

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

IMPLICATION DE MMP-9 DANS LE PHÉNOTYPE INVASIF DES CELLULES
SOUCHES CANCÉREUSES ET DANS L'ENDOTHÉLIUM VASCULAIRE CÉRÉBRAL
TUMORAL

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR
SHANTI ROJAS-SUTTERLIN

SEPTEMBRE 2008

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

J'aimerais d'abord remercier le Dr Richard Béliveau de m'avoir accueillie au sein du Laboratoire de Médecine Moléculaire et de m'avoir accordé sa confiance tout au long de ma maîtrise. Les connaissances et aptitudes que j'ai acquises sont inestimables pour la poursuite de mon cheminement scientifique.

J'aimerais aussi remercier le Dr Borhane Annabi pour sa constante disponibilité, son aide, ses encouragements et ses nombreux conseils, ainsi que mes collègues et amis du laboratoire, Martha, Marie-Paule, Anissa, les deux Simon, Carl et Jean-Christophe. Vous côtoyer a été un vrai plaisir.

J'adresse mes plus sincères remerciements aux membres de ma famille qui m'ont toujours encouragée à donner le meilleur de moi-même.

Finalement, je remercie les donateurs de la Fondation de l'UQÀM, qui m'ont permis l'octroi d'une bourse d'excellence durant mes études.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	viii
RÉSUMÉ.....	xi
CHAPITRE I.....	1
INTRODUCTION.....	1
1 Le cancer.....	1
1.1 La carcinogenèse.....	1
1.2 Les cellules souches cancéreuses (CSC).....	2
1.2.1 La résistance aux agents de chimiothérapie.....	2
1.2.2 CD133 : un des marqueurs de surface des CSC.....	3
2 L'endothélium vasculaire tumoral.....	4
2.1 Les cellules endothéliales tumorales.....	4
2.2 Mécanismes de vascularisation des tumeurs.....	5
2.2.1 L'intussusception.....	6
2.2.2 Le recrutement d'angioblastes.....	6
2.2.3 La cooption vasculaire.....	7
2.2.4 L'angiogenèse par bourgeonnement.....	7
2.3 La matrice extracellulaire.....	8
3 Les métalloprotéinases matricielles (MMP).....	9
3.1 Généralités.....	9

3.2	Les métalloprotéinases.....	9
3.2.1	Structures des MMP.....	10
3.2.2	Transcription des MMP.....	10
3.2.3	Activation et inhibition des MMP.....	11
3.3	La MMP-9.....	12
3.3.1	Caractéristiques.....	12
3.3.2	Transcription de MMP-9.....	13
3.3.3	La stabilisation de l'ARNm de MMP-9.....	14
3.3.4	L'activation de MMP-9.....	14
3.3.5	L'inhibition de MMP-9.....	15
3.4	Rôles des MMP dans les pathologies.....	16
4	Approches thérapeutiques.....	17
4.1	Traitements classiques.....	17
4.2	La nutrathérapie.....	19
4.2.1	Le sulforaphane.....	20
	CHAPITRE II.....	33
	PRÉSENTATION DU PROJET.....	33
1	Mise en contexte.....	33
2	Projet de recherche.....	34
	Volet 1 : Expression de MMP-9 et de MT1-MMP lors de la formation de neurosphères tumorales cérébrales.....	34
	Volet 2 : Impact du sulforaphane sur les fonctions de MMP-9, sécrétée par les cellules endothéliales cérébrales.....	35
	CHAPITRE III.....	36
	ARTICLES.....	36

1	Tumor environment dictates medulloblastoma cancer stem cell expression and invasive phenotype. Annabi B, Rojas-Sutterlin S , Laflamme C, Lachambre MP, Rolland Y, Sartelet H & Béliveau R, (2008) <i>Molecular Cancer Research</i> vol.6, no 6, p.907-916	38
2	The diet-derived sulforaphane inhibits matrix metalloproteinase-9-activated human brain microvascular endothelial cell migration and tubulogenesis. Rojas-Sutterlin S , Annabi B, Laroche M, Lachambre MP, Moundjian R & Béliveau R (2008) <i>Molecular Nutrition & Food Research</i> vol.52, no 6, p.692-700.....	66
	CHAPITRE IV	92
	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	92
	CHAPITRE V	97
	CONCLUSION	97

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Les six signatures du cancer.	24
Figure 2. Différences structurelles entre l'endothélium vasculaire normal et tumoral.	26
Figure 3. Mécanismes de vascularisation tumorale.....	27
Figure 4. La balance angiogénique.....	28
Figure 5. Membres de la famille des MMP dans les mammifères.	29
Figure 6. Principaux éléments de régulation en <i>cis</i> des gènes des gélatinases.....	30
Figure 7. Cascade d'activation des MMP.	31
Figure 8. Production du sulforaphane.	32

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Marqueurs de surface associés aux cellules souches de tumeurs solides	25
--	----

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ACS	<i>American Cancer Association</i>
ADN	acide désoxyribonucléique
Ang	angiopoïétine
AP-1	<i>activator protein 1</i>
Apaf-1	<i>apoptosis protease-activation factor-1</i>
ARE	<i>adenosine and uridine-rich element</i>
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATP	adénosine triphosphate
Bcl	<i>B-cell leukemia/lymphoma</i>
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BHE	barrière hémato-encéphalique
CSC	cellule souche cancéreuse
CD	cytochalasine D
CDK	<i>cyclin-dependent kinase</i>
CEP	<i>circulating endothelial precursor</i>
CE	cellule endothéliale
CET	cellule endothéliale tumorale
COX	cyclo-oxygénase
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
EVAL	<i>embryonic lethal abnormal vision-like</i>
Glu	glutamate
GPI	<i>glycosyl-phosphatidylinositol-anchored protein</i>
GSH	glutathion
HBMEC	<i>human brain microvascular endothelial cell</i>
HIF	<i>hypoxia inducible factor</i>
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>

HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cell</i>
IFN	interféron
IL	interleukine
iNOS	<i>inductible nitric oxide synthase</i>
JNK	<i>jun N-terminal kinase</i>
kDa	kiloDalton
LDL	<i>low-density lipoprotein</i>
LMA	leucémie myéloïde aiguë
LPS	lipopolysaccharide
LRP	<i>low density lipoprotein receptor-related protein</i>
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>
MEC	matrice extracellulaire
MMP	<i>matrix metalloproteinase</i>
MT-MMP	<i>membrane-type MMP</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor κB</i>
NOD-SCID	<i>non-obese diabetic, severe combined immunodeficient</i>
NOS	<i>nitric oxide synthase</i>
p38	protéine 38
pb	paire de bases
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PEA3	<i>polymavirus enhancer A binding-protein-3</i>
PMA	phorbol 12-myristate 13-acétate
RAP	<i>receptor-associated protein</i>
RECK	<i>reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs</i>
Ref	<i>regulator of fusion</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RRM	<i>RNA recognition motif</i>
SAPK	<i>stress-activated protein kinase</i>
SFN	sulforaphane
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteinases</i>

TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TPA	12-O-tetradecanoyl-phorbol 13-acetate
tPA	<i>tissue plasminogen activator</i>
TRE	<i>(TPA)-responsive elements</i>
Trx	thiorédoxine
TSP	thrombospondine
uPA	<i>urokinase-type plasminogen activator</i>
UTR	<i>untranslated region</i>
UV	ultra-violet
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
Zn	zinc

RÉSUMÉ

Le traitement des tumeurs cérébrales représente un défi d'envergure, puisqu'elles sont isolées du reste du corps par la barrière hémato-encéphalique. Il est donc impératif d'accroître nos connaissances sur les cellules composant ces tumeurs. L'une des hypothèses émergentes concerne la présence d'une sous-population spécifique de cellules au sein de la tumeur, les cellules souches cancéreuses (CSC), impliquées dans l'initiation et la récurrence des cancers. Les marqueurs de surfaces des CSC varient largement selon le tissu d'intérêt, mais il semble que CD133, une glycoprotéine membranaire, soit une signature commune à plusieurs CSC. S'il est courant de traiter le cancer en ciblant les cellules cancéreuses elles-mêmes, cibler le microenvironnement dans lequel évolue la tumeur est une avenue thérapeutique prometteuse. En effet, les cellules endothéliales (CE) au sein d'une tumeur sont connues pour avoir des propriétés différentes des CE normales. Ces cellules endothéliales tumorales (CET) peuvent donc constituer une cible supplémentaire pour inhiber sélectivement la croissance tumorale. À l'aide d'une lignée de médulloblastome (DAOY), nous avons identifié et évalué de nouvelles caractéristiques cellulaires et moléculaires impliquées dans la régulation du phénotype invasif associé à la formation de structures comparables aux neurosphères formées par les CSC CD133(+). De plus, nous avons apporté de nouvelles informations concernant les propriétés chimiopréventives du sulforaphane (SFN), un composé naturel retrouvé principalement dans le brocoli, en ciblant spécifiquement les CET cérébrales possiblement impliquées dans la cooption vasculaire. En utilisant la technologie de l'ARN interférant, nous avons montré que MMP-9 et MT1-MMP, deux métalloprotéinases matricielles importantes pour l'invasion cellulaire, les métastases et la résistance à la radiation, avaient un rôle crucial dans la formation par les DAOY de structures apparentées aux neurosphères CD133(+). De plus, nous avons mis en évidence une inhibition presque complète (> 90 %) de la migration des HBMEC (human brain microvascular endothelial cell) activées par un carcinogène, le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA). Ainsi, nos résultats suggèrent que les molécules présentes dans notre diète pourraient cibler les CET cérébrales composant la masse tumorale. En somme, nous proposons que MMP-9 constitue une cible de choix pour le traitement du cancer, que ce soit au niveau du compartiment tumoral ou vasculaire.

Mots clés : cellule souche cancéreuse (CSC), cellule endothéliale tumorale (CET), sulforaphane (SFN), métalloprotéinase matricielle-9 (MMP-9), tumeur cérébrale

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1 Le cancer

1.1 La carcinogenèse

Le développement d'une tumeur maligne, ou cancer, implique des interactions complexes entre plusieurs facteurs, qu'ils soient environnementaux (p. ex. carcinogènes chimiques ou virus) ou endogènes (p. ex. hormones). Selon la vision largement répandue, le développement d'un cancer commence par une phase d'initiation, suivie d'une phase de progression. Ainsi, l'exposition des cellules somatiques à un carcinogène cause des mutations génétiques au niveau des protooncogènes, soit un ensemble de gènes contrôlant la croissance et la différenciation cellulaire, ce qui mène à l'activation des oncogènes, pour finalement se traduire par une croissance et une différenciation incontrôlées (Weinstein, 1988). Les gènes suppresseurs de tumeur et les séquences régulant la transcription seraient également des cibles critiques lors de la carcinogenèse initiée par un agent chimique (Weinstein, 1987). Les promoteurs de tumeurs, par exemple, produisent des effets épigénétiques en se liant à des récepteurs membranaires. Le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA ou TPA), un puissant promoteur de tumeur, induit un nombre d'effets phénotypiques dans les cellules, tels que la modulation de la différenciation et des effets membranaires (Weinstein, 1988). Par la suite, une conversion maligne s'effectue et consiste en une succession de mutations génétiques menant à la transformation progressive de cellules tumorales en cellules cancéreuses (Foulds, 1954 ; Nowell, 1976). Hanahan et Weinberg (2000) ont suggéré que le vaste catalogue de génotypes de cellules cancéreuses se manifeste par six altérations essentielles de la physiologie cellulaire, qui collectivement, dictent la croissance maligne. Il s'agit de l'autosuffisance en signaux de croissance, de l'insensibilité aux signaux d'arrêt de croissance, de la résistance à la mort programmée par apoptose, du potentiel de réplication illimité, de l'angiogenèse soutenue et de l'invasion tissulaire et métastases (Figure 1.) (Hanahan et Weinberg, 2000).

1.2 Les cellules souches cancéreuses (CSC)

Les recherches faites au cours du vingtième siècle ont révélé l'importance des facteurs épidémiologiques, de l'activation des proto-oncogènes et des mutations génétiques dans le développement et la progression du cancer (Lee et Herlyn, 2007). Plus récemment, les études suggèrent l'implication d'une sous-population spécifique de cellules au sein de la tumeur, dans l'initiation et la récurrence des cancers. Puisque cette sous-population partage des caractéristiques avec les cellules souches somatiques, telles que la capacité d'autorenouvellement, de division asymétrique et de différenciation en plusieurs types cellulaires, on s'y réfère en tant que cellules souches cancéreuses (CSC) (Neuzil *et al.*, 2007). L'autorenouvellement est la capacité d'une cellule à se diviser asymétriquement, c'est-à-dire que la cellule mère se divise et donne naissance à une copie d'elle-même, et donc capable d'autorenouvellement, ainsi qu'en une autre cellule fille qui pourra se différencier pour éventuellement donner une cellule spécialisée. L'origine des CSC demeure néanmoins controversée. Dean *et al.* (2005) ont suggéré deux origines, soit 1) la transformation maligne d'une cellule souche normale qui, dû à une exposition prolongée à des carcinogènes, accumule des mutations, ou 2) l'acquisition de la capacité d'autorenouvellement d'une cellule différenciée suite à des altérations génétiques. Ces hypothèses corrént avec le concept bien répandu de carcinogenèse dépendante de multiples étapes (Dean, Fojo et Bates, 2005). Ces cellules initiatrices de tumeurs ont été identifiées dans les leucémies, les myélomes multiples, les néoplasies du système nerveux et les carcinomes colorectaux, de la prostate ou hépatocytaires (Neuzil *et al.*, 2007).

1.2.1 La résistance aux agents de chimiothérapie

La capacité de rejeter activement les substances toxiques est une des propriétés intrinsèques de plusieurs types de tumeurs. La théorie qui prévalait jusqu'à tout récemment était que la résistance des tumeurs aux différents agents de chimiothérapie était la conséquence directe de la pression sélective imposée par la substance toxique et/ou le composé chimiothérapeutique (Lee et Herlyn, 2007). Il est admis que l'agent de chimiothérapie puisse effectivement cibler toutes les cellules malignes composant la tumeur,

mais pas les CSC. Ainsi, les CSC résistantes pourraient alors régénérer la tumeur initiale avec des cellules capables de rejeter encore plus efficacement la ou les agents de chimiothérapie (Michor *et al.*, 2005). En effet, il semble que les CSC partagent d'autres caractéristiques avec les cellules souches normales, qui leur confèrent une résistance naturelle aux agents de chimiothérapie et aux toxines (Dean, Fojo et Bates, 2005). Plus précisément, il est alors question de quiescence cellulaire, les agents de chimiothérapie ciblant généralement le cycle cellulaire, ou les cellules qui se divisent rapidement (Dean, Fojo et Bates, 2005), de leur capacité de réparation de l'ADN et de l'expression de plusieurs transporteurs ABC (ATP-binding cassette), qui utilisent l'énergie d'hydrolyse de l'ATP pour rejeter les agents de chimiothérapie ou agents cytotoxiques hors de la cellule (Dean, Hamon et Chimini, 2001).

1.2.2 CD133 : un des marqueurs de surface des CSC

Il est admis qu'au sein d'une tumeur, les CSC représenteraient moins de 1 % des cellules (Lee et Herlyn, 2007 ; Neuzil *et al.*, 2007). Afin de pouvoir les caractériser davantage, il devient impératif de concevoir des méthodes d'isolation efficaces. Actuellement, les stratégies expérimentales employées pour isoler et caractériser les CSC impliquent la reconnaissance de marqueurs de surface spécifiques. L'idée des marqueurs de surface pour sélectionner les CSC est venue suite à des études faites sur les leucémies myéloïdes aiguës (LMA). En effet, ces études démontraient que seules les cellules CD34⁺/CD38⁻ implantées dans des souris immunodéficientes pouvaient initier une LMA (Lapidot *et al.*, 1994). Ce n'est que près de dix ans plus tard que Al-Hajj *et al.* (2003) ont isolé avec succès des CSC CD44⁺/CD24⁻ originant des tumeurs solides (Al-Hajj *et al.*, 2003). Des études subséquentes ont ensuite identifié différents marqueurs de surface de CSC qui diffèrent selon le type de tumeur (Tableau 1). Il faut cependant mentionner que l'isolation de cellules basée sur les marqueurs de surface ne donne pas nécessairement une population pure, mais plutôt enrichie en CSC (Lee et Herlyn, 2007).

Les marqueurs de surface des CSC varient largement selon le tissu d'intérêt. Parmi ces marqueurs, il semble que l'expression élevée de CD133 soit une signature commune à

plusieurs CSC. En effet, des études récentes ont montré que CD133 était fortement exprimée dans la population de CSC de médulloblastomes, glioblastomes, ainsi que dans les carcinomes de la prostate et du colon (Neuzil *et al.*, 2007).

CD133, aussi connu sous le nom de prominine-1, est une glycoprotéine de surface comprenant cinq domaines transmembranaires et deux grandes boucles glycosylées extracellulaires. Cette protéine a d'abord été isolée au niveau des protrusions membranaires des cellules souches hématopoïétiques (Miraglia *et al.*, 1997). La fonction de CD133 n'a pas encore été clairement établie. On ne connaît ni son ligand, ni ses partenaires intracellulaires, et les données sur l'inactivation de CD133 dans des souris ne sont pas encore disponibles. Par contre, il a été montré que l'expression de l'antigène CD133 corrélait avec un potentiel prolifératif important des cellules épithéliales de la membrane basale de la prostate et leur capacité à régénérer un épithélium complètement différencié (Richardson *et al.*, 2004). De plus, les cellules CD133(+) circulantes sont capables de se différencier *in vitro* en myoblastes et de participer à la régénération des muscles squelettiques dans un modèle murin de dystrophie musculaire de Duchenne (Torrente *et al.*, 2004). Bien que CD133 semble être un marqueur efficace pour l'identification de cellules souches, son influence sur les propriétés d'autorenouvellement et de différenciation reste obscure. Shmelkov *et al.* (2005) ont suggéré que CD133 pouvait participer à l'établissement et au maintien de différents types de protubérances membranaires et, via cet effet potentiel, CD133 pourrait aussi influencer la polarité cellulaire, la migration et les interactions des cellules souches avec les cellules voisines et/ou avec la matrice extracellulaire (Aguado *et al.*; Shmelkov *et al.*, 2005). Enfin, il a été montré que les microdomaines riches en cholestérol étaient enrichis en CD133 (Corbeil *et al.*, 2001).

2 L'endothélium vasculaire tumoral

2.1 Les cellules endothéliales tumorales

L'angiogenèse est un processus qui mène à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins et requière la contribution des cellules endothéliales (CE). En plus de son implication dans le cycle menstruel et la cicatrisation, chez l'adulte, l'angiogenèse se produit

également en réponse à des stimuli pathologiques (Carmeliet, 2000). Plus particulièrement, l'angiogenèse est cruciale pour la croissance et l'invasion des tumeurs solides. En effet, les vaisseaux sanguins assurent alors un apport adéquat en oxygène et en nutriments aux cellules tumorales, tout en étant une voie potentielle vers d'autres sites de l'organisme pour la formation de métastases (Folkman, 1995). En absence de néo-vascularisation, les tumeurs solides ne peuvent croître au-delà de 2-3 mm³ (Folkman, 1972).

L'endothélium vasculaire tumoral est différent du tissu vasculaire normal, entre autres à cause d'un manque de muscles lisses, du recouvrement inadéquat des vaisseaux par les péricytes, de la désorganisation des patrons de ramification (Figure 2) et de la perméabilité accrue des vaisseaux (Eberhard *et al.*, 2000 ; Hashizume *et al.*, 2000). Ainsi, les CE contribuant à la masse tumorale possèdent un phénotype unique et distinct de leur pendant normal (Bussolati *et al.*, 2003). Différents facteurs peuvent être responsables du phénotype des cellules endothéliales tumorales (CET). La persistance de la stimulation angiogénique par le micro-environnement et la dédifférenciation des cellules tumorales en cellules ayant des caractéristiques apparentées aux CE sont des explications envisagées (Bussolati *et al.*, 2003). En effet, il a été montré que les cellules de mélanomes expriment des marqueurs endothéliaux comme TIE-1, et participent, *in vivo*, à l'organisation des vaisseaux tumoraux (Maniotis *et al.*, 1999). En ce sens, Alessandri *et al.* (1998) ont utilisé l'une des isoformes de la fibronectine, une molécule d'adhésion, pour l'isolation spécifiquement des CET (Alessandri *et al.*, 1998). Vu l'hétérogénéité de l'endothélium vasculaire tumoral, il est possible que les CET, quelle que soit leur origine, ne représentent pas la totalité de la population des CE présentes dans les tumeurs (Bussolati *et al.*, 2003).

2.2 Mécanismes de vascularisation des tumeurs

Depuis plusieurs années, la vascularisation de la tumeur était expliquée par la simple croissance de vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants, soit l'angiogenèse par bourgeonnement. Plus récemment, des mécanismes additionnels ont vu le jour (Revue par (Auguste *et al.*, 2005), tels que l'intussusception, le recrutement d'angioblastes (précurseurs endothéliaux circulants) et la cooption vasculaire (Figure 3) (Jain *et al.*, 2007). Dans une

même tumeur, ces mécanismes peuvent être concomitants, ou impliqués sélectivement selon le type de tumeur, ou le micro-environnement de l'hôte (Auguste *et al.*, 2005).

2.2.1 L'intussusception

L'intussusception est un processus qui implique la formation d'une colonne de tissu interstitiel à l'intérieur de la lumière d'un vaisseau préexistant, ce qui entraîne la partition de sa lumière (Auguste *et al.*, 2005). Plus précisément, des CE opposées entrent en contact (« *kissing contact* ») et une jonction interendothéliale se développe alors au point de contact. Par la suite, la pression des cytoplasmes et l'amincissement de leurs membranes entraînent la formation d'une lumière supplémentaire. Normalement, les péricytes sont responsables du « *kissing contact* », via leur activité contractile. Ce processus serait métaboliquement avantageux et très rapide, car il n'implique pas la prolifération de cellules endothéliales comme lors de l'angiogenèse par bourgeonnement (voir la section 2.2.4). Il a été montré que l'intussusception a été impliquée dans l'angiogenèse tumorale, ce qui peut expliquer le remodelage rapide de l'endothélium vasculaire (Patan, Munn et Jain, 1996).

2.2.2 Le recrutement d'angioblastes

Dans le processus d'embryogenèse, l'hémangioblaste est un précurseur commun aux cellules hématopoïétiques et aux lignées endothéliales. Cette cellule qui exprime le récepteur du VEGF (VEGFR2 pour Vascular endothelial growth factor receptor 2) donne naissance à une cellule progénitrice dédiée, l'angioblaste. Cette cellule peut à son tour se différencier en CE mature (Rafii, 2000 ; Rüegg, 2002). Chez l'adulte, les angioblastes sont dérivés des cellules progénitrices adultes multipotentes produites dans la moelle osseuse. Ces cellules deviennent par la suite des cellules précurseurs endothéliales circulantes (CEP). Les CEP circulantes peuvent s'incorporer dans les sites d'angiogenèse et contribuer à l'augmentation de la néo-vascularisation, probablement par une différenciation *in situ* en des CE matures (Rüegg, 2002). Elles sont recrutées lors d'une stimulation causée par le VEGF, Ang-1 (angiopoïétine-1) et MMP-9 (métalloprotéinase-9) (Rafii *et al.*, 2002). L'implantation de tumeurs chez des souris a permis de constater que le recrutement des CEP pour former la néo-vascularisation tumorale dépend du type de tumeur, étant maximale dans les lymphomes

(> 90%) et moindre dans les neuroblastomes (< 5%) (Davidoff *et al.*, 2001 ; Rafii *et al.*, 2002).

