in the activation of pro-MMP-2 (pro-gelatinase A)». *Biochem J*, 403(3), p. 553-563
- Imai, K., Yokohama, Y., Nakanishi, I., Ohuchi, E., Fujii, Y., Nakai, N. et Okada, Y. (1995). «Matrix metalloproteinase 7 (matrilysin) from human rectal carcinoma cells. Activation of the precursor, interaction with other matrix metalloproteinases and enzymic properties». *J Biol Chem*, 270(12), p. 6691-6697

- Itakura, E. et Mizushima, N. (2010). «Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins». *Autophagy*, 6(6), p. 764-776
- Ito, H., Duxbury, M., Benoit, E., Clancy, T.E., Zinner, M.J., Ashley, S.W. et Whang, E.E. (2004). «Prostaglandin E2 enhances pancreatic cancer invasiveness through an Ets-1-dependent induction of matrix metalloproteinase-2». *Cancer Res*, 64(20), p. 7439-7446
- Itoh, Y. (2015). «Membrane-type matrix metalloproteinases: Their functions and regulations». *Matrix Biol*, 44-46C, p. 207-223
- Itoh, Y., Ito, N., Nagase, H. et Seiki, M. (2008). «The second dimer interface of MT1-MMP, the transmembrane domain, is essential for ProMMP-2 activation on the cell surface». *J Biol Chem*, 283(19), p. 13053-13062
- Itoh, Y., Palmisano, R., Anilkumar, N., Nagase, H., Miyawaki, A. et Seiki, M. (2011). «Dimerization of MT1-MMP during cellular invasion detected by fluorescence resonance energy transfer». *Biochem J*, 440(3), p. 319-326
- Itoh, Y. et Seiki, M. (2006). «MT1-MMP: a potent modifier of pericellular microenvironment». *J Cell Physiol*, 206(1), p. 1-8
- Itoh, Y., Takamura, A., Ito, N., Maru, Y., Sato, H., Suenaga, N., Aoki, T. et Seiki, M. (2001). «Homophilic complex formation of MT1-MMP facilitates proMMP-2 activation on the cell surface and promotes tumor cell invasion». *EMBO J*, 20(17), p. 4782-4793
- Janji, B., Viry, E., Baginska, J., Van Moer, J. et Berchem, G. (2013). Role of Autophagy in Cancer and Tumor Progression, *Autophagy - A Double-Edged Sword - Cell Survival or Death?* Dans (Ed.), D. Y. B. (dir.), : InTech.
- Janssens, S. et Lijnen, H.R. (2006). «What has been learned about the cardiovascular effects of matrix metalloproteinases from mouse models?». *Cardiovasc Res*, 69(3), p. 585-594

- Jia, L.F., Wei, S.B., Mitchelson, K., Gao, Y., Zheng, Y.F., Meng, Z., Gan, Y.H. et Yu, G.Y. (2014). «miR-34a inhibits migration and invasion of tongue squamous cell carcinoma via targeting MMP9 and MMP14». *PLoS One*, 9(9), p. e108435
- Jiang, A., Lehti, K., Wang, X., Weiss, S.J., Keski-Oja, J. et Pei, D. (2001). «Regulation of membrane-type matrix metalloproteinase 1 activity by dynamin-mediated endocytosis». *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(24), p. 13693-13698
- Jin, F., Gao, C., Zhao, L., Zhang, H., Wang, H.T., Shao, T., Zhang, S.L., Wei, Y.J., Jiang, X.B., Zhou, Y.P. et Zhao, H.Y. (2011). «Using CD133 positive U251 glioblastoma stem cells to establish nude mice model of transplanted tumor». *Brain Res*, 1368, p. 82-90
- Jin, G., Zhang, F., Chan, K.M., Xavier Wong, H.L., Liu, B., Cheah, K.S., Liu, X., Mauch, C., Liu, D. et Zhou, Z. (2011). «MT1-MMP cleaves Dll1 to negatively regulate Notch signalling to maintain normal B-cell development». *EMBO J*, 30(11), p. 2281-2293
- Jo, Y.K., Park, S.J., Shin, J.H., Kim, Y., Hwang, J.J., Cho, D.H. et Kim, J.C. (2011). «ARP101, a selective MMP-2 inhibitor, induces autophagy-associated cell death in cancer cells». *Biochem Biophys Res Commun*, 404(4), p. 1039-1043
- Johannessen, T.C. et Bjerkvig, R. (2012). «Molecular mechanisms of temozolomide resistance in glioblastoma multiforme». *Expert Rev Anticancer Ther*, 12(5), p. 635-642
- Jonchere, B., Belanger, A., Guette, C., Barre, B. et Coqueret, O. (2013). «STAT3 as a new autophagy regulator». *JAKSTAT*, 2(3), p. e24353
- Jones, D.T., Kocialkowski, S., Liu, L., Pearson, D.M., Backlund, L.M., Ichimura, K. et Collins, V.P. (2008). «Tandem duplication producing a novel oncogenic BRAF fusion gene defines the majority of pilocytic astrocytomas». *Cancer Res*, 68(21), p. 8673-8677

- Kaina, B., Christmann, M., Naumann, S. et Roos, W.P. (2007). «MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents». *DNA Repair (Amst)*, 6(8), p. 1079-1099
- Kajita, M., Itoh, Y., Chiba, T., Mori, H., Okada, A., Kinoh, H. et Seiki, M. (2001). «Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration». *J Cell Biol*, 153(5), p. 893-904
- Kanki, T., Wang, K., Cao, Y., Baba, M. et Klionsky, D.J. (2009). «Atg32 is a mitochondrial protein that confers selectivity during mitophagy». *Dev Cell*, 17(1), p. 98-109
- Kanzawa, T., Zhang, L., Xiao, L., Germano, I.M., Kondo, Y. et Kondo, S. (2005). «Arsenic trioxide induces autophagic cell death in malignant glioma cells by upregulation of mitochondrial cell death protein BNIP3». *Oncogene*, 24(6), p. 980-991
- Kaper, F., Dornhoefer, N. et Giaccia, A.J. (2006). «Mutations in the PI3K/PTEN/TSC2 pathway contribute to mammalian target of rapamycin activity and increased translation under hypoxic conditions». *Cancer Res*, 66(3), p. 1561-1569
- Karantza-Wadsworth, V., Patel, S., Kravchuk, O., Chen, G., Mathew, R., Jin, S. et White, E. (2007). «Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis». *Genes Dev*, 21(13), p. 1621-1635
- Karsli-Uzunbas, G., Guo, J.Y., Price, S., Teng, X., Laddha, S.V., Khor, S., Kalaany, N.Y., Jacks, T., Chan, C.S., Rabinowitz, J.D. et White, E. (2014). «Autophagy is required for glucose homeostasis and lung tumor maintenance». *Cancer Discov*, 4(8), p. 914-927
- Kassem, K.M., Clevenger, M.H., Szandzik, D.L., Peterson, E. et Harding, P. (2014). «PGE2 reduces MMP-14 and increases plasminogen activator inhibitor-1 in cardiac fibroblasts». *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 113-115, p. 62-68

- Kato, H., Kato, S., Kumabe, T., Sonoda, Y., Yoshimoto, T., Kato, S., Han, S.Y., Suzuki, T., Shibata, H., Kanamaru, R. et Ishioka, C. (2000). «Functional evaluation of p53 and PTEN gene mutations in gliomas». *Clin Cancer Res*, 6(10), p. 3937-3943
- Kaushik, S. et Cuervo, A.M. (2008). «Chaperone-mediated autophagy». *Methods Mol Biol*, 445, p. 227-244
- Kawamura, N., Sun-Wada, G.H., Aoyama, M., Harada, A., Takasuga, S., Sasaki, T. et Wada, Y. (2012). «Delivery of endosomes to lysosomes via microautophagy in the visceral endoderm of mouse embryos». *Nat Commun*, 3, p. 1071
- Kaza, N., Kohli, L. et Roth, K.A. (2012). «Autophagy in brain tumors: a new target for therapeutic intervention». *Brain Pathol*, 22(1), p. 89-98
- Kefas, B., Godlewski, J., Comeau, L., Li, Y., Abounader, R., Hawkinson, M., Lee, J., Fine, H., Chiocca, E.A., Lawler, S. et Purow, B. (2008). «microRNA-7 inhibits the epidermal growth factor receptor and the Akt pathway and is down-regulated in glioblastoma». *Cancer Res*, 68(10), p. 3566-3572
- Kessenbrock, K., Plaks, V. et Werb, Z. (2010). «Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment». *Cell*, 141(1), p. 52-67
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B. et Guan, K.L. (2011). «AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1». *Nat Cell Biol*, 13(2), p. 132-141
- Kim, K.H. et Lee, M.S. (2014). «Autophagy--a key player in cellular and body metabolism». *Nat Rev Endocrinol*, 10(6), p. 322-337
- Kim, K.W., Ha, K.Y., Park, J.B., Woo, Y.K., Chung, H.N. et An, H.S. (2005). «Expressions of membrane-type I matrix metalloproteinase, Ki-67 protein, and type II collagen by chondrocytes migrating from cartilage endplate into nucleus pulposus in rat intervertebral discs: a cartilage endplate-fracture

- model using an intervertebral disc organ culture». *Spine (Phila Pa 1976)*, 30(12), p. 1373-1378
- Kim, S., Huang, W., Mottillo, E.P., Sohail, A., Ham, Y.A., Conley-Lacomb, M.K., Kim, C.J., Tzivion, G., Kim, H.R., Wang, S., Chen, Y.Q. et Fridman, R. (2010). «Posttranslational regulation of membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) in mouse PTEN null prostate cancer cells: Enhanced surface expression and differential O-glycosylation of MT1-MMP». *Biochim Biophys Acta*, 1803(11), p. 1287-1297
- Kim, S.H., Turnbull, J. et Guimond, S. (2011). «Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor». *J Endocrinol*, 209(2), p. 139-151
- Kim, Y.S., Lee, H.A., Lim, J.Y., Kim, Y., Jung, C.H., Yoo, S.H. et Kim, Y. (2014). «beta-Carotene inhibits neuroblastoma cell invasion and metastasis in vitro and in vivo by decreasing level of hypoxia-inducible factor-1alpha». *J Nutr Biochem*, 25(6), p. 655-664
- King, J.S. (2012). «Mechanical stress meets autophagy: potential implications for physiology and pathology». *Trends Mol Med*, 18(10), p. 583-588
- Kirisako, T., Ichimura, Y., Okada, H., Kabeya, Y., Mizushima, N., Yoshimori, T., Ohsumi, M., Takao, T., Noda, T. et Ohsumi, Y. (2000). «The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway». *J Cell Biol*, 151(2), p. 263-276
- Kitajima, Y., Ide, T., Ohtsuka, T. et Miyazaki, K. (2008). «Induction of hepatocyte growth factor activator gene expression under hypoxia activates the hepatocyte growth factor/c-Met system via hypoxia inducible factor-1 in pancreatic cancer». *Cancer Sci*, 99(7), p. 1341-1347
- Klein, T. et Bischoff, R. (2011). «Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases». *Amino Acids*, 41(2), p. 271-290

Klionsky, D.J. (2005). «The molecular machinery of autophagy: unanswered questions». *J Cell Sci*, 118(Pt 1), p. 7-18

Klionsky, D.J., Abdalla, F.C., Abeliovich, H., Abraham, R.T., Acevedo-Arozena, A., Adeli, K., Agholme, L., Agnello, M., Agostinis, P., Aguirre-Ghiso, J.A., Ahn, H.J., Ait-Mohamed, O., Ait-Si-Ali, S., Akematsu, T., Akira, S., Al-Younes, H.M., Al-Zeer, M.A., Albert, M.L., Albin, R.L., Alegre-Abarrategui, J., Aleo, M.F., Alirezai, M., Almasan, A., Almonte-Becerril, M., Amano, A., Amaravadi, R., Amarnath, S., Amer, A.O., Andrieu-Abadie, N., Anantharam, V., Ann, D.K., Anoopkumar-Dukie, S., Aoki, H., Apostolova, N., Arancia, G., Aris, J.P., Asanuma, K., Asare, N.Y., Ashida, H., Askanas, V., Askew, D.S., Auberger, P., Baba, M., Backues, S.K., Baehrecke, E.H., Bahr, B.A., Bai, X.Y., Bailly, Y., Baiocchi, R., Baldini, G., Balduini, W., Ballabio, A., Bamber, B.A., Bampton, E.T., Banhegyi, G., Bartholomew, C.R., Bassham, D.C., Bast, R.C., Jr., Batoko, H., Bay, B.H., Beau, I., Bechet, D.M., Begley, T.J., Behl, C., Behrends, C., Bekri, S., Bellaire, B., Bendall, L.J., Benetti, L., Berliocchi, L., Bernardi, H., Bernassola, F., Besteiro, S., Bhatia-Kissova, I., Bi, X., Biard-Piechaczyk, M., Blum, J.S., Boise, L.H., Bonaldo, P., Boone, D.L., Bornhauser, B.C., Bortoluci, K.R., Bossis, I., Bost, F., Bourquin, J.P., Boya, P., Boyer-Guittaut, M., Bozhkov, P.V., Brady, N.R., Brancolini, C., Brech, A., Brenman, J.E., Brennand, A., Bresnick, E.H., Brest, P., Bridges, D., Bristol, M.L., Brookes, P.S., Brown, E.J., Brumell, J.H., Brunetti-Pierri, N., Brunk, U.T., Bulman, D.E., Bultman, S.J., Bultynck, G., Burbulla, L.F., Bursch, W., Butchar, J.P., Buzgariu, W., Bydlowski, S.P., Cadwell, K., Cahova, M., Cai, D., Cai, J., Cai, Q., Calabretta, B., Calvo-Garrido, J., Camougrand, N., Campanella, M., Campos-Salinas, J., Candi, E., Cao, L., Caplan, A.B., Carding, S.R., Cardoso, S.M., Carew, J.S., Carlin, C.R., Carmignac, V., Carneiro, L.A., Carra, S., Caruso, R.A., Casari, G., Casas, C., Castino, R., Cebollero, E., Cecconi, F., Celli, J., Chaachouay, H., Chae, H.J., Chai, C.Y., Chan, D.C., Chan, E.Y., Chang, R.C., Che, C.M., Chen, C.C., Chen, G.C., Chen, G.Q., Chen, M., Chen, Q., Chen, S.S., Chen, W., Chen, X., Chen, X., Chen, X., Chen, Y.G., Chen, Y., Chen, Y., Chen, Y.J., Chen, Z., Cheng, A., Cheng, C.H., Cheng, Y., Cheong, H., Cheong, J.H., Cherry, S., Chess-Williams, R., Cheung, Z.H., Chevet, E., Chiang, H.L., Chiarelli, R., Chiba, T., Chin, L.S., Chiou, S.H., Chisari, F.V., Cho, C.H., Cho, D.H., Choi, A.M., Choi, D., Choi, K.S., Choi, M.E., Chouaib, S., Choubey, D., Choubey, V., Chu, C.T., Chuang, T.H., Chueh, S.H., Chun, T., Chwae, Y.J., Chye, M.L., Ciarcia, R., Ciriolo, M.R., Clague, M.J., Clark, R.S., Clarke, P.G., Clarke, R., Codogno, P., Coller, H.A., Colombo, M.I., Comincini, S., Condello, M., Condorelli, F., Cookson, M.R., Coombs, G.H., Coppens, I., Corbalan, R., Cossart, P., Costelli, P., Costes, S., Coto-Montes, A., Couve, E., Coxon, F.P., Cregg, J.M., Crespo, J.L., Cronje, M.J., Cuervo, A.M., Cullen,

