

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

MÉCANISMES ADAPTATIFS CELLULAIRES AU SEIN DU
MICROENVIRONNEMENT TUMORAL CÉRÉBRAL EN RÉPONSE AUX
SIGNAUX HYPOXIQUES, INFLAMMATOIRES ET ANGIOGÉNIQUES

THÈSE

PRÉSENTÉE

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DU DOCTORAT EN BIOCHIMIE

PAR

AMÉLIE VÉZINA

NOVEMBRE 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.»

REMERCIEMENTS

Je veux commencer par remercier le Professeur Borhane Annabi pour m'avoir donné la plus belle des opportunités de pouvoir poursuivre mon cheminement scientifique au sein de son équipe de recherche. Je le remercie d'avoir cru en moi dès le début, et surtout d'avoir été encourageant tout au long de mon parcours. Je me rappelle chaque fois que j'entrais dans son bureau, son grand tableau blanc rempli de voies de signalisation, d'idées de projets, de plans d'articles, toujours nouveaux, mais restait toujours écrite, dans le coin gauche du haut, cette citation qui me marquait chaque fois : «*Motiver pour mieux enseigner*». Effectivement, chaque fois que je sortais de son bureau, je me sentais plus motivée et encouragée à continuer de fournir les efforts nécessaires à l'avancement de mes projets. Je suis très heureuse d'avoir appris les rudiments du travail de chercheur sous son aile. Merci Borhane d'avoir grandement contribué à faire grandir ma passion pour la recherche, pour tes conseils, tes questions scientifiques et tes questions comme : Tout est sous contrôle? Tu tiens le coup? Ce n'était pas toujours sous contrôle, mais tu as toujours eu confiance et j'en suis très reconnaissante.

Je souhaite remercier mes collègues de laboratoire en commençant par Jonathan Pratt, un complice important à mon cheminement au cours de mon doctorat. Les fous rires dans la salle de culture ne se comptent plus, mais surtout les encouragements et les discussions scientifiques au laboratoire ou à la rédaction de travaux jusqu'à des heures qui ne se peuvent pas. Je remercie tous mes collègues que j'ai côtoyés durant toutes ces années : Cyndia, David, Chirine, Amira, Mustapha, Clémence, Pascale, Djahida, Samuel S., Samuel B., Bayader, Laurence, Hana, Aroua, Paula, Michel, Rima, Éric et Louis-Charles. Je remercie tous ceux que j'ai eu la chance d'entraîner pour un stage : Massimo, Stéphanie, Wiem et Olga. Ils m'ont permis de travailler ma

patience et mes capacités de vulgarisation. Un merci spécial à Alain Zgheib, toujours présent pour donner un coup de main. Avec vous tous, j'ai appris que le travail d'équipe, mais aussi la camaraderie sont d'importants aspects de la recherche.

Je remercie les chercheurs seniors, Dr Khadidja Haidara et Dr Sylvie Lamy, pour leurs précieux conseils et encouragements.

Je remercie le Dr Richard Béliveau d'avoir été une inspiration spirituelle et philosophique tout au long de mon doctorat. Sans bien me connaître, il m'a toujours encouragé lors de ses passages au laboratoire.

Je veux remercier Julie Poirier, la «maman» du laboratoire, pour son soutien, son aide précieuse et sa grande expérience pour nos questions techniques. Je remercie Annie Levert, qui a su prendre les rênes suite au départ à la retraite de Julie.

Je remercie du plus profond de mon cœur ma famille. Maman, Papa, Caro et Isa, vous avez été d'un soutien incroyable durant toutes ces années. Je suis choyée d'avoir des parents aussi dévoués et impliqués. Caro, ma sœur, ma complice, ma coloc, je te remercie pour tous les rires partagés et pour toutes les heures passées à décompresser devant la télé! Isa, ma petite sœur, tu me surprends toujours et j'apprend beaucoup de toi, merci pour ton soutien. Merci à toute la famille Vézina pour votre support.

Merci à tous mes coéquipiers sportifs et particulièrement à mon équipe de badminton des Citadins, avec qui les tournois, mais aussi les soirées d'équipe faisaient mieux balancer toutes ces lectures et ce temps passé au labo.

Enfin, je remercie les Fonds de recherche du Québec – Nature et Technologies (FRQNT), le Fonds à l'accessibilité et à la recherche de l'UQAM et la Fondation J.A. DeSève de l'UQAM pour le support financier.

Merci à tous d'avoir contribué à votre façon à mon cheminement!

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	X
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XIII
RÉSUMÉ	XIX
ABSTRACT.....	XXI
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I.....	5
ÉTAT DES CONNAISSANCES.....	5
1.1 Les cancers du cerveau	6
1.1.1 Généralités et statistiques du cancer.....	6
1.1.2 Le glioblastome multiforme.....	10
1.2 Le microenvironnement tumoral	12
1.2.1 Les astrocytes, cellules d'origine du glioblastome multiforme.....	14
1.2.2 Les cellules microvasculaires endothéliales cérébrales	15
1.2.3 Les cellules souches mésenchymateuses (MSC)	16
1.3 La barrière hématoencéphalique (BHE).....	19
1.3.1 Transport à la BHE.....	22
1.3.2 Les récepteurs de lipoprotéine de basse densité.....	24
1.3.3 Les protéoglycanes héparane sulfate.....	28
1.3.4 La famille des récepteurs à domaine Vps10p.....	30
1.4 Les caractéristiques de la progression tumorale	32
1.5 Le centre hypoxique tumoral	34
1.6 Angiogenèse tumorale	38
1.6.1 Migration des cellules endothéliales	41
1.6.2 Régulation de la migration cellulaire par les voies MAPK.....	43

1.6.3 La Sphingosine-1-phosphate : un facteur pro-angiogénique dans le cancer	46
1.7 Inflammation.....	48
1.7.1 Voie de signalisation du facteur de transcription NF- κ B	49
1.7.2 Modulateurs inflammatoires : le TNF α et la progranuline.....	52
1.8 Transformation cellulaire et oncogénèse	54
1.8.1 La ciliogénèse.....	55
1.9 Avenues thérapeutiques du GBM et résistance aux traitements.....	60
1.9.1 Vectorisation des médicaments	61
1.9.2 Le vecteur peptidique Angiopep-2	62
CHAPITRE II	65
PROJET DE RECHERCHE	65
2.1 Problématique	66
2.2 Hypothèses de recherche	66
2.3 Objectifs de recherche	67
2.4 Méthodologie expérimentale	68
2.5 Contributions à l'avancement des connaissances scientifiques	73
CHAPITRE III	74
HYPOXIC CONDITIONS DICTATE ANGIOPEP-2 SORTING AND CELL SURFACE BINDING/UPTAKE PROCESSES BETWEEN BRAIN TUMOR AND BRAIN ENDOTHELIAL CELLS	74
3.1 Avant-propos	75
3.2 Résumé	77
3.3 Abstract.....	78
3.4 Introduction.....	79
3.5 Material and methods	81
3.5.1 Materials.....	81
3.5.2 Cell culture	81
3.5.3 Immunofluorescence	82
3.5.4 Immunoblotting procedures	83
3.5.5 Binding and uptake of Angiopep-2	83

3.5.6 Immunophenotyping	83
3.5.7 Total RNA isolation, cDNA synthesis, and real-time quantitative PCR .	84
3.5.8 Statistical data analysis.....	85
3.6 Results	86
3.6.1 Differential Angiopep-2 cell surface binding and uptake between brain cancer cells and brain microvascular endothelial cells.	86
3.6.2 Hypoxia triggers LRP1 expression, and Angiopep-2 binding and uptake in U87 glioblastoma cells.....	86
3.6.3 Differential gene expression profiling of intracellular trafficking and compartmentalization of molecular players in brain cancer and brain endothelial cells.....	87
3.6.4 Transcriptional impact of hypoxia on intracellular trafficking and compartmentalization of cell surface receptors in brain cancer and brain endothelial cells.....	88
3.6.5 LRP1-mediated Angiopep-2 compartmentation upon hypoxia is dictated through differential Syndecan-2, Syndecan-4, and Sortilin expression. ..	89
3.7 Discussion.....	90
3.8 Acknowledgements.....	94
3.9 Figures	95
CHAPITRE IV	101
LRP1 CONTROLS CEREBROVASCULAR ANGIOGENIC REPROGRAMMING: IMPACT ON SPHINGOSINE-1-PHOSPHATE-MEDIATED SIGNALING IN BRAIN ENDOTHELIAL CELLS MIGRATION	101
4.1 Avant-Propos	102
4.2 Résumé	104
4.3 Abstract.....	105
4.4 Introduction.....	106
4.5 Material and methods	109
4.5.1 Materials.....	109
4.5.2 Cell culture	109
4.5.3 Mouse brain endothelial cell isolation	110
4.5.4 Cell migration assay.....	110
4.5.5 Immunoblotting procedures	111

4.5.6	Transfection method and RNA interference	111
4.5.7	Total RNA isolation, cDNA synthesis and real-time quantitative RT-PCR	112
4.5.8	Statistical data analysis.....	113
4.6	Results	114
4.6.1	C/EBP β contributes to S1P receptors transcriptional control in human brain microvascular endothelial cells.....	114
4.6.2	Adaptive decrease in C/EBP β gene expression is consequent to stable, but not transient, LRP1 repression in human brain microvascular endothelial cells.....	115
4.6.3	Stable, but not transient, LRP1 repression prevents S1P-induced HBMEC migration	115
4.6.4	Lack of response to S1P in endothelial cells isolated from brains of Lrp1(EC) ^{-/-} mice	116
4.6.5	LRP1 modulation of S1P receptor-mediated signaling requires activation of p38 MAPK and ERK downstream signaling pathways	117
4.6.6	S1P3 is required for proper S1P-mediated migration of HBMEC.....	117
4.6.7	Overexpression of LRP1 cluster IV upregulates S1P3 transcription and restores S1P-mediated cell migration in HBMEC-LRP1 ^{-/-}	118
4.7	Discussion.....	119
4.8	Acknowledgments	124
4.9	Footnotes	125
4.10	Figures	126
	CHAPITRE V	133
	MESENCHYMAL STROMAL CELL CILIOGENESIS IS ABROGATED IN RESPONSE TO TUMOR NECROSIS FACTOR-A AND REQUIRES NF-KB SIGNALING	133
5.1	Avant-propos	134
5.2	Résumé	135
5.3	Abstract.....	136
5.4	Introduction.....	137
5.5	Material and methods	139
5.5.1	Materials.....	139

5.5.2	Cell culture	139
5.5.3	Immunofluorescence	140
5.5.4	Immunoblotting procedures	140
5.5.5	Transfection method and RNA interference	141
5.5.6	Total RNA isolation, cDNA synthesis, and quantitative real-time PCR	141
5.5.7	Analysis of cell cycle by flow cytometry	142
5.5.8	Statistical data analysis.....	142
5.6	Results	143
5.6.1	TNF- α abrogates primary cilia expression in mesenchymal stromal cells.	143
5.6.2	TNF- α -mediated cilia loss does not alter cell cycle phases and IFT88 nuclear expression.	143
5.6.3	Progranulin reverses TNF- α -mediated cilia loss.....	144
5.6.4	IKKs are required for TNF- α -mediated cilia loss.	144
5.6.5	Gene silencing of NF- κ B p65, but not of NF- κ B p50, abrogates the TNF- a-mediated decrease in ciliogenesis.	145
5.7	Discussion.....	146
5.8	Acknowledgements.....	149
5.9	Figures	150
	CHAPITRE VI.....	155
	DISCUSSION ET CONCLUSION.....	155
6.1	Généralités	156
6.2	Les cellules du microenvironnement tumoral acquièrent des phénotypes adaptatifs favorables à leur survie et à l'oncogenèse.....	157
6.2.1	Les cellules tumorales et endothéliales cérébrales répondent de façon différentielle à l'hypoxie	158
6.2.2	LRP1 est important dans l'adaptation oncogénique des cellules microvasculaires endothéliales en réponse à la S1P.	163
6.2.3	La ciliogenèse des cellules souches mésenchymateuses est modulée par une signalisation inflammatoire.	167
6.3	Conclusion	170
	APPENDICE A.....	175

RÉGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DU TRANSPORTEUR DE GLUCOSE-6-PHOSPHATE : UN RÔLE MÉTABOLIQUE DANS LA CANCÉROGENÈSE DES CELLULES CÉRÉBRALES?	175
APPENDICE B	187
LOW DENSITY LIPOPROTEIN RECEPTOR-RELATED PROTEIN (LRP) 1 REPRESSION TRIGGERS <i>IN VITRO</i> AND <i>IN VIVO</i> ADAPTIVE MECHANISMS IN HUMAN BRAIN VASCULAR AND TUMORAL COMPARTMENTS	187
B.1 Contribution.....	188
B.2 Abstract.....	189
APPENDICE C	190
ISOTOPE-LABELED DIFFERENTIAL PROFILING OF METABOLITES USING N-BENZOYLOXYSUCCINIMIDE DERIVATIZATION COUPLED TO LIQUID CHROMATOGRAPHY/HIGH-RESOLUTION TANDEM MASS SPECTROMETRY	190
C.1 Contribution.....	191
C.2 Abstract.....	192
BIBLIOGRAPHIE	193

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	Étapes du développement tumoral : initiation, promotion et progression.	8
1.2	Statistiques canadiennes sur le cancer.	9
1.3	Les cellules du microenvironnement tumoral.	14
1.4	Contribution des cellules souches mésenchymateuses à la progression et la vascularisation tumorale.	18
1.5	Unité neurovasculaire.	21
1.6	Mécanismes de transport à la barrière hématoencéphalique.	23
1.7	Récepteurs de la famille des LDLR.	26
1.8	Les fonctions de LRP1 dans le cancer.	27
1.9	Récepteurs de la famille des syndecans.	30
1.10	Structure des récepteurs à domaine Vps10p.	32
1.11	Caractéristiques de la progression tumorale.	34
1.12	Voie de signalisation par le facteur de transcription inductible par l'hypoxie.	37
1.13	Angiogenèse tumorale.	40
1.14	Étapes de la migration cellulaire endothéliale.	42
1.15	Voie de signalisation des MAPK.	45
1.16	Les récepteurs de la sphingosine-1-phosphate.	48
1.17	Voie de signalisation canonique classique de NF- κ B.	51
1.18	Le cil primaire.	58
1.19	Synchronisation de l'assemblage et du désassemblage du cil primaire avec le cycle cellulaire.	59

1.20	Structure de l'ANG1005.	63
1.21	Transcytose de l'Angiopep-2 via LRP1.	64
2.1	Traitement hypoxique.	69
2.2	Schéma de la procédure de marquage utilisé pour le tri cellulaire par des microbilles magnétiques.	71
2.3	Validation de la pureté de l'isolation des cellules endothéliales cérébrales murines.	71
2.4	Exemple de marquage fluorescent du cil primaire.	72
3.1	Angiopep-2 cell surface binding, uptake, and intracellular sorting in brain tumor cells and brain microvascular endothelial cells.	95
3.2	Hypoxia differentially modulates An2 binding, uptake, and sorting between U87 and HBMEC.	96
3.3	Differential gene expression of LRP1, HSPG, and Vps10p-D between brain tumoral and brain endothelial cells.	97
3.4	Transcriptional impact of hypoxia on molecular players in An2 sorting in tumoral and endothelial cells.	98
3.5	Compartmentation of proteins having a role in An2 sorting.	99
3.6	Schematic impact of hypoxia on compartmentation of enhanced sorting An2 proteins.	100
4.1	C/EBP β contributes to S1P receptors transcriptional control in human brain microvascular endothelial cells.	126
4.2	Adaptive decrease in C/EBP β gene expression is consequent to stable, but not transient, LRP1 repression in human brain microvascular endothelial cells.	127
4.3	Stable, but not transient, LRP1 repression prevents S1P-induced HBMEC migration.	128
4.4	Lack of response to S1P in brain endothelial cells isolated from <i>Lrp1(EC)^{-/-}</i> mouse.	129
4.5	LRP1 modulation of S1P receptor-mediated signaling requires activation of p38 MAPK and ERK downstream signaling pathways.	130

4.6	S1P3 is required for proper S1P-mediated signaling and migration of HBMEC.	131
4.7	Overexpression of m4LRP1 (cluster 4) upregulates S1P3 transcription and restores S1P-mediated cell migration in HBMEC-LRP1 ^{-/-}	132
5.1	TNF- α abrogates primary cilia expression in mesenchymal stromal cells.	150
5.2	TNF- α -mediated cilia loss does not alter cell cycle phases and IFT88 nuclear expression.....	151
5.3	Progranulin reverses TNF- α -mediated cilia loss.....	152
5.4	IKKs are required for TNF- α -mediated cilia loss.	153
5.5	NF- κ B p65, but not NF- κ B p50, gene silencing abrogates TNF- α -mediated decrease in ciliogenesis.	154
6.1	Résumé des interactions et des adaptations cellulaires du microenvironnement tumoral du GBM.....	174
A.1	Le système G6Pase.	179
A.2	L'expression de G6PT est régulée par la ConA et la surexpression de MT1-MMP.....	180
A.3	La transcription de G6PT est inhibée par la ConA et la surexpression de MT1-MMP.....	181
A.4	La stimulation pro-inflammatoire inhibe la transcription de G6PT.....	182
A.5	L'expression de G6PT requiert les sous-unités IKK β et p65.	183
A.6	La transcription de G6PT est dépendante du facteur de transcription NF- κ B.....	184
A.7	La surexpression de G6PT induit le processus autophagique dans les cellules U87.	185
A.8	L'implication de G6PT dans l'autophagie des cellules U87 nécessite l'activation des voies de signalisation de PI3K et de la MAPK ERK.	186

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A β	β -amyloïde
ABC	Transporteur à <i>ATP Binding Cassette</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
AKT3	Protéine kinase sérine/thréonine RAC- γ
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
An2	Angiopep-2
AP-1	Protéine activatrice 1
ARN	Acide ribonucléique
ATF2	Facteur de transcription activateur 2
ATP	Adénosine triphosphate
BDNF	Facteur neurotrophique dérivé du cerveau
bFGF	Facteur de croissance des fibroblastes basique
BHE	Barrière hématoencéphalique
BNIP3	<i>BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3</i>
CBP	Protéine de liaison à CREB
CD31	Groupe de différenciation 31 (synonyme de PECAM-1)
CDKN2A	Kinase inhibitrice 2A dépendante de la cycline
CE	Cellule endothéliale
C/EBP β	<i>CCAAT/Enhancer Binding Protein β</i> , facteur de transcription

CEC	Cellule endothéliale cérébrale
cGy	Centigray (unité de radioactivité)
CPP	Peptide pénétrant dans les cellules
CO ₂	Dioxyde de carbone
ConA	Concanavaline A
COX-2	Cyclooxygénase-2
CREB	Protéine de liaison à l'élément de réponse AMPc
CS	Chondroïtine sulfate
CSF-1	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> , milieu de culture cellulaire
EDG	Gène de différenciation endothéliale
EGFR	Récepteur du facteur de croissance épidermique
ELK1	<i>ETS domain-containing protein Elk1</i>
ERK	Kinase régulée par les signaux extracellulaires
FAK	Kinase d'adhésion focale
FBS	Sérum fœtal bovin
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGFR	Récepteur du facteur de croissance des fibroblastes
FIH1	Facteur inhibiteur d'HIF
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine
G6P	Glucose-6-phosphate
G6Pase	Glucose-6-phosphatase
G6PT	Transporteur de glucose-6-phosphate

GBM	Glioblastome multiforme
GDNF	Facteur neurotrophe dérivé de la glie
GEP	Précurseur granuline épithéline
GFAP	Protéine acide fibrillaire gliale
GK	Glucokinase
GLUT	Transporteur de glucose
GPC	Glypicane
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GRN	Granuline
GSK3	Glycogène synthase kinase 3
GTPase	Guanosine triphosphatase
HBMEC	Cellules microvasculaires endothéliales cérébrales humaines
HBMEC-SV40	HBMEC immortalisées par le virus SV40 (HBMECi)
HDL	Lipoprotéine de haute densité
HIF	Facteur inductible par l'hypoxie
HK	Hexokinase
HRE	Élément de réponse à l'hypoxie
HS	Héparane sulfate
HSPG	Protéoglycane héparane sulfate
I κ B	Inhibiteur de NF- κ B
IFT	Transport intraflagellaire
IKK	Kinase I κ B
IL	Interleukine

IRS2	Substrat 2 du récepteur à l'insuline
JAM-4	Molécule d'adhésion jonctionnelle 4
JNK	Kinase c-Jun N-terminale
LDHA	Lactate déshydrogénase A
LDLR	Récepteur des lipoprotéines de basse densité
LRP1	<i>Low density lipoprotein receptor-related protein 1</i>
LRP4	<i>Low density lipoprotein receptor-related protein 4</i> (MEGF7)
MACS	<i>Magnetic-activated cell sorting</i>
MAPK	Protéine kinase activée par des mitogènes
MAPKK	Protéine kinase kinase activée par des mitogènes, ou MEK
MAPKKK	Protéine kinase kinase kinase activée par des mitogènes, ou MEKK
MEC	Matrice extracellulaire
MEF2	Facteur activateur des myocytes
MEF	Cellules fibroblastiques embryonnaires murines
MMP-2 ou -9	Métalloprotéase matricielle-2 ou -9
MRP	Protéine associée à la multirésistance aux médicaments
MSC	Cellule souche mésenchymateuse
MT1-MMP	Métalloprotéase matricielle de type membranaire (MMP14)
mTORC1	Complexe mTOR 1, cible de la rapamycine
NF1	Neurofibromine
NF- κ B	Facteur de transcription nucléaire activateur de la chaîne légère κ des cellules B activées
NGF	Facteur de croissance du tissu nerveux

NK	Cellule <i>Natural Killer</i>
NO	Monoxyde d'azote
NRP1	Neuropiline 1
NTS3	Récepteur-3 de la neurotensine
PARK2	Parkin E3 ubiquitine-ligase
PCDGF	Facteur de croissance dérivé des cellules de la prostate
PDGFB	Sous-unité B du facteur de croissance dérivé des plaquettes
PDGFR β	Récepteur β du facteur de croissance dérivé des plaquettes
PDK	Pyruvate déshydrogénase kinase
PECAM-1	Molécule d'adhésion cellulaire plaquettaire endothélial
PGC1 α	Coactivateur 1 α de PPAR γ
P-gp	P-glycoprotéine
PGRN	Progranuline
PHD	Prolylhydroxylase
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acétate
PPAR γ	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor γ</i>
PTEN	Phosphatase et homologue tensine
PTPRD	Protéine tyrosine phosphatase δ de type récepteur
pVHL	Suppresseur de tumeur von Hippel Lindau
RAP	Protéine associée aux récepteurs
RE	Réticulum endoplasmique

RB	Protéine du rétinoblastome
RHD	Domaine d'homologie Rel
S1P	Sphingosine-1-phosphate
SDC	Syndécan
SDF1	Facteur-1 dérivé des cellules stromales, aussi appelé CXCL12
SNC	Système nerveux central
SorCS	<i>Sortilin related VPS10 domain containing receptor 1</i>
SorLA	<i>Sortilin-related receptor, LDLR class A repeats containing</i>
SphK1	Sphingosine kinase 1
TGF α ou β	Facteur de croissance transformant
TIMP2	Inhibiteur tissulaire des métalloprotéases
TLR9	Récepteur <i>Toll-like 9</i>
TMZ	Temozolomide
TNF α	Facteur α de nécrose tumorale
TNFR	Récepteur au TNF α
TP53	Protéine tumorale p53
uPA	Activateur du plasminogène de type urokinase
UV	Rayons ultraviolets
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VEGFR-2	Récepteur-2 du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VLDLR	Récepteur des lipoprotéines de très basse densité
Vps10p-D	Domaine <i>Vacuolar protein sorting 10 protein</i>

RÉSUMÉ

Le glioblastome multiforme (GBM) est la tumeur cérébrale adulte la plus agressive et la plus invasive. Son développement est dicté par des événements moléculaires responsables de son phénotype inflammatoire et angiogénique. Le GBM subit des transformations cellulaires au sein de son microenvironnement. Cela comprend la reprogrammation énergétique, l'induction de l'angiogenèse et la mise en place d'un microenvironnement inflammatoire. Le GBM acquiert une importante résistance à la thérapie, en grande partie favorisée par la présence de la barrière hématoencéphalique (BHE). Les interactions moléculaires et cellulaires au cœur de la progression du GBM et de sa capacité de résistance sont de plus en plus étudiées et méritent une attention particulière. Dans le microenvironnement du GBM, nous retrouvons, entre autres, des cellules endothéliales microvasculaires. Elles forment les vaisseaux sanguins et répondent aux signaux angiogéniques induits par les autres cellules du microenvironnement, particulièrement les cellules cancéreuses et les cellules souches mésenchymateuses (MSC). Les MSC contribuent à l'angiogenèse et à l'inflammation associées au cancer en exprimant des biomarqueurs des cellules tumorales cérébrales. Étant donné les différences moléculaires observées à travers ces types cellulaires, il convient de se questionner et comprendre la nature des mécanismes adaptatifs responsables du caractère agressif du GBM.

Des stratégies thérapeutiques sont mises au point afin de trouver un traitement efficace au GBM. L'immunothérapie, la thérapie ciblée et la vectorisation des médicaments font partie des méthodes à l'essai. Le peptide dérivé du domaine de Kunitz du peptide aprotinine, nommé Angiopep-2 (An2) représente une innovation dans le transport de médicaments anticancéreux au travers de la BHE. Sachant que l'internalisation de l'An2 n'est médiée qu'à environ 50% par la *low density lipoprotein receptor-related protein* (LRP1), le premier objectif de cette thèse constitue à identifier les possibles mécanismes compensatoires de son entrée dans les cellules endothéliales et tumorales cérébrales. Il s'agit de situer l'importance d'autres récepteurs présents à la BHE dans le transport de l'An2, mais aussi de comprendre l'effet du microenvironnement hypoxique tumoral sur les systèmes d'endocytose et de transcytose. Nous avons émis l'hypothèse que des comportements différents se produisent au niveau des cellules de la BHE, notamment les cellules microvasculaires endothéliales cérébrales (HBMEC), les HBMEC immortalisées (HBMECi), représentant l'endothélium tumoral, et les cellules de GBM quant à l'internalisation de l'An2 dans un environnement hypoxique. Nous avons montré que le caractère

tumoral engendre une adaptation cellulaire menant à une meilleure internalisation de l'An2 en comparaison aux cellules endothéliales non-immortalisées qui, de leur côté, avaient une meilleure capacité à lier l'An2.

Dans le but de caractériser des mécanismes adaptatifs responsables de la progression du GBM, nous avons choisi d'étudier le rôle de LRP1 dans les HBMECi en réponse à la sphingosine-1-phosphate (S1P). Les cellules endothéliales cérébrales sont activement impliquées dans l'angiogenèse des GBM en réponse à une variété de facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF, le bFGF et les lipides bioactifs S1P et LPA. Particulièrement, la S1P module la migration de plusieurs types cellulaires en se liant à ses récepteurs couplés aux protéines G. Sachant que LRP1 et la signalisation par la S1P sont importants pour le maintien de l'intégrité vasculaire, nous avons identifié un rôle majeur pour LRP1 dans la migration cellulaire en réponse à la S1P. Les HBMECi sont capables de migrer en réponse à la S1P ainsi qu'à l'acide lysophosphatidique (LPA), un lipide bioactif de la même famille. Cependant, nous montrons que la répression stable, mais pas transitoire, de LRP1 empêche les HBMECi de migrer en réponse à la S1P tout en maintenant une réponse adéquate à la LPA. La transduction du signal via les MAPK p38 et ERK s'en trouve également altérée. Ces résultats suggèrent une interrelation importante entre la protéine LRP1 et la signalisation par la S1P et supportent aussi l'hypothèse que les cellules s'adaptent lorsqu'une protéine multifonctionnelle ayant un rôle important dans le métabolisme cellulaire est absente du système.

Enfin, nous avons étudié la ciliogenèse, un mécanisme de transformation cellulaire synchronisé avec le cycle cellulaire. Des perturbations dans l'expression du cil primaire ou des altérations de sa longueur sont associées à diverses ciliopathies, mais aussi à la progression cancéreuse. Les MSC perdent l'expression du cil primaire en condition hypoxique, une caractéristique majeure de la progression tumorale cérébrale. De plus, les MSC activées par le TNF α , un agent pro-inflammatoire, sont impliquées dans la croissance tumorale via la production de facteurs chimioattractants et de facteurs de croissance. Nous montrons que le cil primaire est régulé par la voie de signalisation du facteur de transcription NF- κ B en conditions inflammatoires modulées par le TNF α et la progranuline.

En conclusion, l'ensemble des résultats obtenus démontrent la capacité des cellules du microenvironnement tumoral à s'adapter et à reprogrammer leur comportement pour contribuer à la progression du GBM. Les études *in vitro* et *in vivo* ont permis d'identifier de nouvelles cibles moléculaires potentielles dans la thérapie du GBM.

Mots-clés : Glioblastome multiforme, Hypoxie, Angiogenèse, Inflammation, Ciliogenèse, LRP1, Angiopep-2, NF- κ B, MAPK

ABSTRACT

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most aggressive and invasive adult brain tumor. Its development is dictated by molecular events responsible of its inflammatory and angiogenic phenotype. GBM undergoes cellular transformations reaction in its microenvironment. This includes energy reprogramming, induction of sustained angiogenesis and establishment of an inflammatory microenvironment. GBM is resistant to therapy and this is enhanced by the presence of the blood-brain barrier (BBB). The molecular and cellular events leading the progression of the GBM and its resilience to therapy are increasingly studied, and significantly continue to deserve special attention. Microvascular endothelial cells are part of the GBM microenvironment. They form the blood vessels and respond to angiogenic signals secreted by other cells in the microenvironment, particularly brain tumor cells and mesenchymal stem cells (MSC). MSC contribute to angiogenesis and tumor-associated-inflammation by expressing brain tumor-associated biomarkers. Since there are molecular differences across these cell types, it is appropriate to question the nature of the adaptive mechanisms responsible for the aggressive nature of GBM.

Therapeutic strategies are being developed to find an effective treatment to GBM. Immunotherapy, targeted therapy and drug vectorization are currently extensively studied. Vectorization of drugs is of great interest to find molecules that cross the BBB. Angiopep-2 (An2) peptide is derived from Kunitz domain of aprotinin peptide, and represents innovative strategy to deliver anticancer drugs through the BBB. Knowing that the internalization of An2 is mediated to about 50% by the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP1), the first goal of this thesis was to determine the compensatory mechanisms of entry into endothelial cells and brain tumor cells. The aim is to define the importance of other membrane receptors responsible of An2 transport through the BBB, but also to better understand the impact of microenvironmental hypoxic cue on endocytosis and transcytosis. This also brings out the hypothesis of the existence of differential behaviors between brain microvascular endothelial cells (HBMEC) and immortalized HBMEC (HBMECi), representing tumor endothelium, and GBM cells of being able to bind and internalize An2 under hypoxia. We showed that the tumoral phenotype generates a cellular adaptive phenotype ensuring better uptake of An2 compared to non-immortalized, which, in turn, had a better ability to bind An2.

In order to characterize the adaptive mechanisms responsible for the progression of GBM, we chose to study the role of LRP1 in HBMEC*i* under stimulation by sphingosine-1-phosphate (S1P). Cerebral endothelial cells are actively involved in angiogenesis of GBM under a variety of pro-angiogenic factors such as VEGF, bFGF, and bioactive lipids S1P and lysophosphatidic acid (LPA). Especially, S1P is known to regulate migration of many cell types by binding to his G-protein coupled receptors. Knowing that LRP1 and that the signaling by S1P and his receptors are involved in vascular integrity, we have found a major role for LRP1 in cell migration of HBMEC*i* in response to the bioactive sphingolipid S1P. HBMEC*i* are able to migrate in response to S1P as well as to LPA, a bioactive lipid from the same family. However, the stable repression of LRP1, but not transient, prevents HBMEC*i* to migrate in response to S1P but not to LPA. Signal transduction via ERK and p38 MAPK is also found impaired in LRP1 knockout endothelial cells. These results suggest an important interrelationship between LRP1 and S1P signaling, but also support the hypothesis that cells adapt when a multifonctionnal protein having an important role in cellular metabolism is repressed.

Finally, we studied ciliogenesis, a cell transformation mechanism synchronized with the cell cycle. Altered expression of the primary cilium or alterations in its length are not only associated with various ciliopathies, but also with cancer progression. MSC lose expression of the primary cilium in hypoxic conditions, a major feature of brain tumor progression. Moreover, TNF α -activated MSCs are involved in tumor growth and progression through production of chemoattractant factors and growth factors. We have shown that the primary cilium is regulated by the transcription factor NF- κ B signaling pathway in inflammatory conditions triggered by TNF α and progranulin.

In conclusion, the overall results demonstrate the ability of cells within the tumor microenvironment to adjust and reprogram their behavior to contribute to the progression of GBM. *In vitro* and *in vivo* studies of the present thesis have helped to identify potential new molecular targets for the therapy of the GBM.

Keywords: Glioblastoma multiforme, Hypoxia, Angiogenesis, Inflammation, Ciliogenesis, LRP1, Angiopep-2, NF- κ B, MAPK

INTRODUCTION

Les tumeurs cérébrales font encore partie des cancers les plus récurrents et mortels. Malgré les chirurgies de résection et les traitements de chimiothérapie combinés à la radiothérapie, les récurrences sont souvent inévitables et les taux de survie après 5 ans sont d'environ 25% (Société Canadienne du Cancer, 2016). Le glioblastome multiforme (GBM) est la tumeur cérébrale la plus invasive et la plus agressive qui touche principalement les adultes de 20 à 64 ans. Les faibles taux de survie relative à 5 ans associés au GBM varient de 14 à 1% avec l'âge. Le cerveau est un organe extrêmement dynamique qui nécessite une grande protection. Celle-ci est assurée par la présence de la barrière hématoencéphalique (BHE). Séparant le cerveau de la circulation sanguine, le rôle de la BHE est de laisser passer les nutriments, les ions et l'oxygène, nécessaires au bon fonctionnement du cerveau. Elle sert aussi à empêcher les toxines, les bactéries et les virus de pénétrer dans le cerveau. La BHE assure ainsi le caractère immuno-privilegié du cerveau (Becher, Prat et Antel, 2000 ; Louveau, Harris et Kipnis, 2015). De plus, la présence de récepteurs et transporteurs assurent la bonne gestion des autres molécules et protéines qui peuvent traverser la BHE. Le problème majeur du GBM est la résistance aux traitements en partie due à la difficulté d'y amener des molécules thérapeutiques à cause des propriétés étanches de la BHE. La capacité du GBM à s'adapter en réponse aux divers stimuli du microenvironnement tumoral lui procure un phénotype invasif et inflammatoire accru. Le GBM développe ainsi son propre système de gestion d'énergie pour pouvoir survivre. Cela se fait en étroite collaboration avec les autres composantes du microenvironnement cellulaire tumoral. Depuis le début du siècle, les caractéristiques tumorales sont de plus en plus reconnues, il devient donc plus facile de comprendre et

de déterminer les biomarqueurs à cibler dans la prévention et la thérapie cancéreuse cérébrale. Cependant, il convient encore de se poser d'importantes questions afin de pouvoir trouver de meilleures solutions pour contrer le développement du GBM. Plus spécifiquement, il convient de mieux comprendre les mécanismes moléculaires de la progression du GBM afin de trouver des solutions de thérapie optimisées. Ultiment, la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques contribuera à la guérison, pour l'instant impossible, du GBM.

Cette thèse est le rassemblement des travaux effectués sous trois volets déterminés. Afin d'élucider les comportements cellulaires qui mènent à la résistance thérapeutique du GBM, nous avons identifié des mécanismes adaptatifs importants responsables de la progression tumorale. De façon chronologique, nous nous sommes d'abord penchés sur l'étude de l'impact inflammatoire du facteur de nécrose tumoral α (TNF α) sur la ciliogenèse dans les cellules souches mésenchymateuses (MSC). Ces cellules jouent un rôle important dans la progression tumorale et le cil primaire y est inhibé par l'hypoxie, une condition observée dans le GBM. Le développement tumoral est souvent associé à la perte du cil primaire et à l'augmentation de la prolifération cellulaire (Seeger-Nukpezah *et al.*, 2013). Le cil primaire est très peu ou pas exprimé sur les cellules cancéreuses (Hassounah, Bunch et McDermott, 2012). Par la suite, nous avons orienté nos travaux sur l'étude du transport de l'Angiopep-2 (An2), un vecteur peptidique capable de traverser la BHE. Plus particulièrement, mes travaux ont porté sur l'impact de l'hypoxie sur la reconnaissance et l'internalisation de l'An2 par la *low density lipoprotein receptor related protein-1* (LRP1). Nous avons également exploré les mécanismes compensatoires impliquant d'autres protéines membranaires dans l'internalisation et la reconnaissance de l'An2 en contexte hypoxique dans des modèles cellulaires représentant les compartiments tumoraux et endothéliaux vasculaires cérébraux. Après avoir identifié une capacité d'adaptation phénotypique des cellules endothéliales face à la répression génique de LRP1, nous avons étudié l'impact de ce récepteur sur la capacité migratoire des

cellules endothéliales sous l'action de la sphingosine-1-phosphate (S1P), un sphingolipide bioactif. Cette interrelation joue un rôle dans la signalisation cellulaire inflammatoire et invasive, caractéristiques importantes dans le développement et la progression des tumeurs solides cérébrales.

De façon logique, cette thèse présente les questionnements et les résultats obtenus en commençant par une revue de la littérature au chapitre I mettant de l'avant l'état des connaissances sur le GBM, mais aussi sur ses composants signalétiques et moléculaires jouant un rôle dans son développement. Le chapitre II consiste à la description du projet de recherche en commençant par l'exposition de la problématique suivie de l'hypothèse et de la description des objectifs spécifiques. La méthodologie est brièvement décrite puis la pertinence et la contribution des travaux à l'avancement des connaissances scientifiques sont expliquées. Une recension des résultats obtenus est présentée à travers trois chapitres, sous forme d'articles scientifiques. Le premier article traite des différences d'adaptation entre les cellules tumorales de glioblastomes U87 et les cellules endothéliales cérébrales dans un contexte hypoxique. Le but est de comprendre les mécanismes d'internalisation de l'An2, ce vecteur peptidique récemment mis au point par l'équipe de la compagnie biopharmaceutique Angiochem Inc. (Beliveau *et al.*, 2009). Cet article a été soumis aux avocats de la compagnie Angiochem. Le deuxième article montre l'importance du récepteur LRP1 dans la migration des cellules microvasculaires endothéliales cérébrales stimulées par la S1P *in vitro* et *in vivo*. De plus, la répression stable de LRP1 représente une capacité d'adaptation phénotypique des cellules endothéliales qui ne répondent plus à la stimulation de la S1P. La répression transitoire de LRP1, quant à elle, n'empêchait pas les cellules de répondre à la S1P. C'est-à-dire que LRP1 doit être réprimé de façon stable sans quoi les réponses cellulaires demeurent inchangées par rapport aux cellules non stimulées. Cet article a été soumis pour publication à *The Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. Le troisième article expose les effets d'une stimulation pro-inflammatoire du TNF α sur la

ciliogenèse dans les MSC. Cet article est publié dans le journal *Cancer Letters*. Enfin, le dernier chapitre est une discussion générale faisant ressortir les principales conclusions de ces travaux.

CHAPITRE I

ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1 Les cancers du cerveau

1.1.1 Généralités et statistiques du cancer

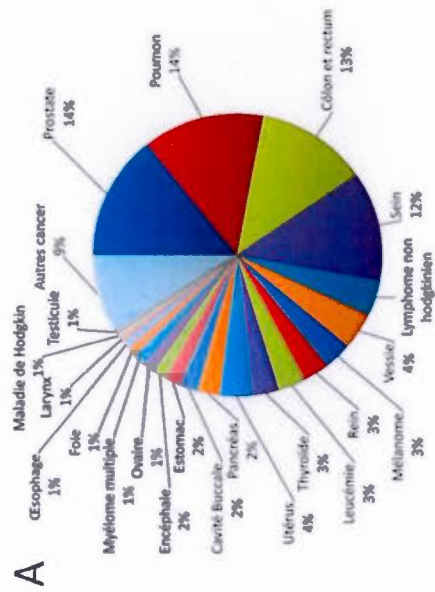
De façon générale, un cancer se développe sur plusieurs années. Des millions de mutations génétiques se produisent tout au long de la vie, et ce, dès la formation de l'embryon jusqu'à maturité (Beliveau et Gingras, 2014). L'influence environnementale a un impact sur l'initiation de dommages à l'ADN, engendrant la promotion d'une cellule initiée vers la formation d'une lésion précancéreuse (Figure 1.1). La cellule initialement transformée par des modifications de son matériel génétique subit ainsi l'influence du microenvironnement cellulaire lui permettant l'acquisition et l'accumulation d'autres mutations cancéreuses (Beliveau et Gingras, 2006). Les mécanismes de réparations des dommages à l'ADN gèrent la réparation de ces mutations, mais lorsque ces mécanismes sont inefficaces, cela engendre les mutations cancéreuses (Tian *et al.*, 2015). Une cellule mutée ne devient pas automatiquement tumorale. Elle doit subir une série de mutations cancéreuses qui lui confèrent son caractère tumoral défini par dix propriétés de plus en plus documentées (section 1.4) (Beliveau et Gingras, 2014 ; Hanahan et Weinberg, 2011). Une fois le processus enclenché, les cellules initiatrices se transforment et prolifèrent pour faire évoluer la tumeur au stade malin. La croissance rapide corrèle avec une instabilité génomique, présente tout au long de l'oncogenèse (Negrini, Gorgoulis et Halazonetis, 2010). Les cancers du cerveau ne font pas exception. Il existe plus d'une centaine de cancers du cerveau et ils représentent seulement 2% des nouveaux cas de cancer diagnostiqués annuellement (Figure 1.2) (Société de recherche sur le cancer, 2015). Le diagnostic se fait souvent lorsque la tumeur est dans un état avancé. Cela rend les procédures thérapeutiques très difficiles et le taux de survie après 5 ans est de 25% (Société Canadienne du Cancer, 2016). En 2015, la Société Canadienne du Cancer a estimé que 3000 nouveaux cas de cancers de cerveau ont été diagnostiqués et que 2100 patients sont morts de la maladie (Société Canadienne du Cancer, 2016 ; Société

de recherche sur le cancer, 2015). Ces cancers sont catégorisés selon leur type cellulaire d'origine. On retrouve, par exemple, les astrocytomes, les oligodendriomes, les épendymomes, les médulloblastomes (pédiatriques), les gliomes mixtes, les méningiomes, les neurinomes acoustiques et les lymphomes primitifs du système nerveux central (SNC) (Société Canadienne du Cancer, 2016 ; Société de recherche sur le cancer, 2015). Ces exemples sont toutes des tumeurs primaires, mais il existe aussi des tumeurs secondaires, soit issues de tumeurs de bas grade ayant évoluées, soit formées par des métastases provenant de la migration de cellules d'autres cancers (poumon, sein, mélanome, colorectal, reins) (Gupta et Massague, 2006). L'histologie des tumeurs primaires et secondaires est très semblable, mais leurs caractéristiques génétiques permet leur distinction (Ohgaki et Kleihues, 2013). Les GBM secondaires présentent la mutation du gène de l'isocitrate déshydrogénase (IDH), caractéristique des glioblastomes de bas grade comme l'astrocytome (Zhang *et al.*, 2013). On ne retrouve pas cette mutation dans les GBM primaires de grade IV (Ohgaki et Kleihues, 2013). Basées sur leur morphologie histologique, les tumeurs cérébrales sont classées selon leur agressivité passant du grade I, pour les tumeurs non invasives et bénignes, jusqu'au grade IV, pour les tumeurs malignes et hautement invasives (Louis *et al.*, 2007). Les astrocytomes regroupent quatre types de tumeurs : les astrocytomes pilocytiques de grade I, les astrocytomes diffus de grade II, les astrocytomes anaplasiques de grade III et les GBM de grade IV. Plus précisément, nous nous sommes intéressés au GBM dans la présente thèse. Ces tumeurs évoluent rapidement et infiltrent les tissus sains environnants (Agnihotri *et al.*, 2013 ; Xie, Mittal et Berens, 2014). Elles ont aussi la capacité de promouvoir la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux existants (angiogenèse), afin d'avoir un apport suffisant en nutriments et oxygène et conserver leur rythme de croissance rapide (Fischer *et al.*, 2005).



Figure 1.1 Étapes du développement tumoral : initiation, promotion et progression.

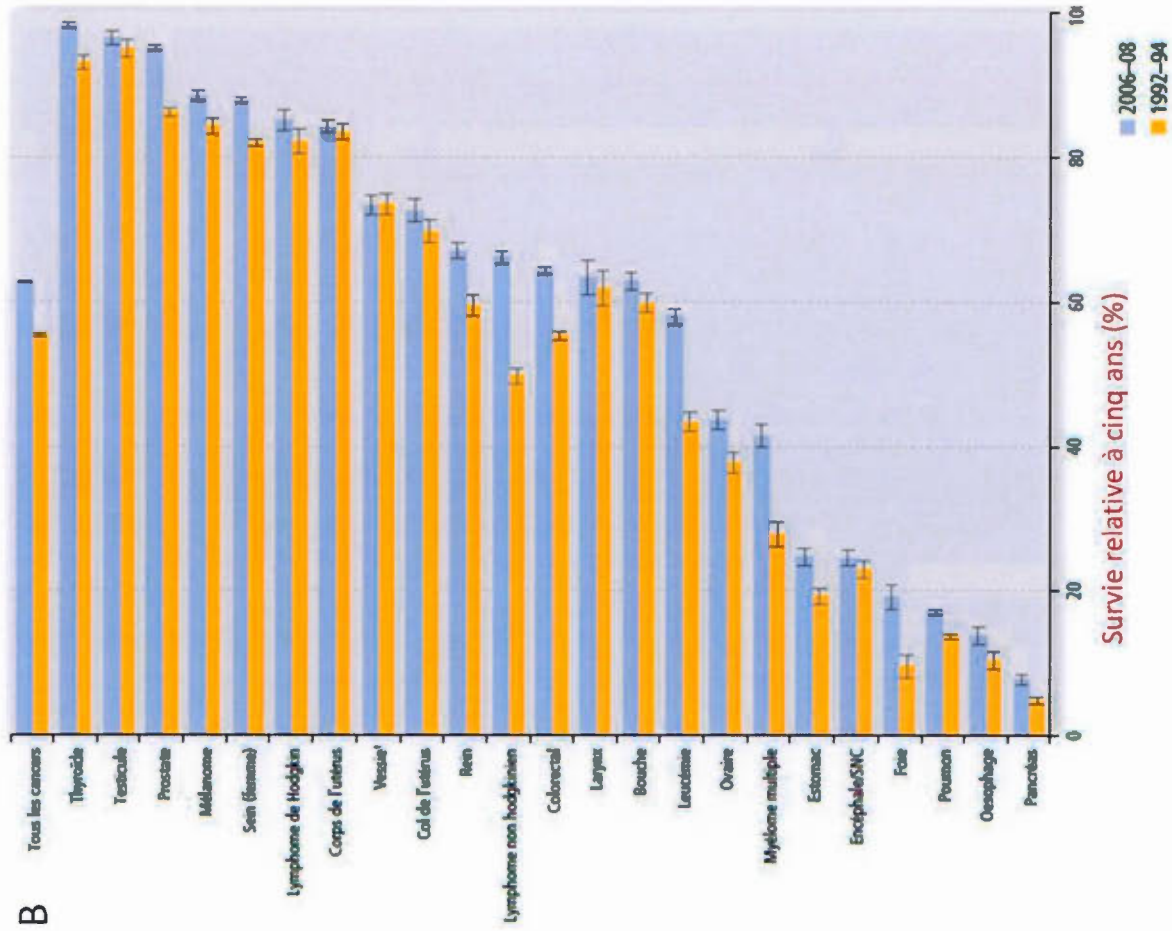
Les cellules normales subissent l'influence exogène de substances chimiques, de rayons ultraviolets (UV) et de virus. Ils provoquent des mutations. Une cellule subit une première mutation lui permettant d'être initiée au phénotype tumoral. Une série de mutations se produisent ensuite afin de promouvoir la formation d'une lésion précancéreuse. Elle progresse plus ou moins rapidement pour former une tumeur maligne qui devient cliniquement détectable. Certaines cellules cancéreuses au grand pouvoir invasif migrent vers d'autres organes pour former des métastases. (Beliveau et Gingras, 2005 ; Portail Santé-Environnement-Travail)



Incidence selon le type de cancer

Figure 1.2 Statistiques canadiennes sur le cancer.

(A) Incidence selon le type de cancer. Dans la population canadienne, les cancers de la prostate, du poumon, colorectaux et du sein sont les plus fréquents. Seulement 2% des cancers diagnostiqués chaque année sont des cancers du cerveau. (B) Rapport de survie relative à cinq ans au Canada. La survie a augmenté avec les années. Avec environ 25%, les cancers de cerveau demeurent dans les cancers au plus faible taux de survie. (Société canadienne du cancer *et al.*, 2015 ; Société de recherche sur le cancer, 2015)



1.1.2 Le glioblastome multiforme

Le GBM est la tumeur cérébrale la plus commune (Hulleman et Helin, 2005 ; Wilson, Karajannis et Harter, 2014). Il a été identifié pour la première fois en 1863 par le Dr Rudolf Virchow (Agnihotri *et al.*, 2013). Il représente 17% des tumeurs cérébrales primaires. Son taux de survie à 5 ans après le diagnostic est de 14% chez les 20-44 ans et passe à 1% chez les 55-64 ans (Société Canadienne du Cancer, 2016). La première chirurgie de résection du GBM remonte à 1920 et malgré l'ablation de l'hémisphère atteint par la tumeur, les 2 patients opérés ont été vaincus par la récurrence de la tumeur ayant infiltré l'hémisphère sain, confirmant ainsi son caractère hautement invasif (Agnihotri *et al.*, 2013). C'est donc depuis le début du 20^e siècle qu'on s'intéresse au GBM, mais son traitement demeure encore aujourd'hui un grand défi.

Les cellules astrocytaires sont à l'origine du GBM. Elles interagissent avec les cellules endothéliales qui forment la paroi des vaisseaux sanguins de la BHE. Les astrocytes interagissent aussi avec des cellules immunitaires et des cellules souches circulant dans le système sanguin. Les astrocytes sont des cellules de soutien jouant d'importants rôles physiologiques : ils régulent la croissance et la survie des cellules neuronales et des axones, ils interviennent dans la formation des synapses et la modulation des transmissions synaptiques, ils modulent les réponses inflammatoires et immunitaires et il y a de plus en plus d'évidences démontrant leur implication dans le métabolisme énergétique, en conditions hypoglycémiques (Sofroniew et Vinters, 2010 ; Wechsler-Reya et Scott, 2001). La perturbation de ces mécanismes physiologiques et des mutations entraînent la prolifération incontrôlée des cellules astrocytaires. Le GBM est ainsi formé et est caractérisé par une très haute densité cellulaire, un centre nécrotique avasculaire dépourvu d'oxygène, une croissance rapide et une grande expression du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) (Dubois *et al.*, 2014). Le VEGF favorise la prolifération des cellules

endothéliales qui composent la BHE, à proximité des astrocytes. Toutefois, le réseau vasculaire intratumoral est très chaotique. L'altération de la BHE contribue à la progression tumorale du GBM. De plus, le phénotype inflammatoire et invasif du GBM cause la perturbation de la BHE accompagnée d'œdème intracérébral (Wolburg *et al.*, 2012). Une des plus importantes limites à une thérapie efficace des tumeurs cérébrales demeure l'étanchéité de la BHE.

Le développement du GBM est relié à plusieurs événements moléculaires et génétiques, rendant son traitement très difficile. D'abord, des altérations sur le chromosome 10 ont lieu (Urbanska *et al.*, 2014). Près de 50% des GBM présente l'amplification de l'expression protéique et l'activation constante du gène du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) (Hatanpaa *et al.*, 2010). En conditions physiologiques normales, le récepteur EGFR peut lier des ligands comme EGF et TGF β pour activer la signalisation intracellulaire menant à la régulation de la prolifération et la différenciation cellulaires (Sasaki, Hiroki et Yamashita, 2013). Les hauts niveaux d'expression d'EGFR en conditions pathologiques corrélerent avec la division cellulaire incontrôlée, la progression tumorale, la résistance à la chimiothérapie et un mauvais pronostic (Azuaje, Tiemann et Niclou, 2015 ; Yano *et al.*, 2003). Dans les GBM, on dénote aussi l'amplification de l'expression du gène du récepteur du facteur de croissance fibroblastique (FGFR) altère l'homéostasie tissulaire (Haugsten *et al.*, 2010). La liaison du facteur de croissance fibroblastique (bFGF) à son récepteur permet normalement l'activation d'une multitude de voies de signalisation intracellulaire (MAPK, AKT, STAT) impliquées dans la croissance, la prolifération, la différenciation et la survie cellulaires (Tiong, Mah et Leong, 2013). Par ailleurs, les protéines substrat-2 du récepteur de l'insuline (IRS2) et kinase B-3 (AKT3) ainsi que la phosphatase et homologue tensine (PTEN) sont d'importants régulateurs de la voie phosphoinositide 3-kinase (PI3K) (Leslie et Downes, 2004 ; Szabolcs *et al.*, 2009). Dans le GBM, la perturbation au niveau des protéines IRS et AKT3 et des mutations sur le gène de PTEN altèrent l'activation de la voie PI3K et

affecte la survie, la prolifération, la croissance et la motilité cellulaires (Cancer Genome Atlas Research Network, 2008 ; Szabolcs *et al.*, 2009). La mutation sur le gène de l'inhibiteur de la kinase cycline dépendante-2A (CDKN2A ou TP16) altère la progression du cycle cellulaire de la phase G1 à la phase S (Cancer Genome Atlas Research Network, 2008). En conditions physiologiques, le gène de CDKN2A agit comme un gène suppresseur de tumeur et est impliqué dans la division cellulaire et le cycle cellulaire (Agarwal *et al.*, 2012). Des mutations dans le gène du facteur de transcription p53 (TP53), un gène suppresseur de tumeur normalement responsable de la réparation des dommages à l'ADN, sont reliées aux processus d'apoptose et de sénescence, mais aussi à l'initiation, la récurrence et la progression du GBM (Cancer Genome Atlas Research Network, 2008 ; Kamp, Wang et Hwang, 2016 ; Nayak *et al.*, 2004). Des mutations de la protéine parkin E3 ubiquitine-ligase (PARK2) sont liées à l'instabilité mitotique (Vlachostergios, Voutsadakis et Papandreou, 2012). Des mutations de la protéine tyrosine phosphatase δ de type récepteur (PTPRD), un gène suppresseur de tumeur, induisent la croissance cellulaire (Veeriah *et al.*, 2009). Finalement, des mutations de la neurofibromine (NF1), un autre gène suppresseur de tumeur, perturbent l'activation de Ras, donc la prolifération, la survie et la traduction des protéines (Cancer Genome Atlas Research Network, 2008 ; Cichowski et Jacks, 2001). L'identification d'une ou plusieurs de ces modifications génétiques permet de déterminer le type de GBM et ainsi identifier la meilleure thérapie disponible (Bastien, McNeill et Fine, 2015).

1.2 Le microenvironnement tumoral

Le microenvironnement des tumeurs solides est composé de divers types cellulaires impliqués dans la progression du cancer (Figure 1.3). Essentiellement, on y retrouve les cellules cancéreuses responsables du caractère tumoral, les cellules souches cancéreuses, les cellules immunitaires, les fibroblastes associés au cancer, les cellules endothéliales, les péricytes, les cellules tumorales invasives ainsi que les cellules

souches et progénitrices, locales ou dérivées de la moelle osseuse (Hanahan et Weinberg, 2011 ; Lorget, 2012). Le microenvironnement tumoral comprend aussi des protéines de la matrice extracellulaire (MEC). Le comportement des tumeurs solides comme le GBM est dicté par le centre hypoxique. La prolifération cellulaire rapide est corrélée à la formation d'un centre cellulaire nécrotique, à une angiogenèse désorganisée et à une déficience en oxygène (Fischer *et al.*, 2005). L'hypoxie qui en résulte est responsable de l'activation de trois principaux facteurs de transcription : HIF1 α , NF κ B et AP1 (Fischer *et al.*, 2005). Les gènes induits par l'hypoxie donnent au GBM son caractère invasif et sa capacité de chimiorésistance (Fischer *et al.*, 2005 ; Jensen, 2009). Les interactions entre les cellules cancéreuses et les cellules qui les entourent ainsi que la MEC sont essentielles à leur survie et leur division (Kucerova et Skolekova, 2013). En ce qui concerne le GBM, l'étroite relation entre les astrocytes et les cellules endothéliales de la BHE favorise un haut taux de vascularisation tumorale et engendre une interaction avec des cellules provenant de la circulation sanguine. Il y a une augmentation accrue de la sécrétion de facteurs de croissance, pro-angiogéniques et pro-inflammatoires. Des cellules souches et immunitaires sont recrutées au site tumoral pour répondre aux besoins de survie. Les plus étudiées sont les macrophages, mais de plus en plus d'attention est apportée aux cellules souches mésenchymateuses (Lorget, 2012).

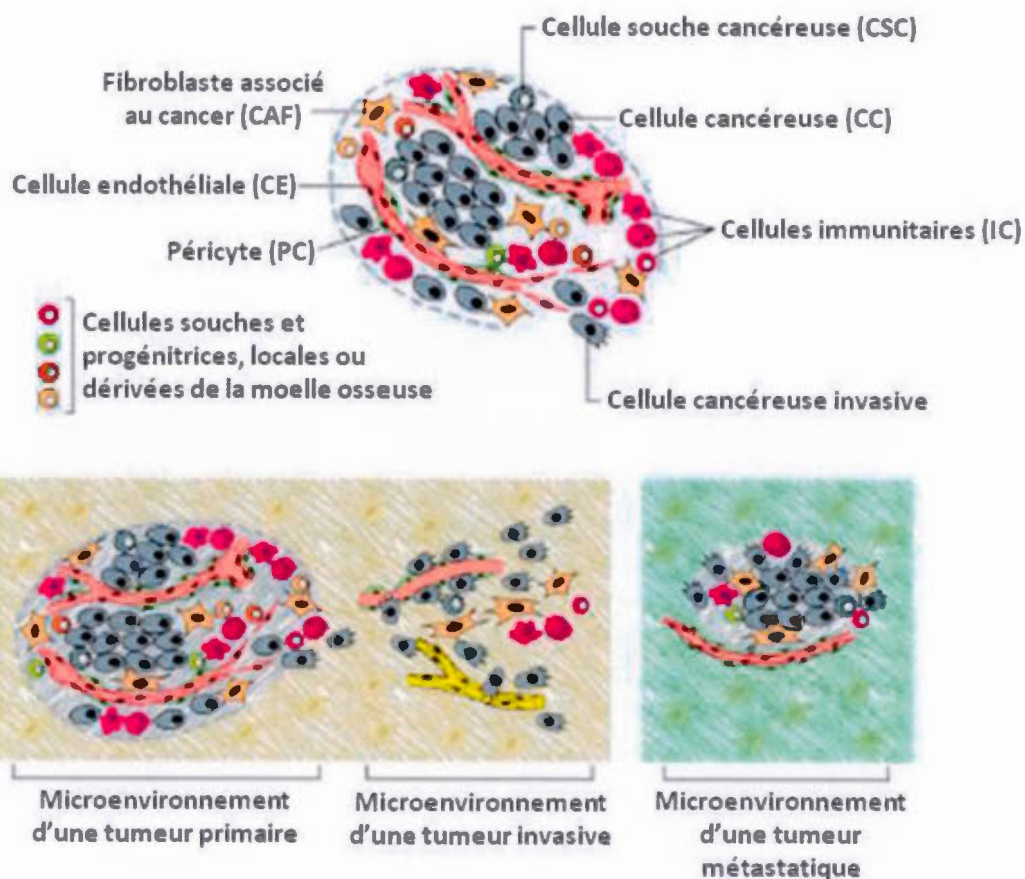


Figure 1.3 Les cellules du microenvironnement tumoral.

Plusieurs types cellulaires composent le microenvironnement tumoral. Les cellules interagissent pour aider à la croissance et à la progression de la tumeur. On distingue un nouveau microenvironnement tumoral selon les capacités d'invasion des cellules qui vont coloniser des tissus sains entourant la tumeur ou dans d'autres organes (métastases). Cela nécessite une interaction cellule-MEC en constante évolution et adaptation. (Hanahan et Weinberg, 2011)

1.2.1 Les astrocytes, cellules d'origine du glioblastome multiforme

Durant l'embryogenèse, les cellules souches neurales de la zone ventriculaire se différencient en neurones, en oligodendrocytes et en astrocytes (Zech, 2004). Les

astrocytes matures sont activés en situation de stress (Yang *et al.*, 2013). La privation d'oxygène et le stress métabolique obligent les astrocytes activés à sécréter des facteurs de croissance et des signaux pro-angiogéniques pour favoriser le recrutement de cellules de soutien au foyer tumoral (Kucerova et Skolekova, 2013). Une fois activés, les astrocytes surexpriment la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP), sécrètent plus de facteur de croissance transformant- α (TGF α), de facteur-1 dérivé des cellules stromales (SDF1 ou CXCL12), de sphingosine-1-phosphate (S1P) produite par la sphingosine kinase (SPHK) et de facteur neutrotrophe dérivé de la glie (GDNF) qui supportent la croissance tumorale (Lorger, 2012). D'une part, la sécrétion de cytokines et de facteurs de croissance (IL-6, TGF- β , IGF-1) promouvoit la prolifération des cellules cérébrales cancéreuses (Lorger, 2012). De plus, de façon autocrine, la production de S1P et de GDNF induit la migration des cellules de GBM et contribue à l'acquisition du phénotype invasif tumoral cérébral (Hoelzinger, Demuth et Berens, 2007). Pour contribuer au caractère invasif de la tumeur, les astrocytes transformés activent des enzymes pour interagir avec la MEC. La forme latente de la métalloprotéase matricielle 2 (proMMP-2) est activée en sa forme active, la MMP-2 via une surexpression et suractivation de la MMP de type membranaire (MT1-MMP ou MMP14) et requiert la présence de l'inhibiteur tissulaire des métalloprotéases-2 (TIMP2) (Bernardo et Fridman, 2003). On remarque aussi une activité induite de l'activateur de plasminogène de type urokinase (uPA), responsable de la conversion du plasminogène en plasmine, et de l'héparanase, responsable de la dégradation des protéoglycanes héparane sulfatés (HSPG) (Lorger, 2012).

1.2.2 Les cellules microvasculaires endothéliales cérébrales

Les cellules endothéliales forment les vaisseaux sanguins (Kushner et Bautch, 2013). D'un organe à un autre, elles sont spécialisées afin de répondre aux besoins de celui-ci. Dans le cerveau, les cellules endothéliales composent, en une seule couche, les capillaires qui forment le compartiment vasculaire de la BHE. Les cellules

endothéliales cérébrales sont liées entre elles par des jonctions serrées. Puisque les GBMs sont associés à un haut niveau de néovascularisation, cela implique la forte présence des cellules endothéliales cérébrales dans le microenvironnement de la tumeur. Elles jouent un rôle majeur dans la croissance tumorale. Elles surexpriment le récepteur-2 du VEGF (VEGFR-2) pour répondre au VEGF sécrété par la tumeur et dont la transcription est stimulée par l'augmentation de l'activité du facteur-1 α induit par l'hypoxie (HIF1 α) (Alberts *et al.*, 2002 ; Fischer *et al.*, 2005 ; Kampen, 2012). Elles produisent également des protéases leur permettant de dégrader les composants de la MEC et de migrer dans celle-ci (Alberts *et al.*, 2002 ; Mentlein, Hattermann et Held-Feindt, 2012).

1.2.3 Les cellules souches mésenchymateuses (MSC)

Les MSC sont dérivées de la moelle osseuse. Elles sont capables d'autorenouvellement et de différenciation en d'autres types cellulaires grâce à leur multipotence (Barry et Murphy, 2004). La différenciation des MSC est activée par différents agents précurseurs spécifiques pour chaque type cellulaire obtenu. La différenciation en adipocyte est activée par le récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR γ), les chondrocytes sont obtenus via l'intervention du TGF β , les ostéocytes sont obtenus suite à l'activation par le bFGF, l'action de l'Azacytidine permet la différenciation des MSC en cardiomyocytes et enfin la différenciation en cellules neuronales se produit sous l'action de l'AMP cyclique (AMPc) (Barry et Murphy, 2004 ; Dimarino, Caplan et Bonfield, 2013). Leur rôle primaire est le maintien des tissus conjonctifs. Elles sont recrutées lors de lésions ou d'inflammation. Les facteurs de croissance et les cytokines sécrétés par les tumeurs favorisent le recrutement des MSC au site tumoral où elles ont un rôle immunomodulateur, elles favorisent la motilité cellulaire, la progression tumorale et les métastases (Kucerova et Skolekova, 2013) (Figure 1.4). Dans le microenvironnement des GBM, on reconnaît de plus en plus la présence des MSC

(Hanahan et Weinberg, 2011). Elles sécrètent des facteurs pro-angiogéniques pouvant stimuler les cellules endothéliales et contribuent ainsi au développement vasculaire tumoral (Annabi *et al.*, 2004 ; Kucerova et Skolekova, 2013). Les MSC expriment des récepteurs de facteurs de croissance et des récepteurs de cytokines en plus de sécréter de la prostaglandine E2 (PGE2) et de produire du VEGF leur conférant un rôle dans la progression tumorale (Hong, Lee et Kang, 2014 ; Yagi et Kitagawa, 2013).