2.2.3 La cooption vasculaire

Il est maintenant admis que les tumeurs se développant dans des tissus très vascularisés comme le cerveau et les poumons n'ont pas besoin de néo-vascularisation pour assurer leur croissance. Il existe cependant des évidences cliniques et expérimentales que des tumeurs grandissent en utilisant des vaisseaux déjà présents, condition dénommée cooption vasculaire (Rüegg, 2002). Les mécanismes précis qui régissent l'interrelation entre les vaisseaux préexistants qui subissent la cooption et l'angiogenèse tumorale sont encore mal compris, mais ils semblent impliquer des facteurs anti et proangiogéniques connus, tels le VEGF et les Ang-1 et -2. Les récepteurs pour ces deux familles de facteurs de croissance sont spécifiquement retrouvés sur l'endothélium vasculaire (Sato *et al.*, 1995).

Holash *et al.* (1999) ont observé que certains types de tumeurs, comme les tumeurs cérébrales, établissent rapidement une cooption des vaisseaux de l'hôte pour former une masse tumorale initialement très vascularisée (Holash *et al.*, 1999). Les CE impliquées dans la cooption synthétisent la Ang-2 et son récepteur Tie2. La liaison de Ang-2 induit entre autres l'apoptose des CE, ce qui mène à une réduction importante du nombre de vaisseaux et à une augmentation du diamètre de ceux-ci. Conséquemment, le manque de vaisseaux entraîne un environnement hypoxique et la mort de nombreuses cellules tumorales. Par contre, les cellules tumorales restantes augmentent leur expression de VEGF et il en résulte une angiogenèse importante en périphérie de la tumeur (Auguste *et al.*, 2005).

2.2.4 L'angiogenèse par bourgeonnement

L'angiogenèse par bourgeonnement est la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants (Diaz-Flores, Gutierrez et Varela, 1994). Ce processus résulte d'une cascade d'événements reliés à la propriété qu'ont les CE à former des capillaires (Obrenovitch et Monsigny, 1986). Il est contrôlé très précisément par une balance dynamique entre les facteurs positifs et négatifs de l'angiogenèse (Naldini et Carraro, 2005).

Ainsi, dans les tissus normaux, la quiescence vasculaire est maintenue par la dominance des inhibiteurs angiogéniques endogènes par rapport aux activateurs (Figure 4).

Deux phases peuvent être distinguées dans le processus d'angiogenèse par bourgeonnement, soit la phase morphogénique, qui requiert la prolifération et la migration des CE, suivie de la phase de maturation, caractérisée par la reconstitution de la MEC et le recrutement des péricytes autour des vaisseaux nouvellement formés (Feige et Bailly, 2000). Plus précisément, le processus implique d'abord la dégradation protéolytique de la membrane basale et la MEC en périphérie des vaisseaux sanguins, suivie par la migration des CE sur une matrice provisoire (faite de protéines plasmatiques telles que le fibrinogène et la fibrine) dans la direction du chimioattractant. Les CE prolifèrent et développent éventuellement des jonctions intercellulaires et forment des vaisseaux continus créant ainsi une lumière. Une membrane basale vasculaire est alors reconstituée et les péricytes sont recrutés pour compléter la maturation des vaisseaux sanguins nouvellement formés (Rundhaug, 2005).

2.3 La matrice extracellulaire

La prolifération et la migration des CE dans l'espace périvasculaire requièrent l'adhésion de celles-ci à la MEC (Wang, Anderson et Gladson, 2005). En effet, cette dernière, ainsi que les composants de la membrane basale, peuvent transduire des signaux pro et antiangiogéniques, et ce, en se liant aux intégrines situées sur les membranes plasmiques des CE. À titre d'exemple, les fibres intactes de collagène de type IV, composant spécifiquement la lame basale, une composante de la membrane basale, lient les intégrines $\alpha1\beta1$ et $\alpha2\beta1$ exprimées sur les CE et induisent leur prolifération et leur migration. Au contraire, le collagène de type IV dégradé ne peut lier ces intégrines, mais lie plutôt l'intégrine $\alpha v\beta3$, et inhibe ainsi la migration et la prolifération. Ainsi, l'état physique de la MEC influence directement les CE. De plus, la MEC agit aussi comme un compartiment d'entreposage pour des facteurs proangiogéniques comme le VEGF, bFGF (basic fibroblast growth factor) et le TGF1 (transforming growth factor 1). Ceux-ci sont relâchés suite à la dégradation de la MEC (Kalluri, 2003).

Puisque, l'angiogenèse implique la migration et l'invasion des CE dans les tissus et le stroma environnant, les protéases comme les métalloprotéinases de la matrice (MMP) sont d'une importance particulière. En effet, il est maintenant bien établi que le rôle de ces enzymes va au-delà de la simple dégradation de la MEC pour faciliter l'invasion des CE. En effet, plusieurs MMP sont aussi nécessaires pour relarguer les facteurs proangiogéniques séquestrés dans la MEC, pour la maturation de facteurs de croissance et des récepteurs (incluant les intégrines et les récepteurs d'adhésion), ainsi que pour générer certains composés antiangiogéniques endogènes, tels que l'arrestine et l'endostatine, des fragments de collagène obtenus suite à sa protéolyse (Rundhaug, 2005).

3 Les métalloprotéinases matricielles

3.1 Généralités

De façon générale, la MEC et la membrane basale peuvent être dégradées par quatre classes d'enzymes protéolytiques, soit les protéinases à cystéine, à aspartate, à sérine et les métalloprotéinases (Johansson, Ahonen et Kahari, 2000). La dégradation bien synchronisée de la MEC est un processus important dans le développement, la morphogénèse, la réparation et le remodelage tissulaire (Nagase, Visse et Murphy, 2006). Ce processus est régulé précisément sous des conditions physiologiques normales, mais lors d'un dérèglement, il peut mener à un état pathologique comme l'arthrite, l'encéphalomyélite, les ulcères chroniques, les fibroses et le cancer (Nagase, Visse et Murphy, 2006). Plusieurs protéinases sont impliquées dans la dégradation de la MEC, mais il est considéré que les principales sont les MMP, aussi appelées matrixines (Nagase, Visse et Murphy, 2006).

3.2 Les métalloprotéinases

Les MMP sont des endopeptidases dépendantes du zinc connues pour leur capacité à cliver un ou plusieurs constituants de la MEC. Chez l'humain, elles constituent une famille de 23 endoprotéases qui peuvent être classées en quatre sous-groupes, soit les collagénases, stromélysines, gélatinases et les MMP de type membranaire (MT-MMP), qui partagent une

structure et des éléments fonctionnels communs (Nagase, Visse et Murphy, 2006). Bien que la distribution tissulaire des protéinases puisse varier grandement, la plupart des cellules synthétisent et sécrètent des MMP dans la MEC. L'expression des MMP est généralement faible dans les tissus et est induite lorsque le remodelage de la MEC est requis (Van den Steen *et al.*, 2002).

3.2.1 Structures des MMP

Bien que les membres de la famille de MMP soient issus de 24 gènes différents (incluant le gène dupliqué de MMP-23) (Nagase, Visse et Murphy, 2006), leur séquence d'acides aminés, ainsi que leur domaine fonctionnel sont grandement conservés (30 à 50%) (Massova *et al.*, 1998). La structure primaire des MMP comprend un peptide signal d'environ 20 acides aminés, qui sera clivé lors de la sécrétion ou l'insertion à la membrane, un propeptide contenant une cystéine qui permet de maintenir la proenzyme sous une forme latente, un domaine catalytique qui contient un site de liaison au Zn^{2+} , une région « charnière » qui lie le domaine catalytique au domaine hémopexine (Figure 5). C'est sous la forme de proenzyme que les MMP sont généralement sécrétées (Johansson, Ahonen et Kahari, 2000 ; Massova *et al.*, 1998 ; Pavlaki *et al.*, 2002), et la quantité de protéines actives dépend de trois niveaux de régulation qui seront discutés dans les sections suivantes, soit la transcription, l'activation et l'inhibition de l'enzyme.

3.2.2 Transcription des MMP

La transcription des MMP peut être influencée par des signaux exogènes tels que les cytokines, les facteurs de croissance, les hormones stéroïdiennes ou suite à des contacts altérés intercellulaires ou entre les cellules et la matrice (Kahari et Saarialho-Kere, 1997 ; Nagase, Visse et Murphy, 2006), mais aussi par des oncogènes et des esters de phorbol (Mancini et Di Battista, 2006). Le PMA est largement utilisé comme promoteur de tumeur dans les recherches sur le cancer. Il s'agit d'un analogue du diacylglycérole et est un ligand de grande affinité envers la protéine kinase C (Shin *et al.*, 2007).

Le promoteur des MMP inductibles contient un élément *cis* AP-1 conservé entre la position -65 et -79 par rapport au site d'initiation de la transcription et un ou plusieurs éléments *cis* du PEA3 (polymavirus enhancer A binding-protein-3). La séquence AP-1 est un site de liaison pour les facteurs de transcription des familles Fos et Jun, alors que l'élément PEA3 est lié par les facteurs de transcription de la famille des ETS. Ces derniers coopèrent avec les éléments AP-1 pour une activation maximale des promoteurs des MMP. L'induction de l'expression de c-Jun et c-Fos est médiée par trois classes distinctes de MAP kinases, soit la voie de ERK (extracellular signal-regulated kinase), de SAPK/JNKs (stress-activated protein kinase/Jun N-terminal kinases) et p38 (Kahari et Saarialho-Kere, 1997). Brièvement, la voie de ERK est activée par des signaux mitogéniques et mène à l'activation de la transcription de *c-fos*, alors que les voies SAPK/JNKs et p38 sont activées par des cytokines (p. ex. TNF et IL-1) et certains stress cellulaires (p. ex. rayons UV) et mènent à l'activation de la transcription de *c-jun* (Karin, Liu et Zandi, 1997). Ainsi, les niveaux d'expression génique peuvent être changés rapidement lorsque le remodelage de la MEC est nécessaire (Klein *et al.*, 2004).

3.2.3 Activation et inhibition des MMP

Comme il a déjà été mentionné, les MMP sont sécrétées sous une forme latente inactive (zymogène), et sont activées suite à un clivage protéolytique dans le milieu extracellulaire. La forme latente est assurée par ce qui est couramment appelé la « *cysteine switch* », puisqu'une cystéine conservée dans la séquence du propeptide établit une interaction covalente avec le zinc catalytique (Johansson, Ahonen et Kahari, 2000 ; Klein *et al.*, 2004). L'activité des MMP peut être contrôlée par deux principaux inhibiteurs endogènes, soit α_2 -macroglobuline et les inhibiteurs de métalloprotéinases tissulaires (TIMP). Ainsi, la balance entre les MMP et ces inhibiteurs est critique pour le remodelage éventuel de la MEC dans un tissu (Nagase, Visse et Murphy, 2006). Chez l'humain, α_2 -macroglobuline est une glycoprotéine plasmatique de 725 kDa, composée de quatre sous-unités identiques. Elle inhibe la majorité des protéinases en formant un complexe qui est rapidement internalisé via une endocytose dépendante des récepteurs LRP (low density lipoprotein receptor-related protein-1) (Nagase, Visse et Murphy, 2006). Pour sa part, la

la famille des TIMP est constituée de quatre membres (TIMP-1, -2, -3 et -4) d'un poids moléculaire de ~ 22-28 kDa. Ceux-ci possèdent deux sous-domaines, chacun contenant trois ponts disulfures conservés. Le domaine N-terminal est considéré comme un domaine indépendant responsable de l'activité inhibitrice des MMP (Nagase, Visse et Murphy, 2006). Le mécanisme d'inhibition des MMP par les TIMP a été élucidé par la structure cristalline du complexe TIMP-MMP. Brièvement, quatre résidus de l'extrémité N-terminale (Cys1-Thr-Cys-Val4) et les résidus Glu67-Ser-Val-Cys70, qui sont liés par un pont disulfure, forment une structure qui peut s'incorporer dans le site actif des MMP. Le zinc catalytique est chélaté par le groupe d'amines N-terminales et le groupement carbonyle du la Cys1, qui expulse la molécule d'eau liée au zinc (Nagase, Visse et Murphy, 2006). Les TIMP-1, -2 et -4 sont sécrétées sous la forme soluble, alors que TIMP-3 est séquestré à la membrane plasmique (Chirco *et al.*, 2006).

3.3 La MMP-9

3.3.1 Caractéristiques

Comme il a été mentionné précédemment, les MMP, de par leur capacité à dégrader la MEC, sont importantes pour les processus d'angiogenèse, de croissance tumorale et de métastase. En particulier, les MMP-2 et MMP-9 sont des joueurs clés, puisqu'elles seules peuvent hydrolyser le collagène de type IV natif, le principal composant des membranes basales (Genersch *et al.*, 2000).

La MMP-9, ou gélatinase B, est une protéase de 92 kDa fortement glycosylée, sécrétée dans le milieu extracellulaire par un grand nombre de types cellulaires. Cette enzyme a la capacité d'hydrolyser plus d'un composant de la MEC, tels la gélatine (collagène dénaturé), le collagène (type I, IV, V, VII et X), l'élastine et des glycoprotéines comme la laminine et fibronectine (Van den Steen *et al.*, 2002). Au-delà des composantes de la MEC, la MMP-9 peut hydrolyser plusieurs protéines fonctionnelles, comme les inhibiteurs de sérine protéase (α 1-antitrypsine et α 1-antichymotrisine), le récepteur à IL2- α , le facteur de croissance transformant- β (TGF- β), le profacteur de nécrose tumorale- α (proTNF- α) et certaines chimiokines (Van den Steen *et al.*, 2002). La régulation de l'activité

de la MMP-9 s'effectue également au niveau de la transcription de son gène, de l'activation et de l'inhibition. Des études récentes montrent néanmoins que la stabilisation de l'ARNm, ainsi que l'internalisation de MMP-9 par des récepteurs de la famille des LDL (low-density lipoprotein) sont fort probablement les mécanismes les plus importants dans la régulation de MMP-9.

3.3.2 Transcription de MMP-9

La séquence promotrice du gène humain de MMP-9 ressemble davantage au promoteur des collagénases interstitielles et de la stromélysine-1 qu'au promoteur de la MMP-2. Ainsi, bien que ces enzymes aient une spécificité de substrat relativement similaire, la régulation génique de ces deux gélatinases est plutôt différente (Figure 6) (Huhtala *et al.*, 1991). Plusieurs régions en *cis* semblent agir en synergie afin de contrôler la transcription basale et induite du gène de MMP-9. Brièvement, le promoteur contient au moins quatre éléments de réponse TRE/AP-1 (pour 12-O-tétradécanoyl-phorbol-13-acétate (TPA)-responsive elements/activator protein-1), qui peuvent potentiellement être des sites de liaison pour les membres de la famille de facteurs de transcription c-Fos et c-Jun. Ainsi, l'élément AP-1, à -79 pb, semble être nécessaire, mais non suffisant, pour l'induction de la transcription en réponse à des esters de phorbol, et des cytokines (Sato *et al.*, 2002). Cet élément coopérerait avec des éléments Sp1 et NF- κ B, en position -563 et -600 respectivement. L'élément NF- κ B, en plus d'être absolument nécessaire pour une surexpression du gène induite par le TNF- α , régule la réponse à IL-1 β , Bcl-2, au virus d'immunodéficience humaine (HIV)-1-Tat, au suppresseur de métastase KiSS-1, ou à une combinaison synergique des cytokines et facteurs de croissance (Van den Steen *et al.*, 2002). Selon le type cellulaire, la MMP-9 peut être induite par plusieurs facteurs comme le EGF, PDGF, bFGF, TGF- α , TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IFN- α , IFN- γ et le TGF- β , en plus des carcinogènes tels les esters de phorbol.

3.3.3 La stabilisation de l'ARNm de MMP-9

Le temps de demi-vie de l'ARNm de MMP-9 est un indice reflétant le niveau de régulation post-transcriptionnel, et qui a des répercussions sur la quantité de protéine synthétisée. Des études récentes montrent que la protéine HuR peut lier le transcrit de MMP-9 et assurer sa stabilisation. HuR fait partie de la famille de protéine ELAV (embryonic lethal abnormal vision-like), qui est constituée de quatre membres connus, soit HuD, HuC, Hel-N1 et HuR. Les trois premiers sont exprimés sélectivement dans les neurones (Hel-N1 est aussi retrouvé dans les gonades), alors que HuR est une protéine ubiquitaire. Les protéines Hu contiennent trois domaines conservés de liaison à l'ARN faisant partie de la superfamille des RRM (RNA recognition motif, aussi appelés RBD). RRM 1 et 2 sont responsables de la liaison aux AREs (adenosine and uridine-rich elements) localisés dans la région 3' non-transcrite (UTR) des ARNm, alors que RRM3 lie la queue de poly(A) de cet ARNm. Ces interactions simultanées seraient essentielles pour la stabilisation du transcrit par HuR (Fan et Steitz, 1998). Les cibles connues de HuR sont les ARNm de c-Fos, c-myc, cycline A, cycline B1, NOS II, VEGF et MMP-9 (Annabi *et al.*, 2007 ; Barreau, Paillard et Osborne, 2005 ; Levy, 1998). De façon prédominante, HuR est localisé dans le noyau, où il lie d'abord l'ARNm au niveau des AREs, accompagne ce dernier jusqu'au cytosol et retourne ensuite au noyau après s'être dissocié du brin d'ARN (Fan et Steitz, 1998).

3.3.4 L'activation de MMP-9

Comme les autres MMP, la MMP-9 est sécrétée sous la forme de proenzyme qui peut être activée par la *cysteine switch*, c'est-à-dire, le clivage de son propeptide. Bien que plusieurs protéases puissent activer l'enzyme, les MMP peuvent également s'activer entre-elles et déclencher ainsi une cascade d'activation (Figure 7). Les activateurs directs de la MMP-9 sont la matrilysine-1 (MMP-7), la matrilysine-2 (MMP-26), la collagénase de fibroblaste (MMP-1), la collagénase-3 (MMP-13), la stromélysine-1 (MMP-3), la stromélysine-2 (MMP-10) et la gélatinase A (MMP-2) (Forget, Desrosiers et Beliveau, 1999 ; Van den Steen *et al.*, 2002). Ainsi, le degré d'activité enzymatique de la MMP-9 est directement proportionnel au ratio des concentrations des inhibiteurs (TIMP) et des

activateurs (les autres MMP). Il est à noter que la liaison de la proMMP-9 à son substrat, en l'occurrence la gélatine ou le collagène de type IV, lui confère une activité enzymatique sans qu'il y ait clivage du propeptide (Bannikov *et al.*, 2002).

Parmi les protéases capables de déclencher le réseau d'activation des MMP, deux familles sont d'une importance particulière : le système d'activateur du plasminogène/plasmine et les MT-MMP (Forget, Desrosiers et Beliveau, 1999). Brièvement, le plasminogène peut être converti en plasmine par l'activateur du plasminogène tissulaire (tPA) ou par l'urokinase (Jadhav, 2004 #73). La plasmine peut alors activer d'autres MMP et la cascade d'activation qui s'en suit, se termine par l'activation de la MMP-9. Pour leur part, les MT-MMP peuvent activer des MMP telles que la MMP-2 et la MMP-13, qui activent à leur tour la MMP-9 (Van den Steen *et al.*, 2002).

3.3.5 L'inhibition de MMP-9

L'activité de la MMP-9 extracellulaire peut être modulée par son inhibition fonctionnelle ou sa dégradation. Mis à part les inhibiteurs plasmatiques tels que α 2-macroglobuline, l'enzyme peut être inhibée localement par la famille des TIMP. TIMP-1 possède une grande affinité pour MMP-9, alors que l'affinité de TIMP-2 et -3 pour la MMP-9 est plus faible (Van den Steen *et al.*, 2002).

L'endocytose médiée par les récepteurs est un mécanisme fondamental qui régule le niveau extracellulaire de plusieurs ligands. Les récepteurs LRP (LDL receptor-related protein) (Revue par Herz et Strickland, 2001) sont structurellement semblables aux autres membres de la famille des récepteurs LDL. Les récepteurs sont sous la forme d'hétérodimères, comprenant une chaîne lourde responsable de la liaison du ligand, associée de façon non-covalente à une chaîne légère qui permet l'ancrage à la membrane. À ce jour, les récepteurs comptent plus de 30 partenaires biologiques, incluant des constituants de la MEC (p. ex. les thrombospondines (TSP)-1 et -2 et la fibronectine), des protéases libres ou complexées (p. ex. tPA et uPA) et les MMP, soit la MMP-2, -9 et -13 (Emonard *et al.*, 2005). Il est à noter qu'une protéine de 39 kDa, copurifiée avec les LRP et nommée RAP (receptor-

associated protein), sert de protéine chaperon et assure le bon repliement des récepteurs, tout en évitant la liaison des récepteurs immatures avec des ligands intracellulaires (Emonard *et al.*, 2005).

Selon le type de MMP, l'endocytose peut impliquer d'abord une association avec un partenaire soluble, i.e. TIMP-1 pour la MMP-9 ; suivi par une liaison directe au LRP. Il a cependant été démontré que TIMP-1 n'est pas requis pour l'internalisation de la MMP-9 via les LRP. Ainsi, le récepteur cellulaire LRP peut lier spécifiquement et avec une grande affinité la MMP-9 (et la proMMP-9) et contrôler son niveau extracellulaire en induisant une endocytose rapide, suivie d'une dégradation lysosomale (Emonard *et al.*, 2005 ; Hahn-Dantona *et al.*, 2001).