J.J., Czaja, M.J., D'Amelio, M., Darfeuille-Michaud, A., Davids, L.M., Davies, F.E., De Felici, M., de Groot, J.F., de Haan, C.A., De Martino, L., De Milito, A., De Tata, V., Debnath, J., Degterev, A., Dehay, B., Delbridge, L.M., Demarchi, F., Deng, Y.Z., Dengjel, J., Dent, P., Denton, D., Deretic, V., Desai, S.D., Devenish, R.J., Di Gioacchino, M., Di Paolo, G., Di Pietro, C., Diaz-Araya, G., Diaz-Laviada, I., Diaz-Meco, M.T., Diaz-Nido, J., Dikic, I., Dinesh-Kumar, S.P., Ding, W.X., Distelhorst, C.W., Diwan, A., Djavaheri-Mergny, M., Dokudovskaya, S., Dong, Z., Dorsey, F.C., Dosenko, V., Dowling, J.J., Doxsey, S., Dreux, M., Drew, M.E., Duan, Q., Duchosal, M.A., Duff, K., Dugail, I., Durbeej, M., Duszenko, M., Edelstein, C.L., Edinger, A.L., Egea, G., Eichinger, L., Eissa, N.T., Ekmekcioglu, S., El-Deiry, W.S., Elazar, Z., Elgendy, M., Ellerby, L.M., Eng, K.E., Engelbrecht, A.M., Engelender, S., Erenpreisa, J., Escalante, R., Esclatine, A., Eskelinen, E.L., Espert, L., Espina, V., Fan, H., Fan, J., Fan, Q.W., Fan, Z., Fang, S., Fang, Y., Fanto, M., Fanzani, A., Farkas, T., Farre, J.C., Faure, M., Fechheimer, M., Feng, C.G., Feng, J., Feng, Q., Feng, Y., Fesus, L., Feuer, R., Figueiredo-Pereira, M.E., Fimia, G.M., Fingar, D.C., Finkbeiner, S., Finkel, T., Finley, K.D., Fiorito, F., Fisher, E.A., Fisher, P.B., Flajolet, M., Florez-McClure, M.L., Florio, S., Fon, E.A., Fornai, F., Fortunato, F., Fotedar, R., Fowler, D.H., Fox, H.S., Franco, R., Frankel, L.B., Fransen, M., Fuentes, J.M., Fueyo, J., Fujii, J., Fujisaki, K., Fujita, E., Fukuda, M., Furukawa, R.H., Gaestel, M., Gailly, P., Gajewska, M., Galliot, B., Galy, V., Ganesh, S., Ganetzky, B., Ganley, I.G., Gao, F.B., Gao, G.F., Gao, J., Garcia, L., Garcia-Manero, G., Garcia-Marcos, M., Garmyn, M., Gartel, A.L., Gatti, E., Gautel, M., Gawriluk, T.R., Gegg, M.E., Geng, J., Germain, M., Gestwicki, J.E., Gewirtz, D.A., Ghavami, S., Ghosh, P., Giammarioli, A.M., Giatromanolaki, A.N., Gibson, S.B., Gilkerson, R.W., Ginger, M.L., Ginsberg, H.N., Golab, J., Goligorsky, M.S., Golstein, P., Gomez-Manzano, C., Goncu, E., Gongora, C., Gonzalez, C.D., Gonzalez, R., Gonzalez-Estevez, C., Gonzalez-Polo, R.A., Gonzalez-Rey, E., Gorbunov, N.V., Gorski, S., Goruppi, S., Gottlieb, R.A., Gozuacik, D., Granato, G.E., Grant, G.D., Green, K.N., Gregorc, A., Gros, F., Grose, C., Grunt, T.W., Gual, P., Guan, J.L., Guan, K.L., Guichard, S.M., Gukovskaya, A.S., Gukovsky, I., Gunst, J., Gustafsson, A.B., Halayko, A.J., Hale, A.N., Halonen, S.K., Hamasaki, M., Han, F., Han, T., Hancock, M.K., Hansen, M., Harada, H., Harada, M., Hardt, S.E., Harper, J.W., Harris, A.L., Harris, J., Harris, S.D., Hashimoto, M., Haspel, J.A., Hayashi, S., Hazelhurst, L.A., He, C., He, Y.W., Hebert, M.J., Heidenreich, K.A., Helfrich, M.H., Helgason, G.V., Henske, E.P., Herman, B., Herman, P.K., Hetz, C., Hilfiker, S., Hill, J.A., Hocking, L.J., Hofman, P., Hofmann, T.G., Hohfeld, J., Holyoake, T.L., Hong, M.H., Hood, D.A., Hotamisligil, G.S., Houwerzijl, E.J., Hoyer-Hansen, M., Hu, B., Hu, C.A., Hu, H.M., Hua, Y., Huang, C., Huang, J., Huang, S., Huang, W.P., Huber, T.B., Huh, W.K., Hung, T.H., Hupp, T.R., Hur, G.M., Hurley, J.B., Hussain, S.N., Hussey, P.J., Hwang, J.J.,

Hwang, S., Ichihara, A., Ilkhanizadeh, S., Inoki, K., Into, T., Iovane, V., Iovanna, J.L., Ip, N.Y., Isaka, Y., Ishida, H., Isidoro, C., Isobe, K., Iwasaki, A., Izquierdo, M., Izumi, Y., Jaakkola, P.M., Jaattela, M., Jackson, G.R., Jackson, W.T., Janji, B., Jendrach, M., Jeon, J.H., Jeung, E.B., Jiang, H., Jiang, H., Jiang, J.X., Jiang, M., Jiang, Q., Jiang, X., Jiang, X., Jimenez, A., Jin, M., Jin, S., Joe, C.O., Johansen, T., Johnson, D.E., Johnson, G.V., Jones, N.L., Joseph, B., Joseph, S.K., Joubert, A.M., Juhasz, G., Juillerat-Jeanneret, L., Jung, C.H., Jung, Y.K., Kaarniranta, K., Kaasik, A., Kabuta, T., Kadowaki, M., Kagedal, K., Kamada, Y., Kaminsky, V.O., Kampinga, H.H., Kanamori, H., Kang, C., Kang, K.B., Kang, K.I., Kang, R., Kang, Y.A., Kanki, T., Kanneganti, T.D., Kanno, H., Kanthasamy, A.G., Kanthasamy, A., Karantza, V., Kaushal, G.P., Kaushik, S., Kawazoe, Y., Ke, P.Y., Kehrl, J.H., Kelekar, A., Kerkhoff, C., Kessel, D.H., Khalil, H., Kiel, J.A., Kiger, A.A., Kihara, A., Kim, D.R., Kim, D.H., Kim, D.H., Kim, E.K., Kim, H.R., Kim, J.S., Kim, J.H., Kim, J.C., Kim, J.K., Kim, P.K., Kim, S.W., Kim, Y.S., Kim, Y., Kimchi, A., Kimmelman, A.C., King, J.S., Kinsella, T.J., Kirkin, V., Kirshenbaum, L.A., Kitamoto, K., Kitazato, K., Klein, L., Klimecki, W.T., Klucken, J., Knecht, E., Ko, B.C., Koch, J.C., Koga, H., Koh, J.Y., Koh, Y.H., Koike, M., Komatsu, M., Kominami, E., Kong, H.J., Kong, W.J., Korolchuk, V.I., Kotake, Y., Koukourakis, M.I., Kouri Flores, J.B., Kovacs, A.L., Kraft, C., Krainc, D., Kramer, H., Kretz-Remy, C., Krichevsky, A.M., Kroemer, G., Kruger, R., Krut, O., Ktistakis, N.T., Kuan, C.Y., Kucharczyk, R., Kumar, A., Kumar, R., Kumar, S., Kundu, M., Kung, H.J., Kurz, T., Kwon, H.J., La Spada, A.R., Lafont, F., Lamark, T., Landry, J., Lane, J.D., Lapaquette, P., Laporte, J.F., Laszlo, L., Lavandero, S., Lavoie, J.N., Layfield, R., Lazo, P.A., Le, W., Le Cam, L., Ledbetter, D.J., Lee, A.J., Lee, B.W., Lee, G.M., Lee, J., Lee, J.H., Lee, M., Lee, M.S., Lee, S.H., Leeuwenburgh, C., Legembre, P., Legouis, R., Lehmann, M., Lei, H.Y., Lei, Q.Y., Leib, D.A., Leiro, J., Lemasters, J.J., Lemoine, A., Lesniak, M.S., Lev, D., Levenson, V.V., Levine, B., Levy, E., Li, F., Li, J.L., Li, L., Li, S., Li, W., Li, X.J., Li, Y.B., Li, Y.P., Liang, C., Liang, Q., Liao, Y.F., Liberski, P.P., Lieberman, A., Lim, H.J., Lim, K.L., Lim, K., Lin, C.F., Lin, F.C., Lin, J., Lin, J.D., Lin, K., Lin, W.W., Lin, W.C., Lin, Y.L., Linden, R., Lingor, P., Lippincott-Schwartz, J., Lisanti, M.P., Liton, P.B., Liu, B., Liu, C.F., Liu, K., Liu, L., Liu, Q.A., Liu, W., Liu, Y.C., Liu, Y., Lockshin, R.A., Lok, C.N., Lonial, S., Loos, B., Lopez-Berestein, G., Lopez-Otin, C., Lossi, L., Lotze, M.T., Low, P., Lu, B., Lu, B., Lu, B., Lu, Z., Luciano, F., Lukacs, N.W., Lund, A.H., Lynch-Day, M.A., Ma, Y., Macian, F., MacKeigan, J.P., Macleod, K.F., Madeo, F., Maiuri, L., Maiuri, M.C., Malagoli, D., Malicdan, M.C., Malorni, W., Man, N., Mandelkew, E.M., Manon, S., Manov, I., Mao, K., Mao, X., Mao, Z., Marambaud, P., Marazziti, D., Marcel, Y.L., Marchbank, K., Marchetti, P., Marciniak, S.J., Marcondes, M., Mardi, M., Marfe, G., Marino, G., Markaki, M., Marten, M.R., Martin, S.J., Martinand-Mari, C., Martinet, W., Martinez-

Vicente, M., Masini, M., Matarrese, P., Matsuo, S., Matteoni, R., Mayer, A., Mazure, N.M., McConkey, D.J., McConnell, M.J., McDermott, C., McDonald, C., McInerney, G.M., McKenna, S.L., McLaughlin, B., McLean, P.J., McMaster, C.R., McQuibban, G.A., Meijer, A.J., Meisler, M.H., Melendez, A., Melia, T.J., Melino, G., Mena, M.A., Menendez, J.A., Menna-Barreto, R.F., Menon, M.B., Menzies, F.M., Mercer, C.A., Merighi, A., Merry, D.E., Meschini, S., Meyer, C.G., Meyer, T.F., Miao, C.Y., Miao, J.Y., Michels, P.A., Michiels, C., Mijaljica, D., Milojkovic, A., Minucci, S., Miracco, C., Miranti, C.K., Mitroulis, I., Miyazawa, K., Mizushima, N., Mograbi, B., Mohseni, S., Molero, X., Mollereau, B., Mollinedo, F., Momoi, T., Monastyrska, I., Monick, M.M., Monteiro, M.J., Moore, M.N., Mora, R., Moreau, K., Moreira, P.I., Moriyasu, Y., Moscat, J., Mostowy, S., Mottram, J.C., Motyl, T., Moussa, C.E., Muller, S., Muller, S., Munger, K., Munz, C., Murphy, L.O., Murphy, M.E., Musaro, A., Mysorekar, I., Nagata, E., Nagata, K., Nahimana, A., Nair, U., Nakagawa, T., Nakahira, K., Nakano, H., Nakatogawa, H., Nanjundan, M., Naqvi, N.I., Narendra, D.P., Narita, M., Navarro, M., Nawrocki, S.T., Nazarko, T.Y., Nemchenko, A., Netea, M.G., Neufeld, T.P., Ney, P.A., Nezis, I.P., Nguyen, H.P., Nie, D., Nishino, I., Nislow, C., Nixon, R.A., Noda, T., Noegel, A.A., Nogalska, A., Noguchi, S., Notterpek, L., Novak, I., Nozaki, T., Nukina, N., Nurnberger, T., Nyfeler, B., Obara, K., Oberley, T.D., Oddo, S., Ogawa, M., Ohashi, T., Okamoto, K., Oleinick, N.L., Oliver, F.J., Olsen, L.J., Olsson, S., Opota, O., Osborne, T.F., Ostrander, G.K., Otsu, K., Ou, J.H., Ouimet, M., Overholtzer, M., Ozpolat, B., Paganetti, P., Pagnini, U., Pallet, N., Palmer, G.E., Palumbo, C., Pan, T., Panaretakis, T., Pandey, U.B., Papackova, Z., Papassideri, I., Paris, I., Park, J., Park, O.K., Parys, J.B., Parzych, K.R., Patschan, S., Patterson, C., Pattingre, S., Pawelek, J.M., Peng, J., Perlmutter, D.H., Perrotta, I., Perry, G., Pervaiz, S., Peter, M., Peters, G.J., Petersen, M., Petrovski, G., Phang, J.M., Piacentini, M., Pierre, P., Pierrefite-Carle, V., Pierron, G., Pinkas-Kramarski, R., Piras, A., Piri, N., Plataniias, L.C., Poggeler, S., Poirot, M., Poletti, A., Pous, C., Pozuelo-Rubio, M., Praetorius-Ibba, M., Prasad, A., Prescott, M., Priault, M., Produit-Zengaffinen, N., Progulsk-Fox, A., Proikas-Cezanne, T., Przedborski, S., Przyklenk, K., Puertollano, R., Puyal, J., Qian, S.B., Qin, L., Qin, Z.H., Quaggin, S.E., Raben, N., Rabinowich, H., Rabkin, S.W., Rahman, I., Rami, A., Ramm, G., Randall, G., Randow, F., Rao, V.A., Rathmell, J.C., Ravikumar, B., Ray, S.K., Reed, B.H., Reed, J.C., Reggiori, F., Regnier-Vigouroux, A., Reichert, A.S., Reiners, J.J., Jr., Reiter, R.J., Ren, J., Revuelta, J.L., Rhodes, C.J., Ritis, K., Rizzo, E., Robbins, J., Roberge, M., Roca, H., Roccheri, M.C., Rocchi, S., Rodemann, H.P., Rodriguez de Cordoba, S., Rohrer, B., Roninson, I.B., Rosen, K., Rost-Roszkowska, M.M., Rouis, M., Rouschop, K.M., Rovetta, F., Rubin, B.P., Rubinsztein, D.C., Ruckdeschel, K., Rucker, E.B., 3rd, Rudich, A., Rudolf, E., Ruiz-Opazo, N., Russo, R., Rusten, T.E., Ryan, K.M., Rytter, S.W., Sabatini, D.M., Sadoshima, J., Saha,

T., Saitoh, T., Sakagami, H., Sakai, Y., Salekdeh, G.H., Salomoni, P., Salvaterra, P.M., Salvesen, G., Salvioli, R., Sanchez, A.M., Sanchez-Alcazar, J.A., Sanchez-Prieto, R., Sandri, M., Sankar, U., Sansanwal, P., Santambrogio, L., Saran, S., Sarkar, S., Sarwal, M., Sasakawa, C., Sasnauskiene, A., Sass, M., Sato, K., Sato, M., Schapira, A.H., Scharl, M., Schatzl, H.M., Scheper, W., Schiaffino, S., Schneider, C., Schneider, M.E., Schneider-Stock, R., Schoenlein, P.V., Schorderet, D.F., Schuller, C., Schwartz, G.K., Scorrano, L., Sealy, L., Seglen, P.O., Segura-Aguilar, J., Seiliez, I., Seleverstov, O., Sell, C., Seo, J.B., Separovic, D., Setaluri, V., Setoguchi, T., Settembre, C., Shacka, J.J., Shanmugam, M., Shapiro, I.M., Shaulian, E., Shaw, R.J., Shelhamer, J.H., Shen, H.M., Shen, W.C., Sheng, Z.H., Shi, Y., Shibuya, K., Shidoji, Y., Shieh, J.J., Shih, C.M., Shimada, Y., Shimizu, S., Shintani, T., Shirihai, O.S., Shore, G.C., Sibirny, A.A., Sidhu, S.B., Sikorska, B., Silva-Zacarin, E.C., Simmons, A., Simon, A.K., Simon, H.U., Simone, C., Simonsen, A., Sinclair, D.A., Singh, R., Sinha, D., Sinicrope, F.A., Sirko, A., Siu, P.M., Sivridis, E., Skop, V., Skulachev, V.P., Slack, R.S., Smaili, S.S., Smith, D.R., Soengas, M.S., Soldati, T., Song, X., Sood, A.K., Soong, T.W., Sotgia, F., Spector, S.A., Spies, C.D., Springer, W., Srinivasula, S.M., Stefanis, L., Steffan, J.S., Stendel, R., Stenmark, H., Stephanou, A., Stern, S.T., Sternberg, C., Stork, B., Stralfors, P., Subauste, C.S., Sui, X., Sulzer, D., Sun, J., Sun, S.Y., Sun, Z.J., Sung, J.J., Suzuki, K., Suzuki, T., Swanson, M.S., Swanton, C., Sweeney, S.T., Sy, L.K., Szabadkai, G., Tabas, I., Taegtmeyer, H., Tafani, M., Takacs-Vellai, K., Takano, Y., Takegawa, K., Takemura, G., Takeshita, F., Talbot, N.J., Tan, K.S., Tanaka, K., Tanaka, K., Tang, D., Tang, D., Tanida, I., Tannous, B.A., Tavernarakis, N., Taylor, G.S., Taylor, G.A., Taylor, J.P., Terada, L.S., Terman, A., Tettamanti, G., Thevissen, K., Thompson, C.B., Thorburn, A., Thumm, M., Tian, F., Tian, Y., Tocchini-Valentini, G., Tolkovsky, A.M., Tomino, Y., Tonges, L., Tooze, S.A., Tournier, C., Tower, J., Towns, R., Trajkovic, V., Travassos, L.H., Tsai, T.F., Tschan, M.P., Tsubata, T., Tsung, A., Turk, B., Turner, L.S., Tyagi, S.C., Uchiyama, Y., Ueno, T., Umekawa, M., Umemiya-Shirafuji, R., Unni, V.K., Vaccaro, M.I., Valente, E.M., Van den Berghe, G., van der Klei, I.J., van Doorn, W., van Dyk, L.F., van Egmond, M., van Grunsven, L.A., Vandenabeele, P., Vandenbergh, W.P., Vanhorebeek, I., Vaquero, E.C., Velasco, G., Vellai, T., Vicencio, J.M., Vierstra, R.D., Vila, M., Vindis, C., Viola, G., Viscomi, M.T., Voitsekhovskaja, O.V., von Haefen, C., Votruba, M., Wada, K., Wade-Martins, R., Walker, C.L., Walsh, C.M., Walter, J., Wan, X.B., Wang, A., Wang, C., Wang, D., Wang, F., Wang, F., Wang, G., Wang, H., Wang, H.G., Wang, H.D., Wang, J., Wang, K., Wang, M., Wang, R.C., Wang, X., Wang, X., Wang, Y.J., Wang, Y., Wang, Z., Wang, Z.C., Wang, Z., Wansink, D.G., Ward, D.M., Watada, H., Waters, S.L., Webster, P., Wei, L., Weihl, C.C., Weiss, W.A., Welford, S.M., Wen, L.P., Whitehouse, C.A., Whitton, J.L., Whitworth, A.J., Wileman, T., Wiley,