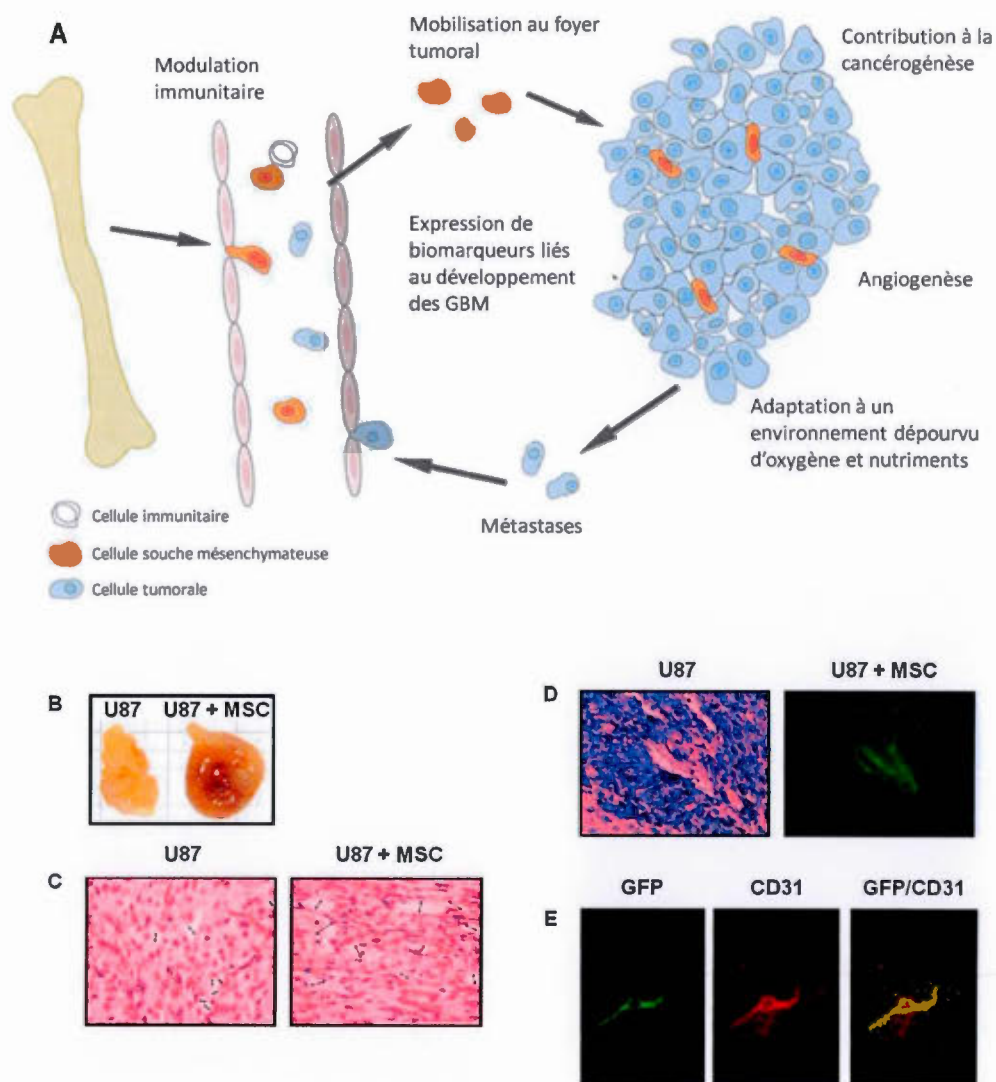


Figure 1.4 Contribution des cellules souches mésenchymateuses à la progression et la vascularisation tumorale.

(A) Les MSC sont recrutées au site tumoral en réponse aux signaux invasifs et inflammatoires sécrétés par la tumeur. Issues de la moelle osseuse, les MSC circulent par le sang afin d'atteindre la tumeur. Une fois mobilisées au foyer tumoral, elles s'adaptent à l'environnement dépourvu en oxygène et nutriments et elles expriment des biomarqueurs favorables au développement du GBM. (B) La contribution des MSC à la progression tumorale est étroitement liée à leur capacité de reconnaître les signaux invasifs et d'amplifier la vascularisation par les cellules microvasculaires

endothéliales. Le recrutement des MSC au foyer tumoral contribue à l'augmentation de la masse tumorale initiée par les cellules de GBM U87. **(C, D)** On observe une plus grande quantité de vaisseaux sanguins dans les tissus tumoraux infiltrés par les MSC. **(E)** La localisation des MSC mobilisées à la tumeur correspond avec la position des cellules microvasculaires endothéliales impliquées dans l'angiogenèse tumorale. CD31 : marqueurs des cellules endothéliales. (Annabi *et al.*, 2004 ; Houthuijzen *et al.*, 2012)

1.3 La barrière hématoencéphalique (BHE)

La BHE est un compartiment étanche et très dynamique responsable de la protection du cerveau contre les toxines, bactéries et virus provenant du sang (Tajes *et al.*, 2014). Elle gère les besoins métaboliques du cerveau et régule l'homéostasie du système nerveux central (SNC) pour favoriser le bon fonctionnement neuronal (Chow et Gu, 2015). Le cerveau consomme pas moins de 20% de l'oxygène total et 60% des réserves métaboliques du corps humain, cependant ses capacités sont limitées en ce qui a trait au stockage de l'énergie (Agnihotri et Zadeh, 2016). C'est pourquoi une étroite régulation de la BHE est essentielle. La BHE est physiquement constituée des cellules endothéliales, des péricytes, des astrocytes, des neurones et finalement des composantes de la MEC. On appelle cet arrangement cellulaire l'unité neurovasculaire (Figure 1.5). Les interactions cellule-cellule se font du compartiment vasculaire vers le compartiment neuronal et vice et versa. Les cellules endothéliales forment une barrière étanche grâce à la présence de jonctions serrées (Keaney et Campbell, 2015). La perte de l'intégrité des jonctions serrées est directement liée à la perturbation de la BHE (Wolburg *et al.*, 2012). Les cellules endothéliales possèdent un système de transport sélectif des macromolécules appelé transcytose (Tuma et Hubbard, 2003). Elles ont aussi recourt aux processus d'endocytose pour internaliser diverses molécules. Elles gèrent l'efflux des déchets métaboliques et des toxines grâce à la famille des transporteurs à cassette de liaison de l'ATP (Abcam), notamment la P-glycoprotéine (P-gp) et les protéines associées à la multirésistance

aux médicaments (MRP) (Chow et Gu, 2015). Les astrocytes interagissent autant avec les cellules endothéliales que les cellules neuronales et sont capables de produire des prostaglandines, de l'ATP et du monoxyde d'azote (NO). Ils régulent le flux calcique entre eux et les cellules endothéliales (Hawkins et Davis, 2005). En conditions pathologiques (Alzheimer, Parkinson, trauma, sclérose en plaques, ischémie, tumeur, etc), la BHE perd sa sélectivité, augmente sa perméabilité et une réponse inflammatoire se développe (Hawkins et Davis, 2005). De plus, les éléments de la MEC sont dégradés favorisant la mise en place du caractère invasif des cellules astrocytaires transformées (Muio, Persson et Sendeski, 2014). La diminution des niveaux d'oxygène favorise la perméabilité de la BHE et entraîne l'activation des facteurs de transcription NF- κ B et HIF-1 α , reliés aux phénomènes inflammatoires et aux dérèglements métaboliques (Hawkins et Davis, 2005).

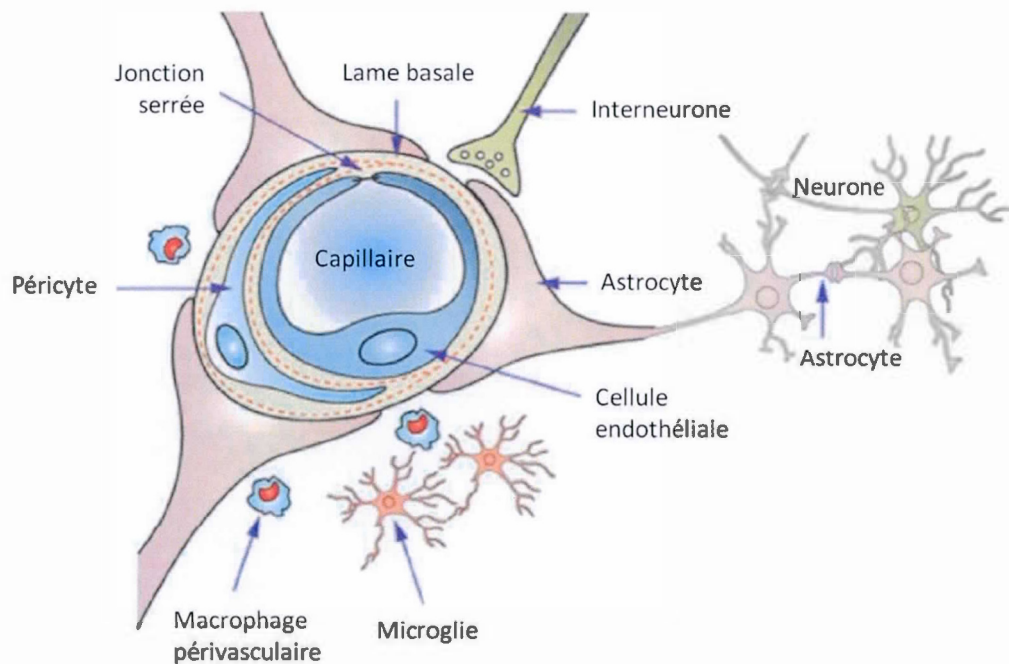


Figure 1.5 **Unité neurovasculaire.**

Composante structurelle de la BHE, l'unité neurovasculaire est formée des neurones, des interneurones, des astrocytes, de la lame basale couverte des cellules musculaires lisses et des péricytes, des cellules endothéliales et de la MEC. Ces cellules interagissent entre elles via les jonctions Gap, les molécules d'adhésion et les canaux ioniques. Chaque composante de l'unité neurovasculaire joue son rôle spécifique dans le maintien de l'intégrité de la BHE : neurones : «pacemaker» qui transforment les signaux électriques et chimiques et communiquent avec les vaisseaux sanguins par les astrocytes; astrocytes : maintien du tonus vasculaire en communiquant simultanément avec les neurones et les cellules endothéliales; péricytes : cellules de support; cellules endothéliales : production de facteurs vasoactifs; MEC : permettre la diffusion des ions, des neurotransmetteurs et de l'ATP. (Feng *et al.*, 2015 ; Muoio, Persson et Sendeski, 2014)

1.3.1 Transport à la BHE

À la BHE (dans les capillaires), il y a une régulation étroite de l'entrée et de la sortie des molécules et des nutriments (Keaney et Campbell, 2015). On retrouve trois principaux types de transport : paracellulaire, transcellulaire et vésiculaire (Figure 1.6). Le transport paracellulaire se définit par la diffusion d'ions, de molécules et parfois même de cellules par l'espace intercellulaire, le tout régulé par le gradient électrochimique épithélial et les protéines des jonctions serrées (Hu *et al.*, 2013). À la BHE, le transport paracellulaire se fait de façon limitée puisque les jonctions serrées composées des protéines Claudine-5 et -12, Occludine et JAM-4 rattachent fermement les cellules endothéliales ensemble et leur procurent une grande étanchéité (Liu *et al.*, 2012). Seuls les agents hydrosolubles tels l'eau et des ions peuvent passer librement au travers des jonctions serrées de la BHE (Keaney et Campbell, 2015). Le transport transcellulaire, quant à lui, permet le passage de molécules au travers des cellules. Il peut se faire de façon passive, pour les agents liposolubles, et de façon active, grâce à des protéines de transport, pour les molécules hydrophiles comme le glucose, les acides aminés, les nucléosides et certains médicaments (Keaney et Campbell, 2015). Ces transporteurs sont également impliqués dans la régulation de la perméabilité de la BHE (Keaney et Campbell, 2015). Le troisième système de transport se nomme transcytose. Le but est de faire passer des macromolécules de façon transcellulaire grâce à la formation de vésicules qui traversent les cellules pour ressortir de l'autre côté. La transcytose peut se faire par adsorption, c'est-à-dire par interaction de la charge nette cationique de la molécule ou du peptide avec la surface cellulaire chargée négativement. Ce processus favorise le passage de l'albumine et des protéines plasmatiques (Abbott, Ronnback et Hansson, 2006). La transcytose peut aussi être médiée par des récepteurs notamment le récepteur de la famille des récepteurs de lipoprotéine de basse densité, LRP1, particulièrement connu pour lier plus d'une quarantaine de ligands (sections 1.3.2) (Candela *et al.*, 2015 ; Preston, Joan Abbott et Begley, 2014). L'internalisation des macromolécules se fait par

endocytose. L'endocytose est généralement médiée par la clathrine (McMahon et Boucrot, 2011). Des vésicules de clathrine se forment et se ferment grâce à la dynamine et à l'activité des GTPases Rab. Après avoir migré de la membrane au cytosol, la clathrine entourant la vésicule se détache et est recyclée pendant que la vésicule se fusionne avec les endosomes précoces. L'endocytose peut aussi se faire par l'invagination de la membrane cellulaire composée des cavéolines (Razani et Lisanti, 2001). Finalement, de façon indépendante de la clathrine ou des cavéolines, des radeaux lipidiques peuvent contribuer à faire passer des molécules au travers de la membrane cellulaire (Mayor et Pagano, 2007).

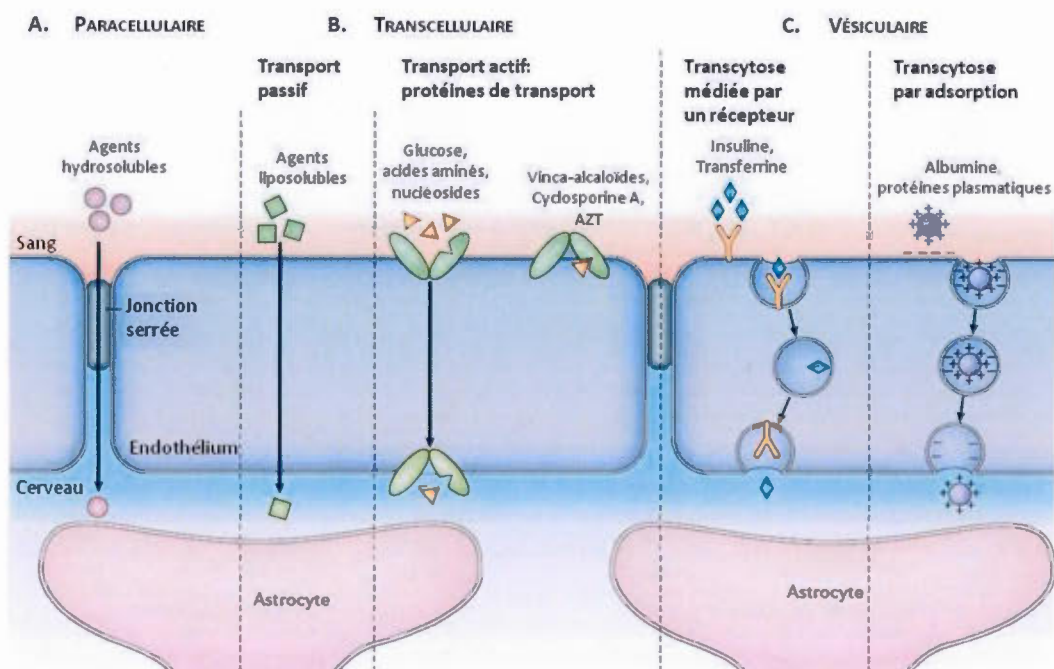


Figure 1.6 Mécanismes de transport à la barrière hématoencéphalique.

A) Le transport paracellulaire permet le passage de petites molécules au travers des jonctions serrées. **B)** Le transport transcellulaire se fait de façon passive pour les agents liposolubles et de façon active grâce à des protéines de transport. **C)** Le transport vésiculaire, aussi appelé transcytose, se fait par des récepteurs membranaires ou par adsorption. (Abbott, Ronnback et Hansson, 2006)

1.3.2 Les récepteurs de lipoprotéine de basse densité

La *low density lipoprotein receptor related protein 1* (LRP1) fait partie de la famille des récepteurs de lipoprotéines de basse densité (LDLR). Cette famille comprend les récepteurs suivants : LRP1, LRP1b, megalin/LRP2, LDLR, VLDLR, MEGF7/LRP4 et LRP8/ApoER2 (May *et al.*, 2007) (Figure 1.7). Ils ont un rôle dans l'homéostasie du cholestérol. Par endocytose, ils capturent la lipoprotéine de basse densité (LDL), pour la faire passer de la circulation sanguine vers les cellules (May *et al.*, 2007). Le LRP1 est un récepteur transmembranaire de type I exprimé de façon ubiquitaire. On l'appelle aussi CD91, ou récepteur de l' α 2macroglobuline (α 2MR). La protéine active est formée à partir d'un précurseur de 600 kDa suite au clivage par la furine, une protéine à sérine qui catalyse le clivage d'un polypeptide au niveau d'une séquence Arg-Xaa-(Arg/Lys)-Arg (Lillis *et al.*, 2008 ; May *et al.*, 2007 ; Tian, Huajun et Wu, 2012 ; Van Gool *et al.*, 2015). On obtient une protéine de 85 kDa composée du domaine transmembranaire et du domaine intracellulaire (carboxy terminal) puis une protéine de 515 kDa composée du domaine extracellulaire (amino terminal) (May *et al.*, 2007). LRP1 a de multiples fonctions (Figure 1.8). Premièrement, LRP1 est impliqué dans le processus d'endocytose de plus d'une quarantaine de ligands. Ceux-ci sont internalisés dans les lysosomes pour ensuite être dégradés (Strickland *et al.*, 2014). L'implication de LRP1 dans l'endocytose lui confère un rôle dans divers mécanismes biologiques tels que le métabolisme des lipides, la croissance cellulaire, la migration et l'invasion tissulaire (May *et al.*, 2007). Il a notamment un important rôle dans le transport du peptide amyloïde- β (A β) à travers la BHE (Candela *et al.*, 2015). La diminution de l'expression de LRP1 dans le développement de la maladie d'Alzheimer corrèle avec l'accumulation d'A β au cerveau (Kanekiyo *et al.*, 2013). Deuxièmement, le LRP1 a un rôle dans la régulation de la signalisation intracellulaire. Cela se fait soit par la liaison d'un ligand extracellulaire qui déclenche une réponse signalétique intracellulaire, soit via l'interaction du domaine intracellulaire de LRP1 avec des protéines adaptatrices dans le but de former un

complexe et activer des voies de signalisation cellulaires (Strickland *et al.*, 2014). Il est particulièrement impliqué dans la modulation de la signalisation du récepteur β de PDGF (PDGFR- β) au compartiment vasculaire, jouant un rôle dans la protection contre l'athérosclérose (May *et al.*, 2007). Le PDGFR- β est aussi capable de phosphoryler les motifs NPxY situés dans le domaine cytoplasmique de LRP1, servant de signal d'endocytose et d'internalisation (Lillis *et al.*, 2008). De plus, LRP1 intervient dans la réponse inflammatoire induite par les lipopolysaccharides bactériens, le TNF α et les facteurs de croissance (May, 2013). En association avec la calréticuline, il est responsable d'atténuer la réponse inflammatoire en ingérant les cellules apoptotiques par phagocytose (Gonias et Campana, 2014 ; Pieper-Furst et Lammert, 2013). Troisièmement, LRP1 est protéolysé au niveau transmembranaire, lui permettant de transloquer au noyau pour y réguler l'expression génique (Strickland *et al.*, 2014). La protéine associée aux récepteurs (RAP) est une protéine chaperonne qui lie très fortement LRP1 afin d'antagoniser la liaison d'autres ligands (Bu, 2001). La protéine RAP réside dans le réticulum endoplasmique (RE). Sa fonction majeure est d'escorter LRP1 du RE à l'appareil de Golgi. Dernièrement, LRP1 peut interagir avec l'activateur tissulaire du plasminogène pour réguler l'intégrité et la perméabilité de la BHE (Lillis *et al.*, 2008).

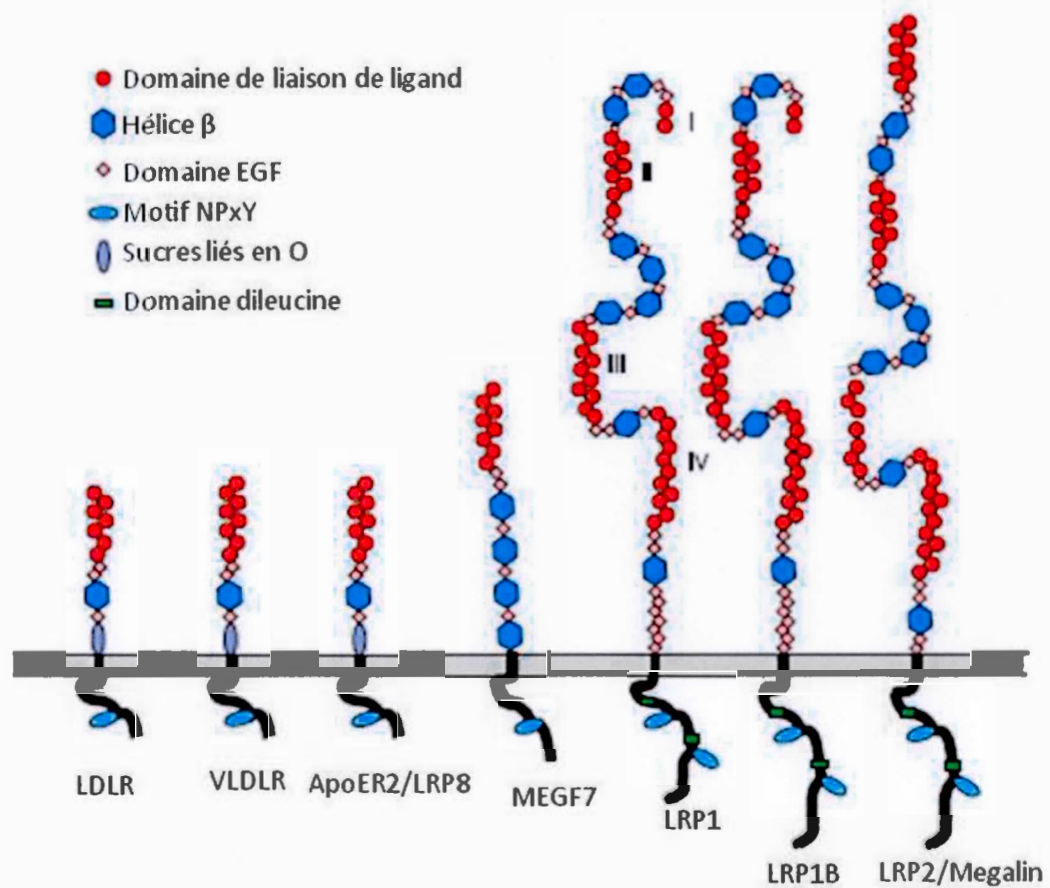


Figure 1.7 Récepteurs de la famille des LDLR.

Les protéines de la famille des LDLR sont des récepteurs transmembranaires de type I. Elles possèdent des domaines de liaison de ligands, un ou deux motifs NPxY leur permettant d'être phosphorylées puis internalisées. (Lillis *et al.*, 2008)

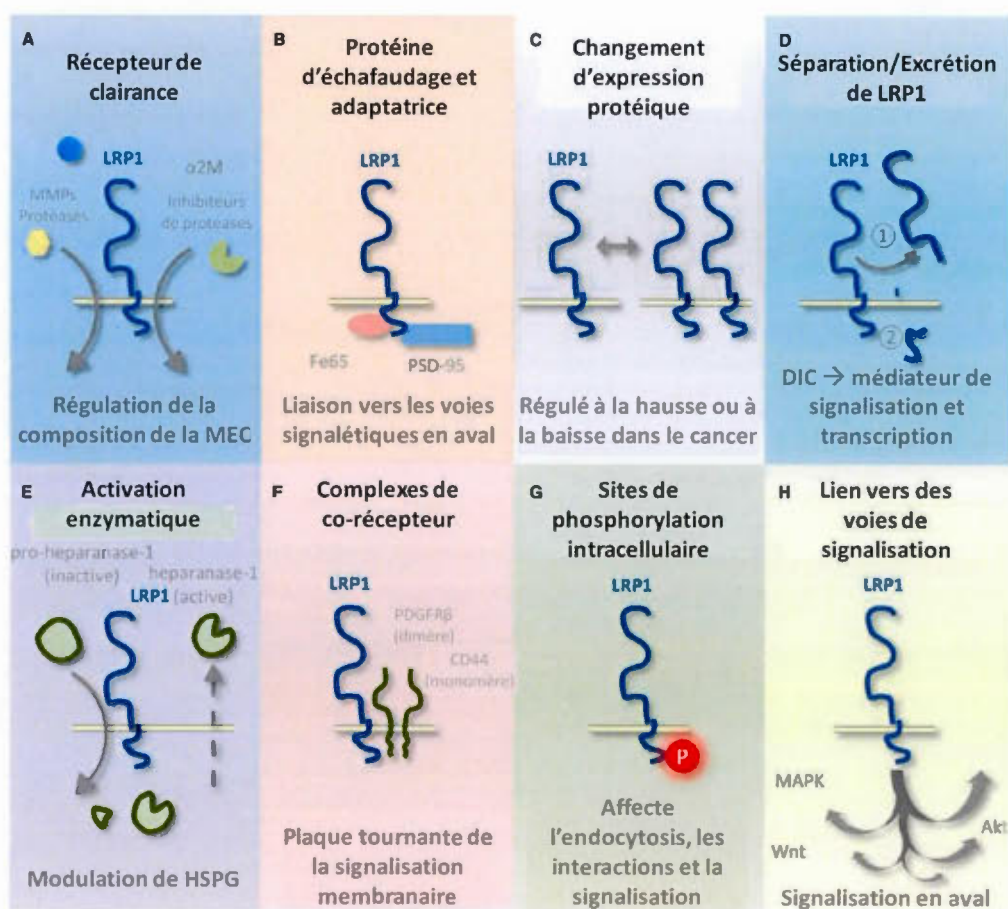


Figure 1.8 Les fonctions de LRP1 dans le cancer.

A) LRP1 fait entrer plusieurs ligands par endocytose pour réguler la composition de la MEC. B) Le domaine intracellulaire de LRP1 interagit avec des protéines adaptatrices faisant la liaison vers des voies de signalisation intracellulaires en aval. C) L'expression de LRP1 varie selon le type de cancer. D) LRP1 peut être séparé de son domaine intracellulaire (DIC). Le DIC devient un médiateur de la signalisation et de la transcription dans la cellule. E) LRP1 module l'activité enzymatique de certaines protéines comme l'héparanase-1 dans le but de moduler les protéoglycanes héparane sulfate (HSPG). F) LRP1 régule la signalisation en formant des complexes avec d'autres récepteurs. Par exemple, en s'associant avec le PDGFR β , il devient une plaque tournante de la signalisation membranaire. G) LRP1 peut être phosphorylé sur son domaine intracellulaire pour moduler la transduction du signal intracellulaire, mais aussi pour réguler l'endocytose. H) Plusieurs voies de signalisation reliées au cancer sont médiées par LRP1. (Van Gool *et al.*, 2015)

1.3.3 Les protéoglycanes héparane sulfate

Les syndécans (SDC) font partie de la famille des protéoglycanes héparane sulfate (HSPG) qui comprend aussi les glypicanes (GPC) (Iozzo et Sanderson, 2011). Les GPC ne possèdent pas de domaine intracellulaire et sont ancrées à la membrane par un glycosylphosphatidylinositol (GPI) et servent exclusivement de co-récepteurs (Tumova, Woods et Couchman, 2000). Les SDC possèdent un domaine transmembranaire (type I) lié à une portion cytoplasmique séparée en trois domaines (C1, variable et C2) (Iozzo et Sanderson, 2011 ; Leonova et Galzitskaya, 2013). On connaît quatre SDC et elles contiennent des chaînes héparane sulfate (HS) et chondroïtine sulfate (CS) ou dermatane sulfate (DS) (Favretto *et al.*, 2014) (Figure 1.9). On les retrouve à la surface de la plupart des cellules. La syndecan-1 (SDC1) est particulièrement exprimée dans les tissus épithéliaux, la syndecan-2 (SDC2), dans les tissus mésenchymateux, la syndecan-3 (SDC3), dans les tissus du système nerveux et la syndecan-4 (SDC4), dans la plupart des tissus (Leonova et Galzitskaya, 2013). Leur chaîne HS leur permet d'interagir avec un certain nombre de ligands regroupant des molécules de la MEC, des facteurs de croissance, des enzymes, des cytokines, des chemokines et des agents pathogènes (De Rossi et Whiteford, 2014). La SDC1 est impliquée dans le métabolisme des lipides, la cicatrisation, la migration des leucocytes, le réarrangement du cytosquelette, la protection des parois vasculaires et la prévention du développement de l'athérosclérose (Leonova et Galzitskaya, 2015 ; Szatmari *et al.*, 2015 ; Teng, Aquino et Park, 2012). La SDC2, aussi appelée fibroglycan, interagit avec les facteurs de croissance PDGF, FGF, VEGF et TGF β . Elle a un rôle dans l'angiogenèse, le développement du système nerveux durant l'embryogenèse et la formation des plaques amyloïdes (Essner, Chen et Ekker, 2006 ; Leonova et Galzitskaya, 2015). La SDC3, aussi appelée *N*-syndecan, régule l'appétit, la plasticité synaptique dans l'hippocampe ainsi que la régénération et la croissance des muscles squelettiques (Carey, 1996 ; Reizes, Benoit et Clegg, 2008). La SDC4, aussi appelée amphiglycan ou ryudocan, joue un rôle dans l'adhésion focale, la

formation des fibrilles de stress (fibronectine), l'interaction cellule-MEC, l'angiogenèse, la diminution de la migration cellulaire et la normalisation de la pression sanguine (Elfenbein et Simons, 2013 ; Woods et Couchman, 2001). En résumé, les SDC agissent comme récepteurs et transmettent le signal à l'intérieur de la cellule (Leonova et Galzitskaya, 2013). Elles agissent également en tant que co-récepteurs en présentant des ligands à d'autres récepteurs, puis elles peuvent devenir des effecteurs solubles suite au clivage de leur ectodomaine par des enzymes de la MEC (héparanases, MMPs) (De Rossi et Whiteford, 2014). Les SDC peuvent se regrouper afin d'être internalisées par des voies indépendantes des clathrines et des cavéolines via l'implication de radeaux lipidiques et de la macropinocytose, requérant l'action de la dynamine et la flotiline-1 ou l'activation de GTPases Rac (Christianson et Belting, 2014 ; Lambaerts, Wilcox-Adelman et Zimmermann, 2009). Elles sont transitées vers les endosomes tardifs pour aboutir dans les lysosomes et être dégradées avec leur cargo (Lambaerts, Wilcox-Adelman et Zimmermann, 2009). Leur recyclage est médié par la synténine (Zimmermann *et al.*, 2005). Les SDC sont impliquées dans l'absorption de nanoparticules et de peptides pénétrant dans les cellules (CPP) leur conférant un rôle thérapeutique potentiel (Letoha *et al.*, 2010). Les HSPG pourraient agir comme récepteurs auxiliaires, notamment via l'interaction de la chaîne HS avec les récepteurs LRP pour l'internalisation des lipoprotéines (Favretto *et al.*, 2014).

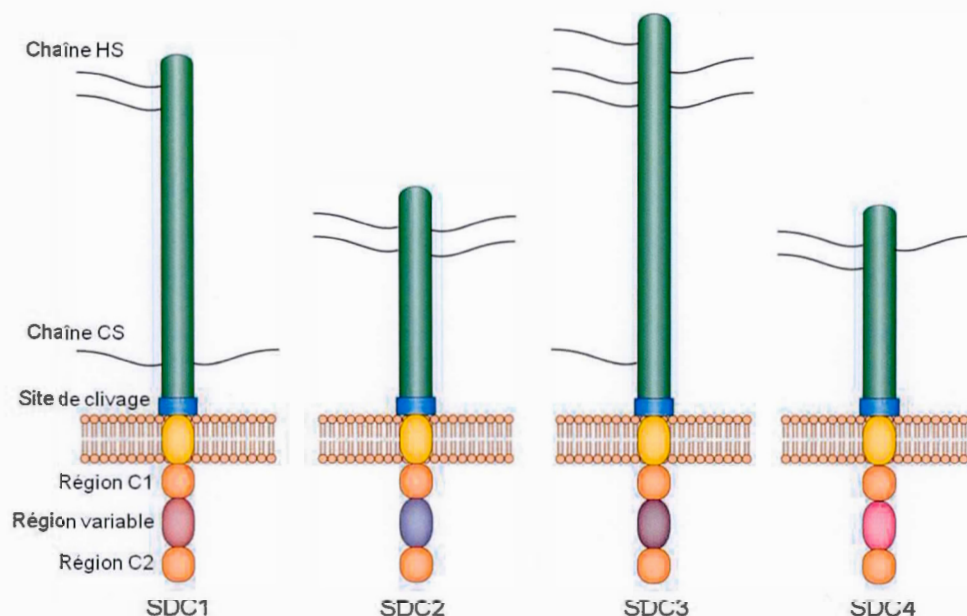


Figure 1.9 Récepteurs de la famille des syndecans.

Les SDCs sont des récepteurs transmembranaires de type I. Elles comportent des chaînes héparane sulfate (HS) et chondroïtine sulfate (CS) dans leur domaine extracellulaire. Leur domaine cytoplasmique est composé de trois domaines, C1, variable et C2. Elles comportent aussi un site de clivage. (Pap et Bertrand, 2013)

1.3.4 La famille des récepteurs à domaine Vps10p

Les récepteurs à domaine Vps10p (Vps10p-D) sont des récepteurs transmembranaires de type I. La famille est composée de Sortiline, SorLA, SorCS1, SorCS2 et SorCS3 (Figure 1.10). Le récepteur Sortiline est aussi connu comme le récepteur-3 à la neurotensine (NTS3) (Sarret *et al.*, 2003). Le récepteur SorLA est aussi appelé LR11 puisqu'il possède 11 répétitions LDLR de classe A. Chacun des récepteurs Vps10p-D possède un court domaine cytoplasmique permettant l'interaction intracellulaire avec des molécules adaptatrices, ainsi qu'un signal pour l'internalisation et le tri intracellulaire. Les cinq récepteurs Vps10p-D sont exprimés en grande partie dans le

système nerveux (Willnow, Petersen et Nykjaer, 2008). Sortiline et SorLA doivent être clivés de leur région propeptidique afin d'exposer leur région de liaison au ligand (Hermey, 2009). L'internalisation de la sortiline se fait par les puits de clathrine. Elle peut ainsi lier et internaliser les lipoprotéines lipases, les apolipoprotéines A et V ainsi que les proformes du facteur de croissance neuronal (NGF) et du facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF). Les ligands sont libérés dans les lysosomes et le cargo passe du réseau trans-Golgi aux endosomes. La RAP est capable de lier la sortiline (Tauris *et al.*, 1998). Le récepteur SorLA, quant à lui, joue un rôle dans l'endocytose ainsi que dans le trafic entre les endosomes et l'appareil de Golgi. On connaît surtout son implication au niveau de l'internalisation de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP), dans la maladie d'Alzheimer (Willnow et Andersen, 2013). Très peu d'information est disponible concernant les SorCS1, SorCS2 et SorCS3. Ils sont exprimés au cerveau de façon prédominante et ils auraient un rôle dans le diabète de type II et la maladie d'Alzheimer (Hermey, 2009).

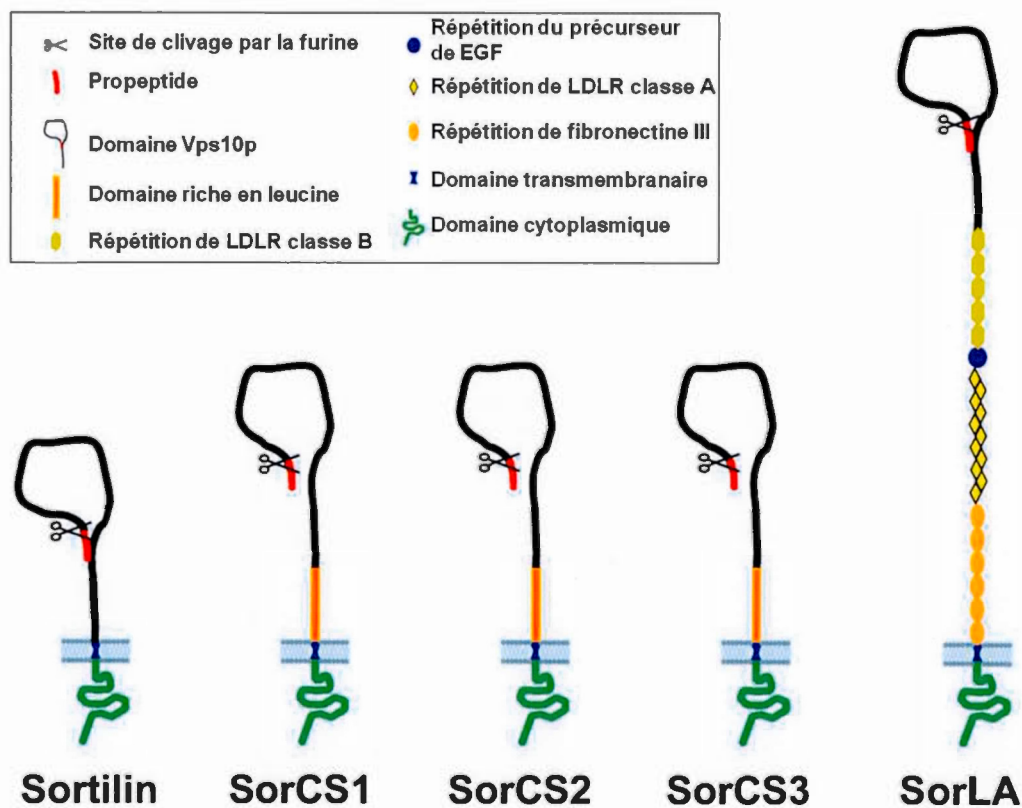


Figure 1.10 Structure des récepteurs à domaine Vps10p.

Les protéines Vps10p-D sont des récepteurs transmembranaires de type I impliqués dans l'internalisation de ligands et le trafic endosomes-Golgi. (Hermeij, 2009)

1.4 Les caractéristiques de la progression tumorale

Au cours de son développement, une tumeur subit des changements phénotypiques maintenant bien identifiés dans la littérature et révisés en 2011 par les Drs Hanahan et Weinberg (Figure 1.11). Ces particularités prennent place dans le microenvironnement tumoral durant la phase de progression oncogénique. Les cellules cancéreuses deviennent autosuffisantes en signaux de croissance. La synthèse et la sécrétion des facteurs de croissance sont augmentées pendant que l'expression

des récepteurs de facteurs de croissance à la surface cellulaire est anormalement induite (Witsch, Sela et Yarden, 2010). Des défauts fonctionnels des gènes suppresseurs de tumeurs associés au gène du rétinoblastome (RB) et à p53 engendrent une insensibilité aux signaux anti-prolifératifs. La perte de fonction de p53, l'augmentation de l'expression de régulateurs anti-apoptotiques et des signaux de survie ainsi que la diminution de l'expression des signaux pro-apoptotiques favorisent la résistance à l'apoptose. Une augmentation de l'activité de la télomérase empêche les cellules cancéreuses d'entrer en sénescence leur confiant une capacité de réplication illimitée (Hanahan et Weinberg, 2011). Ensemble, ces caractéristiques contribuent à l'instabilité génomique des cellules cancéreuses. L'hypoxie est un acteur majeur dans la reprogrammation du métabolisme énergétique est marquée par l'augmentation de l'expression des transporteurs de glucose et des enzymes glycolytiques (Palsson-McDermott et O'Neill, 2013 ; Phan, Yeung et Lee, 2014 ; Romero-Garcia *et al.*, 2011). La reprogrammation métabolique est aussi caractérisée par l'augmentation de la glutaminolyse, du métabolisme des lipides, de la biogenèse des mitochondries et de la voie des pentoses phosphates (Phan, Yeung et Lee, 2014). Les besoins en nutriments et en oxygène des tumeurs nécessitent une présence vasculaire intratumorale importante. Les cellules cancéreuses vivent des changements dans les niveaux d'expression de protéines d'adhésion permettant les interactions cellules-cellules et cellules-MEC. Les processus d'invasion et de métastases sont ensuite induits. Les cellules se détachent du site tumoral primaire, traversent la paroi de cellules vasculaires pour circuler dans les systèmes sanguin et lymphatique puis colonisent un site secondaire. L'infiltration de la tumeur par les cellules immunitaires lui confère un microenvironnement inflammatoire. Ces cellules contribuent à fournir les facteurs nécessaires (cytokines, chemokines, facteurs de croissance, prostaglandines, espèces réactives de l'oxygène (ROS)) à la progression de la tumeur (Grivennikov, Greten et Karin, 2010). Malgré la présence des cellules immunitaires, des cellules cancéreuses réussissent à ignorer la destruction immunitaire pour continuer de faire progresser la tumeur.

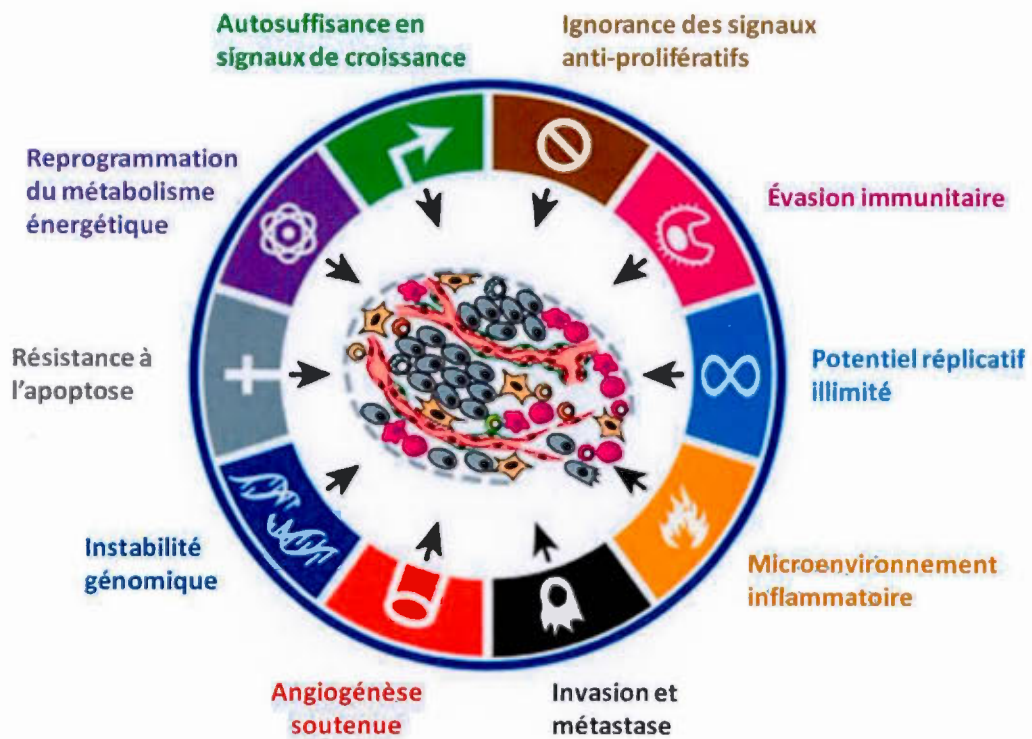


Figure 1.11 Caractéristiques de la progression tumorale.

Depuis les 30 dernières années, les travaux de recherches ont permis l'établissement de dix caractéristiques propres aux cellules cancéreuses. Ensemble, elles supportent la prolifération néoplasique et définissent le microenvironnement tumoral. (Hanahan et Weinberg, 2011)

1.5 Le centre hypoxique tumoral

Lors du développement d'une tumeur solide, un centre hypoxique se forme conséquent à l'hyperprolifération incontrôlée des cellules corrélant avec une absence de vasculature dans la masse cancéreuse. Ainsi, les niveaux d'oxygène tendent à

diminuer jusqu'à environ 1% plus on progresse vers le centre de la tumeur puisque celui-ci ne se trouve pas à proximité de vaisseaux sanguins. L'hypoxie est étroitement liée aux changements phénotypiques tumoraux. Les facteurs inductibles par l'hypoxie (HIF1 et HIF2) régulent la transcription des gènes de l'angiogenèse, du développement et de la croissance tumorale. Les cellules expriment trois isoformes d'enzymes prolylhydroxylases (PHD1, PHD2, PHD3) et le facteur inhibiteur de HIF (FIH1) qui contrôlent les niveaux protéiques des HIF (Li et Kim, 2011 ; Masoud et Li, 2015). Cela permet au suppresseur de tumeur von Hippel Lindau (pVHL) de lier HIF avec une grande affinité afin de mener à la polyubiquitination et à la destruction des sous-unités α (Li et Kim, 2011 ; Semenza, 2013). Dans des conditions normoxiques, les HIF sont dégradés suite à l'hydroxylation sur le résidu prolyl de la sous-unité α par les PHD. Puis, les HIF sont inactivés par l'hydroxylation du résidu asparagine sur la sous-unité α par le FIH1. HIF1 β demeure inchangé par l'hypoxie tandis qu'une baisse des niveaux d'oxygène jusqu'à environ 1% diminue l'activité des PHD et de FIH1 pour stabiliser et activer les HIF1 α et HIF2 α . Ils se lient au coactivateur nucléaire formé de p300 et de la protéine de liaison à l'élément de réponse AMPc (CREB) (p300/CBP) afin d'initier une réponse transcriptionnelle via l'activation des éléments de réponse à l'hypoxie (HRE) sur les promoteurs des gènes des biomarqueurs cibles de l'hypoxie (Jensen, 2009) (Figure 1.12). Les cellules hypoxiques relâchent ainsi plus de VEGF pour interagir avec le VEGFR-2, surexprimé dans les cellules endothéliales et induire leur migration (Casazza *et al.*, 2014). L'augmentation de la transcription des transporteurs de glucose (GLUT1 et GLUT3) et des enzymes glycolytiques favorise l'adaptation métabolique des cellules tumorales (Jensen, 2009). Les très faibles niveaux d'oxygène favorisent également le recrutement des MSC et des monocytes qui, à leur tour, contribuent à recruter les cellules endothéliales (Womeldorff, Gillespie et Jensen, 2014). Dans le GBM, l'hypoxie est aussi interreliée à l'inflammation via l'interleukine 1 β (IL1 β) et le facteur de transcription NF- κ B (Womeldorff, Gillespie et Jensen, 2014). Par ailleurs, la transcription du gène *BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3*

(BNIP3) est induite via l'activation de HIF1 α . La protéine mitochondriale BNIP3 est responsable de l'activation de l'autophagie (Mellor et Harris, 2007). La surexpression de ces biomarqueurs en hypoxie est directement liée au caractère invasif et agressif des GBM (Flynn *et al.*, 2008). L'hypoxie est aussi associée au mauvais pronostic clinique et à la résistance à la thérapie puisqu'elle promeut des changements phénotypiques favorables à la survie de la tumeur (Cavazos et Brenner, 2015).

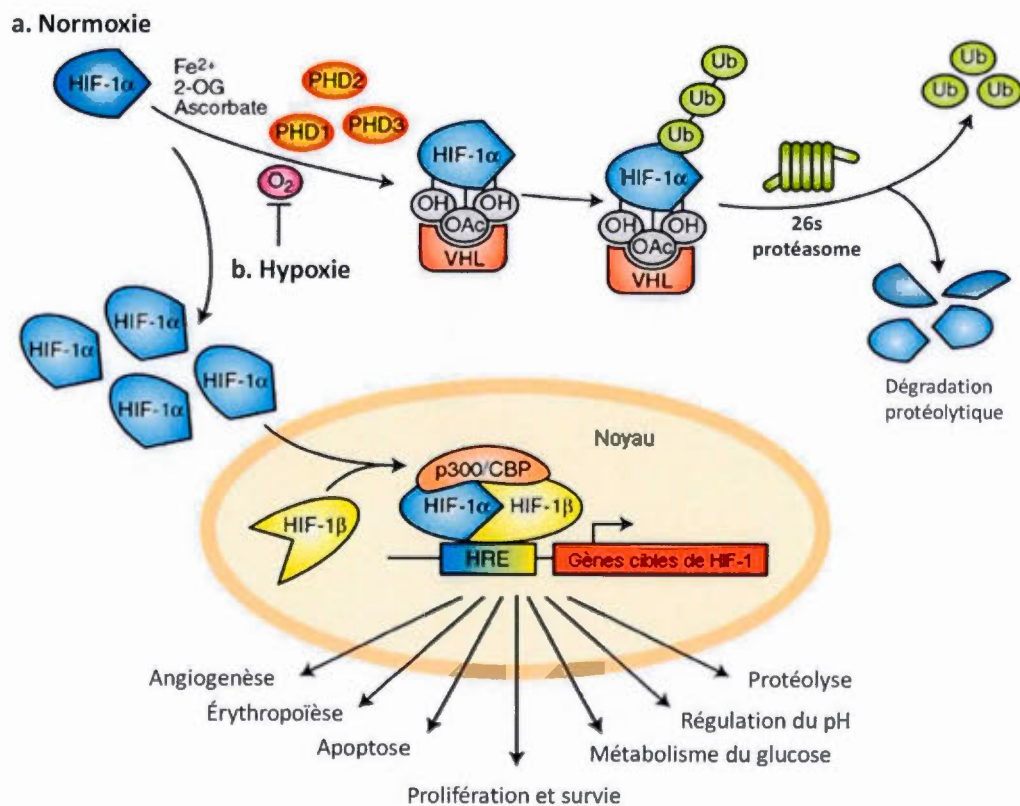


Figure 1.12 Voie de signalisation par le facteur de transcription inducible par l'hypoxie.

(a) En normoxie, HIF1 α est stabilisé par la prolylhydroxylase et le gène suppresseur de tumeur VHL. Une ligase ubiquitine E3 permet l'ubiquitinylation de HIF1 α pour qu'il soit dégradé par le protéasome. (b) En hypoxie, le faible niveau d'oxygène empêche l'action de la PHD. HIF1 α transloque au noyau où il forme un hétérodimère avec HIF1 β . Avec son coactivateur p300/CBP, il reconnaît les éléments de réponse hypoxique HRE sur les promoteurs des gènes cibles impliqués dans l'angiogénèse, l'érythropoïèse, l'apoptose, la prolifération, la survie, le métabolisme du glucose, la régulation du pH et la protéolyse. (Carroll et Ashcroft, 2005)

1.6 Angiogenèse tumorale

L'angiogenèse est le processus de formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir des vaisseaux existants (Fischer *et al.*, 2005). L'angiogenèse est bénéfique pour la croissance et la régénération tissulaire ainsi que durant le développement embryonnaire, mais elle peut aussi contribuer aux pathologies inflammatoires et cancéreuses (Lamallice, Le Boeuf et Huot, 2007). Une vascularisation insuffisante peut mener à un accident vasculaire cérébral, un infarctus du myocarde, des colites ulcéreuses ou à la neurodégénération, tandis qu'une vascularisation anormale peut mener au développement cancéreux, à des maladies inflammatoires, à de l'hypertension pulmonaire ou à la cécité (Carmeliet et Jain, 2011). En conditions physiologiques, l'équilibre est maintenu entre les facteurs pro-angiogéniques et anti-angiogéniques. La «*switch*» angiogénique se produit lorsque cet équilibre est rompu par l'augmentation de l'expression des facteurs pro-angiogéniques (Figure 1.13). Par exemple, lors du développement embryonnaire, l'angiogenèse a lieu puisqu'on mesure une grande expression de VEGF et par conséquent, une grande sécrétion de VEGF dans la zone subventriculaire déclenchant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins au niveau du tube neural (Vallon *et al.*, 2014). Les principaux facteurs pro-angiogéniques dans l'embryon regroupent les VEGF, les glycoprotéines Wnt et les récepteurs d'adhésion cellulaire Intégrines (Vallon *et al.*, 2014). Le VEGF interagit avec son récepteur VEGFR-2 principalement, mais il peut aussi se lier avec le co-récepteur Neuropiline-1 (NRP1) (Klagsbrun, Takashima et Mamluk, 2002). VEGFR-2 et NRP1 peuvent également interagir et jouer un rôle majeur dans l'angiogenèse du système nerveux central (Klagsbrun, Takashima et Mamluk, 2002 ; Neufeld, Kessler et Herzog, 2002). La liaison de VEGF à son récepteur active les voies des MAPK et de PI3K/Akt vers la migration, la prolifération et la survie cellulaire. En conditions hypoxiques, HIF1 α induit une cascade signalétique via les glycoprotéines Wnt et le co-activateur de la transcription, β -caténine, pour réguler la prolifération, la migration, la différenciation et l'apoptose des cellules endothéliales et des cellules

souches mésenchymateuses (Goodwin et D'Amore, 2002 ; Mazumdar *et al.*, 2010 ; Voronkov et Krauss, 2013). En conditions tumorales, l'angiogenèse contribue à la croissance et aux métastases des tumeurs solides (Folkman, 2002). L'angiogenèse tumorale se développe en passant par quelques étapes essentielles. Tout d'abord, les cellules du microenvironnement tumoral sécrètent des facteurs pro-angiogéniques pour activer le développement et la croissance des cellules endothéliales vasculaires ainsi que la dégradation des composantes de la MEC. Pendant ce temps, des métalloprotéases matricielles (MMP) induisent la dégradation de la paroi vasculaire tandis que les intégrines forment des points d'embranchements. Les cellules endothéliales migrent dans la MEC vers les stimuli angiogéniques. Finalement, guidées par l'angiopoïétine-1, elles prolifèrent et forment des structures en tube (tubulogenèse) afin de se réorganiser en nouveaux capillaires sanguins. La stabilisation du nouveau réseau vasculaire est dirigée par le PDGF (Bergers et Benjamin, 2003 ; Carmeliet, 2003 ; De Rossi et Whiteford, 2014). Toutefois, la vasculature au sein des tumeurs solides est très mal organisée et perméable (Azzi, Hebda et Gavard, 2013). L'hypoxie et la privation de glucose sont les principaux inducteurs de la transcription de VEGF. Son expression est modulée par des oncogènes, mais aussi par des gènes suppresseurs de tumeurs tels que Ras, Src et p53. Les glycoprotéines Wnt quant à elles, inhibent l'angiogenèse tumorale cérébrale en induisant le PDGFB et la normalisation vasculaire (Reis *et al.*, 2012).

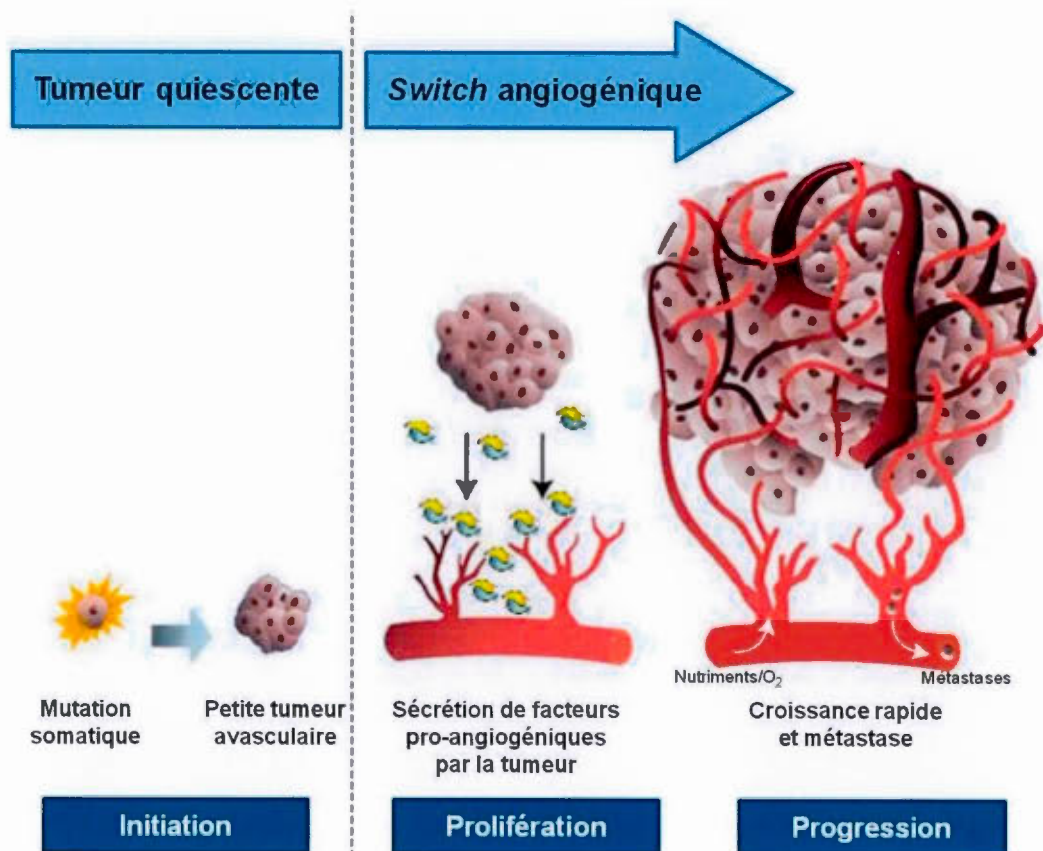


Figure 1.13 Angiogenèse tumorale.

Pendant sa phase d'initiation, la tumeur n'est pas encore vascularisée. Le déséquilibre des signaux pro- et anti-angiogéniques déclenche la prolifération et la migration des cellules endothéliales. La formation de nouveaux vaisseaux au sein de la tumeur permet l'apport de nutriments et d'oxygène. La tumeur croît rapidement et des cellules cancéreuses se détachent et circulent via les nouveaux vaisseaux vers la circulation systémique pour aller établir des métastases dans d'autres tissus. (Wong, 2011)

1.6.1 Migration des cellules endothéliales

Pendant l'angiogenèse, la migration des cellules endothéliales est synchronisée avec la dégradation de la MEC. Les principales protéines cibles de la MEC sont le collagène, la laminine, la fibronectine et les protéoglycanes (Mentlein, Hattermann et Held-Feindt, 2012). La migration est un processus de motilité cellulaire régulé par des stimuli chimiques et/ou mécaniques. Le remodelage de l'actine, principal composant du cytosquelette, est à la base du mouvement des cellules dans la MEC. L'activité des sous-unités globulaires (actine G) et des filaments hélicaux (actine F) est étroitement associée à l'hydrolyse d'ATP grâce à une activité ATPasique intrinsèque nécessaire au constant remodelage du cytosquelette d'actine en filopodes, en lamellipodes puis en fibres de stress. Le remodelage du cytosquelette nécessite l'activation de multiples voies de signalisation incluant les GTPases de la famille Rho, la voie de PI3K, la phosphorylation de la p38/MAPK et de FAK. La motilité cellulaire se fait en six étapes (Figure 1.14) :

- 1) Les filopodes détectent le signal mitogène;
- 2) Les lamellipodes se forment et projettent leurs extensions vers l'avant du corps cellulaire, dans le sens de la migration;
- 3) Ces protrusions s'attachent à la MEC;
- 4) Médiée par les fibres de stress, la contraction du corps cellulaire lui permet d'avancer dans la MEC;
- 5) L'arrière du corps cellulaire est libéré;
- 6) Les «matériaux» d'adhésion et de signalisation sont recyclés.

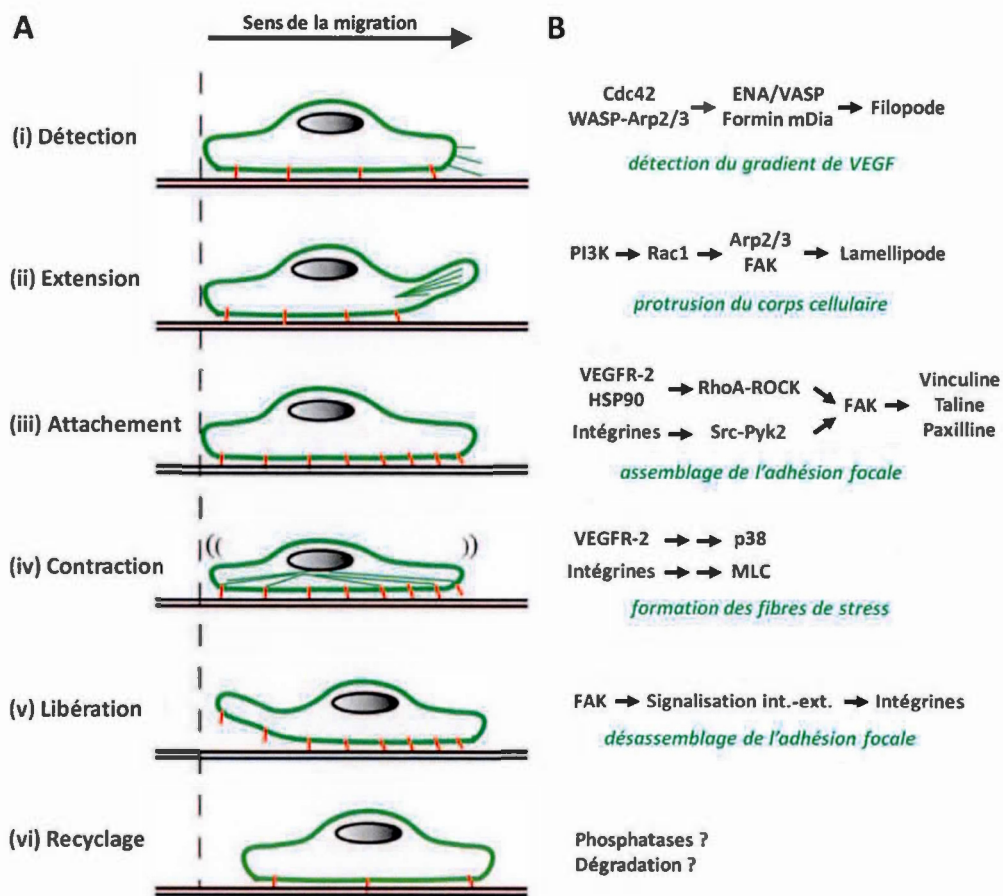


Figure 1.14 Étapes de la migration cellulaire endothéliale.