3.4 Rôles des MMP dans les pathologies

L'expression des MMP dans les tumeurs est contrôlée de manière paracrine par des facteurs de croissance et des cytokines sécrétées par les cellules infiltrant la tumeur ainsi que des cellules tumorales elles-mêmes et les cellules stromales (Mandal *et al.*, 2003). Les MMP promeuvent l'initiation et soutiennent la croissance des tumeurs primaires et les foyers métastatiques, en activant à leur tour les facteurs de croissance, ou en relâchant les molécules mitogènes des protéines matricielles séquestrées dans la MEC autour de la tumeur (Mandal *et al.*, 2003). Par exemple, le relâchement du VEGF intégré dans la MEC par MMP-9 permettrait le recrutement des péricytes. Il s'agirait de la principale contribution des cellules de l'hôte dans la progression tumorale (Deryugina et Quigley, 2006). Ainsi, les facteurs de croissance qui sont activés par les MMP induisent directement la prolifération des cellules tumorales, ou indirectement, régulent le devenir des fibroblastes ou des CE qui supportent la croissance tumorale (Mandal *et al.*, 2003). D'un autre côté, certains membres de la famille des MMP, plus particulièrement la MMP-3, -7, -9 et -12, peuvent limiter l'angiogenèse dans les aires péri-tumorales, en générant l'angiostatine à partir du plasminogène (McQuibban *et al.*, 2000). En effet, le degré de vascularisation d'une tumeur est inversement proportionnel à la synthèse de l'angiostatine produite par la MMP-9 (Chen *et al.*, 2005). Il semble que les

stages précoces de la formation des tubules soient dépendants de la balance entre les protéases actives et les inhibiteurs (Mandal *et al.*, 2003)

Les MMP sont impliquées dans la dégradation de la membrane basale et de la MEC au cours des stades précoces de la tumorigenèse. Elles contribuent donc à la formation d'un micro-environnement qui promeut la croissance tumorale. Par contre, les MMP sont également actives à des stades plus tardifs du développement cancéreux, puisqu'elles contribuent aux métastases (Mandal *et al.*, 2003). Il est maintenant bien connu que les tumeurs malignes expriment un haut niveau de MMP (Mandal *et al.*, 2003). En effet, il a été démontré que l'activité des MMP est requise pour augmenter la mobilité des cellules épithéliales et pour la croissance des cellules tumorales métastatiques (Mandal *et al.*, 2003). L'augmentation de l'expression des membres de la famille des MMP corrèle avec le remodelage de la MEC durant la tumorigenèse et le phénotype malin. Une augmentation de l'expression de la MMP-9 a été rapportée chez des patients atteints de divers cancers, entre autres les tumeurs cérébrales, le cancer de la vessie, divers cancers de la peau, le cancer des poumons, du sein, et de la prostate. De plus, l'expression de la MMP-9 a été corrélée avec le grade histologique des lymphomes malins et avec l'agressivité des cancers gastriques et des gliomes pour ne nommer que ceux-ci. (Van den Steen *et al.*, 2002). Il faut noter que l'expression de la MMP-9 n'est pas limitée aux cellules tumorales. En effet, son expression est également retrouvée dans les cellules stromales environnantes et dans les cellules inflammatoires originaires de l'hôte. Plus précisément, une concentration importante de MMP-9 est retrouvée à l'interface tumeur-stroma, principalement dans les cellules stromales les plus proches du front d'invasion. La concentration de l'enzyme diminue avec la distance, par rapport à la tumeur (Deryugina et Quigley, 2006).

4 Approches thérapeutiques

4.1 Traitements classiques

Les types d'interventions qui sont présentement préconisées pour le traitement du cancer sont la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. Ces traitements ont pour but la

rémission de la maladie, c'est-à-dire la régression de la tumeur cancéreuse, et idéalement sa disparition clinique.

Les traitements contre le cancer peuvent être locaux, systémiques ou une combinaison des deux. Les traitements locaux, tels que la radiothérapie et la chirurgie, sont privilégiés lorsque la tumeur est bénigne et de petite taille (Gittoes, 2003 ; Kreutzer et Fahlbusch, 2004). Brièvement, la chirurgie consiste à éradiquer la tumeur primaire, ainsi que les lésions présentes dans les ganglions lymphatiques à proximité. La radiothérapie tente pour sa part de détruire les cellules cancéreuses en utilisant une source de rayonnement (rayons X, rayons gamma, électrons et autres). Les rayonnements administrés à de fortes doses sur les cellules dans la zone irradiée (saines et cancéreuses), endommagent l'ADN de ces dernières et empêchent ainsi leur développement et leur division (Sindelar et Kinsella, 2003). Ces deux types de traitements sont souvent utilisés conjointement. En effet, l'irradiation précédant ou suivant la chirurgie permettrait de réduire la masse tumorale ou diminuer les risques de récurrence respectivement.

La chimiothérapie traite le cancer au moyen de médicaments qui visent à ralentir ou même à bloquer le développement des cellules cancéreuses pour ainsi empêcher la multiplication et les métastases. Puisque la chimiothérapie a des effets sur toutes les cellules du corps, elle peut endommager les cellules saines et provoquer des effets secondaires importants. Elle est donc employée dans le cas de tumeurs malignes et métastasées. La chimiothérapie peut être aussi combinée à la chirurgie et/ou à la radiothérapie. On parle alors de chimiothérapie adjuvante. Les médicaments de chimiothérapie sont typiquement cytotoxiques et peuvent être subdivisés comme suit : 1) les agents alkylants et apparentés qui forment des liaisons covalentes avec les nucléotides de l'ADN et inhibent ainsi la réplication, 2) les agents antimétaboliques, qui bloquent ou détournent une ou plusieurs voies de synthèse de l'ADN, 3) les antibiotiques cytotoxiques, qui sont des produits d'origine microbienne et qui inhibent la division cellulaire et 4) les agents qui affectent de façon spécifique la fonction du fuseau mitotique en liant la tubuline (Lechat, 2007).

D'autres approches médicamenteuses plus récentes font maintenant partie de l'arsenal thérapeutique tel que les anticorps monoclonaux (p. ex. herceptine), les modificateurs de la réponse immune (p. ex. interféron α 2, IL-2), les inhibiteurs de l'activité protéine tyrosine kinase (p. ex. imatinib), les vaccins antitumoraux, les inhibiteurs de l'angiogénèse, la thérapie génique et/ou cellulaire (Lechat, 2007). Ces médicaments sont souvent liés à la pharmacorésistance et causent plusieurs effets secondaires. Par contre, la recherche effectuée au cours des dernières années est parvenue à mettre en évidence qu'un grand nombre de plantes et aliments faisant partie de notre quotidien alimentaire constituaient des sources de molécules possédant la capacité d'interférer avec certains processus impliqués dans le développement du cancer, d'une façon analogue au mode d'action de plusieurs médicaments synthétiques actuels (Béliveau et Gingras, 2005).

4.2 La nutrathérapie

Les aliments comestibles sont composés de macronutriments (glucides, lipides, protéines), micronutriments (vitamines, minéraux) et de molécules phytochimiques, qui sont responsables de la couleur et des propriétés organoleptiques, c'est-à-dire affectant les organes des sens. Plus précisément, les composés phytochimiques sont les molécules qui permettent aux plantes de se défendre contre les infections et les microorganismes, les insectes et autres prédateurs. Ces composés ont donc des fonctions antibactériennes, antifongiques et insecticides chez les végétaux. D'un autre côté, des études épidémiologiques internationales ont mis en évidence les effets protecteurs de composés phytochimiques, en associant la consommation de certains fruits et légumes avec une diminution du risque de cancer (Béliveau et Gingras, 2005 ; Juge, Mithen et Traka, 2007).

Les molécules phytochimiques ont souvent la capacité d'interagir avec plusieurs des cibles visées par les médicaments d'origine synthétique développés par l'industrie pharmaceutique. La principale différence entre les molécules présentes dans les aliments et les molécules synthétiques est l'absence de toxicité associée à la consommation de ces molécules anticancéreuses. Ces molécules ont donc la capacité d'agir directement sur les cellules cancéreuses, mais auraient également la possibilité de stimuler le système

immunitaire et d'inhiber les processus angiogéniques. La nutrathérapie peut donc être comparée à une chimiothérapie utilisant les molécules anticancéreuses d'origine alimentaire pour prévenir et combattre le développement tumoral. Cette nouvelle approche ne constitue cependant pas une thérapie alternative aux thérapies classiques, mais plutôt un outil complémentaire (Béliveau et Gingras, 2005).

4.2.1 Le sulforaphane

Les plantes de la famille du chou appartiennent à une sous-famille de crucifères, connues en botanique sous l'appellation de *Brassica*. De tous les végétaux comestibles, les légumes crucifères sont probablement ceux qui contiennent la plus grande variété de molécules phytochimiques aux propriétés anticancéreuses, dont les glucosynolates. La molécule de glucosynolate est composée de deux parties, dont une chaîne latérale responsable de ses propriétés phytochimiques (Juge, Mithen et Traka, 2007). Le brocoli (*Brassica oleracea italica*) contient une grande concentration de glucoraphanine qui, suite à une transformation mécanique (p. ex. la mastication) entre en contact avec la myrosinase, une enzyme qui est responsable de l'hydrolyse de ce glucosinolate et générant ainsi le sulforaphane (SFN), une puissante molécule anticancéreuse (Figure 8) (Gingras *et al.*, 2004). Il est à noter que la cuisson peut dénaturer la myrosinase, mais les glucosinolates ingérés peuvent tout de même être convertis en SFN par l'activité thioglucosidase microbienne du colon (Juge, Mithen et Traka, 2007).

Il a été démontré que le SFN (1-isothiocyanato-4-(methylsulfinyl)-butane) possède des propriétés chimioprotectrices impliquant plusieurs mécanismes pouvant interagir et réduire les risques de carcinogénèse. Ces mécanismes incluent 1) l'inhibition des enzymes de phase I du cytochrome P450, 2) l'induction des enzymes métaboliques de phase II, 3) l'induction de l'apoptose, 4) l'arrêt du cycle cellulaire, 5) des propriétés anti-inflammatoires et 6) une inhibition de l'angiogénèse (Juge, Mithen et Traka, 2007).

Virtuellement, tous les carcinogènes provenant de la diète ou de l'environnement sont sujets à des processus enzymatiques qui ont lieu principalement via l'oxydation, mais

aussi la réduction et l'hydrolyse. Ces événements physiologiques sont appelés métabolisme de phase I et sont principalement catalysés par les enzymes du cytochrome P450 (Juge, Mithen et Traka, 2007). En inhibant les enzymes de phase I, le SFN peut donc réduire les dommages à l'ADN causés par la liaison de ces carcinogènes (Asakage *et al.*, 2006).

Classiquement, les enzymes de phase II sont caractérisées par leur capacité à convertir les carcinogènes en métabolites pouvant être excrétés du corps, pour ainsi prévenir leur réaction avec l'ADN (Juge, Mithen et Traka, 2007). Le SFN induit donc une série de protéines, telles que la glutathione transférase et la quinone réductase, capable de catalyser une grande variété de réactions qui confèrent une cytoprotection contre la toxicité des électrophiles et les espèces réactives de l'oxygène (ROS) telles que le superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et le peroxynitrite. Plus précisément, les isothiocyanates induiraient ces enzymes en stimulant la transcription de leur gène via un élément activateur anti-oxidant/électrophile (Asakage *et al.*, 2006). Un débalancement entre la production et l'élimination des ROS est considéré comme étant impliqué dans une variété de processus pathologiques.

L'induction de l'apoptose par le SFN a été documentée dans des cellules du colon (Gamet-Payraastre *et al.*, 2000), de la prostate (Choi *et al.*, 2007), des médulloblastomes (Gingras *et al.*, 2004) et des cellules mammaires de souris (Jackson et Singletary, 2004). Il a été montré que le SFN peut activer la voie apoptotique mitochondriale, qui implique le relâchement du cytochrome c, qui lie alors Apaf-1 (apoptosis protease activation factor-1) et mène à l'activation de la caspase initiateur, la caspase-9 (Juge, Mithen et Traka, 2007). Il semble que le SFN puisse aussi induire l'apoptose via l'activation des voies des MAP kinases, mais ses effets semblent varier selon la lignée cellulaire (Cobb et Goldsmith, 1995). De plus, certains groupes de recherche voient une implication de p53 (Fimognari *et al.*, 2002) et du stress du réticulum endoplasmique (Karmakar *et al.*, 2006) dans l'apoptose induite par le SFN. En plus de l'activation des voies apoptotiques dépendantes des caspases, il a été montré que le SFN pouvait également induire cette mort cellulaire par une voie indépendante de celles-ci (Asakage *et al.*, 2006).

Concernant le cycle cellulaire, il est connu que la progression au travers des quatre phases est régulée par des kinases cycline-dépendante (CDK), des cyclines et leurs inhibiteurs, protéines que peut réguler le SFN (Juge, Mithen et Traka, 2007). L'arrêt du cycle par le SFN pourrait aussi impliquer la désorganisation des microtubules, via l'inhibition de la tubuline polymérase (Jackson et Singletary, 2004), ce qui interfère avec la mitose. De plus, le SFN a été impliqué récemment dans la modification de l'acétylation des histones, processus qui contrôle l'expression de gènes via l'altération structurale de la chromatine (Myzak *et al.*, 2004).

Bien que l'inflammation chronique et la carcinogenèse soient des mécanismes possiblement liés, très peu d'informations concernant les effets anti-inflammatoires du SFN sont disponibles. Il semble que ce dernier puisse diminuer le niveau de transcription de iNOS et COX2 activé par les lipopolysaccharides (LPS) et la sécrétion de TNF- α par les macrophages (Heiss *et al.*, 2001). De plus, il pourrait inactiver directement la sous-unité du facteur de transcription NF- κ B en liant un résidu cystéine, ou indirectement en interagissant avec le GSH et d'autres régulateurs redox (Trx et Ref-1) qui sont importants pour les fonctions de NF- κ B (Heiss *et al.*, 2001). C'est donc dire que l'action anti-inflammatoire et anticarcinogénique du SFN ne passe pas seulement par la modulation de la biotransformation des enzymes, mais aussi par la régulation de gènes impliqués dans les voies inflammatoires (Juge, Mithen et Traka, 2007).

Finalement, il a été montré que le SFN pouvait inhiber l'expression de l'ARNm du VEGF et deux facteurs de transcription angiogéniques, soit c-Myc et HIF-1 α (Bertl, Bartsch et Gerhauser, 2006). D'un autre côté, il peut affecter l'intégrité de la membrane basale en inhibant la transcription de MMP-2 et de son inhibiteur TIMP-2 (Bertl, Bartsch et Gerhauser, 2006). De plus, l'inhibition de l'angiogenèse pourrait passer par la suppression de la prolifération des CE (Jackson, Singletary et Venema, 2007).

Le SFN peut donc interférer avec plusieurs voies de signalisation cellulaire, incluant l'inhibition des enzymes activées par les carcinogènes, l'induction des enzymes de détoxification des carcinogènes, l'augmentation de l'apoptose, l'arrêt de la progression du

cycle cellulaire, l'inhibition de l'inflammation et de l'angiogenèse, ainsi que d'autres mécanismes qui ne sont pas encore très bien décrits. Ces mécanismes démontrent la remarquable capacité du SFN à agir à différentes étapes de la carcinogenèse, soit l'initiation, la promotion et la progression, ainsi qu'au niveau des étapes finales, i.e. l'angiogenèse et les métastases (Juge, Mithen et Traka, 2007).

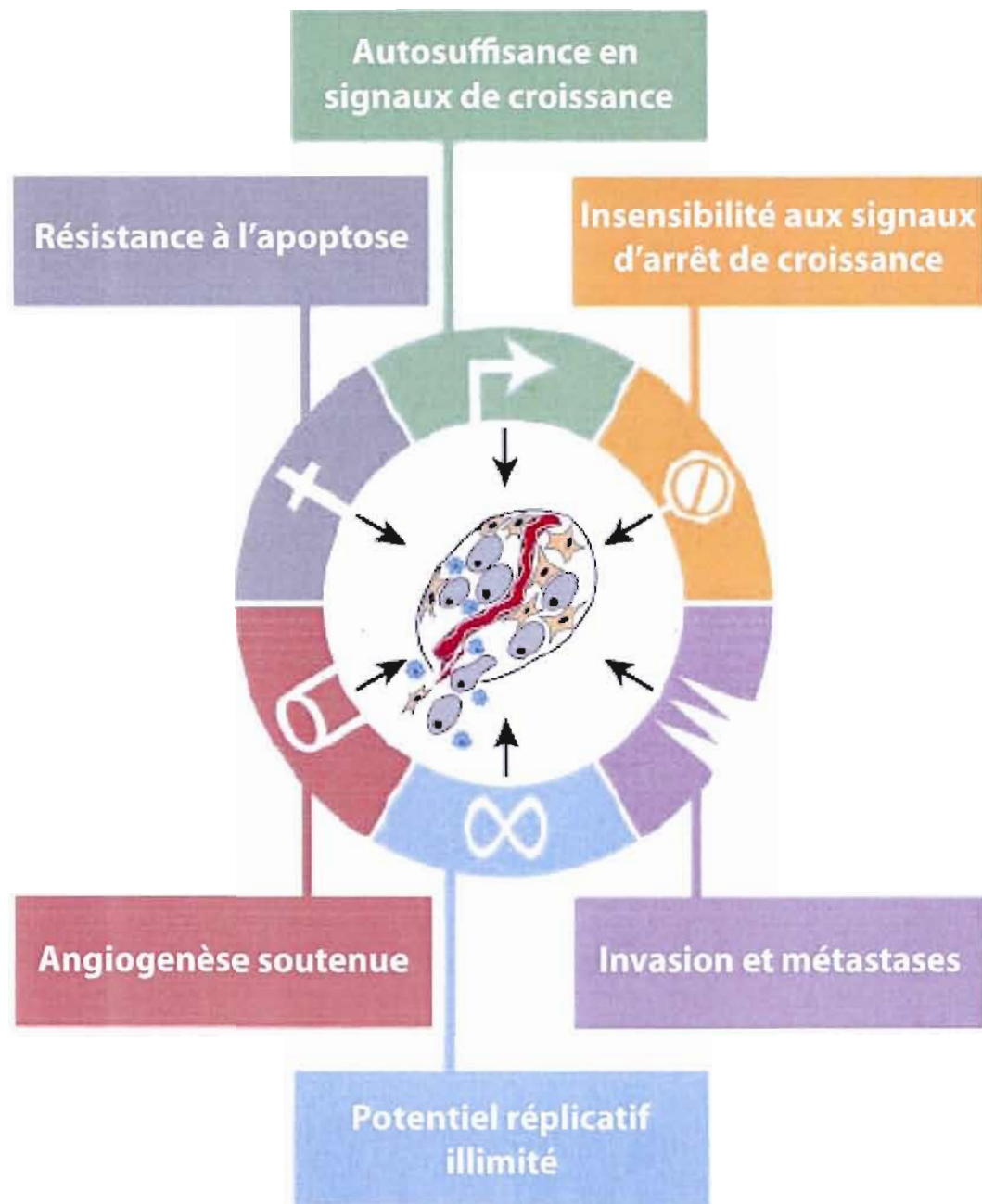


Figure 1. Les six signatures du cancer.

Caractéristiques fonctionnelles acquises par la majorité des cellules cancéreuses. Adapté de (Hanahan et Weinberg, 2000).

Tableau 1. Marqueurs de surface associés aux cellules souches de tumeurs solides

Adapté de (Lee et Herlyn, 2007)

Type de tumeur	Marqueurs de surface	Références
Sein	CD44 ⁺ , CD24 ^{-/low} , Lignée ⁻	Al Hajj et al (2003)
Cerveau (gliome)	CD133 ⁺	Singh et al. (2004)
Os (sarcome)	Stro-1 ⁺ , CD105 ⁺ , CD44 ⁺	Gobbs et al. (2005)
Colorectal	a: EpCAM ^{high} /CD44 ⁺ /CD166 ⁺ b: CD133 ⁺	a : Dalerba et al. (2007) b : O'Brien et al. (2007); Ricci-Vitiani et al. (2007)
Tête et cou	CD44 ⁺ /BMI-1 ⁺	Prince et al. (2007)
Foie	CD133 ⁺	Ma et al. (2007)
Poumon	Sca-1 ⁺ , CD45 ⁻ , PECAM ⁻ , CD34 ⁺	Kim et al (2005)
Mélanome	CD20 ⁺	Fang et al. (2005)
Pancréas	CD44 ⁺ , CD24 ⁺ , ESA ⁺	Li et al. (2007)
Prostate	CD44 ⁺ , α 2 β 1 ^{high} , CD133 ⁺	Collins et al (2005)

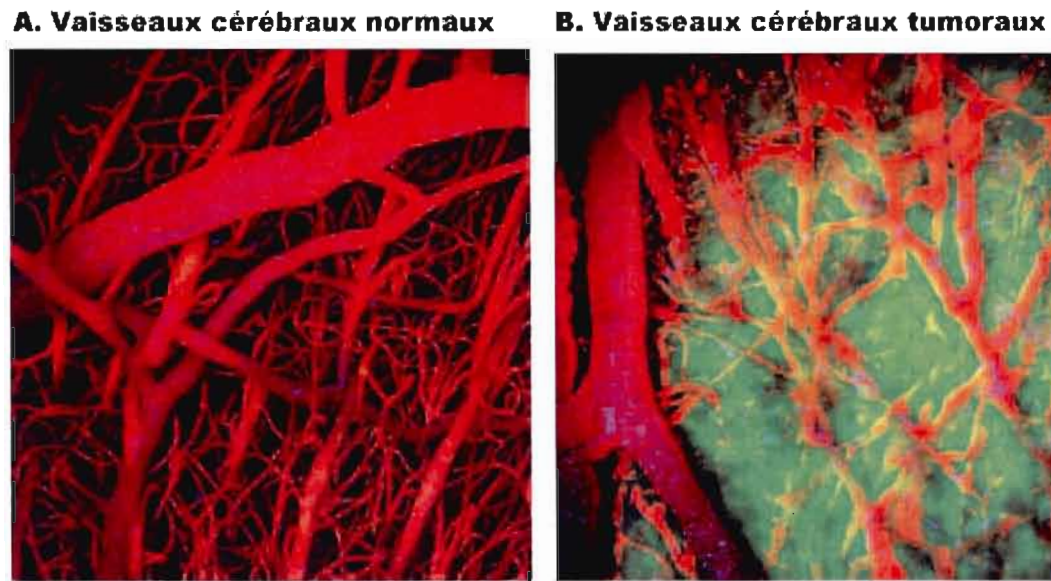


Figure 2. Différences structurelles entre l'endothélium vasculaire normal et tumoral.

A) Photomicrographie des vaisseaux sanguins cérébraux normaux de souris. L'endothélium vasculaire est organisé de façon optimale pour fournir des nutriments et de l'oxygène à toutes les cellules. B) Photomicrographie des vaisseaux sanguins cérébraux d'une souris immunodéficiente, ayant subi une xénogreffe de gliomes (cellules vertes). L'endothélium vasculaire (vaisseaux en rouge et globules rouges en bleu) est désorganisé, il y a un manque de ramifications et l'organisation est tortueuse, causant des régions hypoxiques. Adapté de (Jain *et al.*, 2007).