- J.W., Wilkinson, S., Willbold, D., Williams, R.L., Williamson, P.R., Wouters, B.G., Wu, C., Wu, D.C., Wu, W.K., Wyttenbach, A., Xavier, R.J., Xi, Z., Xia, P., Xiao, G., Xie, Z., Xie, Z., Xu, D.Z., Xu, J., Xu, L., Xu, X., Yamamoto, A., Yamamoto, A., Yamashina, S., Yamashita, M., Yan, X., Yanagida, M., Yang, D.S., Yang, E., Yang, J.M., Yang, S.Y., Yang, W., Yang, W.Y., Yang, Z., Yao, M.C., Yao, T.P., Yeganeh, B., Yen, W.L., Yin, J.J., Yin, X.M., Yoo, O.J., Yoon, G., Yoon, S.Y., Yorimitsu, T., Yoshikawa, Y., Yoshimori, T., Yoshimoto, K., You, H.J., Youle, R.J., Younes, A., Yu, L., Yu, L., Yu, S.W., Yu, W.H., Yuan, Z.M., Yue, Z., Yun, C.H., Yuzaki, M., Zabirnyk, O., Silva-Zacarin, E., Zacks, D., Zacksenhaus, E., Zaffaroni, N., Zakeri, Z., Zeh, H.J., 3rd, Zeitlin, S.O., Zhang, H., Zhang, H.L., Zhang, J., Zhang, J.P., Zhang, L., Zhang, L., Zhang, M.Y., Zhang, X.D., Zhao, M., Zhao, Y.F., Zhao, Y., Zhao, Z.J., Zheng, X., Zhivotovsky, B., Zhong, Q., Zhou, C.Z., Zhu, C., Zhu, W.G., Zhu, X.F., Zhu, X., Zhu, Y., Zoladek, T., Zong, W.X., Zorzano, A., Zschocke, J. et Zuckerbraun, B. (2012). «Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy». *Autophagy*, 8(4), p. 445-544
- Klionsky, D.J., Baehrecke, E.H., Brumell, J.H., Chu, C.T., Codogno, P., Cuervo, A.M., Debnath, J., Deretic, V., Elazar, Z., Eskelinen, E.L., Finkbeiner, S., Fueyo-Margareto, J., Gewirtz, D., Jaattela, M., Kroemer, G., Levine, B., Melia, T.J., Mizushima, N., Rubinsztein, D.C., Simonsen, A., Thorburn, A., Thumm, M. et Tooze, S.A. (2011). «A comprehensive glossary of autophagy-related molecules and processes (2nd edition)». *Autophagy*, 7(11), p. 1273-1294
- Klionsky, D.J. et Codogno, P. (2013). «The mechanism and physiological function of macroautophagy». *J Innate Immun*, 5(5), p. 427-433
- Knauper, V., Bailey, L., Worley, J.R., Soloway, P., Patterson, M.L. et Murphy, G. (2002). «Cellular activation of proMMP-13 by MT1-MMP depends on the C-terminal domain of MMP-13». *FEBS Lett*, 532(1-2), p. 127-130
- Knobbe, C.B., Merlo, A. et Reifenberger, G. (2002). «Pten signaling in gliomas». *Neuro Oncol*, 4(3), p. 196-211
- Kobayashi, S., Volden, P., Timm, D., Mao, K., Xu, X. et Liang, Q. (2010). «Transcription factor GATA4 inhibits doxorubicin-induced autophagy and cardiomyocyte death». *J Biol Chem*, 285(1), p. 793-804

- Kogel, D., Fulda, S. et Mittelbronn, M. (2010). «Therapeutic exploitation of apoptosis and autophagy for glioblastoma». *Anticancer Agents Med Chem*, 10(6), p. 438-449
- Kohn, M., Benito, J.M., Ortiz Mellet, C., Lindhorst, T.K. et Garcia Fernandez, J.M. (2004). «Functional evaluation of carbohydrate-centred glycoclusters by enzyme-linked lectin assay: ligands for concanavalin A». *Chembiochem*, 5(6), p. 771-777
- Kondo, Y., Kanzawa, T., Sawaya, R. et Kondo, S. (2005). «The role of autophagy in cancer development and response to therapy». *Nat Rev Cancer*, 5(9), p. 726-734
- Koshikawa, N., Mizushima, H., Minegishi, T., Iwamoto, R., Mekada, E. et Seiki, M. (2010). «Membrane type 1-matrix metalloproteinase cleaves off the NH₂-terminal portion of heparin-binding epidermal growth factor and converts it into a heparin-independent growth factor». *Cancer Res*, 70(14), p. 6093-6103
- Koziol, A., Martin-Alonso, M., Clemente, C., Gonzalo, P. et Arroyo, A.G. (2012). «Site-specific cellular functions of MT1-MMP». *Eur J Cell Biol*, 91(11-12), p. 889-895
- Krampert, M., Bloch, W., Sasaki, T., Bugnon, P., Rulicke, T., Wolf, E., Aumailley, M., Parks, W.C. et Werner, S. (2004). «Activities of the matrix metalloproteinase stromelysin-2 (MMP-10) in matrix degradation and keratinocyte organization in wounded skin». *Mol Biol Cell*, 15(12), p. 5242-5254
- Kroemer, G. et Levine, B. (2008). «Autophagic cell death: the story of a misnomer». *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(12), p. 1004-1010
- Kroemer, G., Marino, G. et Levine, B. (2010). «Autophagy and the integrated stress response». *Mol Cell*, 40(2), p. 280-293

- Kubli, D.A., Ycaza, J.E. et Gustafsson, A.B. (2007). «Bnip3 mediates mitochondrial dysfunction and cell death through Bax and Bak». *Biochem J*, 405(3), p. 407-415
- Kular, J.K., Basu, S. et Sharma, R.I. (2014). «The extracellular matrix: Structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering». *J Tissue Eng*, 5, p. 2041731414557112
- Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., Tokuhisa, T. et Mizushima, N. (2004). «The role of autophagy during the early neonatal starvation period». *Nature*, 432(7020), p. 1032-1036
- Kumar, A., Deopujari, C. et Karmarkar, V. (2012). «A case of glioblastoma multiforme with long term survival: can we predict the outcome?». *Turk Neurosurg*, 22(3), p. 378-381
- Kunz, J.B., Schwarz, H. et Mayer, A. (2004). «Determination of four sequential stages during microautophagy in vitro». *J Biol Chem*, 279(11), p. 9987-9996
- Kwan, J.A., Schulze, C.J., Wang, W., Leon, H., Sariahmetoglu, M., Sung, M., Sawicka, J., Sims, D.E., Sawicki, G. et Schulz, R. (2004). «Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is present in the nucleus of cardiac myocytes and is capable of cleaving poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in vitro». *FASEB J*, 18(6), p. 690-692
- Labbe, D., Provencal, M., Lamy, S., Boivin, D., Gingras, D. et Beliveau, R. (2009). «The flavonols quercetin, kaempferol, and myricetin inhibit hepatocyte growth factor-induced medulloblastoma cell migration». *J Nutr*, 139(4), p. 646-652
- Labrecque, L., Nyalendo, C., Langlois, S., Durocher, Y., Roghi, C., Murphy, G., Gingras, D. et Beliveau, R. (2004). «Src-mediated tyrosine phosphorylation of caveolin-1 induces its association with membrane type 1 matrix metalloproteinase». *J Biol Chem*, 279(50), p. 52132-52140

- Labrie, M. et St-Pierre, Y. (2013). «Epigenetic regulation of mmp-9 gene expression». *Cell Mol Life Sci*, 70(17), p. 3109-3124
- Lafleur, M.A., Handsley, M.M., Knauper, V., Murphy, G. et Edwards, D.R. (2002). «Endothelial tubulogenesis within fibrin gels specifically requires the activity of membrane-type-matrix metalloproteinases (MT-MMPs)». *J Cell Sci*, 115(Pt 17), p. 3427-3438
- Lafleur, M.A., Mercuri, F.A., Ruangpanit, N., Seiki, M., Sato, H. et Thompson, E.W. (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*, 281(10), p. 6826-6840
- Lalo, U., Palygin, O., Rasooli-Nejad, S., Andrew, J., Haydon, P.G. et Pankratov, Y. (2014). «Exocytosis of ATP from astrocytes modulates phasic and tonic inhibition in the neocortex». *PLoS Biol*, 12(1), p. e1001747
- Lamy, S., Akla, N., Ouanouki, A., Lord-Dufour, S. et Beliveau, R. (2012). «Diet-derived polyphenols inhibit angiogenesis by modulating the interleukin-6/STAT3 pathway». *Exp Cell Res*, 318(13), p. 1586-1596
- Lamy, S., Lachambre, M.P., Lord-Dufour, S. et Beliveau, R. (2010). «Propranolol suppresses angiogenesis in vitro: inhibition of proliferation, migration, and differentiation of endothelial cells». *Vascul Pharmacol*, 53(5-6), p. 200-208
- Lamy, S., Ouanouki, A., Beliveau, R. et Desrosiers, R.R. (2014). «Olive oil compounds inhibit vascular endothelial growth factor receptor-2 phosphorylation». *Exp Cell Res*, 322(1), p. 89-98
- Langlois, S., Di Tomasso, G., Boivin, D., Roghi, C., Murphy, G., Gingras, D. et Beliveau, R. (2005). «Membrane type 1-matrix metalloproteinase induces endothelial cell morphogenic differentiation by a caspase-dependent mechanism». *Exp Cell Res*, 307(2), p. 452-464

- Larsen, M., Artym, V.V., Green, J.A. et Yamada, K.M. (2006). «The matrix reorganized: extracellular matrix remodeling and integrin signaling». *Curr Opin Cell Biol*, 18(5), p. 463-471
- Lathia, J.D., Gallagher, J., Heddleston, J.M., Wang, J., Eyler, C.E., Macswords, J., Wu, Q., VasANJI, A., McLendon, R.E., Hjelmeland, A.B. et Rich, J.N. (2010). «Integrin alpha 6 regulates glioblastoma stem cells». *Cell Stem Cell*, 6(5), p. 421-432
- Le Mercier, M., Fortin, S., Mathieu, V., Kiss, R. et Lefranc, F. (2010). «Galectins and gliomas». *Brain Pathol*, 20(1), p. 17-27
- Le Mercier, M., Lefranc, F., Mijatovic, T., Debeir, O., Haibe-Kains, B., Bontempi, G., Decaestecker, C., Kiss, R. et Mathieu, V. (2008). «Evidence of galectin-1 involvement in glioma chemoresistance». *Toxicol Appl Pharmacol*, 229(2), p. 172-183
- Leco, K.J., Waterhouse, P., Sanchez, O.H., Gowing, K.L., Poole, A.R., Wakeham, A., Mak, T.W. et Khokha, R. (2001). «Spontaneous air space enlargement in the lungs of mice lacking tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3)». *J Clin Invest*, 108(6), p. 817-829
- Lee, A.Y., Fan, C.C., Chen, Y.A., Cheng, C.W., Sung, Y.J., Hsu, C.P. et Kao, T.Y. (2015). «Curcumin Inhibits Invasiveness and Epithelial-Mesenchymal Transition in Oral Squamous Cell Carcinoma Through Reducing Matrix Metalloproteinase 2, 9 and Modulating p53-E-Cadherin Pathway». *Integr Cancer Ther*, 14(5), p. 484-490
- Lee, I.H. et Finkel, T. (2009). «Regulation of autophagy by the p300 acetyltransferase». *J Biol Chem*, 284(10), p. 6322-6328
- Lee, S.T., Chu, K., Oh, H.J., Im, W.S., Lim, J.Y., Kim, S.K., Park, C.K., Jung, K.H., Lee, S.K., Kim, M. et Roh, J.K. (2011). «Let-7 microRNA inhibits the proliferation of human glioblastoma cells». *J Neurooncol*, 102(1), p. 19-24

- Lee, W.Y., Huang, S.C., Tzeng, C.C., Chang, T.L. et Hsu, K.F. (2007). «Alterations of metastasis-related genes identified using an oligonucleotide microarray of genistein-treated HCC1395 breast cancer cells». *Nutr Cancer*, 58(2), p. 239-246
- Leeman, M.F., Curran, S. et Murray, G.I. (2002). «The structure, regulation, and function of human matrix metalloproteinase-13». *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 37(3), p. 149-166
- Lehti, K., Lohi, J., Juntunen, M.M., Pei, D. et Keski-Oja, J. (2002). «Oligomerization through hemopexin and cytoplasmic domains regulates the activity and turnover of membrane-type 1 matrix metalloproteinase». *J Biol Chem*, 277(10), p. 8440-8448
- Lehti, K., Valtanen, H., Wickstrom, S.A., Lohi, J. et Keski-Oja, J. (2000). «Regulation of membrane-type-1 matrix metalloproteinase activity by its cytoplasmic domain». *J Biol Chem*, 275(20), p. 15006-15013
- Lei, H.Y. et Chang, C.P. (2007). «Induction of autophagy by concanavalin A and its application in anti-tumor therapy». *Autophagy*, 3(4), p. 402-404
- Lei, H.Y. et Chang, C.P. (2009). «Lectin of Concanavalin A as an anti-hepatoma therapeutic agent». *J Biomed Sci*, 16, p. 10
- Levy, J.M. et Thorburn, A. (2011). «Targeting autophagy during cancer therapy to improve clinical outcomes». *Pharmacol Ther*, 131(1), p. 130-141
- Li, C., Liu, Y., Liu, H., Zhang, W., Shen, C., Cho, K., Chen, X., Peng, F., Bi, Y., Hou, X., Yang, Z., Zheng, Z., Wang, K., Wang, X., Zhang, J., Zhong, C., Zou, H., Zhang, X. et Zhao, S. (2015). «Impact of autophagy inhibition at different stages on cytotoxic effect of autophagy inducer in glioblastoma cells». *Cell Physiol Biochem*, 35(4), p. 1303-1316
- Li, H., Wang, X., Zhang, N., Gottipati, M.K., Parpura, V. et Ding, S. (2014). «Imaging of mitochondrial Ca²⁺ dynamics in astrocytes using cell-specific mitochondria-targeted GCaMP5G/6s: mitochondrial Ca²⁺ uptake and

cytosolic Ca²⁺ availability via the endoplasmic reticulum store». *Cell Calcium*, 56(6), p. 457-466

Li, K.K., Li, F., Li, Q.S., Yang, K. et Jin, B. (2013). «DNA methylation as a target of epigenetic therapeutics in cancer». *Anticancer Agents Med Chem*, 13(2), p. 242-247

Li, L., Akers, K., Eisen, A.Z. et Seltzer, J.L. (1997). «Activation of gelatinase A (72-kDa type IV collagenase) induced by monensin in normal human fibroblasts». *Exp Cell Res*, 232(2), p. 322-330

Li, L., Tan, J., Miao, Y., Lei, P. et Zhang, Q. (2015). «ROS and Autophagy: Interactions and Molecular Regulatory Mechanisms». *Cell Mol Neurobiol*,

Li, R., Li, H., Yan, W., Yang, P., Bao, Z., Zhang, C., Jiang, T. et You, Y. (2015). «Genetic and clinical characteristics of primary and secondary glioblastoma is associated with differential molecular subtype distribution». *Oncotarget*, 6(9), p. 7318-7324

Li, W., Ma, J., Ma, Q., Li, B., Han, L., Liu, J., Xu, Q., Duan, W., Yu, S., Wang, F. et Wu, E. (2013). «Resveratrol inhibits the epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer cells via suppression of the PI-3K/Akt/NF-kappaB pathway». *Curr Med Chem*, 20(33), p. 4185-4194

Li, W., Zhu, S., Li, J., Assa, A., Jundoria, A., Xu, J., Fan, S., Eissa, N.T., Tracey, K.J., Sama, A.E. et Wang, H. (2011). «EGCG stimulates autophagy and reduces cytoplasmic HMGB1 levels in endotoxin-stimulated macrophages». *Biochem Pharmacol*, 81(9), p. 1152-1163