Les six étapes de la migration sont la détection du gradient de VEGF et formation de filopodes (i), l'extension du corps cellulaire par sa protrusion dans le sens de la migration et la formation de lamellipodes (ii), l'attachement par l'assemblage d'adhésion focale (iii), la contraction du corps cellulaire par la formation de fibres de stress (iv), la libération du corps cellulaire par le désassemblage de l'adhésion focale (v) et, enfin, le recyclage des composantes d'adhésion et de signalisation dont les mécanismes restent méconnus (vi). (Lamallice, Le Boeuf et Huot, 2007)

La migration est associée à des changements dynamiques dans l'adhérence des cellules à la MEC. Cela requiert la transduction signalétique associée à la réorganisation du cytosquelette. Les cellules migrent selon trois mécanismes. Premièrement, la chimiotaxie consiste en la migration des cellules vers un gradient de chimioattractant soluble. Les principaux chimioattractants sont le VEGF, le bFGF et les angiopoïétines. Ils peuvent aussi être d'autres facteurs de croissance ou molécules d'adhésion. La liaison de VEGF à son récepteur VEGFR-2 active la famille des Rho GTPases, contribuant à la phosphorylation de VEGFR-2 et à l'activation de PI3K. Deuxièmement, l'haptotaxie permet la migration cellulaire vers un gradient de ligand immobilisé en réponse à la liaison des intégrines aux composants de la MEC. Celle-ci se voit dégradée par les MMP. Ainsi, les cellules endothéliales peuvent se détacher de la MEC dans laquelle elles étaient retenues par les adhésions focales grâce aux protéines FAK, paxilline et autres protéines de structure qui lient les microfilaments d'actine aux Intégrines. Il existe un «*crosstalk*» entre les intégrines et les facteurs de croissances. C'est-à-dire que les récepteurs de facteurs de croissance améliorent l'expression et l'activation des intégrines. Troisièmement, la mécanotaxie consiste en la migration générée par des forces mécaniques, dépendantes de la contrainte de cisaillement des fluides (Li, Huang et Hsu, 2005). En résumé, la migration cellulaire est une combinaison de ces trois mécanismes, permettant aux cellules endothéliales d'avancer dans la MEC afin de former de nouveaux vaisseaux sanguins nécessaires à la croissance tumorale (Devreotes et Horwitz, 2015 ; Lamalice, Le Boeuf et Huot, 2007)

1.6.2 Régulation de la migration cellulaire par les voies MAPK

Les protéines kinases activées par des mitogènes (MAPK) répondent aux stimuli extracellulaires afin de réguler une panoplie de processus cellulaires dont la prolifération, la différenciation, la survie, l'apoptose, l'homéostasie tissulaire, l'inflammation et la migration. Un mitogène favorise la mitose et la division

cellulaire. Les MAPK sont aussi souvent induites dans les cancers. Leur activation se fait à travers une cascade de kinases (Figure 1.15). Des MAP kinase kinase kinase (MAPKKK) activent des MAP kinase kinase (MAPKK) qui, elles, activent les MAPK en phosphorylant leurs résidus thréonine et tyrosine dans leur boucle d'activation du domaine kinase (motif Thr-x-Tyr) (Huang, Jacobson et Schaller, 2004). La protéine kinase régulée par le signal extracellulaire (ERK) est activée par une variété de facteurs de croissance et de substances mitogènes. Les MAPKKK Raf activent les MAPKK MEK1 et MEK2 qui activent ERK1 et ERK2. La phosphorylation de ERK sur son motif Thr-Glu-Tyr résulte en une régulation de la transcription de gènes cibles de la prolifération, l'apoptose, le métabolisme et la réponse immunitaire (Burotto *et al.*, 2014). La MAPKKK TAK active MKK3 et MKK6 qui, elles, activent ensuite la p38/MAPK. La p38/MAPK peut également s'autophosphoryler. Elle régule les facteurs de transcription p53, ATF2, ELK1, MEF2 et C/EBP β (Wagner et Nebreda, 2009). Dans le cancer, la p38/MAPK agit, d'un côté, comme un suppresseur de tumeurs par la régulation négative du cycle cellulaire et par l'induction de l'apoptose. D'un autre côté, la p38/MAPK agit comme promotrice de tumeurs par l'activation de l'invasion, de l'angiogenèse et de l'inflammation. La protéine kinase c-Jun N-terminal (JNK) est phosphorylée par MKK4 et MKK7. La cible majeure de JNK est le facteur de transcription AP-1. JNK est généralement impliquée dans l'inflammation, la différenciation, l'apoptose et la résistance à l'insuline (Huang, Jacobson et Schaller, 2004). La voie de signalisation de ERK5 est la moins étudiée des MAPK, mais elle aurait un rôle dans l'angiogenèse et la transition épithélio-mésenchymale. Pour ce faire, les MEKK2 et MEKK3 activent MEK5 qui transduit le signal par ERK5 (Drew, Burow et Beckman, 2012).

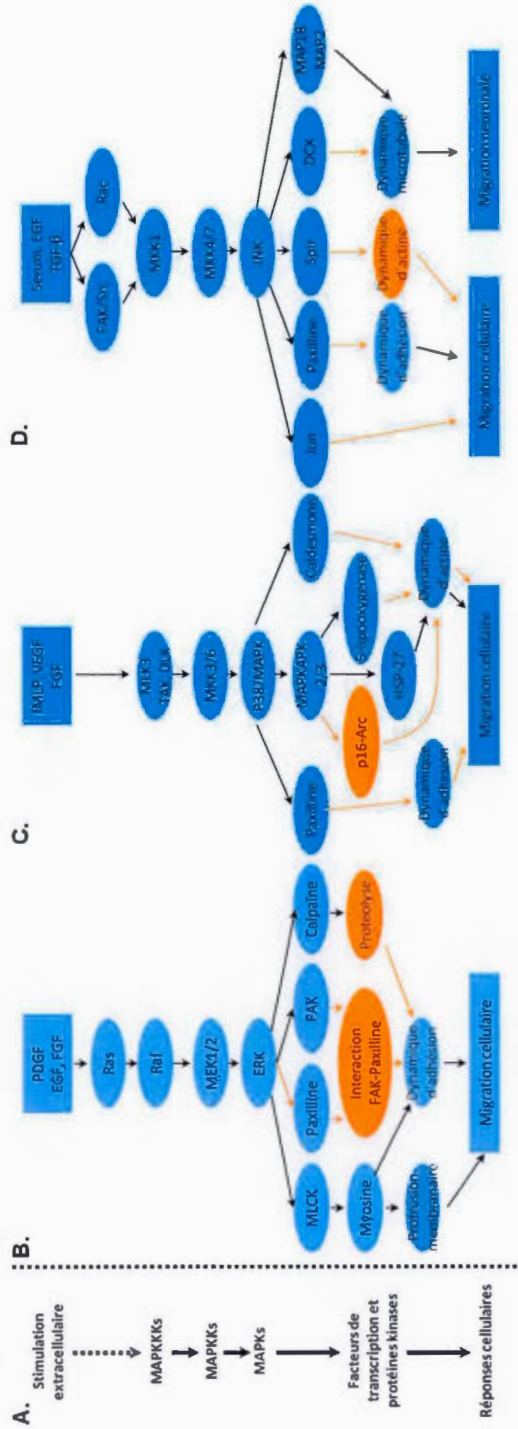


Figure 1.15 Voie de signalisation des MAPK.

A) Des facteurs de croissance et agents mitogènes extracellulaires activent une cascade signalétique de kinase en kinase. Les MAPKs activées régulent des facteurs de transcription et d'autres protéines kinases pour moduler l'inflammation, la prolifération, la différenciation, la survie cellulaire et l'apoptose. Des fonctions émergent pour les MAPKs dans l'activation de la migration cellulaire. B) Voies de signalisation médiées par ERK. Des facteurs de croissance activent ERK via le module de signalisation Ras/Raf/MEK1/2. La migration est ensuite induite par la phosphorylation de MLCK, FAK et Paxilline qui modulent les protrusions membranaires et les protéines d'adhésion focales. C) Voies de signalisation médiées par p38/JNK. Des chemoattractants et des facteurs de croissance activent MKK3/6 qui phosphoryle p38 pour activer MAPKAPK2/3 puis phosphoryler HSP-27. La réorganisation du cytosquelette d'actine et la migration sont ainsi induites. La p38 phosphoryle aussi la paxilline et la caldesmon, jouant des rôles dans les dynamiques d'adhésion et d'actine. D) Voies de signalisation médiées par JNK. Des facteurs de croissance activent MEK1 via FAK/Src ou Rac. Les MKK4 et MKK7 sont ensuite phosphorylés et activés. À son tour, il phosphoryle Jun, paxilline, Spir, DCX et les MAPs. La migration cellulaire est ainsi activée par les modulations au niveau des foyers d'adhésion et du cytosquelette. Les éléments orange sont des voies spéculatives (Huang, Jacobson et Schaller, 2004)

1.6.3 La Sphingosine-1-phosphate : un facteur pro-angiogénique dans le cancer

La sphingosine-1-phosphate (S1P) est un mitogène lipidique bioactif qui module la prolifération cellulaire, l'inflammation, la migration et l'angiogenèse (Van Brocklyn *et al.*, 2005). La production de S1P est finement contrôlée par les sphingomyélinases, les glycosidases, les céramidases, les sphingosine kinases (SphK), les sphingosine phosphatases et les sphingosines lyases (Adada *et al.*, 2013). La majorité de la S1P est liée aux lipoprotéines de haute densité (HDL) (Xiong et Hla, 2014). Seulement 1-2% se retrouve sous forme libre active dans la circulation sanguine (Prager, Spampinato et Ransohoff, 2015). La S1P est principalement sécrétée dans le plasma par les plaquettes, les mastocytes et les monocytes. La S1P lie de façon spécifique cinq récepteurs transmembranaires couplés aux protéines G et appartenant à la famille des gènes de différenciation endothéliale (Sedger et McDermott) (Spiegel et Milstien, 2003) (Figure 1.16). Cela permet l'activation de protéines kinases et de réponses cellulaires. Le récepteur S1P1 est exprimé dans la plupart des tissus et est couplé exclusivement à la protéine G α i (Prager, Spampinato et Ransohoff, 2015). Les récepteurs S1P2 et S1P3 sont aussi exprimés dans la plupart des tissus, mais en plus d'être couplés à la protéine G α i, ils sont aussi couplés aux protéines G α 12/13 et G α q (Prager, Spampinato et Ransohoff, 2015). Le récepteur S1P4 est exprimé dans les tissus lymphoïdes et est couplé aux protéines G α i et G α 12/13 (Prager, Spampinato et Ransohoff, 2015). Le récepteur S1P5 est majoritairement exprimé dans le cerveau, la peau et les cellules «*Natural Killer*» (NK), puis il est couplé aux protéines G α i et G α 12/13 (Prager, Spampinato et Ransohoff, 2015). L'activation de la protéine G α i par la liaison de S1P à ses récepteurs induit la prolifération via ERK, inhibe l'apoptose via Akt, induit la migration cellulaire et module les niveaux de calcium intracellulaire. La protéine G α 12/13 active la famille des GTPases Rho tandis que la protéine G α q interagit avec la phospholipase C (PLC). Par ailleurs, les S1P1-2-3 sont exprimés au niveau de l'endothélium vasculaire. Cela leur confère un rôle clé dans la vasculogenèse et l'angiogenèse, mais aussi dans la perméabilité et l'intégrité de la

BHE (Prager, Spampinato et Ransohoff, 2015). La S1P peut réguler la migration par chimiotaxie des cellules endothéliales, des fibroblastes embryonnaires murins (MEF) et des lymphocytes B et T, tout en inhibant la migration de cellules cancéreuses et de cellules musculaires lisses vasculaires (VMSC) (Takuwa *et al.*, 2012). L'interaction de la S1P avec les récepteurs S1P1 et S1P3 induit le processus de migration par chimioattraction. Par contre, l'interaction de la S1P avec S1P2 régule la chimiorépulsion en inhibant la migration cellulaire. Le métabolisme des sphingolipides est perturbé dans le cancer (Don, Lim et Couttas, 2014). La signalisation activée par la S1P induit l'angiogenèse, la résistance aux mécanismes de mort cellulaire, la prolifération soutenue et l'inflammation (Proia et Hla, 2015). Les glioblastomes expriment beaucoup de SphK1 (Van Brocklyn *et al.*, 2005). Son activité y est fortement induite permettant aux cellules de GBM de sécréter beaucoup de S1P dans la MEC (Bien-Moller *et al.*, 2016).

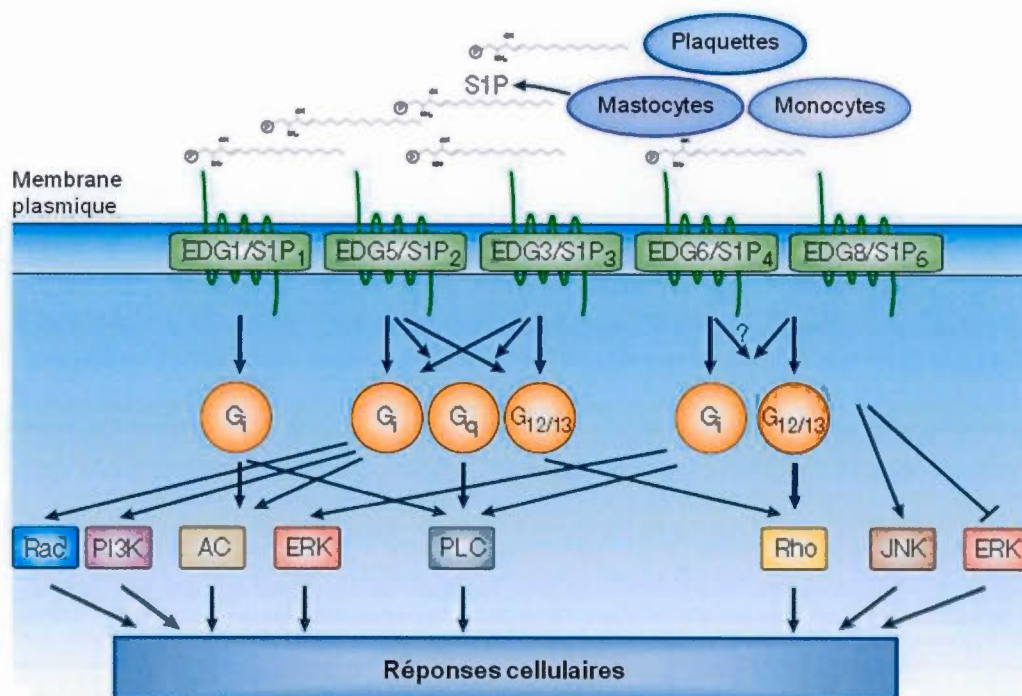


Figure 1.16 Les récepteurs de la sphingosine-1-phosphate.

La S1P est sécrétée dans le plasma par les plaquettes, les mastocytes et les monocytes. Elle peut se lier à une famille de cinq récepteurs transmembranaires couplés aux protéines G pour activer des voies de signalisation intracellulaire en aval afin de produire diverses réponses cellulaires, autant au niveau physiologique que pathologique. (Spiegel et Milstien, 2003)

1.7 Inflammation

L'inflammation est la première ligne de défense en réponse aux lésions tissulaires et aux infections (Nathan, 2002). Les monocytes circulants dans le sang sont activés en macrophages. Ces macrophages sont dérivés de la moelle osseuse et infiltrent les tissus. Avec les neutrophiles, les macrophages défendent l'organisme, mais participent aussi à l'inflammation intratumorale entre autres (Galdiero *et al.*, 2013). Ils sont recrutés par des chemokines au site tumoral (Lee *et al.*, 2013b). Dans les

cellules tumorales et inflammatoires, la cascade de signalisation inflammatoire est initiée par les cytokines pro-inflammatoires TNF, IL1 β et IL6 notamment (Candido et Hagemann, 2013). Depuis plusieurs années, on reconnaît l'association entre l'activation du facteur de transcription NF- κ B et le GBM (Sowers *et al.*, 2014 ; Westhoff *et al.*, 2013). NF- κ B induit la transcription des biomarqueurs majeurs de l'inflammation, MMP-9, VEGF, CSF-1 et COX-2 (Ha *et al.*, 2014 ; Sever et Brugge, 2015). Environ 20% des morts associées aux cancers sont dûes à des infections et à de l'inflammation chronique (Karin, 2008).

1.7.1 Voie de signalisation du facteur de transcription NF- κ B

Le phénomène inflammatoire est en partie associé à la voie de signalisation du facteur nucléaire activateur de la chaîne légère kappa des cellules B activées (NF- κ B) (DiDonato, Mercurio et Karin, 2012). Le facteur de transcription NF- κ B est effectivement un acteur central de l'inflammation, mais aussi de la réponse au stress, de la différenciation, de la prolifération et de la mort cellulaire (Hoesel et Schmid, 2013). Cette voie est activée par des agents pro-inflammatoires tels que les cytokines (ex : IL-1 β , IL-6), le facteur α de nécrose tumoral (TNF α), le phorbol 12-myristate 13-acétate (Roepman et Wolfrum), la lectine concanavaleine A (ConA), des facteurs de croissance, des lipopolysaccharides bactériens (LPS) et des infections (Figure 1.17). Les facteurs p65/RelA, RelB, c-Rel, NF- κ B1 et NF- κ B2 sont les cinq membres de la famille NF- κ B. Les facteurs NF- κ B1 et NF- κ B2 sont les deux seuls à être synthétisés en proformes, soit p105 et p100 respectivement, avant d'être protéolysés en sous-unités p50 et p52. Grâce au domaine d'homologie Rel (RHD), des homodimères ou des hétérodimères de NF- κ B se forment et se lient à l'inhibiteur de NF- κ B (I κ B). Il en existe quatre : I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ et Bcl-3. Un stimulus active la cascade signalétique qui débute avec la phosphorylation d'I κ B par le complexe I κ B kinase (IKK). On connaît les deux sous-unités kinases, IKK α et IKK β , ainsi que la sous-unité régulatrice, IKK γ aussi appelée NEMO. Une fois phosphorylé, l'I κ B est

ubiquitiné puis dégradé par le protéasome. Cela permet la translocation du complexe NF- κ B au noyau. Dans le noyau, l'hétérodimère NF- κ B reconnaît les séquences régulatrices κ B sur les promoteurs des gènes cibles liés à l'inflammation (Hoesel et Schmid, 2013). Trois voies passant par NF- κ B sont reconnues (Hoesel et Schmid, 2013 ; Lawrence, 2009 ; Viatour *et al.*, 2005). La voie canonique classique implique généralement l'hétérodimère p50/p65 activé par des cytokines pro-inflammatoires. La voie alternative indépendante de NEMO, passe plutôt par l'activation de la kinase inductrice de NF- κ B (NIK). Elle active un homodimère d'IKK α puis celui-ci active p100 et p52/RelB. Enfin, la voie atypique est indépendante des IKKs et est induite par des dommages à l'ADN causés par les UV ou la doxorubicine (Viatour *et al.*, 2005). Dans le cancer, l'inflammation et la voie NF- κ B peuvent avoir un double rôle. D'un côté, l'inflammation aiguë mène à l'activation de NF- κ B afin de défendre l'organisme. On appelle cela l'immunosurveillance tumorale (Grivennikov, Greten et Karin, 2010). De l'autre côté, l'activation constitutive de NF- κ B par l'inflammation tumorale engendre la transcription de gènes anti-apoptotiques, de cytokines et de molécules d'adhésion afin de promouvoir la survie et l'invasion (Hoesel et Schmid, 2013).

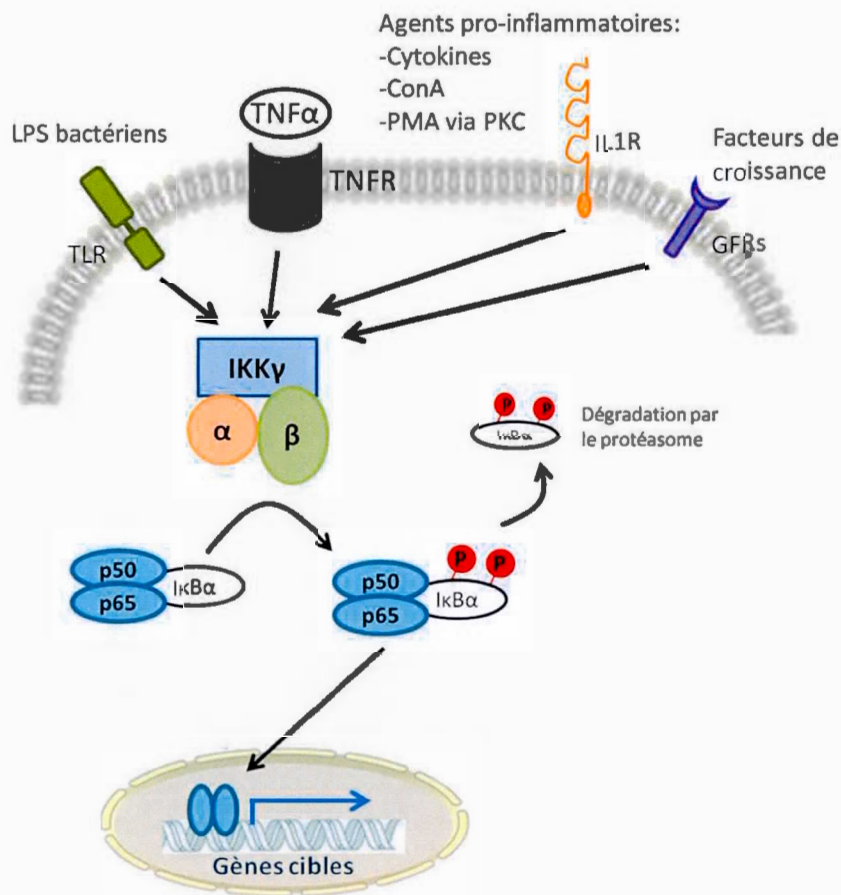


Figure 1.17 Voie de signalisation canonique classique de NF- κ B.

Des agents pro-inflammatoires, des lipopolysaccharides bactériens et des facteurs de croissance activent la voie de signalisation par NF- κ B par l'interaction avec leur récepteur membranaire respectif. Le complexe I κ B kinase phosphoryle I κ B α . Le phospho-I κ B est libéré de l'hétérodimère de NF- κ B puis dégradé par le protéasome. Le complexe NF- κ B, généralement constitué des sous-unités p65/RelA et p50, transloque au noyau où il régule la transcription de gènes cibles de l'inflammation. [Adapté de (Abcam, 2016)]

1.7.2 Modulateurs inflammatoires : le TNF α et la progranuline

Le facteur de nécrose tumoral (TNF α) a été identifié en 1975 comme une molécule cytotoxique causant de la nécrose tumorale (Carswell *et al.*, 1975). Le TNF α est maintenant connu pour jouer un rôle dans les fonctions physiologiques normales, mais aussi dans les processus aigus et chroniques de l'inflammation, dans les maladies auto-immunes et dans l'inflammation liée au cancer (Chu, 2013). Le TNF α est principalement produit par les macrophages et les lymphocytes T, mais la plupart des autres types cellulaires peuvent aussi en produire (Chu, 2013 ; Zelova et Hosek, 2013). Son expression est régulée par les facteurs de transcription NF- κ B, AP-1, AP-2, c-Jun et CRE majoritairement (Sedger et McDermott, 2014 ; Zelova et Hosek, 2013). Le TNF α peut se lier à deux récepteurs spécifiques : TNFR1 et TNFR2 (Candido et Hagemann, 2013 ; Zelova et Hosek, 2013). Le TNFR1 est exprimé ubiquitairement et est responsable de la plupart des effets du TNF α notamment les phénomènes associés à la mort cellulaire et à l'inflammation via la voie de signalisation du facteur de transcription NF- κ B (Puimege, Libert et Van Hauwermeiren, 2014 ; Zelova et Hosek, 2013). Quant au récepteur TNFR2, il est exprimé sur les cellules immunitaires, les cellules endothéliales et quelques populations de cellules neuronales (Probert, 2015 ; Puimege, Libert et Van Hauwermeiren, 2014). La liaison du TNF α au TNFR2 aura plutôt l'effet de supprimer l'inflammation et de promouvoir la survie cellulaire (Puimege, Libert et Van Hauwermeiren, 2014). Malgré que les deux récepteurs fonctionnent de façon indépendante, ils peuvent interagir de façon croisée (Cabal-Hierro et Lazo, 2012 ; Naude *et al.*, 2011). Au niveau moléculaire, il active les voies de signalisation de NF- κ B et des MAPK (Chu, 2013). Il est un important facteur de risque tumoral puisque les cellules du microenvironnement tumoral sont capables de produire du TNF α (Candido et Hagemann, 2013 ; Zelova et Hosek, 2013).

La progranuline (PGRN), quant à elle, est encodée par le gène GRN et est aussi connue sous les noms suivants : précurseur de la granuline-épine (GEP), proépine, facteur de croissance dérivé des cellules tumorales de la prostate (PCDGF) ou acrogranine (Toh *et al.*, 2011). La PGRN est en fait un arrangement de 7,5 motifs de GRN (Palfree, Bennett et Bateman, 2015). La GRN est un peptide de 6 kDa qui module la croissance cellulaire. Elle est riche en cystéine et contient 6 ponts disulfures. La GRN est générée suite à la protéolyse de la PGRN par des élastases. La libération des molécules de GRN génère de l'inflammation et stimule le métabolisme oxydatif des neutrophiles (Daniel *et al.*, 2000 ; Toh *et al.*, 2011). La PGRN est un facteur de croissance de 68 à 88 kDa exprimé et sécrété par les cellules épithéliales, les cellules de la moelle osseuse, immunitaires, neuronales et chondrocytiques. Elle joue un rôle crucial dans la régulation de la cicatrisation et la réparation des tissus. Elle agit comme facteur chondrogénique dans le développement du cartilage et l'arthrite inflammatoire (Liu et Bosch, 2012). La PGRN est un substrat de MT1-MMP (Butler *et al.*, 2008). La PGRN peut aussi s'associer avec le récepteur *Toll-like* 9 (TLR9) afin de prendre part dans le processus d'immunité innée (Park *et al.*, 2011). Son haut taux d'expression dans les cancers humains lui donne un rôle caractéristique dans la progression tumorale (Cenik *et al.*, 2012). La PGRN se lie aux récepteurs du TNF ainsi qu'à la sortiline, ce qui lui permet de moduler la signalisation intracellulaire et la prolifération cellulaire (Liu et Bosch, 2012). Elle est connue pour antagoniser le TNF α sur son récepteur (TNFR) et ainsi avoir un effet anti-inflammatoire via l'inhibition de la voie de signalisation par NF- κ B, mais aussi la voie des MAPKs (Liu et Bosch, 2012). On la retrouve exprimée dans les plaques athérosclérotiques où elle possède une activité anti-inflammatoire (Kojima *et al.*, 2009). L'expression de la PGRN est induite par les stimuli pro-inflammatoires dans les astrocytes (Cenik *et al.*, 2012).

1.8 Transformation cellulaire et oncogénèse

Le métabolisme énergétique est à la base du fonctionnement et de la croissance cellulaire en produisant des hydrates de carbone, des acides gras et des acides aminés via la génération de molécules d'ATP par la phosphorylation oxydative (Berg JM, Tymoczko JL et L., 2002 ; Galgani et Ravussin, 2008). En condition physiologique, le glucose est capté par les GLUT puis transformé en pyruvate lors de la glycolyse (Lunt et Vander Heiden, 2011). Il entre ensuite dans le cycle de Krebs afin de produire de l'ATP via la phosphorylation oxydative. La prolifération incontrôlée des cellules tumorales entraîne une reprogrammation du métabolisme énergétique (Xing *et al.*, 2015). En condition physiopathologique, une baisse de la tension d'oxygène entraîne la glycolyse anaérobie (Agnihotri et Zadeh, 2016). L'activation de HIF1 α induit la transcription des gènes des GLUTs, de la PDK, de la LDHA et de myc (Wu et Zhao, 2013). On mesure donc une augmentation de la consommation du glucose. Puisque le métabolisme mitochondrial est bloqué en absence d'oxygène, de faibles quantités d'ATP sont produites et l'accumulation de lactate est favorisée (Romero-Garcia *et al.*, 2011). De plus, dans les cellules cancéreuses, on observe la conversion de glucose en lactate même en présence d'oxygène, ce qu'on appelle la glycolyse aérobie ou l'effet Warburg (Devic, 2016). L'augmentation des GLUTs et l'effet Warburg favorisent la croissance tumorale. L'augmentation de la transcription des enzymes glycolytiques joue un rôle dans l'effet Warburg. Pendant l'oncogénèse, l'activité de la phosphofructokinase (enzyme de phosphorylation du fructose-6-phosphate) et de l'hexokinase (enzyme de conversion du glucose en glucose-6-phosphate) sont induites tandis que l'activité de la glycogène synthase kinase 3 (GSK3) est inhibée. Ensemble, ils mènent à l'activation de la protéine kinase B, aussi appelée Akt, une protéine de survie cellulaire directement liée à l'augmentation des niveaux cellulaires d'ATP (Romero-Garcia *et al.*, 2011). Par ailleurs, l'activation de la voie PI3K/Akt/mTORC1 régule la croissance cellulaire, améliore la synthèse protéique et promeut la biogénèse des mitochondries, en partie via PGC1 α (Ward et

Thompson, 2012). Au niveau des tumeurs cérébrales, la reprogrammation métabolique est marquée par les fonctions anormales des mitochondries (Seyfried *et al.*, 2011). Ainsi, la transformation d'une cellule normale en cellule tumorale se fait alors que les processus biologiques normaux sont altérés et amènent les cellules à se diviser et proliférer de façon incontrôlée (Chow, 2010). Étant donné que les gènes p53 et myc sont les principaux régulateurs du métabolisme et du cycle cellulaire, on accorde de plus en plus d'importance à leur interrelation (Dang, 2013 ; Lee et Finkel, 2013). Le passage à travers les phases du cycle cellulaire est assuré par plusieurs points de contrôle et leur dérégulation mène à l'oncogenèse (Dominguez-Brauer *et al.*, 2015). Le centrosome est aussi un important acteur de la mitose servant à la ségrégation du matériel génétique (Kim et Dynlacht, 2013).

1.8.1 La ciliogenèse

À l'origine, le cil primaire était perçu comme un organelle vestige de l'évolution des organismes eucaryotes (Carvalho-Santos *et al.*, 2011 ; Davenport et Yoder, 2005). Il fut donc ignoré pendant tout un siècle. Le cil primaire est une organelle cellulaire immobile que l'on trouve ubiquitairement sur les cellules mammifères (Satir, Pedersen et Christensen, 2010). On en compte un par cellule. Il est d'abord très étudié pour ses fonctions sensorielles : mécanique, chimique et photosensible (Ramamurthy et Cayouette, 2009 ; Resnick et Hopfer, 2007 ; Roepman et Wolfrum, 2007). Puis, plus tard, des propriétés lui permettant de faire la transduction des signaux intracellulaires (Basten et Giles, 2013). De plus, le cil primaire régule la croissance cellulaire (Veland *et al.*, 2009). Lors du développement embryonnaire, il détermine le patron d'asymétrie gauche-droite (Nonaka *et al.*, 2002). Finalement, il permet la communication intercellulaire (Stinchcombe et Griffiths, 2014). Sa dysfonction ou sa perte entraîne certaines ciliopathies : la maladie polykystique du rein, la néphronostose pouvant être associée à la rétinite pigmentaire, la dégénération de la

rétine, le syndrome de Joubert et le syndrome de Meckel-Gruber entre autres et il est très peu exprimé dans les cellules cancéreuses (Badano *et al.*, 2006).

La ciliogenèse est le processus d'assemblage et de croissance du cil primaire lors de la différenciation cellulaire (Ishikawa et Marshall, 2011). Le cil primaire contient un axonème «9+0» (9 paires de microtubules périphériques, mais pas de microtubule central) et se différencie des cils mobiles qui contiennent un axonème «9+2» constitué de 9 paires de microtubules périphériques et d'une paire de microtubules centraux, les rendant capables de motilité (Figure 1.18). Le cil primaire ne possède pas de dynéines, les protéines qui rendent possible le mouvement ciliaire observé chez les flagelles. Les protéines responsables de l'assemblage du cil primaire sont transportées le long de l'axonème via les protéines de transport intraflagellaires (IFT) (Ishikawa et Marshall, 2011). La variation de sa longueur et de son expression est synchronisée avec le cycle cellulaire (Figure 1.19). La formation du cil primaire débute par la migration du centrosome vers la surface de la cellule qui entre alors en phase G0 du cycle cellulaire. Le centriole mère est attaché aux vésicules dérivées de l'appareil de Golgi permettant son expansion et sa projection dans la lumière vésiculaire. Les microtubules de l'axonème se polymérisent et les protéines cargo sont transférées au système de transport intraflagellaire. L'exocytose de la vésicule a lieu pour laisser place au cil primaire (Ishikawa et Marshall, 2011). Finalement, le centriole mère s'ancre à la membrane dérivée de l'appareil de Golgi formant le «collier» de la base du cil primaire. En résumé, les cellules ciliées sont en phase G0, leur entrée dans le cycle cellulaire est synchronisée avec la résorption du cil primaire puis à la sortie de la mitose, l'assemblage du cil primaire s'amorce (Quarby et Parker, 2005). Le cil primaire est régulé par les modulations des niveaux de calcium, le récepteur tyrosine kinase, la voie de Sonic hedgehog (Shh), la voie de Wnt, les récepteurs neuronaux et purinergiques ainsi que par les communications entre les cellules et la MEC (Broekhuis, Leong et Jansen, 2013). L'activation anormale de la signalisation dirigée par le cil primaire ou l'absence du cil primaire corrèle avec la

division cellulaire incontrôlée et le développement du cancer dont les astrocytomes et le GBM (Moser, Fritzler et Rattner, 2009 ; Satir, Pedersen et Christensen, 2010). Des conditions hypoxiques inhibent la voie de signalisation Shh et engendrent une diminution du recrutement des protéines de formation du cil primaire. Sa longueur est affectée dans les cellules souches dérivées de la moelle osseuse (Brown *et al.*, 2014 ; Proulx-Bonneau et Annabi, 2011).

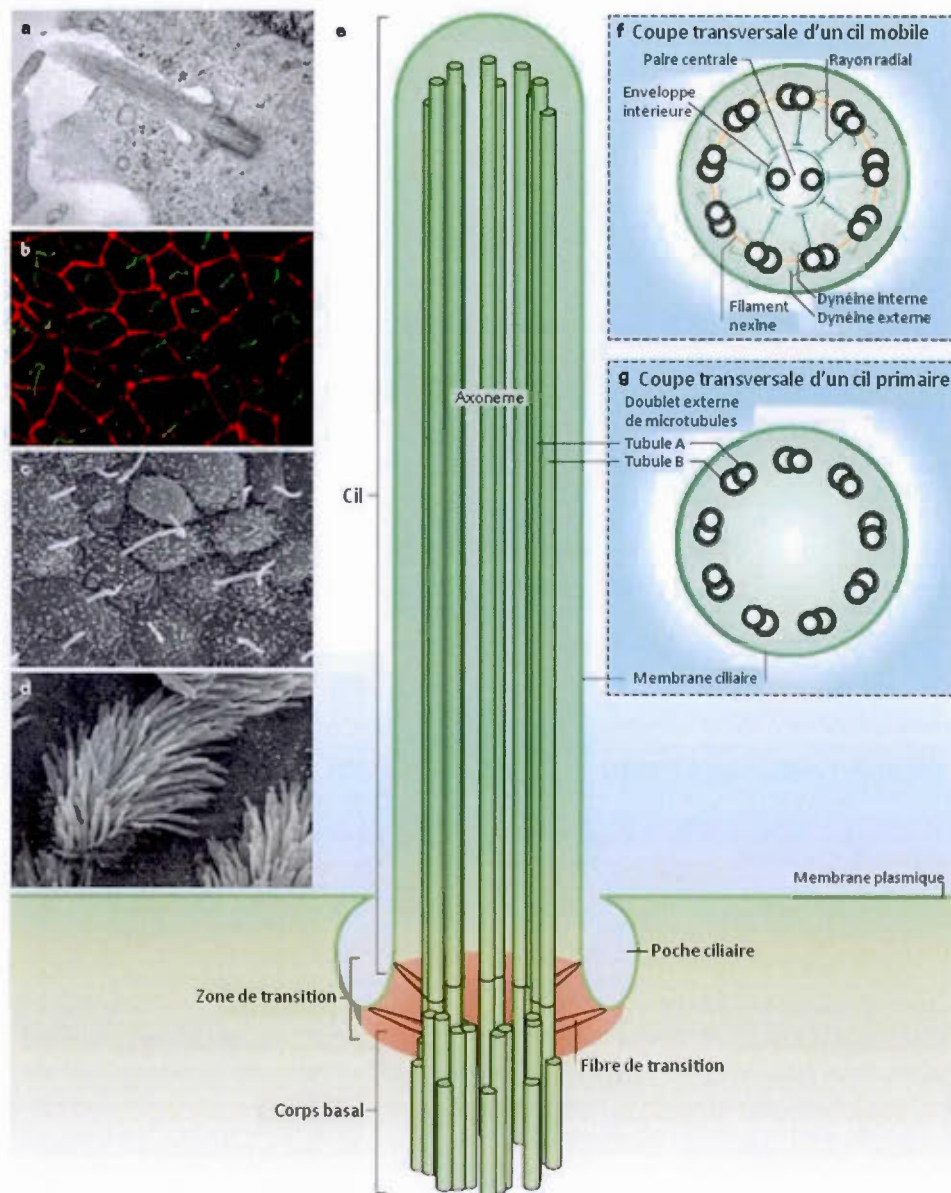


Figure 1.18 Le cil primaire

Représentation du cil primaire en microscopie électronique à transmission **(a)** et en immunofluorescence **(b)**. Microscopie électronique à transmission des cils immobiles **(c)** et des cils mobiles **(d)**. **(e)** Représentation schématique du cil primaire. **(f)** Coupe transversale montrant la structure d'un cil mobile (9+2). **(g)** Coupe transversale montrant la structure du cil primaire (9+0). (Ishikawa et Marshall, 2011)

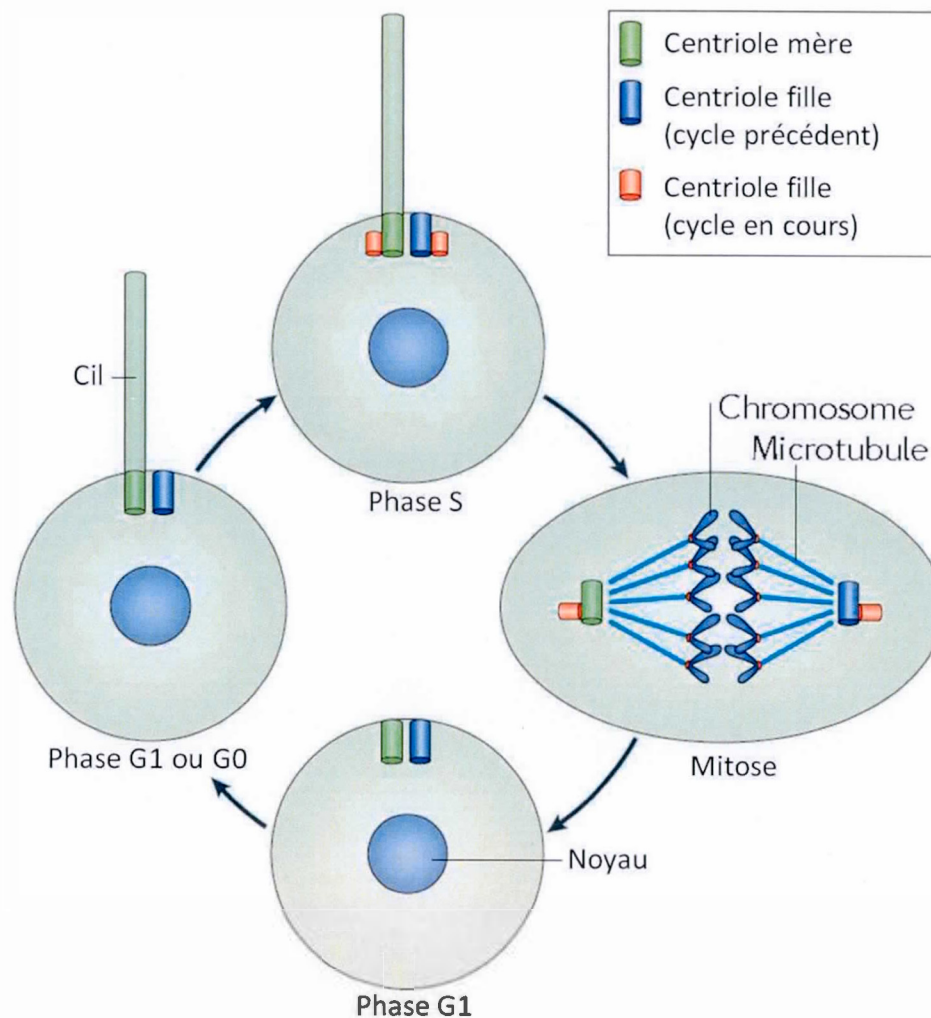


Figure 1.19 Synchronisation de l'assemblage et du désassemblage du cil primaire avec le cycle cellulaire.

Pendant la phase G1, le centriole mère s'attache à la membrane cellulaire. Pendant la phase S, les centrioles se répliquent. Juste avant la mitose, le cil primaire est généralement résorbé pour permettre aux centrioles de se rendre au fuseau mitotique et contribuer à son organisation et son positionnement. Le cil primaire se reforme sur les deux nouvelles cellules filles produites une fois qu'elles entrent en phase G1. (Ishikawa et Marshall, 2011)

1.9 Avenues thérapeutiques du GBM et résistance aux traitements

Présentement, la thérapie conventionnelle du GBM consiste en la chirurgie de résection suivie de traitements combinés de chimiothérapie et de radiothérapie (Wilson, Karajannis et Harter, 2014). La radiothérapie peut consister à l'utilisation de 5000 à 6000 cGy de rayons radioactifs (Barani et Larson, 2015). La chimiothérapie comprend, la plupart du temps, l'utilisation du Temozolomide (TMZ), un agent alkylant qui prévient la réplication de l'ADN et empêche les cellules de se diviser (Nanegrungsunk *et al.*, 2015 ; Wilson, Karajannis et Harter, 2014). Depuis quelques années, des traitements anti-angiogéniques ont été mis au point. Par exemple, le Bevacizumab, un anticorps monoclonal capable de lier le VEGF pour inhiber l'activation de ses récepteurs, a pour but de diminuer la perméabilité vasculaire et l'œdème, deux des principales causes de morbidité et mortalité des patients aux prises avec un GBM (Nanegrungsunk *et al.*, 2015 ; Narita, 2015 ; Wilson, Karajannis et Harter, 2014). Présentement, le développement des médicaments pour le SNC se fait soit par essais et erreurs ou de façon rationnelle avec des essais de criblage à haut débit, le but étant de trouver des molécules capables de traverser la BHE (Patel *et al.*, 2009).

En général, la nécrose cellulaire observée dans le cancer est associée au centre hypoxique tumoral puisqu'un trop grand nombre de cellules cancéreuses est présent dans la masse tumorale et que la faible présence de vaisseaux sanguins et leur désorganisation empêchent l'oxygène d'alimenter ces cellules. L'hypoxie permet l'activation de voies de signalisation impliquées dans la résistance thérapeutique (Shannon *et al.*, 2003). Aussi, la prolifération rapide et incontrôlée, la capacité de survie cellulaire et l'angiogenèse confèrent au GBM un phénotype invasif et inflammatoire favorable à la résistance à la thérapie conventionnelle. La résistance peut être acquise quand une tumeur devient insensible aux drogues utilisées ou elle peut être intrinsèque quand la tumeur ne répond pas de façon significative au

traitement (Haar *et al.*, 2012). Le dynamisme de la BHE lui confère un grand rôle protecteur du cerveau en assurant son homéostasie et gère l'accès de diverses molécules. Par exemple, les protéines d'efflux sont, en partie, responsables de la résistance des GBM aux traitements (Munoz *et al.*, 2015). Les cellules souches cancéreuses sont aussi problématiques et leurs propriétés pro-inflammatoires et pro-angiogéniques contrecarrent l'efficacité à traiter le GBM (Seymour, Nowak et Kakulas, 2015). Finalement, la réparation des dommages à l'ADN et les miARN jouent aussi un rôle important dans la capacité de résistance (Haar *et al.*, 2012). Ensemble, ces caractéristiques sont le centre d'un grand défi thérapeutique en ce qui concerne le traitement des tumeurs cérébrales. Plusieurs autres équipes de chercheurs mettent au point des molécules capables de traverser le BHE en utilisant notamment la vectorisation des médicaments (Lalatsa, Schatzlein et Uchegbu, 2014).

1.9.1 Vectorisation des médicaments

Des stratégies sont mises au point afin de trouver un traitement et une distribution efficace des médicaments dans la tumeur cérébrale. Les approches thérapeutiques émergentes mettent en lumière les systèmes de distribution chimiques, biologiques ou mécaniques (Patel *et al.*, 2009). Les modifications chimiques des médicaments se font de 3 façons : l'utilisation de liposomes, l'approche prodrogue et le système «lock-in» (LIS) (Oberoi *et al.*, 2016 ; Patel *et al.*, 2009 ; van Tellingen *et al.*, 2015). La doxorubicine encapsulée est un exemple de lipidation de petite molécule (Negishi *et al.*, 2011). L'approche prodrogue, quant à elle, s'est avérée apporter une plus grande possibilité de toxicité et est donc moins intéressante (Patel *et al.*, 2009). La méthode biologique vise à créer des peptides vecteurs et à utiliser les systèmes de transport présents à la BHE (décrits à la section 1.3.1). Jusqu'à maintenant, on reconnaît l'OX26, l'HIRMabNP, le 2B3-101, le Cereport, l'Elacridar et l'ANG1005 (van Tellingen *et al.*, 2015). Il est aussi possible de briser de façon transitoire et réversible les jonctions serrées des cellules endothéliales par choc hyperosmotique,

administration de substances vasoactives ou d'alkylglycérols (Erdlenbruch *et al.*, 2003). Enfin, la fabrication de nanoparticules est aussi une méthode populaire qui utilise la voie transcellulaire pour traverser la BHE (Li *et al.*, 2016).

1.9.2 Le vecteur peptidique Angiopep-2

La compagnie biopharmaceutique Angiochem Inc. a créé une famille de peptides dérivés du domaine de Kunitz du peptide aprotinine, nommés Angiopeps (Demeule *et al.*, 2008b). Parmi les molécules identifiées, l'Angiopep-2 (An-2) est le meilleur candidat pour l'administration de médicaments dans le parenchyme cérébral (Demeule *et al.*, 2008b). Il s'agit d'une stratégie novatrice basée sur l'utilisation d'un peptide cargo sur lequel on peut conjuguer une molécule thérapeutique pour traverser la BHE. L'An-2 peut être conjugué au Paclitaxel, un agent de blocage de la mitose, à la Doxorubicin, un agent intercalant de l'ADN, puis à l'Étoposide, un inhibiteur de la topoisomérase et on nomme ces molécules ANG1005, ANG1007 et ANG1009 respectivement (Che *et al.*, 2010 ; Regina *et al.*, 2008). L'ANG1005 a été désigné par la «*Food and Drug Administration*» (FDA) comme traitement contre le GBM (Angiochem Inc., 2014). Le passage au travers de la BHE se fait principalement via le récepteur LRP1, capable d'efficacement reconnaître et internaliser les molécules d'Angiopeps (Demeule *et al.*, 2008a). De plus, le récepteur LRP1 se trouve souvent induit dans les cancers (Xing *et al.*, 2016). L'ANG1005 se lie à LRP1 pour traverser les capillaires par transcytose (Figure 1.14). Une fois internalisé dans les lysosomes, l'ester de l'ANG1005 est hydrolysé en acide carboxylique par des estérases aboutissant en la libération intracellulaire des molécules de Paclitaxel. Il a été montré que l'internalisation de l'An-2 est stimulée par des conditions acides, hypoxiques et de sevrage (Bertrand *et al.*, 2011).

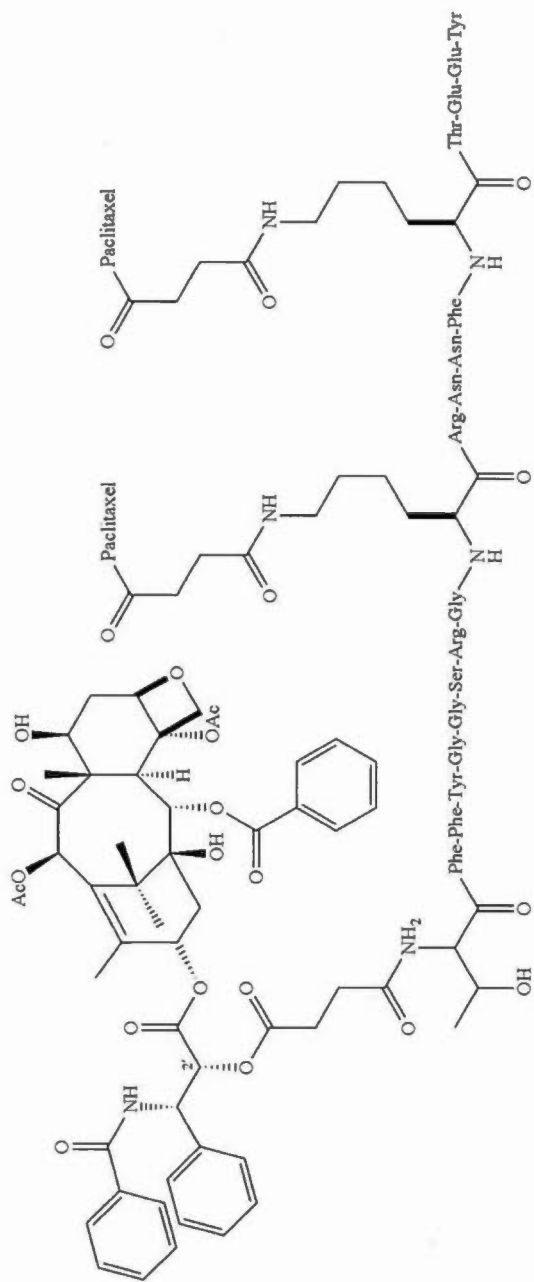


Figure 1.20 Structure de l'ANG1005.

L'ANG1005 est un peptide de 19 acides aminés conjugué à un dérivé de taxane, le paclitaxel, un inhibiteur de la mitose. Trois molécules de paclitaxel sont liées à l'An2 par un lien ester succinyl. (Bertrand *et al.*, 2010 ; Regina *et al.*, 2008)

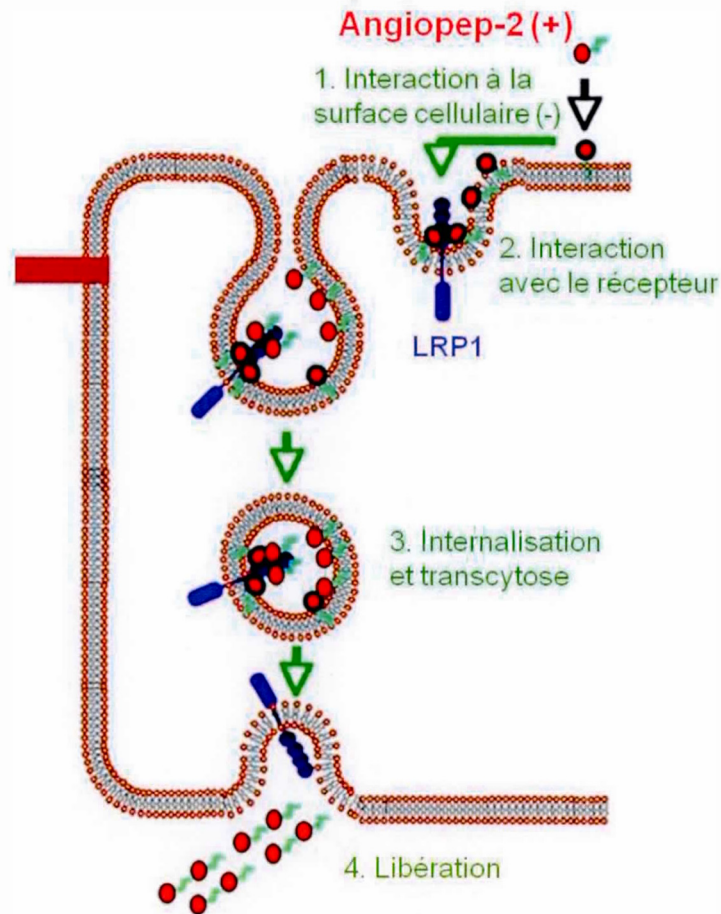


Figure 1.21 Transcytose de l'Angiopep-2 via LRP1.

L'An-2 est chargée positivement, lui permettant d'interagir avec la surface cellulaire endothéliale. L'An-2 se lie à LRP1 pour être internalisée puis libérée de l'autre côté de la cellule. (Bertrand *et al.*, 2010)

CHAPITRE II

PROJET DE RECHERCHE

2.1 Problématique

L'évolution rapide du GBM provoque plusieurs changements dans son microenvironnement très complexe. Ce microenvironnement est principalement composé des compartiments cellulaires tumoraux et endothéliaux ainsi que celui des cellules provenant de la circulation sanguine incluant notamment les cellules souches mésenchymateuses. Les interactions entre ces trois compartiments favorisent le développement des phénotypes inflammatoires, invasifs et infiltrants qui caractérisent le GBM. La difficulté à traiter le GBM est défini par l'important centre hypoxique tumoral, mais est aussi due à la présence de la BHE. Les interactions cellulaires au sein du microenvironnement du GBM nous amènent à croire que des mécanismes adaptatifs sont à la base des comportements régissant la progression tumorale et la résistance à la thérapie.

2.2 Hypothèses de recherche

Depuis plusieurs années, les avancées thérapeutiques contre le GBM sont de plus en plus novatrices, mais sont plus ou moins efficaces à allonger la survie des patients atteints. Afin de mieux comprendre la complexité des comportements cellulaires au sein du microenvironnement du GBM nous avons émis une première hypothèse concernant la stratégie thérapeutique utilisant le vecteur peptidique Angiopep-2 comme cargo dans le transport de médicaments anticancéreux au travers de la BHE :

- 1- Nous suggérons qu'il existe des mécanismes adaptatifs dans les systèmes de transport à la BHE séparant les compartiments tumoraux et endothéliaux qui favorisent l'endocytose et la transcytose de l'Angiopep-2 en réponse à l'hypoxie.

Ensuite, nous avons choisi d'approfondir nos connaissances sur le phénomène d'angiogénèse tumorale, une importante propriété du GBM, en partie responsable de la difficulté à traiter ce cancer de grade IV. Le GBM sécrète une panoplie de facteurs

pro-angiogéniques stimulant la prolifération et la migration des cellules endothéliales prêtes à former de nouveaux vaisseaux sanguins pour nourrir la tumeur. Plus particulièrement, la sphingosine-1-phosphate (S1P) est un lipide bioactif impliqué dans plusieurs mécanismes cellulaires dont la migration cellulaire et l'angiogénèse. La S1P est reconnue pour promouvoir la progression tumorale. Puisque le récepteur membranaire LRP1 est également un important intermédiaire dans la liaison de plus d'une quarantaine de ligands et qu'il est exprimé dans les cellules endothéliales, nous avons émis la deuxième hypothèse suivante :

- 2- Nous suggérons qu'il se produit des mécanismes adaptatifs dans la migration cellulaire endothéliale en réponse à la répression du récepteur membranaire LRP1.

Enfin, nous avons dirigé nos travaux vers l'étude de la ciliogenèse des cellules souches mésenchymateuses. Le cil primaire est peu exprimé dans les cellules cancéreuses ayant un grand pouvoir prolifératif. Les cellules souches mésenchymateuses, quant à elles, ont la possibilité d'être recrutées au foyer tumoral et contribuer à la progression tumorale du GBM en s'adaptant et participant notamment aux mécanismes inflammatoires et angiogéniques. En ce sens, l'activation des MSC par le $TNF\alpha$ est directement liée à la promotion de la croissance tumorale. Nous avons donc émis la troisième hypothèse qui suit :

- 3- Nous suggérons que des mécanismes adaptatifs corréleraient avec la transformation oncogénique des cellules souches mésenchymateuses en contexte inflammatoire.

2.3 Objectifs de recherche

Les présents travaux s'inscrivent dans les objectifs du Laboratoire d'Oncologie Moléculaire dans le but d'approfondir nos connaissances liées à la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires responsables de la progression tumorale et à

l'identification de nouvelles cibles au potentiel thérapeutique principalement envers les tumeurs cérébrales telles que le GBM. L'objectif général de cette thèse est de mettre en lumière des processus et des cibles signalétiques pour mieux comprendre les mécanismes adaptatifs cellulaires régissant l'oncogenèse cérébrale. Les objectifs spécifiques sont :

- 1) Déterminer les mécanismes compensatoires à LRP1 via l'implication d'autres récepteurs membranaires dans les cellules des compartiments tumoraux et endothéliaux cérébraux dans l'internalisation de l'Angiopep-2 en réponse à un stimulus hypoxique.
- 2) Caractériser les mécanismes adaptatifs des cellules microvasculaires endothéliales en comparant les états de répression stable ou transitoire de la protéine LRP1 dans la migration et la signalisation par les récepteurs de la SIP, un facteur pro-angiogénique.
- 3) Étudier la ciliogenèse en réponse à un stimulus pro-inflammatoire comme mécanisme de transformation oncogénique des cellules souches mésenchymateuses.

2.4 Méthodologie expérimentale

Afin de tester la validité de les hypothèses annoncées, nous avons utilisé des approches expérimentales utilisant des modèles cellulaires *in vitro* et un modèle murin *in vivo*. Nos stratégies expérimentales se basent surtout sur l'étude de voies de signalisation intracellulaires régissant les phénomènes tumoraux qui nous intéressent.

Plus spécifiquement, afin de déterminer les mécanismes compensatoires à LRP1 dans les cellules des compartiments tumoraux et endothéliaux cérébraux dans l'internalisation de l'An2 en réponse à l'hypoxie et ainsi répondre à l'objectif #1, des cellules U87, HBMEC et HBMEC-SV40 ont été maintenues à <1% d'oxygène dans une chambre hypoxique jusqu'à 48 heures (Figure 2.1). L'induction génique des

biomarqueurs hypoxiques VEGF et GLUT1 marquent les modifications générées par de faibles niveaux d'oxygène dans l'environnement cellulaire. Par la suite, nous avons procédé à des essais cellulaires tels que le marquage de lysosomes et des expériences de reconnaissance (*binding*) et d'internalisation (*uptake*) de l'An2 dans les cellules hypoxiées ou non. Ces essais nous ont permis de caractériser les comportements cellulaires dans les deux types de compartiments que l'on retrouve au niveau d'une tumeur solide comme le GBM soit l'endothélium et la tumeur. Le marquage de protéines à la membrane ou de façon intracellulaire nous a permis de qualifier l'importance et le positionnement des récepteurs nécessaires à l'entrée et au relargage de l'An2 en conditions hypoxiques.

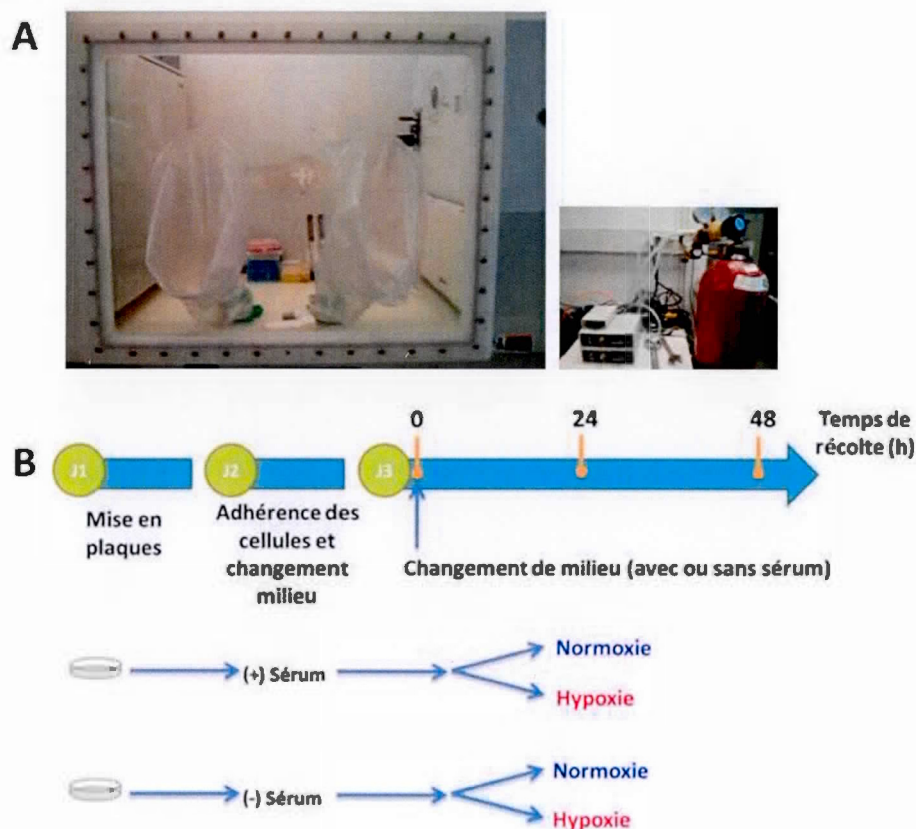


Figure 2.1 Traitement hypoxique.

A) Chambre hypoxique. B) Protocole de traitement cellulaire.

Dans le but de caractériser les mécanismes adaptatifs des cellules microvasculaires endothéliales et de mieux définir l'interrelation entre LRP1 et la S1P et ainsi répondre à l'objectif #2, nous avons utilisé un modèle *in vitro* de HBMEC-SV40 sauvage (WT), de HBMEC-SV40 LRP1^{-/-}, un modèle *in vivo* de souris sauvage (Wt) et des souris dans lesquelles Lrp1 a été réprimé de façon stable par la méthode Cre/Lox (Lrp1^{(EC)^{-/-}}). J'ai mis au point une technique d'isolation de cellules microvasculaires cérébrales de souris inspirée des techniques de Demeule M. et al. (2001); Lu C. et al. (2008); Wu Z. et al. (2003). La technique consiste à euthanasier entre 4 à 10 souris par génotype, dépendamment de l'expérience à faire. Leurs cerveaux sont ensuite extraits puis homogénéisés manuellement à l'aide d'un homogénéisateur de type Potter, dans du milieu de culture réduit en sérum. On retire ensuite la myéline par centrifugation dans une solution de Dextran 70kDa avant de faire une digestion enzymatique du matériel extracellulaire avec de la collagénase A. Après des filtrations et des lavages du culot cellulaire, on procède à un tri cellulaire en utilisant des microbilles magnétiques sur lesquelles sont attachés des anticorps spécifiques afin de récolter au maximum des cellules endothéliales et au minimum des autres types cellulaires (lymphocytes, leucocytes, astrocytes, etc.). L'anticorps CD45 est utilisé pour cibler les leucocytes et s'en débarrasser. L'anticorps *platelet endothelial cellular adhesion molecule 1* (PECAM-1) aussi appelé CD31 est utilisé pour cibler les cellules endothéliales. Le tri se fait sur une colonne magnétique MACS® LS (Figure 2.2). La validation de l'isolation cellulaire a été faite par cytométrie en flux avec un anticorps CD31 marqué avec l'Alexa Fluor 647 (Figure 2.3). De plus, du même coup, il a été possible de mesurer les niveaux d'expression de Lrp1 avec un anticorps marqué avec l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). Nous avons aussi mesuré l'expression du marqueur astrocytaire GFAP. Quant aux cellules HBMEC-SV40 WT et LRP1^{-/-}, elles ont été mises au point par ma collègue stagiaire postdoctorale Cyndia Charfi.

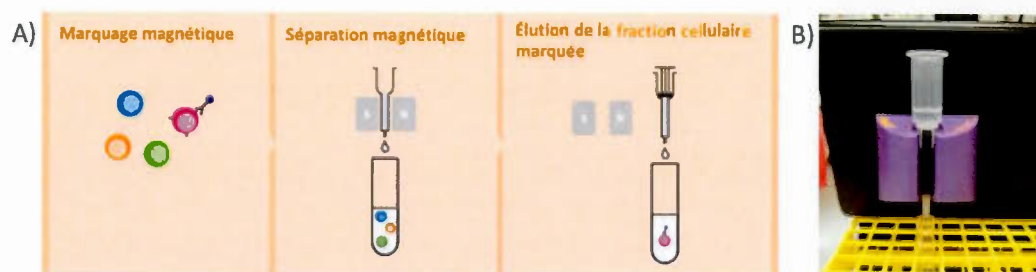


Figure 2.2 Schéma de la procédure de marquage utilisé pour le tri cellulaire par des microbilles magnétiques.

A) Étapes d'un tri cellulaire par sélection grâce à un anticorps spécifique couplé à des microbilles magnétiques. Les cellules sont incubées avec les microbilles magnétiques couplées à l'anticorps de sélection spécifique. La suspension cellulaire est appliquée dans le réservoir de la colonne de sélection magnétique. La portion négative passe à travers la colonne alors que la portion positive reste accrochée à l'intérieur de celle-ci. Enfin, la colonne est retirée du support puis la portion positive est récupérée à l'aide d'un piston. **B)** Montage de la colonne sur le support magnétique.

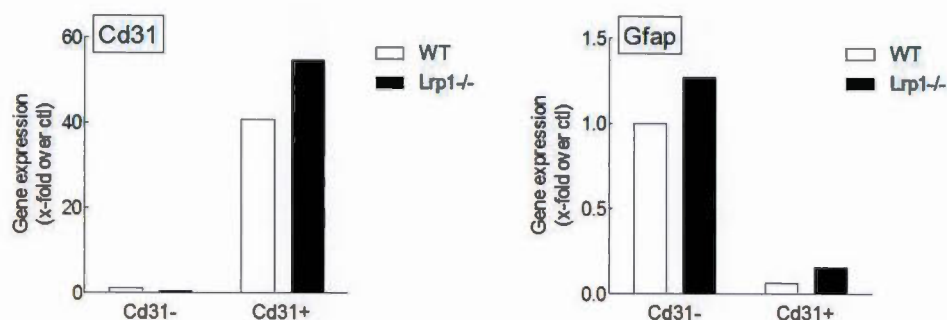


Figure 2.3 Validation de la pureté de l'isolation des cellules endothéliales cérébrales murines.

Expression génique de Cd31 (**A**) et Gfap (**B**) mesurée dans les cellules endothéliales isolées à partir des cerveaux de souris. La pureté de la population endothéliale est validée par le haut niveau d'expression du marqueur endothélial Cd31 en comparaison aux autres cellules Cd31^{négative}. La pureté de la population endothéliale se remarque aussi par le faible niveau d'expression du marqueur astrocytaire Gfap dans la population Cd31^{positive} en comparaison à la population des autres cellules Cd31^{négative}.