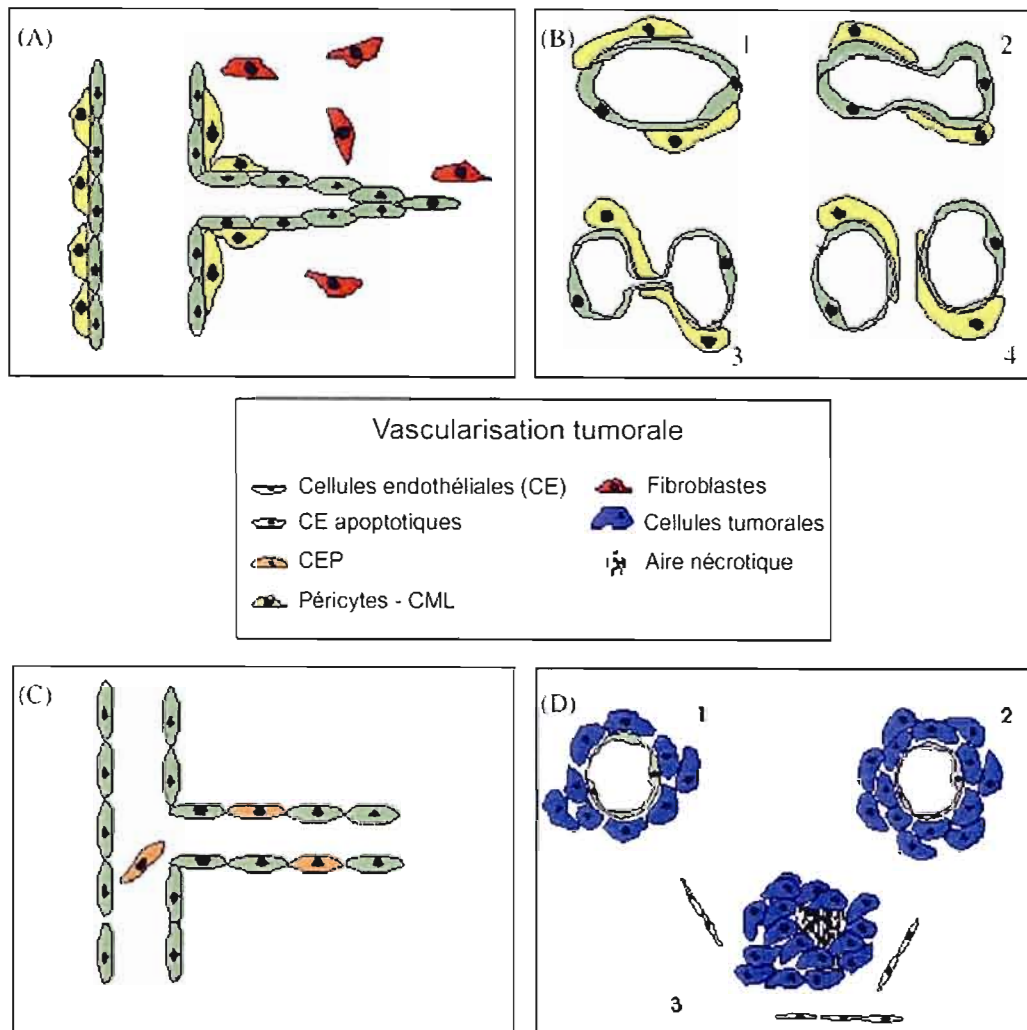
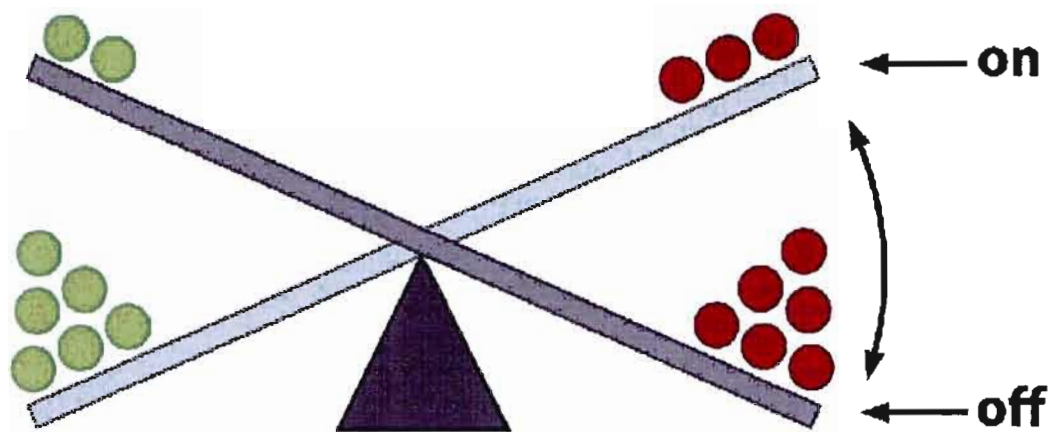


Figure 3. Mécanismes de vascularisation tumorale.

A) L'angiogenèse par bourgeonnement, B) Intussusception C) Recrutement des précurseurs endothéliaux (CEP) circulants, D) La cooption vasculaire. Adapté de (Auguste *et al.*, 2005)



<p>● Activateurs VEGF-A VEGF-B, -C FGF1 (aFGF) FGF2 (bFGF) autres FGFs etc.</p>	<p>● Inhibiteurs Thrombospondine-1, -2 Interféron α/β Angiostatine Endostatine Collagène IV (fragment) etc.</p>
--	--

Figure 4. La balance angiogénique.

Exemple de molécules endogènes activatrices et inhibitrices de l'angiogenèse. La balance nette détermine si le processus angiogénique aura lieu. Adapté de (Weinberg, 2007)

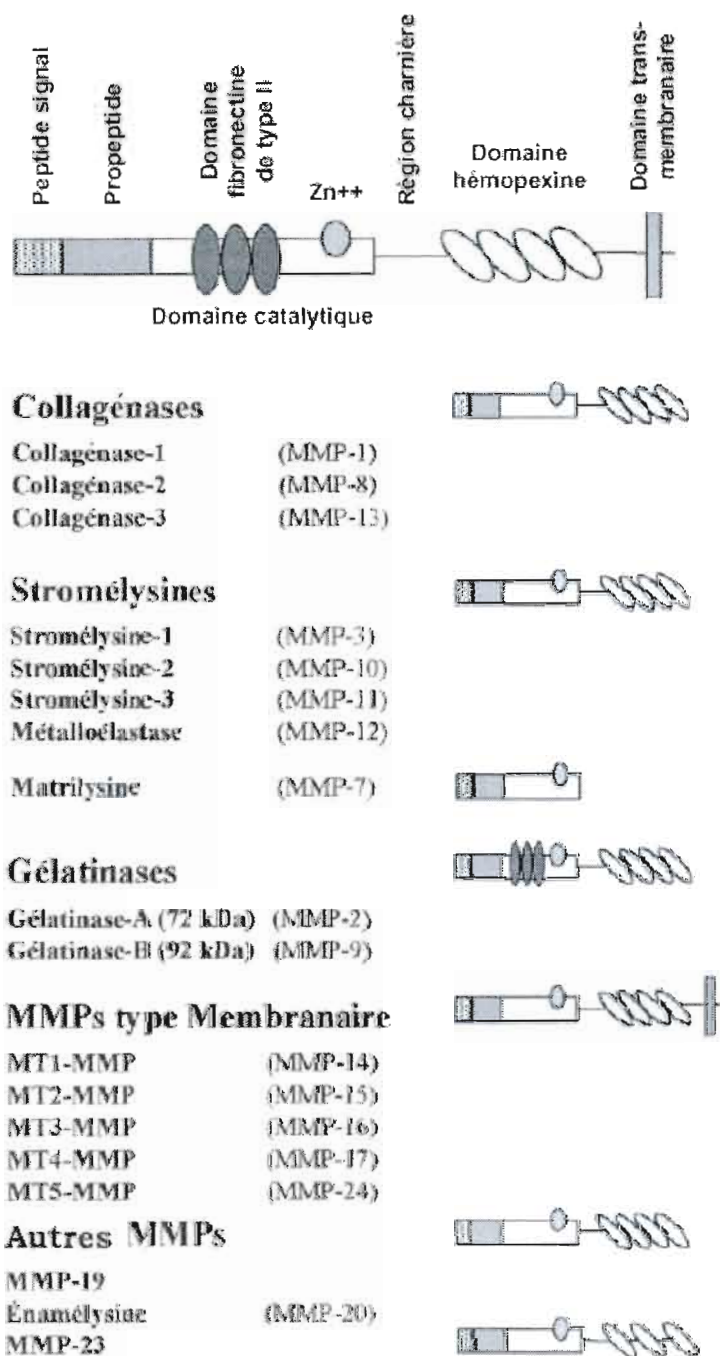


Figure 5. Membres de la famille des MMP dans les mammifères.

Adapté de (Johansson, Ahonen et Kahari, 2000).

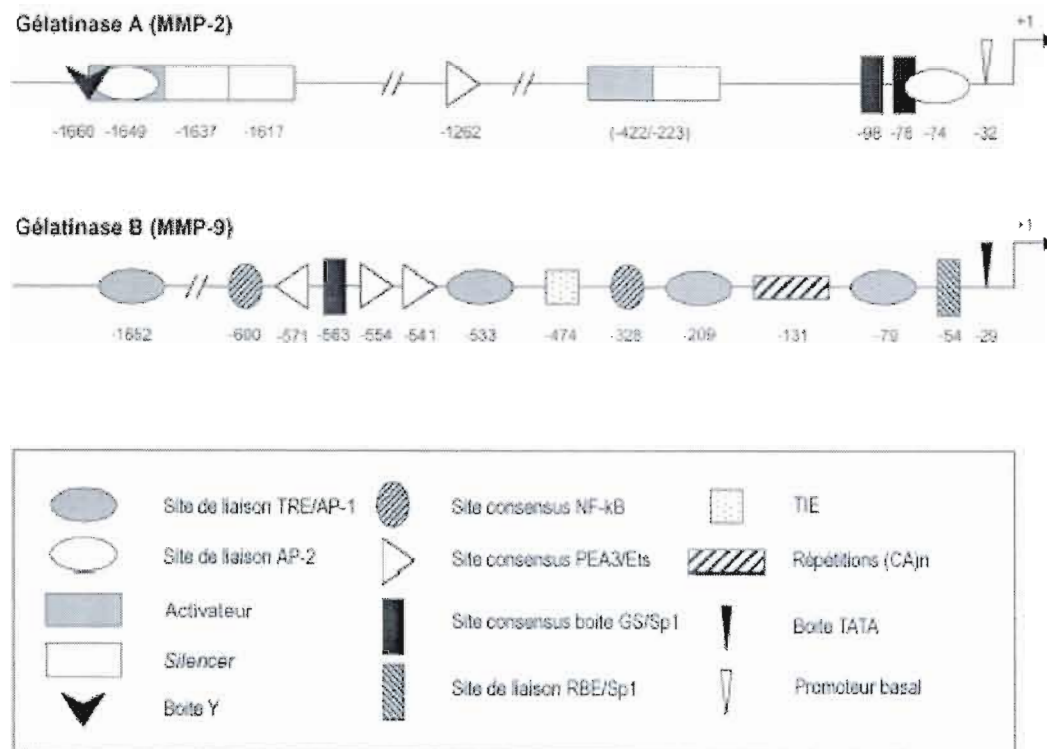


Figure 6. Principaux éléments de régulation en *cis* des gènes des gélatinases.

Bien que MMP-2 et MMP-9 soient des enzymes similaires au niveau protéique, la régulation de leur transcription est complètement différente. Adapté de (Van den Steen *et al.*, 2002)

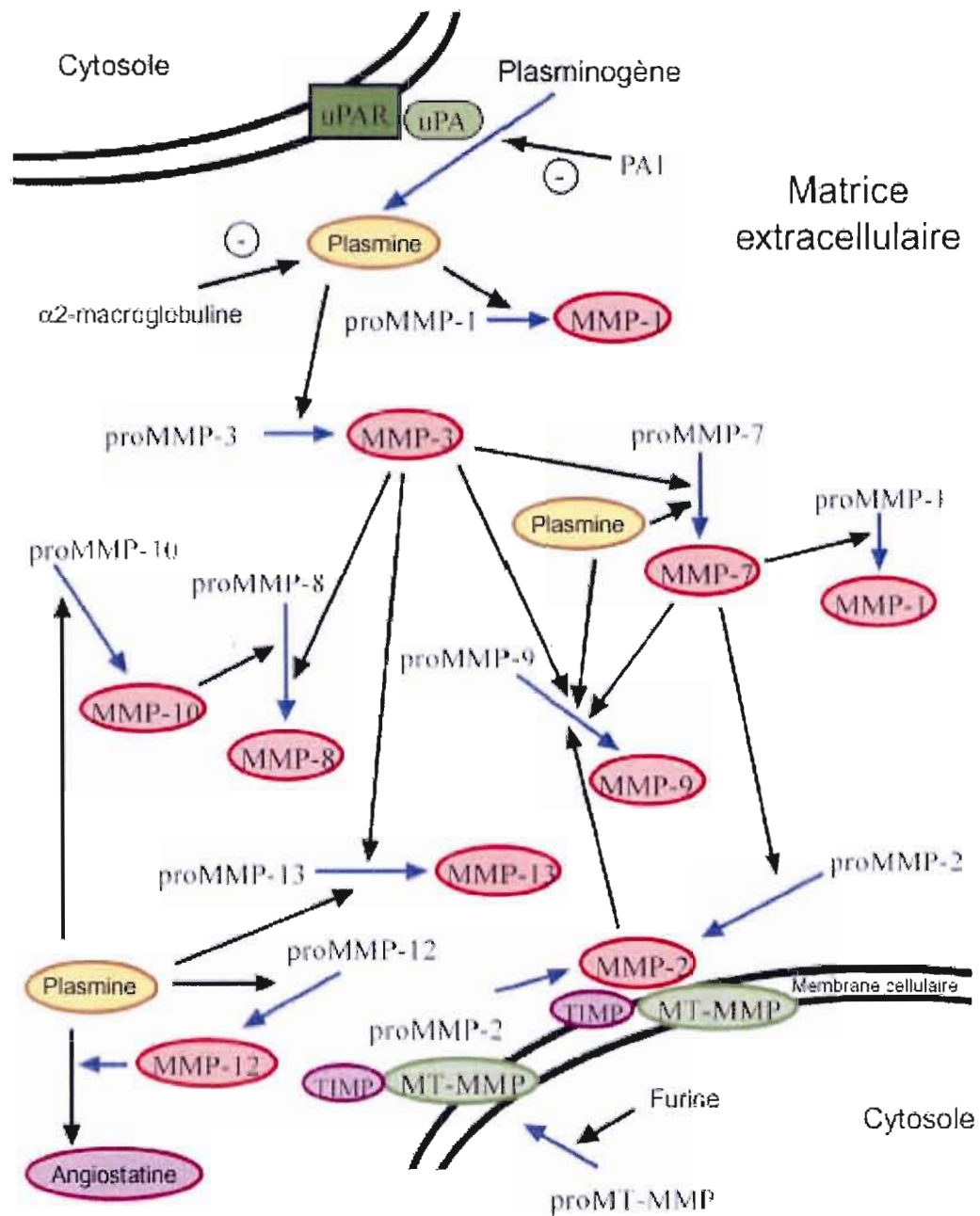


Figure 7. Cascade d'activation des MMP.

uPA protéolyse le plasminogène en plasmine. La plasmine active en retour plusieurs proMMP, initiant les cascades d'activation de différentes MMP, ce qui mène à la dégradation et au remodelage de la MEC. Dans le Golgi, des enzymes clivent le prodomaine et activent MT-MMP. (-, inhibition). Adapté de (Forget, Desrosiers et Beliveau, 1999)

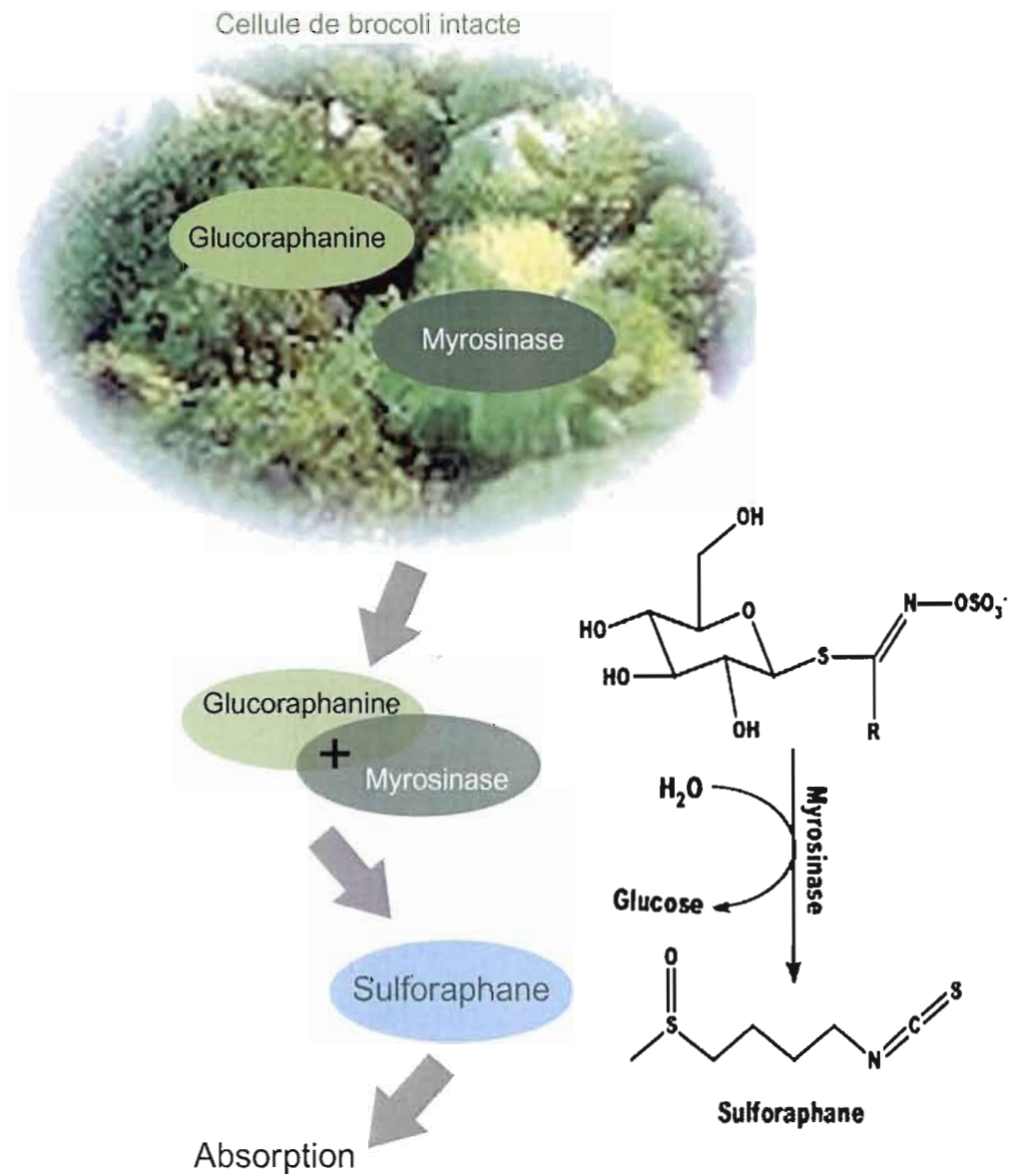


Figure 8. Production du sulforaphane.

Les glucosinolates, comme la glucoraphanine, sont séparés de la myrosinase dans les cellules de la plante. Le bris mécanique des cellules par la mastication par exemple, met en contact l'enzyme et son substrat, qui est alors transformé en sulforaphane. Le sulforaphane peut ensuite être absorbé par la circulation sanguine. Inspiré de (Béliveau et Gingras, 2005)

CHAPITRE II

PRÉSENTATION DU PROJET

1 Mise en contexte

Le médulloblastome est la tumeur cérébrale pédiatrique la plus fréquente puisqu'elle représente 21 % des tumeurs malignes du système nerveux central de l'enfant (Hemmati *et al.*, 2003). Il s'agit d'un néoplasme agressif qui croît généralement dans le cervelet et qui peut se propager le long de la colonne vertébrale et des méninges (ACS; www.cancer.org). Malgré l'avancement des traitements de chirurgie, de radiation et de chimiothérapie, le taux de survie après 5 ans varie entre 30 % et 70 % (Vibhakar *et al.*, 2007). Les tumeurs cérébrales sont connues pour être composées d'une population très hétérogène de cellules. Les cellules diffèrent dans leur capacité de reformer une tumeur et de perpétuer la croissance tumorale et la progression maligne. La majorité de ces cellules composant la masse tumorale ont une capacité limitée de se diviser, mais une sous-population de cellules souches cancéreuses, capable de proliférer extensivement et de former un nouveau foyer tumoral, a été identifiée dans les médulloblastomes et les gliomes (Li *et al.*, 2006). Ces CSC, isolées de tumeurs, forment des neurosphères, lorsque cultivées *in vitro*, dans un milieu contenant des facteurs de croissance spécifiques pour les cellules souches, et possèdent la capacité d'autorenouvellement (Yuan *et al.*, 2004).

Il est maintenant connu que les tumeurs cérébrales peuvent se développer sans que la conversion angiogénique (angiogenic switch) ne se produise. En effet, durant les stades précoces de leur développement, les cellules tumorales qui se développent dans des tissus très vascularisés comme le cerveau et les poumons peuvent migrer le long des vaisseaux sanguins et les « parasiter » pour assurer leur apport en oxygène et nutriment. Par contre, la régression des vaisseaux et la réduction de la perfusion qui s'ensuivent, causent un environnement hypoxique qui induit la sécrétion de facteurs de croissance par les cellules cancéreuses et le recrutement de nouveaux vaisseaux sanguins via l'angiogenèse en périphérie de la tumeur (Holash *et al.*, 1999). Quoiqu'il en soit, il semble que les cellules

endothéliales composant la masse tumorale aient, ou acquièrent, un phénotype distinct de leur pendant normal, phénotype qui peut être maintenu même en absence des cellules tumorales (Bussolati *et al.*, 2003). Ainsi, il devient intéressant de cibler les cellules endothéliales tumorales dans le traitement contre le cancer. Récemment, il a été proposé que certains composés phytochimiques naturels pouvaient augmenter l'efficacité des traitements de radiothérapie conventionnels (McLaughlin *et al.*, 2006). Les propriétés chimiopréventives du sulforaphane, un de ces phytocomposés, sont probablement parmi les mieux caractérisées. Il n'y a cependant pas de données disponibles quant aux effets du SFN sur les CE cérébrales tumorales.

2 Projet de recherche

À la lumière des concepts discutés dans notre introduction, les traitements contre le cancer devraient cibler à la fois les cellules cancéreuses et le compartiment vasculaire endothélial tumoral. Mon projet de recherche comprend donc deux volets :

1. Implication des métalloprotéinases MMP-9 et MT1-MMP dans l'acquisition du phénotype invasif d'une lignée de médulloblastomes, les DAOY;
2. Effet du sulforaphane sur les cellules endothéliales cérébrales associées aux tumeurs.

Volet 1 : Expression de MMP-9 et de MT1-MMP lors de la formation de neurosphères tumorales cérébrales

Basé sur le fait que CD133 était un marqueur de surface des CSC et que son expression génique est accrue dans les tissus tumoraux cérébraux, nous avons voulu savoir si d'autres partenaires moléculaires pouvaient également contribuer au potentiel invasif des médulloblastomes. Il a été démontré que les MMP pouvaient être associées à l'invasion des glioblastomes (Lakka *et al.*, 2005) et des médulloblastomes (Ozen *et al.*, 2004). En particulier, l'expression de MMP-9 et de MT1-MMP augmente de plus de 75 % dans les tissus envahis par les médulloblastomes (Ozen *et al.*, 2004). Le premier volet de l'étude portait donc sur l'implication spécifique de MMP-9 et MT1-MMP, dans le processus de

formation de structures comparables aux neurosphères formées par les CSC CD133(+) à partir d'une lignée de médulloblastomes, les DAOY.