Li, W.W., Yu, J.Y., Xu, H.L. et Bao, J.K. (2011). «Concanavalin A: a potential anti-neoplastic agent targeting apoptosis, autophagy and anti-angiogenesis for cancer therapeutics». *Biochem Biophys Res Commun*, 414(2), p. 282-286

Li, X.Y., Ota, I., Yana, I., Sabeh, F. et Weiss, S.J. (2008). «Molecular dissection of the structural machinery underlying the tissue-invasive activity of membrane type-1 matrix metalloproteinase». *Mol Biol Cell*, 19(8), p. 3221-3233

- Li, Y., Jin, X., Kang, S., Wang, Y., Du, H., Zhang, J., Guo, W., Wang, N. et Fang, S. (2006). «Polymorphisms in the promoter regions of the matrix metalloproteinases-1, -3, -7, and -9 and the risk of epithelial ovarian cancer in China». *Gynecol Oncol*, 101(1), p. 92-96
- Li, Z., Chen, B., Wu, Y., Jin, F., Xia, Y. et Liu, X. (2010). «Genetic and epigenetic silencing of the beclin 1 gene in sporadic breast tumors». *BMC Cancer*, 10, p. 98
- Li, Z. et Zhu, W.G. (2014). «Targeting histone deacetylases for cancer therapy: from molecular mechanisms to clinical implications». *Int J Biol Sci*, 10(7), p. 757-770
- Liang, W., Wu, X., Fang, W., Zhao, Y., Yang, Y., Hu, Z., Xue, C., Zhang, J., Zhang, J., Ma, Y., Zhou, T., Yan, Y., Hou, X., Qin, T., Dinglin, X., Tian, Y., Huang, P., Huang, Y., Zhao, H. et Zhang, L. (2014). «Network meta-analysis of erlotinib, gefitinib, afatinib and icotinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring EGFR mutations». *PLoS One*, 9(2), p. e85245
- Liao, X., Siu, M.K., Au, C.W., Wong, E.S., Chan, H.Y., Ip, P.P., Ngan, H.Y. et Cheung, A.N. (2009). «Aberrant activation of hedgehog signaling pathway in ovarian cancers: effect on prognosis, cell invasion and differentiation». *Carcinogenesis*, 30(1), p. 131-140
- Lim, Y.C., Roberts, T.L., Day, B.W., Harding, A., Kozlov, S., Kijas, A.W., Ensbey, K.S., Walker, D.G. et Lavin, M.F. (2012). «A role for homologous recombination and abnormal cell-cycle progression in radioresistance of glioma-initiating cells». *Mol Cancer Ther*, 11(9), p. 1863-1872
- Limb, G.A., Matter, K., Murphy, G., Cambrey, A.D., Bishop, P.N., Morris, G.E. et Khaw, P.T. (2005). «Matrix metalloproteinase-1 associates with intracellular organelles and confers resistance to lamin A/C degradation during apoptosis». *Am J Pathol*, 166(5), p. 1555-1563

- Lin, S.S. et Levitan, I.B. (1991). «Concanavalin A: a tool to investigate neuronal plasticity». *Trends Neurosci*, 14(7), p. 273-277
- Liu, B., Cheng, Y., Zhang, B., Bian, H.J. et Bao, J.K. (2009). «Polygonatum cyrtoneura lectin induces apoptosis and autophagy in human melanoma A375 cells through a mitochondria-mediated ROS-p38-p53 pathway». *Cancer Lett*, 275(1), p. 54-60
- Liu, B., Li, G., Wang, X. et Liu, Y. (2014). «A furin inhibitor downregulates osteosarcoma cell migration by downregulating the expression levels of MT1-MMP via the Wnt signaling pathway». *Oncol Lett*, 7(4), p. 1033-1038
- Liu, J.J., Lin, M., Yu, J.Y., Liu, B. et Bao, J.K. (2011). «Targeting apoptotic and autophagic pathways for cancer therapeutics». *Cancer Lett*, 300(2), p. 105-114
- Liu, W.M., Huang, P., Kar, N., Burgett, M., Muller-Greven, G., Nowacki, A.S., Distelhorst, C.W., Lathia, J.D., Rich, J.N., Kappes, J.C. et Gladson, C.L. (2013). «Lyn facilitates glioblastoma cell survival under conditions of nutrient deprivation by promoting autophagy». *PLoS One*, 8(8), p. e70804
- Liu, W.T., Lin, C.H., Hsiao, M. et Gean, P.W. (2011). «Minocycline inhibits the growth of glioma by inducing autophagy». *Autophagy*, 7(2), p. 166-175
- Liu, Z., Luo, Y., Zhou, T.T. et Zhang, W.Z. (2013). «Could plant lectins become promising anti-tumour drugs for causing autophagic cell death?». *Cell Prolif*, 46(5), p. 509-515
- Llano, E., Pendas, A.M., Freije, J.P., Nakano, A., Knauper, V., Murphy, G. et Lopez-Otin, C. (1999). «Identification and characterization of human MT5-MMP, a new membrane-bound activator of progelatinase a overexpressed in brain tumors». *Cancer Res*, 59(11), p. 2570-2576
- Loskutov, Y.V., Kozyulina, P.Y., Kozyreva, V.K., Ice, R.J., Jones, B.C., Roston, T.J., Smolkin, M.B., Ivanov, A.V., Wysolmerski, R.B. et Pugacheva, E.N. (2015). «NEDD9/Arf6-dependent endocytic trafficking of matrix metalloproteinase

- 14: a novel mechanism for blocking mesenchymal cell invasion and metastasis of breast cancer». *Oncogene*, 34(28), p. 3662-3675
- Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvet, A., Scheithauer, B.W. et Kleihues, P. (2007). «The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system». *Acta Neuropathol*, 114(2), p. 97-109
- Lovett, D.H., Cheng, S., Cape, L., Pollock, A.S. et Mertens, P.R. (2010). «YB-1 alters MT1-MMP trafficking and stimulates MCF-7 breast tumor invasion and metastasis». *Biochem Biophys Res Commun*, 398(3), p. 482-488
- Lu, P., Weaver, V.M. et Werb, Z. (2012). «The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression». *J Cell Biol*, 196(4), p. 395-406
- Lu, Z., Luo, R.Z., Lu, Y., Zhang, X., Yu, Q., Khare, S., Kondo, S., Kondo, Y., Yu, Y., Mills, G.B., Liao, W.S. et Bast, R.C., Jr. (2008). «The tumor suppressor gene ARHI regulates autophagy and tumor dormancy in human ovarian cancer cells». *J Clin Invest*, 118(12), p. 3917-3929
- Lucchiari, C., Botturi, A., Silvani, A., Lamperti, E., Gaviani, P., Innocenti, A., Finocchiaro, C.Y., Masiero, M. et Pravettoni, G. (2015). «Cognitive strategies and quality of life of patients with high-grade glioma». *Support Care Cancer*,
- Luo, D., Mari, B., Stoll, I. et Anglard, P. (2002). «Alternative splicing and promoter usage generates an intracellular stromelysin 3 isoform directly translated as an active matrix metalloproteinase». *J Biol Chem*, 277(28), p. 25527-25536
- Luo, X.H., Liao, E.Y., Liao, H.J., Jin, Y., Zhou, H.D. et Huang, G. (2003). «Recombinant matrix metalloproteinase-14 catalytic domain induces apoptosis in human osteoblastic SaOS-2 cells». *J Endocrinol Invest*, 26(11), p. 1111-1116
- Macpherson, I.R., Rainero, E., Mitchell, L.E., van den Berghe, P.V., Speirs, C., Dozynkiewicz, M.A., Chaudhary, S., Kalna, G., Edwards, J., Timpson, P. et Norman, J.C. (2014). «CLIC3 controls recycling of late endosomal MT1-

MMP and dictates invasion and metastasis in breast cancer». *J Cell Sci*, 127(Pt 18), p. 3893-3901

Maddodi, N., Huang, W., Havighurst, T., Kim, K., Longley, B.J. et Setaluri, V. (2010). «Induction of autophagy and inhibition of melanoma growth in vitro and in vivo by hyperactivation of oncogenic BRAF». *J Invest Dermatol*, 130(6), p. 1657-1667

Malanga, M. et Althaus, F.R. (2005). «The role of poly(ADP-ribose) in the DNA damage signaling network». *Biochem Cell Biol*, 83(3), p. 354-364

Manon-Jensen, T., Mulhaupt, H.A. et Couchman, J.R. (2013). «Mapping of matrix metalloproteinase cleavage sites on syndecan-1 and syndecan-4 ectodomains». *FEBS J*, 280(10), p. 2320-2331

Markovic, D.S., Vinnakota, K., Chirasani, S., Synowitz, M., Raguet, H., Stock, K., Sliwa, M., Lehmann, S., Kalin, R., van Rooijen, N., Holmbeck, K., Heppner, F.L., Kiwit, J., Matyash, V., Lehnardt, S., Kaminska, B., Glass, R. et Kettenmann, H. (2009). «Gliomas induce and exploit microglial MT1-MMP expression for tumor expansion». *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(30), p. 12530-12535

Markovic, D.S., Vinnakota, K., van Rooijen, N., Kiwit, J., Synowitz, M., Glass, R. et Kettenmann, H. (2011). «Minocycline reduces glioma expansion and invasion by attenuating microglial MT1-MMP expression». *Brain Behav Immun*, 25(4), p. 624-628

Massova, I., Kotra, L.P., Fridman, R. et Mobashery, S. (1998). «Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification». *FASEB J*, 12(12), p. 1075-1095

Mathew, R., Karantza-Wadsworth, V. et White, E. (2007). «Role of autophagy in cancer». *Nat Rev Cancer*, 7(17972889), p. 961-967

- Mathew, R., Kongara, S., Beaudoin, B., Karp, C.M., Bray, K., Degenhardt, K., Chen, G., Jin, S. et White, E. (2007). «Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability». *Genes Dev*, 21(11), p. 1367-1381
- Matrone, A., Grossi, V., Chiacchiera, F., Fina, E., Cappellari, M., Caringella, A.M., Di Naro, E., Loverro, G. et Simone, C. (2010). «p38alpha is required for ovarian cancer cell metabolism and survival». *Int J Gynecol Cancer*, 20(2), p. 203-211
- Matus, S., Lisbona, F., Torres, M., Leon, C., Thielen, P. et Hetz, C. (2008). «The stress rheostat: an interplay between the unfolded protein response (UPR) and autophagy in neurodegeneration». *Curr Mol Med*, 8(3), p. 157-172
- Mayo, L.D., Dixon, J.E., Durden, D.L., Tonks, N.K. et Donner, D.B. (2002). «PTEN protects p53 from Mdm2 and sensitizes cancer cells to chemotherapy». *J Biol Chem*, 277(7), p. 5484-5489
- McLaughlin, N., Annabi, B., Lachambre, M.P., Kim, K.S., Bahary, J.P., Mouldjian, R. et Beliveau, R. (2006). «Combined low dose ionizing radiation and green tea-derived epigallocatechin-3-gallate treatment induces human brain endothelial cells death». *J Neurooncol*, 80(2), p. 111-121
- McNeill, R.S., Schmid, R.S., Bash, R.E., Vitucci, M., White, K.K., Werneke, A.M., Constance, B.H., Huff, B. et Miller, C.R. (2014). «Modeling astrocytoma pathogenesis in vitro and in vivo using cortical astrocytes or neural stem cells from conditional, genetically engineered mice». *J Vis Exp*(90), p. e51763
- Messaoudi, K., Clavreul, A. et Lagarce, F. (2015). «Toward an effective strategy in glioblastoma treatment. Part I: resistance mechanisms and strategies to overcome resistance of glioblastoma to temozolomide». *Drug Discov Today*, 20(7), p. 899-905
- Messaritou, G., East, L., Roghi, C., Isacke, C.M. et Yarwood, H. (2009). «Membrane type-1 matrix metalloproteinase activity is regulated by the endocytic collagen receptor Endo180». *J Cell Sci*, 122(Pt 22), p. 4042-4048

- Mijaljica, D., Prescott, M. et Devenish, R.J. (2011). «Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum». *Autophagy*, 7(7), p. 673-682
- Miyamori, H., Takino, T., Kobayashi, Y., Tokai, H., Itoh, Y., Seiki, M. et Sato, H. (2001). «Claudin promotes activation of pro-matrix metalloproteinase-2 mediated by membrane-type matrix metalloproteinases». *J Biol Chem*, 276(30), p. 28204-28211
- Mizoguchi, M., Guan, Y., Yoshimoto, K., Hata, N., Amano, T., Nakamizo, A. et Sasaki, T. (2013). «Clinical implications of microRNAs in human glioblastoma». *Front Oncol*, 3, p. 19
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M. et Klionsky, D.J. (2008). «Autophagy fights disease through cellular self-digestion». *Nature*, 451(7182), p. 1069-1075
- Mizushima, N., Yoshimori, T. et Ohsumi, Y. (2011). «The role of Atg proteins in autophagosome formation». *Annu Rev Cell Dev Biol*, 27, p. 107-132
- Mori, H., Tomari, T., Koshikawa, N., Kajita, M., Itoh, Y., Sato, H., Tojo, H., Yana, I. et Seiki, M. (2002). «CD44 directs membrane-type 1 matrix metalloproteinase to lamellipodia by associating with its hemopexin-like domain». *EMBO J*, 21(15), p. 3949-3959
- Morrison, C.J., Butler, G.S., Bigg, H.F., Roberts, C.R., Soloway, P.D. et Overall, C.M. (2001). «Cellular activation of MMP-2 (gelatinase A) by MT2-MMP occurs via a TIMP-2-independent pathway». *J Biol Chem*, 276(50), p. 47402-47410
- Morrison, C.J. et Overall, C.M. (2006). «TIMP independence of matrix metalloproteinase (MMP)-2 activation by membrane type 2 (MT2)-MMP is determined by contributions of both the MT2-MMP catalytic and hemopexin C domains». *J Biol Chem*, 281(36), p. 26528-26539

- Morselli, E., Galluzzi, L., Kepp, O., Marino, G., Michaud, M., Vitale, I., Maiuri, M.C. et Kroemer, G. (2011). «Oncosuppressive functions of autophagy». *Antioxid Redox Signal*, 14(11), p. 2251-2269
- Moruno-Manchon, J.F., Perez-Jimenez, E. et Knecht, E. (2013). «Glucose induces autophagy under starvation conditions by a p38 MAPK-dependent pathway». *Biochem J*, 449(2), p. 497-506
- Mott, J.D., Thomas, C.L., Rosenbach, M.T., Takahara, K., Greenspan, D.S. et Banda, M.J. (2000). «Post-translational proteolytic processing of procollagen C-terminal proteinase enhancer releases a metalloproteinase inhibitor». *J Biol Chem*, 275(2), p. 1384-1390
- Mrugala, M.M., Crew, L.K., Fink, J.R. et Spence, A.M. (2012). «Carboplatin and bevacizumab for recurrent malignant glioma». *Oncol Lett*, 4(5), p. 1082-1086
- Muller, O., Sattler, T., Flotenmeyer, M., Schwarz, H., Plattner, H. et Mayer, A. (2000). «Autophagic tubes: vacuolar invaginations involved in lateral membrane sorting and inverse vesicle budding». *J Cell Biol*, 151(3), p. 519-528
- Murphy, G. et Nagase, H. (2008). «Progress in matrix metalloproteinase research». *Mol Aspects Med*, 29(5), p. 290-308
- Nagase, H., Visse, R. et Murphy, G. (2006). «Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs». *Cardiovasc Res*, 69(3), p. 562-573
- Nagelkerke, A., Sweep, F.C., Geurts-Moespot, A., Bussink, J. et Span, P.N. (2015). «Therapeutic targeting of autophagy in cancer. Part I: molecular pathways controlling autophagy». *Semin Cancer Biol*, 31, p. 89-98
- Nakahara, H., Howard, L., Thompson, E.W., Sato, H., Seiki, M., Yeh, Y. et Chen, W.T. (1997). «Transmembrane/cytoplasmic domain-mediated membrane type 1-matrix metalloprotease docking to invadopodia is required for cell invasion». *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(15), p. 7959-7964

- Nakai, A., Yamaguchi, O., Takeda, T., Higuchi, Y., Hikoso, S., Taniike, M., Omiya, S., Mizote, I., Matsumura, Y., Asahi, M., Nishida, K., Hori, M., Mizushima, N. et Otsu, K. (2007). «The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress». *Nat Med*, 13(5), p. 619-624
- Nakamoto, T., Yamagata, T., Sakai, R., Ogawa, S., Honda, H., Ueno, H., Hirano, N., Yazaki, Y. et Hirai, H. (2000). «CIZ, a zinc finger protein that interacts with p130(cas) and activates the expression of matrix metalloproteinases». *Mol Cell Biol*, 20(5), p. 1649-1658
- Nakayama, I., Shibasaki, M., Yashima-Abo, A., Miura, F., Sugiyama, T., Masuda, T. et Maesawa, C. (2013). «Loss of HOXD10 expression induced by upregulation of miR-10b accelerates the migration and invasion activities of ovarian cancer cells». *Int J Oncol*, 43(1), p. 63-71
- Namas, R.A., Metukuri, M.R., Dhupar, R., Velosa, C., Jefferson, B.S., Myer, E., Constantine, G.M., Billiar, T.R., Vodovotz, Y. et Zamora, R. (2011). «Hypoxia-induced overexpression of BNIP3 is not dependent on hypoxia-inducible factor 1alpha in mouse hepatocytes». *Shock*, 36(2), p. 196-202
- Narita, Y., Nagane, M., Mishima, K., Huang, H.J., Furnari, F.B. et Cavenee, W.K. (2002). «Mutant epidermal growth factor receptor signaling down-regulates p27 through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in glioblastomas». *Cancer Res*, 62(22), p. 6764-6769
- Natsumeda, M., Aoki, H., Miyahara, H., Yajima, N., Uzuka, T., Toyoshima, Y., Kakita, A., Takahashi, H. et Fujii, Y. (2011). «Induction of autophagy in temozolomide treated malignant gliomas». *Neuropathology*, 31(5), p. 486-493
- Nedjic, J., Aichinger, M., Mizushima, N. et Klein, L. (2009). «Macroautophagy, endogenous MHC II loading and T cell selection: the benefits of breaking the rules». *Curr Opin Immunol*, 21(1), p. 92-97
- Neyns, B., Sadones, J., Joosens, E., Bouttens, F., Verbeke, L., Baurain, J.F., D'Hondt, L., Strauven, T., Chaskis, C., In't Veld, P., Michotte, A. et De Greve, J.