Pour répondre à l'objectif #3 et étudier la ciliogenèse des MSC en réponse au $TNF\alpha$, nous avons utilisé un modèle de MSC murines dans lesquelles nous avons étudié les modulations d'expression du cil primaire en réponse à la stimulation proinflammatoire du $TNF\alpha$. La meilleure façon d'étudier le cil primaire est d'en faire le marquage avec un anticorps dirigé contre la tubuline acétylée. On peut observer les résultats au microscope à fluorescence. Le cil est facilement visible et on en observe qu'un seul par cellule (Figure 2.4). Nous avons testé l'hypothèse de l'activation et l'importance de la voie de signalisation passant par NF- κ B dans les modulations d'expression du cil primaire avec un modèle de fibroblastes embryonnaires murins réprimés pour chacune des sous-unités qui composent le complexe I κ B kinase (IKK α , IKK β , IKK γ). De plus, avec un antagoniste du récepteur au $TNF\alpha$, la progranuline (PGRN), nous avons pu valider les résultats observés sur la ciliogenèse.

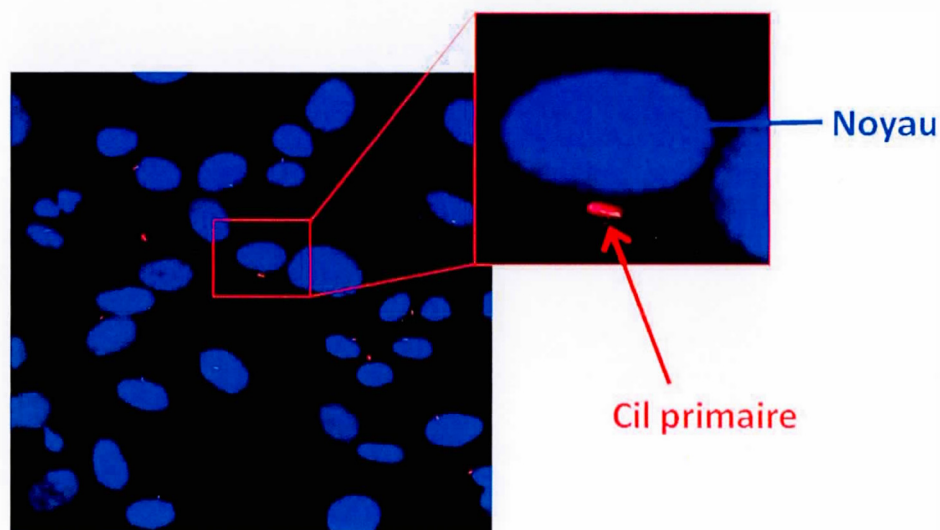


Figure 2.4 Exemple de marquage fluorescent du cil primaire.

Le marquage du cil primaire est fait avec un anticorps dirigé contre la tubuline-acétylée. L'analyse microscopique permet de reconnaître une structure unique, le cil primaire (flèche rouge) sur chacune des cellules, positionnée près du noyau (flèche bleue).

2.5 Contributions à l'avancement des connaissances scientifiques

Les GBM sont les tumeurs cérébrales dont les patients atteints ont le plus faible taux de survie. Malgré les récents progrès, il demeure primordial d'approfondir les connaissances des processus moléculaires liées à la progression oncogénique du GBM, mais aussi à l'entrée de plateformes thérapeutiques comme l'An2. Le principal enjeu scientifique de cette thèse demeure dans l'importance d'établir le lien entre l'adaptation phénotypique observée au sein des cellules de tumeurs cérébrales de haut grade composant le microenvironnement tumoral et la capacité des tumeurs cérébrales à survivre, migrer vers les tissus sains et produire des signaux (pro-inflammatoires, pro-angiogéniques, prolifératifs, anti-apoptotiques) favorisant sa progression. Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires entourant l'acquisition d'un phénotype inflammatoire et invasif des GBMs permettra de cibler des marqueurs de la signalisation intracellulaire (kinases, facteurs de transcription, récepteurs). Cela contribuera à la mise au point d'approches thérapeutiques pouvant contrecarrer le phénotype de résistance aux traitements conventionnels des GBMs. Dans un futur rapproché, ces nouvelles études se verront novatrices et prometteuses afin d'améliorer la taux de survie ainsi que la qualité de vie des patients aux prises avec des pathologies malignes interreliées à des problèmes métaboliques.

CHAPITRE III

HYPOXIC CONDITIONS DICTATE ANGIOPEP-2 SORTING AND CELL SURFACE BINDING/UPTAKE PROCESSES BETWEEN BRAIN TUMOR AND BRAIN ENDOTHELIAL CELLS

Amélie Vézina, Samuel Sheehy, Jonathan Pratt, Borhane Annabi

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

2016

Soumis aux avocats d'Angiochem Inc.

3.1 Avant-propos

Les travaux présentés dans ce premier article répondent au premier objectif de cette thèse, dans le but de mieux caractériser la reconnaissance et l'internalisation de l'Angiopep-2 dans des modèles cellulaires tumoraux et endothéliaux cérébraux, en contexte hypoxique. Ce vecteur peptidique, sur lequel il est possible de conjuguer des drogues anticancéreuses, est très prometteur dans le traitement du cancer du cerveau. Son internalisation se fait en partie (environ 50%) par la protéine LRP1 et est modulée lorsque des changements métaboliques surviennent : diminution des niveaux d'oxygène, acidification du milieu et sevrage. Je me suis donc penchée sur l'étude des mécanismes compensatoires à LRP1 responsables de la reconnaissance et l'internalisation de l'Angiopep-2 dans des cellules de GBM et dans deux modèles de HBMEC : normales et mimant l'endothélium tumoral de par leur capacité à proliférer de façon infinie. Les résultats montrent une réponse différentielle des deux sous-types cellulaires caractérisant le compartiment tumoral et le compartiment endothélial retrouvé à la barrière hémato encéphalique.

J'ai contribué à la conception de l'étude et à toutes les expériences et leurs analyses subséquentes. Sous ma supervision, Samuel Sheehy a effectué quelques expériences de qRT-PCR et Jonathan Pratt a procédé au marquage fluorescent des lysosomes ainsi qu'à leur analyse en microscopie. La rédaction de l'article, l'interprétation des résultats, le montage des figures, l'analyse statistique et les révisions finales du manuscrit ont été effectués par moi-même et par le professeur Borhane Annabi. Les références de l'article sont présentées à la fin de la thèse dans la bibliographie générale.

Les résultats ont été présentés sous forme de communication orale ou par affiche dans les congrès suivants :

VÉZINA A, Sheehy S, Pratt J, Demeule M, Haidara K, Annabi B. (2015) Régulation des processus d'internalisation et de reconnaissance de l'Angiopep-2 en hypoxie dans les cellules tumorales cérébrales et les cellules microvasculaires endothéliales cérébrales. *Congrès annuel CRCQ 2015 (St-Alexis-des-Monts, QC, Canada)*. Oral #91.

VÉZINA A, Sheehy S, Demeule M, Haidara K, Annabi B. (2015) Evidence for differential angiopep-2 sorting and upregulated cell surface binding/uptake processes between brain tumor and brain endothelial cells under hypoxic conditions. *Retraite du Centre de Recherche BioMed 2015 (Ste-Adèle, QC, Canada)*. Affiche #55.

3.2 Résumé

Au sein des glioblastomes de grade IV, les cellules cancéreuses et endothéliales sont exposées à des conditions hypoxiques et adaptent leur réponse biologique par une activation accrue des voies de signalisation qui régulent la prolifération, l'angiogénèse et la survie cellulaire. Les cellules tumorales et endothéliales cérébrales peuvent également acquérir une signature phénotypique moléculaire permettant aux tumeurs de résister à la chimiothérapie. Sachant que l'hypoxie de ces tumeurs les associe à un mauvais pronostic et à la résistance à la chimiothérapie, il devient important d'évaluer l'efficacité de nouvelles stratégies de livraison de médicaments au sein de ces microenvironnement tumoraux hypoxiques. Dans cette étude, nous avons évalué l'impact de l'hypoxie sur l'internalisation de l'Angiopep-2 (An2), un peptide connu pour traverser la barrière hématoencéphalique et pouvant améliorer la livraison de molécules biologiques actives aux tumeurs cérébrales. Nous avons utilisé trois modèles cellulaires: les cellules de glioblastome (U87), les cellules microvasculaires endothéliales cérébrales (HBMEC) et les cellules HBMEC immortalisées par le virus SV40 qui miment le comportement des cellules endothéliales dérivées de tumeurs cérébrales de par leur capacité à proliférer de façon infinie. Nous avons identifié que l'internalisation de l'An2 était plus efficace dans les U87 et les HBMEC-SV40 alors que les processus de liaison de l'An2 étaient plus efficaces dans les HBMEC. En hypoxie, les processus de liaison de l'An2 étaient induits dans les U87 et les HBMEC, puis son internalisation était seulement induite dans les U87. Nous avons également observé une induction des niveaux d'expression génique et protéique de *Low Density Lipoprotein receptor-related protein-1* (LRP1), Syndecan-2 et Syndecan-4 dans les U87 traitées par l'hypoxie, suggérant un rôle pour ces récepteurs dans l'internalisation de l'An2. Nous avons observé une induction de l'expression de la Sortilin-1 dans les HBMEC, suggérant son rôle dans la transcytose de l'An2 dans le compartiment vasculaire cérébral. L'ensemble de ces résultats suggèrent une première évidence différentielle quant à la spécificité des processus de livraison de l'An2 dans un modèle endothélial normal en comparaison à un modèle endothélial tumoral cérébral. En conclusion, nous avons identifié la possibilité de liaison et d'internalisation de l'An2 par des biomarqueurs tels que LRP1 pour efficacement délivrer des molécules chimiothérapeutiques dans un compartiment tumoral cérébrale hypoxique.

Mots clés : Barrière hématoencéphalique, hypoxie, glioblastome, cellules endothéliales cérébrales, Angiopep-2

3.3 Abstract

Tumoral and vascular compartment undergo adaptive cellular responses when exposed to hypoxic conditions such as found within solid tumors. These include activation of specific signaling pathways which regulate proliferation, angiogenesis and survival. Cancer and endothelial cells can further acquire a phenotypic molecular signature allowing tumors to resist to chemotherapy treatments. Given tumor hypoxia is associated with poor prognosis and resistance to therapy, it becomes imperative to evaluate the efficacy of chemotherapeutic drug delivery strategies within the hypoxic tumor microenvironment. In this study, we evaluated the impact of hypoxia on the uptake of Angiopep-2 (An2), a brain-penetrant peptide known to cross the blood-brain barrier (BBB) and which can increase the delivery of biologically active An2-conjugates within brain tumors. Three cellular models were used namely a human glioblastoma-derived U87 cell line, a human brain microvascular endothelial cell (HBMEC) line, and a SV40-immortalized HBMEC model which closely mimics brain tumor-derived endothelial cells. We found that basal An2 cell surface binding/recognition processes were more efficient in HBMEC than in U87 or HBMEC-SV40 cells, while the An2 uptake process was more efficient in U87 and HBMEC-SV-40 cells than in normal HBMEC. An2 intracellular compartmentalization was also found to be associated within lysosomes in U87 cells but not in HBMEC, suggesting differential intracellular trafficking processes to be involved. When cultured under hypoxic conditions, all three cell lines exhibited increased VEGF transcript levels. However, increase in An2 cell surface binding was only observed in U87 and HBMEC, while increased An2 uptake was observed in U87 cells. Neither An2 binding nor uptake were modulated in hypoxic immortalized HBMEC-SV40 cells. Interestingly, hypoxia was found to increase the transcript levels of LDL receptor-related protein-1 (LRP-1), Syndecan-2 and Syndecan-4 in U87 cells suggesting these may be involved in intracellular uptake processes, while Sortilin-1 gene expression was found to be increased in HBMEC and possibly involved in the An2 transcytosis processes within the brain vascular compartment. Collectively, these observations are the first evaluating the specificity of An2-delivery mechanisms in a normal versus a transformed brain endothelium model. Moreover, we have identified An2 cell surface and intracellular sorting mechanisms which may allow efficient LRP-1-mediated An2 transcytosis/uptake processes to be accomplished, and which confirm the capacity of the platform to efficiently target the hypoxic BBB vascular compartment and to deliver An2 within the tumoral compartment.

Key words: Blood-brain barrier, Hypoxia, Glioblastoma, Brain microvascular endothelial cells, Angiopep-2

3.4 Introduction

Solid tumors are complex heterogeneous systems displaying a combination of cancer cells and non-malignant cells within an extracellular matrix (ECM) (Saggar *et al.*, 2013). At a certain point of their development, small tumors start suffering from anoxia and hypoxia as they are lacking nutrients and oxygen. Vascularization allows to overcome this stressful state. To do so, hypoxic tumor cells express several angiogenic factors, of which the up-regulation of hypoxia induced factor-1 α (HIF-1 α) plays a crucial role (Pugh et Ratcliffe, 2003). HIF-1 α is a transcription factor involved in a myriad of cellular processes including cell cycle arrest, pro- and anti-apoptotic effects, glycolysis and angiogenesis through up-regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) (Pugh et Ratcliffe, 2003 ; Semenza, 2003). However, tumor neovascularisation is typically anarchic allowing the establishment of hypoxic areas (Hendriksen *et al.*, 2009). The hypoxic tumor phenotype is defined when the cells face an environment devoid of vasculature to provide enough oxygen (Brahimi-Horn, Chiche et Pouyssegur, 2007).

As we know, tumor vessels cannot ensure efficient tumor blood perfusion, since they are structurally aberrant and hyperpermeable and this could be a challenge when it comes to drug delivery. Endothelial cells, pericytes, smooth muscle cells, and the basal membrane collectively form the blood vascular wall that therapeutic molecules have to cross to reach the targeted tissue (Azzi, Hebda et Gavard, 2013). Bioavailability and selectivity of therapeutic molecules toward tumor cells, depends on their ability to counteract biological and physical barriers such as drug efflux pumps that are especially highly expressed at the blood-brain barrier (BBB). (Gottesman, 2002 ; Regina *et al.*, 2001). Crossing the BBB has been the major challenge for the design and the discovery of brain targeting therapeutic molecules. A family of peptides called Angiopep derived from the Kunitz domain and mimicking the sequence of aprotinin have the significant ability to cross the BBB through

transcytosis and to accumulate within the brain parenchyma (Demeule *et al.*, 2008a ; Demeule *et al.*, 2008b). From this peptide family, Angiopep-2 (An2), a 19 amino-acid peptide, displays higher ability to cross the brain microvascular endothelial wall (*in vitro* and *in vivo*) and to accumulate into the brain parenchyma. Using drug conjugate strategies, a portfolio of novel anticancer agents was created, including An2-conjugates of Paclitaxel (ANG1005; also known as GRN1005), Doxorubicin (ANG1007), and Etoposide (ANG1009) (Che *et al.*, 2010 ; Regina *et al.*, 2008). It has been shown that these 3 molecules display a better brain penetration compared to their non-conjugated form, and keep their therapeutic activities.

An2 internalization is essentially thought to be mediated at about 50% through the low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP1), a membrane receptor displaying both scavenging and signaling functions (Bertrand *et al.*, 2011 ; Demeule *et al.*, 2008a ; Demeule *et al.*, 2008b). The other mechanisms and/or receptors responsible for the 50% of An2 uptake remaining is still undefined. Furthermore, it has been shown that An2 uptake was modified by microenvironment cues of gliomas such as hypoxia, change in pH and serum privation (Bertrand *et al.*, 2011). An2 internalization and recognition processes remain to be better understood within hypoxic settings, especially that LRP1 is known to be induced by hypoxic conditions in a multitude of tumoral and primary cell lines (Castellano *et al.*, 2011 ; Li *et al.*, 2015 ; Masaldan et Iyer, 2014 ; Revuelta-Lopez *et al.*, 2015 ; Wykoff *et al.*, 2000). We hypothesis that An2 binding and internalization by LRP1 will be enhanced by hypoxia and that other receptors at the BBB are responsible of the remaining 50% of An2 entry in cells. In this study we sought at assessing An2 internalization and subsequent localization in human glioblastoma cells (U87), human brain endothelial cells (HBMEC), and in an immortalized SV40-HBMEC model which closely mimics the brain tumor vasculature in order to better understand how such peptide vector can cross the BBB and become a cure for aggressive high-grade gliomas such as GBM.

3.5 Material and methods

3.5.1 Materials

Sodium dodecylsulfate (SDS), bovine serum albumin (BSA), and paraformaldehyde were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON) and prepared following manufacturer protocol. Electrophoresis reagents were from Bio-Rad (Mississauga, ON). The enhanced chemiluminescence (ECL) reagents were from Perkin Elmer (Waltham, MA). Micro bicinchoninic acid protein assay reagents were from Pierce (Rockford, IL). The Alexa Fluor 488 conjugated Angiopep-2 was a kind gift from Angiochem Inc. (Montréal, QC). The monoclonal antibody against LRP1 (85KDa) was purchased from Research Diagnostics (Flanders, NJ, USA). Dilutions of 2 μ g/ml were used for immunoblotting. The anti-LRP1-PE and its IgG1 κ -PE were purchased from BD Biosciences (Mississauga, ON). The antibodies against Syndecan-2, Syndecan-4 and Sortilin were purchased from Abcam (Toronto, ON) The respective IgGs were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX). The anti-mouse and anti-rabbit Alexa Fluor 488 secondary antibodies for immunocytochemistry were purchased from Life Technologies (Burlington, ON). The monoclonal antibody against GAPDH was from Advanced Immunochemical Inc. (Long Beach, CA). Dilution of 1:50,000 was used for immunoblotting. Horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-mouse IgG secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA). The Lysotracker Red DND-99 was purchased from Life Technologies (Burlington, ON).

3.5.2 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), and 1 mM sodium pyruvate. HBMEC were characterized and generously provided by Dr Kwang

Sik Kim of Johns Hopkins University School of Medicine (Baltimore, MD). These cells were positive for factor VIII-Rag, carbonic anhydrase IV and Ulex Europeus Agglutinin I; they took up fluorescently labeled, acetylated low-density lipoprotein and expressed gamma glutamyl transpeptidase, demonstrating their brain EC-specific phenotype (Stins, Gilles et Kim, 1997). HBMEC were immortalized by transfection with simian virus 40 large T antigen and maintained their morphological and functional characteristics for at least 30 passages (Greiffenberg *et al.*, 1998). Both HBMEC lines were maintained in RPMI 1640 (Gibco, Burlington, ON) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (HyClone Laboratories, Logan, UT), 10% (v/v) NuSerum (BD Bioscience, Mountain View, CA), and endothelial cells growth supplement (30 µg/mL). Cells were cultured at 37°C under a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Hypoxia treatments were made in a Biospherix hypoxic chamber (Parish, NY). The cells were maintained for different periods of time under 1% oxygen, 5% CO₂, at 37°C in a humidified atmosphere.

3.5.3 Immunofluorescence

Cells were grown on coverslips to 80% confluence and then treated for 48 hours (24h alone, then 24h with 50nM Angiopep-2-AlexaFluor488). The coverslips were incubated 1 hour with 500 nM LysoTracker Red DND-99, then incubated in 4% formaldehyde (Fisher Scientific, ON) for 20 minutes. The cells were further incubated for 1 hour with 10 µg/ml DAPI. The coverslips were then washed 3 times in PBS and laid down on microscope slides using ProLong Gold Antifade Reagent from Invitrogen (Carlsbad, NM). The samples were viewed under a Nikon Eclipse Ti Confocal microscope using NIS Elements software. Three random fields were acquired for each condition and analyzed with the Image J software (NIH). The colocalization ratio of green and red was quantified.

3.5.4 Immunoblotting procedures

Proteins from control and treated cells were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). After electrophoresis, proteins were electrotransferred to polyvinylidene difluoride membranes which were then blocked for 1 hour at room temperature with 5% non-fat dry milk in Tris-buffered saline (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5) containing 0.1% Tween-20 (TBST). Membranes were further washed in TBST and incubated with the primary antibodies in TBST containing 3% bovine serum albumin and 0,05% NaN₃ followed by a 1 hour incubation with horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (1/5000 dilution) in TBST containing 5% non-fat dry milk. Immunoreactive material was visualized by enhanced chemiluminescence (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC).

3.5.5 Binding and uptake of Angiopep-2

Cells were cultured as described with 20% or 1% of oxygen. Cells were wash 3 times with Ringer-Hepes buffer before being incubated with 250 nM of An2-Alexa Fluor 488® from 0 to 60 minutes at 4°C for the binding assay and at 37°C for the uptake assay. Cells were then washed 3 times in a PBS 1X- BSA 5%-EDTA 2mM solution. Fluorescence data were collected using a BD Accuri™ C6. Data were analyzed with BD Accuri™ C6 software.

3.5.6 Immunophenotyping

Cells were detached using PBS-citrate, then resuspended in a PBS-FBS 1%-NaN₃ 0,05% buffer. For the **non-permeabilized** cell condition: Resuspension was performed in PBS-FBS-NaN₃ with either antibodies, rabbit IgG, mouse IgG, anti-SDC2, anti-SDC4 and anti-Sortilin, for 30 minutes at room temperature. Cells were washed with PBS-FBS-NaN₃. They were incubated with secondary antibody, anti-mouse-AF488, anti-rabbit-AF488 (1:1000). Cells were lastly washed in PBS-FBS-NaN₃ and immunophenotyping performed with a BD Accuri™ C6. For the

permeabilized cell condition: cells were fixed in 1% paraformaldehyde for 20 minutes in the dark, permeabilized in 0,1% Triton X-100 for 5 minutes, then washed in PBS-FBS-NaN₃-Triton. The same manipulations as for the non-permeabilized cells were performed for primary and secondary antibody incubations and the event recording. Anti-LRP1-PE antibody and its IgG-PE were directly incubated 1 hour in the dark, for both protocols.

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

Total RNA was extracted from U87, HBMEC and HBMEC-SV40 monolayers using TriZol reagent (Life Technologies, Gaithersburg, MD). For cDNA synthesis, 1 µg of total RNA was reverse transcribed using a high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). cDNA was stored at -20°C prior to PCR. Gene expression was quantified by real-time quantitative PCR using SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA). DNA amplification was carried out using a CFX Connect Real-Time System (Bio-Rad, Hercules, CA) and product detection was performed by measuring binding of the fluorescent dye SsoFast™ EvaGreen® to double-stranded DNA. The following QuantiTect human primers were obtained from Qiagen (Valencia, CA) : LRP1 (QT00025536), SDC1 (QT00037128), SDC2 (QT00001001), SDC3 (QT00036386), SDC4 (QT01008126), SORT1 (QT00073318), SORL1 (QT00046830), VEGFA (QT01682072), SLC2A1 (QT00068957). The relative quantities of target gene mRNA were compared against human RPS18 (QT02323251) and RPS28 (QT02310203) internal mRNA controls, and were measured by following a ΔC_t method employing an amplification plot (fluorescence signal vs. cycle number) and obtaining a cycle threshold (C_t). The difference (ΔC_t) between the mean values in the triplicate samples of the target gene and those of RPS18 and RPS28 mRNAs were calculated by CFX Manager™ Software version 3.1 (Bio-Rad, Hercules, CA) and the normalized expression ($\Delta\Delta C_t$) was quantified.

3.5.8 Statistical data analysis

Data are representative of three or more independent experiments. Statistical significance was assessed using Student's unpaired *t*-test. One-way ANOVA with a post hoc Bonferroni test was performed for figure 2B. One-way ANOVA with a post hoc Dunnett test was performed for figure 2A and 4. Probability values of less than 0.05 were considered significant and an asterisk (*) identifies such significance in each figure.

3.6 Results

3.6.1 Differential Angiopep-2 cell surface binding and uptake between brain cancer cells and brain microvascular endothelial cells.

We first aimed at delineating the phenotypic *in vitro* cellular signature that characterizes An2 recognition and internalization in brain vascular and tumoral compartment. Glioblastoma-derived U87 cells, as well as HBMEC and SV40-transformed HBMEC (HBMEC-SV40) were used to assess An2 binding and uptake. In all cell models, An2 was found to bind at the cell surface and to be internalized in a time-dependent manner (Fig.3.1A-B). An2 cell surface binding process was however found to be more efficient in HBMEC than in HBMEC-SV40 or U87 cells (Fig.3.1A). On the other hand, when An2 internalization was assessed, we rather observed that uptake was more efficient in U87 and HBMEC-SV40 than in HBMEC (Fig.3.1B). Intracellular trafficking of An2 was also compared between the three cell models used. A marked increased co-localization of An2 within late endosomes/lysosomes was observed in U87 glioma cells as well as within HBMEC-SV40 cells, but not in normal HBMEC (Fig.3.1C). Given that transformed HBMEC-SV40 are suggested to be the *in vitro* cellular model that best represents brain tumor vascular cells, one can hypothesize that they acquired some properties similar to those from brain tumor-derived endothelial cells present within a hypoxic solid tumor microenvironment.

3.6.2 Hypoxia triggers LRP1 expression, and Angiopep-2 binding and uptake in U87 glioblastoma cells.

In order to assess the impact of low oxygen tension on HBMEC, HBMEC-SV40, and U87 glioblastoma cells' capacity to internalize An2, cells were cultured under normoxic (20% O₂) or hypoxic (1% O₂) conditions for 24-48 hours. Hypoxic conditions were validated through the significant induction of VEGF (Fig.3.2A) and

GLUT1 (Fig.3.2B) transcript levels in all tested cells, indicating that they all effectively responded to low oxygen tension conditions. Under hypoxic conditions, An2 cell surface binding was increased in HBMEC and U87 glioma cells, but not in HBMEC-SV40 cells (Fig.3.2C). When An2 uptake was assessed under hypoxic conditions, it was only found increased in U87 glioma cells (Fig.3.2D). Using LysoTracker® Red DND-99 cell labeling, hypoxia did not alter late endosomes/lysosomes formation within the cells (data not shown), whereas it rather triggered the An2 receptor low-density lipoprotein receptor-related peptide (LRP1) gene (Fig.3.2E) and protein expression (Fig.3.2F) in U87 glioma cells but not in HBMEC or HBMEC-SV40 cells. Altogether, these observations suggest that an important molecular adaptation occurs in response to low oxygen tension culture conditions allowing U87 glioma cells to better recognize and internalize An2. Such adaptive intracellular trafficking regulation of An2 is independent from increased targeting to lysosomes and does not seem to occur in transformed HBMEC-SV40.

3.6.3 Differential gene expression profiling of intracellular trafficking and compartmentalization of molecular players in brain cancer and brain endothelial cells.

While An2 cell surface recognition and subsequent internalization is believed to partially involve LRP1 (Bertrand *et al.*, 2011 ; Demeule *et al.*, 2008a), the mechanistic stages allowing increased An2 cell internalization and intracellular trafficking under hypoxia remain poorly understood. Transcriptomic analysis of the basal expression levels of LRP1 was therefore performed, as well as of intracellular compartmentation molecular players including the Syndecan-1 to -4 proteoglycans, the Vps10p-D Sortilin, SorLA, and the SorCS protein families. Their combined functions are believed to control the intracellular trafficking of numerous ligands in gliomas (Choi, Kang et Oh, 2013 ; Iozzo et Sanderson, 2011 ; Leonova et Galzitskaya, 2013 ; Watanabe, 2005) as well as in the central nervous system

(Hermeij, 2009). We found that LRP1, Syndecan-1 and Syndecan-2 were highly expressed in U87 and HBMEC, when compared to HBMEC-SV40 (Fig.3.3). We also observed lower expression of Syndecan-3 in U87 and HBMEC-SV40 in contrast to HBMEC, which Syndecan-3 levels were higher (Fig.3.3). Syndecan-4 expression remained equivalent between all three cell lines tested (Fig.3.3). Low expression levels of Sortilin were measured in U87 cells, while SorLA was significantly expressed in HBMEC-SV40 (Fig.3.3). The SorCS members were not significantly expressed in either cell lines tested (data not shown). Such differential expression profiling between the cell types suggests that important modulation of the respective encoded molecular players may impact on the processes of recognition and intracellular compartmentation of An2.

3.6.4 Transcriptional impact of hypoxia on intracellular trafficking and compartmentalization of cell surface receptors in brain cancer and brain endothelial cells.

Increased LRP1-mediated binding/uptake of An2 in hypoxic U87 cells was further explored. Increases in Syndecan-2 and -4 gene expression were observed upon hypoxia in U87 glioma cells (Fig.3.4A), whereas only Sortilin gene expression was induced in HBMEC (Fig.3.4B). No transcriptional regulation was observed in any of the Syndecan or Sortilin genes in HBMEC-SV40 (Fig.3.4C). These results suggest that the Syndecans may represent good candidates for An2 intracellular trafficking within the brain tumor cell compartment, and that Sortilin may rather be involved in the endocytosis process of LRP1-mediated An2 trafficking within the brain microvascular endothelial cell compartment. Immunophenotyping was next performed by flow cytometry to assess the impact of hypoxia on their cell surface and intracellular expression, and on the potential regulation of LRP1-mediated An2 internalization process.

3.6.5 LRP1-mediated Angiopep-2 compartmentation upon hypoxia is dictated through differential Syndecan-2, Syndecan-4, and Sortilin expression.

U87 and HBMEC cells were assessed for basal expression of cell surface and intracellular levels of LRP1, Syndecan-2, Syndecan-4 and Sortilin proteins. We observed that LRP1 and Syndecan-4 expressions were mostly found at the cell surface of U87 cells (Fig.3.5A), whereas LRP1 expression was evenly distributed between intracellular compartments and the cell surface in HBMEC (Fig.3.5B). Higher expression of Syndecan-2 in U87 cells (Fig.3.5A) and of Sortilin-1 in HBMEC was observed (Fig.3.5B). When cells were cultured under hypoxic conditions, LRP1 and Syndecan 4 expression levels shifted from cell surface to intracellular compartments in U87 cells (Fig.3.5A). The impact of hypoxia was different in HBMEC, where LRP1 levels decreased within the intracellular compartment while they remained unchanged at the cell surface (Fig.3.5B). In contrast to LRP1, Sortilin-1 was found to shift from intracellular to cell surface upon hypoxia in HBMEC (Fig.3.5B). Altogether, our data highlight a dynamic adaptive compartmentation of LRP1-mediated An2 uptake processes, and suggests that An2 trafficking from cell surface to intracellular compartments requires specific sorting molecular players, and is differentially regulated between the cancer and the vascular compartments.

3.7 Discussion

Hypoxia is a well known hallmark that contributes to resistance of solid tumors with invasive phenotype to therapy. Accordingly, targeting hypoxic biomarkers could represent a logical avenue for the treatment of high grade tumors, such as glioblastomas (Cavazos et Brenner, 2015 ; Wilson et Hay, 2011). In brain cancer, hypoxia occurs when the BBB is disrupted due to abnormal and disorganized vasculogenesis into the tumoral site (Wolburg *et al.*, 2012). Many proteins and receptors are regulated under hypoxia to counteract the aberrant vascularisation and help the tumor to survive (Justus, Sanderlin et Yang, 2015 ; Shannon *et al.*, 2003). As such, it is of interest to discover new ways to deliver therapeutic drugs across the BBB up to the tumoral site and target the cancer cell compartment without affecting healthy cells. In this study, we analyzed the effect of hypoxia on the recognition and internalization mechanisms of An2 in brain endothelial and glioblastoma cells. We report a differential binding and uptake of An2 between normal and transformed brain endothelial cells, as well as glioblastoma cells. Since they have different features and roles in the progression of the tumor, this is in part explained by differentially activated binding and uptake mechanisms involving cell surface and intracellular trafficking proteins.

Considering the intrinsic hypoxic state of tumoral cells, it is with great interest that we found that low oxygen tension positively modulated An2 sorting (recognition and internalization) processes in U87 cells. This means that under hypoxia, U87 cells have an enhanced capacity to bind and internalize An2. This suggests that one can deliver any An2-drug conjugate into the cells and help abolish tumoral progression. However, before reaching the tumoral compartment, An2 needs to transcytose through the microvascular endothelial compartment. Thus, we documented HBMEC's capacity to recognize and internalize An2 in normoxic basal conditions but we also observed that hypoxia specifically enhanced the ability of HBMEC to

bind An2. Without LRP1 expression induction under hypoxia, there should be other proteins responsible for An2 binding induction as endocytic mechanisms require receptors and/or formation of vesicles. Unlike HBMEC, hypoxic U87 cells showed increased levels of LRP1, the first known receptor for An2. Given that approximately 50% of An2 can be recognized by LRP1 (Bertrand *et al.*, 2010), we sought to investigate the potential receptors responsible for the remaining part. Hypoxia is known to regulate tyrosine kinase receptors signaling through endocytosis (Wang et Ohh, 2010), but we found that in U87 cells, An2 sorting could be mediated by LRP1, Syndecan-2 (SDC2) and Syndecan-4 (SDC4) since these genes were upregulated under hypoxic conditions. Furthermore, they could be compartmentalized in order to increase their efficiency to process An2. Syndecans are heparin sulfate proteoglycans (HSPG) integrated into the cell membrane and are known to interact with extracellular matrix proteins and integrins (Leonova et Galzitskaya, 2013). They also interact with growth factors receptors such as FGFR, PDGFR, VEGFR and TGFR, and have an important role in angiogenesis (De Rossi et Whiteford, 2014). In 2003, the role of syndecans as plasma membrane carriers was highlighted as they can mediate ligand internalization either independently or in concert with LRP1 (Belting, 2003). The nature of the proteoglycan were also found to dictate the outcome of the syndecan which can act in plasma membrane shedding, intracellular signaling and lysosomal degradation (Belting, 2003). Under oncogenic situation, it has been shown that hypoxia leads to integrin and FGFR membrane localization (Wang et Ohh, 2010). Here we show that under hypoxia, SDC2 and SDC4 are upregulated in U87 cells suggesting a correlated role with or without LRP1 in An2 sorting processes. Altogether, binding and uptake of An2 may be envisioned to occur upon a cooperation work between a SDC and LRP1 or between the two SDCs.

In the case of HBMEC, we found that Sortilin was upregulated under hypoxia. Sortilin is a Vps10p domain transmembrane protein also known as Neurotensin receptor-3 (NT3) (Sarret *et al.*, 2003). It is a sorting receptor implicated in transgolgi

network (TGN) and mediates endocytosis. Sortilin is normally internalized via clathrin-coated pits before delivering their ligands to the lysosomes and transport cargos from the TGN to endosomes (Wahe *et al.*, 2010). It has been shown that receptor-associated protein RAP, an inhibitor of ligand interaction with the LDL receptor family (Bu, 2001), binds to sortilin (Hermeij, 2009). Knowing that sortilin is present at 5 to 10% at the cell surface on which the protein is able to bind and internalize external ligands (Mazella et Vincent, 2006), its induction by very low oxygen levels may, in part, contribute to enhanced binding of An2 in HBMEC. Moreover, as predicted, we observed higher levels of intracellular Sortilin in each cell type independently of oxygen levels. Nonetheless, we were able to measure a higher pool of Sortilin at the hypoxic HBMEC membrane resulting in a better binding of An2.

The tumor microenvironment is very harsh on the cells as it triggers HIF1 α -mediated activity, the acidification of the environment, the triggering of inflammatory processes, altogether resulting in a resistance to therapy behavior (Candido et Hagemann, 2013 ; Wojtkowiak *et al.*, 2011 ; Zeng *et al.*, 2015). Among these stressful cancerous characteristics, the hypoxic state of solid tumor incoming from a defective vasculature clearly is useful to increase An2 sorting processes. To date, there is no treatment for brain cancer and survival is less than one year after diagnosis (Dubois *et al.*, 2014). Radiotherapy combined with chemotherapy using temozolomide is until now the most significant advance to treat the symptoms of brain cancer which location makes it difficult to treat (Cavazos et Brenner, 2015 ; Yang, Zhou et Lin, 2014). Understanding the mechanisms underlying the sorting processes of therapeutic peptides-drug conjugate capable of crossing the BBB is a significant step towards a longer patient survival and even a future for building a treatment. In order to develop the most effective drug carrier strategy, it is even more important to better understand the adaptive behavior of each cell type (endothelial and astrocyte) composing the BBB and forming part of the tumor. Since they

normally interact to form the BBB, they both have their respective transport system which includes entry mechanisms and drug resistance processes (Abbott, Ronnback et Hansson, 2006). Therefore, we report significant phenotypic changes between these cell types in the recognition and internalisation of An2. Additionally, these differences were observed when the cells were submitted to stressful culture conditions as in low oxygen tension (Fig.3.6). As such, the hypoxic state affected both cell types and made them to recognize An2 better. In conclusion, hypoxia enhanced receptors expression and sorting processes brings a novel and promising approach for using An2 conjugate in the treatment of grade IV glioblastoma.

3.8 Acknowledgements

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). AV is a Fonds de recherche du Québec - Nature et technologies (FRQNT) awardee. JP is a NSERC awardee.

3.9 Figures

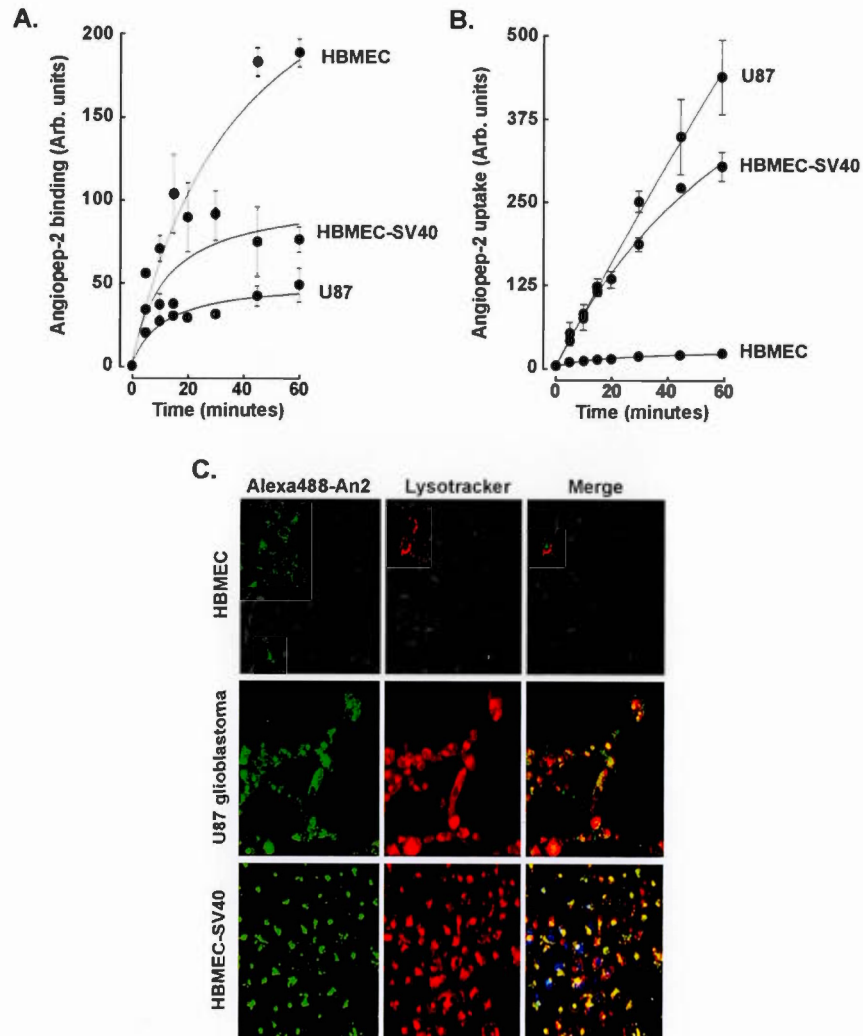


Figure 3.1 Angiopep-2 cell surface binding, uptake, and intracellular sorting in brain tumor cells and brain microvascular endothelial cells.

An2 binding (A) and uptake (B) experiments were performed with 250 nM of AlexaFluor-488 labeled An2. Events were measured by flow cytometry. Data are expressed as mean \pm SD. (C) Cells were incubated with Lysotracker Red DND-99 and An2-AF488, and fluorescence measured by confocal microscopy. Cellular trafficking of An2 within lysosomes was monitored through a colocalization of AF488 and Red DND-99.

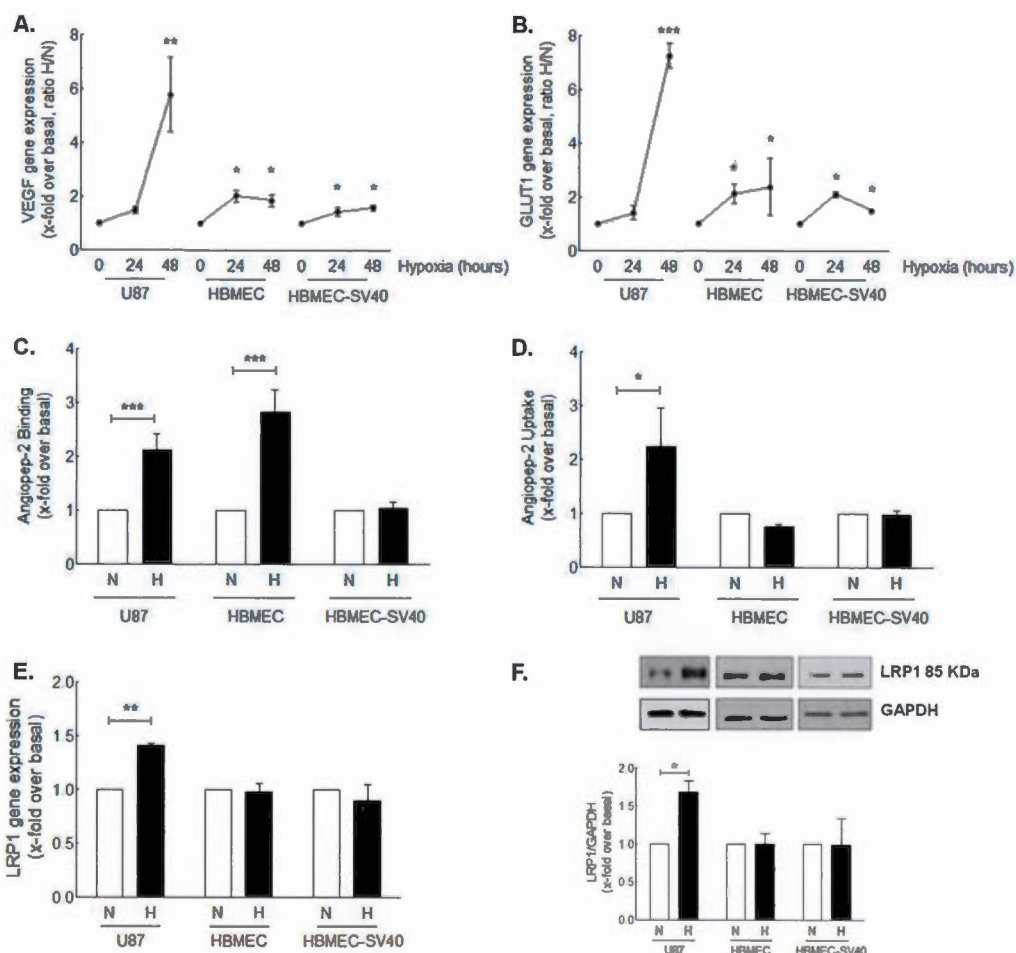


Figure 3.2 Hypoxia differentially modulates An2 binding, uptake, and sorting between U87 and HBMEC.

Cells were incubated in an environment containing 20% O₂ (N) or 1% O₂ (H) for 48h, and transcript levels of VEGF (A) and GLUT1 (B), two important hypoxia biomarkers, were measured. An2 binding (C) and uptake (D) were assessed in U87, HBMEC, and HBMEC-SV40 as described in the Methods section. LRP1 gene (E) and protein (F) levels were assessed by qRT-PCR. Data present 3 or more experiments and are expressed as mean ± SEM.

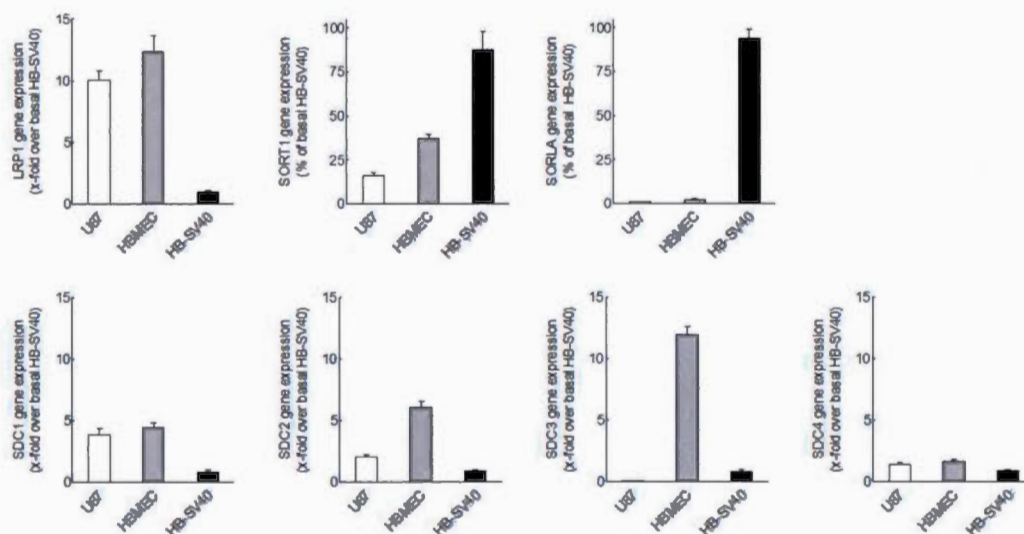


Figure 3.3 Differential gene expression of LRP1, HSPG, and Vps10p-D between brain tumoral and brain endothelial cells.

U87, HBMEC, and HBMEC-SV40 were cultured as described in the Methods section. Total RNA was extracted from the cells before being reverse transcribed into cDNA, and then being analyzed by qRT-PCR using specific primer sequences. Data present 3 or more experiments and are expressed as mean \pm SEM.

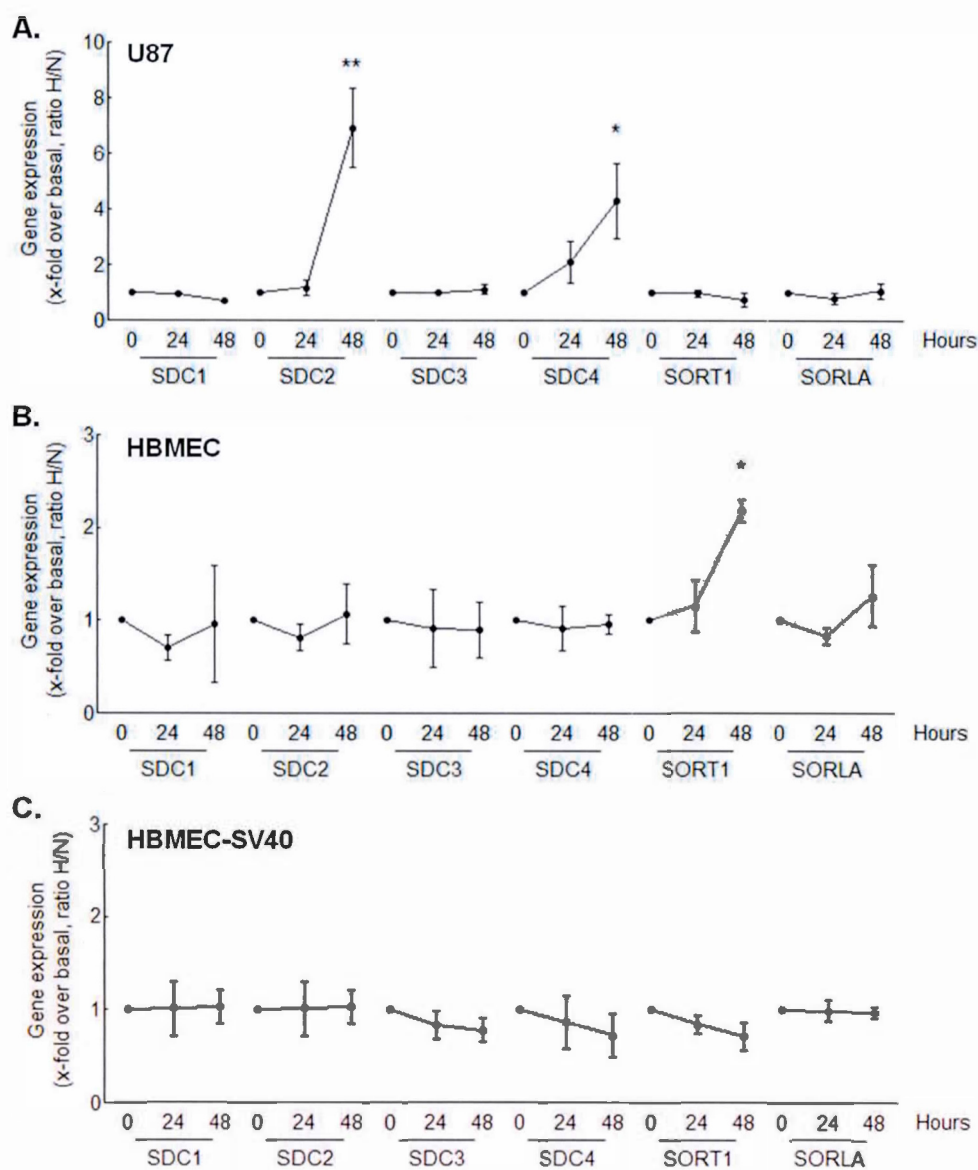


Figure 3.4 Transcriptional impact of hypoxia on molecular players in An2 sorting in tumoral and endothelial cells.

U87 (A), HBMEC (B), and HBMEC-SV40 (C) were cultured under normoxic or hypoxic conditions. Total RNA was extracted from the cells before being reverse transcribed into cDNA, and then being analyzed by qRT-PCR using specific primer sequences. Data present 3 or more experiments and are expressed as mean \pm SEM.

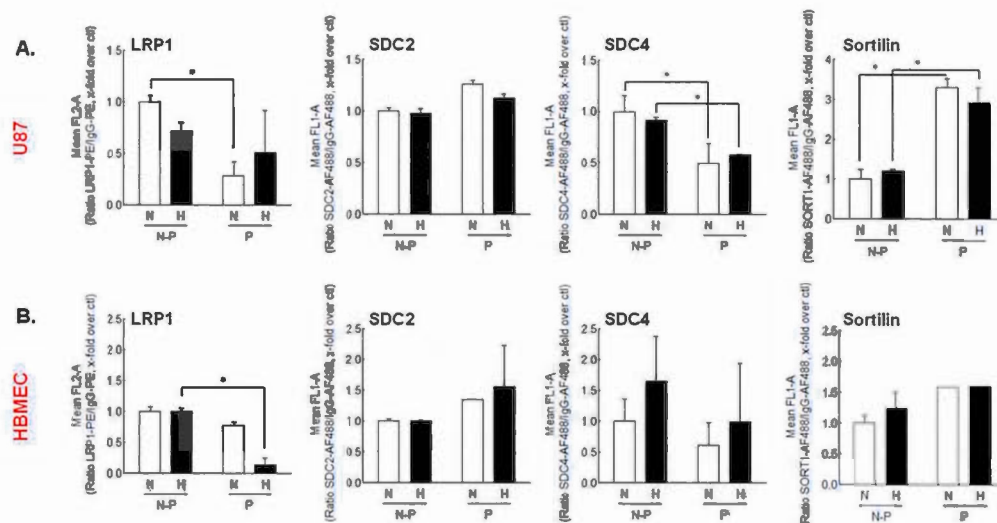


Figure 3.5 Compartmentation of proteins having a role in An2 sorting.

Cell lines were cultured either under normoxia (20% O₂) or hypoxia (1% O₂). As described in Methods section, cells were incubated with specific primary antibodies tagged either with PE or AlexaFluor488 following the non-permeabilized cells protocol or the permeabilized cells protocol. Compartmentalization of cell surface receptors was measured by flow cytometry. A) U87 compartmentation of LRP1, SDC2, SDC4 and Sortilin. B) HBMEC compartmentation of LRP1, SDC2, SDC4 and Sortilin. Data present 3 or more experiments and are expressed by mean FL2A ± SEM. H: hypoxia; N: normoxia; N-P: non-permeabilized; P: permeabilized; SORT1 = Sortilin.

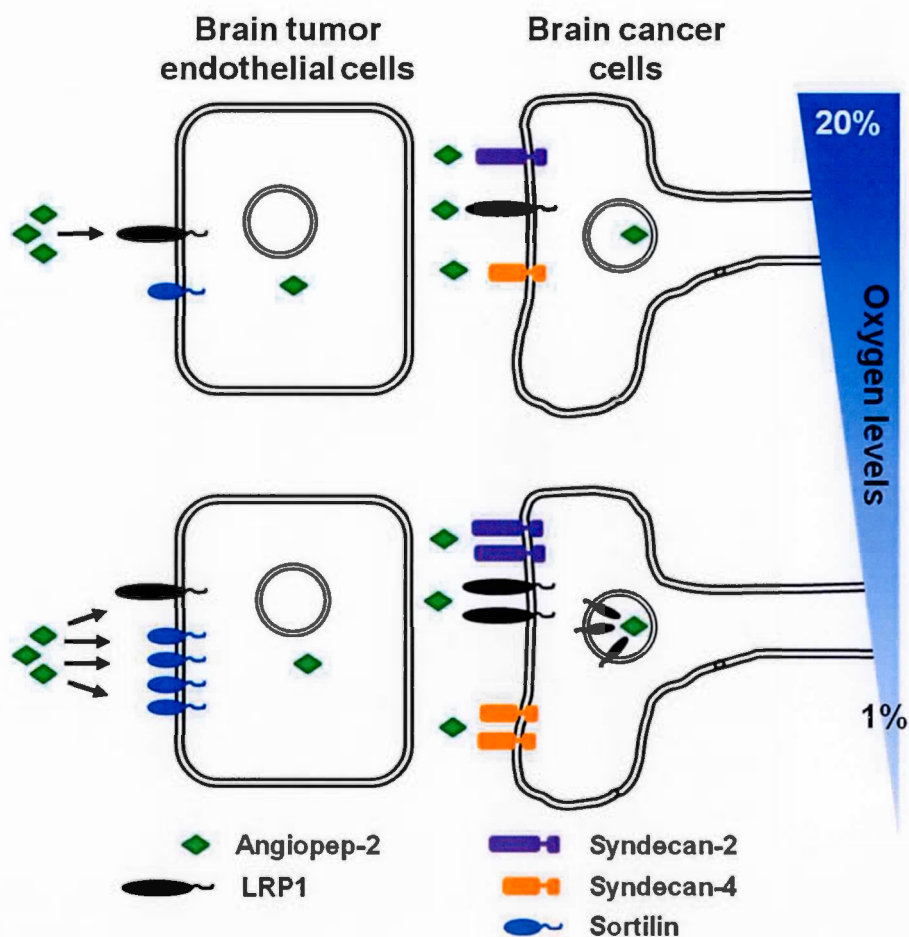


Figure 3.6 Schematic impact of hypoxia on compartmentation of enhanced sorting An2 proteins.

In endothelial cells, LRP1 and Sortilin are expressed at the cell membrane in normoxic conditions, while Sortilin is overexpressed at the membrane under low oxygen levels. In glioblastoma cells, SDC2 and SDC4 are expressed at the cell membrane under high levels of O_2 , but their pool is upregulated when oxygen is depleted. LRP1 is highly expressed at the membrane of normoxic brain tumor cells, but becomes even more expressed intracellularly under low oxygen tension.

CHAPITRE IV

LRP1 CONTROLS CEREBROVASCULAR ANGIOGENIC REPROGRAMMING: IMPACT ON SPHINGOSINE-1-PHOSPHATE-MEDIATED SIGNALING IN BRAIN ENDOTHELIAL CELLS MIGRATION

Amélie Vézina, Cyndia Charfi, Alain Zgheib, Borhane Annabi
Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Département de Chimie, Centre de Recherche
BioMed, Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, Canada.

2016

Soumis à *The Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*

4.1 Avant-Propos

Les travaux présentés dans ce chapitre répondent au deuxième objectif de cette thèse. Le but était de mieux comprendre le rôle de la protéine LRP1 dans la migration des cellules HBMEC en réponse à la S1P. Cela nous a permis de caractériser le lien qui existe entre la protéine LRP1 et la signalisation de la S1P via ses récepteurs couplés aux protéines G. Les résultats montrent que la réponse migratoire des HBMEC à la S1P est dépendante de LRP1 et de S1P₃. De plus, nous avons identifié un caractère adaptatif des cellules endothéliales consécutif à la répression stable de LRP1 *in vivo* et *in vitro*.

J'ai contribué à la conception de l'étude et à toutes les expériences et leurs analyses subséquentes. Cyndia Charfi a mis au point les lignées cellulaires HBMEC-SV40 WT et LRP1^{-/-}. Sous ma supervision, Alain Zgheib a effectué les expériences de migration cellulaire. Alain Zgheib était responsable de la colonie de souris. J'ai maintenu les cellules en culture et j'ai procédé à l'isolation des cellules à partir des cerveaux de souris. La rédaction de l'article, l'interprétation des résultats, le montage des figures, l'analyse statistique et les révisions finales du manuscrit ont été faits par moi-même et par le professeur Borhane Annabi. Les références de l'article sont présentées à la fin de la thèse dans la bibliographie générale.

Les résultats ont été présentés sous forme de communication orale ou par affiche dans les congrès suivants :

VÉZINA A, Charfi C, Zgheib A, Annabi B. (2016) Adaptive mechanisms upon LRP1 repression : Impact on sphingosine-1-phosphate-mediated signaling and migration of brain endothelial cells. *Congrès Annuel de l'Association Américaine pour la Recherche sur le Cancer (AACR) (Nouvelle-Orléans, Louisiane, États-Unis)* Affiche #3364.

VÉZINA A, Charfi C, Zgheib A, Annabi B. (2016) La protéine LRP1 régule la migration et la signalisation médiées par la sphingosine-1-phosphate dans les cellules endothéliales cérébrales. *Colloque Annuel du Centre de Recherche BioMed (Laval, QC, Canada)*. Oral #2.

VÉZINA A, Charfi C, Zgheib A, Annabi B. (2016) Mécanismes adaptatifs et impact de LRP1 sur la migration des cellules endothéliales cérébrales en réponse à la sphingosine-1-phosphate. *84^e Congrès Annuel de l'ACFAS (Montréal, QC, Canada)*. Oral #4, Session Cancer : Étude des mécanismes.

4.2 Résumé

Le métabolisme des sphingolipides est associé à la transformation oncogénique et un rôle de la *low density lipoprotein receptor-related protein* (LRP1) a été démontré dans la signalisation pro-angiogénique de la sphingosine-1-phosphate (S1P). Bien que la S1P joue un rôle clé dans la perméabilité de la barrière hématoencéphalique (BHE), sa signalisation interdépendante avec LRP1 dans les cellules endothéliales cérébrales (Plateel, Teissier et Cecchelli) demeure peu connue. Nous émettons l'hypothèse que des mécanismes adaptatifs altérant l'axe LRP1/S1P soient requis dans les CEC microvasculaires humaines (HBMEC) immortalisées par le virus SV40, un modèle imitant le phénotype de l'endothélium tumoral cérébral. Des lignées de HBMEC-SV40 réprimant LRP1 de façon transitoire ou stable ont été générées et la diminution de l'expression génique de la protéine de liaison activatrice/CCAAT β (C/EBP β), un facteur transcriptionnel régulant l'expression des récepteurs de la S1P, a été observée dans les cellules stables. Les processus de migration sont altérés et les récepteurs de la S1P modulés par une répression stable de LRP1 *in vivo* dans des CEC isolées de souris *Lrp1(CE)^{-/-}* et *in vitro* dans les HBMEC *LRP1^{-/-}*. De plus, le récepteur S1P₃ est nécessaire à la migration des HBMEC. Enfin, la surexpression de LRP1 rétablit la réponse migratoire des HBMEC à la S1P, ainsi que les niveaux d'expression génique de S1P₃. Collectivement, nos résultats mettent en évidence un phénotype adaptatif liant LRP1 à la signalisation de la S1P, rendant possible le ciblage de l'axe de signalisation LRP1/S1P à la BHE pour de futures stratégies thérapeutiques.

Mots clés : barrière hématoencéphalique, cellules endothéliales cérébrales, LRP1, Sphingosine-1-phosphate, angiogénèse.

4.3 Abstract

Switches in sphingolipid metabolism have recently been associated with oncogenic transformation, and a role for the low density lipoprotein receptor related protein 1 (LRP1) in sphingosine-1-phosphate (S1P) proangiogenic signaling inferred. Although S1P is a key determinant in blood-brain barrier (BBB) permeability, its signaling crosstalk with LRP1 in brain endothelial cells (EC) remains unclear. Here, we assessed whether any adaptive S1P/LRP1 interdependence mechanisms are required in SV40-immortalized human brain microvascular EC (HBMEC), a model which closely mimics the brain tumor endothelium phenotype. Transient *in vitro* LRP1 gene silencing and stable LRP1^{-/-} HBMEC were compared. We observed decreased expression of CCAAT/enhancer binding protein β (C/EBP β), a transcription factor which multiple binding sites were found within the promoter sequences of all five S1P receptor members, upon stable but not transient LRP1 repression. Chemotactic migration of brain EC isolated from *Lrp1*(EC)^{-/-} mice and of stable LRP1^{-/-} HBMEC became unresponsive to S1P, partly explained by altered ERK and p38 MAPK pathways, whereas it remained unaltered upon transient *in vitro* LRP1 repression. Adaptive diminished S1P1, S1P3, and S1P5 expressions were observed in stable LRP1^{-/-} HBMEC and in brain EC isolated from *Lrp1*(EC)^{-/-} mice. Overexpression of LRP1 cluster IV rescued S1P-mediated cell migration through S1P3 transcription increase in LRP1^{-/-} HBMEC. Collectively, our study highlights an adaptive signaling crosstalk between LRP1 and specific S1P receptors which could regulate the angiogenic response of brain EC. Targeting of the S1P/LRP1 signaling axis at the BBB may thus be envisioned in future therapeutic strategies.

Keywords: blood-brain barrier, brain endothelial cells, LRP1, Sphingosine-1-phosphate, angiogenesis.

4.4 Introduction

Glioblastomas (GBM) are highly angiogenic tumours with important metabolic reprogramming that enable them to efficiently use altered metabolic enzymes and their oncogenic metabolites (Agnihotri et Zadeh, 2016). Reprogramming of metabolism in cancer cells includes changes in the expression of genes that directly control the rate of key metabolic pathways such as glycolysis, lipogenesis and nucleotide synthesis, which are dysregulated upon the adaptation and progression of tumor cells towards more aggressive phenotypes (Pavlova et Thompson, 2016). While metabolic shifts, such as towards aerobic glycolysis known as the Warburg effect, are relatively well characterized in the cancer cell compartment (Palsson-McDermott et O'Neill, 2013), our knowledge concerning the adaptive mechanisms taking place at the blood-brain barrier (BBB) and specifically within the cerebrovascular endothelial cell (EC) compartment remains extremely limited.

Among the growth factors- and cytokines-mediated angiogenic cues released from brain cancer cells and which impact the cellular functions of the BBB and of the tumour microenvironment, sphingosine-1-phosphate (S1P) is a pleiotropic lipid mediator regulating cell survival, migration, recruitment of immune cells, angiogenesis, and lymphangiogenesis, all processes involved in cancer progression (Pyne *et al.*, 2012). A shift towards increased S1P synthesis is, in fact, observed in GBM (Quint *et al.*, 2014), and results in tumor cell survival and resistance to chemotherapy. High expression in sphingosine kinase (SphK), the enzyme responsible for transforming sphingosine into S1P, was proved to correlate with poor survival of patients with GBM (Van Brocklyn, 2007). Furthermore, the use of maintenance therapy with a SphK inhibitor, in patients with GBM who had tumor reduction or stable disease after therapy, has been investigated (Nagahashi *et al.*, 2014 ; Noack *et al.*, 2014 ; Sordillo, Sordillo et Helson, 2016 ; Van Brocklyn *et al.*, 2005). Particularly, proliferation of GBM cell lines was decreased and apoptosis was

increased under SphK inhibitor treatment (Van Brocklyn *et al.*, 2005). It also has been shown to be an efficient death inducer *in vivo* in murine and human GBM and to enhance temozolomide treatment (Noack *et al.*, 2014).

Metabolic reprogramming is also observed in response to increased cell proliferation and growth and during high turnover of cell cholesterol for membrane growth (Munoz-Pinedo, El Mjiyad et Ricci, 2012). Cells requiring cholesterol for membrane synthesis take up plasma LDL, the main cholesterol carrier in blood, via receptor-mediated endocytosis (Goldstein et Brown, 2009). The latter is thought to involve elevated LDL receptor levels in rapidly growing tumor cells (Firestone, 1994). Overall, high expression of LDL receptors on numerous glioblastoma cells could potentially be useful for targeting of antitumor agents (Maletinska *et al.*, 2000). Interestingly, LRP1 has been reported to serve as a receptor-mediated transcytosis intermediate for drug delivery across the BBB by binding to the targeting ligand Angiopep-2 (Gabathuler, 2010 ; Srimanee *et al.*, 2016). Recently, switches in sphingolipid metabolism have been associated with oncogenic transformation, and a role for LRP1 in S1P proangiogenic signaling has been inferred. The existence of a S1P/LRP1 signaling crosstalk remains however to be investigated. Moreover, LRP1 was identified to interact with the sphingolipid signaling complex and to promote vascular development of vascular smooth muscle cells (Nakajima *et al.*, 2014). Among its modulation of transmembrane proteins, the molecular basis of LRP1's interaction with the sphingolipid signaling complex remains less well understood in the context of brain tumor driven angiogenesis.