Volet 2 : Impact du sulforaphane sur les fonctions de MMP-9, sécrétée par les cellules endothéliales cérébrales

L'expression de MMP-9 est augmentée de façon significative durant la progression tumorale, le tout étant également associé à l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique (BHE) (Shigemori *et al.*, 2006). De plus, il a été démontré que MMP-9 joue un rôle clé dans l'organisation du réseau de CE, puisque la diminution de son expression inhibe la migration des CE et réduit la formation de structures capillaires (Jadhav *et al.*, 2004). Par contre, parmi toutes les MMP, la sécrétion de MMP-9 par les CE cérébrales n'avait jamais été étudiée et pourrait s'avérer importante dans l'angiogenèse associée aux tumeurs cérébrales. Le second volet de l'étude consistait donc à caractériser les effets du SFN sur les processus de migration et tubulogenèse d'une lignée de CE cérébrales. Les HBMEC (Human Brain Microvascular Endothelial Cell) sont, à notre connaissance, le modèle *in vitro* le plus proche du phénotype particulier et des fonctions des CET. Afin de simuler les signaux de différenciation que ces cellules peuvent subir dans un environnement tumoral, nous avons traité les cellules avec le PMA, un puissant promoteur de tumeur.

CHAPITRE III

ARTICLES

ARTICLE # 1

Tumor environment dictates medulloblastoma cancer stem cell expression and invasive phenotype

Contribution des auteurs:

Borhane Annabi : Design expérimental, écriture et interprétation/analyse des résultats ; Shanti Rojas-Sutterlin : Expérimentation, interprétation/analyse des résultats et écriture ; Carl Laflamme : Expérimentation ; Marie-Paule Lachambre : Expérimentation ; Yannève Rolland : Expérimentation ; Hervé Sartelet : Expérimentation et analyses histochimiques ; Richard Béliveau : Design expérimental, interprétation/analyse des résultats, financement.

1 Tumor environment dictates medulloblastoma cancer stem cell expression and invasive phenotype

Borhane Annabi¹, Shanti Rojas-Sutterlin², Carl Laflamme¹, Marie-Paule Lachambre²,
Yannève Rolland², Hervé Sartelet³ and Richard Béliveau^{2*}

¹Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Département de Chimie, Université du Québec à Montréal, Québec, Canada, ²Centre de Cancérologie Charles-Bruneau, Hôpital Sainte-Justine-UQAM, Québec, Canada, ³Department of Pathology, Hôpital Sainte-Justine, Québec, Canada

The neural precursor surface marker CD133 is enriched in brain cancer stem cells (CSC) and in radioresistant DAOY medulloblastoma-derived tumor cells [Blazek ER, Foutch JL, Maki G. (2007) *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 67(1):1-5]. Given that membrane-type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) expression is a hallmark of highly invasive, radioresistant and hypoxic brain tumor cells, we sought to determine whether MT1-MMP and other MMPs could regulate the invasive phenotype of CD133(+) DAOY cells. We found that when DAOY medulloblastoma or U87 glioblastoma cells were implanted in nude mice, only those cells specifically implanted in the brain environment generated CD133(+) brain tumors. VEGF and bFGF gene expression increases correlated with CD133 expression in those tumors. When DAOY cultures were induced to generate *in vitro* neurosphere-like cells, gene expression of CD133, MT1-MMP, MMP-9 and MDR-1 was induced and correlated with an increase in neurospheres invasiveness. Specific siRNA gene silencing of either MT1-MMP or MMP-9 reduced the capacity of the DAOY monolayers to generate neurospheres, and concomitantly abrogated their invasive capacity. On the other hand, overexpression of MT1-MMP in DAOY triggered neurosphere-like formation which was further amplified when cells were cultured in neurosphere media. Collectively, we show that both MT1-MMP and MMP-9 contribute to the invasive phenotype during CD133(+) neurosphere-like formation in medulloblastoma cells. Increases in MMP-9 may contribute to the opening of the blood-brain barrier while increased MT1-MMP would promote brain tumor infiltration. Our study suggests that MMP-9 or MT1-MMP targeting may reduce the formation of brain tumor stem cells.

Key words: Cancer stem cells, medulloblastoma, CD133, MT1-MMP, MMP-9, neurospheres

The abbreviations used are : Cancer stem cells, CSC; Matrix metalloproteinase, MMP; membrane type-1 MMP, MT1-MMP; tissue factor, TF

INTRODUCTION

Recently, a small population of cancer stem cells (CSC) in adult and pediatric brain tumors has been identified (1, 2). These CSC, once isolated from tumor tissues, form neurospheres when cultured *in vitro* and possess the capacity for cell renewal. Based upon their high expression of the neural precursor cell surface marker CD133 (prominin-1), these CSC have been further hypothesized to bear properties such as resistance to apoptosis and resistance to drugs and to ionizing radiation (3, 4). Interestingly, among primary human medulloblastoma and glioblastoma multiforme-derived cells, only those cells expressing CD133 on their surfaces can initiate tumors in the brains of nonobese diabetic/severe combined immunodeficient (NOD/SCID) mice (5). In fact, injection of as few as 100 CD133(+) cells produces a tumor that could be serially transplanted and that is a phenocopy of the patient's original tumor, whereas injection of CD133(-) cells did not cause a tumor. Such evidence highlights the fact that in brain tumors, and in other malignancies, the tumor clone is functionally heterogeneous, however, existing in a cellular hierarchy based on small subpopulations of stem cells (6).

Given that CD133 has been identified as a powerful CSC marker, and that its gene expression is significantly higher in the recurrent brain tumor tissue, we examined whether other molecular players may also contribute to the invasiveness potential of medulloblastomas. Matrix metalloproteinases (MMP) have been shown to be associated with glioblastoma (7, 8) and medulloblastoma cell invasiveness (9, 10). In particular, levels of MMP-9 and membrane type-1 (MT1)-MMP expression were increased in >75% of medulloblastoma tumor tissues (11). Whether the CD133(+)-CSC subpopulation of cells was also targeted remains unknown. When MMP-9 gene expression was silenced in DAOY medulloblastoma-derived cells, experimental *in vivo* tumor growth was inhibited in an intracranial animal model (12). Moreover, in line with the CD133(+) tumor cell phenotype that accounts for glioma stem cells radioresistance (13), expression of MT1-MMP

expression was also increased in several cell line models that escaped radiation-induced apoptosis (14, 15). Previous reports from our laboratory have documented the contribution of MT1-MMP to the infiltrative and invasive phenotype of brain tumor-derived cells (16, 17), and strategies which inhibit either MMP-9 or MT1-MMP activities and/or expression may, furthermore, be envisioned to reduce tumorigenicity (17-19). Whether expression of MMP-9 or MT1-MMP affects the acquisition of an invasive phenotype during neurosphere-like formation of CSC is currently unknown.

In this study, we sought to examine the effect of tumor tissue environment and the contribution of CD133(+) brain tumor-derived CSC to tumor development *in vivo*. We also investigated the *in vitro* expression of MMP-9 and MT1-MMP, two MMP which contribute to blood-brain barrier opening and to the radioresistance phenotype of brain tumor cells, in the neurosphere formation capacity of DAOY medulloblastoma cells.

RESULTS

The tissue environment of cell implantation dictates the expression of CD133(+) brain tumor-derived stem cells. In an attempt to assess the contribution of CD133(+) CSC to experimental brain tumor growth, monolayer cultures of DAOY medulloblastoma cells were trypsinized and cell suspensions were implanted either subcutaneously or by stereotaxis within the brain and left to develop for several weeks as described in the Methods section. Histopathological analysis of intra-cerebrally implanted human DAOY medulloblastoma cells shows well defined but not encapsulated large malignant proliferation composed of a majority of small undifferentiated round cells found in normal mouse brain (Fig.1A1). At high magnification, HPS staining shows that the tumor was highly cellular with numerous mitoses (Fig.1A2), and presents an aggressive pattern with a limited area of necrosis (Fig.1A3). The nuclei are often densely hyperchromatic associated with poor cytoplasm. No fibrillar material and no rosette could be identified. Stromal elements are scant consisting of small blood vessel. Moreover, some tumoral cells were found to exhibit membranous expression of CD133 (Fig.1A4, arrows). While subcutaneous tumor growth was only observed with implanted U87 glioblastoma cells, we found that U87 and DAOY cells implanted within the cerebral environment readily developed into tumors. Intracerebral growth of U87 tumors was routinely found to occur within the first 2-3 weeks, while significant intra-cerebral growth of DAOY tumors only occurred after 9-11 weeks. Homogenates were then generated from the individual tumors and CD133 immunodetection was performed. We found that CD133 protein expression was only observed when U87 or DAOY cells were implanted within the cerebral environment (Fig.1B). The origin of CD133 expression was further examined when homogenates from DAOY cell monolayers, control brain hemisphere, and intra-cerebral DAOY-derived tumors were probed for CD133. We found that DAOY cell monolayers expressed low basal CD133 (Fig.1C, *in vitro*) while CD133 expression was enriched in the brain hemisphere in which DAOY cells had been implanted (Fig.1C, *in vivo*). Quantitative PCR (qPCR) was also performed with the control and DAOY-derived tumors and confirmed the angiogenic phenotype of DAOY-derived tumors as VEGF and bFGF gene expression were significantly increased in those tumors (Fig.1D).

Increased CD133, MDR-1, MT1-MMP, and MMP-9 expression characterize the invasive phenotype of neurosphere-like DAOY cells. Neurosphere-like brain CSC are thought to contribute to a sub-population of CD133(+) brain CSC (4). Neurosphere induction of DAOY cells was performed according to established protocols (20-22) and this process promoted the transition of adherent DAOY monolayer cells to neurosphere-like cells (Fig.2A). Total RNA was isolated from monolayers and from neurosphere-like DAOY cells and semi-quantitative RT-PCR performed. We found that gene expression of CD133, MDR-1, HuR, MMP-9, and MT1-MMP all increased in neurosphere-like DAOY cells (Fig.2B). While the increase in CD133 cell surface expression was confirmed in cells cultured in neurospheres by flow cytometry (not shown), the increases in MMP-9 and in MT1-MMP were both confirmed when conditioned media were isolated from serum-starved monolayers and from neurosphere-like DAOY cells and we observed a massive increase in extracellular proMMP-9 gelatinolytic activity, as assessed by gelatin zymography (Fig.2C), from the latter media. While the latent proMMP-2 extracellular levels remained unchanged between monolayers and neurosphere-like cells, the active forms of MMP-2 were exclusively produced in neurospheres, most likely due to an increased MT1-MMP activity (Fig.2C). Cell migration was also assessed by seeding monolayers and neurosphere-like DAOY cells on top of modified Boyden chambers. We found that the invasive capacity of neurosphere-like DAOY cells was significantly increased when compared to DAOY cells grown into monolayers (Fig.2D).

MT1-MMP and MMP-9 contribute to the invasive phenotype and contribute to the neurosphere-like formation process in DAOY cells. We next assessed the effects of MMP-9 and MT1-MMP activities in promoting neurosphere-like formation and invasion using RNA interference technology. DAOY monolayer cells were transiently transfected with siRNA to specifically downregulate either MMP-9 or MT1-MMP gene expression as described in the Methods section. Transfection efficiencies were monitored either through the protein expression of MMP-9 or through the MT1-MMP-mediated activation of proMMP-2 using gelatin zymography. We found that basal levels of proMMP-9 in DAOY monolayers (Fig.3A, monolayers) as well as the proMMP-9 induced in neurosphere-like DAOY cells

(Fig.3A, neurospheres) were significantly decreased in siMMP-9-transfected cells when compared to Mock-transfected cells. MT1-MMP was also efficiently silenced and this was reflected by the complete inability of neurosphere-like DAOY cells to activate latent proMMP-2 into its active MMP-2 form (Fig.3A, neurospheres). MT1-MMP pro- and active forms protein expression is further shown to be efficiently and specifically diminished using immunoblotting in siMT1-MMP-transfected cells but not in siMMP-9-transfected cells (Fig.3B, exposition 30 sec). Moreover, the increased proMMP-2 activation observed in neurospheres by zymography (Fig.3A), also correlates with MT1-MMP proteolytic activation as seen by the appearance of the well documented 45kDa MT1-MMP immunoreactive inactive form (Fig.3B, exposition 2 min). GAPDH protein expression was used as an internal loading control and remained unaffected throughout the conditions. When neurosphere-like formation was monitored, we found a significant decrease in neurosphere-like formation in cells whose MT1-MMP or MMP-9 had been silenced, as can be seen in images recorded at two (10X vs 4X) different magnifications (Fig.3C). Cell migration was also assessed with Mock-transfected cells as well as with DAOY monolayers and neurosphere-like DAOY cells that were transfected with MT1-MMP and MMP-9 silencers (Fig.3D). The induced migration observed in neurosphere-like DAOY cells was completely abolished in those cells when either MT1-MMP or MMP-9 gene expression was silenced (Fig.3D, neurospheres). No significant decreases were observed in siMT1-MMP or in siMMP-9 DAOY cells from monolayer cultures (Fig.3D, monolayers).

Overexpression of MT1-MMP triggers neurospheres-like DAOY differentiation. We further assessed the specific contribution of MT1-MMP toward the control of neurosphere-like DAOY formation. We first transiently transfected DAOY monolayers with cDNA encoding a recombinant MT1-MMP protein fused to GFP (23). Transfection efficiency was monitored using fluorescence microscopy and was confirmed by the expression of fluorescent cells (Fig.4A). Moreover, recombinant MT1-MMP was also found to be active as its expression led to proMMP-2 activation and to increase in proMMP-9 secretion as assessed by gelatin zymography (Fig.4B). Mock- and MT1-MMP-transfected DAOY monolayers were then trypsinized and then cultured either in monolayer media or in neurospheres media for 24 hours. Phase contrast pictures were taken in order to monitor for

neurosphere-like formation in each culture condition. We found that Mock-transfected cells were, as expected, still able to adhere and grow as monolayers when cultured in monolayer media, while they formed neurosphere-like cells when cultured under neurosphere media (Fig.4C, phase contrast pictures). In contrast, when MT1-MMP-transfected DAOY monolayer cells were seeded in monolayer media, we observed that very few GFP-positive cells adhered to the culture dishes but rather formed neurosphere-like cells (Fig.4C, phase contrast pictures). This was also evident through fluorescence visualisation. Recombinant MT1-MMP overexpression was thus found to enhance neurosphere-like DAOY formation as shown through phase contrast and fluorescent microscopy imaging (Fig.4C).

DISCUSSION

Among brain tumors in children, the highly metastatic medulloblastomas represent approximately 25% of all pediatric intracranial neoplasms (24). Although modern neurosurgical and radiotherapy techniques combined with chemotherapy regimens result in prolonged free survival rates, the long-term prognoses are poor and the quality of life of these patients is generally poor (25). Recently, an isolated CD133(+) cell subpopulation from human brain tumors was shown to exhibit stem cell properties (5) and is thought to play a pivotal role in brain tumor initiation, growth and recurrence (5, 26). Consequently, a better understanding of the potential contribution of brain tumor-derived CSC will help develop new clinical approaches in order to improve the efficiency of current treatment. In the present study, we identified and evaluated new biological and molecular features regulating the invasive phenotype associated with the formation of neurosphere-like CD133(+) medulloblastoma-derived CSC. Using RNA interference technology, we provided evidence for crucial roles for MMP-9 and for MT1-MMP, two major actors in cell invasion, metastasis and resistance to radiation, in CD133(+) neurosphere-like formation in DAOY medulloblastoma cells.

It is noteworthy that as few as 100 CD133(+) cells from a brain tumor fraction were found to be capable of tumor initiation in NOD-SCID mouse brains (5). The use of an intracerebral implantation model versus a flank implantation model in our current study, further added to the stringency of our experiments proving that CD133 expression only aroused from implanted brain tumor cells within a cerebral environment, possibly attributable to increased angiogenesis as reflected by high VEGF and bFGF transcript levels. Gene expression profiles of experimental brain tumors grown as s.c. flank xenografts, intracerebral xenografts, and cells grown *in vitro* have been shown to be different suggesting that the tissue environment dictates the experimental tumor phenotype (27, 28). Intracerebral models can more closely mimic the actual environment of glioma- and medulloblastoma-derived CD133(+) CSC growth (29). The demonstration that CD133(+) cells express increased MDR-1 transcript levels (30, this study) also reveals issues important to drug

delivery and to the BBB environment that can now be addressed in terms of chemoresistance or angiogenic phenotype.

The CD133(+) fraction among medulloblastomas, which initiated tumors upon intracranial transplantation into the NOD-SCID mouse forebrain, also correlated closely with an *in vitro* primary sphere formation assay that is used to quantify stem cell properties (6). While brain tumor stem cell properties have recently been studied in non-adherent neurospheres (31), expression of selected markers was found to vary between non-adherent spheres and adherent monolayer cells, but no data was available as to MMP involvement in neurosphere-like formation. The identification and demonstration, in our current study, that MT1-MMP plays a role in medulloblastoma neurosphere-like formation provides support to the need of designing new routes that use MT1-MMP as a therapeutic target. Indeed, based on blocking its activity with inhibitors, antibodies, or RNAi, novel anticancer approaches using inhibition of MT1-MMP activity have already been described (32). Work with MT1-MMP shows that interference with its RNA expression decreases tumor cell migration and invasion (33, 34). This approach has already been shown to be possible in endothelial cells where interference of MT1-MMP RNA expression decreased the capacity to form capillary tubes in the Matrigel system (35). Although speculative, it is tempting to suggest that therapeutic use of interference RNA approaches could also target the MT1-MMP functions involved in the formation of neurosphere-like CD133(+) brain CSC. Evidence provided from our own study suggests that inhibiting MT1-MMP and MMP-9 gene expression significantly impairs neurosphere-like formation and abrogates invasive properties (Fig.3). The potential therapeutic use of interference RNA is currently being investigated (36-38).

It is still unclear whether CD133 expression plays a causative, contributing or correlative role in the formation of the CSC population. Still, CD133-expressing CSC have been implicated in a number of key processes, including tumor repopulation, resistance to therapy, increased aggressiveness and angiogenesis (5, 13). Among the important implications that arise from our study is the radioresistant phenotype ascribed to CD133-expressing CSC. A recent study has, in fact, provided evidence that CD133-expressing glioma cells *in vivo* and in culture are relatively resistant to radiation (13). Moreover, DAOY

medulloblastoma cells that express CD133 were also shown to be radioresistant when compared to CD133(-) cells (4). Given that MT1-MMP expression is also correlated with brain tumor recurrence, increased invasiveness, and radioresistance (15), one can hypothesize in light of our observations that MT1-MMP triggers CD133(+) neurosphere-like formation in medulloblastoma cells, and that targeting of MT1-MMP functions and/or expression may alter the radioresistant and invasive phenotype of brain CSC. As such, the expression of a major group of MT-MMP has recently been found elevated in gliomas (39), from which CD133(+) CSC isolated from fresh brain tumor specimens were found to escape the lethal damage of ionizing radiation (13). New possibilities for abrogating the tumor-promoting function of MT1-MMP, other than the conventional protease inhibitor-based approach, have recently been envisioned (32, 40, 41).

We have also identified increased levels of MMP-9 that correlated with neurosphere-like formation and to MT1-MMP increased expression. Known functions for MMP-9 include liberation of vascular endothelial growth factor (VEGF) during angiogenesis (42), and disruption of the blood-brain barrier (BBB, 43, 44). More interesting are the less documented functions of MMP-9 recently reported in the promotion of thrombosis through increased tissue factor (TF) expression (45), the latter being thought to contribute to tumor growth/regulating properties of CD133(+) CSC through increased TF-dependent procoagulant activity (46). In fact, clinical and experimental evidence suggest that high levels of TF are correlated with increasing cancer aggressiveness and procoagulant tendencies (47). Furthermore, a crucial role of NF- κ B in tumor stem cell biology has recently been inferred where it regulates the expression of genes that are involved in essential processes during the initiation and progression of various cancer types such as proliferation, migration and apoptosis (48). Consistent with that observation, a correlation was found between proMMP-9 expression and MT1-MMP-mediated activation of proMMP-2 in specific conditions such as in 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-activated HT1080 fibrosarcoma cells (49). This phenomenon is thought to be mediated through NF- κ B activation (50, 51), and the promoter region of the MT1-MMP contains NF- κ B binding sites (52).

Finally, our study focused on the well established method of neurospheres cell culture that enables to study the *in vitro* CSC phenotype. As such, successful isolation and establishment of a novel, long-term, primary, neurosphere-like cell line from highly aggressive anaplastic medulloblastoma was reported (53) and such model will help shed light into MMP functions of CD133(+) CSC. Our study is thus among the first to provide an *in vitro* model for potential MMP involvement in CSC invasive phenotype. Direct evidence for the role of these MMP will be obtained through the direct isolation and characterization of CD133(+) CSC. In conclusion, involvement of MMP-9 and MT1-MMP in CD133(+) neurosphere formation and in their acquisition of an invasive and/or resistance to therapy phenotype could thus affect a provisional stem cell niche formation process that would, in part, support the emerging tumor. MMP-9 and MT1-MMP targeting in CSC may constitute promising new targets for anticancer therapies in destroying brain tumor stem cells.

MATERIALS AND METHODS

Materials : Sodium dodecylsulfate (SDS) and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma (Oakville, ON). Cell culture media was obtained from Life Technologies (Burlington, ON). Electrophoresis reagents were purchased from Bio-Rad (Mississauga, ON). The enhanced chemiluminescence (ECL) reagents were from Amersham Pharmacia Biotech (Baie d'Urfé, QC). Micro bicinchoninic acid protein assay reagents were from Pierce (Rockford, IL). The polyclonal antibody against CD133 and the monoclonal antibody against GAPDH were purchased from Abcam (Cambridge, MA) and Advanced Immunochemical Inc. (Long Beach, CA) respectively. The polyclonal antibody against MT1-MMP (AB815) was from Chemicon (Temecula, CA). Horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit and anti-mouse IgG secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA). All other reagents were from Sigma-Aldrich Canada.

Cell culture and neurosphere-like formation: The human DAOY medulloblastoma cell line was purchased from American Type Culture Collection and was maintained in Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) containing 10% (v/v) calf serum (CS) (HyClone Laboratories, Logan, UT), 2 mM glutamine, 100 units/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin. Cells were incubated at 37°C, with 95% air and 5% CO₂. Neurosphere-like formation was triggered in a defined serum-free neural stem cell medium (54) containing Ex Vivo 15 (LONZA, Walkersville, MD), 20 ng/ml fibroblast growth factor (bFGF), 20 ng/ml of epidermal growth factor (EGF, Wisent, St-Bruno, QC), 20 ng/ml leukemia inhibitory factor (LIF, SIGMA, Oakville, ON) and 1X neural survival factor-1 (NSF-1, LONZA, Walkersville, MD).