- (2009). «Stratified phase II trial of cetuximab in patients with recurrent high-grade glioma». *Ann Oncol*, 20(9), p. 1596-1603
- Ng, T.L., Leprivier, G., Robertson, M.D., Chow, C., Martin, M.J., Laderoute, K.R., Davicioni, E., Triche, T.J. et Sorensen, P.H. (2012). «The AMPK stress response pathway mediates anoikis resistance through inhibition of mTOR and suppression of protein synthesis». *Cell Death Differ*, 19(3), p. 501-510
- Ng, W.L., Yan, D., Zhang, X., Mo, Y.Y. et Wang, Y. (2010). «Over-expression of miR-100 is responsible for the low-expression of ATM in the human glioma cell line: M059J». *DNA Repair (Amst)*, 9(11), p. 1170-1175
- Nick, A.M., Stone, R.L., Armaiz-Pena, G., Ozpolat, B., Tekedereli, I., Graybill, W.S., Landen, C.N., Villares, G., Vivas-Mejia, P., Bottsford-Miller, J., Kim, H.S., Lee, J.S., Kim, S.M., Baggerly, K.A., Ram, P.T., Deavers, M.T., Coleman, R.L., Lopez-Berestein, G. et Sood, A.K. (2011). «Silencing of p130cas in ovarian carcinoma: a novel mechanism for tumor cell death». *J Natl Cancer Inst*, 103(21), p. 1596-1612
- Nie, J. et Pei, D. (2003). «Direct activation of pro-matrix metalloproteinase-2 by leukolysin/membrane-type 6 matrix metalloproteinase/matrix metalloproteinase 25 at the asn(109)-Tyr bond». *Cancer Res*, 63(20), p. 6758-6762
- Niemoeller, O.M., Niyazi, M., Corradini, S., Zehentmayr, F., Li, M., Lauber, K. et Belka, C. (2011). «MicroRNA expression profiles in human cancer cells after ionizing radiation». *Radiat Oncol*, 6, p. 29
- Nivon, M., Richet, E., Codogno, P., Arrigo, A.P. et Kretz-Remy, C. (2009). «Autophagy activation by NFkappaB is essential for cell survival after heat shock». *Autophagy*, 5(6), p. 766-783
- Nobusawa, S., Watanabe, T., Kleihues, P. et Ohgaki, H. (2009). «IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas». *Clin Cancer Res*, 15(19), p. 6002-6007

- Noushmehr, H., Weisenberger, D.J., Diefes, K., Phillips, H.S., Pujara, K., Berman, B.P., Pan, F., Pelloski, C.E., Sulman, E.P., Bhat, K.P., Verhaak, R.G., Hoadley, K.A., Hayes, D.N., Perou, C.M., Schmidt, H.K., Ding, L., Wilson, R.K., Van Den Berg, D., Shen, H., Bengtsson, H., Neuvial, P., Cope, L.M., Buckley, J., Herman, J.G., Baylin, S.B., Laird, P.W. et Aldape, K. (2010). «Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma». *Cancer Cell*, 17(5), p. 510-522
- Nowikovsky, K., Reipert, S., Devenish, R.J. et Schweyen, R.J. (2007). «Mdm38 protein depletion causes loss of mitochondrial K⁺/H⁺ exchange activity, osmotic swelling and mitophagy». *Cell Death Differ*, 14(9), p. 1647-1656
- Nyalendo, C., Michaud, M., Beaulieu, E., Roghi, C., Murphy, G., Gingras, D. et Beliveau, R. (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(21), p. 15690-15699
- Ogata, M., Hino, S., Saito, A., Morikawa, K., Kondo, S., Kanemoto, S., Murakami, T., Taniguchi, M., Tanii, I., Yoshinaga, K., Shiosaka, S., Hammarback, J.A., Urano, F. et Imaizumi, K. (2006). «Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress». *Mol Cell Biol*, 26(24), p. 9220-9231
- Ogden, A.T., Waziri, A.E., Lochhead, R.A., Fusco, D., Lopez, K., Ellis, J.A., Kang, J., Assanah, M., McKhann, G.M., Sisti, M.B., McCormick, P.C., Canoll, P. et Bruce, J.N. (2008). «Identification of A2B5+CD133- tumor-initiating cells in adult human gliomas». *Neurosurgery*, 62(2), p. 505-514; discussion 514-505
- Oh, J., Takahashi, R., Kondo, S., Mizoguchi, A., Adachi, E., Sasahara, R.M., Nishimura, S., Imamura, Y., Kitayama, H., Alexander, D.B., Ide, C., Horan, T.P., Arakawa, T., Yoshida, H., Nishikawa, S., Itoh, Y., Seiki, M., Itoharu, S., Takahashi, C. et Noda, M. (2001). «The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis». *Cell*, 107(6), p. 789-800
- Ohgaki, H. et Kleihues, P. (2005). «Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas». *J Neuropathol Exp Neurol*, 64(6), p. 479-489

- Ohgaki, H. et Kleihues, P. (2013). «The definition of primary and secondary glioblastoma». *Clin Cancer Res*, 19(4), p. 764-772
- Ohtake, Y., Tojo, H. et Seiki, M. (2006). «Multifunctional roles of MT1-MMP in myofiber formation and morphostatic maintenance of skeletal muscle». *J Cell Sci*, 119(Pt 18), p. 3822-3832
- Okamoto, T., Akaike, T., Nagano, T., Miyajima, S., Suga, M., Ando, M., Ichimori, K. et Maeda, H. (1997). «Activation of human neutrophil procollagenase by nitrogen dioxide and peroxynitrite: a novel mechanism for procollagenase activation involving nitric oxide». *Arch Biochem Biophys*, 342(2), p. 261-274
- Overall, C.M. et Lopez-Otin, C. (2002). «Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era». *Nat Rev Cancer*, 2(9), p. 657-672
- Ozpolat, B. et Benbrook, D.M. (2015). «Targeting autophagy in cancer management - strategies and developments». *Cancer Manag Res*, 7, p. 291-299
- Pagenstecher, A., Wussler, E.M., Opdenakker, G., Volk, B. et Campbell, I.L. (2001). «Distinct expression patterns and levels of enzymatic activity of matrix metalloproteinases and their inhibitors in primary brain tumors». *J Neuropathol Exp Neurol*, 60(6), p. 598-612
- Paglin, S., Hollister, T., Delohery, T., Hackett, N., McMahon, M., Sphicas, E., Domingo, D. et Yahalom, J. (2001). «A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles». *Cancer Res*, 61(2), p. 439-444
- Panda, P.K., Mukhopadhyay, S., Das, D.N., Sinha, N., Naik, P.P. et Bhutia, S.K. (2015). «Mechanism of autophagic regulation in carcinogenesis and cancer therapeutics». *Semin Cell Dev Biol*, 39, p. 43-55
- Park, C.K., Kim, J.E., Kim, J.Y., Song, S.W., Kim, J.W., Choi, S.H., Kim, T.M., Lee, S.H., Kim, I.H. et Park, S.H. (2012). «The Changes in MGMT Promoter

- Methylation Status in Initial and Recurrent Glioblastomas». *Transl Oncol*, 5(5), p. 393-397
- Park, C.W., Hong, S.M., Kim, E.S., Kwon, J.H., Kim, K.T., Nam, H.G. et Choi, K.Y. (2013). «BNIP3 is degraded by ULK1-dependent autophagy via MTORC1 and AMPK». *Autophagy*, 9(3), p. 345-360
- Park, J.M., Kim, A., Oh, J.H. et Chung, A.S. (2007). «Methylseleninic acid inhibits PMA-stimulated pro-MMP-2 activation mediated by MT1-MMP expression and further tumor invasion through suppression of NF-kappaB activation». *Carcinogenesis*, 28(4), p. 837-847
- Park, K.J., Lee, S.H., Lee, C.H., Jang, J.Y., Chung, J., Kwon, M.H. et Kim, Y.S. (2009). «Upregulation of Beclin-1 expression and phosphorylation of Bcl-2 and p53 are involved in the JNK-mediated autophagic cell death». *Biochem Biophys Res Commun*, 382(4), p. 726-729
- Park, M.J., Park, I.C., Hur, J.H., Rhee, C.H., Choe, T.B., Yi, D.H., Hong, S.I. et Lee, S.H. (2000). «Protein kinase C activation by phorbol ester increases in vitro invasion through regulation of matrix metalloproteinases/tissue inhibitors of metalloproteinases system in D54 human glioblastoma cells». *Neurosci Lett*, 290(3), p. 201-204
- Partridge, D.G., O'Brien, E. et Chapman, A.L. (2012). «Outpatient parenteral antibiotic therapy for infective endocarditis: a review of 4 years' experience at a UK centre». *Postgrad Med J*, 88(1041), p. 377-381
- Paz, A., Haklai, R., Elad-Sfadia, G., Ballan, E. et Kloog, Y. (2001). «Galectin-1 binds oncogenic H-Ras to mediate Ras membrane anchorage and cell transformation». *Oncogene*, 20(51), p. 7486-7493
- Pei, D. (1999). «Identification and characterization of the fifth membrane-type matrix metalloproteinase MT5-MMP». *J Biol Chem*, 274(13), p. 8925-8932
- Pei, D. et Weiss, S.J. (1995). «Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen». *Nature*, 375(6528), p. 244-247

- Petitclerc, E., Boutaud, A., Prestayko, A., Xu, J., Sado, Y., Ninomiya, Y., Sarras, M.P., Jr., Hudson, B.G. et Brooks, P.C. (2000). «New functions for non-collagenous domains of human collagen type IV. Novel integrin ligands inhibiting angiogenesis and tumor growth in vivo». *J Biol Chem*, 275(11), p. 8051-8061
- Petrella, B.L. et Vincenti, M.P. (2012). «Interleukin-1beta mediates metalloproteinase-dependent renal cell carcinoma tumor cell invasion through the activation of CCAAT enhancer binding protein beta». *Cancer Med*, 1(1), p. 17-27
- Phillips, H.S., Kharbanda, S., Chen, R., Forrest, W.F., Soriano, R.H., Wu, T.D., Misra, A., Nigro, J.M., Colman, H., Soroceanu, L., Williams, P.M., Modrusan, Z., Feuerstein, B.G. et Aldape, K. (2006). «Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis». *Cancer Cell*, 9(3), p. 157-173
- Pietraszek, K., Chatron-Colliet, A., Brezillon, S., Perreau, C., Jakubiak-Augustyn, A., Krotkiewski, H., Maquart, F.X. et Wegrowski, Y. (2014). «Lumican: a new inhibitor of matrix metalloproteinase-14 activity». *FEBS Lett*, 588(23), p. 4319-4324
- Pietrocola, F., Izzo, V., Niso-Santano, M., Vacchelli, E., Galluzzi, L., Maiuri, M.C. et Kroemer, G. (2013). «Regulation of autophagy by stress-responsive transcription factors». *Semin Cancer Biol*, 23(5), p. 310-322
- Pillai, V.B., Sundaresan, N.R. et Gupta, M.P. (2014). «Regulation of Akt signaling by sirtuins: its implication in cardiac hypertrophy and aging». *Circ Res*, 114(2), p. 368-378
- Pilorget, A., Annabi, B., Bouzeghrane, F., Marvaldi, J., Luis, J. et Beliveau, R. (2005). «Inhibition of angiogenic properties of brain endothelial cells by platelet-derived sphingosine-1-phosphate». *J Cereb Blood Flow Metab*, 25(9), p. 1171-1182

- Ping, Y.F., Yao, X.H., Jiang, J.Y., Zhao, L.T., Yu, S.C., Jiang, T., Lin, M.C., Chen, J.H., Wang, B., Zhang, R., Cui, Y.H., Qian, C., Wang, J. et Bian, X.W. (2011). «The chemokine CXCL12 and its receptor CXCR4 promote glioma stem cell-mediated VEGF production and tumour angiogenesis via PI3K/AKT signalling». *J Pathol*, 224(3), p. 344-354
- Pol, J., Le Boeuf, F. et Diallo, J.S. (2013). «[Genetic, immunological, and pharmacological strategies to generate improved oncolytic viruses]». *Med Sci (Paris)*, 29(2), p. 165-173
- Polson, H.E., de Lartigue, J., Rigden, D.J., Reedijk, M., Urbe, S., Clague, M.J. et Tooze, S.A. (2010). «Mammalian Atg18 (WIPI2) localizes to omegasome-anchored phagophores and positively regulates LC3 lipidation». *Autophagy*, 6(4), p. 506-522
- Prados, M.D., Chang, S.M., Butowski, N., DeBoer, R., Parvataneni, R., Carliner, H., Kabuubi, P., Ayers-Ringler, J., Rabbitt, J., Page, M., Fedoroff, A., Sneed, P.K., Berger, M.S., McDermott, M.W., Parsa, A.T., Vandenberg, S., James, C.D., Lamborn, K.R., Stokoe, D. et Haas-Kogan, D.A. (2009). «Phase II study of erlotinib plus temozolomide during and after radiation therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme or gliosarcoma». *J Clin Oncol*, 27(4), p. 579-584
- Pratt, J. et Annabi, B. (2014). «Induction of autophagy biomarker BNIP3 requires a JAK2/STAT3 and MT1-MMP signaling interplay in Concanavalin-A-activated U87 glioblastoma cells». *Cell Signal*, 26(5), p. 917-924
- Pratt, J., Iddir, M., Bourgault, S. et Annabi, B. (2015). «Evidence of MTCBP-1 interaction with the cytoplasmic domain of MT1-MMP: Implications in the autophagy cell index of high-grade glioblastoma». *Mol Carcinog*,
- Pratt, J., Roy, R. et Annabi, B. (2012). «Concanavalin-A-induced autophagy biomarkers requires membrane type-1 matrix metalloproteinase intracellular signaling in glioblastoma cells». *Glycobiology*, 22(9), p. 1245-1255

- Prins, R.M., Soto, H., Konkankit, V., Odesa, S.K., Eskin, A., Yong, W.H., Nelson, S.F. et Liao, L.M. (2011). «Gene expression profile correlates with T-cell infiltration and relative survival in glioblastoma patients vaccinated with dendritic cell immunotherapy». *Clin Cancer Res*, 17(6), p. 1603-1615
- Proulx-Bonneau, S. et Annabi, B. (2011). «The primary cilium as a biomarker in the hypoxic adaptation of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells: a role for the secreted frizzled-related proteins». *Biomark Insights*, 6, p. 107-118
- Proulx-Bonneau, S., Guezguez, A. et Annabi, B. (2011a). «A concerted HIF-1 α /MT1-MMP signalling axis regulates the expression of the 3BP2 adaptor protein in hypoxic mesenchymal stromal cells». *PLoS One*, 6(6), p. e21511
- Proulx-Bonneau, S., Pratt, J. et Annabi, B. (2011b). «A role for MT1-MMP as a cell death sensor/effector through the regulation of endoplasmic reticulum stress in U87 glioblastoma cells». *J Neurooncol*, 104(1), p. 33-43
- Qin, Z., Feng, J., Liu, Y., Deng, L.L. et Lu, C. (2015). «PDGF-D promotes dermal fibroblast invasion in 3-dimensional extracellular matrix via Snail-mediated MT1-MMP upregulation». *Tumour Biol*,
- Qu, X., Zou, Z., Sun, Q., Luby-Phelps, K., Cheng, P., Hogan, R.N., Gilpin, C. et Levine, B. (2007). «Autophagy gene-dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development». *Cell*, 128(5), p. 931-946
- Quant, E.C., Drappatz, J., Wen, P.Y. et Norden, A.D. (2010). «Recurrent high-grade glioma». *Curr Treat Options Neurol*, 12(4), p. 321-333
- Ra, H.J. et Parks, W.C. (2007). «Control of matrix metalloproteinase catalytic activity». *Matrix Biol*, 26(8), p. 587-596
- Rabinovich, G.A., Baum, L.G., Tinari, N., Paganelli, R., Natoli, C., Liu, F.T. et Iacobelli, S. (2002). «Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response?». *Trends Immunol*, 23(6), p. 313-320