The purpose of this study was to examine whether any adaptive S1P/LRP1/S1P receptors interdependence mechanisms is required in the regulation of brain EC migration. We compared cell migration in response to S1P in cells with transiently silenced *Lrp1* to a stable shRNA-mediated LRP1^{-/-} human brain microvascular EC model. We also analyzed the adaptive transcriptional crosstalk between LRP1 and

specific S1P receptors in murine brain EC isolated from *Lrp1*(EC)^{-/-} mice. Collectively, our study will enable us to highlight whether any adaptive transcriptional crosstalk links LRP1 to specific S1P receptors which account for S1P signaling in brain EC. A better understanding of the S1P/LRP1 signaling axis at the BBB may ultimately lead in the design of targeted anti-angiogenic strategies.

4.5 Material and methods

4.5.1 Materials

Sodium dodecylsulfate (SDS) and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma (Oakville, ON). Electrophoresis reagents were from Bio-Rad (Mississauga, ON). The enhanced chemiluminescence (ECL) reagents were from Perkin Elmer (Waltham, MA). Micro bicinchoninic acid protein assay reagents were from Pierce (Rockford, IL). The antibodies against phospho-ERK1/2 (4377), phospho-JNK (9251), phospho-p38 MAPK (9211), ERK1/2 (9107), JNK (9252), and p38 MAPK (9212) were all purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, MA). S1P and lysophosphatidic acid (LPA) were from Sigma-Aldrich Canada.

4.5.2 Cell culture

The human brain microvascular endothelial cells (HBMEC) were immortalized by transfection with simian virus 40 large T antigen and maintained their morphological and functional characteristics for at least 30 passages (Greiffenberg *et al.*, 1998). HBMEC were maintained in RPMI 1640 (Gibco, Burlington, ON) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS, HyClone Laboratories, Logan, UT), 10% (v/v) NuSerum (BD Bioscience, Mountain View, CA), and EC growth supplement (30 µg/mL). Human *Lrp1* gene silencing within HBMEC was performed using the pcDNATM6.2-GW/EmGFP-miR vector system where a specific human *Lrp1*-shRNA was cloned (Hmi409872_top_LRP1 and Hmi409872_bot_LRP1; Invitrogen). Cells were transfected with this construct or with the empty vector using the lipofectamine reagent (Invitrogen) and selected 48 hours later with 6 µg/mL Blasticidin. Resistant clones were isolated and the silencing of LRP1 expression was validated by Western blot and qPCR. GFP-HBMEC and LRP1^{-/-} (GFP, clone 4.3)-HBMEC were maintained in RPMI 1640 supplemented with 10% (v/v) FBS, 10% (v/v) NuSerum,

EC growth supplement (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and blasticidin S (12 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Cells were cultured at 37°C under a humidified atmosphere containing 5% CO_2 .

4.5.3 Mouse brain endothelial cell isolation

All animal experiments were evaluated and approved by the Institutional Committee for Good Animal Practices (UQAM, Montreal, QC). Genotyped C57/BL6 *Lrp1*(EC)^{-/-} mice were obtained through breeding of Tie2-Cre LRP1 (B6;129S7-Lrp1^{tm2Her/J}) and Tie2-Cre (B6.Cg-Tg(Tek-cre)^{12Flv/J}) animals in which Cre recombinase expression is driven by a mouse endothelial-specific receptor tyrosine kinase promoter/enhancer. Recombinase activity results in the deletion of loxP flanked targets in the female germline as well as in endothelial cells (Jackson Laboratories, Bar Harbor, MA). The mouse brain EC isolation procedure was adapted from (Demeule *et al.*, 2001 ; Lu *et al.*, 2008 ; Wu, Hofman et Zlokovic, 2003). WT and *Lrp1*(EC)^{-/-} mice were euthanized under CO_2 . Brains of 4 to 10 mice were removed by taking care to detach the cerebellum, meninges and large vessels. The brains were rinsed in DMEM containing 2% FBS then cut into small pieces of 1-2 mm^3 and placed in tubes containing DMEM-FBS. The brains were homogenized manually using a Potter, and homogenates mixed with an equal volume of 31% (w/v) Dextran 70 and stirred for 20 minutes at 4°C. The mixes were ultracentrifuged at 10,000g for 20 minutes at 4°C. The white and thick supernatant (myelin) was removed. The pellet was resuspended in a 0.05% collagenase A solution (in PBS) before being incubated for 1 hour at 37°C. The solutions were then filtered on a 180 μm Nitex filter and then filtered on a 30 μm Nitex filter. The filtrates were centrifuged at 600g for 10 minutes at 4°C.

4.5.4 Cell migration assay

Cell migration assay experiments were carried out using the Real-Time Cell Analyzer (RTCA) Dual-Plate (DP) Instrument of the xCELLigence system (Roche Diagnostics). Cells were trypsinized and 20,000 cells/well were seeded onto CIM-

Plates 16 (Roche Diagnostics). Isolated mice EC were seeded in the wells immediately after their extraction. These migration plates are similar to conventional Transwells (8 μm pore size), with gold electrode arrays on the bottom side of the membrane to provide a real-time measurement of cell migration. Prior to cell seeding, the underside of the wells from the upper chamber was coated with 25 μL of 0.15% gelatin in PBS and incubated for 1 hour at 37°C. S1P or LPA were dissolved in serum-free culture medium and added to the lower chamber. Cell migration was monitored for 6 hours. The impedance values were measured by the RTCA DP Instrument software and were expressed in arbitrary units as Normalized Cell Migration Index. Each experiment was performed two times in duplicate.

4.5.5 Immunoblotting procedures

Cells were lysed in a buffer containing 1 mM each of NaF and Na_3VO_4 , and proteins from control and treated cells separated by SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). After electrophoresis, proteins were electrotransferred to polyvinylidene difluoride membranes which were then blocked for 1 hour at room temperature with 5% non-fat dry milk in Tris-buffered saline (150 mM NaCl, 20 mM Tris–HCl, pH 7.5) containing 0.1% Tween-20 (TBST). Membranes were further washed in TBST and incubated with the primary antibodies (1/1000 dilution) in TBST containing 3% BSA and 0,05% NaN_3 . The primary antibody was washed in TBST and this was followed by a 1 hour incubation with horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (1/5000 dilution) in TBST containing 5% non-fat dry milk. Immunoreactive material was visualized by enhanced chemiluminescence (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC).

4.5.6 Transfection method and RNA interference

HBMEC were transiently transfected with an equimolar (20 nM) mixture of three different human siRNA (Qiagen) against C/EBP β (Hs_CEBPB_4 FlexiTube siRNA:

SI00073640; Hs_CEBPB_5 FlexiTube siRNA: SI02777292; Hs_CEBPB_7 FlexiTube siRNA: SI03058062) in order to achieve maximal gene repression. Single siRNA sequences were used for LRP1 (Hs_LRP1_9 FlexiTube siRNA: SI05113192), S1P1 (Hs_EDG1_1 FlexiTube siRNA: SI00376201), S1P3 (Hs_EDG3_5 FlexiTube siRNA: SI02757391) gene silencing or scrambled sequences (AllStar Negative Control siRNA, 1027281) using Lipofectamine 2000 (ThermoFisher Scientific, Burlington, ON). Specific gene knockdown was evaluated by qRT-PCR as described below. The m4LRP1 cDNA plasmid was a kind gift from Dr Guojun Bu (Washington University School of Medicine, St Louis, MO).

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

Total RNA was extracted from HBMEC monolayers or from isolated mouse EC using TriZol reagent (Life Technologies, Gaithersburg, MD). For cDNA synthesis, 1 µg of total RNA was reverse transcribed using a high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Gene expression was quantified by real-time quantitative PCR using SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA). DNA amplification was carried out using a CFX Connect Real-Time System (Bio-Rad, Hercules, CA) and product detection was performed by measuring binding of the fluorescent dye SsoFast™ EvaGreen® to double-stranded DNA. The following QuantiTect human and mouse primers were obtained from Qiagen (Valencia, CA): LRP1 (QT00025536), S1P1 (QT00208733), S1P2 (QT00230846), S1P3 (QT00244251), S1P4 (QT01192744), S1P5 (QT00234178), CEBPB (QT00237580), LRP1 (QT00155981), S1P1 (QT00243628), S1P2 (QT00262773), S1P3 (QT00132160), S1P4 (QT00260141), S1P5 (QT00282744), CEBPB (QT00320313). The relative quantities of target gene mRNA were compared against human GAPDH (QT00079247) and PPIA (QT01866137) or mouse GAPDH (QT01658692) and PPIA (QT00247709) internal mRNA controls, and were measured by following a Δ Ct method employing an amplification plot (fluorescence

signal vs. cycle number) and obtaining a cycle threshold. The difference (ΔCt) between the mean values in the triplicate samples of the target gene and those of GAPDH and PPIA mRNAs were calculated by CFX Manager™ Software version 3.1 (Bio-Rad, Hercules, CA) and the normalized expression ($\Delta\Delta\text{Ct}$) was quantified.

4.5.8 Statistical data analysis

Data are representative of three or more independent experiments. Statistical significance was assessed using GraphPad Prism 5 software with Student's paired t-test. * $P < 0.05$ was considered significant.

4.6 Results

4.6.1 C/EBP β contributes to S1P receptors transcriptional control in human brain microvascular endothelial cells

The interconvertible bioactive sphingolipids sphingosine-1-phosphate (S1P) and ceramide have profound effects on GBM cells, with S1P leading to cell survival, proliferation and invasion (Van Brocklyn, 2007). Although current evidence supports a role of S1P signaling at the BBB (Prager, Spampinato et Ransohoff, 2015), little is known about the vascular plasticity and transcriptional adaptive mechanisms involved upon oncogenic transformation (Don, Lim et Couttas, 2014). A better understanding in cerebrovascular S1P receptors expression regulation and in S1P receptor-mediated signaling pathways may offer potential anti-angiogenic therapeutic targeting strategies for GBM. In order to predict the transcription factors binding sites present within the promoter sequences of the five human S1P receptors known, we used the Ensembl Genome Browser tool coupled to the PROMO algorithm (Cunningham *et al.*, 2015 ; Farre *et al.*, 2003 ; Messeguer *et al.*, 2002). Our *in silico* screen of human brain microvascular endothelial cells (HBMEC) enabled us to identify putative transcription factors binding sites with a dissimilarity rate of less than 15% (Durasi *et al.*, 2011). Based on these findings, we extracted each promoter sequence by annotating all transcription factor sequences with a 0% dissimilarity rate. We noticed a high frequency of CCAAT/Enhancer binding protein β (C/EBP β) regulatory sequences within all five receptors of S1P (Fig.4.1A), suggesting a crucial role may be played by this transcription factor in regulating S1P receptors transcription. Transient gene silencing of C/EBP β was performed and, indeed, shown to significantly decrease S1P2, S1P3, and S1P5 gene expression, whereas that of S1P1 remained unaffected (Fig.4.1B). S1P4 basal gene expression was undetectable in HBMEC (data not shown).

4.6.2 Adaptive decrease in C/EBP β gene expression is consequent to stable, but not transient, LRP1 repression in human brain microvascular endothelial cells

LRP1 was recently ascribed a role in angiogenesis, and an unexpected link between lipoprotein receptor and sphingolipid signaling made with potential implications towards tumor angiogenesis and inflammatory processes (Nakajima *et al.*, 2014). Given that LRP1 is highly expressed in human brain microvessels (Uchida *et al.*, 2011), we next addressed whether any signaling crosstalk existed between LRP1 and cerebrovascular S1P receptor transcriptional control that potentially involves C/EBP β . Thus, LRP1 gene and protein expressions were either transiently (siLRP1) repressed using siRNA approaches (Fig.4.2A), or stable HBMEC LRP1^{-/-} KO cells generated through shRNA strategies (Fig.4.2B). Both lead to very significant decreases in LRP1 gene and protein expression as demonstrated through qRT-PCR and immunoblotting (Fig.4.2A and 4.2B, upper panels). While C/EBP β expression was found unaltered in transient LRP1 repression (Fig.4.2A), a down-regulation of C/EBP β was observed in HBMEC LRP1^{-/-} (Fig.4.2B). This observation suggests that long-term reprogramming mechanisms may be involved in C/EBP β transcriptional regulation in HBMEC and consequent to constitutive LRP1 lack of function. Whether adaptive responses upon LRP1 repression further impacted on S1P receptors-mediated response was next explored.

4.6.3 Stable, but not transient, LRP1 repression prevents S1P-induced HBMEC migration

Both LRP1 and S1P receptor-mediated molecular signaling are respectively known to be involved in invasion and angiogenesis processes (Kozlova *et al.*, 2015 ; Pi *et al.*, 2012 ; Takuwa *et al.*, 2010). In order to investigate the molecular link between LRP1 expression and S1P receptor-mediated response, we assessed HBMEC's real-time migration using the xCELLigence system as described in the Experimental

Procedures section. We found that HBMEC LRP1^{-/-} became unresponsive to S1P, as compared to HBMEC LRP1^{+/+} (Fig.4.3A), whereas transient LRP1 gene silencing (siLRP1) did not affect HBMEC responsiveness to S1P (Fig.4.3B). Chemotactic response to lysophosphatidic acid (LPA), another natural bioactive lysophospholipid which signals through defined GPCRs (Kihara, Mizuno et Chun, 2015), was found unaffected (Fig.4.3A). Given that LRP1 stable repression altered C/EBP β , a transcription factor that regulates S1P receptor transcription (Fig.4.1A), we also assessed the gene expression levels of S1P receptors *SIP1*, *SIP2*, *SIP3*, and *SIP5* in cells with LRP1 stably repressed (HBMEC LRP1^{-/-}). We found that *SIP1* and *SIP3* expression were down-regulated, while that of *SIP5* was not found significantly altered and that of *SIP2* tended to increase (Fig.4.3C). Altogether, the downregulated *SIP1* and *SIP3* receptors are therefore putative candidates which could explain why S1P response is altered consequent to LRP1 constitutive repression.

4.6.4 Lack of response to S1P in endothelial cells isolated from brains of Lrp1(EC)^{-/-} mice

We next examined the impact of *in vivo* LRP1 repression on S1P-mediated migration using isolated EC from brains of *Lrp1(EC)*^{-/-} mice and compared it to EC isolated from *Wt-Lrp1(EC)* mice brains. Our *in vivo* data were found to closely match those observed *in vitro* using our stable HBMEC LRP1^{-/-} cell model with regards to S1P stimulation. Brain EC isolated from *Lrp1(EC)*^{-/-} mice lacked LRP1 (Fig.4.4B), and were also less responsive to S1P than were *Wt* cells (Fig.4.4A, upper panels). Response to LPA was preserved between the *Wt*- and *Lrp1(EC)*^{-/-} migration (Fig.4.4A, lower panels). When *SIP1* and *SIP3*, those S1P receptors found to be down-regulated *in vitro* upon LRP1 stable repression, were assessed only *SIP3* expression was significantly decreased (Fig.4.4C). Altogether, these *in vivo* results strengthen the concept of crosstalk between LRP1 functions and S1P receptor-

mediated signaling within an adaptive response to constitutive repression of LRP1. Which specific signaling pathway involved was next investigated.

4.6.5 LRP1 modulation of S1P receptor-mediated signaling requires activation of p38 MAPK and ERK downstream signaling pathways

Mitogen-activated protein kinases (MAPK) represent good candidates in the downstream signaling of LRP1 and S1P because they both regulate multiple cellular processes such as gene expression, proliferation, invasion and migration, metabolism and apoptosis (Johnson et Lapadat, 2002). Western blot analysis of the phosphorylation status of three major MAPK downstream signals was performed and confirmed the involvement of p38 MAPK, ERK1/2, and JNK, in response to S1P-mediated signaling as they were all maximally phosphorylated within ~10-20 minutes (Fig.4.5A). When HBMEC LRP1^{-/-} were stimulated with S1P, only JNK remained phosphorylated while p38 MAPK and ERK1/2 phosphorylation status significantly decreased (Fig.4.5B). Collectively, our data again suggest that adaptive mechanisms take place in response to constitutively repressed LRP1 expression, which prevent adequate MAPK pathways activation and which lead to HBMEC inability to migrate under S1P stimulation.

4.6.6 S1P3 is required for proper S1P-mediated migration of HBMEC

S1P signaling is known to activate different pathways through its five receptors leading to migration and angiogenesis (Takuwa *et al.*, 2010). Given that *S1P1* and *S1P3* expression were initially found to be decreased upon the absence of LRP1, and that HBMEC LRP1^{-/-} were defective towards S1P chemotactic cell migration, we next investigated which of the S1P1 or S1P3 receptor is involved in the repressed S1P-mediated cell migration. Using transient siRNA gene silencing of *S1P1* and *S1P3* (Fig.4.6B), we found that only S1P3 was required for HBMEC to migrate efficiently (Fig.4.6A). Furthermore, we also observed that the p38 MAPK and ERK1/2 signaling

pathways were completely repressed when *SIP3* was transiently silenced (Fig.4.6C) demonstrating its importance for the angiogenic migration process of HBMEC.

4.6.7 Overexpression of LRP1 cluster IV upregulates SIP3 transcription and restores SIP-mediated cell migration in HBMEC-LRP1^{-/-}

In order to delineate the minimal LRP1 structural requirement necessary to ensure adequate SIP-mediated response, we transfected and overexpressed recombinant LRP1 cluster IV (m4LRP1) in HBMEC LRP1^{-/-} cells. Recombinant m4LRP1 anchors to the plasma membrane and provides access to a short intracellular cytoplasmic domain (Jen *et al.*, 2010). Transfection efficacy of the m4LRP1 cDNA plasmid was confirmed (Fig.4.7A, grey bar), and found to rescue SIP-mediated cell migration in HBMEC LRP1^{-/-} (Fig.4.7B) to levels approaching those of Wt HBMEC LRP1. Given constitutive repression of LRP1 lead to diminished SIP1 and SIP3 transcription, we next questioned whether m4LRP1 overexpression would enable any transcriptional control of these two genes. We found that, while *SIP1* transcript levels remained low, those of *SIP3* were significantly rescued in m4LRP1-transfected HBMEC LRP1^{-/-} cells (Fig.4.7C). This observation suggests that SIP3 is under the direct transcriptional control of LRP1, whereas SIP1 possibly required an additional level of control in addition to LRP1 itself.

4.7 Discussion

In the current study, we highlight an original signaling axis linking intracellular domain capacity of LRP1 to regulate gene transcription to sphingolipid signaling within the cerebrovascular compartment. More specifically, we identified the S1P receptor *S1P3* as an important downstream actor in the adaptive mechanisms consequent to constitutive LRP1 expression lowering. Whether such metabolic reprogramming involves alternate functions from LRP1 in ligand transport or intracellular trafficking/endocytosis remains to be confirmed. LRP1 is known to regulate signal transduction and to interact with other cell surface membrane receptors such as PDGFR β and β 2-integrins (Muratoglu *et al.*, 2010 ; Ranganathan *et al.*, 2011). How cell surface LRP1 regulates specific S1P receptors trafficking in brain EC may further be envisioned, but is expected to be ruled out given that transient LRP1 silencing did not alter brain EC response to S1P. Moreover, overexpression of only a partial recombinant LRP1 encompassing its transmembrane and intracellular domain was sufficient to reverse S1P lack of response and to rescue *S1P3* transcription. Through analysis of S1P receptors promoter sequence, we also found several potential transcription factors binding sites possibly involved in the regulation of S1P receptors gene expression. Among these, a C/EBP β regulatory sequence was found to be repeatedly expressed within all five S1P receptors promoter. Its transient silencing confirmed that it specifically regulated *S1P2*, *S1P3*, and *S1P5* transcription, whereas its expression was also significantly diminished in EC which had LRP1 stably repressed. Collectively, our *in vitro* and *in vivo* evidence clearly confirms that adaptive mechanisms, consequent to LRP1-mediated metabolic reprogramming, alter brain EC angiogenic response.

Physiological cellular responses to S1P have been associated to angiogenic and pro-inflammatory processes. In fact, S1P can be heavily synthesized and secreted from increased SphK activity, as observed within several solid tumour cancers, and able to

trigger angiogenesis (Anelli *et al.*, 2008 ; Anelli *et al.*, 2010). Given S1P can also be released from platelets and immune cells such as monocyte-derived macrophages and neutrophils (Baumruker, Bornancin et Billich, 2005), pro-inflammatory paracrine signaling may also be triggered in order to promote cell death/survival signaling or cell migration and proliferation (Hait *et al.*, 2006). Incidentally, all these events can take place within hypoxic tumour microenvironment. As such, low oxygen tension was found to augment outgrowth of EC sprouting and directed migration in response to S1P (Williams *et al.*, 2015). Recently, the SphK/S1P signaling pathway was found to elicit various cellular processes including cell proliferation, cell survival or angiogenesis (Cuvillier et Ader, 2011). Hypoxia also upregulated LRP1 expression in human vascular smooth muscle cells through HIF-1 α induction (Castellano *et al.*, 2011). Combined targeting of either the SphK/S1P signaling or LRP1 functions may thus represent an attractive strategy for therapeutic intervention in cancer.

Metabolic reprogramming is also associated with crucial S1P signaling which can dictate stem cells differentiation status. In fact, S1P was found to reprogram mesenchymal stem cells (MSC) towards osteogenic differentiation and to inhibit adipogenic differentiation (Hashimoto *et al.*, 2015). Interestingly, a Gi-dependent S1P signaling was found to suppress C/EBP β expression essential for adipogenic differentiation (Hashimoto *et al.*, 2015). Given we hypothesize that transcription of all five S1P receptors is potentially regulated by C/EBP β , a transcription factor of the basic-leucine zipper (bZIP) class having a role in the CNS, one may question the possible retroactive mechanism involved in general physiological processes in EC such as proliferation (Ramji et Foka, 2002), cell death and survival, energy metabolism and inflammation (Pulido-Salgado, Vidal-Taboada et Saura, 2015). Given stable repression of LRP1 lead to diminished C/EBP β expression and to altered S1P-mediated HBMEC migration, our data suggest that the *in vivo* and *in vitro* long term expression status of lipoprotein receptors such as LRP1 can lead an

adaptive transcriptional machinery to impact on growth factors- and cytokines-mediated signaling that controls EC migration and angiogenesis.

Pro-angiogenic intracellular signal transducing pathways can regulate cell migration in a paracrine and autocrine manner (Devreotes et Horwitz, 2015). Among these, S1P has been shown to require Rho small GTPases and PI3K pathway and to modify cytoskeletal activity while paxillin/focal adhesion kinase (Pax/FAK) signaling module triggers adhesion (Belvitch et Dudek, 2012). S1P can also activate GPCRs through Ras and Raf, subsequently activating MAPK pathways to potentially regulate migration (Goldsmith et Dhanasekaran, 2007). Hence, we focused on MAPK pathways since they are directly associated to migration process. We found that LRP1 was required for proper S1P-mediated ERK1/2 and p38 MAPK activation, but not JNK. This evidence supports the fact that there is a signaling crosstalk involving LRP1 and S1P in the migratory response which could represent a promising anti-angiogenic target in HBMEC to prevent tumour neovascularization. Moreover, it has been reported that MAPK pathways can modulate and phosphorylate C/EBP β for further gene transcription (Wagner et Nebreda, 2009), confirming its role as a candidate feedback transcription factor in differentially expressed S1P receptors in HBMEC LRP1^{-/-}.

HBMEC were found to only express four of the five S1P receptors transcripts. When differential gene expression profiling was performed between transient and stable LRP1 knockdowns, *in vitro* and *in vivo* LRP1 silencing strategies both lead us to conclude that S1P3 was the lead S1P receptor involved in the altered adaptive response to S1P upon LRP1 repression. Among the strongest evidence regarding LRP1's role in regulating *SIP3* transcription was provided upon overexpression of LRP1 cluster IV (m4LRP1). Accordingly, constitutive cell surface anchoring of a transmembrane and cytoplasmic domain of LRP1 was found to significantly rescue *SIP3* transcript levels. Given previous observations have put forward a role for S1P1

and S1P3 in the chemotactic vascular migration towards S1P (Waeber, Blondeau et Salomone, 2004), this suggests that migration can mostly be activated through the Gi and possibly G_{12/13} signaling consistent with a decreased in ERK and p38 phosphorylation.

Regulation of LRP1 expression and function during oncogenic transformation may also be performed through alternate mechanisms. For instance, the membrane type-1 matrix metalloproteinase MT1-MMP, highly expressed in several cancers (Itoh, 2015), has been shown to cleave LRP1 at the cell surface as this is believed to result in increased invasive phenotype through increase in global ECM hydrolytic activity (Selvais *et al.*, 2011). In fact, high expression of MT1-MMP has been correlated with decreased expression of LRP-1 in advanced stages of Wilms tumours (Desrosiers *et al.*, 2006). Whereas shedding of the extracellular domain of LRP1 has been reported to impact on its extracellular domain and to functionally decrease the recycling of LRP1 ligands (Emonard *et al.*, 2014), the functions of the remaining LRP1 transmembrane and cytoplasmic domains may however still be unaltered and sufficient in transducing S1P-mediated signaling. Interestingly, an MT1-MMP/S1P signaling crosstalk was also recently documented in bone marrow stromal cells (Annabi *et al.*, 2003b ; Meriane *et al.*, 2006), glioblastoma cells (Fortier *et al.*, 2008), and CD133+ glioblastoma stem cells (Annabi *et al.*, 2009). Whether LRP1 modulates any of this signaling remains to be confirmed. Pharmacological inhibition of S1P signaling was also found to inhibit differentiation of promyelomonocytic leukemia cells by EGCG (Chokor, Lamy et Annabi, 2014), an anti-angiogenic and anti-inflammatory green tea-derived catechin very well documented to inhibit MT1-MMP catalytic and signaling functions (Annabi *et al.*, 2002 ; Zgheib, Lamy et Annabi, 2013).

In conclusion, our study provides evidence for significant angiogenic reprogramming consequent to long term adaptive mechanisms taking place within cerebrovascular

EC and upon LRP1 repression. Targeting of the LRP1/S1P signaling axis at the BBB should be considered in future antiangiogenic therapeutic strategies. S1P receptors expression could also hold promise as new cerebrovascular biomarkers in the design and development of targeted new drugs.

4.8 Acknowledgments

BA holds an institutional Research Chair in Cancer Prevention and Treatment. AV is a Fonds de Recherche du Québec – Nature et technologies (FRQNT) awardee. This study was supported through funding by the Collaborative Research and Development Grant program of the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

4.9 Footnotes

The abbreviations used are : BBB, blood-brain barrier; C/EBP β , CCAAT/enhancer binding protein β ; EC, endothelial cells; GBM, glioblastoma; HBMEC, human brain microvascular endothelial cells; LPA, lysophosphatidic acid; LRP1, low density lipoprotein receptor related protein 1; MAPK, mitogen-activated protein kinases; MSC, mesenchymal stem cells; MT1-MMP, membrane type-1 matrix metalloproteinase; SphK, sphingosine kinase; SIP, sphingosine-1-phosphate.

4.10 Figures

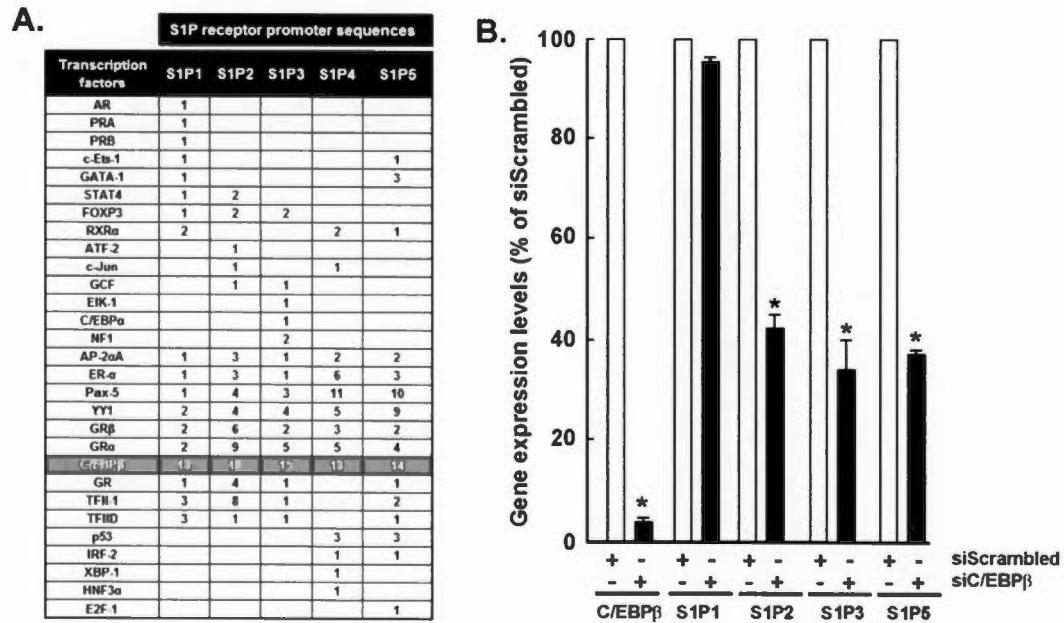


Figure 4.1 C/EBP β contributes to S1P receptors transcriptional control in human brain microvascular endothelial cells.

A) Presence and frequency of various transcription factors binding sites within promoter sequences of all five S1P receptors were obtained as described in the Methods section. Each transcription factor regulatory sequences with a dissimilarity rate of 0% was grouped. C/EBP β potential binding sites (highlighted in gray) were the most present in all five S1P receptors promoters. B) Transient gene silencing of C/EBP β (siC/EBP β , black bars) was performed in transfected HBMEC using specific siRNA as described in the Methods section, and gene expression of C/EBP β , S1P1, S1P2, S1P3, S1P5 assessed by qRT-PCR (S1P4 is not expressed in HBMEC, not shown). Normalized gene expression over GAPDH and PPIA is shown with the means \pm SEM of at least three independent experiments. * $P < 0,05$.

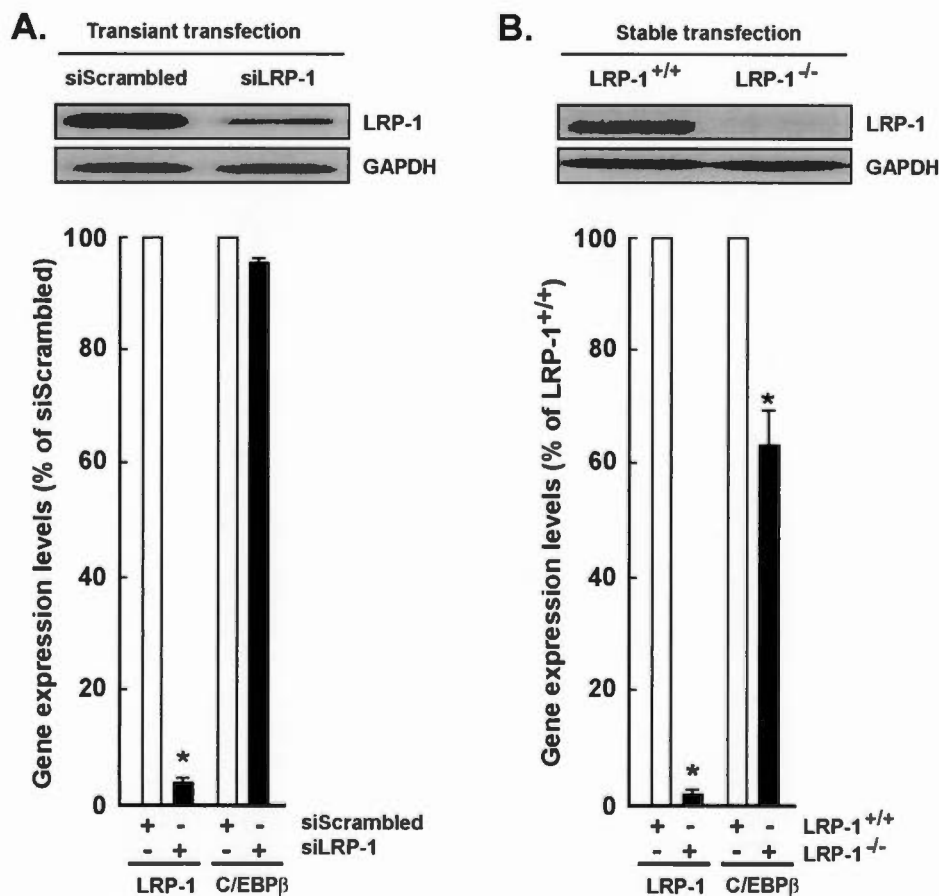


Figure 4.2 Adaptive decrease in C/EBP β gene expression is consequent to stable, but not transient, LRP1 repression in human brain microvascular endothelial cells.

LRP1 silencing was performed in HBMEC either A) transiently (siLRP1), or B) stably (LRP1^{-/-}) as described in the Methods section. LRP-1 and C/EBP β gene expression levels were assessed by qRT-PCR, whereas LRP-1 protein expression was assessed by Western Blot as described in the Methods section.

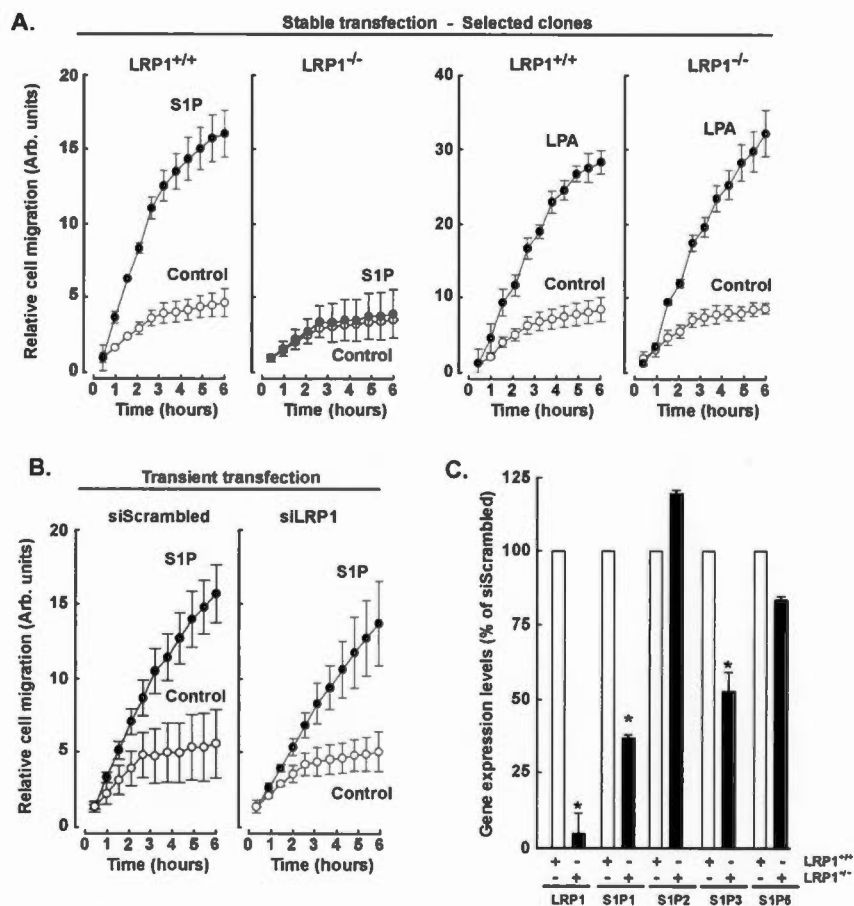


Figure 4.3 Stable, but not transient, LRP1 repression prevents S1P-induced HBMEC migration.

Cells were seeded into the chambers of an xCELLigence system as described in the Methods section. Cells were then primed with either vehicle (0.1% MeOH for the S1P stimulations, or 0.1% PBS-BSA for LPA stimulations), 1 μ M S1P or 2 μ M LPA. Migration was measured in real-time for 6 hours. A) Migration of HBMEC expressing LRP1 (LRP1^{+/+}) and HBMEC where LRP1 was stably repressed (LRP1^{-/-}) was performed in the absence (open circles) or presence of S1P/LPA (closed circles). B) Transient control (siScrambled) or LRP1 (siLRP1) gene repression was performed in HBMEC as described in the Methods section. Migration was assessed in response to vehicle (Control, open circles) or 1 μ M S1P (closed circles). C) Gene expression levels of *LRP1*, *SIP1*, *SIP2*, *SIP3* and *SIP5* were assessed by qRT-PCR in LRP1^{+/+} (white bars) and LRP1^{-/-} (black bars) HBMEC. Normalized gene expression over GAPDH and PPIA is shown with the means \pm SEM of at least three independent experiments. * $P < 0.05$.

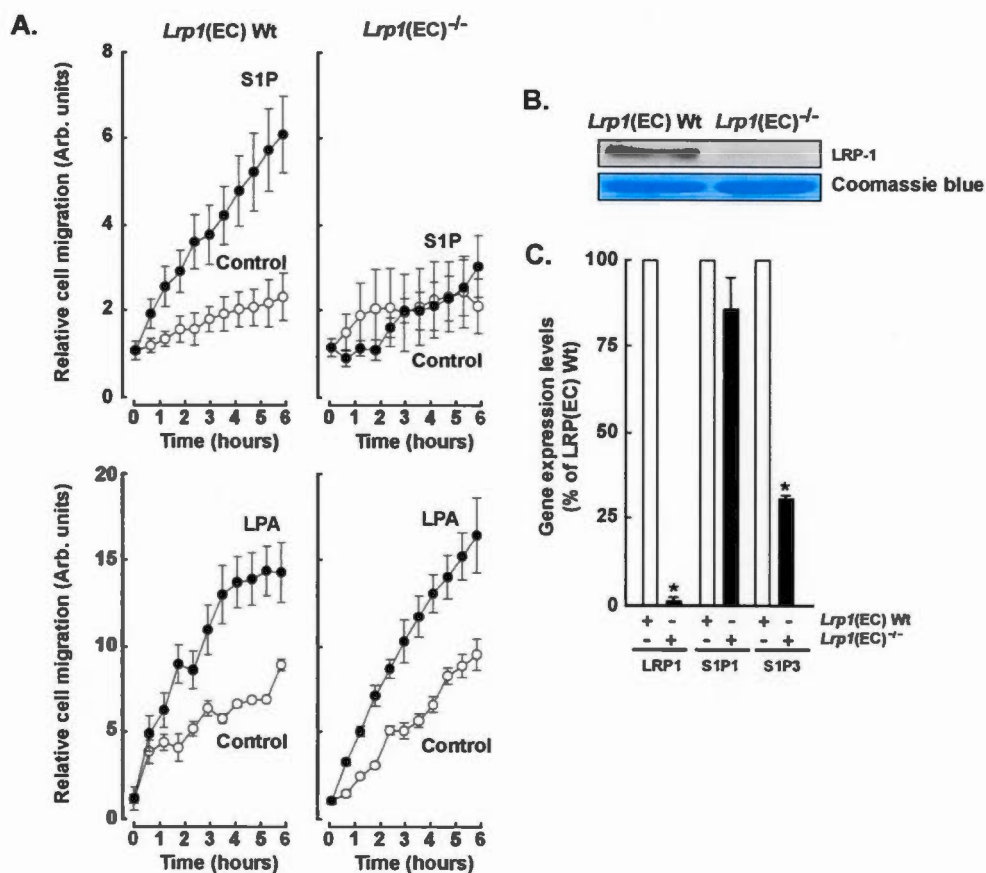


Figure 4.4 Lack of response to S1P in brain endothelial cells isolated from *Lrp1(EG)^{-/-}* mouse.

A) Endothelial cells were isolated from (*Lrp1(EG) Wt*) or LRP1-deficient (*Lrp1(EG)^{-/-}*) mice brains as described in the Methods section, then seeded into the chambers of the xCELLigence system. Cell migration was then monitored in response to vehicle (0.1% MeOH for the S1P stimulations, or 0.1% PBS-BSA for LPA stimulations), 1 μ M S1P or 2 μ M LPA. B) Immunoblotting of cell lysates was performed to detect LRP1 expression in the endothelial cells from both animal models. Coomassie blue staining was performed to show equal loading of proteins. C) Gene expression levels of *LRP1*, *S1P1*, and *S1P3* were assessed by qRT-PCR in *Lrp1(EG) Wt* (white bars) and *Lrp1(EG)^{-/-}* (black bars) HBMEC. Normalized gene expression over GAPDH and PPIA is shown with the means \pm SEM of at least three independent experiments. * $P < 0.05$.

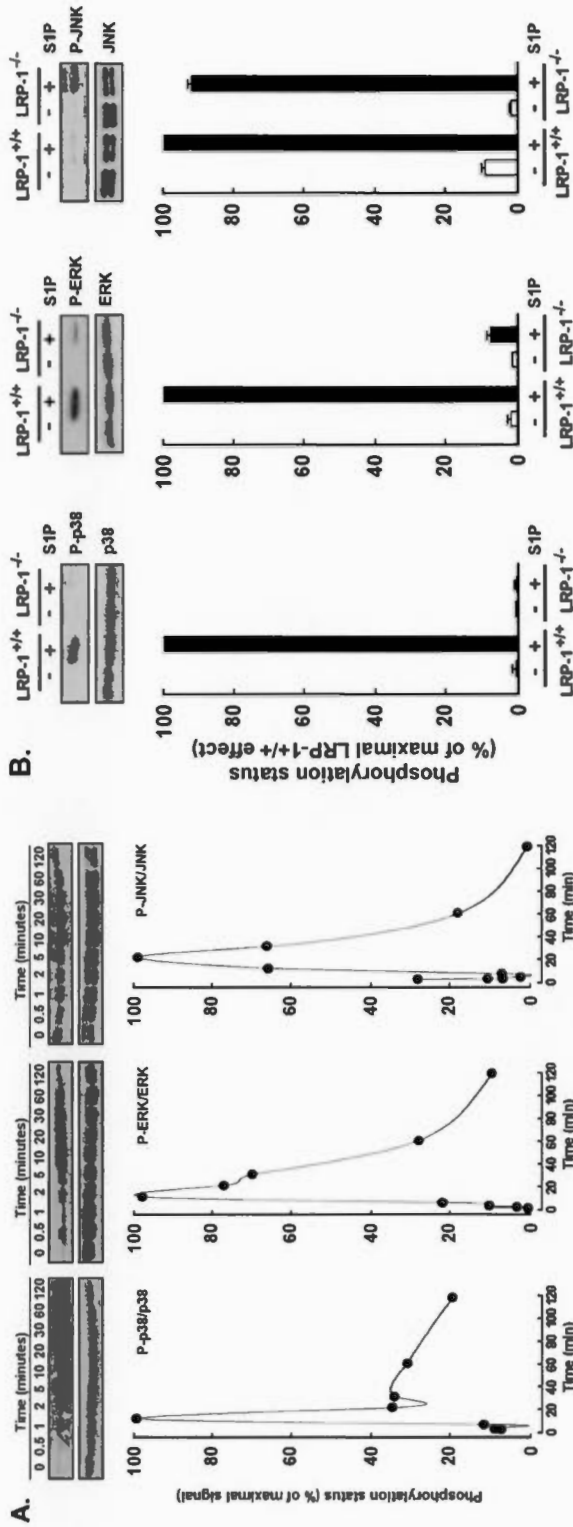


Figure 4.5 LRP1 modulation of S1P receptor-mediated signaling requires activation of p38 MAPK and ERK downstream signaling pathways.

A) Phosphorylation status of p38, ERK1/2 and JNK proteins were assessed in 20 μ g lysates extracted from HBMEC submitted to 1 μ M S1P stimulation for up to 120 minutes (upper panels). A representative scanning densitometry quantification is shown for each phosphorylated intermediate and expressed as the ratio of phosphorylated/total protein signal. B) Phosphorylation status of p38, ERK1/2, and JNK in response to S1P was compared between HBMEC which expressed Wt LRP1 (LRP1^{+/+}) or which LRP1 expression was stably repressed (LRP1^{-/-}). A representative scanning densitometry quantification is shown for each phosphorylated intermediate and expressed as the % of maximal phosphorylated/total protein signal from LRP1^{+/+}.

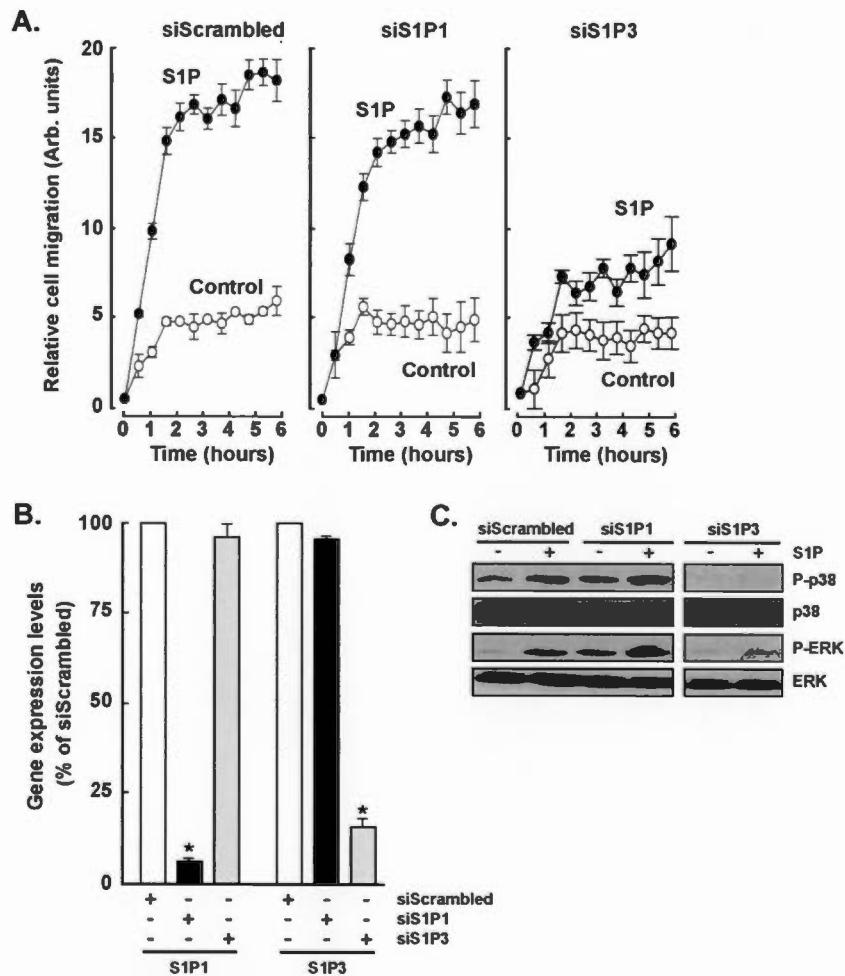


Figure 4.6 S1P3 is required for proper S1P-mediated signaling and migration of HBMEC.

A) Transient control (siScrambled), S1P1 (siS1P1), or S1P3 (siS1P3) gene silencing was performed in HBMEC as described in the Methods section. Cells were left to recuperate for 24 hours, seeded into the chambers of the xCELLigence system, and primed with either vehicle (0.1% MeOH, control open circles) or 1 μ M S1P (closed circles). Migration was measured in real-time for 6 hours. B) Validation and efficacy of S1P1 (black bars) and S1P3 (grey bars) gene silencing was performed by qRT-PCR. Normalized gene expression over GAPDH and PPIA is shown with the means \pm SEM of at least three independent experiments. * $P < 0,05$. C) Phosphorylation status of p38 and of ERK1/2 was performed by immunoblotting upon a 10 minutes S1P treatment in cell lysates.

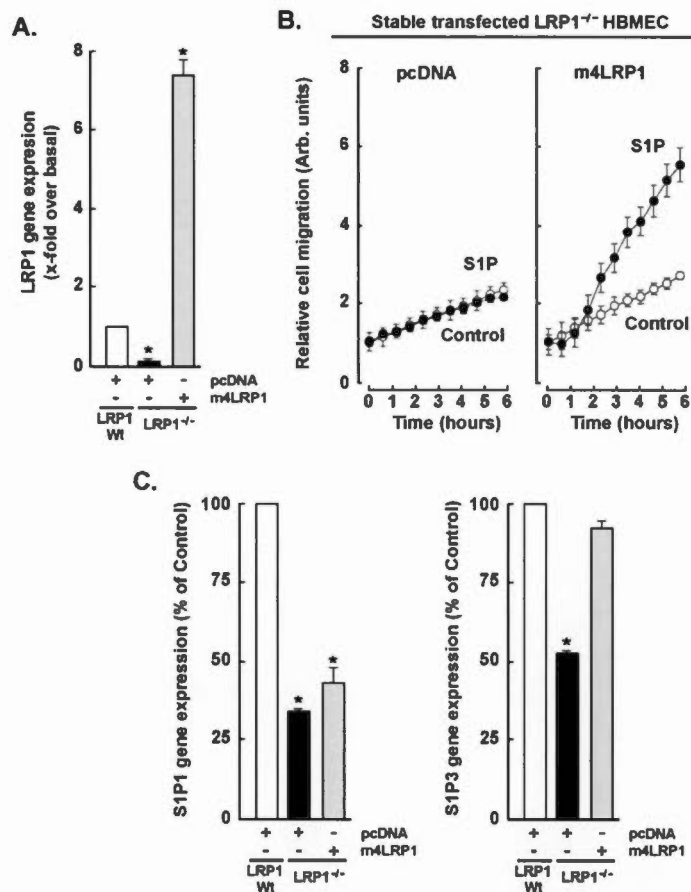


Figure 4.7 Overexpression of m4LRP1 (cluster 4) upregulates S1P3 transcription and restores S1P-mediated cell migration in HBMEC-LRP1^{-/-}.

A) Stable LRP1-repressed HBMEC (LRP1^{-/-}) were transiently transfected with pcDNA or a cDNA plasmid encoding LRP1 cluster IV (m4LRP1) as described in the Methods section. LRP1 gene expression was performed by qRT-PCR. In parallel, LRP1^{-/-} HBMEC were either transfected with pcDNA or m4LRP1 and B) real-time cell migration assessed in response to vehicle (Control, open circles) or S1P (closed circles) with an xCELLigence system, or C) *SIP1* and *SIP3* gene expression assessed by qRT-PCR.

CHAPITRE V

MESENCHYMAL STROMAL CELL CILIOGENESIS IS ABROGATED IN RESPONSE TO TUMOR NECROSIS FACTOR-A AND REQUIRES NF-KB SIGNALING

Amélie Vézina, Eric Vaillancourt-Jean, Stéphanie Albarao, Borhane Annabi
Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Département de Chimie, Centre de Recherche
BioMed, Université du Québec à Montréal, Québec, Canada.

2014

Cancer Letters, 345(1) :100-105.

5.1 Avant-propos

Les travaux présentés dans ce chapitre répondent au troisième objectif de cette thèse. Le but était de caractériser la signalisation régissant la ciliogenèse dans les MSCs en réponse au stimulateur pro-inflammatoire TNF α . Les résultats montrent l'implication de la voie NF- κ B. Nous avons aussi identifié un rôle spécifique de la voie TNF α /TNFR/NF- κ B grâce à l'utilisation d'un antagoniste du récepteur au TNF α , la progranuline.

J'ai contribué à la conception de l'étude et à toutes les expériences et leurs analyses subséquentes. Éric Vaillancourt-Jean a fait les expériences pour la figure 4 et a contribué aux expérimentations de la figure 1. Stéphanie Albarao a contribué à la validation des transfections transitoires de siRNA apparaissant à la figure 5. La rédaction de l'article, l'interprétation des résultats, le montage des figures, l'analyse statistique et les révisions finales du manuscrit ont été faits par moi-même et par le professeur Borhane Annabi. Les références de l'article sont présentées à la fin de la thèse dans la bibliographie générale.

Les résultats ont été présentés sous forme de communication orale ou par affiche dans les congrès suivants :

VÉZINA A, Annabi B. (2014) Impact de l'inflammation sur la ciliogénèse des cellules souches mésenchymateuses : contribution de la voie de signalisation NF κ B. *82^e congrès de l'ACFAS (Montréal, QC, Canada)* Oral #5, Session Cancer : Biologie et aspect humain.

VÉZINA A, Vaillancourt-Jean É, Annabi, B. (2014) NF- κ B signaling regulates the cell surface expression of the primary cilium in tumor necrosis factor- α -treated mesenchymal stromal cells. *Journée scientifique du GÉPROM 2014 (Montréal, QC, Canada)*. Affiche #21.

5.2 Résumé

Le cil primaire a longtemps été considéré comme un vestige de l'évolution des organismes eucaryotes. Depuis quelques années, il est réputé avoir un rôle dans la transduction du signal intracellulaire, la croissance cellulaire et dans la différenciation des cellules souches. Le cil primaire est une organelle ancrée à la surface cellulaire dont l'expression est abolie dans les cellules cancéreuses et durant l'adaptation des cellules souches mésenchymateuses (MSC) à des faibles niveaux d'oxygène. Sachant que la signalisation proinflammatoire est une caractéristique importante dans la progression tumorale, nous émettons l'hypothèse que la signalisation qui module l'expression du cil primaire passe par une voie NFκB dépendante de l'activation par la cytokine proinflammatoire, TNFα. L'expression du cil primaire dans les MSC est diminuée par le TNFα et cela est indépendant de l'expression de la protéine de transport flagellaire, IFT88. La progranuline, un antagoniste du récepteur au TNFα, prévient cette répression. Cela est médié par la voie signalétique NFκB et requiert les kinases d'IκB (α, β et γ) ainsi que la sous-unité p65 composant l'hétérodimère NFκB responsable de la transcription. En conclusion, nos résultats montrent que le cil primaire représente un biomarqueur potentiel dans la capacité des MSC à s'adapter à un environnement inflammatoire. Des nouvelles thérapies pourraient cibler la ciliogénèse dans la prévention du développement des processus tumoraux impliqués dans la transformation des MSC.

Mots clés : Inflammation, cellules souches mésenchymateuses, NF-κB, cil primaire

5.3 Abstract

The primary cilium is a cell surface-anchored sensory organelle which expression is lost in hypoxic cancer cells and during mesenchymal stromal cells (MSC) adaptation to low oxygen levels. Since pro-inflammatory cues are among the early events which promote tumor angiogenesis, we tested the inflammatory cytokine tumor necrosis factor (TNF)- α and found that it triggered a dose-dependent loss of the primary cilia in MSC. This loss was independent of IFT88 expression, was abrogated by progranulin, an antagonist of the TNF receptor and required the NF- κ B signaling intermediates I κ B kinase α , β , and γ , as well as NF- κ B p65. These findings strengthen the concept that the primary cilium may serve as a biomarker reflecting the tumor supporting potential of MSC and their capacity to adapt to hypoxic and pro-inflammatory cues.

Key words: Inflammation, mesenchymal stromal cells, NF- κ B, primary cilium

5.4 Introduction

The primary cilium is an immotile microtubule-based organelle anchored to the membrane of most human cells (Wheatley, Wang et Strugnell, 1996). Originally believed to be an artifact of evolution with very little physiologic purpose, it is now clear that the primary cilium bears important signaling and sensory functions (Gardiner, 2005). Mechanosensation, photosensation, chemosensation, calcium level regulation, left-right patterning asymmetry in embryonic development and intercellular communication are all crucial physiologic events in which primary cilia are involved (Nonaka *et al.*, 2002 ; Ramamurthy et Cayouette, 2009 ; Resnick et Hopfer, 2007 ; Roepman et Wolfrum, 2007). The primary cilia also represent an important gateway in cell signaling, providing the extracellular matrix (ECM) components and growth factors with access to several receptors (Davenport et Yoder, 2005). Bearing such important roles, dysfunction or dysgenesis of the primary cilia leads to ciliopathies such as polycystic kidney disease, nephronophthisis, Joubert syndrome and Meckel-Gruber syndrome (Badano *et al.*, 2006). While most of healthy human cells express primary cilia, cancer cells have been reported to express very low or undetectable levels of the cilia (Moser, Fritzler et Rattner, 2009 ; Yuan *et al.*, 2010). How ciliogenesis is regulated by procarcinogenic stimulation or within a tumor-associated pro-inflammatory microenvironment remains poorly understood.

A number of cell signaling pathways associated with tumor cell growth, particularly the Hedgehog and Wnt pathway, are modulated following ablation of cilia (Wong *et al.*, 2009). Several studies reported that cilia removal activated GLI2, a known effector of the Hedgehog mitogenic pathway, leading to repression of the P16 tumor suppressor (Bishop *et al.*, 2010 ; Han *et al.*, 2009 ; Humke *et al.*, 2010). Moreover, ciliogenesis seems to depend on cell cycle status, as it has been observed that primary cilium expression only occurs in non-proliferating cells, again supporting the hypothesis that highly proliferative cancer cells do not display this organelle

(Quarmby et Parker, 2005). Several other proliferating and ciliated cell types have been reported, suggesting a complex regulation of ciliary assembly depending on the cell's signaling needs and according to the cell cycle status (Seeley et Nachury, 2010). Among these cell types, bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (MSC) express primary cilia although ciliogenesis was abrogated when MSC were cultured in hypoxic conditions approximating those oxygen levels found within solid tumors (Proulx-Bonneau et Annabi, 2011). There is growing interest in MSC's immunomodulatory properties and links to cancer (Djouad *et al.*, 2003 ; Studeny *et al.*, 2002), and MSC were found to migrate and engraft within the tumor hypoxic and inflammatory microenvironment where they express and secrete cytokines that trigger angiogenesis (Annabi *et al.*, 2004 ; Marigo et Dazzi, 2011 ; Yen et Yen, 2008 ; Zgheib *et al.*, 2013).

To date, no molecular links have been established between inflammation and ciliogenesis, and it is unknown whether ciliogenesis is regulated by inflammatory cues. As tumor-associated inflammation is, in part, triggered through the pro-inflammatory cytokine tumor necrosis factor (TNF)- α /TNF receptor (TNFR) signaling pathway (Viatour *et al.*, 2005), we therefore questioned whether ciliogenesis is affected by TNF- α treatment and whether this required any TNFR downstream signaling. In the current study, we report that TNF- α triggers the loss of primary cilium expression and that this occurs through a TNFR-mediated NF- κ B signaling with an absolute requirement for the I κ B kinase (IKK) family.

5.5 Material and methods

5.5.1 Materials

Murine progranulin and murine tumor necrosis factor (TNF)- α were from EMD Millipore (Gibbstown, NJ), sodium dodecylsulfate (SDS) and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma (Oakville, ON). Electrophoresis reagents were purchased from Bio-Rad (Mississauga, ON). The enhanced chemiluminescence (ECL) reagents were from Perkin Elmer (Waltham, MA). Micro bicinchoninic acid protein assay reagents were from Pierce (Rockford, IL). The polyclonal antibody against I κ B was purchased from Cell Signaling (Danvers, MA). The goat anti-IFT88/Polaris antibody was from MyBioSources (San Diego, CA). Dilutions of 1:1,000 was used for immunoblotting, and 1:200 for immunofluorescence. The Alexa Fluor 488 donkey anti-goat IgG antibody was from Molecular Probes (Grand Island, NY). The mouse antiacetylated tubulin antibody (clone 6-11B-1) and the anti-mouse Red-X secondary antibody for immunofluorescence were purchased from Invitrogen (Carlsbad, NM). The monoclonal antibody against GAPDH was from Advanced Immunochemical Inc. (Long Beach, CA). Horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit and anti-mouse IgG secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA). All other reagents were from Sigma-Aldrich Canada.

5.5.2 Cell culture

Bone marrow-derived MSC were isolated from the whole femur and tibia bone marrow of C57BL/6 female mice; cells were cultured and characterized as previously described (Annabi *et al.*, 2003a). Analysis by flow cytometry, performed at passage 14, revealed that MSC expressed CD44 yet were negative for CD45, CD31, KDR/flk1 (VEGF-R2), flt-4 (VEGF-R3) and Tie2 (angiopoietin receptor) (data not shown). Wild-type (WT) or mutant murine embryonic fibroblasts (MEF) IKK α ^{-/-} (Hu

et al., 1999), IKK β ^{-/-} (Li *et al.*, 1999), and IKK γ /Nemo^{-/-} (Makris *et al.*, 2000) were described previously and were kindly provided by Dr Terence Dermody (Vanderbilt University, USA).

5.5.3 Immunofluorescence

MSC were grown on coverslips to 60% confluence and then treated for 18 hours. Cells were then incubated in 10% formalin phosphate buffer for 20 minutes, followed by incubation in permeabilization buffer (0.5% triton X-100 in PBS) for 5 minutes and then blocked in 1% BSA in PBS. The coverslips were incubated 1 hour with a monoclonal anti-acetylated tubulin antibody 1:200 in 3% BSA, 0.5% NaN₃ solution in PBS (antibody solution). After three PBS washes, the cells were further incubated for 1 hour with 10 mM DAPI and anti-mouse Red-X 1:200 in antibody solution. The coverslips were then washed 3 times in PBS and laid down on microscope slides using ProLong Gold Antifade Reagent from Invitrogen (Carlsbad, NM). The samples were viewed under a fluorescence microscope using Northern Eclipse software (Empix Imaging Inc.) with labeled acetylated tubulin in red and DAPI-stained nucleus in blue. Three random fields were acquired for each condition and analyzed with the Image J software (NIH). The expression ratio of acetylated tubulin antibody-labeled cells (primary cilium) over DAPI stained nucleus (total cells) was calculated.

5.5.4 Immunoblotting procedures

Proteins from control and treated cells were separated by SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). After electrophoresis, proteins were electrotransferred to polyvinylidene difluoride membranes which were then blocked for 1 hour at room temperature with 5% non-fat dry milk in Tris-buffered saline (150 mM NaCl, 20 mM Tris–HCl, pH 7.5) containing 0.3% Tween-20 (TBST). Membranes were further washed in TBST and incubated with the primary antibodies (1/1,000 dilution) in TBST containing 3% bovine serum albumin, 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).

5.5.5 Transfection method and RNA interference

MSC were transiently transfected with 20 nM murine siRNA (Qiagen) against NF- κ B p50 (Mm_Nfkb_2 Flexitube siRNA, SI01326990) or NF- κ B p65 (Mm_Rela_2 Flexitube siRNA, SI01399622) or scrambled sequences (AllStar Negative Control siRNA, 1027281) using Hiperfect (Qiagen). Specific gene knockdown was evaluated by qRT-PCR as described below. Small interfering RNA and mismatch siRNA were synthesized by Qiagen and annealed to form duplexes.

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

Total RNA was extracted from MSC monolayers using TriZol reagent (Life Technologies, Gaithersburg, MD). For cDNA synthesis, 2 μ g of total RNA were reversetranscribed using a high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). cDNA was stored at -80°C prior to PCR. Gene expression was quantified by real-time quantitative PCR using iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA). DNA amplification was carried out using a CFX Connect Real-Time System (Bio-Rad, Hercules, CA) and product detection was performed by measuring binding of the fluorescent dye SsoFast EvaGreen to double-stranded DNA. The following QuantiTect murine primer sets were obtained from Qiagen (Valencia, CA): NF- κ B p50/NF- κ B1 (QT00154091) and NF- κ B p65/RelA (QT00149415). The relative quantities of target gene mRNA were compared against murine GAPDH and β -Actin internal mRNA controls, and were measured by following a Δ CT method employing an amplification plot (fluorescence signal vs. cycle number). The difference (Δ CT) between the mean values in the triplicate samples of the target gene and those of GAPDH and β -actin mRNAs were calculated

by iQ5 Optical System Software version 2.0 (Bio-Rad, Hercules, CA) and the relative quantified value (RQV) was expressed as $2^{-\Delta CT}$.

5.5.7 Analysis of cell cycle by flow cytometry

Distribution of MSC throughout the cell cycle was assessed by flow cytometry (Currie *et al.*, 2007). Serum-starving preparation was performed prior to analysis and therefore the cell populations were synchronous prior to TNF- α treatment. Cells were harvested by gentle scraping, pelleted by centrifugation, washed with ice-cold PBS/EDTA (5 mM), then resuspended in 1 volume PBS/EDTA and fixed with 100% ethanol overnight. Three volumes of staining solution, containing propidium iodine (PI, 50 $\mu\text{g/ml}$) and DNase-free RNase (20 $\mu\text{g/ml}$), were added. The fraction of the population in each phase of the cell cycle was determined as a function of the DNA content using a Becton Dickinson FACS Calibur flow cytometer equipped with CellQuest Pro software.

5.5.8 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.