Intracranial tumor model: All animal experiments were evaluated and approved by the Institutional Committee for Good Animal Practices (UQAM, QC). Intracerebral tumor implantation was performed as previously described with some modifications (55). Anesthetized 5- to 10-week-old CrI:CD-1⁰⁰-nuBR female nude mice (Charles River, QC) were placed in a stereotaxic frame; viable DAOY medulloblastoma (2×10^6) or U-87

glioblastoma cells (5×10^4) in 5 μ L of medium without serum were then implanted into the right corpus striatum at a depth of 3.5 mm at a point 2.5 mm lateral to the midline and 1.5 mm anterior to the bregma.

Subcutaneous xenograft model: Tumor implantation was performed as described previously (56). Briefly, DAOY medulloblastoma or U-87 glioblastoma cells were harvested by trypsinization using a trypsin/EDTA solution. Cells were washed three times with phosphate buffered saline that was free of both Ca^{2+} and Mg^{2+} , and centrifuged. The resulting pellet was resuspended in 1% methyl-cellulose in serum-free MEM at a concentration of 2.5×10^6 cells per 100 μ L. Animals were anesthetized by O_2 /isoflurane inhalation and tumors were established by subcutaneous injection of 100 μ L from the cell suspension into the right flank of female Crl:CD-1[®]-nuBR nude mice.

Histology and immunocytochemistry : Mouse brains were fixed in 10% buffered formalin and paraffin-embedded. For routine histological examination, 3 μ m-thick sections were stained with hematoxylin-phloxin-saffron (HPS). Immunohistochemistry was performed on paraffin-embedded sections using the biotin-streptavidin peroxidase LSAB kit in conjunction with an automated DAKO immunostainer (DakoCytomation, CA, USA). An antibody against CD133 (1/100, rabbit polyclonal, Abcam, Cambridge, MA) was applied. First, for antigen retrieval, deparaffinized and rehydrated sections were treated using a pressure cooker (citrate buffer, pH 6.0, 1:10, 30 minutes). Then the sections were mounted in the DAKO autostainer, covered with H_2O_2 for 5 minutes, followed by a 5-minute application of Ultra V block (LabVision). The slides were then incubated for 60 minutes with the diluted antibody at room temperature, followed by application of the labeled biotin-streptavidin reagents according to the manufacturer's instructions (LSAB+System HRP-Kit; DAKO). DAB (DAKO) was used as a chromogen. A section of human fetal liver was used in the same slide as a specific, positive control (57). Normal mouse or rabbit IgG at the same concentration as the primary antibody served as negative controls. Slides were then incubated with this solution instead of primary antibody. Tissues were analyzed and photographed using a Zeiss Axioplan microscope.

Total RNA isolation and semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis : Total RNA was extracted from monolayers or neurosphere-like DAOY cells using the TRIzol reagent (Life Technologies). One microgram of total RNA was used for first strand cDNA synthesis followed by specific gene product amplification with the One-Step RT-PCR Kit (Invitrogen, Burlington, ON). Primers for CD133 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), MDR-1 (forward : 5'-ATTCAACTATCCCACCCGACCG-3', reverse : 5'-CCTTTGCTGCCCTCACAATCTC-3', MT1-MMP (forward : 5'-ATTGATGCTGCTCTCTTCTGG-3', reverse : 5'-GTGAAGACTTCATCGCTGCC-3'), HuR (forward : 5'-TCGCAGCTGTACCACTCGCCAG-3', reverse : 5'- CCAAACATCTGCCAGAGGATC-3') and for MMP-9 (forward : 5'-AAGATGCTGCTGTTTCAGCGGG-3', reverse : 5'-GTCCTCAGGGCACTGCAGGAT-3') were all derived from human sequences. PCR conditions were optimized so that the gene products were examined at the exponential phase of their amplification and the products were resolved on 1.8% agarose gels containing 1 µg/ml ethidium bromide.

cDNA synthesis and real-time quantitative RT-PCR : Total RNA was extracted from fresh tumor tissue or cell cultures as described above. For cDNA synthesis, ~1 µg total RNA was reverse-transcribed into cDNA using high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). cDNA was stored at -80°C for 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 Icyler iQ5 (BIO-RAD, Hercules, CA) and product detection was performed by measuring the binding of the fluorescent dye SYBR Green I to double-stranded DNA. All the primer sets were provided by QIAGEN (Valencia, CA). The relative quantities of target gene mRNA against an internal control, 18S ribosomal RNA, were measured by following a ΔC_T method. An amplification plot that had been the plot of fluorescence signal vs. cycle number was drawn. The difference (ΔC_T) between the mean values in the triplicate samples of target gene and those of 18S ribosomal RNA were calculated by iQ5 Optical System Software version 2.0 (BIO-RAD, Hercules, CA) and the relative quantified value (RQV) was expressed as $2^{-\Delta C_T}$.

RNA interference : RNA interference experiments were performed using HiPerFect (QIAGEN, Valencia, CA). A small interfering RNA (siRNA; 20 nM) against MT1-MMP (siMT1-MMP) and mismatch siRNA were synthesized by EZBiolab Inc. (Westfield, IN), and annealed to form duplexes. The sequence of the siMT1-MMP used in this study was derived from the human MT1-MMP gene (NM_004995) and is as follows : 5'-CCAGAAGCUGAAGGUAGAAAdTdT-3' (sense) and 5'-UUCUACCUUCAGCUUCUGGdTdT-3' (antisense) (58). A small interfering RNA against human MMP-9 (siMMP-9, GenBankTM accession number NM-004994) and mismatch siRNA with no known homology to mammalian genes were synthesized (Qiagen, Valencia, CA) against the following published target sequences for MMP-9: 5'-AACATCACCTATTGGATCCAAACTAC-3', nucleotides 377 to 403. The sequence of the siMMP-9 used in this study is as follows : 5'-CAUCACCUAUUGGAUCCAAAdTdT-3' (sense) and 5'-UUGGAUCCAAUAGGUGAUGdTdT-3' (anti-sense). Evaluation of the transient knockdown duration was performed by real-time quantitative RT-PCR and the targeted gene expression found to routinely be diminished by 65-90% 24 to 48 hrs post-transfection (not shown).

Cell transfection method : Sub-confluent DAOY monolayer cells were transiently transfected with 10 µg of the cDNA encoding the full length (Wt) MT1-MMP fused to GFP (59) using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Burlington, ON). Mock transfections of U87 cultures with pcDNA (3.1+) were used as controls. Transfected cells were left to recuperate and were used 48 hrs post-transfection. The occurrence of MT1-MMP specific gene expression and function was evaluated by semi-quantitative RT-PCR, immunoblotting procedures, and validated by assessing MT1-MMP-mediated proMMP-2 activation by gelatin zymography (Fig.3 and Fig.4).

Gelatin zymography : Gelatin zymography was used to assess the proMMP-9, proMMP-2, and MMP-2 extracellular levels. Briefly, an aliquot (20 µl) of the culture medium was subjected to SDS-PAGE in a gel containing 0.1 mg/ml gelatin. The gels were then incubated in 2.5% Triton X-100 and rinsed in nanopure distilled H₂O. Gels were further incubated at 37°C for 20 hrs in 20 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 0.02% Brij-35, 50 mM Tris-HCl

buffer, pH 7.6, then stained with 0.1% Coomassie Brilliant blue R-250 and destained in 10% acetic acid, 30% methanol in H₂O. Gelatinolytic activity was detected as unstained bands on a blue background.

Immunoblotting procedures: Proteins from control and treated cells were separated by SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (Annabi *et al.*). After electrophoresis, proteins were electrotransferred to polyvinylidene difluoride membranes which were then blocked for 1 hr at room temperature with 5% non-fat dry milk in Tris-buffered saline (150 mM NaCl, 20 mM Tris–HCl, pH 7.5) containing 0.3% Tween-20 (TBST). Membranes were further washed in TBST and incubated with the primary antibodies (1/1,000 dilution) in TBST containing 3% bovine serum albumin, followed by a 1 hr incubation with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse IgG (1/2,500 dilution) in TBST containing 5% non-fat dry milk. Immunoreactive material was visualized by enhanced chemiluminescence (Amersham Biosciences, Baie d’Urfée, QC).

Analysis of DAOY cell migration: DAOY cell migration was assessed using modified Boyden chambers. The lower surfaces of Transwells (8- μ m pore size; Costar, Acton, MA) were pre-coated with 1 mg/ml gelatin for 2 hours at 37°C. The Transwells were then assembled in a 24-well plate (Fisher Scientific Ltd, Nepean, ON). The lower chamber was filled with serum-free medium. Monolayer or neurospheres-like DAOY cells were collected by trypsinization, washed and resuspended in serum-free medium at a concentration of 5×10^5 cells/ml; 5×10^4 cells were then inoculated onto the upper side of each modified Boyden chamber. The plates were placed at 37°C in 5% CO₂/95% air and migration left to proceed for 16 hours. Cells that had migrated to the lower surfaces of the filters were fixed with 10% formalin phosphate and stained with 0.1% crystal violet-20% methanol (v/v). Images of at least five random fields per filter were digitized (100X magnification). The average number of migrating cells per field was quantified using Northern Eclipse software (Empix Imaging Inc., Mississauga, ON). Migration data are expressed as a mean value derived from at least three independent experiments.

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 each figure.

Acknowledgments : BA holds a Canada Research Chair in Molecular Oncology from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). This study was funded by grants from of the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to BA, and from the CIHR, Charles-Bruneau Foundation, NSERC, and the Claude Bertrand Chair in Neurosurgery to RB. The authors wish to thank Dr Anthony Regina and Mrs Isabelle Lavallée for their assistance in handling and treating the mice.

REFERENCES

1. Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA, et al. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100:15178-83.
2. Yuan X, Curtin J, Xiong Y, et al. Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene.* 2004; 23:9392-400.
3. Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer.* 2005; 5:275-84.
4. Blazek ER, Foutch JL, Maki G. Daoy medulloblastoma cells that express CD133 are radioresistant relative to CD133- cells, and the CD133+ sector is enlarged by hypoxia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2007; 67:1-5.
5. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature.* 2004; 432:396-401.
6. Singh S, Dirks PB. Brain tumor stem cells: identification and concepts. *Neurosurg Clin N Am.* 2007; 18:31-8.
7. Nakada M, Okada Y, Yamashita J. The role of matrix metalloproteinases in glioma invasion. *Front Biosci.* 2003; 8:e261-9.
8. Lakka SS, Gondi CS, Rao JS. Proteases and glioma angiogenesis. *Brain Pathol.* 2005; 15:327-41.
9. Bodey B, Bodey B Jr, Siegel SE, Kaiser HE. Matrix metalloproteinase expression in childhood medulloblastomas/primitive neuroectodermal tumors. *In Vivo.* 2000; 14:667-73.
10. Vince GH, Herbold C, Klein R, et al. Medulloblastoma displays distinct regional matrix metalloprotease expression. *J Neurooncol.* 2001; 53:99-106.
11. Ozen O, Krebs B, Hemmerlein B, Pekrun A, Kretzschmar H, Herms J. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in medulloblastomas and their prognostic relevance. *Clin Cancer Res.* 2004; 10:4746-53.
12. Rao JS, Bhoopathi P, Chetty C, Gujrati M, Lakka SS. MMP-9 short interfering RNA induced senescence resulting in inhibition of medulloblastoma growth via p16(INK4a) and mitogen-activated protein kinase pathway. *Cancer Res.* 2007; 67:4956-64.

13. Bao S, Wu Q, McLendon RE, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 2006; 444:756-60.
14. Wild-Bode C, Weller M, Rimner A, Dichgans J, Wick W. Sublethal irradiation promotes migration and invasiveness of glioma cells: implications for radiotherapy of human glioblastoma. *Cancer Res*. 2001; 61:2744-50.
15. Annabi B, Lee YT, Martel C, Pilonnet A, Bahary JP, Beliveau R. Radiation induced-tubulogenesis in endothelial cells is antagonized by the antiangiogenic properties of green tea polyphenol (-) epigallocatechin-3-gallate. *Cancer Biol Ther*. 2003; 2:642-9.
16. Annabi B, Thibeault S, Mouldjian R, Beliveau R. Hyaluronan cell surface binding is induced by type I collagen and regulated by caveolae in glioma cells. *J Biol Chem*. 2004; 279:21888-96.
17. Annabi B, Bouzegrane M, Mouldjian R, Moghrabi A, Beliveau R. Probing the infiltrating character of brain tumors: inhibition of RhoA/ROK-mediated CD44 cell surface shedding from glioma cells by the green tea catechin EGCG. *J Neurochem*. 2005; 94:906-16.
18. Annabi B, Lachambre MP, Bousquet-Gagnon N, Page M, Gingras D, Beliveau R. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin 3-gallate inhibits MMP-2 secretion and MT1-MMP-driven migration in glioblastoma cells. *Biochim Biophys Acta*. 2002; 1542:209-20.
19. Annabi B, Currie JC, Moghrabi A, Beliveau R. Inhibition of HuR and MMP-9 expression in macrophage-differentiated HL-60 myeloid leukemia cells by green tea polyphenol EGCG. *Leuk Res*. 2007; 31:1285-92.
20. Milosevic J, Storch A, Schwarz J. Spontaneous apoptosis in murine free-floating neurospheres. *Exp Cell Res*. 2004; 294:9-17.
21. Beier D, Hau P, Proescholdt M, et al. CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res*. 2007; 67:4010-5.
22. Gal H, Makovitzki A, Amariglio N, Rechavi G, Ram Z, Givol D. A rapid assay for drug sensitivity of glioblastoma stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 358:908-13.
23. Belkaid A, Fortier S, Cao J, Annabi B. Necrosis induction in glioblastoma cells reveals a new "bioswitch" function for the MT1-MMP/G6PT signaling axis in proMMP-2 activation versus cell death decision. *Neoplasia*. 2007; 9:332-40.

24. Saran F. Recent advances in paediatric neuro-oncology. *Curr Opin Neurol.* 2002; 15:671-7.
25. Kuhl, J., Doz, F. and Taylor, R. E., Embryonic tumors. In Walker, D., Perilongo, G., Punt, J. A. G., Taylor, G. E. (Eds.), *Brain and spinal tumors of childhood.* Arnold, London 2004. pp. 314-330.
26. Liu G, Yuan X, Zeng Z, et al. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer.* 2006; 5:67.
27. Ozawa T, Wang J, Hu LJ, Lamborn KR, Bollen AW, Deen DF. Characterization of human glioblastoma xenograft growth in athymic mice. *In Vivo.* 1998; 12:369-74.
28. Camphausen K, Purow B, Sproull M, et al. Influence of in vivo growth on human glioma cell line gene expression: convergent profiles under orthotopic conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102:8287-92.
29. Koutcher JA, Hu X, Xu S, et al. MRI of mouse models for gliomas shows similarities to humans and can be used to identify mice for preclinical trials. *Neoplasia.* 2002; 4:480-5.
30. Salmaggi A, Boiardi A, Gelati M, et al. Glioblastoma-derived tumorspheres identify a population of tumor stem-like cells with angiogenic potential and enhanced multidrug resistance phenotype. *Glia.* 2006; 54:850-60.
31. Inagaki A, Soeda A, Oka N, et al. Long-term maintenance of brain tumor stem cell properties under at non-adherent and adherent culture conditions. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 361:586-92.
32. Arroyo AG, Genis L, Gonzalo P, Matias-Roman S, Pollan A, Galvez BG. Matrix metalloproteinases: new routes to the use of MT1-MMP as a therapeutic target in angiogenesis-related disease. *Curr Pharm Des.* 2007; 13:1787-802.
33. Ueda J, Kajita M, Suenaga N, Fujii K, Seiki M. Sequence-specific silencing of MT1-MMP expression suppresses tumor cell migration and invasion: importance of MT1-MMP as a therapeutic target for invasive tumors. *Oncogene.* 2003; 22:8716-22.
34. Bartolome RA, Molina-Ortiz I, Samaniego R, Sanchez-Mateos P, Bustelo XR, Teixido J. Activation of Vav/Rho GTPase signaling by CXCL12 controls membrane-type matrix metalloproteinase-dependent melanoma cell invasion. *Cancer Res.* 2006; 66:248-58.
35. Robinet A, Fahem A, Cauchard JH, et al. Elastin-derived peptides enhance angiogenesis by promoting endothelial cell migration and tubulogenesis through upregulation of MT1-MMP. *J Cell Sci.* 2005; 118:343-56.

36. Uprichard SL. The therapeutic potential of RNA interference. *FEBS Lett.* 2005; 579:5996-6007.
37. Lu PY, Xie FY, Woodle MC. Modulation of angiogenesis with siRNA inhibitors for novel therapeutics. *Trends Mol Med.* 2005; 11:104-13.
38. Lu PY, Xie F, Woodle MC. In vivo application of RNA interference: from functional genomics to therapeutics. *Adv Genet.* 2005; 54:117-42.
39. Nuttall RK, Pennington CJ, Taplin J, et al. Elevated membrane-type matrix metalloproteinases in gliomas revealed by profiling proteases and inhibitors in human cancer cells. *Mol Cancer Res.* 2003; 1:333-45.
40. Nonaka T, Nishibashi K, Itoh Y, Yana I, Seiki M. Competitive disruption of the tumor-promoting function of membrane type 1 matrix metalloproteinase/matrix metalloproteinase-14 in vivo. *Mol Cancer Ther.* 2005; 4:1157-66.
41. Hatakeyama H, Akita H, Ishida E, et al. Tumor targeting of doxorubicin by anti-MT1-MMP antibody-modified PEG liposomes. *Int J Pharm.* 2007; 342:194-200.
42. Bergers G, Brekken R, McMahon G, et al. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol.* 2000; 2:737-44.
43. Valable S, Montaner J, Bellail A, et al. VEGF-induced BBB permeability is associated with an MMP-9 activity increase in cerebral ischemia: both effects decreased by Ang-1. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2005; 25:1491-504.
44. Shigemori Y, Katayama Y, Mori T, Maeda T, Kawamata T. Matrix metalloproteinase-9 is associated with blood-brain barrier opening and brain edema formation after cortical contusion in rats. *Acta Neurochir Suppl.* 2006; 96:130-3.
45. Morishige K, Shimokawa H, Matsumoto Y, et al. Overexpression of matrix metalloproteinase-9 promotes intravascular thrombus formation in porcine coronary arteries in vivo. *Cardiovasc Res.* 2003; 57:572-85.
46. Milsom C, Anderson GM, Weitz JI, Rak J. Elevated tissue factor procoagulant activity in CD133-positive cancer cells. *J Thromb Haemost.* 2007; 5:2550-2.
47. Rak J, Milsom C, May L, Klement P, Yu J. Tissue factor in cancer and angiogenesis: the molecular link between genetic tumor progression, tumor neovascularization, and cancer coagulopathy. *Semin Thromb Hemost.* 2006; 32:54-70.
48. Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Matias-Guiu X. NF- κ B in development and progression of human cancer. *Virchows Arch.* 2005; 446:475-82.
49. Park BC, Thapa D, Lee YS, Kwak MK, Lee ES, Choi HG, Yong CS, Kim JA. 1-furan-2-yl-3-pyridin-2-yl-propenone inhibits the invasion and migration of HT1080

- human fibrosarcoma cells through the inhibition of proMMP-2 activation and down regulation of MMP-9 and MT1-MMP. *Eur J Pharmacol.* 2007; 567:193-7.
50. Lee KW, Kim JH, Lee HJ, Surh YJ. Curcumin inhibits phorbol ester-induced up-regulation of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 by blocking ERK1/2 phosphorylation and NF-kappaB transcriptional activity in MCF10A human breast epithelial cells. *Antioxid Redox Signal.* 2005; 7:1612-20.
 51. Park JM, Kim A, Oh JH, Chung AS. Methylseleninic acid inhibits PMA-stimulated pro-MMP-2 activation mediated by MT1-MMP expression and further tumor invasion through suppression of NF-kappaB activation. *Carcinogenesis.* 2007; 28:837-47.
 52. Han YP, Tuan TL, Wu H, Hughes M, Garner WL. TNF-alpha stimulates activation of pro-MMP2 in human skin through NF-(kappa)B mediated induction of MT1-MMP. *J Cell Sci.* 2001; 114:131-9.
 53. Raso A, Negri F, Gregorio A, Nozza P, Mascelli S, De Marco P, Merello E, Milanaccio C, Ravegnani M, Cama A, Garrè ML, Capra V. Successful isolation and long-term establishment of a cell line with stem cell-like features from an anaplastic medulloblastoma. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2007 (in press)
 54. Rietze RL, Reynolds BA. Neural stem cell isolation and characterization. *Methods Enzymol.* 2006; 419:3-23.
 55. Regina A, Demeule M, Berube A, Mouldjian R, Berthelet F, Beliveau R. Differences in multidrug resistance phenotype and matrix metalloproteinases activity between endothelial cells from normal brain and glioma. *J Neurochem.* 2003; 84:316-24.
 56. Rolland Y, Demeule M, Michaud-Levesque J, Beliveau R. Inhibition of tumor growth by a truncated and soluble form of melanotransferrin. *Exp Cell Res.* 2007; 313:2910-9.
 57. Shmelkov SV, Meeus S, Moussazadeh N, et al. Cytokine preconditioning promotes codifferentiation of human fetal liver CD133+ stem cells into angiomyogenic tissue. *Circulation.* 2005; 111:1175-83.
 58. Neth P, Ciccarella M, Egea V, Hoelters J, Jochum M, Ries C. Wnt signaling regulates the invasion capacity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2006; 24:1892-903.
 59. Cao J, Chiarelli C, Kozarekar P, Adler HL. Membrane type 1-matrix metalloproteinase promotes human prostate cancer invasion and metastasis. *Thromb Haemost.* 2005; 93:770-778.