- Rajan, P. et McKay, R.D. (1998). «Multiple routes to astrocytic differentiation in the CNS». *J Neurosci*, 18(10), p. 3620-3629
- Rasooli-Nejad, S., Palygin, O., Lalo, U. et Pankratov, Y. (2014). «Cannabinoid receptors contribute to astroglial Ca(2)(+)-signalling and control of synaptic plasticity in the neocortex». *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 369(1654), p. 20140077
- Ravikumar, B., Sarkar, S., Davies, J.E., Futter, M., Garcia-Arencibia, M., Green-Thompson, Z.W., Jimenez-Sanchez, M., Korolchuk, V.I., Lichtenberg, M., Luo, S., Massey, D.C., Menzies, F.M., Moreau, K., Narayanan, U., Renna, M., Siddiqi, F.H., Underwood, B.R., Winslow, A.R. et Rubinsztein, D.C. (2010). «Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology». *Physiol Rev*, 90(4), p. 1383-1435
- Rawlings, N.D., Waller, M., Barrett, A.J. et Bateman, A. (2014). «MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors». *Nucleic Acids Res*, 42, p. D503-509
- Remacle, A.G., Chekanov, A.V., Golubkov, V.S., Savinov, A.Y., Rozanov, D.V. et Strongin, A.Y. (2006). «O-glycosylation regulates autolysis of cellular membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP)». *J Biol Chem*, 281(25), p. 16897-16905
- Remacle, A.G., Golubkov, V.S., Shiryaev, S.A., Dahl, R., Stebbins, J.L., Chernov, A.V., Cheltsov, A.V., Pellecchia, M. et Strongin, A.Y. (2012). «Novel MT1-MMP small-molecule inhibitors based on insights into hemopexin domain function in tumor growth». *Cancer Res*, 72(9), p. 2339-2349
- Reuter, S., Gupta, S.C., Chaturvedi, M.M. et Aggarwal, B.B. (2010). «Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?». *Free Radic Biol Med*, 49(11), p. 1603-1616

- Roberts, P., Moshitch-Moshkovitz, S., Kvam, E., O'Toole, E., Winey, M. et Goldfarb, D.S. (2003). «Piecemeal microautophagy of nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*». *Mol Biol Cell*, 14(1), p. 129-141
- Roghi, C., Jones, L., Gratian, M., English, W.R. et Murphy, G. (2010). «Golgi reassembly stacking protein 55 interacts with membrane-type (MT) 1-matrix metalloprotease (MMP) and furin and plays a role in the activation of the MT1-MMP zymogen». *FEBS J*, 277(15), p. 3158-3175
- Rojas, F., Hernandez, M.E., Silva, M., Li, L., Subramanian, S., Wilson, M.J. et Liu, P. (2015). «The Oncogenic Response to MiR-335 Is Associated with Cell Surface Expression of Membrane-Type 1 Matrix Metalloproteinase (MT1-MMP) Activity». *PLoS One*, 10(7), p. e0132026
- Roohbakhsh, A., Parhiz, H., Soltani, F., Rezaee, R. et Iranshahi, M. (2015). «Molecular mechanisms behind the biological effects of hesperidin and hesperetin for the prevention of cancer and cardiovascular diseases». *Life Sci*, 124, p. 64-74
- Roth, J.C., Cassady, K.A., Cody, J.J., Parker, J.N., Price, K.H., Coleman, J.M., Peggins, J.O., Noker, P.E., Powers, N.W., Grimes, S.D., Carroll, S.L., Gillespie, G.Y., Whitley, R.J. et Markert, J.M. (2014). «Evaluation of the safety and biodistribution of M032, an attenuated herpes simplex virus type 1 expressing hIL-12, after intracerebral administration to aotus nonhuman primates». *Hum Gene Ther Clin Dev*, 25(1), p. 16-27
- Rouschop, K.M., van den Beucken, T., Dubois, L., Niessen, H., Bussink, J., Savelkoul, K., Keulers, T., Mujcic, H., Landuyt, W., Voncken, J.W., Lambin, P., van der Kogel, A.J., Koritzinsky, M. et Wouters, B.G. (2010). «The unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes MAP1LC3B and ATG5». *J Clin Invest*, 120(1), p. 127-141
- Roy, S., Chakraborti, T., Chowdhury, A. et Chakraborti, S. (2013). «Role of PKC-alpha in NF-kappaB-MT1-MMP-mediated activation of proMMP-2 by TNF-alpha in pulmonary artery smooth muscle cells». *J Biochem*, 153(3), p. 289-302

- Rozanov, D.V., Deryugina, E.I., Ratnikov, B.I., Monosov, E.Z., Marchenko, G.N., Quigley, J.P. et Strongin, A.Y. (2001). «Mutation analysis of membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP). The role of the cytoplasmic tail Cys(574), the active site Glu(240), and furin cleavage motifs in oligomerization, processing, and self-proteolysis of MT1-MMP expressed in breast carcinoma cells». *J Biol Chem*, 276(28), p. 25705-25714
- Rozanov, D.V., Ghebrehiwet, B., Ratnikov, B., Monosov, E.Z., Deryugina, E.I. et Strongin, A.Y. (2002). «The cytoplasmic tail peptide sequence of membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) directly binds to gC1qR, a compartment-specific chaperone-like regulatory protein». *FEBS Lett*, 527(1-3), p. 51-57
- Rozanov, D.V., Savinov, A.Y., Golubkov, V.S., Postnova, T.I., Remacle, A., Tomlinson, S. et Strongin, A.Y. (2004). «Cellular membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) cleaves C3b, an essential component of the complement system». *J Biol Chem*, 279(45), p. 46551-46557
- Rubinstein, N., Alvarez, M., Zwirner, N.W., Toscano, M.A., Ilarregui, J.M., Bravo, A., Mordoh, J., Fainboim, L., Podhajcer, O.L. et Rabinovich, G.A. (2004). «Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection; A potential mechanism of tumor-immune privilege». *Cancer Cell*, 5(3), p. 241-251
- Rubinsztein, D.C., Marino, G. et Kroemer, G. (2011). «Autophagy and aging». *Cell*, 146(5), p. 682-695
- Saeb-Parsy, K., Veerakumarasivam, A., Wallard, M.J., Thorne, N., Kawano, Y., Murphy, G., Neal, D.E., Mills, I.G. et Kelly, J.D. (2008). «MT1-MMP regulates urothelial cell invasion via transcriptional regulation of Dickkopf-3». *Br J Cancer*, 99(4), p. 663-669
- Sahu, R., Kaushik, S., Clement, C.C., Cannizzo, E.S., Scharf, B., Follenzi, A., Potalicchio, I., Nieves, E., Cuervo, A.M. et Santambrogio, L. (2011). «Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes». *Dev Cell*, 20(1), p. 131-139

- Sakamoto, T. et Seiki, M. (2010). «A membrane protease regulates energy production in macrophages by activating hypoxia-inducible factor-1 via a non-proteolytic mechanism». *J Biol Chem*, 285(39), p. 29951-29964
- Salmela, M.T., Pender, S.L., Karjalainen-Lindsberg, M.L., Puolakkainen, P., Macdonald, T.T. et Saarialho-Kere, U. (2004). «Collagenase-1 (MMP-1), matrilysin-1 (MMP-7), and stromelysin-2 (MMP-10) are expressed by migrating enterocytes during intestinal wound healing». *Scand J Gastroenterol*, 39(11), p. 1095-1104
- Salvador, N., Aguado, C., Horst, M. et Knecht, E. (2000). «Import of a cytosolic protein into lysosomes by chaperone-mediated autophagy depends on its folding state». *J Biol Chem*, 275(35), p. 27447-27456
- Sampson, J.H., Kaminski, T.J. et Schulman, K.A. (2011). «Our failure to advance new treatments for glioma to market». *J Neurosurg*, 115(2), p. 245-247; discussion 247
- Sane, R., Agarwal, S., Mittapalli, R.K. et Elmquist, W.F. (2013). «Saturable active efflux by p-glycoprotein and breast cancer resistance protein at the blood-brain barrier leads to nonlinear distribution of elacridar to the central nervous system». *J Pharmacol Exp Ther*, 345(1), p. 111-124
- Sato, M. et Sato, K. (2011). «Degradation of paternal mitochondria by fertilization-triggered autophagy in *C. elegans* embryos». *Science*, 334(6059), p. 1141-1144
- Saunders, W.B., Bayless, K.J. et Davis, G.E. (2005). «MMP-1 activation by serine proteases and MMP-10 induces human capillary tubular network collapse and regression in 3D collagen matrices». *J Cell Sci*, 118(Pt 10), p. 2325-2340
- Schebesch, K.M., Proescholdt, M., Hohne, J., Hohenberger, C., Hansen, E., Riemenschneider, M.J., Ullrich, W., Doenitz, C., Schlaier, J., Lange, M. et Brawanski, A. (2013). «Sodium fluorescein-guided resection under the

YELLOW 560 nm surgical microscope filter in malignant brain tumor surgery--a feasibility study». *Acta Neurochir (Wien)*, 155(4), p. 693-699

Schenk, S., Hintermann, E., Bilban, M., Koshikawa, N., Hojilla, C., Khokha, R. et Quaranta, V. (2003). «Binding to EGF receptor of a laminin-5 EGF-like fragment liberated during MMP-dependent mammary gland involution». *J Cell Biol*, 161(1), p. 197-209

Schleicher, S.M., Moretti, L., Varki, V. et Lu, B. (2010). «Progress in the unraveling of the endoplasmic reticulum stress/autophagy pathway and cancer: implications for future therapeutic approaches». *Drug Resist Updat*, 13(3), p. 79-86

Sebti, S., Prebois, C., Perez-Gracia, E., Bauvy, C., Desmots, F., Pirot, N., Gongora, C., Bach, A.S., Hubberstey, A.V., Palissot, V., Berchem, G., Codogno, P., Linares, L.K., Liaudet-Coopman, E. et Pattingre, S. (2014). «BAT3 modulates p300-dependent acetylation of p53 and autophagy-related protein 7 (ATG7) during autophagy». *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(11), p. 4115-4120

Sekar, R.B. et Periasamy, A. (2003). «Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations». *J Cell Biol*, 160(5), p. 629-633

Senft, C., Priester, M., Polacin, M., Schroder, K., Seifert, V., Kogel, D. et Weissenberger, J. (2011). «Inhibition of the JAK-2/STAT3 signaling pathway impedes the migratory and invasive potential of human glioblastoma cells». *J Neurooncol*, 101(3), p. 393-403

Senggunprai, L., Kukongviriyapan, V., Prawan, A. et Kukongviriyapan, U. (2014). «Quercetin and EGCG exhibit chemopreventive effects in cholangiocarcinoma cells via suppression of JAK/STAT signaling pathway». *Phytother Res*, 28(6), p. 841-848

Shangary, S. et Wang, S. (2009). «Small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 protein-protein interaction to reactivate p53 function: a novel approach for cancer therapy». *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 49, p. 223-241

- Sharma, K., Le, N., Alotaibi, M. et Gewirtz, D.A. (2014). «Cytotoxic autophagy in cancer therapy». *Int J Mol Sci*, 15(6), p. 10034-10051
- Shchors, K., Persson, A.I., Rostker, F., Tihan, T., Lyubynska, N., Li, N., Swigart, L.B., Berger, M.S., Hanahan, D., Weiss, W.A. et Evan, G.I. (2013). «Using a preclinical mouse model of high-grade astrocytoma to optimize p53 restoration therapy». *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(16), p. E1480-1489
- Shen, S., Niso-Santano, M., Adjemian, S., Takehara, T., Malik, S.A., Minoux, H., Souquere, S., Marino, G., Lachkar, S., Senovilla, L., Galluzzi, L., Kepp, O., Pierron, G., Maiuri, M.C., Hikita, H., Kroemer, R. et Kroemer, G. (2012). «Cytoplasmic STAT3 represses autophagy by inhibiting PKR activity». *Mol Cell*, 48(5), p. 667-680
- Shi, L., Chen, J., Yang, J., Pan, T., Zhang, S. et Wang, Z. (2010). «MiR-21 protected human glioblastoma U87MG cells from chemotherapeutic drug temozolomide induced apoptosis by decreasing Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3 activity». *Brain Res*, 1352, p. 255-264
- Shingu, T., Fujiwara, K., Bogler, O., Akiyama, Y., Moritake, K., Shinojima, N., Tamada, Y., Yokoyama, T. et Kondo, S. (2009). «Inhibition of autophagy at a late stage enhances imatinib-induced cytotoxicity in human malignant glioma cells». *Int J Cancer*, 124(5), p. 1060-1071
- Shiomi, T., Inoki, I., Kataoka, F., Ohtsuka, T., Hashimoto, G., Nemori, R. et Okada, Y. (2005). «Pericellular activation of proMMP-7 (promatrilysin-1) through interaction with CD151». *Lab Invest*, 85(12), p. 1489-1506
- Shofuda, K.I., Hasenstab, D., Kenagy, R.D., Shofuda, T., Li, Z.Y., Lieber, A. et Clowes, A.W. (2001). «Membrane-type matrix metalloproteinase-1 and -3 activity in primate smooth muscle cells». *FASEB J*, 15(11), p. 2010-2012
- Shpilka, T. et Elazar, Z. (2011). «Shedding light on mammalian microautophagy». *Dev Cell*, 20(1), p. 1-2

- Sina, A., Lord-Dufour, S. et Annabi, B. (2009). «Cell-based evidence for aminopeptidase N/CD13 inhibitor actinonin targeting of MT1-MMP-mediated proMMP-2 activation». *Cancer Letters*, 279(2), p. 171-176
- Sina, A., Proulx-Bonneau, S., Roy, A., Poliquin, L., Cao, J. et Annabi, B. (2010). «The lectin concanavalin-A signals MT1-MMP catalytic independent induction of COX-2 through an IKKgamma/NF-kappaB-dependent pathway». *J Cell Commun Signal*, 4(1), p. 31-38
- Singh, D., Srivastava, S.K., Chaudhuri, T.K. et Upadhyay, G. (2015). «Multifaceted role of matrix metalloproteinases (MMPs)». *Front Mol Biosci*, 2, p. 19
- Singh, S.K., Hawkins, C., Clarke, I.D., Squire, J.A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R.M., Cusimano, M.D. et Dirks, P.B. (2004). «Identification of human brain tumour initiating cells». *Nature*, 432(7015), p. 396-401
- Singletary, K. et Milner, J. (2008). «Diet, autophagy, and cancer: a review». *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 17(7), p. 1596-1610
- Sini, P., James, D., Chresta, C. et Guichard, S. (2010). «Simultaneous inhibition of mTORC1 and mTORC2 by mTOR kinase inhibitor AZD8055 induces autophagy and cell death in cancer cells». *Autophagy*, 6(4), p. 553-554
- Sithu, S.D., English, W.R., Olson, P., Krubasik, D., Baker, A.H., Murphy, G. et D'Souza, S.E. (2007). «Membrane-type 1-matrix metalloproteinase regulates intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)-mediated monocyte transmigration». *J Biol Chem*, 282(34), p. 25010-25019
- Siwik, D.A. et Colucci, W.S. (2004). «Regulation of matrix metalloproteinases by cytokines and reactive oxygen/nitrogen species in the myocardium». *Heart Fail Rev*, 9(1), p. 43-51
- Soeda, A., Hara, A., Kunisada, T., Yoshimura, S., Iwama, T. et Park, D.M. (2015). «The evidence of glioblastoma heterogeneity». *Sci Rep*, 5, p. 7979

- Sohail, A., Sun, Q., Zhao, H., Bernardo, M.M., Cho, J.A. et Fridman, R. (2008). «MT4-(MMP17) and MT6-MMP (MMP25), A unique set of membrane-anchored matrix metalloproteinases: properties and expression in cancer». *Cancer Metastasis Rev*, 27(2), p. 289-302
- Son, M.J., Woolard, K., Nam, D.H., Lee, J. et Fine, H.A. (2009). «SSEA-1 is an enrichment marker for tumor-initiating cells in human glioblastoma». *Cell Stem Cell*, 4(5), p. 440-452
- Soubani, O., Ali, A.S., Logna, F., Ali, S., Philip, P.A. et Sarkar, F.H. (2012). «Re-expression of miR-200 by novel approaches regulates the expression of PTEN and MT1-MMP in pancreatic cancer». *Carcinogenesis*, 33(8), p. 1563-1571
- Soulie, P., Carrozzino, F., Pepper, M.S., Strongin, A.Y., Poupon, M.F. et Montesano, R. (2005). «Membrane-type-1 matrix metalloproteinase confers tumorigenicity on nonmalignant epithelial cells». *Oncogene*, 24(10), p. 1689-1697
- Sounni, N.E., Devy, L., Hajitou, A., Frankenne, F., Munaut, C., Gilles, C., Deroanne, C., Thompson, E.W., Foidart, J.M. et Noel, A. (2002). «MT1-MMP expression promotes tumor growth and angiogenesis through an up-regulation of vascular endothelial growth factor expression». *FASEB J*, 16(6), p. 555-564
- Sounni, N.E. et Noel, A. (2005). «Membrane type-matrix metalloproteinases and tumor progression». *Biochimie*, 87(3-4), p. 329-342
- Sounni, N.E., Roghi, C., Chabottaux, V., Janssen, M., Munaut, C., Maquoi, E., Galvez, B.G., Gilles, C., Frankenne, F., Murphy, G., Foidart, J.M. et Noel, A. (2004). «Up-regulation of vascular endothelial growth factor-A by active membrane-type 1 matrix metalloproteinase through activation of Src-tyrosine kinases». *J Biol Chem*, 279(14), p. 13564-13574
- Sowter, H.M., Ratcliffe, P.J., Watson, P., Greenberg, A.H. et Harris, A.L. (2001). «HIF-1-dependent regulation of hypoxic induction of the cell death factors BNIP3 and NIX in human tumors». *Cancer Res*, 61(18), p. 6669-6673