5.6 Results

5.6.1 TNF- α abrogates primary cilia expression in mesenchymal stromal cells.

The pro-inflammatory cytokine TNF- α was first evaluated for its capacity to affect primary cilium expression. MSC were cultured on coverslips for immunofluorescence and serum starved in the presence of increasing concentrations of TNF- α for 18 hours. The resulting slides were incubated with the anti-acetylated tubulin antibody and nuclei were stained with DAPI. The number of cells expressing a primary cilium was visualised using fluorescent microscopy (Fig.5.1A) and assessed in three different random fields for each condition. We observed that the primary cilium was expressed in more than 80% of MSC (Fig.5.1B, control) and that TNF- α dose dependently repressed ciliogenesis reaching ~90% inhibition at 10 ng/ml (Fig.5.1B). This effect of TNF- α was accompanied by a decrease in I κ B expression (Fig.5.1C) and similarly reached a maximal effect at 10 ng/ml (Fig.5.1D).

5.6.2 TNF- α -mediated cilia loss does not alter cell cycle phases and IFT88 nuclear expression.

Loss of primary cilia function is thought to be linked to proliferative diseases and to cell cycle (Kee et Verhey, 2013). Among components of mammalian intraflagellar components, the intraflagellar transport protein 88 homolog (IFT88) is essential for ciliogenesis and has been ascribed regulating functions in G1/S transition (Robert *et al.*, 2007). We next assessed the effect of TNF on cell cycle phases, and whether the TNF-mediated loss of acetylated tubulin expression also altered IFT88 expression. We found that increasing concentrations of TNF- α did not alter cell cycle phases as no significant difference was observed between control and TNF-treated cells in G0/G1, G2/M, and S phases (Fig.5.2A). While COX-2 increased in response to TNF- α treatment in cell lysates, that of IFT88 and of GAPDH remained unchanged (Fig.5.2B). IFT88 nuclear expression also remained unaffected, and no co-

localization of IFT88 with acetylated tubulin was observed within our cell model and under our experimental settings (Fig.5.2C) suggesting that TNF-mediated loss of the primary cilium is independent of IFT88 expression.

5.6.3 Progranulin reverses TNF- α -mediated cilia loss.

In order to address whether this primary cilia loss required TNF- α binding to its receptor TNFR, we next treated MSC with TNF- α , the TNFR antagonist progranulin, or a combination of both and visualized primary cilium expression (Fig.5.3A). While progranulin itself was ineffective, TNF- α significantly decreased ciliogenesis, and this effect was reversed by progranulin (Fig.5.3B). This indicates that TNF- α required interaction with its receptor TNFR in order to transduce the downstream signaling that ultimately led to ciliogenesis disruption.

5.6.4 IKKs are required for TNF- α -mediated cilia loss.

In an attempt to elucidate the NF- κ B signaling axis required to transduce TNF- α -mediated inhibition of ciliogenesis, wild-type mouse embryonic fibroblasts (MEF) and MEF mutants for IKK α ^{-/-}, IKK β ^{-/-}, and IKK γ ^{-/-} were used. Cells were cultured on coverslips for immunofluorescence and serum-starved in the presence of TNF- α for 18 hours. The resulting slides were immunolabeled for acetylated tubulin, nucleus-stained with DAPI and visualised with a fluorescence microscope (Fig.5.4A). The number of primary cilia was counted in three different random fields for each condition. Similar to what was found in MSCs, TNF triggered cilia disappearance in up to 40% of the cells in the wild type condition, suggesting similar mechanisms of action are found in both murine cell lines. However, deficiency in any of the IKK family members significantly reversed the TNF effect (Fig.5.4B). These results suggest that TNF-mediated NF- κ B activation is required for cilia loss and that the I κ B kinases are essential in this mechanism.

5.6.5 Gene silencing of NF- κ B p65, but not of NF- κ B p50, abrogates the TNF- α -mediated decrease in ciliogenesis.

TNF- α -mediated activation of the IKK complex leads to the phosphorylation of I κ B and subsequent degradation via the proteasome pathway as observed in Fig.5.1D. This process is known to release the heterodimer p50/p65, allowing it to translocate to the nucleus where it binds to specific κ B sites (Viatour *et al.*, 2005). We therefore used gene silencing strategies to reduce either NF- κ B p50 or NF- κ B p65 murine genes in MSC, then treated the cells with or without TNF- α . Initially, total RNA was extracted and gene silencing efficacy found to typically range between 65-82% (Fig.5.5B). When expression of the primary cilium was evaluated (Fig.5.5A), only the NF- κ B p65 silencing prevented TNF- α from decreasing ciliogenesis (Fig.5.5C). This observation suggests that NF- κ B p65 acts as the primary ciliogenesis repressor in the TNF-mediated signaling axis.

5.7 Discussion

The link between inflammation and cancer is well recognized, but current research still continues to reveal new intricate mechanisms by which they cooperate (Balkwill et Mantovani, 2001 ; Mantovani *et al.*, 2008). In fact, the tumor inflammatory and hypoxic microenvironment results in conditions that trigger carcinogenic processes where the NF- κ B signaling axis is thought to play a critical role (Viatour *et al.*, 2005). In support, the oncogenic-related hypoxia condition has been shown to downregulate ciliogenesis in MSC, in part through the Wnt/HIF-1 signaling axis (Proulx-Bonneau et Annabi, 2011). In the current study, we further provide evidence that cells exposed to TNF- α -mediated inflammatory stimulation also tend to lose their primary cilia through NF- κ B-mediated signaling with crucial contributions from the IKK family members and NF- κ B p65. Altogether, the above combined hypoxic and inflammatory cues provide molecular evidence that support MSC oncogenic transformation capacity as reflected by their loss of the primary cilium biomarker.

Considering that most neoplastic tissues lack expression of the primary cilium and that MSC possess the capacity to migrate and transform within hypoxic and inflammation-prone sites of injury, it is tempting to consider monitoring ciliogenesis in pathologic conditions. It would be of interest to assess primary cilia expression in a variety of cancer cell lines in order to better understand its importance in tumorigenic conditions. In addition to primary cilium expression, several MSC biomarkers have been linked to the tumour-initiating phenotype of primary glioblastomas which express mesenchymal stem-like properties (Tso *et al.*, 2006). Interestingly, downregulation of the primary cilium in MSC was found to specifically inhibit their differentiation along the osteogenic and adipogenic, but not chondrogenic lineage (Tummala, Arnsdorf et Jacobs, 2010). Whether such cell differentiating processes, consequent to the loss of the primary cilia, are also differentially regulated in MSC transformation upon hypoxic and inflammatory cues remains to be investigated given

IFT88 expression was found unaffected by TNF- α in our cell system model. In support to our current study, neuroinflammation consequent to massive infiltration and activation of macrophages triggered IKK/NF- κ B-mediated signaling and was found to impair ependymal ciliogenesis (Lattke *et al.*, 2012). Recent evidence further supports the view that loss of the primary cilium occurs upon carcinogenic stimulation. As such, human renal proximal tubular epithelial cells treated with carcinogens such as ochratoxin A and potassium bromate resulted in the loss of the primary cilium (Radford *et al.*, 2012). In addition, cilia were found to be predominantly lost in renal cell carcinomas compared to tissue of the tumor parenchyma, suggesting that ciliary loss is a common process in renal tumorigenesis (Basten *et al.*, 2013).

How a decreased ciliogenesis phenotype is involved with cancer initiation or neuroinflammation is currently unknown and will require better understanding of the roles of ciliogenesis in cancer cell biology. Furthermore, how decreases in cilia expression dictate tumor growth, angiogenesis, immune suppression, or cancer cell proliferation also remain open questions. Cilia loss may possibly contribute to the sequence of cellular events leading to malignant tumor development. Interestingly, restoration of primary cilia in tumor cells was recently found to decrease tumor growth and suggests that such targeting may be a potential therapeutic approach for cholangiocarcinoma (Gradilone *et al.*, 2013). Ciliogenesis was recently linked to the centrosome which templates the assembly of the primary cilium. It is hypothesized that dysregulation of centrosome number, a process known to induce genome instability and tumor formation, triggers changes in cilium number and affects cilia-related disease phenotypes (Mahjoub, 2013).

In conclusion, our study highlights the possibility that tumor-associated inflammation may trigger primary cilia disappearance through NF- κ B signaling. Given that the tumour cells which proliferate within hypoxic and pro-inflammatory conditions also

lack this sensory organelle, it is tempting to suggest that intrinsic tumor-promoting signaling mechanisms triggered by inflammation also inhibit ciliogenesis. Future therapies aimed at restoring or circumventing cilia signaling might therefore aid in preventing the oncogenic processes involved in MSC transformation.

5.8 Acknowledgements

BA holds a Canada Research Chair in Molecular and Metabolic Oncology from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). This study was funded by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

5.9 Figures

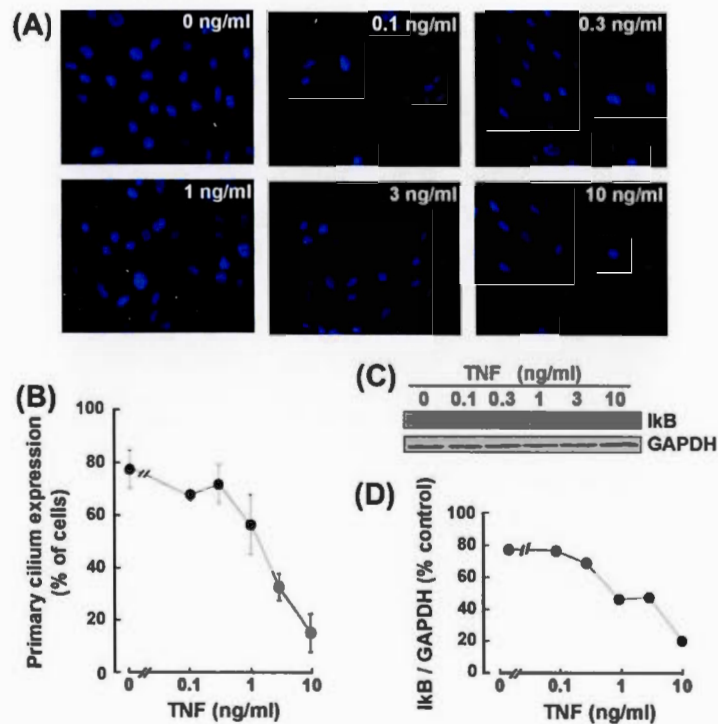


Figure 5.1 TNF- α abrogates primary cilia expression in mesenchymal stromal cells.

(A) MSC were seeded on coverslips for immunofluorescence and serum-starved in the presence of various concentrations of TNF- α for 18 hours. The coverslips were then fixed and incubated with anti-acetylated tubulin antibody, DAPI-stained, then visualised using a fluorescence microscope. (B) The number of primary cilia (in red) was counted in three different random locations for each condition and the cilia expression ratio determined as a proportion of the number of cells (in blue). Typically, 100-150 cells were evaluated. (C) Lysates of samples which underwent the various treatments were isolated, electrophoresed via SDS-PAGE and immunodetection was performed as described in the Methods section. (D) Quantification was performed by scanning densitometry of the autoradiograms for GAPDH and I κ B.

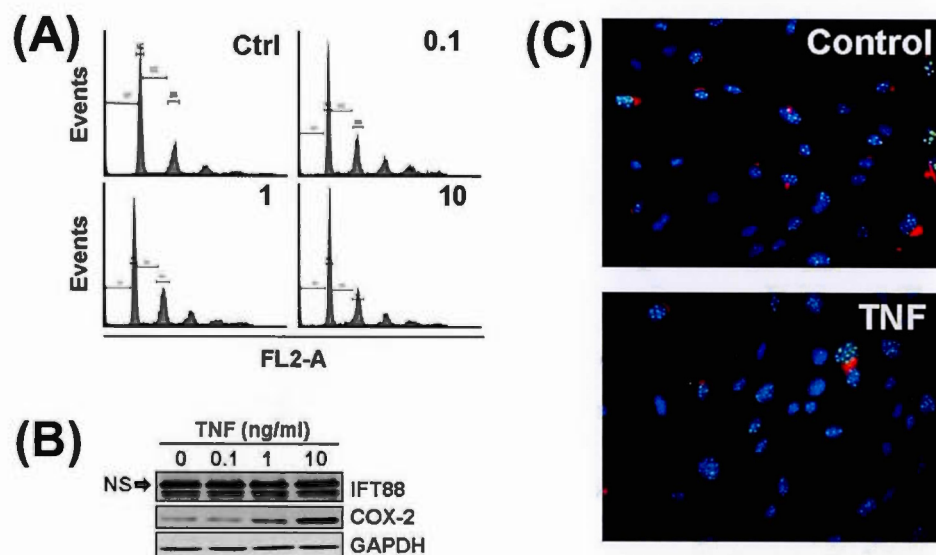


Figure 5.2 TNF- α -mediated cilia loss does not alter cell cycle phases and IFT88 nuclear expression.

MSC were serum-starved in the presence of various concentrations of TNF- α for 18 hours, then either **(A)** labeled for G0/G1, G2/M, and S cell cycle evaluation as described in the Methods section, or **(B)** total lysates isolated for immunoblotting detection of IFT88, COX-2, or GAPDH protein expression. **(C)** MSC were seeded on coverslips for immunofluorescence and serum-starved in the presence of vehicle (Control) or 10 ng/ml TNF- α for 18 hours. The slides were then fixed and incubated with antiacetylated tubulin antibody (red), anti-IFT88 (green), DAPI-stained (blue), then visualized using a fluorescence microscope. Typically, 100-150 cells were evaluated. NS: non specific.

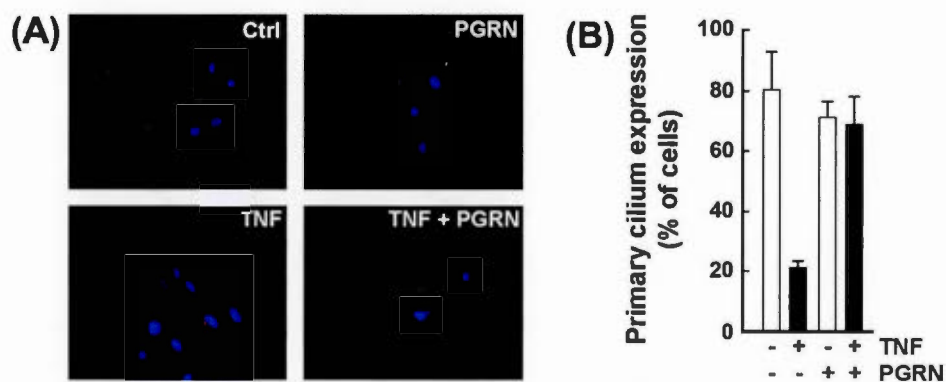


Figure 5.3 Progranulin reverses TNF- α -mediated cilia loss.

(A) MSC were seeded on coverslips for immunofluorescence and serum-starved in the presence of 10 ng/ml TNF- α and/or 10nM progranulin for 18 hours. The slides were then fixed and incubated with antiacetylated tubulin antibody, DAPI-stained, then visualized using a fluorescence microscope. Typically, 100-150 cells were evaluated. (B) The number of primary cilia (in red) was counted in three different random locations for each condition and the cilia expression ratio determined as a proportion of the number of cells (in blue).

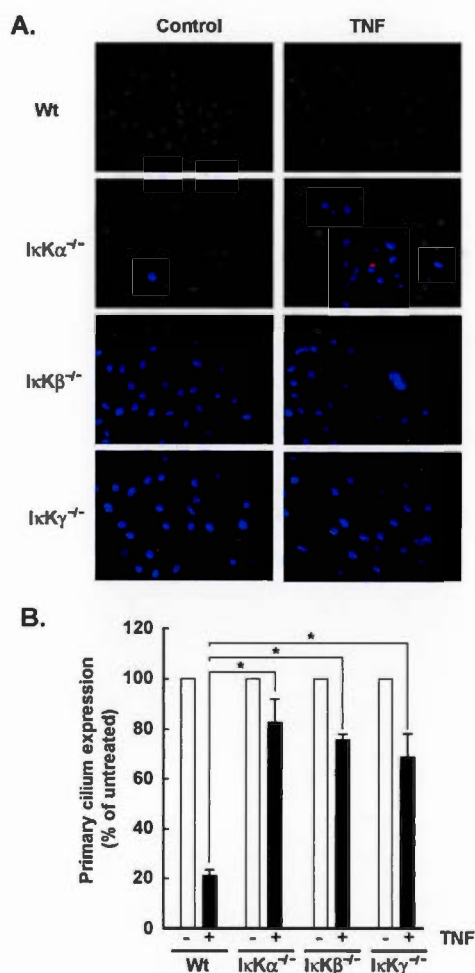


Figure 5.4 IKKs are required for TNF- α -mediated cilia loss.

(A) Four subtypes of mouse embryonic fibroblast cells (MEFs) : Wild Type (WT), IKK α ^{-/-}, IKK β ^{-/-}, and IKK γ ^{-/-} were seeded on coverslips for immunofluorescence and serum-starved in the presence of 10ng/ml TNF- α for 18 hours. The slides were then fixed and incubated with anti-acetylated tubulin antibody, DAPI-stained, then visualized using a fluorescence microscope. Typically, 100-150 cells were evaluated. (B) The number of primary cilia (in red) was counted in three different random locations for each condition and the cilia expression ratio determined as a proportion of the number of cells (in blue).

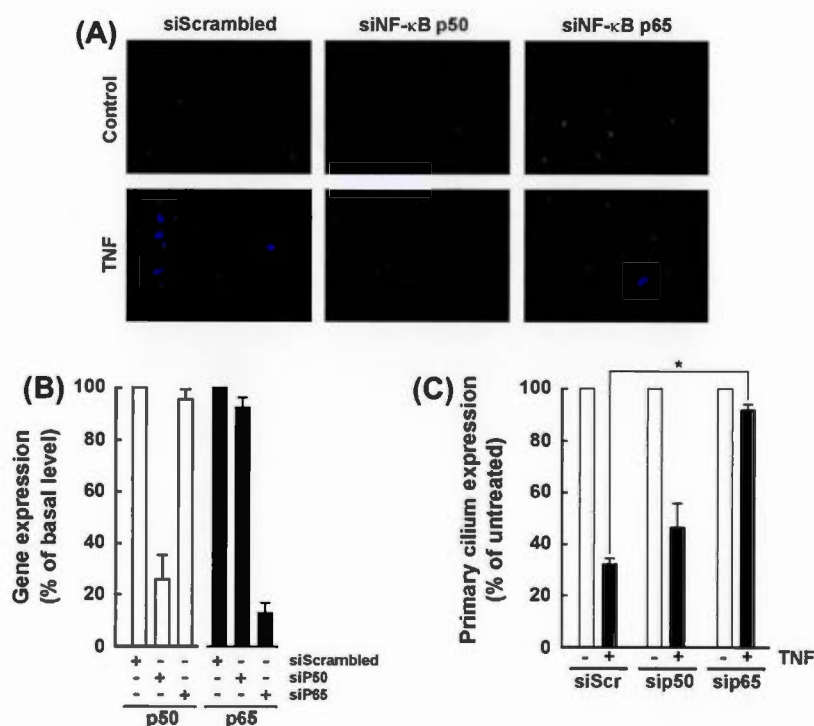


Figure 5.5 NF- κ B p65, but not NF- κ B p50, gene silencing abrogates TNF- α -mediated decrease in ciliogenesis.

MSC were seeded on coverslips and transiently transfected with siRNA against NF- κ B p50 (sip50), NF- κ B p65 (sip65) or with a scrambled sequence (si Scr). Cells were then serum-starved in the presence of vehicle (Control) or 10 ng/ml TNF- α for 18 hours. **(A)** The slides were then fixed and incubated with anti-acetylated tubulin antibody, DAPI-stained, then visualized using a fluorescence microscope. Typically, 100-150 cells were evaluated. **(B)** Total RNA was isolated from conditions described above, cDNA synthesis, and qPCR performed to assess the extent of p50 and p65 gene silencing. **(C)** The number of primary cilia (in red) was counted in three different random locations for each condition and the cilia expression ratio determined as a proportion of the number of cells (in blue).

CHAPITRE VI

DISCUSSION ET CONCLUSION

6.1 Généralités

Comme pour plusieurs cancers, le problème majeur des GBM demeure leur capacité à résister à la thérapie. Les GBM sont incurables. La plupart des symptômes semblent banals à première vue, rendant encore plus difficile leur diagnostic précoce (Chandana *et al.*, 2008). Ils incluent des maux de tête, des troubles digestifs, des changements comportementaux, des anomalies dans les mouvements et la position du corps, des faiblesses corporelles, des troubles sensoriels (vue, ouïe, équilibre), des étourdissements, de la fatigue et de l'épilepsie dans certains cas (Chandana *et al.*, 2008). Les mécanismes moléculaires et cellulaires à la base de ces symptômes méritent une attention particulière. Les GBM résistent à la médication et à la chirurgie puisqu'ils ont un très grand potentiel invasif et une possibilité de réplication illimitée (Ramirez *et al.*, 2013). La prolifération rapide des cellules tumorales corrèle avec la génération des signaux angiogéniques et inflammatoires. En conséquence, d'autres types cellulaires sont attirés au foyer tumoral pour contribuer aux mécanismes de croissance et prolifération cancéreuse. Les cellules astrocytaires se transforment et ne répondent plus aux signaux de mort afin de progresser dans l'oncogenèse. Les CEC s'adaptent aux changements du microenvironnement et contribuent à nourrir la tumeur par la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. En réponse aux signaux inflammatoires, prolifératifs et angiogéniques, les MSC se transforment aussi (Houthuijzen *et al.*, 2012 ; Yagi et Kitagawa, 2013). Ensemble, les CEC et les MSC promeuvent l'angiogenèse pour fournir l'oxygène et les nutriments nécessaires à la croissance de la tumeur solide.

La BHE est une imposante limite au traitement des GBM. La BHE est extrêmement sélective. Sa perturbation est associée à de l'ischémie cérébrale pouvant mener à de l'œdème vasculaire (Plateel, Teissier et Cecchelli, 1997). L'hypoxie est une des conditions menant à la perturbation de la BHE. Pour ce faire, elle induit principalement l'expression du transporteur de glucose, GLUT1, et du VEGF ainsi

que l'activité du facteur de transcription HIF1 α au sein des cellules du microenvironnement tumoral (Flynn *et al.*, 2008). L'hypoxie induit aussi le transport vésiculaire ce qui déstabilise les fonctions protectrices de la BHE (Plateel, Teissier et Cecchelli, 1997). Aujourd'hui, plusieurs stratégies thérapeutiques sont mises au point et étudiées dans le but de faire traverser la BHE aux médicaments destinés à guérir ou soulager les pathologies du SNC. À ce jour, des méthodes novatrices sont à l'étude comme l'utilisation de mécanismes osmotiques ou d'ultrasons pour perturber la BHE de façon transitoire, la confection d'agents pharmacologiques aux propriétés favorables au passage à travers la BHE, le raffinement de la structure de ces agents pharmacologiques, l'inhibition des mécanismes d'efflux (i.e. P-gp, MRP), l'utilisation de nanoparticules, de plus en plus populaire, et finalement, l'utilisation de vecteurs peptidiques comme l'An2 (Oberoi *et al.*, 2016). En plus de réussir à traverser la BHE, l'objectif est aussi de cibler efficacement les cellules malades avec la moindre cytotoxicité envers les cellules saines environnantes. Alors, il convient de mieux comprendre les systèmes de transport de la BHE afin de pouvoir éventuellement y faire traverser des médicaments ciblant des biomarqueurs potentiellement nuisibles à la santé du cerveau. Pour ce faire, il faut mieux définir, caractériser et reconnaître les mécanismes et les voies de signalisation impliqués dans les modulations cellulaires et moléculaires prenant part dans le microenvironnement tumoral très dynamique. Nous avons mis en évidence certains gènes, protéines et facteurs de transcription comme cibles dans le processus fondamental de la découverte de traitements efficaces contre les cancers du cerveau.

6.2 Les cellules du microenvironnement tumoral acquièrent des phénotypes adaptatifs favorables à leur survie et à l'oncogenèse

Les interactions entre les cellules du microenvironnement tumoral contribuent grandement au développement et à la progression du cancer. Chaque type cellulaire s'adapte pour faire évoluer la tumeur. Les interactions cellule-cellule et cellule-MEC

dans une tumeur solide lui fournissent des signaux prolifératifs, angiogéniques, métaboliques et inflammatoires essentiels à sa survie. Les travaux de cette thèse ont permis de définir certains processus adaptatifs et leurs cibles signalétiques au cœur de l'oncogenèse cérébrale afin de faire un pas de plus dans la compréhension de la progression tumorale. Dans un premier temps, cela a permis d'identifier de quelle façon les cellules répondaient à un stress hypoxique dans le but de faire pénétrer l'An2 dans le cerveau par transcytose, entre autres, par LRP1. Ces travaux s'inscrivent parmi ceux qui ont contribué au succès de la molécule An2, maintenant en études cliniques de phase III, avec comme principal objectif de traiter les métastases cérébrales des patientes atteintes de cancer du sein métastatiques (Inc., 2016 ; O'Sullivan *et al.*, 2016). Dans un deuxième temps, nous avons approfondi les connaissances sur le rôle important de LRP1 dans la migration cellulaire stimulée par un lipide bioactif pro-angiogénique et pro-inflammatoire, la SIP. Dans un troisième temps, nous avons établi que la ciliogenèse des MSC était régulée par la voie NF- κ B lorsque modulées par les molécules inflammatoires TNF α et PGRN. En somme, nous avons découvert des particularités adaptatrices spécifiques aux trois compartiments cellulaires que représentent les cellules de GBM, les MSC et les CEC. Nous améliorons notre compréhension fondamentale de leur implication respective dans l'oncogenèse, mais aussi dans les mécanismes associés aux caractéristiques du cancer : l'expression différentielle de récepteurs responsables de l'internalisation de médicaments en contexte hypoxique, la réponse aux molécules pro-angiogéniques sécrétées dans le microenvironnement tumoral ainsi que l'inflammation associée au cancer.

6.2.1 Les cellules tumorales et endothéliales cérébrales répondent de façon différentielle à l'hypoxie

Dans certains cancers, la diminution de l'expression de LRP1 corrèle avec un pronostic défavorable (Van Gool *et al.*, 2015). Pourtant, dans certaines lignées de

GBM, l'expression de LRP1 est augmentée (Maletinska *et al.*, 2000). LRP1 est un récepteur membranaire aux multiples fonctions (Van Gool *et al.*, 2015). Parmi ces fonctions, il a la capacité d'internaliser plusieurs types de ligands. Il a été montré que l'internalisation de l'An2 se fait en partie par LRP1 (Demeule *et al.*, 2008a). Puisque l'internalisation résiduelle de l'An2 est inconnue, nous avons voulu connaître les mécanismes compensatoires responsables de son entrée dans les cellules endothéliales et tumorales cérébrales. Nous avons identifié que les protéines des familles des SDC et des Vps10p-D modulent la reconnaissance et l'internalisation de l'An2. Ces protéines sont exprimées de façon différentielle entre les types cellulaires étudiés. Plus spécifiquement, les protéines de la famille des SDC sont plus fortement exprimées dans les cellules U87 et HBMEC normales en comparaison aux cellules HBMEC immortalisées (HBMECi). La famille des récepteurs Vps10p-D est plus fortement exprimée dans les cellules HBMECi que dans les U87 et les HBMEC. Cependant, nous avons observé que selon le caractère prolifératif des cellules, les cellules au potentiel de réplication illimité (U87 et HBMEC-SV40, représentant l'endothélium vasculaire tumoral) ont une meilleure capacité à internaliser l'An2 en comparaison aux HBMEC normales (primaires), qui elles, sont meilleures pour reconnaître et lier l'An2 en partie grâce aux récepteurs de surface membranaire. Ce caractère différentiel entre les CEC et les cellules tumorales cérébrales transformées s'explique, en partie, par le positionnement et la compartimentation dans la cellule des protéines LRP1, SDC et Vps10p-D. Nous montrons que la liaison de l'An2 pourrait se faire par LRP1 et sortilin à la surface des CEC tandis que LRP1 et les SDC2 et SDC4 pourraient être responsables de l'internalisation de l'An2 dans les cellules U87. Il est connu que la SDC2 est hautement exprimée dans plusieurs lignées tumorales (Essner, Chen et Ekker, 2006). D'autres études ont démontré que les SDC sont de bons candidats pour lier des médicaments destinés à traiter le cancer (Lindahl, 2007). Des rôles dans l'Alzheimer et dans l'anti-angiogenèse tumorale ont aussi été évoqués (Lindahl, 2007). Une diversité de ligands est connue pour lier les SDC. Ils incluent le FGF2, les polyplexes ADN-peptide, les anticorps anti-HS conjugués à des

nanoparticules et le VLDL puis ils sont internalisés par des radeaux lipidiques (Christianson et Belting, 2014). La chaîne HS des SDC a une charge hautement négative leur permettant de lier ces divers ligands (Lindahl, 2007). Récemment, des travaux ont démontré l'utilité des SDC à lier l'AG73-Dox, des liposomes modifiés par le peptide encapsulé AG73 et conjugués à la doxorubicine. Améliorant la pénétrance de la doxorubicine dans les tissus et les cellules, il s'agit d'un bon exemple de candidat vecteur peptidique pour traiter certains cancers (Negishi *et al.*, 2011). La SDC4 s'est également révélée être efficace dans l'internalisation de CPP (Letoha *et al.*, 2010). Quant à la sortilin, elle est reconnue comme le récepteur de la neurotensine et du facteur de croissance neuronale. Fortement exprimée dans l'appareil de Golgi, elle médie le tri intracellulaire des enzymes lysosomales et joue un rôle dans la phagocytose (Wahe *et al.*, 2010). Le premier ligand ayant été reconnu pour lier la sortilin est la protéine RAP (Tauris *et al.*, 1998). Environ 5 à 10% du «pool» de sortilin se trouve à la surface cellulaire, lui permettant d'avoir un rôle dans l'internalisation de ligands (Mazella, 2001). Néanmoins, peu d'études ont été réalisées sur son rôle endocytaire à la membrane cellulaire. Nos travaux révèlent de nouvelles pistes concernant l'étude de la sortilin en tant que récepteur membranaire. De plus, nos résultats corrélerent avec la colocalisation de l'An2 avec les lysosomes dans les U87 et les HBMECi. Cette colocalisation est en accord avec la théorie qui veut que le vecteur peptidique soit clivé de la drogue, dégradé, puis la drogue relâchée dans le parenchyme cellulaire (Demeule *et al.*, 2008a). Ainsi, puisque la sortilin se trouve fortement exprimée dans l'appareil de Golgi ainsi qu'impliquée dans la phagocytose, il s'agit d'une protéine intéressante dans le compartimentation cellulaire de vecteur peptidique comme l'An2.

Par ailleurs, nous montrons que certaines caractéristiques microenvironnementales, comme de très faibles niveaux d'oxygène, ont un impact sur la capacité des sous-types cellulaires à reconnaître et à internaliser l'An2. En plus d'avoir montré que les cellules endothéliales et les cellules tumorales présentent des patrons d'expression

différents des gènes des récepteurs responsables de l'internalisation de l'An2, nous avons étudié l'impact de conditions hypoxiques sur leur expression. Dans la littérature, il a été rapporté que l'hypoxie et le sevrage induisent l'expression de la protéine LRP1 suggérant l'augmentation de l'internalisation de l'An2 (Bertrand *et al.*, 2011). Incidemment, c'est ce que nous avons observé. Il est intéressant de voir que l'hypoxie induit des facteurs pro-angiogéniques, mais aussi des protéines et des enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique (Dang, 2012 ; Jensen, 2009). C'est pourquoi lorsque nous étudions l'impact de l'hypoxie dans des modèles *in vitro*, la mesure de l'expression de VEGF et de GLUT1 sert de validation de l'activation de la transcription de ces gènes par le HIF1 α et donc par l'absence d'oxygène dans le système (Womeldorff, Gillespie et Jensen, 2014). Nous avons montré que l'hypoxie induit le niveau de liaison et de reconnaissance de l'An2 dans les HBMEC et les U87 et l'internalisation de l'An2 dans les U87 seulement. Ces mécanismes peuvent être médiés par les protéines membranaires LRP1, SDC2, SDC4 et sortilin. L'hypoxie est la condition centrale et déterminante de l'oncogenèse des tumeurs solides. L'hypoxie est un important dénominateur du pronostic chez le patient qui présente une tumeur menée par un phénotype hypoxique (Dhani *et al.*, 2015). L'hypoxie est ainsi elle-même une cible thérapeutique potentielle. Le manque d'oxygène au sein des tumeurs promeut des changements dans la transduction du signal intracellulaire, mais il induit aussi des transformations cellulaires, en partie reliées aux changements métaboliques. Dans cette étude, nous avons mis l'hypoxie à contribution et confirmé un rôle positif pour cette dernière dans le potentiel thérapeutique cancéreux. Nous avons démontré l'utilité de l'hypoxie à modifier les caractéristiques et comportements des cellules. Nous montrons que même en conditions hypoxiques, les cellules s'adaptent en exprimant de façon différentielle les récepteurs responsables de la liaison et l'internalisation de l'An2 pour la faire pénétrer dans les cellules et surtout lui faire traverser la BHE malgré qu'elle soit perturbée par le caractère inflammatoire et invasif du GBM. Son transport est médié

par les récepteurs membranaires de type I induits dans le cancer du cerveau et impliqués dans l'endocytose.

Nos travaux présentent certains biais de sélection. En effet, nous avons étudié les mécanismes d'internalisation et de reconnaissance de l'An2 dans la lignée cellulaire tumorale U87 seulement. Il serait pertinent de comparer les mécanismes adaptatifs identifiés dans cette étude avec d'autres lignées de GBM qui expriment de manière différente les mêmes protéines membranaires. Par exemple, il existe plusieurs lignées de glioblastome de grade IV, mais aussi des lignées cellulaires provenant d'astrocytome de plus bas grade ou pédiatrique. Cela nous permettrait de déterminer le profil complet d'expression protéique et génique des récepteurs d'intérêt selon la gravité et l'agressivité tumorale. Dans cette même étude, les mesures d'An2 auraient pu aussi être effectuées par radiomarquage (Demeule *et al.*, 2008b). De cette façon, nous aurions pu visualiser et mesurer différemment l'internalisation d'An2 dans les cellules hypoxiées. En ce qui a trait à l'étude de l'expression de la localisation des différentes protéines membranaires, un marquage immunofluorescent aurait permis la visualisation microscopique de leur emplacement. De plus, on aurait pu visualiser la colocalisation de l'An2 avec ces protéines en utilisant un double marquage ainsi qu'une analyse en temps réel de la localisation et du trafic au niveau du réseau trans-Golgi, par exemple, un peu comme nous avons fait avec le marquage des lysosomes. Il serait aussi pertinent de caractériser plus finement le transport de l'An2 au travers de la BHE. Premièrement, il serait approprié de caractériser l'impact de cytokines pro-inflammatoires sur l'internalisation de l'An2 étant donné que l'inflammation tumorale est souvent associée à la perturbation de la BHE, en favorisant le recrutement de cellules immunes (TAM et MSC) au site tumoral (Sowers *et al.*, 2014). D'autres travaux ont déjà été faits en changeant le pH du milieu de culture cellulaire. Il a été montré que l'acidification du milieu inhibe la capture de l'An2 (Bertrand *et al.*, 2011). Avec toutes ces informations, il devient encore plus intéressant de reconnaître l'An2 comme une méthode de traitement non invasive

novatrice qui consiste à utiliser les dispositions de la BHE comme alternative aux méthodes invasives telle la chirurgie (Tajes *et al.*, 2014). Dans un but thérapeutique, l'étude de l'efficacité d'utilisation de l'An2 peut se réaliser dans des modèles *in vivo*, en se servant de la molécule d'An2 radiomarquée (Thomas *et al.*, 2009). Cette technique a déjà été utilisée dans des modèles tumoraux, mais elle pourrait maintenant aussi être utilisée dans des modèles de souris n'exprimant pas une ou l'autre des protéines impliquées dans l'internalisation de l'An2. Cela permettrait de comprendre sa distribution systémique, son efficacité à pénétrer la tumeur et d'entrer au minimum dans les tissus sains. De plus, l'utilisation d'un modèle de BHE en co-culture de cellules endothéliales et cellules tumorales serait un bon outil pour caractériser le passage de l'An2 du compartiment endothélial au compartiment tumoral en plus de mieux définir l'impact des protéines d'efflux (Wilhelm et Krizbai, 2014). Dans ce genre de modèle expérimental, les cellules endothéliales seraient en contact avec les molécules sécrétées par les cellules tumorales. Cela permettrait de mieux évaluer l'impact des interactions cellules-cellules dans le contexte d'utilisation thérapeutique de l'An2.

6.2.2 LRP1 est important dans l'adaptation oncogénique des cellules microvasculaires endothéliales en réponse à la S1P.

En plus d'avoir un rôle important dans l'internalisation des molécules d'Angiopeps, LRP1 est essentiel au maintien de l'intégrité vasculaire (Candela *et al.*, 2015 ; Lillis, Mikhailenko et Strickland, 2005 ; Strickland *et al.*, 2014). De ce fait, nous avons voulu connaître l'importance de LRP1 dans les phénomènes reliés à la progression tumorale. En nous attaquant au concept de migration cellulaire stimulée par la S1P, nous avons constaté que LRP1 est un joueur clé dans la migration des HBMECi. En l'absence de LRP1, les HBMECi ne migrent plus en réponse à la S1P. Le rôle de LRP1 est très connu dans le métabolisme des lipides et dans la maladie d'Alzheimer (Xing *et al.*, 2016). Comme mentionné précédemment, le récepteur LRP1 peut

reconnaître une panoplie de ligands tels que des protéases, des protéines de la matrice extracellulaire, des facteurs de croissance, des toxines et des protéines virales (Van Gool *et al.*, 2015). La reconnaissance de ces ligands leur permet soit d'être internalisés ou d'activer des voies de signalisation subséquentes. LRP1 peut également interagir avec d'autres récepteurs tels que les intégrines et le PDGFR β (Gonias, Gaultier et Jo, 2011 ; Muratoglu *et al.*, 2010). Toutes ces interactions lui permettent d'agir au niveau des mécanismes d'apoptose, d'invasion, de prolifération et de migration via l'activation des voies MAPK, AKT et NF- κ B (Xing *et al.*, 2016).

Dans la littérature, il est montré que LRP1 a un rôle direct dans la migration de plusieurs types cellulaires. Par exemple, la protéine RAP antagonise la liaison de tout ligand à LRP1, diminuant ainsi la migration cellulaire (Lillis, Mikhailenko et Strickland, 2005). Il est aussi connu que la liaison de l'Apolipoprotéine E (ApoE) à LRP1 bloque la migration des cellules musculaires lisses (Boucher *et al.*, 2003). De plus, LRP1 induit les niveaux de MMP-2 et MMP-9, deux de ses cibles signalétiques en aval, et cela corrèle avec une augmentation de la migration des cellules U87 tandis que la répression stable de LRP1 diminue la migration des cellules U87 (Song *et al.*, 2009). L'interaction de LRP1 avec le récepteur de l'uPA (uPAR) induit la migration cellulaire (Wujak, Markart et Wygrecka, 2016). La déplétion de LRP1 altère aussi l'endocytose de protéases et la dégradation de la MEC s'en trouve augmentée, permettant d'être remodelée et de faire place à la migration et l'invasion cellulaires associées au cancer (Wujak, Markart et Wygrecka, 2016). La répression stable de LRP1 dans des souris est fatale puisqu'elle mène à l'arrêt de leur développement (Herz, Clouthier et Hammer, 1992). Avec nos travaux, nous avons montré que la répression stable plutôt que transitoire de LRP1 empêche les HBMEC de migrer en réponse à la S1P. Pour ce faire, nous avons utilisé un modèle de souris spécifiquement réprimée de LRP1 dans les cellules endothéliales afin de montrer son importance dans la modulation des réponses cellulaires comme la migration en réponse à la S1P. Ce lipide bioactif a comme rôle physiologique de maintenir

l'intégrité de la BHE en protégeant sa perméabilité (Azzi, Hebda et Gavard, 2013). La S1P est aussi une molécule inductrice de la formation de structures capillaires à partir des MSC (Annabi *et al.*, 2003b). Elle peut aussi inhiber la tubulogenèse des CEC (Pilorget *et al.*, 2005).

La migration cellulaire est un mécanisme qui nécessite l'activation de voies de signalisation passant par les MAPK. Nous avons montré que LRP1 semble important dans l'activation de la signalisation des MAPK ERK et p38 en réponse au S1P. Récemment, il a été démontré que l'activation de p38 et ERK par la S1P se fait via l'activation des récepteurs EGFR et PDGFR dans les cellules pulmonaires alvéolaires épithéliales (Lin *et al.*, 2015). La S1P induit certains facteurs angiogéniques et inflammatoires : VEGF et MMP2 dans les cellules endothéliales (Heo *et al.*, 2009 ; Sun *et al.*, 2010) ainsi que COX-2 dans les cellules vasculaires musculaires lisses (Hsieh *et al.*, 2006). Les lysophospholipides sécrétés normalement par les plaquettes sont capables d'induire le «remodelage» du cytosquelette ayant été montré pour favoriser la migration des cellules endothéliales dans la cicatrisation et l'angiogenèse (Lee, Goetzl et An, 2000 ; Lee *et al.*, 1999). Nous aurions également pu montrer l'activation, l'induction ou la sécrétion de protéines et de gènes qui favorisent la migration cellulaire. La S1P induit le processus de migration potentiellement relié à l'induction d'enzymes de dégradation de la MEC, comme les MMP, très fortement présentes dans les cancers de haut grade et hautement invasifs qui nécessitent une forte présence angiogénique, quoique chaotique. Puisque LRP1 interagit avec les MMP et d'autres protéines de la MEC, il est possible que cela affecte la migration des HBMEC stimulées par la S1P. En absence de LRP1, les MMP sécrétées par les tumeurs ne peuvent interagir avec la surface cellulaire des CEC pour induire la dégradation de la MEC et promouvoir leur déplacement vers le site tumoral. Dans notre étude, nous montrons que c'est S1P3 qui semble réguler la migration des HBMEC et que cela peut se produire via les voies MAPK, il pourrait s'agir de l'activation de la protéine Gai. Nous aurions pu confirmer cette signalisation avec

l'utilisation d'agonistes ou d'antagonistes spécifiques des récepteurs de S1P. Étant donné que la S1P est un facteur oncogénique reconnu pour promouvoir la progression tumorale, plusieurs agonistes et antagonistes ont été mis au point comme potentielle thérapie ciblant les récepteurs de S1P (Watters *et al.*, 2011). Par exemple, les antagonistes connus de S1P1, S1P2 et S1P3 sont les W146, JTE-013 et CAY10444 respectivement (Kong *et al.*, 2014). Un des agonistes connus pour les récepteurs S1P1, S1P3 et S1P5 est le FTY720 (Roberts *et al.*, 2013). Il a d'ailleurs été prouvé que les récepteurs S1P1 et S1P3 induisent la migration des cellules souches dérivées de la moelle osseuse tandis que le S1P2 l'inhibe (Kong *et al.*, 2014). Étant donné que les récepteurs de la S1P sont couplés aux protéines G, ils activent plusieurs seconds messagers en aval qui peuvent interagir de façon croisée (*cross-talk*) pour activer ou inhiber les processus cellulaires tels que la prolifération, la croissance et la migration. Il serait alors approprié d'étudier l'impact de l'interrelation de LRP1 et de la signalisation de S1P et de ses récepteurs sur d'autres seconds messagers comme l'adénylate cyclase, la phospholipase C, la voie de PI3K/Akt et les GTPases Rho et Ras. De cette façon, nous pourrions mieux caractériser la spécificité de l'importance de LRP1 vis-à-vis de la migration des cellules endothéliales en réponse au S1P.

Nous montrons également que la répression transitoire avec un siRNA contre le facteur de transcription C/EBP β inhibe l'expression des récepteurs de S1P. Avec une analyse bio-informatique simple, nous avons prédit que la régulation transcriptionnelle des récepteurs de S1P pourrait se faire en grande partie par le facteur de transcription C/EBP β . Il serait avantageux d'effectuer des essais de EMSA, d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) ou de gène rapporteur afin de confirmer l'interaction entre les séquences de C/EBP β et les promoteurs des récepteurs de S1P. Cependant, nous pouvons émettre l'hypothèse que cette régulation est probable puisque le nombre de séquences correspondant à celle de C/EBP β est très élevé dans les séquences promotrices des récepteurs de S1P en comparaison aux autres séquences d'autres facteurs de transcription. Entre autres facteurs de

transcription probables de réguler la transcription des récepteurs de S1P, il y a le récepteur de glucocorticoïdes α (GR α). Il joue un rôle dans la prolifération et la différenciation cellulaires, en se liant aux éléments de réponse GRE ou nGRE (négatif), et il active ou réprime la transcription de gènes cibles (Buckingham, 2006). Il a aussi été montré qu'il peut directement interagir avec le C/EBP β (Boruk, Savory et Hache, 1998). Peut-être aurait-il donc un impact sur la modulation à la hausse ou à la baisse de la transcription des gènes des récepteurs de S1P. Des séquences du facteur de transcription multifonctionnel TFII-1 se retrouvent aussi dans les séquences promotrices des récepteurs de S1P. Le TFII-1 joue un rôle dans la signalisation par les facteurs de croissance (Hakre *et al.*, 2006). Le facteur de transcription de la famille *paired box protein* (Pax-5), quant à lui, joue un rôle dans le développement embryonnaire (Funahashi *et al.*, 1999). Son expression a été détectée dans le SNC (Adams *et al.*, 1992). Cela peut expliquer sa forte présence dans la séquence du promoteur du récepteur S1P5. Enfin, le facteur de transcription Yin Yang 1 (YY1) joue un rôle dans la biosynthèse du cholestérol et dans la régulation du cycle cellulaire (Hakre *et al.*, 2006 ; Thiaville et Kim, 2011). En somme, nous montrons que LRP1 est important pour l'expression de C/EBP β et donc pour les récepteurs de S1P. La répression de LRP1 inhibe l'expression de C/EBP β . LRP1 aurait donc un rôle dans la régulation transcriptionnelle des récepteurs de S1P en modulant l'expression de C/EBP β . La répression de C/EBP β est aussi connue pour diminuer la prolifération, la viabilité, l'invasion, l'angiogenèse et les métastases et pour augmenter l'apoptose des GBMs (Aguilar-Morante *et al.*, 2011).

6.2.3 La ciliogenèse des cellules souches mésenchymateuses est modulée par une signalisation inflammatoire.

Depuis 1969, la ciliogenèse est étudiée dans trois principaux modèles : l'organisme unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*, le nématode *Caenorhabditis elegans* et les cellules embryonnaires fibroblastiques de mammifères (Wann et Knight, 2012a ;

Wheatley, 1969). Le cil primaire est maintenant de plus en plus étudié dans les lignées cellulaires animales et humaines. L'altération de la longueur du cil primaire est associée à la plupart des ciliopathies (Miyoshi *et al.*, 2011). La longueur du cil primaire est modulée par les niveaux de Ca^{2+} , de phosphorylation, de l'augmentation de l'AMPC, de la PKC et des MAPKs, mais plus précisément, elle est augmentée par l'interleukine 1 (IL1), un modulateur de la transduction du signal inflammatoire (Wann et Knight, 2012a). On reconnaît aussi un rôle pour les protéines IFT dans l'élongation du cil primaire en condition inflammatoire (Wann et Knight, 2012b). Alors que le cil primaire est absent dans plusieurs cancers (carcinome du rein, sein, mélanome, médulloblastome, pancréas), il est requis pour l'activation des voies de signalisation Notch, Sonic-Hedgehog (Shh), PDGF, mTOR et Wnt dans les cellules normales (Hassounah, Bunch et McDermott, 2012 ; Mahjoub, 2013). Depuis quelques années, il existe une corrélation entre la transformation cellulaire associée au développement tumoral et le cil primaire (Plotnikova, Golemis et Pugacheva, 2008). Il a été montré que le cil primaire joue un rôle important dans la différenciation et la signalisation des cellules souches qui contribuent au développement embryonnaire (Veland *et al.*, 2009). Le cil primaire possède le PDGFR et la signalisation par la voie de Sonic Hedgehog (Seeger-Nukpezah et Golemis, 2012). La modulation de la voie Shh dans le cil primaire est étroitement reliée au développement tumoral (Tasouri et Tucker, 2011). L'impact du $TNF\alpha$ sur le cil primaire a aussi été observé pour moduler le développement de la polykystose rénale (Li *et al.*, 2008). Le cil primaire, en tant qu'organelle sensorielle, sert à définir le patron de différenciation, autant dans le développement embryonnaire que tumoral, mais aussi au niveau des cellules souches (Han et Alvarez-Buylla, 2010). Son rôle dans la progression tumorale est d'autant plus significatif puisqu'il est en relation directe avec la MEC (Seeger-Nukpezah et Golemis, 2012). Sa perte mène à de nombreux défauts de signalisation, rajoutant aux multiples caractéristiques néfastes des cellules cancéreuses. Outre la nécessité de la présence du cil primaire pour certaines voies de signalisation, nous avons montré qu'il peut aussi être modulé par la

voie de signalisation passant par NF- κ B. La stimulation pro-inflammatoire par le TNF α représente l'action paracrine de cellules tumorales sécrétant des cytokines inflammatoires.

Les MSC ont la particularité d'avoir deux destinées distinctes. Premièrement, elles sont très étudiées pour leur potentiel thérapeutique, particulièrement au niveau des maladies métaboliques ou du système nerveux central (Nishikawa, Goldstein et Nierras, 2008). Deuxièmement, les MSCs ont un rôle significatif dans la progression tumorale (Hong, Lee et Kang, 2014). Notamment, l'activation des MSC par le TNF α a montré significativement induire le volume de tumeurs de la peau et du sein suite à leur recrutement au foyer tumoral puis à leur contribution à la progression et la croissance cellulaire cancéreuse (Ren *et al.*, 2012 ; Yu *et al.*, 2016). Ainsi, selon l'hypothèse soutenant le recrutement et la contribution des MSC au développement de la tumeur, il convient de souligner que la perte du cil primaire perturberait des voies de signalisation importantes à la prolifération et différenciation. Les MSC sont recrutées au foyer tumoral par des signaux inflammatoires et angiogéniques (Yagi et Kitagawa, 2013). Leur accumulation à la tumeur en fait de bonnes candidates comme vecteur de thérapie. Elles possèdent des récepteurs à chemokines et cytokines. Le TNF α permet l'adhésion des MSC aux CE pendant que le facteur de transcription NF- κ B régule leur accumulation via VCAM1 (Uchibori *et al.*, 2013). Dans le but de réguler leur autorenouvellement et leur niveau de différenciation, les cellules souches et les cellules tumorales activent des voies de signalisation similaires : Wnt, BMP, MAPK, Notch (Qiao *et al.*, 2008). Récemment, un rôle pour RelB, une sous-unité de NF- κ B, a été établi dans la modulation de l'oncogenèse par les MSC (Lee *et al.*, 2013a). Nous avons montré que la régulation du cil primaire par le TNF dans les MSC n'était pas synchronisée avec le cycle cellulaire contrairement à ce qui est connu dans la littérature par rapport aux cellules qui prolifèrent (Goto, Inoko et Inagaki, 2013). En comparaison à la littérature, nos résultats concernant l'effet du TNF α dans les MSC et la ciliogenèse corrélaient avec le fait que les cytokines sont

importantes dans les relations entre les MSC et les cellules tumorales cérébrales (Motaln et Turnsek, 2015). Dans la littérature, la protéine IFT88 est associée au processus d'assemblage du cil primaire, colocalisant avec le centrosome durant la progression des cellules à travers les phases du cycle cellulaire (Robert *et al.*, 2007). Cependant, nous avons montré que la protéine IFT88 était toujours localisée au noyau des MSC sous l'influence du $TNF\alpha$. Puisque nous n'avons pas remarqué d'association entre le cycle cellulaire et la régulation inflammatoire du cil primaire dans les MSC, il est logique de voir que l'IFT88 est toujours localisé au noyau. Il a d'ailleurs été montré que la protéine IFT88 a un impact sur la migration de cellules épithéliales indépendamment de son rôle régulateur du cil primaire (Boehlke *et al.*, 2015). L'utilisation d'un siRNA contre la protéine IFT88 aurait pu aussi nous servir à déterminer son rôle dans le contexte inflammatoire des MSC. Cet outil a d'ailleurs déjà servi à montrer le rôle de IFT88 dans la localisation de β -caténine au noyau et dans la signalisation de Wnt, dans la ciliogenèse des MSC (McMurray *et al.*, 2013).

6.3 Conclusion

Dans le but de caractériser les mécanismes moléculaires et cellulaires régulant le caractère infiltrant et invasif des tumeurs cérébrales, nous avons utilisé des techniques de biochimie classique et de biologie moléculaire pour comprendre comment divers types cellulaires s'adaptent dans des conditions retrouvées au sein du microenvironnement tumoral. Les travaux présentés dans cette thèse sont des études très fondamentales rapportant des mécanismes adaptatifs qui se produisent dans les compartiments tumoraux et endothéliaux ainsi que dans les cellules souches mésenchymateuses. Nous avons mis en évidence des protéines, des gènes et des voies de signalisation modulés par des conditions favorables à la progression des GBMs. Le cerveau est l'organe le plus complexe du corps humain. Les dérégulations observées lors de cancers sont d'autant plus complexes. L'hypoxie fait partie des

facteurs limitant la thérapie des maladies du SNC telles les GBM (Zhang, Xu et Liu, 2015).

L'hypoxie est au centre des phénomènes adaptatifs qui régissent le caractère tumoral. Parmi les caractéristiques tumorales fondamentales (Figure 1.11), l'inflammation et l'angiogenèse ont été au cœur de nos travaux de recherche. Ils sont en partie responsables de la progression tumorale. Ensemble, ils favorisent les transformations des cellules du microenvironnement tumoral. Plusieurs biomarqueurs angiogéniques sont sécrétés dans le microenvironnement tumoral pour faciliter les interactions cellule-cellule. Nous avons identifié une réponse différentielle à l'hypoxie entre les cellules de GBM et les CEC. Ainsi, nous avons pu étudier le comportement de ces cellules dans leur capacité à internaliser l'An2. Nous avons remarqué des changements phénotypiques représentatifs des mécanismes adaptatifs qui se produisent au sein d'une tumeur solide.

Le cancer du cerveau demeure difficile à traiter. Malgré les efforts qui sont déployés, les stratégies thérapeutiques ne font que régler une partie du problème des tumeurs primaires cérébrales. Les récives liées au caractère invasif et à la présence de cellules souches cancéreuses sont très fréquentes (Haar *et al.*, 2012 ; Lathia *et al.*, 2015 ; Seymour, Nowak et Kakulas, 2015 ; Xie, Mittal et Berens, 2014). Des thérapies ciblant les caractéristiques du cancer sont mises au point depuis quelques années (Hanahan et Weinberg, 2011). Certains traitements s'avèrent efficaces alors qu'ils ciblent un caractère spécifique du microenvironnement tumoral, tel est le cas du bevacizumab, un anticorps monoclonal dirigé contre le VEGF-A approuvé par la FDA en 2009 (Verhoeff *et al.*, 2009). Le but de la thérapie antiangiogénique est de normaliser la vasculature et de restaurer l'intégrité de la BHE. Les thérapies antiangiogéniques sont présentement le meilleur espoir de guérison des GBM. Par contre, les tumeurs récidivent presque tous vu le caractère très infiltrant des tumeurs de haut grade. De plus, il a été montré que des médicaments antiangiogéniques

réduisaient l'efficacité du témozolomide (TMZ) (Wick *et al.*, 2011). Toutefois, avec les années et les récentes études sur les GBM, on se rend compte que les cellules acquièrent des phénotypes qui favorisent la résistance à la monothérapie. Ainsi, il convient de commencer à penser à cibler et à co-traiter plusieurs caractéristiques tumorales en même temps avec les médicaments spécifiques appropriés (Hanahan, 2014). La diversité des caractéristiques tumorales nous amène à vouloir étudier et expliquer celles-ci plus en détail. Cela permet la meilleure compréhension des transformations cellulaires au centre de la progression des GBM. En étudiant les voies signalétiques impliquées, on fait un pas de plus vers la personnalisation de la médication anticancéreuse. On identifie des biomarqueurs comme futures cibles thérapeutiques déterminantes de la signature moléculaire tumorale permettant de mieux traiter le caractère inflammatoire et angiogénique des GBM. Il y a des mutations spécifiques (mentionnés à la section 1.1.2) des GBM servant de cible directe à la thérapie. Par contre, les mécanismes de résistance des GBM font en sorte qu'il demeure de comprendre la signalisation entourant les modifications génétiques et de mieux cibler les protéines ou les gènes des voies signalétiques mutées.

D'un côté, nous avons approfondi les connaissances entourant les mécanismes d'internalisation du peptide prometteur An2. Nous avons montré que ce peptide pénètre dans les cellules par diverses protéines membranaires, et ce, même en contexte hypoxique, un état selon lequel les cellules du microenvironnement se transforment pour survivre et résister aux traitements. D'un autre côté, nous avons montré qu'une de ces protéines membranaires, le récepteur LRP1, joue un rôle important dans la migration des cellules endothéliales en réponse à une stimulation par la S1P. Afin d'encore mieux caractériser le microenvironnement tumoral ainsi que les voies de signalisation impliquées, nous avons montré que l'interrelation entre LRP1 et les récepteurs au S1P nécessite l'activation des voies des MAPK. Aussi, nous avons montré que la voie signalétique passant par le facteur de transcription NF- κ B est importante dans la régulation du caractère tumoral des MSCs, en régulant la

ciliogenèse suggérant que nous devons nous attaquer à l'inflammation associée au cancer.

Enfin, les GBM contiennent également des cellules souches cancéreuses (CSC), capables d'autorenouvellement et qui contribuent à l'initiation oncogénique ainsi qu'à la résistance à la thérapie. Les CSC sont de plus en plus étudiées. Elles expriment des marqueurs de cellules souches et se retrouvent fréquemment dans les tumeurs solides. Elles peuvent se différencier en d'autres lignées cellulaires. Elles sont régulées de façon intrinsèque par la génétique, l'épigénétique et le métabolisme puis de façon extrinsèque par le microenvironnement tumoral, les facteurs de la «niche» vasculaire et le système immunitaire (Lathia *et al.*, 2015 ; Schiffer *et al.*, 2010). Ce sous-type cellulaire est une piste de recherche intéressante en vue de fournir de plus en plus d'informations sur les transformations cellulaires au sein de la tumeur, mais aussi pour avoir une plus grande connaissance des cibles thérapeutiques potentielles du GBM.

En conclusion, il reste encore un grand bout de chemin à parcourir avant d'arriver à trouver la meilleure thérapie au GBM. Comme on a pu le remarquer, le microenvironnement tumoral est extrêmement complexe et nécessite l'activation des diverses voies de signalisation au cœur des processus cellulaires qui contribuent à la survie de la tumeur. Nos travaux permettent toutefois de mettre en lumière des mécanismes adaptatifs qui régissent la progression tumorale. De cette façon, nous faisons un pas de plus vers une médecine personnalisée.

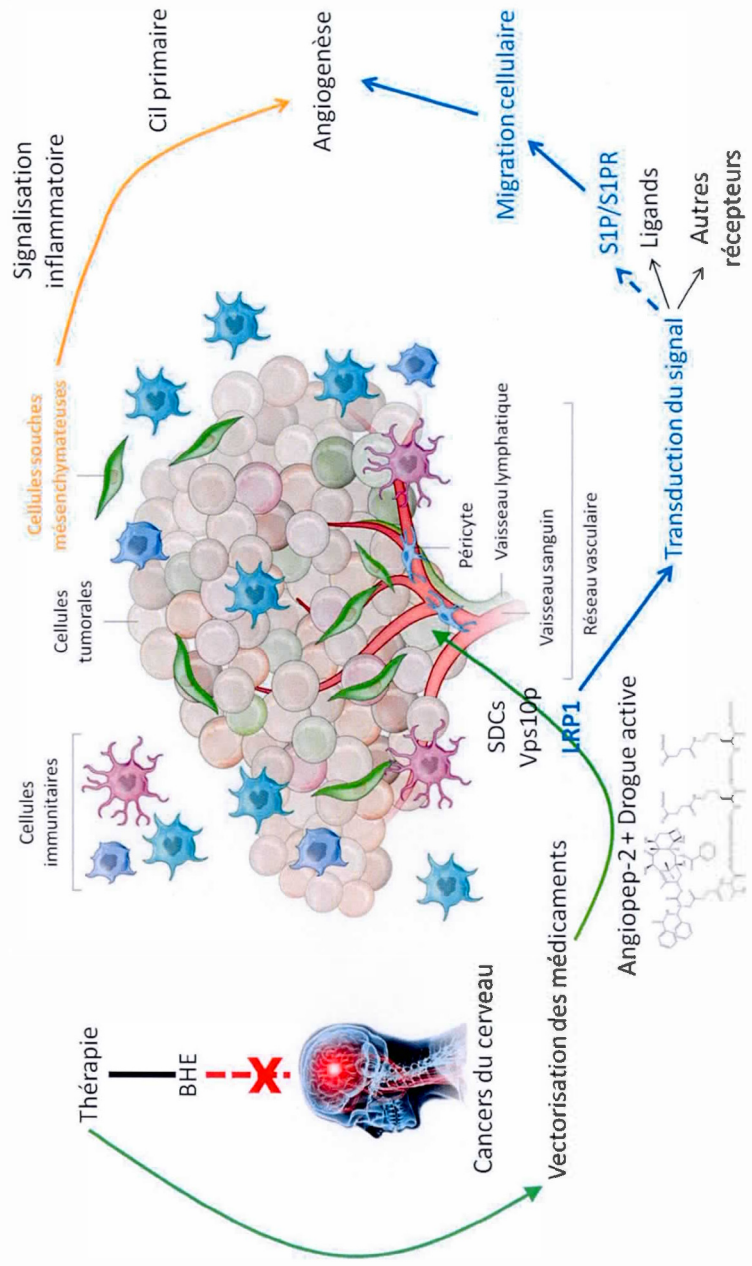


Figure 6.1 Résumé des interactions et des adaptations cellulaires du microenvironnement tumoral du GBM.

Le microenvironnement tumoral est très dynamique. Il contient divers types cellulaires avec leurs fonctions respectives dans la tumeur. Dans le GBM, le microenvironnement est modulé en grande partie par un centre hypoxique. Il permet la mise en place et la surexpression de modulateurs angiogéniques et inflammatoires responsables des adaptations moléculaires des cellules souches mésenchymateuses et des cellules microvasculaires endothéliales. La modulation des récepteurs de surface membranaire par l'hypoxie module le passage de l'An2 à travers la BHE.

APPENDICE A

Autre contribution

RÉGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DU TRANSPORTEUR DE GLUCOSE-6-PHOSPHATE : UN RÔLE MÉTABOLIQUE DANS LA CANCÉROGENÈSE DES CELLULES CÉRÉBRALES?

Amélie Vézina¹, Louis-Charles Levros², Sébastien Proulx-Bonneau¹ et Borhane Annabi¹

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

²Centre de Recherche Biomed, Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal, Québec, Canada.

Expériences en cours

Ancré à la membrane du réticulum endoplasmique, nous retrouvons le système glucose-6-phosphatase (G6Pase) (van Schaftingen et Gerin, 2002) (Figure A.1). Le transporteur de glucose-6-phosphate (G6PT) est une protéine à 10 hélices transmembranaires encodée par le gène SLC37A4 (Chen *et al.*, 2002). Il est responsable de faire passer le glucose-6-phosphate (G6P) du cytoplasme cellulaire vers la lumière du RE. La glucose-6-phosphatase α (G6Pase α) est une phosphohydrolase de 357 acides aminés exprimée dans le foie, les reins et l'intestin (Chou, Jun et Mansfield, 2010b). La G6Pase β est aussi une phosphohydrolase de 346 acides aminés, mais exprimée de façon ubiquitaire (Chou, Jun et Mansfield, 2010a). Le couplage fonctionnel de G6PT avec les G6Pases permet l'hydrolyse du G6P en glucose et en phosphate inorganique (Chou, Sik Jun et Mansfield, 2013). Les transporteurs T2 et T3 sont responsables de l'exportation du glucose et du phosphate inorganique hors du RE. Le rôle du système G6Pase est très bien connu dans les organes producteurs de glucose. Il constitue la dernière étape des voies de fabrication du glucose que sont la gluconéogenèse et la glycogénolyse. La présence ubiquitaire de G6Pase β suggère que les tissus non hépatiques sont capables de produire du glucose de façon endogène via le système G6Pase. Par exemple, le cerveau contient des réserves de glycogène dans les astrocytes majoritairement et exprime des niveaux significatifs de G6PT et G6Pase β , mais leurs fonctions sont peu connues (Ghosh *et al.*, 2005). Une déficience en G6PT cause l'augmentation de G6P dans le cytoplasme cellulaire et une accumulation excessive de glycogène intracellulaire (Chou, Sik Jun et Mansfield, 2013). Des mutations des composantes du système G6Pase engendrent la maladie de Von Gierke ou Glycogénose (Chou, Jun et Mansfield, 2010a). La déficience en G6Pase α cause la glycogénose de type Ia (Chen *et al.*, 2002), cependant, la G6Pase β peut arriver à prendre le relais. Les symptômes cliniques observés sont un retard de croissance, une hypoglycémie, une augmentation des concentrations plasmatiques des triglycérides, du cholestérol, des acides gras libres, des corps cétoniques, de l'acide urique et de l'acide lactique, une augmentation des réserves de glycogène au foie et une stéatose hépatique (Chopra *et al.*, 2008). La

déficience en G6PT cause la glycogénose de type Ib. Les symptômes associés sont l'altération de l'homéostasie du glucose, la neutropénie et la dysfonction des neutrophiles (Chopra *et al.*, 2008). Depuis près d'une quinzaine d'années, des équipes de recherche s'attardent aux fonctions de G6PT indépendantes de son activité catalytique au sein du système G6Pase. Les travaux du Dr Annabi mettent en évidence un rôle pour G6PT dans la progression tumorale des GBMs. Il a d'abord été démontré que le G6PT est exprimé dans les lignées cellulaires de GBMs adultes (Belkaid *et al.*, 2006b). Il a aussi été démontré qu'il joue un rôle dans la survie cellulaire, la migration cellulaire et la mobilisation du calcium au réticulum endoplasmique (Belkaid *et al.*, 2006a ; Fortier *et al.*, 2008). Son expression a aussi été rapportée dans les MSCs, malgré la faible expression des G6Pases. Sa transcription semble être régulée par HIF1 α (Lord-Dufour *et al.*, 2009). De plus, un rôle pour G6PT a récemment été identifié dans l'induction de l'autophagie d'hépatocytes (HEK293T), supportant l'hypothèse de l'implication de G6PT dans l'adaptation métabolique des U87 (Ahn *et al.*, 2015).