Figure 1

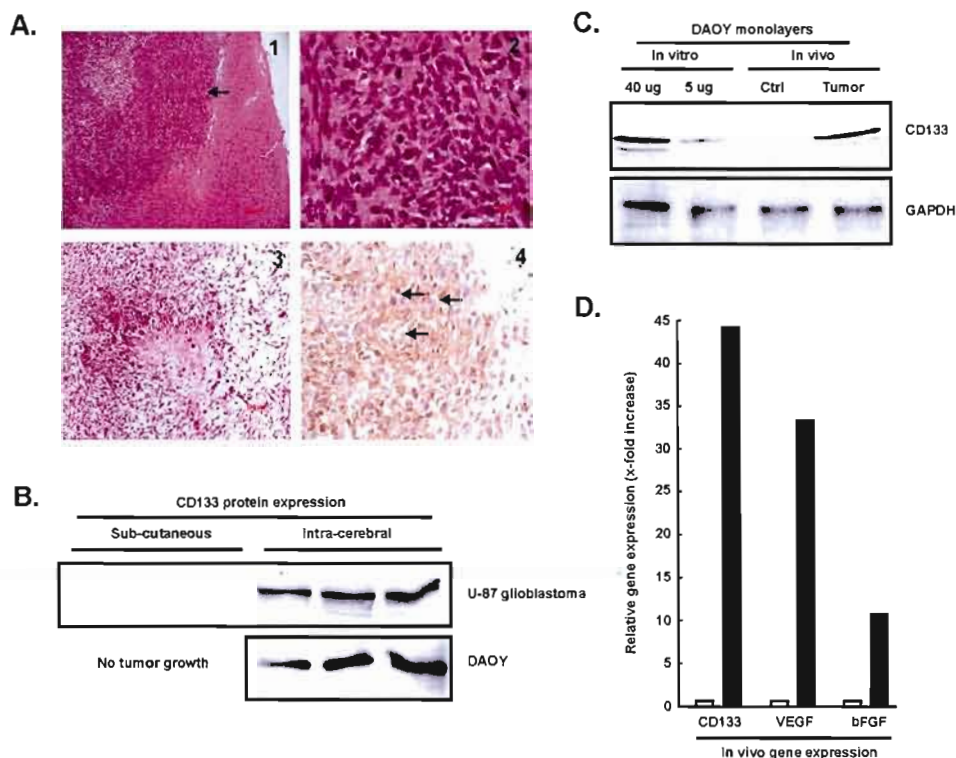


Fig.1 : The tissue environment of cell implantation dictates the expression of CD133(+) brain tumor-derived stem cells. Cultured DAOY monolayers were trypsinized and 10^6 cells injected either sub-cutaneously (s.c.) or intra-cerebrally (i.c.) in nude mice. Tumors were left to develop as described in the Methods section. (A1) Histopathological analysis of paraffin sections (3 μ m) of i.c. implanted human DAOY medulloblastoma cells was performed with hematoxylin-phloxin-saffron (HPS) staining and shows malignant proliferation composed of a majority of small round cells (arrow) found in normal mouse brain (asterisk, magnification 100x). (A2) At high magnification (400x) HPS staining shows that tumor is highly cellular with numerous mitoses, and (A3) presents an aggressive pattern with limited area of necrosis (magnification 200x). (A4) Some tumoral cells had a membranous expression of CD133 (arrows). (B) Immunoblotting was used to assess CD133 protein expression in lysates (20 μ g proteins) generated from subcutaneous and intracerebral U87 glioblastoma- or DAOY medulloblastoma-implanted cells as described in the Methods section. (C) Lysates (5 μ g protein) from *in vitro* cultured DAOY cell monolayers, controlateral healthy brain (Ctrl), and from i.c. implanted DAOY cells (Tumor) were assessed for CD133 expression. GAPDH expression was used as an internal loading control. (D) Relative gene expression levels of CD133, VEGF, and bFGF were assessed by quantitative PCR (qPCR) using total RNA extracted from controlateral healthy brain (white bars), or from intra-cerebral implanted DAOY tumors (black bars).

Figure 2

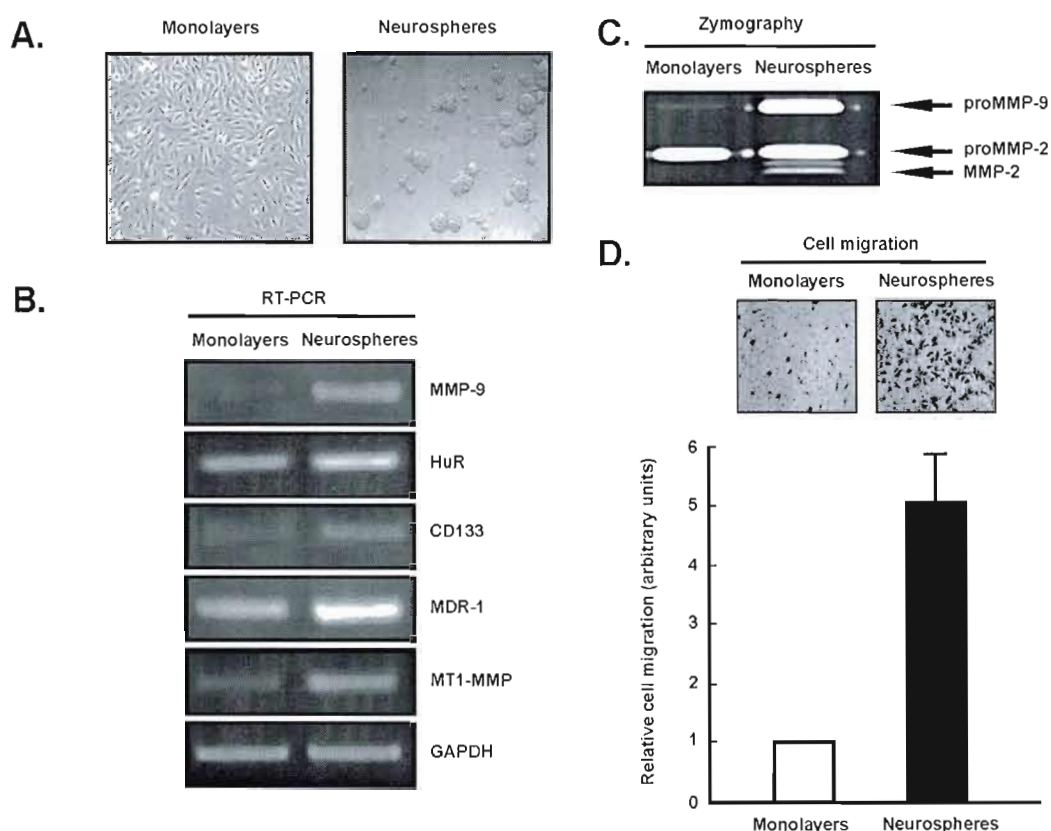


Fig.2 : Increased CD133, MDR-1, MT1-MMP, and MMP-9 expression characterize the invasive phenotype of neurosphere-like DAOY cells. (A) Representative phase contrast pictures of DAOY monolayers and neurosphere-like cells were taken after 48 hrs of culture. (B) Total RNA was extracted from DAOY monolayers and neurosphere-like cells as described in the Methods section. Semi-quantitative RT-PCR was performed and cDNA amplicons for MMP-9, HuR, CD133, MDR-1, MT1-MMP, and GAPDH were revealed by electrophoresis using agarose gels as described in the Methods section. (C) Conditioned media from DAOY monolayers and neurosphere-like cells were assessed for their MMP-9 and MMP-2 secretion and activation levels as described in the Methods section. (D) DAOY monolayers and neurosphere-like cells were trypsinized and seeded (5×10^4 cells) on gelatin-coated filters in modified Boyden chambers. Migration was allowed to proceed for 16h at 37°C. Cells on filters were then fixed and stained; one out of five representative stainings for each condition is shown. Values shown represent the means \pm SD of a representative experiment where five random fields per filter were counted in each experiment for each condition.

Figure 3

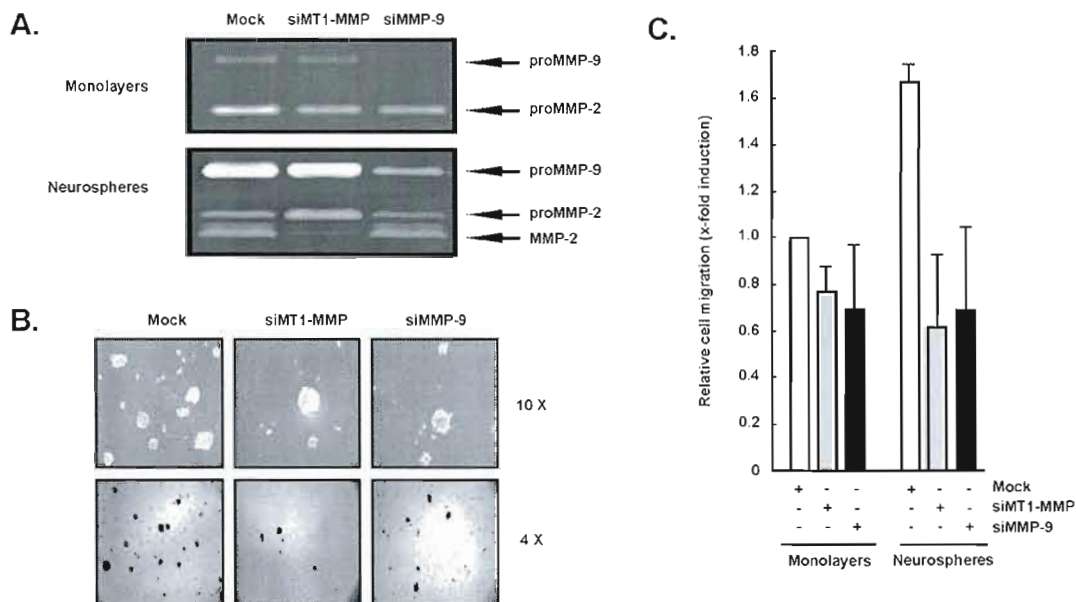


Fig.3: MT1-MMP and MMP-9 control the neurosphere-like formation process in DAOY cells and contribute to their invasive phenotype. (A) Gene silencing using siRNA was used to downregulate the expression of MT1-MMP and MMP-9 in DAOY cell monolayers (upper panel) or DAOY neurospheres (lower panel) as described in the Methods section. Conditioned media from each respective condition was harvested 48 hrs post-transfection and the extent of either MT1-MMP or MMP-9 silencing assessed using gelatin zymography. (B) MT1-MMP immunoblotting was performed with cell lysates isolated from (A). Autoradiograms are shown at 30 sec vs 2 min exposition in order to appreciate MT1-MMP downregulation (30 sec exposition), and the appearance of the 43-45 kDa inactive immunoreactive MT1-MMP that is generated during proMMP-2 activation (2 min exposition). GAPDH was used as an internal loading control. (C) Phase contrast (10X and 4X magnification) microscopy enabled the visualisation of the decrease in neurospheres-like formation in cells whose MT1-MMP or MMP-9 had been silenced. (D) Cell migration was also assessed 48 hrs post-transfection in modified Boyden chambers as described in the Methods section for control (white bars) monolayers and neurosphere-like DAOY cells, and cells where MMP-9 (black bars) and MT1-MMP (grey bars) gene expression was silenced. Values shown represent the means \pm SD of a representative experiment where five random fields per filter were counted for each condition.

Figure 4

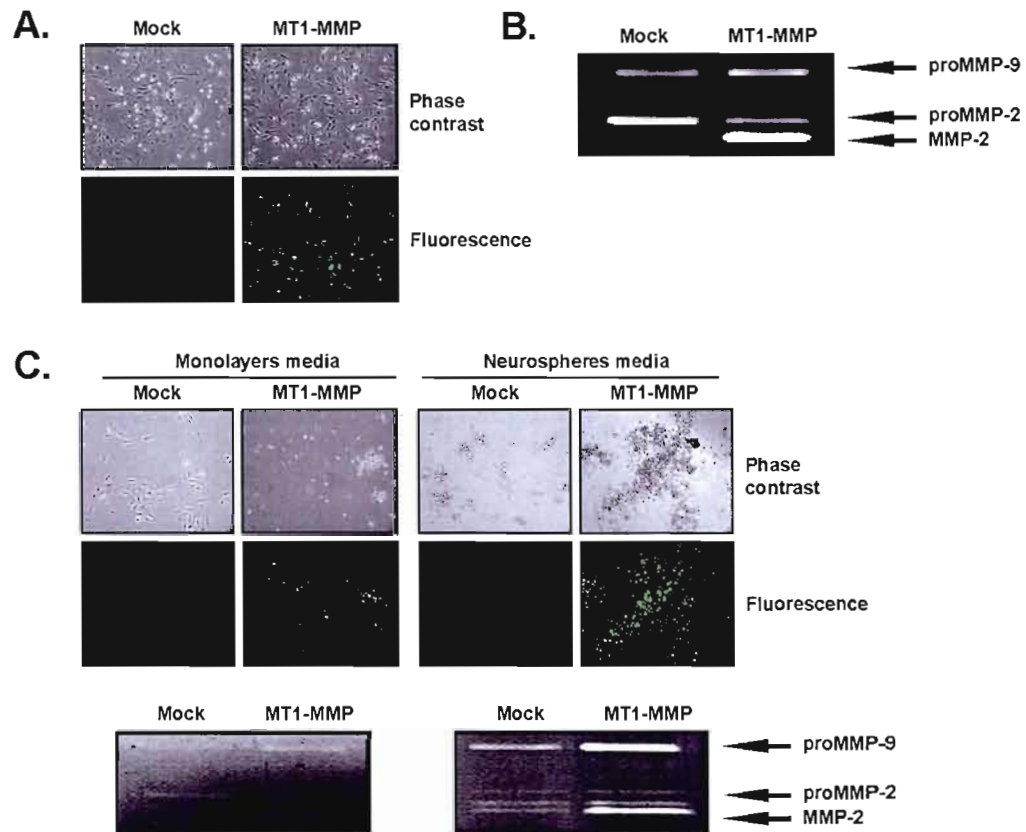


Fig.4: Overexpression of MT1-MMP triggers neurosphere-like DAOY differentiation. (A) DAOY cell monolayers were transiently transfected with a plasmid encoding GFP-MT1-MMP as described in the Methods section. Representative pictures were taken in phase contrast (upper panels) and fluorescence (bottom panels) in order to show transfection efficacy. (B) Conditioned media of Mock and GFP-MT1-MMP-transfected cells were assessed for proMMP-2 activation by the expression of the recombinant MT1-MMP protein using gelatin zymography as described in the Methods section. (C) Mock or GFP-MT1-MMP-transfected cells were trypsinized and then seeded either in monolayers media or neurosphere media. Representative pictures were then taken in phase contrast and fluorescence in order to monitor the extent of MT1-MMP-mediated neurosphere-like formation.

ARTICLE #2

The diet-derived sulforaphane inhibits matrix metalloproteinase-9-activated human brain microvascular endothelial cell migration and tubulogenesis

Contribution des auteurs:

Shanti Rojas-Sutterlin: Expérimentation, interprétation/analyse des résultats et écriture ; Borhane Annabi: Design expérimental, écriture et interprétation/analyse des résultats ; Mathieu Laroche : Expérimentation ; Marie-Paule Lachambre : Expérimentation ; Robert Moumdjian : Analyse/interprétation des résultats ; Richard Béliveau : Design expérimental, interprétation/analyse des résultats, financement

2 The diet-derived sulforaphane inhibits matrix metalloproteinase-9-activated human brain microvascular endothelial cell migration and tubulogenesis

Shanti Rojas-Sutterlin^{2¶P}, Borhane Annabi^{1¶P}, Mathieu Laroche^{2,3P}, Marie-Paule Lachambre^{2P}, Robert Moumdjian^{3P} and Richard Béliveau^{2P*}

^{1P}Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Département de Chimie, Centre BIOMED, Université du Québec à Montréal, Québec, Canada, ^{2P}Centre de Cancérologie Charles-Bruneau, Hôpital Sainte-Justine-UQAM, Québec, Canada, ^{3P}Surgery Department, Neurosurgery Service, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montreal, Québec, Canada

^{¶P}These authors contributed equally to this work

Human brain microvascular endothelial cells (HBMEC) play an essential role as structural and functional components of the blood-brain barrier (BBB). While disruption of the BBB by the brain tumor-secreted matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) favors tumor invasion, the role and regulation of MMP-9 secretion by HBMEC themselves in response to carcinogens or brain tumor-derived growth factors has received little attention. Our study delineates a unique brain endothelial phenotype in that MMP-9 secretion is increased upon phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) treatment of HBMEC. Sulforaphane (SFN), an isothiocyanate present in broccoli which exhibits chemopreventive properties, selectively inhibited the secretion of MMP-9 but not that of MMP-2. The decrease in MMP-9 gene expression correlated with a decrease in the expression of the mRNA stabilizing factor HuR protein triggered by SFN. PMA-induced HBMEC migration was also antagonized by SFN. Silencing of the MMP-9 gene inhibited PMA-induced MMP-9 secretion, cell migration and *in vitro* tubulogenesis on Matrigel. While SFN inhibited the chemoattractive abilities of brain tumor-derived growth factors, it failed to inhibit PMA-induced tubulogenesis. Our data are indicative of a selective role for SFN to inhibit MMP-9-activated, but not basal, HBMEC migration and tubulogenesis which actions could add to SFN's anti-tumor properties.

The abbreviations used are : BBB, blood-brain barrier; EC, endothelial cells; HBMEC, Human brain microvascular EC; MMP-9, matrix metalloproteinase-9; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; SFN, sulforaphane; TNF, tumor necrosis factor

Key words : Brain endothelial cells, cooption, MMP-9, sulforaphane

INTRODUCTION

Tumor angiogenesis was, considered, for many years, a vascularization process solely explained by the ingrowth of new vessels into a tumor from preexisting vessels. With time, tumor angiogenesis became a fast growing sub-domain in tumor biology research as basic mechanisms were unraveled and many key players identified [1]. In recent years additional mechanisms, including angioblast recruitment, cooption, vasculogenic mimicry and mosaic vessels, have been recognized as contributing to tumor vascularization. These different mechanisms may exist concomitantly in the same tumor or may be selectively involved in a specific tumor type or host environment [2]. More recently it has also become clear that tumors may use alternative means of obtaining a blood supply. Vessel cooption, the use of pre-existing vessels, was described first in the brain, one of the most densely vascularized organs in the body. Thus, brain tumors may develop without the need of an angiogenic switch to occur. Obviously, this means of augmenting blood supply will not be affected by angiogenesis inhibition. [3]. Glioblastoma multiforme is, for instance, characterized by exuberant angiogenesis, but the pathologic mechanisms driving the biological behavior of gliomas also involves cooption of native blood vessels [4]. The cerebral endothelium may thus dictate the nature of the brain tumor vascularizing processes and provide a specific environment for therapeutic targeting.

Although the inhibition of tumor angiogenesis is thought to be an efficient therapeutic strategy for the treatment of malignant gliomas [5], the fact that glioma cells can invade the brain diffusely over long distances without necessarily requiring angiogenesis indicates the need for alternative/complementary therapeutic approaches. Furthermore, because systemic anti-angiogenic therapy can also apparently increase the invasiveness of gliomas in the orthotopic model, it was concluded that tumor cell invasion is tightly associated with pre-existing blood vessels, confirming that increased cooption of the host vasculature could, in fact, represent a compensatory mechanism that is selected for by inhibiting adequate tumor vascularization [6]. These observations were further strengthened

by histologic studies of growth suggesting that these tumors adapt to inhibition of angiogenesis by increased infiltration and cooption of the host vasculature [7]. Targeting tumor-associated endothelial cells (EC) as part of cancer treatments thus becomes an appealing prospect. The expression of matrix metalloproteinases (MMPs), particularly MMP-9, is significantly increased during tumor progression and is associated with the opening of the BBB [8]. Adenoviral-mediated MMP-9 downregulation inhibited human dermal microvascular EC migration in cell wounding and spheroid migration assays, and reduced capillary-like tube formation, demonstrating the key role of MMP-9 in EC network organization [9]. Furthermore, among all MMPs, MMP-9 secreted from brain EC has never been investigated and may likely be of importance in brain tumor-associated angiogenesis and become a therapeutic target. A role for MMP-9 in cooption mechanisms remains to be investigated.

Recent reports have proposed that some naturally occurring phytochemicals can function as sensitizers which could, for instance, augment the effectiveness of conventional radiotherapy [10, 11]. Of these phytochemicals, isothiocyanates present in cruciferous vegetables, and particularly sulforaphane (SFN) present in broccoli, are by far the most extensively studied in order to uncover the mechanisms behind its chemopreventive properties [12]. Evidence that SFN acts to inhibit angiogenesis via suppression of bovine aortic endothelial cell proliferation was recently provided [13, 14]. However, no data are available in the specific targeting of brain tumor-associated EC functions by SFN. Because the HBMEC model used in this study, is to our knowledge, the closest *in vitro* surrogate model available that can approximate brain tumor-derived EC phenotype and functions, the goal of our study was to characterize the impact of SFN on the basal and MMP-9-activated phenotype of HBMEC migration and tubulogenesis, with an emphasis on the anti-MMP-9 secretion properties that are attributed to SFN.

MATERIALS AND METHODS

Materials. Sodium dodecylsulfate (SDS) and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma (Oakville, ON). Electrophoresis reagents were purchased from Bio-Rad (Mississauga, ON). The enhanced chemiluminescence (ECL) reagents were from Amersham Pharmacia Biotech (Baie d'Urfé, QC). Micro bicinchoninic acid protein assay reagents were from Pierce (Rockford, IL). All other reagents were from Sigma-Aldrich Canada.

Cell culture: Human brain microvascular endothelial cells (HBMEC) were characterized and generously provided by Dr Kwang Sik Kim from the John 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 labelled, acetylated low-density lipoprotein and expressed gamma glutamyl transpeptidase, demonstrating their brain EC-specific phenotype [15]. HBMEC were immortalized by transfection with simian virus 40 large T antigen and maintained their morphologic and functional characteristics for at least 30 passages [16]. HBMEC were maintained in RPMI 1640 (Gibco, Burlington, ON) supplemented with 10% (v/v) inactive fetal bovine serum (iFBS) (HyClone Laboratories, Logan, UT), 10% (v/v) NuSerum (BD Bioscience, Mountain View, CA), modified Eagle's medium nonessential amino acids (1%) and vitamins (1%) (Gibco), sodium pyruvate (1 mM) and EC growth supplement (30 µg/ml). Culture flasks were coated with 0.2% type-I collagen to support the growth of HBMEC monolayers. Cells were cultured at 37^oP°C under a humidified atmosphere containing 5% COB₂B. All experiments were performed using passages 3 to 28. The HT-1080 cell line was purchased from American Type Culture Collection (Manassas, VI), maintained in Eagle's minimum essential medium (MEM) containing 10% (v/v) calf serum (HyClone Laboratories), 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin, and cultured at 37°C under a humidified atmosphere containing 5% COB₂B.

RNA interference : RNA interference experiments were performed using Lipofectamine 2000 according to theP^P manufacturer's instructions.. A small interfering

RNA against human MMP-9 (siMMP-9, GenBankTM accession^P number NM-004994) and mismatch siRNA with no known homology to mammalian genes were synthesized (Qiagen, Valencia, CA) against the following^P published target sequences for MMP-9: 5'-AACATCACCTATTGGATCCAAACTAC-3',^P nucleotides 377 to 403 [17], and respectively annealed to form duplexes. The sequence of the siMMP-9 used in this study is as follows : Sense siRNA sequence was 5'-CAUCACCUAUUGGAUCCAAAdTdT-3'.^P Antisense si-RNA was 5'-UUGGAUCCAAUAGGUGAUGdTdT-3'. Knockdown of MMP-9 expression, as assessed by RT-PCR, ranged routinely from 75-90% efficiency (Fig.2a).

cDNA synthesis and real-time quantitative RT-PCR : Total RNA was extracted from cultured HBMEC using the TRIzol reagent (Invitrogen, Burlington, ON). For cDNA synthesis, ~1 µg total RNA was reverse-transcribed into cDNA using Oligo dT primer and iScript cDNA synthesis kit reverse transcriptase. cDNA was stored at -20°C for PCR. MMP-9 gene expression was quantified by real-time quantitative RT-PCR using QuantiTect SYBR Green dye (Qiagen, Valencia, CA). DNA amplification was carried out using Icyler (BIO-RAD, Hercules, CA), and the detection was performed by measuring the binding of the fluorescence dye SYBR Green I to double-stranded DNA. Primers for MMP-9 (forward : 5'-AAGATGCTGCTGTTTCAGCGGG-3', reverse : 5'-GTCCTCAGGGCACTGCAGGAT-3') were derived from human sequences. The relative quantities of target gene mRNA against an internal control, 18S ribosomal RNA, was possible by following a ΔC_{T_B} method. An amplification plot that had been the plot of fluorescence signal vs. cycle number was drawn. The difference (ΔC_{T_B}) between the mean values in the duplicated samples of target gene and those of 18S ribosomal RNA were calculated by Microsoft Excel and the relative quantified value (RQV) was expressed as $2^{P-\Delta C_{T_B}}$.