- Stambolic, V., MacPherson, D., Sas, D., Lin, Y., Snow, B., Jang, Y., Benchimol, S. et Mak, T.W. (2001). «Regulation of PTEN transcription by p53». *Mol Cell*, 8(2), p. 317-325
- Stawowy, P., Margeta, C., Kallisch, H., Seidah, N.G., Chretien, M., Fleck, E. et Graf, K. (2004). «Regulation of matrix metalloproteinase MT1-MMP/MMP-2 in cardiac fibroblasts by TGF-beta1 involves furin-convertase». *Cardiovasc Res*, 63(1), p. 87-97
- Stechishin, O.D., Luchman, H.A., Ruan, Y., Blough, M.D., Nguyen, S.A., Kelly, J.J., Cairncross, J.G. et Weiss, S. (2013). «On-target JAK2/STAT3 inhibition slows disease progression in orthotopic xenografts of human glioblastoma brain tumor stem cells». *Neuro Oncol*, 15(2), p. 198-207
- Sternlicht, M.D. et Werb, Z. (2001). «How matrix metalloproteinases regulate cell behavior». *Annu Rev Cell Dev Biol*, 17, p. 463-516
- Stetefeld, J., Jenny, M., Schulthess, T., Landwehr, R., Schumacher, B., Frank, S., Ruegg, M.A., Engel, J. et Kammerer, R.A. (2001). «The laminin-binding domain of agrin is structurally related to N-TIMP-1». *Nat Struct Biol*, 8(8), p. 705-709
- Stewart, B.W. et Wild, C.P. (2014). *World Cancer Report 2014*. International Agency for Research on Cancer : World Health Organization.
- 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*, 359(9311), p. 1011-1018
- Stricker, T.P., Dumin, J.A., Dickeson, S.K., Chung, L., Nagase, H., Parks, W.C. et Santoro, S.A. (2001). «Structural analysis of the alpha(2) integrin I domain/procollagenase-1 (matrix metalloproteinase-1) interaction». *J Biol Chem*, 276(31), p. 29375-29381
- Strickland, D.K., Ashcom, J.D., Williams, S., Burgess, W.H., Migliorini, M. et Argraves, W.S. (1990). «Sequence identity between the alpha 2-

macroglobulin receptor and low density lipoprotein receptor-related protein suggests that this molecule is a multifunctional receptor». *J Biol Chem*, 265(29), p. 17401-17404

Strongin, A.Y. (2010). «Proteolytic and non-proteolytic roles of membrane type-1 matrix metalloproteinase in malignancy». *Biochim Biophys Acta*, 1803(1), p. 133-141

Stummer, W., Novotny, A., Stepp, H., Goetz, C., Bise, K. et Reulen, H.J. (2000). «Fluorescence-guided resection of glioblastoma multiforme by using 5-aminolevulinic acid-induced porphyrins: a prospective study in 52 consecutive patients». *J Neurosurg*, 93(6), p. 1003-1013

Stummer, W., Pichlmeier, U., Meinel, T., Wiestler, O.D., Zanella, F., Reulen, H.J. et Group, A.L.-G.S. (2006). «Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial». *Lancet Oncol*, 7(5), p. 392-401

Stupp, R., Hegi, M.E., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Taphoorn, M.J., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Allgeier, A., Fisher, B., Belanger, K., Hau, P., Brandes, A.A., Gijtenbeek, J., Marosi, C., Vecht, C.J., Mokhtari, K., Wesseling, P., Villa, S., Eisenhauer, E., Gorlia, T., Weller, M., Lacombe, D., Cairncross, J.G. et Mirimanoff, R.O. (2009). «Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial». *Lancet Oncol*, 10(5), p. 459-466

Stupp, R., van den Bent, M.J. et Hegi, M.E. (2005). «Optimal role of temozolomide in the treatment of malignant gliomas». *Curr Neurol Neurosci Rep*, 5(3), p. 198-206

Suenaga, N., Mori, H., Itoh, Y. et Seiki, M. (2005). «CD44 binding through the hemopexin-like domain is critical for its shedding by membrane-type 1 matrix metalloproteinase». *Oncogene*, 24(5), p. 859-868

- Suva, M.L., Riggi, N. et Bernstein, B.E. (2013). «Epigenetic reprogramming in cancer». *Science*, 339(6127), p. 1567-1570
- Swift, H. et Hruban, Z. (1964). «Focal Degradation as a Biological Process». *Fed Proc*, 23, p. 1026-1037
- Swoboda, E. et Strzadala, L. (2009). «[BNIP3 as an atypical representative of the Bcl-2 protein family. Part 1: BNIP3, a regulator of non-apoptotic programmed cell death]». *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 63, p. 409-417
- Takeuchi, H., Kondo, Y., Fujiwara, K., Kanzawa, T., Aoki, H., Mills, G.B. et Kondo, S. (2005). «Synergistic augmentation of rapamycin-induced autophagy in malignant glioma cells by phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B inhibitors». *Cancer Res*, 65(8), p. 3336-3346
- Tallant, C., Marrero, A. et Gomis-Ruth, F.X. (2010). «Matrix metalloproteinases: fold and function of their catalytic domains». *Biochim Biophys Acta*, 1803(1), p. 20-28
- Tam, E.M., Morrison, C.J., Wu, Y.I., Stack, M.S. et Overall, C.M. (2004). «Membrane protease proteomics: Isotope-coded affinity tag MS identification of undescribed MT1-matrix metalloproteinase substrates». *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(18), p. 6917-6922
- Tamura, K., Aoyagi, M., Ando, N., Ogishima, T., Wakimoto, H., Yamamoto, M. et Ohno, K. (2013). «Expansion of CD133-positive glioma cells in recurrent de novo glioblastomas after radiotherapy and chemotherapy». *J Neurosurg*, 119(5), p. 1145-1155
- Tang, J., Di, J., Cao, H., Bai, J. et Zheng, J. (2015). «p53-mediated autophagic regulation: A prospective strategy for cancer therapy». *Cancer Lett*, 363(2), p. 101-107
- Tang, T.K., Chiu, S.C., Lin, C.W., Su, M.J. et Liao, M.H. (2015). «Induction of survivin inhibition, g(2)/m cell cycle arrest and autophagic on cell death in human malignant glioblastoma cells». *Chin J Physiol*, 58(2), p. 95-103

- Tanida, I. (2011). «Autophagosome formation and molecular mechanism of autophagy». *Antioxid Redox Signal*, 14(11), p. 2201-2214
- Tchougounova, E., Lundequist, A., Fajardo, I., Winberg, J.O., Abrink, M. et Pejler, G. (2005). «A key role for mast cell chymase in the activation of pro-matrix metalloprotease-9 and pro-matrix metalloprotease-2». *J Biol Chem*, 280(10), p. 9291-9296
- Terawaki, S., Kitano, K., Aoyama, M. et Hakoshima, T. (2008). «Crystallographic characterization of the radixin FERM domain bound to the cytoplasmic tail of membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP)». *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 64(Pt 10), p. 911-913
- Terlecky, S.R., Chiang, H.L., Olson, T.S. et Dice, J.F. (1992). «Protein and peptide binding and stimulation of in vitro lysosomal proteolysis by the 73-kDa heat shock cognate protein». *J Biol Chem*, 267(13), p. 9202-9209
- Thomas, A.A., Brennan, C.W., DeAngelis, L.M. et Omuro, A.M. (2014). «Emerging therapies for glioblastoma». *JAMA Neurol*, 71(11), p. 1437-1444
- Thomas, G.J., Hart, I.R., Speight, P.M. et Marshall, J.F. (2002). «Binding of TGF-beta1 latency-associated peptide (LAP) to alpha(v)beta6 integrin modulates behaviour of squamous carcinoma cells». *Br J Cancer*, 87(8), p. 859-867
- Thomson, A.W., Turnquist, H.R. et Raimondi, G. (2009). «Immunoregulatory functions of mTOR inhibition». *Nat Rev Immunol*, 9(5), p. 324-337
- Thorburn, A., Thamm, D.H. et Gustafson, D.L. (2014). «Autophagy and cancer therapy». *Mol Pharmacol*, 85(6), p. 830-838
- Tian, S., Huang, S., Wu, S., Guo, W., Li, J. et He, X. (2010). «MicroRNA-1285 inhibits the expression of p53 by directly targeting its 3' untranslated region». *Biochem Biophys Res Commun*, 396(2), p. 435-439

- Tochowicz, A., Goettig, P., Evans, R., Visse, R., Shitomi, Y., Palmisano, R., Ito, N., Richter, K., Maskos, K., Franke, D., Svergun, D., Nagase, H., Bode, W. et Itoh, Y. (2011). «The dimer interface of the membrane type 1 matrix metalloproteinase hemopexin domain: crystal structure and biological functions». *J Biol Chem*, 286(9), p. 7587-7600
- Toth, M., Hernandez-Barrantes, S., Osenkowski, P., Bernardo, M.M., Gervasi, D.C., Shimura, Y., Meroueh, O., Kotra, L.P., Galvez, B.G., Arroyo, A.G., Mobashery, S. et Fridman, R. (2002). «Complex pattern of membrane type 1 matrix metalloproteinase shedding. Regulation by autocatalytic cells surface inactivation of active enzyme». *J Biol Chem*, 277(29), p. 26340-26350
- Townsend, K.N., Hughson, L.R., Schlie, K., Poon, V.I., Westerback, A. et Lum, J.J. (2012). «Autophagy inhibition in cancer therapy: metabolic considerations for antitumor immunity». *Immunol Rev*, 249(1), p. 176-194
- Trog, D., Yeghiazaryan, K., Fountoulakis, M., Friedlein, A., Moenkemann, H., Haertel, N., Schueller, H., Breipohl, W., Schild, H., Leppert, D. et Golubnitschaja, O. (2006). «Pro-invasive gene regulating effect of irradiation and combined temozolomide-radiation treatment on surviving human malignant glioma cells». *Eur J Pharmacol*, 542(1-3), p. 8-15
- Tsai, W.C., Liang, F.C., Cheng, J.W., Lin, L.P., Chang, S.C., Chen, H.H. et Pang, J.H. (2013). «High glucose concentration up-regulates the expression of matrix metalloproteinase-9 and -13 in tendon cells». *BMC Musculoskeletal Disord*, 14, p. 255
- Tsien, C., Moughan, J., Michalski, J.M., Gilbert, M.R., Purdy, J., Simpson, J., Kresel, J.J., Curran, W.J., Diaz, A., Mehta, M.P. et Radiation Therapy Oncology Group, T. (2009). «Phase I three-dimensional conformal radiation dose escalation study in newly diagnosed glioblastoma: Radiation Therapy Oncology Group Trial 98-03». *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 73(3), p. 699-708
- Tsukamoto, S., Kuma, A. et Mizushima, N. (2008). «The role of autophagy during the oocyte-to-embryo transition». *Autophagy*, 4(8), p. 1076-1078

- Uekita, T., Gotoh, I., Kinoshita, T., Itoh, Y., Sato, H., Shiomi, T., Okada, Y. et Seiki, M. (2004). «Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cytoplasmic tail-binding protein-1 is a new member of the Cupin superfamily. A possible multifunctional protein acting as an invasion suppressor down-regulated in tumors». *J Biol Chem*, 279(13), p. 12734-12743
- Uekita, T., Itoh, Y., Yana, I., Ohno, H. et Seiki, M. (2001). «Cytoplasmic tail-dependent internalization of membrane-type 1 matrix metalloproteinase is important for its invasion-promoting activity». *J Cell Biol*, 155(7), p. 1345-1356
- Ujifuku, K., Mitsutake, N., Takakura, S., Matsuse, M., Saenko, V., Suzuki, K., Hayashi, K., Matsuo, T., Kamada, K., Nagata, I. et Yamashita, S. (2010). «miR-195, miR-455-3p and miR-10a(*) are implicated in acquired temozolomide resistance in glioblastoma multiforme cells». *Cancer Lett*, 296(2), p. 241-248
- Uttenweiler, A., Schwarz, H. et Mayer, A. (2005). «Microautophagic vacuole invagination requires calmodulin in a Ca²⁺-independent function». *J Biol Chem*, 280(39), p. 33289-33297
- Uttenweiler, A., Schwarz, H., Neumann, H. et Mayer, A. (2007). «The vacuolar transporter chaperone (VTC) complex is required for microautophagy». *Mol Biol Cell*, 18(1), p. 166-175
- van Engeland, M., Derks, S., Smits, K.M., Meijer, G.A. et Herman, J.G. (2011). «Colorectal cancer epigenetics: complex simplicity». *J Clin Oncol*, 29(10), p. 1382-1391
- Vargova, V., Pytliak, M. et Mechirova, V. (2012). «Matrix metalloproteinases». *EXS*, 103, p. 1-33
- Velasco, G., Pendas, A.M., Fueyo, A., Knauper, V., Murphy, G. et Lopez-Otin, C. (1999). «Cloning and characterization of human MMP-23, a new matrix metalloproteinase predominantly expressed in reproductive tissues and

lacking conserved domains in other family members». *J Biol Chem*, 274(8), p. 4570-4576

Venur, V.A., Peereboom, D.M. et Ahluwalia, M.S. (2015). «Current medical treatment of glioblastoma». *Cancer Treat Res*, 163, p. 103-115

Verhaak, R.G., Hoadley, K.A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M.D., Miller, C.R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J.P., Alexe, G., Lawrence, M., O'Kelly, M., Tamayo, P., Weir, B.A., Gabriel, S., Winckler, W., Gupta, S., Jakkula, L., Feiler, H.S., Hodgson, J.G., James, C.D., Sarkaria, J.N., Brennan, C., Kahn, A., Spellman, P.T., Wilson, R.K., Speed, T.P., Gray, J.W., Meyerson, M., Getz, G., Perou, C.M., Hayes, D.N. et Cancer Genome Atlas Research, N. (2010). «Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1». *Cancer Cell*, 17(1), p. 98-110

Vinnakota, K., Hu, F., Ku, M.C., Georgieva, P.B., Szulzewsky, F., Pohlmann, A., Waiczies, S., Waiczies, H., Niendorf, T., Lehnardt, S., Hanisch, U.K., Synowitz, M., Markovic, D., Wolf, S.A., Glass, R. et Kettenmann, H. (2013). «Toll-like receptor 2 mediates microglia/brain macrophage MT1-MMP expression and glioma expansion». *Neuro Oncol*, 15(11), p. 1457-1468

Virgin, H.W. et Levine, B. (2009). «Autophagy genes in immunity». *Nat Immunol*, 10(5), p. 461-470

von Nandelstadh, P., Gucciardo, E., Lohi, J., Li, R., Sugiyama, N., Carpen, O. et Lehti, K. (2014). «Actin-associated protein palladin promotes tumor cell invasion by linking extracellular matrix degradation to cell cytoskeleton». *Mol Biol Cell*, 25(17), p. 2556-2570

Vu, T.H., Shipley, J.M., Bergers, G., Berger, J.E., Helms, J.A., Hanahan, D., Shapiro, S.D., Senior, R.M. et Werb, Z. (1998). «MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes». *Cell*, 93(3), p. 411-422