Le but de ses travaux était de mieux caractériser le rôle du G6PT dans l'adaptation métabolique des cellules U87. Nous avons identifié un nouveau rôle central pour G6PT qui intervient dans les capacités des cellules à survivre. À travers un axe de signalisation passant par la MT1-MMP, nous montrons que la régulation transcriptionnelle de G6PT se fait par le facteur de transcription NF- κ B. Nous avons eu recours à des essais de gène rapporteur afin de valider l'implication du facteur de transcription NF- κ B dans la régulation d'expression génique du G6PT. Nous avons étudié l'impact proinflammatoire sur l'expression du G6PT. Finalement, nous avons montré un rôle pour G6PT dans l'autophagie des cellules U87.

J'ai contribué à la conception de l'étude. J'ai procédé à toutes les expériences et leurs analyses subséquentes. Louis-Charles Levros a conçu les mutants de délétion progressive du promoteur de G6PT. Sébastien Proulx-Bonneau a effectué les

expériences de transfection de siRNA dans les MEFs. Les références citées sont présentées à la fin de la thèse dans la bibliographie générale.

Les résultats ont été présentés sous forme de communication orale ou par affiche dans les congrès suivants :

VÉZINA A, Annabi B. (2014) Régulation transcriptionnelle de G6PT : un rôle métabolique dans la cancérogenèse des cellules tumorales cérébrales? *82^e congrès de l'ACFAS (Montréal, QC, Canada)* Affiche #1, Section Cancer.

VÉZINA A, Annabi B. (2014) Régulation transcriptionnelle de G6PT : un rôle métabolique dans la cancérogenèse des cellules tumorales cérébrales? *Colloque La recherche en santé à l'UQAM*, Affiche #B53.

VÉZINA A, Levros Jr LC, Annabi B. (2013) Signal transducing functions from the membrane bound matrix metalloproteinase mt1-mmp impact on the glucose-6-phosphate translocase transcriptional regulation. *9^e Colloque Annuel du Centre de Recherche BioMed (UQTR, Trois-Rivières, QC, Canada.)* Affiche #3.

VÉZINA A. (2013) Un rôle pour G6PT dans l'adaptation métabolique des glioblastomes. *Présentation orale lors du concours «Ma soutenance en 180 secondes» (Montréal, QC, Canada)*

VÉZINA A, Annabi B. (2013) Signal transducing functions from the membrane bound matrix metalloproteinase mt1-mmp impact on the glucose-6-phosphate translocase transcriptional regulation. *13^e conférence annuelle des étudiants en sciences biomédicales à McGill (Montréal, QC, Canada).* Affiche #G1.

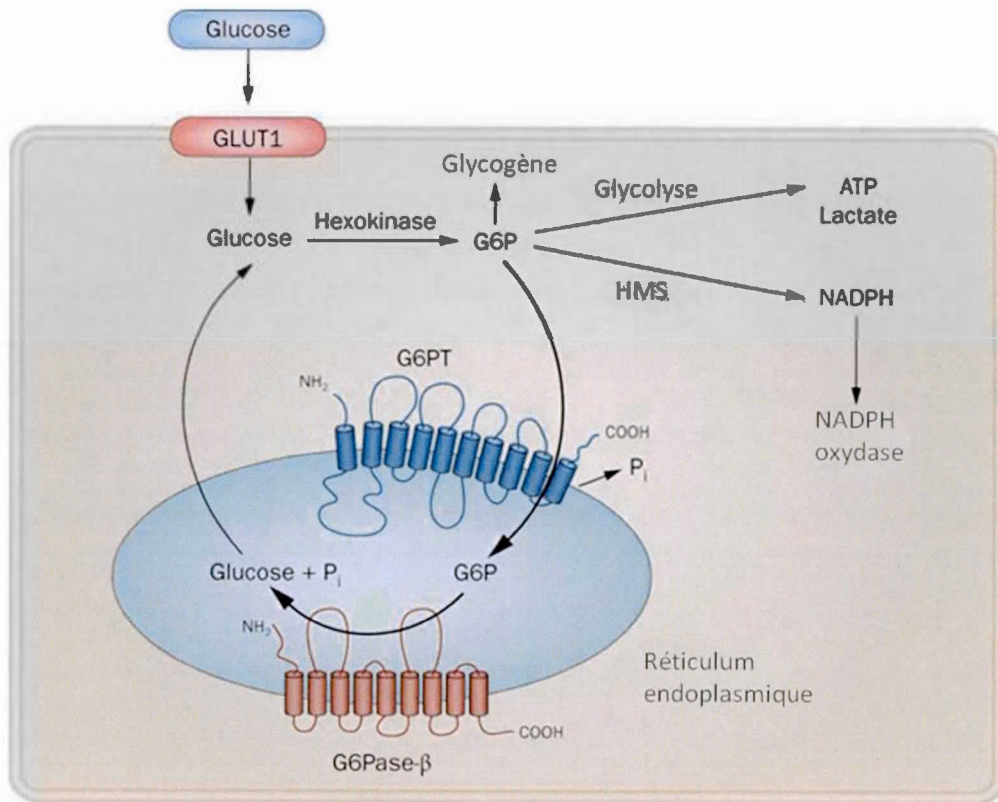


Figure A.1 Le système G6Pase.

Le glucose fait son entrée dans la cellule par le transporteur de glucose (GLUT1). Il est ensuite phosphorylé en G6P par l'hexokinase. Le G6P est transporté vers la lumière du réticulum endoplasmique par le G6PT et subséquentment hydrolysé en glucose et en phosphate inorganique par la G6Pase β . Les produits sont retournés dans le cytoplasme cellulaire. Le G6P qui ne passe pas par le système G6Pase est transformé en glycogène ou il passe par la glycolyse afin de produire de l'énergie sous forme d'ATP et de lactate. Il peut aussi contourner la glycolyse via le «*shunt*» hexose monophosphate. (Chou, Jun et Mansfield, 2010a)

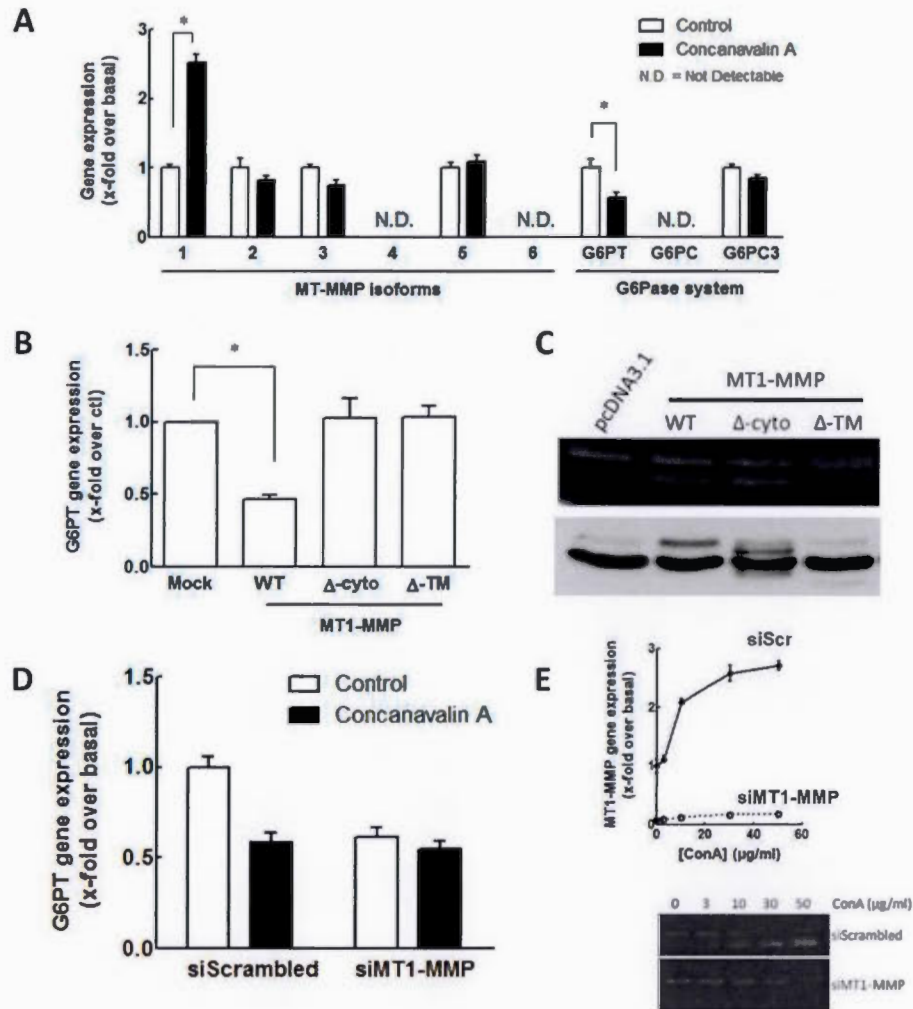


Figure A.2 L'expression de G6PT est r gul e par la ConA et la surexpression de MT1-MMP.

Dans les cellules U87, (A) La ConA induit l'expression g nrique de MT1-MMP tandis qu'elle inhibe celle de G6PT. (B) La surexpression de MT1-MMP inhibe l'expression g nrique de G6PT. La surexpression des constructions de MT1-MMP Δ -domaine cytoplasmique et soluble n'a aucun impact sur l'expression de G6PT. (C) Validation de la transfection de MT1-MMP par la mesure de l'activité g latinytique de la MMP-2. (D) La répression transitoire de MT1-MMP empêche la ConA d'inhiber G6PT. (E) La répression transitoire de MT1-MMP empêche la ConA d'induire l'expression de MT1-MMP et l'activation de la MMP-2 mesur e par zymographie gélatine.

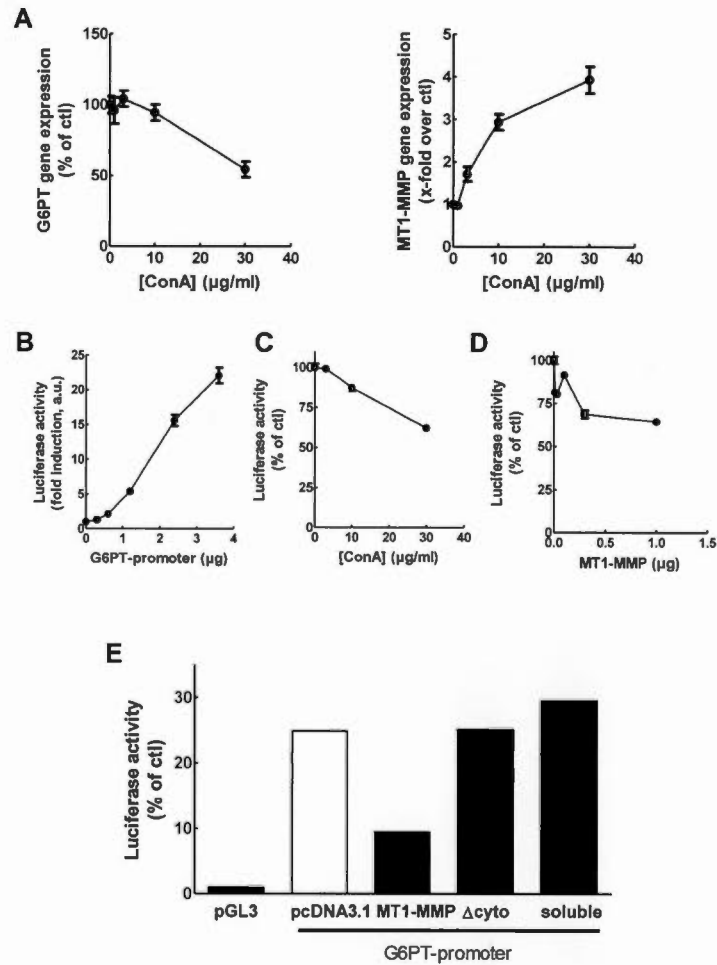


Figure A.3 La transcription de G6PT est inhibée par la ConA et la surexpression de MT1-MMP

Dans les cellules U87, (A) des doses croissantes de ConA inhibent l'expression de G6PT et induisent l'expression de MT1-MMP. (B) L'activité du gène rapporteur luciférase Firefly du promoteur de G6PT a été mesurée par rapport à l'activité de la luciférase *Renilla*, un contrôle interne. Les niveaux d'induction d'activité ont été mesurés par rapport au plasmide contrôle pGL3. (C) 1 µg du promoteur de G6PT a été transfecté dans les cellules U87 suivi par un traitement de 30 µg/ml de ConA. Une diminution de l'activité a été observée. (D) Le promoteur de G6PT a été co-transfecté avec des quantités croissantes de plasmide MT1-MMP. Une diminution de l'activité luciférase a été observée. (E) La surexpression de MT1-MMP inhibe la transcription de G6PT et requiert la présence des domaines cytoplasmique et transmembranaire.

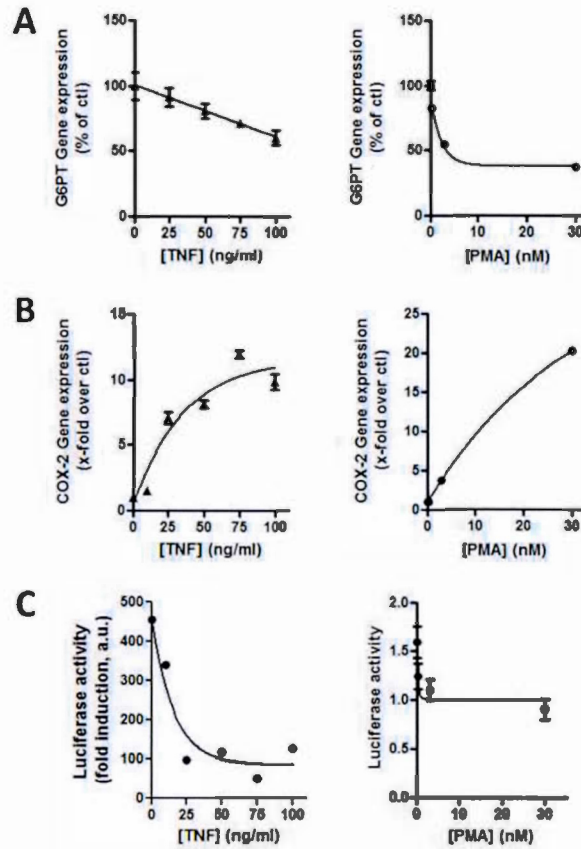


Figure A.4 La stimulation pro-inflammatoire inhibe la transcription de G6PT

Dans les cellules U87, (A) la TNF α et le PMA inhibent l'expression génique de G6PT de façon dose-dépendante. (B) Le TNF α et le PMA stimulent l'expression de COX-2. (C) Le TNF α et le PMA inhibent la transcription de G6PT en inhibant l'activité du gène rapporteur luciférase reliée au promoteur de G6PT.

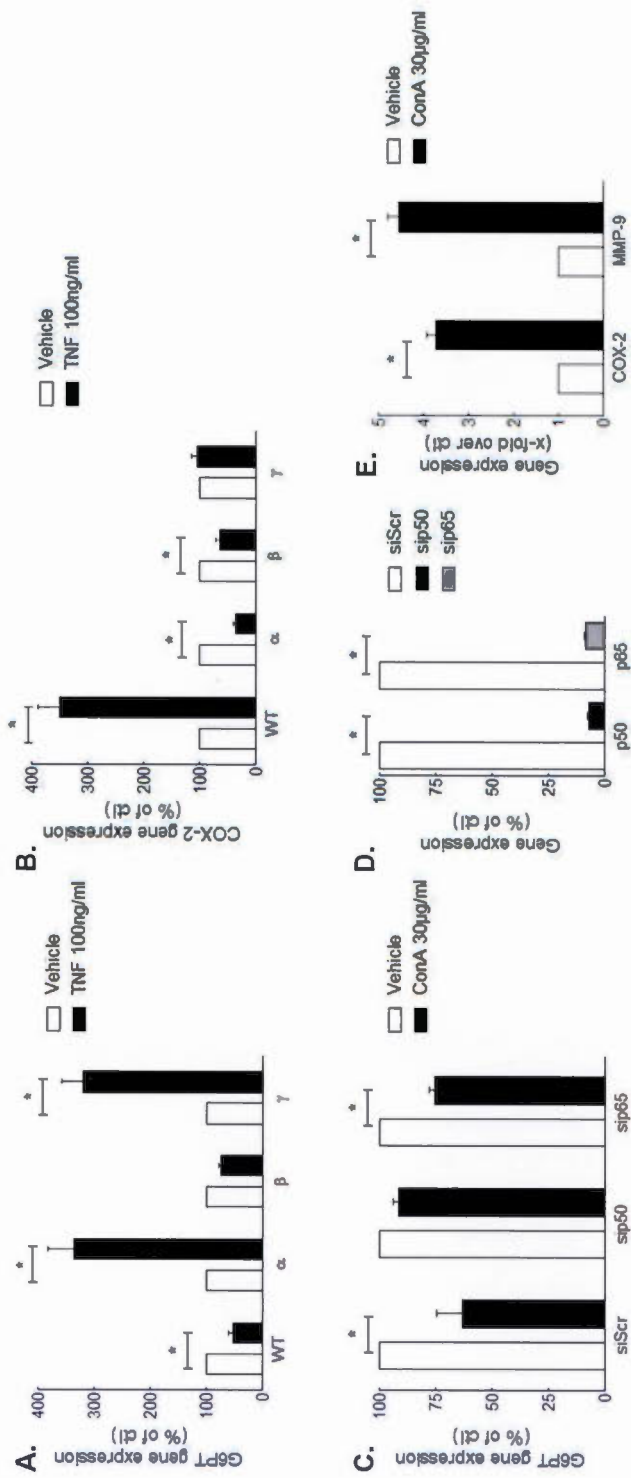


Figure A.5 L'expression de G6PT requiert les sous-unités IKK β et p65.

Dans les cellules embryonnaires fibroblastiques murines (MEF), (A) l'inhibition de l'expression génique de G6PT par le TNF α requiert la sous-unité IKK β tandis que (B) l'induction de COX-2 par le TNF α requiert les trois sous-unités IKK. Dans les cellules U87, (C) l'inhibition de G6PT par la ConA requiert la sous-unité NF-kB, p65 tandis que (D) la ConA induit l'expression de COX-2 et MMP-9, deux biomarqueurs inflammatoires.

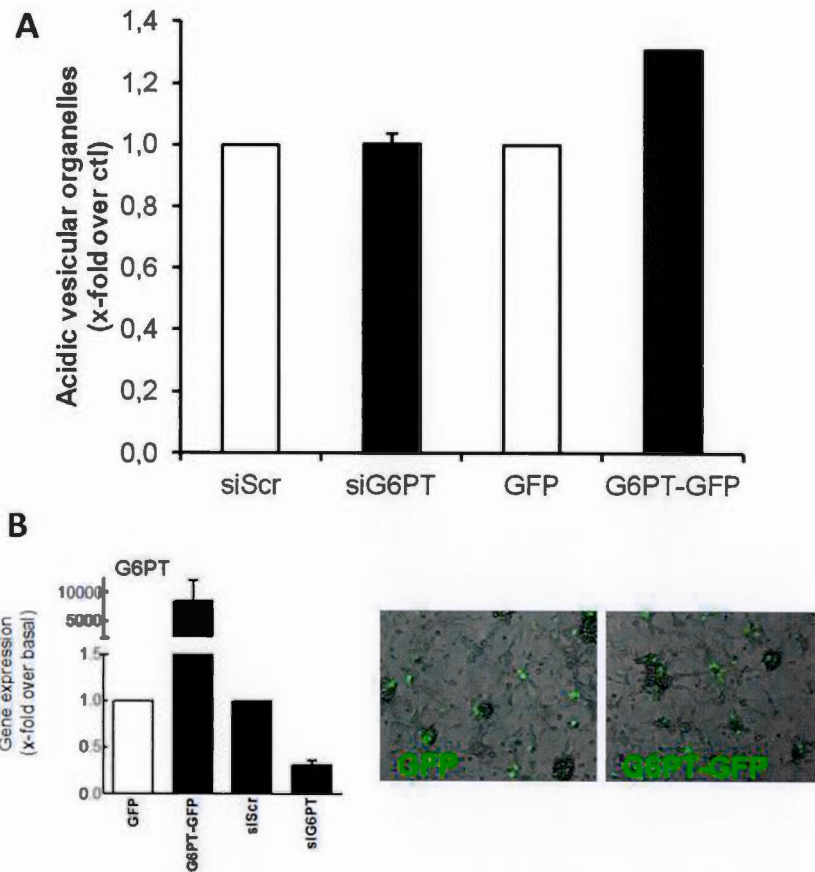


Figure A.7 La surexpression de G6PT induit le processus autophagique dans les cellules U87.

Dans les cellules U87, **(A)** La surexpression de G6PT induit la formation de vésicules acides (Boruk, Savory et Hache) alors que la répression transitoire de G6PT n'a mené à aucune formation d'AVO. **(B)** Validation de la transfection de G6PT par qPCR et la visualisation de GFP par immunofluorescence.

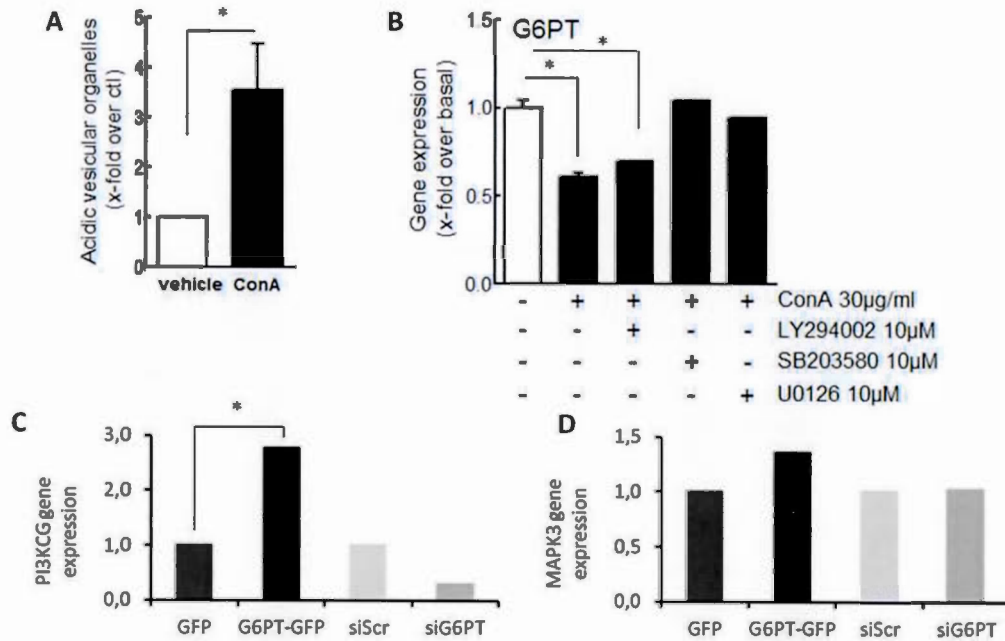


Figure A.8 L'implication de G6PT dans l'autophagie des cellules U87 nécessite l'activation des voies de signalisation de PI3K et de la MAPK ERK.

Dans les cellules U87, (A) La ConA induit la formation d'AVO dans les cellules U87. (B) L'inhibition de l'expression génique de G6PT par la ConA est renversée par l'activité des inhibiteurs des MAPK p38 et ERK, SB203580 et U0126. (C) La surexpression de G6PT induit l'expression génique de la PI3K et l'expression génique de la (D) MAPK3 (ERK1). La répression transitoire de G6PT inhibe la PI3K mais n'affecte pas MAPK3.

APPENDICE B

Autre contribution – Collaboration avec la Dre Cyndia Charfi (UQAM)

LOW DENSITY LIPOPROTEIN RECEPTOR-RELATED PROTEIN (LRP) 1
REPRESSION TRIGGERS *IN VITRO* AND *IN VIVO* ADAPTIVE MECHANISMS
IN HUMAN BRAIN VASCULAR AND TUMORAL COMPARTMENTS

Charfi C, Beauchemin D, Vézina A, Zgheib A, Annabi B.

2016

Soumis aux avocats d'Angiochem Inc.

B.1 Contribution

Dans le cadre du projet de la Dre Cyndia Charfi concernant la caractérisation des mécanismes adaptatifs des compartiments tumoraux et endothéliaux cérébraux réprimés de LRP1, j'ai contribué à la portion des travaux expérimentaux *in vivo*. Avec Alain Zgheib, nous étions en charge de la colonie de souris WT et *Lrp1(EC)^{-/-}*. Nous avons procédé au sacrifice de celles-ci. Ensuite, j'ai effectué l'isolation des cellules endothéliales cérébrales avant de procéder aux expériences de «binding» et d'«uptake» de l'An2 dans les différentes conditions, soit WT ou *Lrp1* KO. J'ai aussi effectué les qRT-PCR dans ces mêmes cellules pour étudier l'expression génique des récepteurs de surface membranaire d'intérêt (Syndecans, Vps10p-D et LRP1). Dre Charfi a présenté ces travaux au congrès annuel du CRCQ 2015 ainsi qu'à la retraite du Centre de Recherche BioMed 2015.

B.2 Abstract

Dysfunction in intracellular trafficking pathways in many diseases of the nervous system is also believed to be linked to systemic lipoprotein metabolism alterations. Given the crucial role low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) plays at the blood-brain barrier as well as in pathological situations, including cancer and neurological disorders, we sought to explore whether any crosstalk exists linking LRP1 to intracellular trafficking processes in both the brain endothelial and tumoral compartments. Transcriptomic profiling of grade I-IV human brain tumor tissues revealed low *Lrp1* gene expression in higher grades brain tumors, which correlated with high *Sdc4*, *Sort1* and *Sor11* transcripts encoding cell surface heparan sulfate proteoglycans and sortilins involved in intracellular trafficking and compartmentation. Functional impact of stable *Lrp1* repression was assessed in human U87 glioblastoma and brain microvascular endothelial cells (HBMEC), and uptake of the LRP1 ligand Angiopep-2 (An2) compared to the respective transient LRP1 repressed cell models. While An2 uptake was at best reduced by ~40% when LRP1 was transiently silenced, it was rather found increased in selected HBMEC and U87 cells in which LRP1 was stably knocked-down *in vitro*, or in brain endothelial cells isolated from LRP1-KO mice. Such adaptive mechanisms, consequent to constitutively-reduced LRP1 expression, were found to trigger *Myb* and *Gata3* transcription factors transcript levels, which silencing reversed the increases in *Sdc4*, *Sort1* and *Sor11* expression as well as in LRP1-mediated An2 uptake. Overall, we highlight an unreported LRP1-mediated adaptive regulatory axis acting as an endocytosis biosensor in the control of An2 uptake within the brain vascular and tumoral compartments. Efficient An2-conjugates delivery can further be envisioned to occur through a multi-stage intracellular compartmentation hierarchy cascade.

APPENDICE C

Autre contribution – Collaboration avec la Dre Lekha Sleno (UQAM)

ISOTOPE-LABELED DIFFERENTIAL PROFILING OF METABOLITES USING N-BENZOYLOXYSUCCINIMIDE DERIVATIZATION COUPLED TO LIQUID CHROMATOGRAPHY/HIGH-RESOLUTION TANDEM MASS SPECTROMETRY

Wagner M, Ohlund LB, Shiao TC, Vézina A, Annabi B, Roy R, Sleno L.

Rapid communications in mass spectrometry, 29(18):1632-40

2015

C.1 Contribution

Tout au long de ce projet, j'ai été responsable de la culture des cellules promyéloïdes HL-60. J'ai effectué leur récolte lorsqu'elles avaient atteint la confluence désirée. J'ai procédé à leur centrifugation et leur lavage subséquent, avant de les entreposer pour expériences futures, effectuées par l'équipe de chercheurs de la Dre Sleno. Les cellules HL-60 prolifèrent en suspension dans les flacons de culture. Une très grande confluence est requise pour les expérimentations. L'équipe de la Dre Sleno a présenté ces travaux au 4e Congrès Annuel du groupe de Recherche PharmaQAM en 2012.

C.2 Abstract

RATIONALE: An isotopic labeling strategy based on derivatizing amine-containing metabolites has been developed using light ($^{12}\text{C}_6$) and heavy ($^{13}\text{C}_6$) N-benzoyloxysuccinimide reagents for semi-targeted metabolomic applications.

METHODS: Differentially labeled samples were combined and analyzed simultaneously by liquid chromatography/high-resolution tandem mass spectrometry (LC/HR-MS/MS) to compare relative amounts of amine-containing metabolites. The selectivity of the reaction was determined with model metabolites and was shown to also be applicable to thiol and phenol moieties. The potential for relative quantitation was evaluated in cell extracts and the method was then applied to quantify metabolic perturbations occurring in human cultured cells under normal vs. oxidative stress conditions.

RESULTS: A total of 279 derivatized features were detected in HL60 cell extracts, 77 of which yielded significant concentration changes upon oxidative stress treatment. Based on accurate mass measurements and MS/MS spectral matching with reference standard solutions, 10 metabolites were clearly identified. Derivatized compounds were found to have diagnostic fragment ions from the reagent itself, as well as structurally informative ions useful for metabolite identification.

CONCLUSION: This simple derivatization reaction can be applied to the relative quantitation of amine-, thiol- and phenol-containing compounds, with improved sensitivity and chromatographic peak shapes due to the increased hydrophobicity of polar metabolites not readily amenable to reversed-phase LC/MS analysis.

BIBLIOGRAPHIE

- Abbott, N. J., L. Ronnback et E. Hansson. 2006. «Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier». *Nat Rev Neurosci*, vol. 7, no 1, p. 41-53.
- Abcam. 2016. «NF-kappa B signaling pathway». En ligne. <<http://www.abcam.com/pathways/nf-kappa-beta-signaling-interactive-pathway>>.
- Adada, M., D. Canals, Y. A. Hannun et L. M. Obeid. 2013. «Sphingosine-1-phosphate receptor 2». *FEBS J*, vol. 280, no 24, p. 6354-6366.
- Adams, B., P. Dorfler, A. Aguzzi, Z. Kozmik, P. Urbanek, I. Maurer-Fogy et M. Busslinger. 1992. «Pax-5 encodes the transcription factor BSAP and is expressed in B lymphocytes, the developing CNS, and adult testis». *Genes Dev*, vol. 6, no 9, p. 1589-1607.
- Agarwal, P., F. Mohammad, L. Kabir, P. DeInnocentes et R.C. Bird. 2012. «Tumor Suppressor Gene p16/INK4A/CDKN2A and Its Role in Cell Cycle Exit, Differentiation, and Determination of Cell Fate». In *Tumor Suppressor Genes*, Yue Cheng : InTech.
- Agnihotri, S., K. E. Burrell, A. Wolf, S. Jalali, C. Hawkins, J. T. Rutka et G. Zadeh. 2013. «Glioblastoma, a brief review of history, molecular genetics, animal models and novel therapeutic strategies». *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, vol. 61, no 1, p. 25-41.
- Agnihotri, S., et G. Zadeh. 2016. «Metabolic reprogramming in glioblastoma: the influence of cancer metabolism on epigenetics and unanswered questions». *Neuro Oncol*, vol. 18, no 2, p. 160-172.

- Aguilar-Morante, D., M. Cortes-Canteli, M. Sanz-Sancristobal, A. Santos et A. Perez-Castillo. 2011. «Decreased CCAAT/enhancer binding protein beta expression inhibits the growth of glioblastoma cells». *Neuroscience*, vol. 176, p. 110-119.
- Ahn, H. H., Y. Oh, H. Lee, W. Lee, J. W. Chang, H. K. Pyo, H. Nah do et Y. K. Jung. 2015. «Identification of glucose-6-phosphate transporter as a key regulator functioning at the autophagy initiation step». *FEBS Lett*, vol. 589, no 16, p. 2100-2109.
- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts et P. Walter. 2002. «Blood Vessels and Endothelial Cells». In *Molecular Biology of the Cell*, 4th, Garland Science. New York. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26848/>>.
- Anelli, V., C. R. Gault, A. B. Cheng et L. M. Obeid. 2008. «Sphingosine kinase 1 is up-regulated during hypoxia in U87MG glioma cells. Role of hypoxia-inducible factors 1 and 2». *J Biol Chem*, vol. 283, no 6, p. 3365-3375.
- Anelli, V., C. R. Gault, A. J. Snider et L. M. Obeid. 2010. «Role of sphingosine kinase-1 in paracrine/transcellular angiogenesis and lymphangiogenesis in vitro». *FASEB J*, vol. 24, no 8, p. 2727-2738.
- Angiochem Inc. 2014. «Angiochem's ANG1005 Received Orphan Drug Designation from FDA for the Treatment of Glioblastoma multiform». En ligne. <<http://angiochem.com/angiochem%E2%80%99s-ang1005-received-orphan-drug-designation-fda-treatment-glioblastoma-multiform>>. Consulté le 3 mars.
- Angiochem Inc. (2016). Angiochem Announces Successful End-of-Phase 2 Meeting with FDA for ANG1005 En ligne. <<http://angiochem.com/angiochem-announces-successful-end-phase-2-meeting-fda-ang1005>>.
- Annabi, B., M. P. Lachambre, N. Bousquet-Gagnon, M. Page, D. Gingras et R. Beliveau. 2002. «Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin 3-gallate inhibits

MMP-2 secretion and MT1-MMP-driven migration in glioblastoma cells». *Biochim Biophys Acta*, vol. 1542, no 1-3, p. 209-220.

- Annabi, B., M. P. Lachambre, K. Plouffe, H. Sartelet et R. Beliveau. 2009. «Modulation of invasive properties of CD133+ glioblastoma stem cells: a role for MT1-MMP in bioactive lysophospholipid signaling». *Mol Carcinog*, vol. 48, no 10, p. 910-919.
- Annabi, B., Y. T. Lee, S. Turcotte, E. Naud, R. R. Desrosiers, M. Champagne, N. Eliopoulos, J. Galipeau et R. Beliveau. 2003a. «Hypoxia promotes murine bone-marrow-derived stromal cell migration and tube formation». *Stem Cells*, vol. 21, no 3, p. 337-347.
- Annabi, B., E. Naud, Y. T. Lee, N. Eliopoulos et J. Galipeau. 2004. «Vascular progenitors derived from murine bone marrow stromal cells are regulated by fibroblast growth factor and are avidly recruited by vascularizing tumors». *J Cell Biochem*, vol. 91, no 6, p. 1146-1158.
- Annabi, B., S. Thibeault, Y. T. Lee, N. Bousquet-Gagnon, N. Eliopoulos, S. Barrette, J. Galipeau et R. Beliveau. 2003b. «Matrix metalloproteinase regulation of sphingosine-1-phosphate-induced angiogenic properties of bone marrow stromal cells». *Exp Hematol*, vol. 31, no 7, p. 640-649.
- Azuaje, F., K. Tiemann et S. P. Niclou. 2015. «Therapeutic control and resistance of the EGFR-driven signaling network in glioblastoma». *Cell Commun Signal*, vol. 13, p. 23.
- Azzi, S., J. K. Hebda et J. Gavard. 2013. «Vascular permeability and drug delivery in cancers». *Front Oncol*, vol. 3, p. 211.
- Badano, J. L., N. Mitsuma, P. L. Beales et N. Katsanis. 2006. «The ciliopathies: an emerging class of human genetic disorders». *Annu Rev Genomics Hum Genet*, vol. 7, p. 125-148.
- Balkwill, F., et A. Mantovani. 2001. «Inflammation and cancer: back to Virchow?». *Lancet*, vol. 357, no 9255, p. 539-545.

- Barani, I. J., et D. A. Larson. 2015. «Radiation therapy of glioblastoma». *Cancer Treat Res*, vol. 163, p. 49-73.
- Barry, F. P., et J. M. Murphy. 2004. «Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization». *Int J Biochem Cell Biol*, vol. 36, no 4, p. 568-584.
- Basten, S. G., et R. H. Giles. 2013. «Functional aspects of primary cilia in signaling, cell cycle and tumorigenesis». *Cilia*, vol. 2, no 1, p. 6.
- Basten, S. G., S. Willekers, J. S. Vermaat, G. G. Slaats, E. E. Voest, P. J. van Diest et R. H. Giles. 2013. «Reduced cilia frequencies in human renal cell carcinomas versus neighboring parenchymal tissue». *Cilia*, vol. 2, no 1, p. 2.
- Bastien, J. I., K. A. McNeill et H. A. Fine. 2015. «Molecular characterizations of glioblastoma, targeted therapy, and clinical results to date». *Cancer*, vol. 121, no 4, p. 502-516.
- Baumruker, T., F. Bornancin et A. Billich. 2005. «The role of sphingosine and ceramide kinases in inflammatory responses». *Immunol Lett*, vol. 96, no 2, p. 175-185.
- Becher, B., A. Prat et J. P. Antel. 2000. «Brain-immune connection: immunoregulatory properties of CNS-resident cells». *Glia*, vol. 29, no 4, p. 293-304.
- Beliveau, R., M. Demeule, C. Che et A. Regina (2009). Molecules for transporting a compound across the blood-brain barrier. États-Unis. US 7,557,182 B2: 47 p
- Beliveau, R., et D. Gingras. 2005. *Les aliments contre le cancer*. Montréal, 320 p.
- Beliveau, R., et D. Gingras. 2006. *Cuisiner avec les aliments contre le cancer* : , 415 p.

- Beliveau, R., et D. Gingras. 2014. *Prévenir le cancer*. Montréal, 263 p.
- Belkaid, A., I. B. Copland, D. Massillon et B. Annabi. 2006a. «Silencing of the human microsomal glucose-6-phosphate translocase induces glioma cell death: potential new anticancer target for curcumin». *FEBS Lett*, vol. 580, no 15, p. 3746-3752.
- Belkaid, A., J. C. Currie, J. Desgagnes et B. Annabi. 2006b. «The chemopreventive properties of chlorogenic acid reveal a potential new role for the microsomal glucose-6-phosphate translocase in brain tumor progression». *Cancer Cell Int*, vol. 6, p. 7.
- Belting, M. 2003. «Heparan sulfate proteoglycan as a plasma membrane carrier». *Trends Biochem Sci*, vol. 28, no 3, p. 145-151.
- Belvitch, P., et S. M. Dudek. 2012. «Role of FAK in S1P-regulated endothelial permeability». *Microvasc Res*, vol. 83, no 1, p. 22-30.
- Berg JM, Tymoczko JL et Stryer L. 2002. « Metabolism Consist of Highly Interconnected Pathways». In *Biochemistry*, 5th edition. New York: W H Freeman. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22553/>>.
- Bergers, G., et L. E. Benjamin. 2003. «Tumorigenesis and the angiogenic switch». *Nat Rev Cancer*, vol. 3, no 6, p. 401-410.
- Bernardo, M. M., et R. Fridman. 2003. «TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase-2) regulates MMP-2 (matrix metalloproteinase-2) activity in the extracellular environment after pro-MMP-2 activation by MT1 (membrane type 1)-MMP». *Biochem J*, vol. 374, no Pt 3, p. 739-745.
- Bertrand, Y., J. C. Currie, M. Demeule, A. Regina, C. Che, A. Abulrob, D. Fatehi, H. Sartelet, R. Gabathuler, J. P. Castaigne, D. Stanimirovic et R. Beliveau. 2010. «Transport characteristics of a novel peptide platform for CNS therapeutics». *J Cell Mol Med*, vol. 14, no 12, p. 2827-2839.

- Bertrand, Y., J. C. Currie, J. Poirier, M. Demeule, A. Abulrob, D. Fatehi, D. Stanimirovic, H. Sartelet, J. P. Castaigne et R. Beliveau. 2011. «Influence of glioma tumour microenvironment on the transport of ANG1005 via low-density lipoprotein receptor-related protein 1». *Br J Cancer*, vol. 105, no 11, p. 1697-1707.
- Bien-Moller, S., S. Lange, T. Holm, A. Bohm, H. Paland, J. Kupper, S. Herzog, K. Weitmann, C. Havemann, S. Vogelgesang, S. Marx, W. Hoffmann, H. W. Schroeder et B. H. Rauch. 2016. «Expression of S1P metabolizing enzymes and receptors correlate with survival time and regulate cell migration in glioblastoma multiforme». *Oncotarget*, vol. 7, no 11, p. 13031-13046.
- Bishop, C. L., A. M. Bergin, D. Fessart, V. Borgdorff, E. Hatzimasoura, J. C. Garbe, M. R. Stampfer, J. Koh et D. H. Beach. 2010. «Primary cilium-dependent and -independent Hedgehog signaling inhibits p16(INK4A)». *Mol Cell*, vol. 40, no 4, p. 533-547.
- Boehlke, C., H. Janusch, C. Hamann, C. Powelske, M. Mergen, H. Herbst, F. Kotsis, R. Nitschke et E. W. Kuehn. 2015. «A Cilia Independent Role of Ift88/Polaris during Cell Migration». *PLoS One*, vol. 10, no 10, p. e0140378.
- Boruk, M., J. G. Savory et R. J. Hache. 1998. «AF-2-dependent potentiation of CCAAT enhancer binding protein beta-mediated transcriptional activation by glucocorticoid receptor». *Mol Endocrinol*, vol. 12, no 11, p. 1749-1763.
- Boucher, P., M. Gotthardt, W. P. Li, R. G. Anderson et J. Herz. 2003. «LRP: role in vascular wall integrity and protection from atherosclerosis». *Science*, vol. 300, no 5617, p. 329-332.
- Brahimi-Horn, M. C., J. Chiche et J. Pouyssegur. 2007. «Hypoxia and cancer». *J Mol Med (Berl)*, vol. 85, no 12, p. 1301-1307.
- Broekhuis, J. R., W. Y. Leong et G. Jansen. 2013. «Regulation of cilium length and intraflagellar transport». *Int Rev Cell Mol Biol*, vol. 303, p. 101-138.

- Brown, J. A., T. Santra, P. Owens, A. M. Morrison et F. Barry. 2014. «Primary cilium-associated genes mediate bone marrow stromal cell response to hypoxia». *Stem Cell Res*, vol. 13, no 2, p. 284-299.
- Bu, G. 2001. «The roles of receptor-associated protein (RAP) as a molecular chaperone for members of the LDL receptor family». *Int Rev Cytol*, vol. 209, p. 79-116.
- Buckingham, J. C. 2006. «Glucocorticoids: exemplars of multi-tasking». *Br J Pharmacol*, vol. 147 Suppl 1, p. S258-268.
- Burotto, M., V. L. Chiou, J. M. Lee et E. C. Kohn. 2014. «The MAPK pathway across different malignancies: a new perspective». *Cancer*, vol. 120, no 22, p. 3446-3456.
- Butler, G. S., R. A. Dean, E. M. Tam et C. M. Overall. 2008. «Pharmacoproteomics of a metalloproteinase hydroxamate inhibitor in breast cancer cells: dynamics of membrane type 1 matrix metalloproteinase-mediated membrane protein shedding». *Mol Cell Biol*, vol. 28, no 15, p. 4896-4914.
- Cabal-Hierro, L., et P. S. Lazo. 2012. «Signal transduction by tumor necrosis factor receptors». *Cell Signal*, vol. 24, no 6, p. 1297-1305.
- Cancer Genome Atlas Research Network. 2008. «Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways». *Nature*, vol. 455, no 7216, p. 1061-1068.
- Candela, P., J. Saint-Pol, M. Kuntz, M. C. Boucau, Y. Lamartiniere, F. Gosselet et L. Fenart. 2015. «In vitro discrimination of the role of LRP1 at the BBB cellular level: focus on brain capillary endothelial cells and brain pericytes». *Brain Res*, vol. 1594, p. 15-26.
- Candido, J., et T. Hagemann. 2013. «Cancer-related inflammation». *J Clin Immunol*, vol. 33 Suppl 1, p. S79-84.

- Carey, D. J. 1996. «N-syndecan: structure and function of a transmembrane heparan sulfate proteoglycan». *Perspect Dev Neurobiol*, vol. 3, no 4, p. 331-346.
- Carmeliet, P. 2003. «Angiogenesis in health and disease». *Nat Med*, vol. 9, no 6, p. 653-660.
- Carmeliet, P., et R. K. Jain. 2011. «Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis». *Nature*, vol. 473, no 7347, p. 298-307.
- Carroll, V. A., et M. Ashcroft. 2005. «Targeting the molecular basis for tumour hypoxia». *Expert Rev Mol Med*, vol. 7, no 6, p. 1-16.
- Carswell, E. A., L. J. Old, R. L. Kassel, S. Green, N. Fiore et B. Williamson. 1975. «An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 72, no 9, p. 3666-3670.
- Carvalho-Santos, Z., J. Azimzadeh, J. B. Pereira-Leal et M. Bettencourt-Dias. 2011. «Evolution: Tracing the origins of centrioles, cilia, and flagella». *J Cell Biol*, vol. 194, no 2, p. 165-175.
- Casazza, A., G. Di Conza, M. Wenes, V. Finisguerra, S. Deschoemaeker et M. Mazzone. 2014. «Tumor stroma: a complexity dictated by the hypoxic tumor microenvironment». *Oncogene*, vol. 33, no 14, p. 1743-1754.
- Castellano, J., R. Aledo, J. Sendra, P. Costales, O. Juan-Babot, L. Badimon et V. Llorente-Cortes. 2011. «Hypoxia stimulates low-density lipoprotein receptor-related protein-1 expression through hypoxia-inducible factor-1alpha in human vascular smooth muscle cells». *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 31, no 6, p. 1411-1420.
- Cavazos, D. A., et A. J. Brenner. 2015. «Hypoxia in astrocytic tumors and implications for therapy». *Neurobiol Dis*.

- Cenik, B., C. F. Sephton, B. Kutluk Cenik, J. Herz et G. Yu. 2012. «Progranulin: a proteolytically processed protein at the crossroads of inflammation and neurodegeneration». *J Biol Chem*, vol. 287, no 39, p. 32298-32306.
- Chandana, S. R., S. Movva, M. Arora et T. Singh. 2008. «Primary brain tumors in adults». *Am Fam Physician*, vol. 77, no 10, p. 1423-1430.
- Che, C., G. Yang, C. Thiot, M. C. Lacoste, J. C. Currie, M. Demeule, A. Regina, R. Beliveau et J. P. Castaigne. 2010. «New Angiopep-modified doxorubicin (ANG1007) and etoposide (ANG1009) chemotherapeutics with increased brain penetration». *J Med Chem*, vol. 53, no 7, p. 2814-2824.
- Chen, L. Y., C. J. Pan, J. J. Shieh et J. Y. Chou. 2002. «Structure-function analysis of the glucose-6-phosphate transporter deficient in glycogen storage disease type Ib». *Hum Mol Genet*, vol. 11, no 25, p. 3199-3207.
- Choi, S., D. H. Kang et E. S. Oh. 2013. «Targeting syndecans: a promising strategy for the treatment of cancer». *Expert Opin Ther Targets*, vol. 17, no 6, p. 695-705.
- Chokor, R., S. Lamy et B. Annabi. 2014. «Transcriptional targeting of sphingosine-1-phosphate receptor S1P2 by epigallocatechin-3-gallate prevents sphingosine-1-phosphate-mediated signaling in macrophage-differentiated HL-60 promyelomonocytic leukemia cells». *Onco Targets Ther*, vol. 7, p. 667-677.
- Chopra, A. R., J. F. Louet, P. Saha, J. An, F. Demayo, J. Xu, B. York, S. Karpen, M. Finegold, D. Moore, L. Chan, C. B. Newgard et B. W. O'Malley. 2008. «Absence of the SRC-2 coactivator results in a glycogenopathy resembling Von Gierke's disease». *Science*, vol. 322, no 5906, p. 1395-1399.
- Chou, J. Y., H. S. Jun et B. C. Mansfield. 2010a. «Glycogen storage disease type I and G6Pase-beta deficiency: etiology and therapy». *Nat Rev Endocrinol*, vol. 6, no 12, p. 676-688.
- Chou, J. Y., H. S. Jun et B. C. Mansfield. 2010b. «Neutropenia in type Ib glycogen storage disease». *Curr Opin Hematol*, vol. 17, no 1, p. 36-42.

- Chou, J. Y., H. Sik Jun et B. C. Mansfield. 2013. «The SLC37 family of phosphate-linked sugar phosphate antiporters». *Mol Aspects Med*, vol. 34, no 2-3, p. 601-611.
- Chow, A.Y. 2010. «Cell cycle control by oncogenes and tumor suppressors: driving the transformation of normal cells into cancerous cells». *Nature Education*, vol. 3, no 9, p. 7.
- Chow, B. W., et C. Gu. 2015. «The molecular constituents of the blood-brain barrier». *Trends Neurosci*, vol. 38, no 10, p. 598-608.
- Christianson, H. C., et M. Belting. 2014. «Heparan sulfate proteoglycan as a cell-surface endocytosis receptor». *Matrix Biol*, vol. 35, p. 51-55.
- Chu, W. M. 2013. «Tumor necrosis factor». *Cancer Lett*, vol. 328, no 2, p. 222-225.
- Cichowski, K., et T. Jacks. 2001. «NF1 tumor suppressor gene function: narrowing the GAP». *Cell*, vol. 104, no 4, p. 593-604.
- Cunningham, F., M. R. Amode, D. Barrell, K. Beal, K. Billis, S. Brent, D. Carvalho-Silva, P. Clapham, G. Coates, S. Fitzgerald, L. Gil, C. G. Giron, L. Gordon, T. Hourlier, S. E. Hunt, S. H. Janacek, N. Johnson, T. Juettemann, A. K. Kahari, S. Keenan, F. J. Martin, T. Maurel, W. McLaren, D. N. Murphy, R. Nag, B. Overduin, A. Parker, M. Patricio, E. Perry, M. Pignatelli, H. S. Riat, D. Sheppard, K. Taylor, A. Thormann, A. Vullo, S. P. Wilder, A. Zadissa, B. L. Aken, E. Birney, J. Harrow, R. Kinsella, M. Muffato, M. Ruffier, S. M. Searle, G. Spudich, S. J. Trevanion, A. Yates, D. R. Zerbino et P. Flicek. 2015. «Ensembl 2015». *Nucleic Acids Res*, vol. 43, no Database issue, p. D662-669.
- Currie, J. C., S. Fortier, A. Sina, J. Galipeau, J. Cao et B. Annabi. 2007. «MT1-MMP down-regulates the glucose 6-phosphate transporter expression in marrow stromal cells: a molecular link between pro-MMP-2 activation, chemotaxis, and cell survival». *J Biol Chem*, vol. 282, no 11, p. 8142-8149.

- Cuvillier, O., et I. Ader. 2011. «Hypoxia-inducible factors and sphingosine 1-phosphate signaling». *Anticancer Agents Med Chem*, vol. 11, no 9, p. 854-862.
- Dang, C. V. 2012. «Links between metabolism and cancer». *Genes Dev*, vol. 26, no 9, p. 877-890.
- Dang, C. V. 2013. «MYC, metabolism, cell growth, and tumorigenesis». *Cold Spring Harb Perspect Med*, vol. 3, no 8.
- Daniel, R., Z. He, K.P. Carmichael, J. Halper et A. Bateman. 2000. «Cellular localization of gene expression for progranulin». *J Histochem Cytochem*, vol. 48, no 7, p. 999-1009.
- Davenport, J. R., et B. K. Yoder. 2005. «An incredible decade for the primary cilium: a look at a once-forgotten organelle». *Am J Physiol Renal Physiol*, vol. 289, no 6, p. F1159-1169.
- De Rossi, G., et J. R. Whiteford. 2014. «Syndecans in angiogenesis and endothelial cell biology». *Biochem Soc Trans*, vol. 42, no 6, p. 1643-1646.
- Demeule, M., J. C. Currie, Y. Bertrand, C. Che, T. Nguyen, A. Regina, R. Gabathuler, J. P. Castaigne et R. Beliveau. 2008a. «Involvement of the low-density lipoprotein receptor-related protein in the transcytosis of the brain delivery vector angiopep-2». *J Neurochem*, vol. 106, no 4, p. 1534-1544.
- Demeule, M., M. Labelle, A. Regina, F. Berthelet et R. Beliveau. 2001. «Isolation of endothelial cells from brain, lung, and kidney: expression of the multidrug resistance P-glycoprotein isoforms». *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 281, no 3, p. 827-834.
- Demeule, M., A. Regina, C. Che, J. Poirier, T. Nguyen, R. Gabathuler, J. P. Castaigne et R. Beliveau. 2008b. «Identification and design of peptides as a new drug delivery system for the brain». *J Pharmacol Exp Ther*, vol. 324, no 3, p. 1064-1072.

- Desrosiers, R. R., M. E. Rivard, P. E. Grundy et B. Annabi. 2006. «Decrease in LDL receptor-related protein expression and function correlates with advanced stages of Wilms tumors». *Pediatr Blood Cancer*, vol. 46, no 1, p. 40-49.
- Devic, S. 2016. «Warburg Effect - a Consequence or the Cause of Carcinogenesis?». *J Cancer*, vol. 7, no 7, p. 817-822.
- Devreotes, P., et A. R. Horwitz. 2015. «Signaling networks that regulate cell migration». *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 7, no 8, p. a005959.
- Dhani, N., A. Fyles, D. Hedley et M. Milosevic. 2015. «The clinical significance of hypoxia in human cancers». *Semin Nucl Med*, vol. 45, no 2, p. 110-121.
- DiDonato, J. A., F. Mercurio et M. Karin. 2012. «NF-kappaB and the link between inflammation and cancer». *Immunol Rev*, vol. 246, no 1, p. 379-400.
- Dimarino, A. M., A. I. Caplan et T. L. Bonfield. 2013. «Mesenchymal stem cells in tissue repair». *Front Immunol*, vol. 4, p. 201.
- Djouad, F., P. Plerce, C. Bony, P. Tropel, F. Apparailly, J. Sany, D. Noel et C. Jorgensen. 2003. «Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals». *Blood*, vol. 102, no 10, p. 3837-3844.
- Dominguez-Brauer, C., K. L. Thu, J. M. Mason, H. Blaser, M. R. Bray et T. W. Mak. 2015. «Targeting Mitosis in Cancer: Emerging Strategies». *Mol Cell*, vol. 60, no 4, p. 524-536.
- Don, A. S., X. Y. Lim et T. A. Couttas. 2014. «Re-configuration of sphingolipid metabolism by oncogenic transformation». *Biomolecules*, vol. 4, no 1, p. 315-353.
- Drew, B. A., M. E. Burow et B. S. Beckman. 2012. «MEK5/ERK5 pathway: the first fifteen years». *Biochim Biophys Acta*, vol. 1825, no 1, p. 37-48.

- Dubois, L. G., L. Campanati, C. Righy, I. D'Andrea-Meira, T. C. Spohr, I. Porto-Carreiro, C. M. Pereira, J. Balca-Silva, S. A. Kahn, M. F. DosSantos, A. Oliveira Mde, A. Ximenes-da-Silva, M. C. Lopes, E. Faveret, E. L. Gasparetto et V. Moura-Neto. 2014. «Gliomas and the vascular fragility of the blood brain barrier». *Front Cell Neurosci*, vol. 8, p. 418.
- Durasi, I.M., U. Dag, B.B. Gungor, B. Erdogan, I.A. Kumaz et O. Ugur Sezerman. 2011. *Identification of transcription factor binding sites in promoter databases.: 2011 6th International Symposium on Health Informatics and Bioinformatics (HIBIT)*.
- Elfenbein, A., et M. Simons. 2013. «Syndecan-4 signaling at a glance». *J Cell Sci*, vol. 126, no Pt 17, p. 3799-3804.
- Emonard, H., L. Theret, A. H. Bennisroune et S. Dedieu. 2014. «Regulation of LRP-1 expression: make the point». *Pathol Biol (Paris)*, vol. 62, no 2, p. 84-90.
- Erdlenbruch, B., M. Alipour, G. Fricker, D. S. Miller, W. Kugler, H. Eibl et M. Lakomek. 2003. «Alkylglycerol opening of the blood-brain barrier to small and large fluorescence markers in normal and C6 glioma-bearing rats and isolated rat brain capillaries». *Br J Pharmacol*, vol. 140, no 7, p. 1201-1210.
- Essner, J. J., E. Chen et S. C. Ekker. 2006. «Syndecan-2». *Int J Biochem Cell Biol*, vol. 38, no 2, p. 152-156.
- Farre, D., R. Roset, M. Huerta, J. E. Adsuara, L. Rosello, M. M. Alba et X. Messeguer. 2003. «Identification of patterns in biological sequences at the ALGGEN server: PROMO and MALGEN». *Nucleic Acids Res*, vol. 31, no 13, p. 3651-3653.
- Favretto, M. E., R. Wallbrecher, S. Schmidt, R. van de Putte et R. Brock. 2014. «Glycosaminoglycans in the cellular uptake of drug delivery vectors - bystanders or active players?». *J Control Release*, vol. 180, p. 81-90.

- Feng, X., A. Chen, Y. Zhang, J. Wang, L. Shao et L. Wei. 2015. «Application of dental nanomaterials: potential toxicity to the central nervous system». *Int J Nanomedicine*, vol. 10, p. 3547-3565.
- Firestone, R. A. 1994. «Low-density lipoprotein as a vehicle for targeting antitumor compounds to cancer cells». *Bioconjug Chem*, vol. 5, no 2, p. 105-113.
- Fischer, I., J. P. Gagner, M. Law, E. W. Newcomb et D. Zagzag. 2005. «Angiogenesis in gliomas: biology and molecular pathophysiology». *Brain Pathol*, vol. 15, no 4, p. 297-310.
- Flynn, J. R., L. Wang, D. L. Gillespie, G. J. Stoddard, J. K. Reid, J. Owens, G. B. Ellsworth, K. L. Salzman, A. Y. Kinney et R. L. Jensen. 2008. «Hypoxia-regulated protein expression, patient characteristics, and preoperative imaging as predictors of survival in adults with glioblastoma multiforme». *Cancer*, vol. 113, no 5, p. 1032-1042.
- Folkman, J. 2002. «Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis». *Semin Oncol*, vol. 29, no 6 Suppl 16, p. 15-18.
- Fortier, S., D. Labelle, A. Sina, R. Moreau et B. Annabi. 2008. «Silencing of the MT1-MMP/ G6PT axis suppresses calcium mobilization by sphingosine-1-phosphate in glioblastoma cells». *FEBS Lett*, vol. 582, no 5, p. 799-804.
- Funahashi, J., T. Okafuji, H. Ohuchi, S. Noji, H. Tanaka et H. Nakamura. 1999. «Role of Pax-5 in the regulation of a mid-hindbrain organizer's activity». *Dev Growth Differ*, vol. 41, no 1, p. 59-72.
- Gabathuler, R. 2010. «Approaches to transport therapeutic drugs across the blood-brain barrier to treat brain diseases». *Neurobiol Dis*, vol. 37, no 1, p. 48-57.
- Galdiero, M. R., E. Bonavita, I. Barajon, C. Garlanda, A. Mantovani et S. Jaillon. 2013. «Tumor associated macrophages and neutrophils in cancer». *Immunobiology*, vol. 218, no 11, p. 1402-1410.

- Galgani, J., et E. Ravussin. 2008. «Energy metabolism, fuel selection and body weight regulation». *Int J Obes (Lond)*, vol. 32 Suppl 7, p. S109-119.
- Gardiner, M.B. 2005. «The importance of being cilia». *HHMI Bulletin*, vol. 18, no 2, p. 32-36.
- Ghosh, A., Y. Y. Cheung, B. C. Mansfield et J. Y. Chou. 2005. «Brain contains a functional glucose-6-phosphatase complex capable of endogenous glucose production». *J Biol Chem*, vol. 280, no 12, p. 11114-11119.
- Goldsmith, Z. G., et D. N. Dhanasekaran. 2007. «G protein regulation of MAPK networks». *Oncogene*, vol. 26, no 22, p. 3122-3142.
- Goldstein, J. L., et M. S. Brown. 2009. «The LDL receptor». *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 29, no 4, p. 431-438.
- Gonias, S. L., et W. M. Campana. 2014. «LDL receptor-related protein-1: a regulator of inflammation in atherosclerosis, cancer, and injury to the nervous system». *Am J Pathol*, vol. 184, no 1, p. 18-27.
- Gonias, S. L., A. Gaultier et M. Jo. 2011. «Regulation of the urokinase receptor (uPAR) by LDL receptor-related protein-1 (LRP1)». *Curr Pharm Des*, vol. 17, no 19, p. 1962-1969.
- Goodwin, A. M., et P. A. D'Amore. 2002. «Wnt signaling in the vasculature». *Angiogenesis*, vol. 5, no 1-2, p. 1-9.
- Goto, H., A. Inoko et M. Inagaki. 2013. «Cell cycle progression by the repression of primary cilia formation in proliferating cells». *Cell Mol Life Sci*, vol. 70, no 20, p. 3893-3905.
- Gottesman, M. M. 2002. «Mechanisms of cancer drug resistance». *Annu Rev Med*, vol. 53, p. 615-627.

- Gradilone, S. A., B. N. Radtke, P. S. Bogert, B. Q. Huang, G. B. Gajdos et N. F. LaRusso. 2013. «HDAC6 inhibition restores ciliary expression and decreases tumor growth». *Cancer Res*, vol. 73, no 7, p. 2259-2270.
- Greiffenberg, L., W. Goebel, K. S. Kim, I. Weiglein, A. Bubert, F. Engelbrecht, M. Stins et M. Kuhn. 1998. «Interaction of *Listeria monocytogenes* with human brain microvascular endothelial cells: InlB-dependent invasion, long-term intracellular growth, and spread from macrophages to endothelial cells». *Infect Immun*, vol. 66, no 11, p. 5260-5267.
- Grivennikov, S. I., F. R. Greten et M. Karin. 2010. «Immunity, inflammation, and cancer». *Cell*, vol. 140, no 6, p. 883-899.
- Gupta, G. P., et J. Massague. 2006. «Cancer metastasis: building a framework». *Cell*, vol. 127, no 4, p. 679-695.
- Ha, E.T., J.P. Antonios, H. Soto, R.M. Prins, N. Kasahara, L.M. Liao et C.A. Kruse. 2014. «Chronic inflammation drives glioma growth: cellular and molecular factors responsible for an immunosuppressive microenvironment.». *Neuroimmunol Neuroinflammation*, vol. 1, p. 66-76.
- Haar, C. P., P. Hebbbar, G. C. th Wallace, A. Das, W. A. Vandergrift, 3rd, J. A. Smith, P. Giglio, S. J. Patel, S. K. Ray et N. L. Banik. 2012. «Drug resistance in glioblastoma: a mini review». *Neurochem Res*, vol. 37, no 6, p. 1192-1200.
- Hait, N. C., C. A. Oskeritzian, S. W. Paugh, S. Milstien et S. Spiegel. 2006. «Sphingosine kinases, sphingosine 1-phosphate, apoptosis and diseases». *Biochim Biophys Acta*, vol. 1758, no 12, p. 2016-2026.
- Hakre, S., M. I. Tussie-Luna, T. Ashworth, C. D. Novina, J. Settleman, P. A. Sharp et A. L. Roy. 2006. «Opposing functions of TFII-I spliced isoforms in growth factor-induced gene expression». *Mol Cell*, vol. 24, no 2, p. 301-308.
- Han, Y. G., et A. Alvarez-Buylla. 2010. «Role of primary cilia in brain development and cancer». *Curr Opin Neurobiol*, vol. 20, no 1, p. 58-67.