- Wang, A.L., Liu, Z.X., Li, G. et Zhang, L.W. (2011). «Expression and significance of P53 protein and MDM-2 protein in human gliomas». *Chin Med J (Engl)*, 124(16), p. 2530-2533
- Wang, J., Wakeman, T.P., Lathia, J.D., Hjelmeland, A.B., Wang, X.F., White, R.R., Rich, J.N. et Sullenger, B.A. (2010). «Notch promotes radioresistance of glioma stem cells». *Stem Cells*, 28(1), p. 17-28
- Wang, L., Yuan, J., Tu, Y., Mao, X., He, S., Fu, G., Zong, J. et Zhang, Y. (2013). «Co-expression of MMP-14 and MMP-19 predicts poor survival in human glioma». *Clin Transl Oncol*, 15(2), p. 139-145
- Wang, S.Y., Yu, Q.J., Zhang, R.D. et Liu, B. (2011). «Core signaling pathways of survival/death in autophagy-related cancer networks». *Int J Biochem Cell Biol*, 43(9), p. 1263-1266
- Wang, Y. et McNiven, M.A. (2012). «Invasive matrix degradation at focal adhesions occurs via protease recruitment by a FAK-p130Cas complex». *J Cell Biol*, 196(3), p. 375-385
- White, E. (2012). «Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer». *Nat Rev Cancer*, 12(6), p. 401-410
- White, E. et DiPaola, R.S. (2009). «The double-edged sword of autophagy modulation in cancer». *Clin Cancer Res*, 15(19706824), p. 5308-5316
- Wick, W., Wick, A., Schulz, J.B., Dichgans, J., Rodemann, H.P. et Weller, M. (2002). «Prevention of irradiation-induced glioma cell invasion by temozolomide involves caspase 3 activity and cleavage of focal adhesion kinase». *Cancer Res*, 62(6), p. 1915-1919
- Wiesner, C., El Azzouzi, K. et Linder, S. (2013). «A specific subset of RabGTPases controls cell surface exposure of MT1-MMP, extracellular matrix degradation and three-dimensional invasion of macrophages». *J Cell Sci*, 126(Pt 13), p. 2820-2833

- Wild-Bode, C., Weller, M., Rimmer, A., Dichgans, J. et Wick, W. (2001). «Sublethal irradiation promotes migration and invasiveness of glioma cells: implications for radiotherapy of human glioblastoma». *Cancer Res*, 61(6), p. 2744-2750
- Wilson, W.R. et Hay, M.P. (2011). «Targeting hypoxia in cancer therapy». *Nat Rev Cancer*, 11(6), p. 393-410
- Winberg, J.O., Berg, E., Kolset, S.O. et Uhlin-Hansen, L. (2003). «Calcium-induced activation and truncation of promatrix metalloproteinase-9 linked to the core protein of chondroitin sulfate proteoglycans». *Eur J Biochem*, 270(19), p. 3996-4007
- Wirawan, E., Vande Walle, L., Kersse, K., Cornelis, S., Claerhout, S., Vanoverberghe, I., Roelandt, R., De Rycke, R., Verspurten, J., Declercq, W., Agostinis, P., Vanden Berghe, T., Lippens, S. et Vandenabeele, P. (2010). «Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria». *Cell Death Dis*, 1, p. e18
- Wojton, J., Elder, J. et Kaur, B. (2014). «How efficient are autophagy inhibitors as treatment for glioblastoma?». *CNS Oncol*, 3(1), p. 5-7
- Wolf, A., Agnihotri, S. et Guha, A. (2010). «Targeting metabolic remodeling in glioblastoma multiforme». *Oncotarget*, 1(7), p. 552-562
- Wu, Y.I., Munshi, H.G., Sen, R., Snipas, S.J., Salvesen, G.S., Fridman, R. et Stack, M.S. (2004). «Glycosylation broadens the substrate profile of membrane type 1 matrix metalloproteinase». *J Biol Chem*, 279(9), p. 8278-8289
- Xiang, X., Mei, H., Qu, H., Zhao, X., Li, D., Song, H., Jiao, W., Pu, J., Huang, K., Zheng, L. et Tong, Q. (2015a). «miRNA-584-5p exerts tumor suppressive functions in human neuroblastoma through repressing transcription of matrix metalloproteinase 14». *Biochim Biophys Acta*, 1852(9), p. 1743-1754

- Xiang, X., Mei, H., Zhao, X., Pu, J., Li, D., Qu, H., Jiao, W., Zhao, J., Huang, K., Zheng, L. et Tong, Q. (2015b). «miRNA-337-3p suppresses neuroblastoma progression by repressing the transcription of matrix metalloproteinase 14». *Oncotarget*, 6(26), p. 22452-22466
- Xie, B., Zhou, J., Yuan, L., Ren, F., Liu, D.C., Li, Q. et Shu, G. (2013). «Epigenetic silencing of Klotho expression correlates with poor prognosis of human hepatocellular carcinoma». *Hum Pathol*, 44(5), p. 795-801
- Xu, D.W., Zhang, G.Q., Wang, Z.W., Xu, X.Y. et Liu, T.X. (2015). «Autophagy in tumorigenesis and cancer treatment». *Asian Pac J Cancer Prev*, 16(6), p. 2167-2175
- Xu, H., Xu, Y., Zhang, W., Shen, L., Yang, L. et Xu, Z. (2011). «Aquaporin-3 positively regulates matrix metalloproteinases via PI3K/AKT signal pathway in human gastric carcinoma SGC7901 cells». *J Exp Clin Cancer Res*, 30, p. 86
- Xu, X.P., Meisel, S.R., Ong, J.M., Kaul, S., Cercek, B., Rajavashisth, T.B., Sharifi, B. et Shah, P.K. (1999). «Oxidized low-density lipoprotein regulates matrix metalloproteinase-9 and its tissue inhibitor in human monocyte-derived macrophages». *Circulation*, 99(8), p. 993-998
- Yamamoto, K., Higashi, S., Kioi, M., Tsunozumi, J., Honke, K. et Miyazaki, K. (2006). «Binding of active matrilysin to cell surface cholesterol sulfate is essential for its membrane-associated proteolytic action and induction of homotypic cell adhesion». *J Biol Chem*, 281(14), p. 9170-9180
- Yan, C. et Boyd, D.D. (2007). «Regulation of matrix metalloproteinase gene expression». *J Cell Physiol*, 211(1), p. 19-26
- Yana, I. et Weiss, S.J. (2000). «Regulation of membrane type-1 matrix metalloproteinase activation by proprotein convertases». *Mol Biol Cell*, 11(7), p. 2387-2401

- Yang, J., Takahashi, Y., Cheng, E., Liu, J., Terranova, P.F., Zhao, B., Thrasher, J.B., Wang, H.G. et Li, B. (2010). «GSK-3beta promotes cell survival by modulating Bif-1-dependent autophagy and cell death». *J Cell Sci*, 123(Pt 6), p. 861-870
- Yang, Q.Y., Guo, C.C. et Chen, Z.P. (2015). «Profile of nimotuzumab in the treatment of high-grade glioma». *Onco Targets Ther*, 8, p. 819-825
- Yang, S., Bing, M., Chen, F., Sun, Y., Chen, H. et Chen, W. (2012). «Autophagy regulation by the nuclear factor kappaB signal axis in acute pancreatitis». *Pancreas*, 41(3), p. 367-373
- Yang, Y.P., Chien, Y., Chiou, G.Y., Cherng, J.Y., Wang, M.L., Lo, W.L., Chang, Y.L., Huang, P.I., Chen, Y.W., Shih, Y.H., Chen, M.T. et Chiou, S.H. (2012). «Inhibition of cancer stem cell-like properties and reduced chemoradioresistance of glioblastoma using microRNA145 with cationic polyurethane-short branch PEI». *Biomaterials*, 33(5), p. 1462-1476
- Yang, Z., Zhao, T.Z., Zou, Y.J., Zhang, J.H. et Feng, H. (2014). «Hypoxia Induces autophagic cell death through hypoxia-inducible factor 1alpha in microglia». *PLoS One*, 9(5), p. e96509
- Yang, Z.J., Chee, C.E., Huang, S. et Sinicrope, F.A. (2011). «The role of autophagy in cancer: therapeutic implications». *Mol Cancer Ther*, 10(9), p. 1533-1541
- Yen, J.H., Kocieda, V.P., Jing, H. et Ganea, D. (2011). «Prostaglandin E2 induces matrix metalloproteinase 9 expression in dendritic cells through two independent signaling pathways leading to activator protein 1 (AP-1) activation». *J Biol Chem*, 286(45), p. 38913-38923
- Yi, C., Ma, M., Ran, L., Zheng, J., Tong, J., Zhu, J., Ma, C., Sun, Y., Zhang, S., Feng, W., Zhu, L., Le, Y., Gong, X., Yan, X., Hong, B., Jiang, F.J., Xie, Z., Miao, D., Deng, H. et Yu, L. (2012). «Function and molecular mechanism of acetylation in autophagy regulation». *Science*, 336(6080), p. 474-477

- Yin, J.J., Li, Y.B., Wang, Y., Liu, G.D., Wang, J., Zhu, X.O. et Pan, S.H. (2012). «The role of autophagy in endoplasmic reticulum stress-induced pancreatic beta cell death». *Autophagy*, 8(2), p. 158-164
- Yongjun, Y., Shuyun, H., Lei, C., Xiangrong, C., Zhilin, Y. et Yiquan, K. (2013). «Atorvastatin suppresses glioma invasion and migration by reducing microglial MT1-MMP expression». *J Neuroimmunol*, 260(1-2), p. 1-8
- Yoon, C.H., Kim, M.J., Kim, R.K., Lim, E.J., Choi, K.S., An, S., Hwang, S.G., Kang, S.G., Suh, Y., Park, M.J. et Lee, S.J. (2012). «c-Jun N-terminal kinase has a pivotal role in the maintenance of self-renewal and tumorigenicity in glioma stem-like cells». *Oncogene*, 31(44), p. 4655-4666
- Yoon, S., Woo, S.U., Kang, J.H., Kim, K., Kwon, M.H., Park, S., Shin, H.J., Gwak, H.S. et Chwae, Y.J. (2010). «STAT3 transcriptional factor activated by reactive oxygen species induces IL6 in starvation-induced autophagy of cancer cells». *Autophagy*, 6(8), p. 1125-1138
- You, L., Wang, Z., Li, H., Shou, J., Jing, Z., Xie, J., Sui, X., Pan, H. et Han, W. (2015). «The role of STAT3 in autophagy». *Autophagy*, 11(5), p. 729-739
- Young, A.R., Narita, M., Ferreira, M., Kirschner, K., Sadaie, M., Darot, J.F., Tavares, S., Arakawa, S., Shimizu, S., Watt, F.M. et Narita, M. (2009). «Autophagy mediates the mitotic senescence transition». *Genes Dev*, 23(7), p. 798-803
- Yu, J.S., Liu, G., Ying, H., Yong, W.H., Black, K.L. et Wheeler, C.J. (2004). «Vaccination with tumor lysate-pulsed dendritic cells elicits antigen-specific, cytotoxic T-cells in patients with malignant glioma». *Cancer Res*, 64(14), p. 4973-4979
- Yu, M., Bowden, E.T., Sitlani, J., Sato, H., Seiki, M., Mueller, S.C. et Thompson, E.W. (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*, 57(22), p. 5028-5032

- Yu, Q. et Stamenkovic, I. (2000). «Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis». *Genes Dev*, 14(2), p. 163-176
- Yu, W.H., Woessner, J.F., Jr., McNeish, J.D. et Stamenkovic, I. (2002). «CD44 anchors the assembly of matrilysin/MMP-7 with heparin-binding epidermal growth factor precursor and ErbB4 and regulates female reproductive organ remodeling». *Genes Dev*, 16(3), p. 307-323
- Yu, X., Zech, T., McDonald, L., Gonzalez, E.G., Li, A., Macpherson, I., Schwarz, J.P., Spence, H., Futo, K., Timpson, P., Nixon, C., Ma, Y., Anton, I.M., Visegrady, B., Insall, R.H., Oien, K., Blyth, K., Norman, J.C. et Machesky, L.M. (2012). «N-WASP coordinates the delivery and F-actin-mediated capture of MT1-MMP at invasive pseudopods». *J Cell Biol*, 199(3), p. 527-544
- Yuan, X., Du, J., Hua, S., Zhang, H., Gu, C., Wang, J., Yang, L., Huang, J., Yu, J. et Liu, F. (2015). «Suppression of autophagy augments the radiosensitizing effects of STAT3 inhibition on human glioma cells». *Exp Cell Res*, 330(2), p. 267-276
- Zanotto-Filho, A., Braganhol, E., Klafke, K., Figueiro, F., Terra, S.R., Paludo, F.J., Morrone, M., Bristot, I.J., Battastini, A.M., Forcelini, C.M., Bishop, A.J., Gelain, D.P. et Moreira, J.C. (2015). «Autophagy inhibition improves the efficacy of curcumin/temozolomide combination therapy in glioblastomas». *Cancer Lett*, 358(2), p. 220-231
- Zeng, T., Cui, D. et Gao, L. (2015). «Glioma: an overview of current classifications, characteristics, molecular biology and target therapies». *Front Biosci (Landmark Ed)*, 20, p. 1104-1115
- Zeng, X. et Kinsella, T.J. (2010). «BNIP3 is essential for mediating 6-thioguanine- and 5-fluorouracil-induced autophagy following DNA mismatch repair processing». *Cell Res*, 20(6), p. 665-675

- Zgheib, A., Lamy, S. et Annabi, B. (2013). «Epigallocatechin gallate targeting of membrane type 1 matrix metalloproteinase-mediated Src and Janus kinase/signal transducers and activators of transcription 3 signaling inhibits transcription of colony-stimulating factors 2 and 3 in mesenchymal stromal cells». *J Biol Chem*, 288(19), p. 13378-13386
- Zhang, B., Henney, A., Eriksson, P., Hamsten, A., Watkins, H. et Ye, S. (1999). «Genetic variation at the matrix metalloproteinase-9 locus on chromosome 20q12.2-13.1». *Hum Genet*, 105(5), p. 418-423
- Zhang, H., Qi, M., Li, S., Qi, T., Mei, H., Huang, K., Zheng, L. et Tong, Q. (2012). «microRNA-9 targets matrix metalloproteinase 14 to inhibit invasion, metastasis, and angiogenesis of neuroblastoma cells». *Mol Cancer Ther*, 11(7), p. 1454-1466
- Zhang, L., Wang, H., Ding, K. et Xu, J. (2015a). «FTY720 induces autophagy-related apoptosis and necroptosis in human glioblastoma cells». *Toxicol Lett*, 236(1), p. 43-59
- Zhang, L., Wang, X. et Lai, M. (2015b). «Modulation of epithelial-to-mesenchymal cancerous transition by natural products». *Fitoterapia*, 106, p. 247-255
- Zhang, X., Li, W., Wang, C., Leng, X., Lian, S., Feng, J., Li, J. et Wang, H. (2014). «Inhibition of autophagy enhances apoptosis induced by proteasome inhibitor bortezomib in human glioblastoma U87 and U251 cells». *Mol Cell Biochem*, 385(1-2), p. 265-275
- Zhang, Y., Guessous, F., Kofman, A., Schiff, D. et Abounader, R. (2010). «XL-184, a MET, VEGFR-2 and RET kinase inhibitor for the treatment of thyroid cancer, glioblastoma multiforme and NSCLC». *IDrugs*, 13(2), p. 112-121
- Zhang, Y., Liao, Z., Zhang, L.J. et Xiao, H.T. (2015). «The utility of chloroquine in cancer therapy». *Curr Med Res Opin*, 31(5), p. 1009-1013
- Zhao, H., Bernardo, M.M., Osenkowski, P., Sohail, A., Pei, D., Nagase, H., Kashiwagi, M., Soloway, P.D., DeClerck, Y.A. et Fridman, R. (2004).

«Differential inhibition of membrane type 3 (MT3)-matrix metalloproteinase (MMP) and MT1-MMP by tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 and TIMP-3 regulates pro-MMP-2 activation». *J Biol Chem*, 279(10), p. 8592-8601

Zhao, Y., Chen, G., Zhang, W., Xu, N., Zhu, J.Y., Jia, J., Sun, Z.J., Wang, Y.N. et Zhao, Y.F. (2012). «Autophagy regulates hypoxia-induced osteoclastogenesis through the HIF-1 α /BNIP3 signaling pathway». *J Cell Physiol*, 227(2), p. 639-648

Zheng, Z., Yang, J., Zhao, D., Gao, D., Yan, X., Yao, Z., Liu, Z. et Ma, Z. (2013). «Downregulated adaptor protein p66(Shc) mitigates autophagy process by low nutrient and enhances apoptotic resistance in human lung adenocarcinoma A549 cells». *FEBS J*, 280(18), p. 4522-4530

Zhou, X., Ikenoue, T., Chen, X., Li, L., Inoki, K. et Guan, K.L. (2009). «Rheb controls misfolded protein metabolism by inhibiting aggresome formation and autophagy». *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(22), p. 8923-8928

Zhuang, W., Li, B., Long, L., Chen, L., Huang, Q. et Liang, Z. (2011). «Induction of autophagy promotes differentiation of glioma-initiating cells and their radiosensitivity». *Int J Cancer*, 129(11), p. 2720-2731

Zhuang, W., Qin, Z. et Liang, Z. (2009). «The role of autophagy in sensitizing malignant glioma cells to radiation therapy». *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 41(5), p. 341-351

Zucker, S., Hymowitz, M., Conner, C.E., DiYanni, E.A. et Cao, J. (2002). «Rapid trafficking of membrane type 1-matrix metalloproteinase to the cell surface regulates progelatinase a activation». *Lab Invest*, 82(12), p. 1673-1684

Zucker, S., Pei, D., Cao, J. et Lopez-Otin, C. (2003). «Membrane type-matrix metalloproteinases (MT-MMP)». *Curr Top Dev Biol*, 54, p. 1-74