- Han, Y. G., H. J. Kim, A. A. Dlugosz, D. W. Ellison, R. J. Gilbertson et A. Alvarez-Buylla. 2009. «Dual and opposing roles of primary cilia in medulloblastoma development». *Nat Med*, vol. 15, no 9, p. 1062-1065.
- Hanahan, D. 2014. «Rethinking the war on cancer». *Lancet*, vol. 383, no 9916, p. 558-563.
- Hanahan, D., et R. A. Weinberg. 2011. «Hallmarks of cancer: the next generation». *Cell*, vol. 144, no 5, p. 646-674.
- Hashimoto, Y., E. Matsuzaki, K. Higashi, F. Takahashi-Yanaga, A. Takano, M. Hirata et F. Nishimura. 2015. «Sphingosine-1-phosphate inhibits differentiation of C3H10T1/2 cells into adipocyte». *Mol Cell Biochem*, vol. 401, no 1-2, p. 39-47.
- Hassounah, N. B., T. A. Bunch et K. M. McDermott. 2012. «Molecular pathways: the role of primary cilia in cancer progression and therapeutics with a focus on Hedgehog signaling». *Clin Cancer Res*, vol. 18, no 9, p. 2429-2435.
- Hatanpaa, K. J., S. Burma, D. Zhao et A. A. Habib. 2010. «Epidermal growth factor receptor in glioma: signal transduction, neuropathology, imaging, and radioresistance». *Neoplasia*, vol. 12, no 9, p. 675-684.
- Haugsten, E. M., A. Wiedlocha, S. Olsnes et J. Wesche. 2010. «Roles of fibroblast growth factor receptors in carcinogenesis». *Mol Cancer Res*, vol. 8, no 11, p. 1439-1452.
- Hawkins, B. T., et T. P. Davis. 2005. «The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease». *Pharmacol Rev*, vol. 57, no 2, p. 173-185.
- Hendriksen, E. M., P. N. Span, J. Schuurin, J. P. Peters, F. C. Sweep, A. J. van der Kogel et J. Bussink. 2009. «Angiogenesis, hypoxia and VEGF expression during tumour growth in a human xenograft tumour model». *Microvasc Res*, vol. 77, no 2, p. 96-103.

- Heo, K., K. A. Park, Y. H. Kim, S. H. Kim, Y. S. Oh, I. H. Kim, S. H. Ryu et P. G. Suh. 2009. «Sphingosine 1-phosphate induces vascular endothelial growth factor expression in endothelial cells». *BMB Rep*, vol. 42, no 10, p. 685-690.
- Hermey, G. 2009. «The Vps10p-domain receptor family». *Cell Mol Life Sci*, vol. 66, no 16, p. 2677-2689.
- Herz, J., D. E. Clouthier et R. E. Hammer. 1992. «LDL receptor-related protein internalizes and degrades uPA-PAI-1 complexes and is essential for embryo implantation». *Cell*, vol. 71, no 3, p. 411-421.
- Hoelzinger, D. B., T. Demuth et M. E. Berens. 2007. «Autocrine factors that sustain glioma invasion and paracrine biology in the brain microenvironment». *J Natl Cancer Inst*, vol. 99, no 21, p. 1583-1593.
- Hoesel, B., et J. A. Schmid. 2013. «The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer». *Mol Cancer*, vol. 12, p. 86.
- Hong, I. S., H. Y. Lee et K. S. Kang. 2014. «Mesenchymal stem cells and cancer: friends or enemies?». *Mutat Res*, vol. 768, p. 98-106.
- Houthuijzen, J. M., L. G. Daenen, J. M. Roodhart et E. E. Voest. 2012. «The role of mesenchymal stem cells in anti-cancer drug resistance and tumour progression». *Br J Cancer*, vol. 106, no 12, p. 1901-1906.
- Hsieh, H. L., C. B. Wu, C. C. Sun, C. H. Liao, Y. T. Lau et C. M. Yang. 2006. «Sphingosine-1-phosphate induces COX-2 expression via PI3K/Akt and p42/p44 MAPK pathways in rat vascular smooth muscle cells». *J Cell Physiol*, vol. 207, no 3, p. 757-766.
- Hu, Y., V. Baud, M. Delhase, P. Zhang, T. Deerinck, M. Ellisman, R. Johnson et M. Karin. 1999. «Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKKalpha subunit of IkappaB kinase». *Science*, vol. 284, no 5412, p. 316-320.

- Hu, Y. J., Y. D. Wang, F. Q. Tan et W. X. Yang. 2013. «Regulation of paracellular permeability: factors and mechanisms». *Mol Biol Rep*, vol. 40, no 11, p. 6123-6142.
- Huang, C., K. Jacobson et M. D. Schaller. 2004. «MAP kinases and cell migration». *J Cell Sci*, vol. 117, no Pt 20, p. 4619-4628.
- Hulleman, E., et K. Helin. 2005. «Molecular mechanisms in gliomagenesis». *Adv Cancer Res*, vol. 94, p. 1-27.
- Humke, E. W., K. V. Dorn, L. Milenkovic, M. P. Scott et R. Rohatgi. 2010. «The output of Hedgehog signaling is controlled by the dynamic association between Suppressor of Fused and the Gli proteins». *Genes Dev*, vol. 24, no 7, p. 670-682.
- Iozzo, R. V., et R. D. Sanderson. 2011. «Proteoglycans in cancer biology, tumour microenvironment and angiogenesis». *J Cell Mol Med*, vol. 15, no 5, p. 1013-1031.
- Ishikawa, H., et W. F. Marshall. 2011. «Ciliogenesis: building the cell's antenna». *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 12, no 4, p. 222-234.
- Itoh, Y. 2015. «Membrane-type matrix metalloproteinases: Their functions and regulations». *Matrix Biol*, vol. 44-46, p. 207-223.
- Jen, A., C. J. Parkyn, R. C. Mootoosamy, M. J. Ford, A. Warley, Q. Liu, G. Bu, I. V. Baskakov, S. Moestrup, L. McGuinness, N. Emptage et R. J. Morris. 2010. «Neuronal low-density lipoprotein receptor-related protein 1 binds and endocytoses prion fibrils via receptor cluster 4». *J Cell Sci*, vol. 123, no Pt 2, p. 246-255.
- Jensen, R. L. 2009. «Brain tumor hypoxia: tumorigenesis, angiogenesis, imaging, pseudoprogression, and as a therapeutic target». *J Neurooncol*, vol. 92, no 3, p. 317-335.

- Johnson, G. L., et R. Lapadat. 2002. «Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases». *Science*, vol. 298, no 5600, p. 1911-1912.
- Justus, C. R., E. J. Sanderlin et L. V. Yang. 2015. «Molecular Connections between Cancer Cell Metabolism and the Tumor Microenvironment». *Int J Mol Sci*, vol. 16, no 5, p. 11055-11086.
- Kamp, W. M., P. Y. Wang et P. M. Hwang. 2016. «TP53 mutation, mitochondria and cancer». *Curr Opin Genet Dev*, vol. 38, p. 16-22.
- Kampen, K. R. 2012. «The mechanisms that regulate the localization and overexpression of VEGF receptor-2 are promising therapeutic targets in cancer biology». *Anticancer Drugs*, vol. 23, no 4, p. 347-354.
- Kanekiyo, T., J. R. Cirrito, C. C. Liu, M. Shinohara, J. Li, D. R. Schuler, M. Shinohara, D. M. Holtzman et G. Bu. 2013. «Neuronal clearance of amyloid-beta by endocytic receptor LRP1». *J Neurosci*, vol. 33, no 49, p. 19276-19283.
- Karin, M. 2008. «The I κ B kinase - a bridge between inflammation and cancer». *Cell Res*, vol. 18, no 3, p. 334-342.
- Keaney, J., et M. Campbell. 2015. «The dynamic blood-brain barrier». *FEBS J*, vol. 282, no 21, p. 4067-4079.
- Kee, H. L., et K. J. Verhey. 2013. «Molecular connections between nuclear and ciliary import processes». *Cilia*, vol. 2, no 1, p. 11.
- Kihara, Y., H. Mizuno et J. Chun. 2015. «Lysophospholipid receptors in drug discovery». *Exp Cell Res*, vol. 333, no 2, p. 171-177.
- Kim, S., et B. D. Dynlacht. 2013. «Centrosomes tune in to metabolic state and turn on to oxygen». *Dev Cell*, vol. 26, no 4, p. 325-326.

- Klagsbrun, M., S. Takashima et R. Mamluk. 2002. «The role of neuropilin in vascular and tumor biology». *Adv Exp Med Biol*, vol. 515, p. 33-48.
- Kojima, Y., K. Ono, K. Inoue, Y. Takagi, K. Kikuta, M. Nishimura, Y. Yoshida, Y. Nakashima, H. Matsumae, Y. Furukawa, N. Mikuni, M. Nobuyoshi, T. Kimura, T. Kita et M. Tanaka. 2009. «Progranulin expression in advanced human atherosclerotic plaque». *Atherosclerosis*, vol. 206, no 1, p. 102-108.
- Kong, Y., H. Wang, T. Lin et S. Wang. 2014. «Sphingosine-1-phosphate/S1P receptors signaling modulates cell migration in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells». *Mediators Inflamm*, vol. 2014, p. 565369.
- Kozlova, N., J. K. Jensen, T. F. Chi, A. Samoylenko et T. Kietzmann. 2015. «PAI-1 modulates cell migration in a LRP1-dependent manner via beta-catenin and ERK1/2». *Thromb Haemost*, vol. 113, no 5, p. 988-998.
- Kucerova, L., et S. Skolekova. 2013. «Tumor microenvironment and the role of mesenchymal stromal cells». *Neoplasma*, vol. 60, no 1, p. 1-10.
- Kushner, E. J., et V. L. Bautch. 2013. «Building blood vessels in development and disease». *Curr Opin Hematol*, vol. 20, no 3, p. 231-236.
- Lalatsa, A., A. G. Schatzlein et I. F. Uchegbu. 2014. «Strategies to deliver peptide drugs to the brain». *Mol Pharm*, vol. 11, no 4, p. 1081-1093.
- Lamallice, L., F. Le Boeuf et J. Huot. 2007. «Endothelial cell migration during angiogenesis». *Circ Res*, vol. 100, no 6, p. 782-794.
- Lambaerts, K., S. A. Wilcox-Adelman et P. Zimmermann. 2009. «The signaling mechanisms of syndecan heparan sulfate proteoglycans». *Curr Opin Cell Biol*, vol. 21, no 5, p. 662-669.
- Lathia, J. D., S. C. Mack, E. E. Mulkearns-Hubert, C. L. Valentim et J. N. Rich. 2015. «Cancer stem cells in glioblastoma». *Genes Dev*, vol. 29, no 12, p. 1203-1217.

- Lattke, M., A. Magnutzki, P. Walther, T. Wirth et B. Baumann. 2012. «Nuclear factor kappaB activation impairs ependymal ciliogenesis and links neuroinflammation to hydrocephalus formation». *J Neurosci*, vol. 32, no 34, p. 11511-11523.
- Lawrence, T. 2009. «The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation». *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 1, no 6, p. a001651.
- Lee, D. W., D. Ramakrishnan, J. Valenta, I. F. Parney, K. J. Bayless et R. Sitcheran. 2013a. «The NF-kappaB RelB protein is an oncogenic driver of mesenchymal glioma». *PLoS One*, vol. 8, no 2, p. e57489.
- Lee, H., E. J. Goetzl et S. An. 2000. «Lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate stimulate endothelial cell wound healing». *Am J Physiol Cell Physiol*, vol. 278, no 3, p. C612-618.
- Lee, H. W., H. J. Choi, S. J. Ha, K. T. Lee et Y. G. Kwon. 2013b. «Recruitment of monocytes/macrophages in different tumor microenvironments». *Biochim Biophys Acta*, vol. 1835, no 2, p. 170-179.
- Lee, I. H., et T. Finkel. 2013. «Metabolic regulation of the cell cycle». *Curr Opin Cell Biol*, vol. 25, no 6, p. 724-729.
- Lee, O. H., Y. M. Kim, Y. M. Lee, E. J. Moon, D. J. Lee, J. H. Kim, K. W. Kim et Y. G. Kwon. 1999. «Sphingosine 1-phosphate induces angiogenesis: its angiogenic action and signaling mechanism in human umbilical vein endothelial cells». *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 264, no 3, p. 743-750.
- Leonova, E. I., et O. V. Galzitskaya. 2013. «Structure and functions of syndecans in vertebrates». *Biochemistry (Mosc)*, vol. 78, no 10, p. 1071-1085.
- Leonova, E. I., et O. V. Galzitskaya. 2015. «Role of Syndecans in Lipid Metabolism and Human Diseases». *Adv Exp Med Biol*, vol. 855, p. 241-258.

- Leslie, N. R., et C. P. Downes. 2004. «PTEN function: how normal cells control it and tumour cells lose it». *Biochem J*, vol. 382, no Pt 1, p. 1-11.
- Letoha, T., A. Keller-Pinter, E. Kusz, C. Kolozsi, Z. Bozso, G. Toth, C. Vizler, Z. Olah et L. Szilak. 2010. «Cell-penetrating peptide exploited syndecans». *Biochim Biophys Acta*, vol. 1798, no 12, p. 2258-2265.
- Li, M., et W. Y. Kim. 2011. «Two sides to every story: the HIF-dependent and HIF-independent functions of pVHL». *J Cell Mol Med*, vol. 15, no 2, p. 187-195.
- Li, P., J. Wu, L. Zhao et X. W. Feng. 2015. «Effects and relationship of intermittent hypoxia on serum lipid levels, hepatic low-density lipoprotein receptor-related protein 1, and hypoxia-inducible factor 1alpha». *Sleep Breath*.
- Li, S., N. F. Huang et S. Hsu. 2005. «Mechanotransduction in endothelial cell migration». *J Cell Biochem*, vol. 96, no 6, p. 1110-1126.
- Li, X., B. S. Magenheimer, S. Xia, T. Johnson, D. P. Wallace, J. P. Calvet et R. Li. 2008. «A tumor necrosis factor-alpha-mediated pathway promoting autosomal dominant polycystic kidney disease». *Nat Med*, vol. 14, no 8, p. 863-868.
- Li, X., J. Tsibouklis, T. Weng, B. Zhang, G. Yin, G. Feng, Y. Cui, I. N. Savina, L. I. Mikhalovska, S. R. Sandeman, C. A. Howel et S. V. Mikhalovsky. 2016. «Nano Carriers for Drug Transport across the Blood Brain Barrier». *J Drug Target*, p. 1-39.
- Li, Z. W., W. Chu, Y. Hu, M. Delhase, T. Deerinck, M. Ellisman, R. Johnson et M. Karin. 1999. «The IKKbeta subunit of IkappaB kinase (IKK) is essential for nuclear factor kappaB activation and prevention of apoptosis». *J Exp Med*, vol. 189, no 11, p. 1839-1845.
- Lillis, A. P., I. Mikhailenko et D. K. Strickland. 2005. «Beyond endocytosis: LRP function in cell migration, proliferation and vascular permeability». *J Thromb Haemost*, vol. 3, no 8, p. 1884-1893.

- Lillis, A. P., L. B. Van Duyn, J. E. Murphy-Ullrich et D. K. Strickland. 2008. «LDL receptor-related protein 1: unique tissue-specific functions revealed by selective gene knockout studies». *Physiol Rev*, vol. 88, no 3, p. 887-918.
- Lin, C. C., I. T. Lee, C. H. Hsu, C. K. Hsu, P. L. Chi, L. D. Hsiao et C. M. Yang. 2015. «Sphingosine-1-phosphate mediates ICAM-1-dependent monocyte adhesion through p38 MAPK and p42/p44 MAPK-dependent Akt activation». *PLoS One*, vol. 10, no 3, p. e0118473.
- Lindahl, U. 2007. «Heparan sulfate-protein interactions--a concept for drug design?». *Thromb Haemost*, vol. 98, no 1, p. 109-115.
- Liu, C. J., et X. Bosch. 2012. «Progranulin: a growth factor, a novel TNFR ligand and a drug target». *Pharmacol Ther*, vol. 133, no 1, p. 124-132.
- Liu, W.Y., Z.B. Wang, L.C. Zhang, X. Wei et L. Li. 2012. «Tight junction in blood-brain barrier: an overview of structure, regulation, and regulator substances». *CNS Neurosci Ther.*, vol. 8, p. 609-615.
- Lord-Dufour, S., I. B. Copland, L. C. Levros, Jr., M. Post, A. Das, C. Khosla, J. Galipeau, E. Rassart et B. Annabi. 2009. «Evidence for transcriptional regulation of the glucose-6-phosphate transporter by HIF-1alpha: Targeting G6PT with mumbaistatin analogs in hypoxic mesenchymal stromal cells». *Stem Cells*, vol. 27, no 3, p. 489-497.
- Lorger, M. 2012. «Tumor microenvironment in the brain». *Cancers (Basel)*, vol. 4, no 1, p. 218-243.
- Louis, D. N., H. Ohgaki, O. D. Wiestler, W. K. Cavenee, P. C. Burger, A. Jouvet, B. W. Scheithauer et P. Kleihues. 2007. «The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system». *Acta Neuropathol*, vol. 114, no 2, p. 97-109.
- Louveau, A., T. H. Harris et J. Kipnis. 2015. «Revisiting the Mechanisms of CNS Immune Privilege». *Trends Immunol*, vol. 36, no 10, p. 569-577.

- Lu, C., S. Pelech, H. Zhang, J. Bond, K. Spach, R. Noubade, E. P. Blankenhorn et C. Teuscher. 2008. «Pertussis toxin induces angiogenesis in brain microvascular endothelial cells». *J Neurosci Res*, vol. 86, no 12, p. 2624-2640.
- Lunt, S. Y., et M. G. Vander Heiden. 2011. «Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation». *Annu Rev Cell Dev Biol*, vol. 27, p. 441-464.
- Mahjoub, M. R. 2013. «The importance of a single primary cilium». *Organogenesis*, vol. 9, no 2, p. 61-69.
- Makris, C., V. L. Godfrey, G. Krahn-Senfleben, T. Takahashi, J. L. Roberts, T. Schwarz, L. Feng, R. S. Johnson et M. Karin. 2000. «Female mice heterozygous for IKK gamma/NEMO deficiencies develop a dermatopathy similar to the human X-linked disorder incontinentia pigmenti». *Mol Cell*, vol. 5, no 6, p. 969-979.
- Maletinska, L., E. A. Blakely, K. A. Bjornstad, D. F. Deen, L. J. Knoff et T. M. Forte. 2000. «Human glioblastoma cell lines: levels of low-density lipoprotein receptor and low-density lipoprotein receptor-related protein». *Cancer Res*, vol. 60, no 8, p. 2300-2303.
- Mantovani, A., P. Allavena, A. Sica et F. Balkwill. 2008. «Cancer-related inflammation». *Nature*, vol. 454, no 7203, p. 436-444.
- Marigo, I., et F. Dazzi. 2011. «The immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells». *Semin Immunopathol*, vol. 33, no 6, p. 593-602.
- Masaldan, S., et V. V. Iyer. 2014. «Exploration of effects of emodin in selected cancer cell lines: enhanced growth inhibition by ascorbic acid and regulation of LRP1 and AR under hypoxia-like conditions». *J Appl Toxicol*, vol. 34, no 1, p. 95-104.
- Masoud, G. N., et W. Li. 2015. «HIF-1alpha pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy». *Acta Pharm Sin B*, vol. 5, no 5, p. 378-389.

- May, P. 2013. «The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 in inflammation». *Curr Opin Lipidol*, vol. 24, no 2, p. 134-137.
- May, P., E. Woldt, R. L. Matz et P. Boucher. 2007. «The LDL receptor-related protein (LRP) family: an old family of proteins with new physiological functions». *Ann Med*, vol. 39, no 3, p. 219-228.
- Mayor, S., et R. E. Pagano. 2007. «Pathways of clathrin-independent endocytosis». *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 8, no 8, p. 603-612.
- Mazella, J. 2001. «Sortilin/neurotensin receptor-3: a new tool to investigate neurotensin signaling and cellular trafficking?». *Cell Signal*, vol. 13, no 1, p. 1-6.
- Mazella, J., et J. P. Vincent. 2006. «Functional roles of the NTS2 and NTS3 receptors». *Peptides*, vol. 27, no 10, p. 2469-2475.
- Mazumdar, J., W. T. O'Brien, R. S. Johnson, J. C. LaManna, J. C. Chavez, P. S. Klein et M. C. Simon. 2010. «O₂ regulates stem cells through Wnt/beta-catenin signalling». *Nat Cell Biol*, vol. 12, no 10, p. 1007-1013.
- McMahon, H. T., et E. Boucrot. 2011. «Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis». *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 12, no 8, p. 517-533.
- McMurray, R. J., A. K. Wann, C. L. Thompson, J. T. Connelly et M. M. Knight. 2013. «Surface topography regulates wnt signaling through control of primary cilia structure in mesenchymal stem cells». *Sci Rep*, vol. 3, p. 3545.
- Mellor, H. R., et A. L. Harris. 2007. «The role of the hypoxia-inducible BH3-only proteins BNIP3 and BNIP3L in cancer». *Cancer Metastasis Rev*, vol. 26, no 3-4, p. 553-566.

- Mentlein, R., K. Hattermann et J. Held-Feindt. 2012. «Lost in disruption: role of proteases in glioma invasion and progression». *Biochim Biophys Acta*, vol. 1825, no 2, p. 178-185.
- Meriane, M., S. Duhamel, L. Lejeune, J. Galipeau et B. Annabi. 2006. «Cooperation of matrix metalloproteinases with the RhoA/Rho kinase and mitogen-activated protein kinase kinase-1/extracellular signal-regulated kinase signaling pathways is required for the sphingosine-1-phosphate-induced mobilization of marrow-derived stromal cells». *Stem Cells*, vol. 24, no 11, p. 2557-2565.
- Messeguer, X., R. Escudero, D. Farre, O. Nunez, J. Martinez et M. M. Alba. 2002. «PROMO: detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches». *Bioinformatics*, vol. 18, no 2, p. 333-334.
- Miyoshi, K., K. Kasahara, I. Miyazaki et M. Asanuma. 2011. «Factors that influence primary cilium length». *Acta Med Okayama*, vol. 65, no 5, p. 279-285.
- Moser, J. J., M. J. Fritzler et J. B. Rattner. 2009. «Primary ciliogenesis defects are associated with human astrocytoma/glioblastoma cells». *BMC Cancer*, vol. 9, p. 448.
- Motaln, H., et T. L. Turnsek. 2015. «Cytokines play a key role in communication between mesenchymal stem cells and brain cancer cells». *Protein Pept Lett*, vol. 22, no 4, p. 322-331.
- Munoz-Pinedo, C., N. El Mjiyad et J. E. Ricci. 2012. «Cancer metabolism: current perspectives and future directions». *Cell Death Dis*, vol. 3, p. e248.
- Munoz, J. L., N. D. Walker, K. W. Scotto et P. Rameshwar. 2015. «Temozolomide competes for P-glycoprotein and contributes to chemoresistance in glioblastoma cells». *Cancer Lett*, vol. 367, no 1, p. 69-75.
- Muoio, V., P. B. Persson et M. M. Sendeski. 2014. «The neurovascular unit - concept review». *Acta Physiol (Oxf)*, vol. 210, no 4, p. 790-798.

- Muratoglu, S. C., I. Mikhailenko, C. Newton, M. Migliorini et D. K. Strickland. 2010. «Low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) forms a signaling complex with platelet-derived growth factor receptor-beta in endosomes and regulates activation of the MAPK pathway». *J Biol Chem*, vol. 285, no 19, p. 14308-14317.
- Nagahashi, M., K. Takabe, K. P. Terracina, D. Soma, Y. Hirose, T. Kobayashi, Y. Matsuda et T. Wakai. 2014. «Sphingosine-1-phosphate transporters as targets for cancer therapy». *Biomed Res Int*, vol. 2014, p. 651727.
- Nakajima, C., P. Haffner, S. M. Goerke, K. Zurhove, G. Adelman, M. Frotscher, J. Herz, H. H. Bock et P. May. 2014. «The lipoprotein receptor LRP1 modulates sphingosine-1-phosphate signaling and is essential for vascular development». *Development*, vol. 141, no 23, p. 4513-4525.
- Nanegrungsunk, D., W. Onchan, N. Chattipakorn et S. C. Chattipakorn. 2015. «Current evidence of temozolomide and bevacizumab in treatment of gliomas». *Neurol Res*, vol. 37, no 2, p. 167-183.
- Narita, Y. 2015. «Bevacizumab for glioblastoma». *Ther Clin Risk Manag*, vol. 11, p. 1759-1765.
- Nathan, C. 2002. «Points of control in inflammation». *Nature*, vol. 420, no 6917, p. 846-852.
- Naude, P. J., J. A. den Boer, P. G. Luiten et U. L. Eisel. 2011. «Tumor necrosis factor receptor cross-talk». *FEBS J*, vol. 278, no 6, p. 888-898.
- Nayak, A., A. M. Ralte, M. C. Sharma, V. P. Singh, A. K. Mahapatra, V. S. Mehta et C. Sarkar. 2004. «p53 protein alterations in adult astrocytic tumors and oligodendrogliomas». *Neurol India*, vol. 52, no 2, p. 228-232.
- Negishi, Y., N. Hamano, D. Omata, A. Fujisawa, M. Manandhar, M. Nomizu et Y. Aramaki. 2011. «Effects of doxorubicin-encapsulating AG73 peptide-modified liposomes on tumor selectivity and cytotoxicity». *Results Pharma Sci*, vol. 1, no 1, p. 68-75.

- Negrini, S., V. G. Gorgoulis et T. D. Halazonetis. 2010. «Genomic instability--an evolving hallmark of cancer». *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 11, no 3, p. 220-228.
- Neufeld, G., O. Kessler et Y. Herzog. 2002. «The interaction of Neuropilin-1 and Neuropilin-2 with tyrosine-kinase receptors for VEGF». *Adv Exp Med Biol*, vol. 515, p. 81-90.
- Nishikawa, S., R. A. Goldstein et C. R. Nierras. 2008. «The promise of human induced pluripotent stem cells for research and therapy». *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 9, no 9, p. 725-729.
- Noack, J., J. Choi, K. Richter, A. Kopp-Schneider et A. Regnier-Vigouroux. 2014. «A sphingosine kinase inhibitor combined with temozolomide induces glioblastoma cell death through accumulation of dihydrosphingosine and dihydroceramide, endoplasmic reticulum stress and autophagy». *Cell Death Dis*, vol. 5, p. e1425.
- Nonaka, S., H. Shiratori, Y. Saijoh et H. Hamada. 2002. «Determination of left-right patterning of the mouse embryo by artificial nodal flow». *Nature*, vol. 418, no 6893, p. 96-99.
- O'Sullivan, C. C., M. Lindenberg, C. Bryla, N. Patronas, C. J. Peer, L. Amiri-Kordestani, N. Davarpanah, E. M. Gonzalez, M. Burotto, P. Choyke, S. M. Steinberg, D. J. Liewehr, W. D. Figg, T. Fojo, S. Balasubramaniam et S. E. Bates. 2016. «ANG1005 for breast cancer brain metastases: correlation between 18F-FLT-PET after first cycle and MRI in response assessment». *Breast Cancer Res Treat*, vol. 160, no 1, p. 51-59.
- Oberoi, R. K., K. E. Parrish, T. T. Sio, R. K. Mittapalli, W. F. Elmquist et J. N. Sarkaria. 2016. «Strategies to improve delivery of anticancer drugs across the blood-brain barrier to treat glioblastoma». *Neuro Oncol*, vol. 18, no 1, p. 27-36.

- Ohgaki, H., et P. Kleihues. 2013. «The definition of primary and secondary glioblastoma». *Clin Cancer Res*, vol. 19, no 4, p. 764-772.
- Palfree, R. G., H. P. Bennett et A. Bateman. 2015. «The Evolution of the Secreted Regulatory Protein Progranulin». *PLoS One*, vol. 10, no 8, p. e0133749.
- Palsson-McDermott, E. M., et L. A. O'Neill. 2013. «The Warburg effect then and now: from cancer to inflammatory diseases». *Bioessays*, vol. 35, no 11, p. 965-973.
- Pap, T., et J. Bertrand. 2013. «Syndecans in cartilage breakdown and synovial inflammation». *Nat Rev Rheumatol*, vol. 9, no 1, p. 43-55.
- Park, B., L. Buti, S. Lee, T. Matsuwaki, E. Spooner, M. M. Brinkmann, M. Nishihara et H. L. Ploegh. 2011. «Granulin is a soluble cofactor for toll-like receptor 9 signaling». *Immunity*, vol. 34, no 4, p. 505-513.
- Patel, M. M., B. R. Goyal, S. V. Bhadada, J. S. Bhatt et A. F. Amin. 2009. «Getting into the brain: approaches to enhance brain drug delivery». *CNS Drugs*, vol. 23, no 1, p. 35-58.
- Pavlova, N. N., et C. B. Thompson. 2016. «The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism». *Cell Metab*, vol. 23, no 1, p. 27-47.
- Phan, L. M., S. C. Yeung et M. H. Lee. 2014. «Cancer metabolic reprogramming: importance, main features, and potentials for precise targeted anti-cancer therapies». *Cancer Biol Med*, vol. 11, no 1, p. 1-19.
- Pi, X., C. E. Schmitt, L. Xie, A. L. Portbury, Y. Wu, P. Lockyer, L. A. Dyer, M. Moser, G. Bu, E. J. Flynn, 3rd, S. W. Jin et C. Patterson. 2012. «LRP1-dependent endocytic mechanism governs the signaling output of the bmp system in endothelial cells and in angiogenesis». *Circ Res*, vol. 111, no 5, p. 564-574.

- Pieper-Furst, U., et F. Lammert. 2013. «Low-density lipoprotein receptors in liver: old acquaintances and a newcomer». *Biochim Biophys Acta*, vol. 1831, no 7, p. 1191-1198.
- Pilorget, A., B. Annabi, F. Bouzeghrane, J. Marvaldi, J. Luis et R. Beliveau. 2005. «Inhibition of angiogenic properties of brain endothelial cells by platelet-derived sphingosine-1-phosphate». *J Cereb Blood Flow Metab*, vol. 25, no 9, p. 1171-1182.
- Plateel, M., E. Teissier et R. Cecchelli. 1997. «Hypoxia dramatically increases the nonspecific transport of blood-borne proteins to the brain». *J Neurochem*, vol. 68, no 2, p. 874-877.
- Plotnikova, O. V., E. A. Golemis et E. N. Pugacheva. 2008. «Cell cycle-dependent ciliogenesis and cancer». *Cancer Res*, vol. 68, no 7, p. 2058-2061.
- Portail Santé-Environnement-Travail. «Cancer et environnement - Représentation schématique des différentes étapes de la cancérogenèse». En ligne. <http://www.sante-environnement-travail.fr/minisite.php3?id_rubrique=868&id_article=2689>.
- Prager, B., S. F. Spampinato et R. M. Ransohoff. 2015. «Sphingosine 1-phosphate signaling at the blood-brain barrier». *Trends Mol Med*, vol. 21, no 6, p. 354-363.
- Preston, J. E., N. Joan Abbott et D. J. Begley. 2014. «Transcytosis of macromolecules at the blood-brain barrier». *Adv Pharmacol*, vol. 71, p. 147-163.
- Probert, L. 2015. «TNF and its receptors in the CNS: The essential, the desirable and the deleterious effects». *Neuroscience*, vol. 302, p. 2-22.
- Proia, R. L., et T. Hla. 2015. «Emerging biology of sphingosine-1-phosphate: its role in pathogenesis and therapy». *J Clin Invest*, vol. 125, no 4, p. 1379-1387.

- Proulx-Bonneau, S., et B. Annabi. 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*, vol. 6, p. 107-118.
- Pugh, C. W., et P. J. Ratcliffe. 2003. «Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system». *Nat Med*, vol. 9, no 6, p. 677-684.
- Puimege, L., C. Libert et F. Van Hauwermeiren. 2014. «Regulation and dysregulation of tumor necrosis factor receptor-1». *Cytokine Growth Factor Rev*, vol. 25, no 3, p. 285-300.
- Pulido-Salgado, M., J. M. Vidal-Taboada et J. Saura. 2015. «C/EBPbeta and C/EBPdelta transcription factors: Basic biology and roles in the CNS». *Prog Neurobiol*, vol. 132, p. 1-33.
- Pyne, N. J., F. Tonelli, K. G. Lim, J. S. Long, J. Edwards et S. Pyne. 2012. «Sphingosine 1-phosphate signalling in cancer». *Biochem Soc Trans*, vol. 40, no 1, p. 94-100.
- Qiao, L., T. J. Zhao, F. Z. Wang, C. L. Shan, L. H. Ye et X. D. Zhang. 2008. «NF-kappaB downregulation may be involved the depression of tumor cell proliferation mediated by human mesenchymal stem cells». *Acta Pharmacol Sin*, vol. 29, no 3, p. 333-340.
- Quarmby, L. M., et J. D. Parker. 2005. «Cilia and the cell cycle?». *J Cell Biol*, vol. 169, no 5, p. 707-710.
- Quint, K., N. Stiel, D. Neureiter, H. U. Schlicker, C. Nimsky, M. Ocker, H. Strik et M. A. Kolodziej. 2014. «The role of sphingosine kinase isoforms and receptors S1P1, S1P2, S1P3, and S1P5 in primary, secondary, and recurrent glioblastomas». *Tumour Biol*, vol. 35, no 9, p. 8979-8989.
- Radford, R., C. Slattery, P. Jennings, O. Blacque, W. Pfaller, H. Gmuender, J. Van Delft, M. P. Ryan et T. McMorrow. 2012. «Carcinogens induce loss of the primary cilium in human renal proximal tubular epithelial cells independently

- of effects on the cell cycle». *Am J Physiol Renal Physiol*, vol. 302, no 8, p. F905-916.
- Ramamurthy, V., et M. Cayouette. 2009. «Development and disease of the photoreceptor cilium». *Clin Genet*, vol. 76, no 2, p. 137-145.
- Ramirez, Y. P., J. L. Weatherbee, R. T. Wheelhouse et A. H. Ross. 2013. «Glioblastoma multiforme therapy and mechanisms of resistance». *Pharmaceuticals (Basel)*, vol. 6, no 12, p. 1475-1506.
- Ramji, D. P., et P. Foka. 2002. «CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation». *Biochem J*, vol. 365, no Pt 3, p. 561-575.
- Ranganathan, S., C. Cao, J. Catania, M. Migliorini, L. Zhang et D. K. Strickland. 2011. «Molecular basis for the interaction of low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) with integrin alphaMbeta2: identification of binding sites within alphaMbeta2 for LRP1». *J Biol Chem*, vol. 286, no 35, p. 30535-30541.
- Razani, B., et M. P. Lisanti. 2001. «Caveolins and caveolae: molecular and functional relationships». *Exp Cell Res*, vol. 271, no 1, p. 36-44.
- Regina, A., M. Demeule, C. Che, I. Lavallee, J. Poirier, R. Gabathuler, R. Beliveau et J. P. Castaigne. 2008. «Antitumour activity of ANG1005, a conjugate between paclitaxel and the new brain delivery vector Angiopep-2». *Br J Pharmacol*, vol. 155, no 2, p. 185-197.
- Regina, A., M. Demeule, A. Laplante, J. Jodoin, C. Dagenais, F. Berthelet, A. Moghrabi et R. Beliveau. 2001. «Multidrug resistance in brain tumors: roles of the blood-brain barrier». *Cancer Metastasis Rev*, vol. 20, no 1-2, p. 13-25.
- Reis, M., C. J. Czupalla, N. Ziegler, K. Devraj, J. Zinke, S. Seidel, R. Heck, S. Thom, J. Macas, E. Bockamp, M. Fruttiger, M. M. Taketo, S. Dimmeler, K. H. Plate et S. Liebner. 2012. «Endothelial Wnt/beta-catenin signaling inhibits glioma angiogenesis and normalizes tumor blood vessels by inducing PDGF-B expression». *J Exp Med*, vol. 209, no 9, p. 1611-1627.

- Reizes, O., S. C. Benoit et D. J. Clegg. 2008. «The role of syndecans in the regulation of body weight and synaptic plasticity». *Int J Biochem Cell Biol*, vol. 40, no 1, p. 28-45.
- Ren, G., X. Zhao, Y. Wang, X. Zhang, X. Chen, C. Xu, Z. R. Yuan, A. I. Roberts, L. Zhang, B. Zheng, T. Wen, Y. Han, A. B. Rabson, J. A. Tischfield, C. Shao et Y. Shi. 2012. «CCR2-dependent recruitment of macrophages by tumor-educated mesenchymal stromal cells promotes tumor development and is mimicked by TNFalpha». *Cell Stem Cell*, vol. 11, no 6, p. 812-824.
- Resnick, A., et U. Hopfer. 2007. «Force-response considerations in ciliary mechanosensation». *Biophys J*, vol. 93, no 4, p. 1380-1390.
- Revuelta-Lopez, E., R. Cal, A. Herraiz-Martinez, D. de Gonzalo-Calvo, L. Nasarre, S. Roura, C. Galvez-Monton, A. Bayes-Genis, L. Badimon, L. Hove-Madsen et V. Llorente-Cortes. 2015. «Hypoxia-driven sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 (SERCA2) downregulation depends on low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1)-signalling in cardiomyocytes». *J Mol Cell Cardiol*, vol. 85, p. 25-36.
- Robert, A., G. Margall-Ducos, J. E. Guidotti, O. Bregerie, C. Celati, C. Brechot et C. Desdouets. 2007. «The intraflagellar transport component IFT88/polaris is a centrosomal protein regulating G1-S transition in non-ciliated cells». *J Cell Sci*, vol. 120, no Pt 4, p. 628-637.
- Roberts, E., M. Guerrero, M. Urbano et H. Rosen. 2013. «Sphingosine 1-phosphate receptor agonists: a patent review (2010-2012)». *Expert Opin Ther Pat*, vol. 23, no 7, p. 817-841.
- Roepman, R., et U. Wolfrum. 2007. «Protein networks and complexes in photoreceptor cilia». *Subcell Biochem*, vol. 43, p. 209-235.
- Romero-Garcia, S., J. S. Lopez-Gonzalez, J. L. Baez-Viveros, D. Aguilar-Cazares et H. Prado-Garcia. 2011. «Tumor cell metabolism: an integral view». *Cancer Biol Ther*, vol. 12, no 11, p. 939-948.

- Saggar, J. K., M. Yu, Q. Tan et I. F. Tannock. 2013. «The tumor microenvironment and strategies to improve drug distribution». *Front Oncol*, vol. 3, p. 154.
- Sarret, P., P. Krzywkowski, L. Segal, M. S. Nielsen, C. M. Petersen, J. Mazella, T. Stroh et A. Beaudet. 2003. «Distribution of NTS3 receptor/sortilin mRNA and protein in the rat central nervous system». *J Comp Neurol*, vol. 461, no 4, p. 483-505.
- Sasaki, T., K. Hiroki et Y. Yamashita. 2013. «The role of epidermal growth factor receptor in cancer metastasis and microenvironment». *Biomed Res Int*, vol. 2013, p. 546318.
- Satir, P., L. B. Pedersen et S. T. Christensen. 2010. «The primary cilium at a glance». *J Cell Sci*, vol. 123, no Pt 4, p. 499-503.
- Schiffer, D., L. Annovazzi, V. Caldera et M. Mellai. 2010. «On the origin and growth of gliomas». *Anticancer Res*, vol. 30, no 6, p. 1977-1998.
- Sedger, L. M., et M. F. McDermott. 2014. «TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future». *Cytokine Growth Factor Rev*, vol. 25, no 4, p. 453-472.
- Seeger-Nukpezah, T., et E. A. Golemis. 2012. «The extracellular matrix and ciliary signaling». *Curr Opin Cell Biol*, vol. 24, no 5, p. 652-661.
- Seeger-Nukpezah, T., J. L. Little, V. Serzhanova et E. A. Golemis. 2013. «Cilia and cilia-associated proteins in cancer». *Drug Discov Today Dis Mech*, vol. 10, no 3-4, p. e135-e142.
- Seeley, E. S., et M. V. Nachury. 2010. «The perennial organelle: assembly and disassembly of the primary cilium». *J Cell Sci*, vol. 123, no Pt 4, p. 511-518.

- Selvais, C., L. D'Auria, D. Tyteca, G. Perrot, P. Lemoine, L. Troeberg, S. Dedieu, A. Noel, H. Nagase, P. Henriët, P. J. Courtoy, E. Marbaix et H. Emonard. 2011. «Cell cholesterol modulates metalloproteinase-dependent shedding of low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1) and clearance function». *FASEB J*, vol. 25, no 8, p. 2770-2781.
- Semenza, G. L. 2003. «Targeting HIF-1 for cancer therapy». *Nat Rev Cancer*, vol. 3, no 10, p. 721-732.
- Semenza, G. L. 2013. «HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations». *J Clin Invest*, vol. 123, no 9, p. 3664-3671.
- Sever, R., et J. S. Brugge. 2015. «Signal transduction in cancer». *Cold Spring Harb Perspect Med*, vol. 5, no 4.
- Seyfried, T. N., M. A. Kiebish, J. Marsh, L. M. Shelton, L. C. Huysentruyt et P. Mukherjee. 2011. «Metabolic management of brain cancer». *Biochim Biophys Acta*, vol. 1807, no 6, p. 577-594.
- Seymour, T., A. Nowak et F. Kakulas. 2015. «Targeting Aggressive Cancer Stem Cells in Glioblastoma». *Front Oncol*, vol. 5, p. 159.
- Shannon, A. M., D. J. Bouchier-Hayes, C. M. Condrón et D. Toomey. 2003. «Tumour hypoxia, chemotherapeutic resistance and hypoxia-related therapies». *Cancer Treat Rev*, vol. 29, no 4, p. 297-307.
- Société Canadienne du Cancer. 2016. «Statistiques de survie au cancer du cerveau et de la moelle épinière». En ligne. <<http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/brain-spinal/prognosis-and-survival/survival-statistics/?region=qc>>. Consulté le 6 janvier 2016.
- Société canadienne du cancer, Statistique Canada, Agence de la santé publique du Canada et Registres provinciaux et territoriaux du cancer (2015). Statistiques canadiennes sur le cancer 2015 Consulté le 6 janvier 2016.

- Société de recherche sur le cancer. 2015. «Statistiques et facteurs de risque». En ligne. <<http://www.societederecherchesurlecancer.ca/page.aspx?pid=1714>>. Consulté le 6 janvier 2016.
- Sofroniew, M. V., et H. V. Vinters. 2010. «Astrocytes: biology and pathology». *Acta Neuropathol*, vol. 119, no 1, p. 7-35.
- Song, H., Y. Li, J. Lee, A. L. Schwartz et G. Bu. 2009. «Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 promotes cancer cell migration and invasion by inducing the expression of matrix metalloproteinases 2 and 9». *Cancer Res*, vol. 69, no 3, p. 879-886.
- Sordillo, L. A., P. P. Sordillo et L. Helson. 2016. «Sphingosine Kinase Inhibitors as Maintenance Therapy of Glioblastoma After Ceramide-Induced Response». *Anticancer Res*, vol. 36, no 5, p. 2085-2095.
- Sowers, J. L., K. M. Johnson, C. Conrad, J. T. Patterson et L. C. Sowers. 2014. «The role of inflammation in brain cancer». *Adv Exp Med Biol*, vol. 816, p. 75-105.
- Spiegel, S., et S. Milstien. 2003. «Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid». *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 4, no 5, p. 397-407.
- Srimanee, A., J. Regberg, M. Hallbrink, O. Vajragupta et U. Langel. 2016. «Role of scavenger receptors in peptide-based delivery of plasmid DNA across a blood-brain barrier model». *Int J Pharm*, vol. 500, no 1-2, p. 128-135.
- Stinchcombe, J. C., et G. M. Griffiths. 2014. «Communication, the centrosome and the immunological synapse». *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, vol. 369, no 1650.
- Stins, M. F., F. Gilles et K. S. Kim. 1997. «Selective expression of adhesion molecules on human brain microvascular endothelial cells». *J Neuroimmunol*, vol. 76, no 1-2, p. 81-90.

- Strickland, D. K., D. T. Au, P. Cunfer et S. C. Muratoglu. 2014. «Low-density lipoprotein receptor-related protein-1: role in the regulation of vascular integrity». *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 34, no 3, p. 487-498.
- Studený, M., F. C. Marini, R. E. Champlin, C. Zampetti, I. J. Fidler et M. Andreeff. 2002. «Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors». *Cancer Res*, vol. 62, no 13, p. 3603-3608.
- Sun, H. Y., S. P. Wei, R. C. Xu, P. X. Xu et W. C. Zhang. 2010. «Sphingosine-1-phosphate induces human endothelial VEGF and MMP-2 production via transcription factor ZNF580: novel insights into angiogenesis». *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 395, no 3, p. 361-366.
- Szabolcs, M., M. Keniry, L. Simpson, L. J. Reid, S. Koujak, S. C. Schiff, G. Davidian, S. Licata, S. Gruvberger-Saal, V. V. Murty, S. Nandula, A. Efstratiadis, J. A. Kushner, M. F. White et R. Parsons. 2009. «Irs2 inactivation suppresses tumor progression in Pten^{+/-} mice». *Am J Pathol*, vol. 174, no 1, p. 276-286.
- Szatmari, T., R. Otvos, A. Hjerpe et K. Dobra. 2015. «Syndecan-1 in Cancer: Implications for Cell Signaling, Differentiation, and Prognostication». *Dis Markers*, vol. 2015, p. 796052.
- Tajes, M., E. Ramos-Fernandez, X. Weng-Jiang, M. Bosch-Morato, B. Guivernau, A. Eraso-Pichot, B. Salvador, X. Fernandez-Busquets, J. Roquer et F. J. Munoz. 2014. «The blood-brain barrier: structure, function and therapeutic approaches to cross it». *Mol Membr Biol*, vol. 31, no 5, p. 152-167.
- Takuwa, Y., W. Du, X. Qi, Y. Okamoto, N. Takuwa et K. Yoshioka. 2010. «Roles of sphingosine-1-phosphate signaling in angiogenesis». *World J Biol Chem*, vol. 1, no 10, p. 298-306.
- Takuwa, Y., Y. Okamoto, K. Yoshioka et N. Takuwa. 2012. «Sphingosine-1-phosphate signaling in physiology and diseases». *Biofactors*, vol. 38, no 5, p. 329-337.

- Tasouri, E., et K. L. Tucker. 2011. «Primary cilia and organogenesis: is Hedgehog the only sculptor?». *Cell Tissue Res*, vol. 345, no 1, p. 21-40.
- Tauris, J., L. Ellgaard, C. Jacobsen, M. S. Nielsen, P. Madsen, H. C. Thogersen, J. Gliemann, C. M. Petersen et S. K. Moestrup. 1998. «The carboxy-terminal domain of the receptor-associated protein binds to the Vps10p domain of sortilin». *FEBS Lett*, vol. 429, no 1, p. 27-30.
- Teng, Y. H., R. S. Aquino et P. W. Park. 2012. «Molecular functions of syndecan-1 in disease». *Matrix Biol*, vol. 31, no 1, p. 3-16.
- Thiaville, M. M., et J. Kim. 2011. «Oncogenic potential of yin yang 1 mediated through control of imprinted genes». *Crit Rev Oncog*, vol. 16, no 3-4, p. 199-209.
- Thomas, F. C., K. Taskar, V. Rudraraju, S. Goda, H. R. Thorsheim, J. A. Gaasch, R. K. Mittapalli, D. Palmieri, P. S. Steeg, P. R. Lockman et Q. R. Smith. 2009. «Uptake of ANG1005, a novel paclitaxel derivative, through the blood-brain barrier into brain and experimental brain metastases of breast cancer». *Pharm Res*, vol. 26, no 11, p. 2486-2494.
- Tian, H., Z. Gao, H. Li, B. Zhang, G. Wang, Q. Zhang, D. Pei et J. Zheng. 2015. «DNA damage response--a double-edged sword in cancer prevention and cancer therapy». *Cancer Lett*, vol. 358, no 1, p. 8-16.
- Tian, S., W. Huajun et J. Wu. 2012. «Computational prediction of furin cleavage sites by a hybrid method and understanding mechanism underlying diseases». *Sci Rep*, vol. 2, p. 261.
- Tiong, K. H., L. Y. Mah et C. O. Leong. 2013. «Functional roles of fibroblast growth factor receptors (FGFRs) signaling in human cancers». *Apoptosis*, vol. 18, no 12, p. 1447-1468.

- Toh, H., B. P. Chitramuthu, H. P. Bennett et A. Bateman. 2011. «Structure, function, and mechanism of progranulin; the brain and beyond». *J Mol Neurosci*, vol. 45, no 3, p. 538-548.
- Tso, C. L., P. Shintaku, J. Chen, Q. Liu, J. Liu, Z. Chen, K. Yoshimoto, P. S. Mischel, T. F. Cloughesy, L. M. Liau et S. F. Nelson. 2006. «Primary glioblastomas express mesenchymal stem-like properties». *Mol Cancer Res*, vol. 4, no 9, p. 607-619.
- Tuma, P., et A. L. Hubbard. 2003. «Transcytosis: crossing cellular barriers». *Physiol Rev*, vol. 83, no 3, p. 871-932.
- Tummala, P., E. J. Arnsdorf et C. R. Jacobs. 2010. «The Role of Primary Cilia in Mesenchymal Stem Cell Differentiation: A Pivotal Switch in Guiding Lineage Commitment». *Cell Mol Bioeng*, vol. 3, no 3, p. 207-212.
- Tumova, S., A. Woods et J. R. Couchman. 2000. «Heparan sulfate proteoglycans on the cell surface: versatile coordinators of cellular functions». *Int J Biochem Cell Biol*, vol. 32, no 3, p. 269-288.
- Uchibori, R., T. Tsukahara, H. Mizuguchi, Y. Saga, M. Urabe, H. Mizukami, A. Kume et K. Ozawa. 2013. «NF-kappaB activity regulates mesenchymal stem cell accumulation at tumor sites». *Cancer Res*, vol. 73, no 1, p. 364-372.
- Uchida, Y., S. Ohtsuki, Y. Katsukura, C. Ikeda, T. Suzuki, J. Kamiie et T. Terasaki. 2011. «Quantitative targeted absolute proteomics of human blood-brain barrier transporters and receptors». *J Neurochem*, vol. 117, no 2, p. 333-345.
- Urbanska, K., J. Sokolowska, M. Szmids et P. Sysa. 2014. «Glioblastoma multiforme - an overview». *Contemp Oncol (Pozn)*, vol. 18, no 5, p. 307-312.
- Vallon, M., J. Chang, H. Zhang et C. J. Kuo. 2014. «Developmental and pathological angiogenesis in the central nervous system». *Cell Mol Life Sci*, vol. 71, no 18, p. 3489-3506.

- Van Brocklyn, J. R. 2007. «Sphingolipid signaling pathways as potential therapeutic targets in gliomas». *Mini Rev Med Chem*, vol. 7, no 10, p. 984-990.
- Van Brocklyn, J. R., C. A. Jackson, D. K. Pearl, M. S. Kotur, P. J. Snyder et T. W. Prior. 2005. «Sphingosine kinase-1 expression correlates with poor survival of patients with glioblastoma multiforme: roles of sphingosine kinase isoforms in growth of glioblastoma cell lines». *J Neuropathol Exp Neurol*, vol. 64, no 8, p. 695-705.
- Van Gool, B., S. Dedieu, H. Emonard et A. J. Roebroek. 2015. «The Matricellular Receptor LRP1 Forms an Interface for Signaling and Endocytosis in Modulation of the Extracellular Tumor Environment». *Front Pharmacol*, vol. 6, p. 271.
- van Schaftingen, E., et I. Gerin. 2002. «The glucose-6-phosphatase system». *Biochem J*, vol. 362, no Pt 3, p. 513-532.
- van Tellingen, O., B. Yetkin-Arik, M. C. de Gooijer, P. Wesseling, T. Wurdinger et H. E. de Vries. 2015. «Overcoming the blood-brain tumor barrier for effective glioblastoma treatment». *Drug Resist Updat*, vol. 19, p. 1-12.
- Veeriah, S., C. Brennan, S. Meng, B. Singh, J. A. Fagin, D. B. Solit, P. B. Paty, D. Rohle, I. Vivanco, J. Chmielecki, W. Pao, M. Ladanyi, W. L. Gerald, L. Liao, T. C. Cloughesy, P. S. Mischel, C. Sander, B. Taylor, N. Schultz, J. Major, A. Heguy, F. Fang, I. K. Mellinghoff et T. A. Chan. 2009. «The tyrosine phosphatase PTPRD is a tumor suppressor that is frequently inactivated and mutated in glioblastoma and other human cancers». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 106, no 23, p. 9435-9440.
- Veland, I. R., A. Awan, L. B. Pedersen, B. K. Yoder et S. T. Christensen. 2009. «Primary cilia and signaling pathways in mammalian development, health and disease». *Nephron Physiol*, vol. 111, no 3, p. p39-53.
- Verhoeff, J. J., O. van Tellingen, A. Claes, L. J. Stalpers, M. E. van Linde, D. J. Richel, W. P. Leenders et W. R. van Furth. 2009. «Concerns about anti-

- angiogenic treatment in patients with glioblastoma multiforme». *BMC Cancer*, vol. 9, p. 444.
- Viatour, P., M. P. Merville, V. Bours et A. Chariot. 2005. «Phosphorylation of NF-kappaB and IkappaB proteins: implications in cancer and inflammation». *Trends Biochem Sci*, vol. 30, no 1, p. 43-52.
- Vlachostergios, P. J., I. A. Voutsadakis et C. N. Papandreou. 2012. «The ubiquitin-proteasome system in glioma cell cycle control». *Cell Div*, vol. 7, no 1, p. 18.
- Voronkov, A., et S. Krauss. 2013. «Wnt/beta-catenin signaling and small molecule inhibitors». *Curr Pharm Des*, vol. 19, no 4, p. 634-664.
- Waeber, C., N. Blondeau et S. Salomone. 2004. «Vascular sphingosine-1-phosphate S1P1 and S1P3 receptors». *Drug News Perspect*, vol. 17, no 6, p. 365-382.
- Wagner, E. F., et A. R. Nebreda. 2009. «Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development». *Nat Rev Cancer*, vol. 9, no 8, p. 537-549.
- Wahe, A., B. Kasmajour, C. Schmaderer, D. Liebl, K. Sandhoff, A. Nykjaer, G. Griffiths et M. G. Gutierrez. 2010. «Golgi-to-phagosome transport of acid sphingomyelinase and prosaposin is mediated by sortilin». *J Cell Sci*, vol. 123, no Pt 14, p. 2502-2511.
- Wang, Y., et M. Ohh. 2010. «Oxygen-mediated endocytosis in cancer». *J Cell Mol Med*, vol. 14, no 3, p. 496-503.
- Wann, A. K., et M. M. Knight. 2012a. «Primary cilia elongation in response to interleukin-1 mediates the inflammatory response». *Cell Mol Life Sci*, vol. 69, no 17, p. 2967-2977.
- Wann, AKT, et MM Knight. 2012b. «A role for IFT88/the primary cilium in the inflammatory response to interleukin-1». *Cilia*, vol. 1, no 1, p. 1-1.

- Ward, P. S., et C. B. Thompson. 2012. «Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate». *Cancer Cell*, vol. 21, no 3, p. 297-308.
- Watanabe, A. 2005.
- Watters, R. J., H. G. Wang, S. S. Sung, T. P. Loughran et X. Liu. 2011. «Targeting sphingosine-1-phosphate receptors in cancer». *Anticancer Agents Med Chem*, vol. 11, no 9, p. 810-817.
- Wechsler-Reya, R., et M. P. Scott. 2001. «The developmental biology of brain tumors». *Annu Rev Neurosci*, vol. 24, p. 385-428.
- Westhoff, M. A., S. Zhou, L. Nonnenmacher, G. Karpel-Massler, C. Jennewein, M. Schneider, M. E. Halatsch, N. O. Carragher, B. Baumann, A. Krause, T. Simmet, M. G. Bachem, C. R. Wirtz et K. M. Debatin. 2013. «Inhibition of NF-kappaB signaling ablates the invasive phenotype of glioblastoma». *Mol Cancer Res*, vol. 11, no 12, p. 1611-1623.
- Wheatley, D. N. 1969. «Cilia in cell-cultured fibroblasts. I. On their occurrence and relative frequencies in primary cultures and established cell lines». *J Anat*, vol. 105, no Pt 2, p. 351-362.
- Wheatley, D. N., A. M. Wang et G. E. Strugnell. 1996. «Expression of primary cilia in mammalian cells». *Cell Biol Int*, vol. 20, no 1, p. 73-81.
- Wick, W., M. Weller, M. Weiler, T. Batchelor, A. W. Yung et M. Platten. 2011. «Pathway inhibition: emerging molecular targets for treating glioblastoma». *Neuro Oncol*, vol. 13, no 6, p. 566-579.
- Wilhelm, I., et I. A. Krizbai. 2014. «In vitro models of the blood-brain barrier for the study of drug delivery to the brain». *Mol Pharm*, vol. 11, no 7, p. 1949-1963.
- Williams, P. A., R. S. Stilhano, V. P. To, L. Tran, K. Wong et E. A. Silva. 2015. «Hypoxia augments outgrowth endothelial cell (OEC) sprouting and directed

migration in response to sphingosine-1-phosphate (S1P)». *PLoS One*, vol. 10, no 4, p. e0123437.

Willnow, T. E., et O. M. Andersen. 2013. «Sorting receptor SORLA--a trafficking path to avoid Alzheimer disease». *J Cell Sci*, vol. 126, no Pt 13, p. 2751-2760.

Willnow, T. E., C. M. Petersen et A. Nykjaer. 2008. «VPS10P-domain receptors - regulators of neuronal viability and function». *Nat Rev Neurosci*, vol. 9, no 12, p. 899-909.

Wilson, T. A., M. A. Karajannis et D. H. Harter. 2014. «Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics». *Surg Neurol Int*, vol. 5, p. 64.

Wilson, W. R., et M. P. Hay. 2011. «Targeting hypoxia in cancer therapy». *Nat Rev Cancer*, vol. 11, no 6, p. 393-410.

Witsch, E., M. Sela et Y. Yarden. 2010. «Roles for growth factors in cancer progression». *Physiology (Bethesda)*, vol. 25, no 2, p. 85-101.

Wojtkowiak, J. W., D. Verduzco, K. J. Schramm et R. J. Gillies. 2011. «Drug resistance and cellular adaptation to tumor acidic pH microenvironment». *Mol Pharm*, vol. 8, no 6, p. 2032-2038.

Wolburg, H., S. Noell, P. Fallier-Becker, A. F. Mack et K. Wolburg-Buchholz. 2012. «The disturbed blood-brain barrier in human glioblastoma». *Mol Aspects Med*, vol. 33, no 5-6, p. 579-589.

Womeldorff, M., D. Gillespie et R. L. Jensen. 2014. «Hypoxia-inducible factor-1 and associated upstream and downstream proteins in the pathophysiology and management of glioblastoma». *Neurosurg Focus*, vol. 37, no 6, p. E8.

Wong, S. Y., A. D. Seol, P. L. So, A. N. Ermilov, C. K. Bichakjian, E. H. Epstein, Jr., A. A. Dlugosz et J. F. Reiter. 2009. «Primary cilia can both mediate and

suppress Hedgehog pathway-dependent tumorigenesis». *Nat Med*, vol. 15, no 9, p. 1055-1061.

Wong, T. 2011. «Platelets and angiogenesis 101». En ligne. <depts.washington.edu/hemeweb/seminars-conferences/Wong%20slides-062411.pdf>. Consulté le 22 février.

Woods, A., et J. R. Couchman. 2001. «Syndecan-4 and focal adhesion function». *Curr Opin Cell Biol*, vol. 13, no 5, p. 578-583.

Wu, W., et S. Zhao. 2013. «Metabolic changes in cancer: beyond the Warburg effect». *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, vol. 45, no 1, p. 18-26.

Wu, Z., F. M. Hofman et B. V. Zlokovic. 2003. «A simple method for isolation and characterization of mouse brain microvascular endothelial cells». *J Neurosci Methods*, vol. 130, no 1, p. 53-63.

Wujak, L., P. Markart et M. Wygrecka. 2016. «The low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) 1 and its function in lung diseases». *Histol Histopathol*, p. 11746.

Wykoff, C. C., C. W. Pugh, P. H. Maxwell, A. L. Harris et P. J. Ratcliffe. 2000. «Identification of novel hypoxia dependent and independent target genes of the von Hippel-Lindau (VHL) tumour suppressor by mRNA differential expression profiling». *Oncogene*, vol. 19, no 54, p. 6297-6305.

Xie, Q., S. Mittal et M. E. Berens. 2014. «Targeting adaptive glioblastoma: an overview of proliferation and invasion». *Neuro Oncol*, vol. 16, no 12, p. 1575-1584.

Xing, P., Z. Liao, Z. Ren, J. Zhao, F. Song, G. Wang, K. Chen et J. Yang. 2016. «Roles of low-density lipoprotein receptor-related protein 1 in tumors». *Chin J Cancer*, vol. 35, no 1, p. 6.

- Xing, Y., S. Zhao, B. P. Zhou et J. Mi. 2015. «Metabolic reprogramming of the tumour microenvironment». *FEBS J*, vol. 282, no 20, p. 3892-3898.
- Xiong, Y., et T. Hla. 2014. «S1P control of endothelial integrity». *Curr Top Microbiol Immunol*, vol. 378, p. 85-105.
- Yagi, H., et Y. Kitagawa. 2013. «The role of mesenchymal stem cells in cancer development». *Front Genet*, vol. 4, p. 261.
- Yang, C., S. Rahimpour, A. C. Yu, R. R. Lonser et Z. Zhuang. 2013. «Regulation and dysregulation of astrocyte activation and implications in tumor formation». *Cell Mol Life Sci*, vol. 70, no 22, p. 4201-4211.
- Yang, L. J., C. F. Zhou et Z. X. Lin. 2014. «Temozolomide and radiotherapy for newly diagnosed glioblastoma multiforme: a systematic review». *Cancer Invest*, vol. 32, no 2, p. 31-36.
- Yano, S., K. Kondo, M. Yamaguchi, G. Richmond, M. Hutchison, A. Wakeling, S. Averbuch et P. Wadsworth. 2003. «Distribution and function of EGFR in human tissue and the effect of EGFR tyrosine kinase inhibition». *Anticancer Res*, vol. 23, no 5A, p. 3639-3650.
- Yen, B.L., et M-L. Yen. 2008. «Mesenchymal stem cells and cancer - for better or for worse?». *Journal of Cancer Molecules*, vol. 4, no 1, p. 5-9.
- Yu, P. F., Y. Huang, Y. Y. Han, L. Y. Lin, W. H. Sun, A. B. Rabson, Y. Wang et Y. F. Shi. 2016. «TNFalpha-activated mesenchymal stromal cells promote breast cancer metastasis by recruiting CXCR2+ neutrophils». *Oncogene*.
- Yuan, K., N. Frolova, Y. Xie, D. Wang, L. Cook, Y. J. Kwon, A. D. Steg, R. Serra et A. R. Frost. 2010. «Primary cilia are decreased in breast cancer: analysis of a collection of human breast cancer cell lines and tissues». *J Histochem Cytochem*, vol. 58, no 10, p. 857-870.

- Zech, N. 2004. «Adult Stem Cell Manipulation and Possible Clinical Perspectives». *J. Reproduktionsmed. Endokrinol*, vol. 1, no 2, p. 91-99.
- Zelova, H., et J. Hosek. 2013. «TNF-alpha signalling and inflammation: interactions between old acquaintances». *Inflamm Res*, vol. 62, no 7, p. 641-651.
- Zeng, W., P. Liu, W. Pan, S. R. Singh et Y. Wei. 2015. «Hypoxia and hypoxia inducible factors in tumor metabolism». *Cancer Lett*, vol. 356, no 2 Pt A, p. 263-267.
- Zgheib, A., S. Lamy et B. Annabi. 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*, vol. 288, no 19, p. 13378-13386.
- Zgheib, A., E. Pelletier-Bonnier, L. C. Levros, Jr. et B. Annabi. 2013. «Selective JAK/STAT3 signalling regulates transcription of colony stimulating factor-2 and -3 in Concanavalin-A-activated mesenchymal stromal cells». *Cytokine*, vol. 63, no 2, p. 187-193.
- Zhang, C., L. M. Moore, X. Li, W. K. Yung et W. Zhang. 2013. «IDH1/2 mutations target a key hallmark of cancer by deregulating cellular metabolism in glioma». *Neuro Oncol*, vol. 15, no 9, p. 1114-1126.
- Zhang, F., C. L. Xu et C. M. Liu. 2015. «Drug delivery strategies to enhance the permeability of the blood-brain barrier for treatment of glioma». *Drug Des Devel Ther*, vol. 9, p. 2089-2100.
- Zimmermann, P., Z. Zhang, G. Degeest, E. Mortier, I. Leenaerts, C. Coomans, J. Schulz, F. N'Kuli, P. J. Courtoy et G. David. 2005. «Syndecan recycling [corrected] is controlled by syntenin-PIP2 interaction and Arf6». *Dev Cell*, vol. 9, no 3, p. 377-388.