Analysis of HBMEC migration: HBMEC migration was assessed using modified Boyden chambers. The lower surfaces of Transwells (8-µm pore size; Costar, Acton, MA) were pre-coated with 0.2% type-I collagen for 2 hours at 37°C. The Transwells were then assembled in a 24-well plate (Fisher Scientific Ltd, Nepean, ON). The lower chamber was filled with serum-free HBMEC medium or growth factor-enriched conditioned medium isolated from 48 hours serum starved U-87 human glioblastoma cells, which we found to

exert a very potent chemoattractant effect upon endothelial cell migration [18]. Control HBMEC were collected by trypsinization, washed and resuspended in serum-free medium at a concentration of $10P^{6P}$ cells/ml; $10P^{5P}$ cells were then inoculated onto the upper side of each modified Boyden chamber. The plates were placed at $37^{\circ}C$ in 5% CO_{2B} /95% air for 30 minutes after which various concentrations of SFN were added to the lower chambers of the Transwells. Migration then proceeded for 6 hours at $37^{\circ}C$ in 5% CO_{2B} /95% air. Cells that had migrated to the lower surfaces of the filters were fixed with 10% formalin phosphate and stained with 0.1% crystal violet-20% methanol (v/v). Images of at least five random fields per filter were digitized (100X magnification). The average number of migrating cells per field was quantified using Northern Eclipse software (Empix Imaging Inc., Mississauga, ON). Migration data are expressed as a mean value derived from at least four independent experiments.

Endothelial cell morphogenesis assay: Tubulogenesis was assessed using Matrigel aliquots of 50 μ L, plated into individual wells of 96-well tissue culture plates (Costar, Amherst, MA) and allowed to polymerize at $37^{\circ}C$ for 30 minutes. After brief trypsination, HBMEC were washed and resuspended at a concentration of $10P^{6P}$ cells/ml in serum-free medium. Next, 25 μ L of cell suspension (25,000 cells/well) and 75 μ L of medium with serum were added into each culture well. Cells were allowed to form capillary-like tubes at $37^{\circ}C$ in 5% CO_{2B} /95% air for 20 hours. The formation of capillary-like structures^P was examined microscopically and pictures (100x) were taken using^P a Retiga 1300 camera (QImaging) and a Nikon Eclipse TE2000-U microscope. The^P extent to which capillary-like structures formed in the gel was quantified by analysis of digitized images to determine^P the thread length of the capillary-like network, using a commercially^P available image analysis program (Northern Eclipse) as described and validated previously [18, 19]. For each experiment, four randomly chosen areas were quantified by counting the number of tubes formed. Tubulogenesis data are expressed as a mean value derived from at least three independent experiments.

Gelatin zymography : Gelatin zymography was used to assess the extent of MMP-2 and MMP-9 activity as previously described and validated [20, 21]. Briefly, an aliquot (20

μ l) of the culture medium was subjected to SDS-PAGE in a gel containing 0.1 mg/ml gelatin. The gels were then incubated in 2.5% Triton X-100 and rinsed in nanopure distilled H_2O . Gels were further incubated at 37°C for 20 hrs in 20 mM NaCl, 5 mM CaCl_2 , 0.02% Brij-35, 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.6, then stained with 0.1% Coomassie Brilliant blue R-250 and destained in 10% acetic acid, 30% methanol in H_2O . Gelatinolytic activity was detected as unstained bands on a blue background.

Immunoblotting procedures: Cytosolic proteins from control and treated cells were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (Annabi *et al.*). After electrophoresis, proteins were electrotransferred to polyvinylidene difluoride membranes which were then blocked for 1 hr at room temperature with 5% non-fat dry milk in Tris-buffered saline (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5) containing 0.3% Tween-20 (TBST). Membranes were further washed in TBST and incubated with the primary polyclonal anti-HuR antibody (1/1,000 dilution, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) in TBST containing 3% bovine serum albumin, followed by a 1 hr incubation with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (1/2,500 dilution) in TBST containing 5% non-fat dry milk. Immunoreactive material was visualized by enhanced chemiluminescence (Amersham Biosciences, Baie d'Urfée, QC).

Fluorimetric caspase-3 activity assay: HBMECs were grown to 60% confluence and treated with increasing concentrations of SFN. Cells were collected and washed in ice-cold PBS pH 7.0. Cells were subsequently lysed in Apo-Alert lysis buffer (Clontech, Palo Alto, CA) for one hour at 4°C and the lysates were clarified by centrifugation at 16,000g for 20 minutes. Caspase-3 activity was determined by incubation with 50 μM of the caspase-3-specific fluorogenic peptide substrate acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin (Ac-DEVD-AFC) in assay buffer [50 mM Hepes-NaOH (pH 7.4), 100 mM NaCl, 10% sucrose, 0.1% 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate, 5 mM DTT and 1 mM EDTA] in 96-well plates [22]. The release of AFC was monitored for at least 30 minutes at 37°C on a fluorescence plate reader (Molecular Dynamics) ($\lambda_{\text{exc}} = 400\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 505\text{nm}$).

Statistical data analysis : Data are representative of three or more independent experiments. Statistical significance was assessed using Student's unpaired *t*-test and probability values of less than 0.05 were considered significant; an asterisk (*) identifies such significance in each figure.

RESULTS

MMP-9 secretion is selectively induced by PMA and inhibited by sulforaphane. We first assessed human brain microvascular endothelial cells' (HBMEC) response to the inflammatory mediator tumor necrosis factor (TNF)- α and to the carcinogen PMA, two well established MMP-9 secretion inducers [23]. Cells were serum-starved, treated for 18 hours and conditioned media was harvested to measure MMP levels by gelatin zymography. While MMP-2 extracellular levels remained unaffected, those of MMP-9 were increased in PMA-treated cells but not upon TNF treatment (Fig.1a). In contrast, both PMA and TNF induced MMP-9 secretion in HT-1080 fibrosarcoma cells. When HBMEC were treated with combined PMA and sulforaphane (SFN), MMP-9 was found to be significantly inhibited (Fig.1b). When MMP-9 gene expression was silenced using siRNA strategies, PMA induction of MMP-9 was significantly reduced and SFN completely inhibited PMA-induced MMP-9 secretion (Fig.1b), indicating a role of SFN in the inhibition of MMP-9 gene expression upon PMA signaling. Moreover, we assessed cell viability through caspase-3 activity in cells treated with up to 30 μ M SFN and found no deleterious effect on HBMEC viability (Fig.1c). Collectively, these results suggest that selective MMP-9 gene expression affects extracellular MMP-9 levels in response to tumor promoting conditions rather than to inflammatory mediators in HBMEC.

Sulforaphane inhibits PMA-induced HuR protein and MMP-9 gene expression in HBMEC. Although most published studies have focused on the transcriptional control of MMP-9 expression, there is increasing evidence that its expression can also be regulated at the levels of mRNA stability, translation and protein secretion. Among the factors shown to stabilize MMP-9 mRNA and augment its expression [24], HuR has been ascribed a pivotal role in the development of tumors [25] and been found to be a key mediator during macrophage activation in PMA-differentiated HL-60 cells [20]. We next tested whether SFN affected MMP-9 transcripts levels and whether any MMP-9 modulation could be correlated to that of cytosolic HuR protein expression. Total RNA was isolated from treated HBMEC, and MMP-9 gene expression assessed by quantitative RT-PCR. PMA was found to increase MMP-9 gene expression, while SFN was able to antagonize that increase as well as in

untreated cells (Fig.2a). The protein expression of HuR was also assessed in those same conditions and found to be decreased by SFN in the cytosolic fraction where it is reported to exert MMP-9 mRNA stabilization, while that of GAPDH remained unaffected (Fig.2b). Collectively, insight into the anti-MMP-9 effect of SFN may involve downregulation of HuR which may ultimately decrease MMP-9 mRNA stability.

Sulforaphane antagonizes PMA-induced MMP-9 secretion and MMP-9-dependent cell migration in HBMEC. The effects of SFN on MMP-9 secretion and on cell migration were further investigated. We found a dose-dependent inhibition of MMP-9 secretion in PMA-treated HBMEC, while MMP-2 extracellular levels remained unaffected (Fig.3a). SFN almost completely inhibited PMA-induced MMP-9 secretion at 10 μM , with a calculated $\text{ICB}_{50\text{B}}$ of 1-3 μM (Fig.3b, right panel). MMP-2 secretion remained unaffected in all conditions (Fig.3b, left panel), demonstrating SFN's specificity of action. Cell migration was also induced by PMA in HBMEC while SFN dose-dependently inhibited such migration with an $\text{ICB}_{50\text{B}}$ ranging from 0.3-1 μM (Fig.4a). Interestingly, SFN specifically targeted the migration of PMA-treated HBMEC but not that of untreated cells (Fig.4a). Gene silencing of MMP-9 combined with SFN treatment of HBMEC further highlighted the importance of MMP-9 in HBMEC migration, since PMA was unable to efficiently trigger cell migration in cells where MMP-9 levels were reduced by silencing (Fig.4b). The effects of SFN on PMA-induced cell migration and MMP-9 secretion were further plotted and showed a very nice correlation ($r^{2\text{P}} = 0.985$, Fig.4c) demonstrating that the more PMA-induced MMP-9 secretion is inhibited, the more PMA-induced cell migration is as well.

Sulforaphane inhibits HBMEC migration in response to brain tumor-derived growth factors. In addition to its inhibitory effect against carcinogen-induced HBMEC migration, we assessed SFN's capacity to affect HBMEC migration in response to conditioned media generated from serum-starved subconfluent U87 glioblastoma cell cultures [18] and that is enriched in brain tumor-derived growth factors. HBMEC migration was efficiently induced up to 10-fold by tumor-derived growth factors chemoattraction (Fig.5a). This chemoattracting effect was dose-dependently decreased when SFN was added to the lower

chamber of migration (Fig.5b). This suggests that SFN potentially inhibits some intracellular signalling pathways triggered in response to tumor growth factors.

MMP-9 is involved in three-dimensional capillary-like structure formation by HBMEC. The importance of MMP-9 in HBMEC tubulogenesis was assessed in mock-transfected and siMMP-9-transfected cells. We observed that, as expected for differentiated endothelial cells, HBMEC formed well-defined, capillary-like structures on Matrigel (Fig.6a). While PMA treatment induced *in vitro* tubulogenesis, transient gene silencing of MMP-9 decreased basal HBMEC tube formation suggesting that MMP-9-mediated events were crucial for tubulogenesis, while PMA was found unable to trigger HBMEC tube formation in siMMP-9 cells in comparison to Mock cells (Fig.6b). This suggests that MMP-9, most probably both the soluble fraction and the fraction bound to the cell surface of HBMEC, is actively involved in tubulogenesis.

Sulforaphane selectively inhibits in vitro capillary-like structure formation in MMP-9-activated HBMEC. Because SFN selectively inhibited PMA-induced MMP-9 secretion and PMA-induced HBMEC migration, we also evaluated whether it might inhibit HBMEC tubulogenesis. Cells were seeded on top of Matrigel and left to adhere as described in the Methods section. SFN or the green tea-derived catechin EGCg, an antiangiogenic molecule that we have shown to inhibit MMP-9 secretion [20], and to sensitize HBMEC to ionizing radiation [22], were then added to the wells and the extent of tubulogenesis assessed (Fig.7a). We found that 10 μ M SFN was unable to inhibit basal (white bars) capillary-like structure formation, while it reduced by \sim 45% PMA-induced (black bars) *in vitro* tubulogenesis (Fig.7b). In contrast, EGCg efficiently inhibited both basal and PMA-induced tubulogenesis. This observation suggests that, in addition to its activity against cell migration and ECM degradation, SFN specifically targets the MMP-9-dependent tubulogenesis of HBMEC.

DISCUSSION

The transformation of the regular vasculature in normal tissue into a highly heterogeneous tumor capillary network is described by models incorporating tumor growth, vessel cooption, neo-vascularization, vessel collapse, and cell death [26]. Although different mechanisms of tumor vascularization have been characterized, much is unknown about their interaction with diet-derived molecules. The combined tumor vascularizing processes in tumor development, in fact, renders difficult their specific targeting in antitumor therapy. Brain tumors are highly vascularized and, at early stages of development, tumor-associated vessels possess a phenotype similar to that in their normal brain environment. This phenotype can, in fact, explain why it is difficult to detect gliomas at early stages by MRI analysis [3]. While brain tumors can use angiogenesis to develop in a highly vascularized tissue such as brain, they can also use alternate vascularization mechanisms such as cooption [27]. In the present study, the specific targeting of the molecular players involved in brain EC cooption increases our comprehension of the chemopreventive properties of SFN. Collectively, we provide evidence that the almost complete (>90%) inhibition of MMP-9-activated, but not basal, HBMEC migration in comparison to the less potent inhibition (~45%) of tubulogenesis may highlight a potential role of SFN against cooption mechanisms.

Recently it was shown that EC, isolated from tumors, grew independent of the presence of endothelial growth factors, suggesting that tumor EC acquire some characteristics that make them less sensitive to antiangiogenic therapy [28]. This finding prompted the search for alternate antitumor molecules that can target cooption mechanisms, such as the SFN differential targeting of HBMEC migration that we report here. Because cooption also depends on the site of tumor development, the specific host-tumor interaction in brain can therefore be considered to dictate the vascular endothelium behavior and could explain why SFN possesses antiangiogenic activity in umbilical- or dermal-derived EC but not in cerebral EC. Antiangiogenic agents have thus far been used with some success [29, 30], but mostly in combination with ionizing radiation (IR) to increase their therapeutic efficacy [31, 32]. Only recently have the brain EC been considered not only as the target of

antiangiogenic agents but also of IR, therefore representing a powerful new potential treatment target in highly vascularized tumours such as glioblastoma [18, 33]. In line with this, epigallocatechin-3-gallate (EGCg), a green tea-derived molecule, has been recognized as having many anti-tumor biochemical functions including inhibition of tumor cell growth and of angiogenesis [34]. Furthermore, we have recently shown that EGCg suppressed MMP-9 secretion [20] and vascular endothelial growth factor receptor function in EC [19], and that EGCg efficiently targeted those human EC that escaped IR-induced damage [18, 22]. Given that HuR levels are elevated in cancer [35], and have a pivotal role in promoting angiogenesis [36, 37], we also found, in line with the anti-MMP-9 gene expression effect of SFN, that inhibition of HuR expression by EGCg efficiently suppressed PMA-induced MMP-9 secretion in promyelocytic leukemia cells [20]. It is thus tempting to suggest that inhibition of HuR-regulated expression of markers such as MMP-9 by EGCg or SFN, could be potential targets of anticancer nutraceutical molecules.

In order to further document the chemopreventive properties of SFN, we show in our study that SFN may represent such a class of molecules that could effectively target MMP-9-mediated brain EC migration properties independent of EC angiogenesis. This finding complements the major mechanism by which SFN acts and that includes suppression of cytochrome P450 enzymes, induction of apoptotic pathways, suppression of cell cycle progression and anti-inflammatory activity [12]. SFN has been shown to act as a histone deacetylase inhibitor preventing NFkB activation [38]. Given that PMA triggers NFkB activation which, in turn, induces MMP-9 transcription [39], one can hypothesize that inhibition of histone deacetylase by SFN in HBMEC may also play a role in MMP-9 inhibition. The specific phenotype of differentiated HBMEC dictates its specific response to SFN. As such, SFN was shown to suppress 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced cancer cell invasion and MMP-9 activity in human MDA-MB-231 breast cancer cells [40], while others have shown that SFN did not affect MMP production in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) as a model of angiogenesis but still inhibited tube formation on Matrigel [41]. SFN also potently decreased newly formed microcapillaries in a human *in vitro* anti-angiogenesis model with an ICB_{50B} of $0.08 \mu\text{M}$ [13], a value that is very close to the ICB_{50B} for MMP-9 secretion inhibition that we observed in this study.

Furthermore, daily administration of SFN (100 nmol/day, intravenously for 7 days) to female Balb/c mice bearing VEGF-impregnated Matrigel plugs strongly and significantly suppressed angiogenesis progression [14]. These findings, combined with ours, suggest that the EC population is a target of SFN action both *in vitro* and *in vivo*. SFN may thus interfere with all essential steps of neovascularization targeting angiogenesis as well as with cooption mechanisms within specific tissues where EC proliferation, migration and tube formation occur.

In conclusion, angiogenic inhibitors are increasingly used in combination with chemotherapy in experimental mouse models and in medical therapy [42]. One explanation for the benefits of this combination is that antiangiogenic therapy normalizes the tumor vasculature by shutting-down non-functional blood vessels, but still permits alternate vascularization processes to take place. Our study provides molecular evidence for diet-derived molecules such as SFN to further target those brain EC involved in cooption mechanisms and highlights a potential role for SFN to inhibit MMP-9-mediated functions in HBMEC.

Acknowledgments : BA holds a Canada Research Chair in Molecular and Metabolic Oncology from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). RB holds both an Institutional UQAM Research Chair in Cancer Prevention and Treatment, and the Claude Bertrand Chair in Neurosurgery (CHUM).

REFERENCES

1. Harper, J., Moses, M.A., Molecular regulation of tumor angiogenesis: mechanisms and therapeutic implications, *EXS* 2006, *96*, 223-268.
2. Auguste, P., Lemiere, S., Larrieu-Lahargue, F., Bikfalvi, A.T., Molecular mechanisms of tumor vascularization, *Crit Rev Oncol Hematol.* 2005, *54*, 53-61.
3. Leenders, W.P., Kusters, B., de Waal, R.M.T, Vessel co-option: how tumors obtain blood supply in the absence of sprouting angiogenesis, *Endothelium* 2002, *9*, 83-87.
4. Fischer, I., Gagner, J.P., Law, M., Newcomb, E.W., Zagzag, D.T, Angiogenesis in gliomas: biology and molecular pathophysiology, *Brain Pathol.* 2005, *15*, 297-310.
5. Tuettenberg, J., Friedel, C., Vajkoczy, P., Angiogenesis in malignant glioma--a target for antitumor therapy? *Crit Rev Oncol Hematol.* 2006, *59*, 181-193.
6. Lamszus, K., Kunkel, P., Westphal, M.T, Invasion as limitation to anti-angiogenic glioma therapy. *Acta Neurochir Suppl.* 2003, *88*, 169-177.
7. Rubenstein, J.L., Kim, J., Ozawa, T., Zhang, M., et al. Anti-VEGF antibody treatment of glioblastoma prolongs survival but results in increased vascular cooption. *Neoplasia* 2000, *2*, 306-314.
8. Shigemori, Y., Katayama, Y., Mori, T., Maeda, T., Kawamata, T.T, Matrix metalloproteinase-9 is associated with blood-brain barrier opening and brain edema formation after cortical contusion in rats. *Acta Neurochir Suppl.* 2006, *96*, 130-133.
9. Jadhav, U., Chigurupati, S., Lakka, S.S., Mohanam, S.T, Inhibition of matrix metalloproteinase-9 reduces in vitro invasion and angiogenesis in human microvascular endothelial cells. *Int J Oncol.* 2004, *25*, 1407-1414.
10. Chendil, D., Ranga, R.S., Meigooni, D., Sathishkumar, S., Ahmed, M.M., Curcumin confers radiosensitizing effect in prostate cancer cell line PC-3. *Oncogene* 2004, *23*, 1599-1607.
11. Baatout, S., Derradji, H., Jacquet, P., Mergeay, M., Increased radiation sensitivity of an eosinophilic cell line following treatment with epigallocatechin-gallate, resveratrol and curcuma. *Int J Mol Med.* 2005, *15*, 337-352.
12. Juge, N., Mithen, R.F., Traka, M.T Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: a comprehensive review. *Cell Mol Life Sci,* 2007, *64*, 1105-1127.
13. Bertl, E., Bartsch, H., Gerhauser, C.T Inhibition of angiogenesis and endothelial cell functions are novel sulforaphane-mediated mechanisms in chemoprevention. *Mol Cancer Ther.,* 2006, *5*, 575-585.

14. TJackson, S.J., Singletary, K.W., Venema, R.C., TSulforaphane suppresses angiogenesis and disrupts endothelial mitotic progression and microtubule polymerization. *Vascul Pharmacol.* 2007, *46*, 77-84.
15. TStins, M.F., Gilles, F., Kim, K.S.,T Selective expression of adhesion molecules on human brain microvascular endothelial cells. *J Neuroimmunol.* 1997, *76*, 81-90.
16. TGreiffenberg, L., Goebel, W., Kim, K.S., Weiglein, I., et al.,T 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.* 1998, *66*, 5260-5267.
17. TDeryugina, E.I., Zijlstra, A., Partridge, J.J., Kupriyanova, T.A., et al. TUnexpected effect of matrix metalloproteinase down-regulation on vascular intravasation and metastasis of human fibrosarcoma cells selected in vivo for high rates of dissemination. *Cancer Res.*, 2005, *65*, 10959-10969.
18. TMcLaughlin, N., Annabi, B., Sik Kim, K., Bahary, J.P., et al., TThe response to brain tumor-derived growth factors is altered in radioresistant human brain endothelial cells. *Cancer Biol Ther.* 2006, *5*, 1539-1545.
19. TLamy, S., Gingras, D., Beliveau, R.T, Green tea catechins inhibit vascular endothelial growth factor receptor phosphorylation. *Cancer Res.* 2002, *62*, 381-385.
20. TAnnabi, B., Currie, J.C., Moghrabi, A., Beliveau, RT. Inhibition of HuR and MMP-9 expression in macrophage-differentiated HL-60 myeloid leukemia cells by green tea polyphenol EGCg. *Leuk Res.* 2007, *31*, 1277-1284.
21. TAnnabi, B., Lachambre, M.P., Bousquet-Gagnon, N., Page, M., et al.,.T Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin 3-gallate inhibits MMP-2 secretion and MT1-MMP-driven migration in glioblastoma cells. *Biochim Biophys Acta.* 2002, *1542*, 209-220.
22. TMcLaughlin, N., Annabi, B., Lachambre, M.P., Kim, K.S., et al., TCombined low dose ionizing radiation and green tea-derived epigallocatechin-3-gallate treatment induces human brain endothelial cells death. *J Neurooncol.* 2006, *80*, 111-121.
23. THetzel, M., Walcher, D., Grub, M., Bach, H., et al.,.T Inhibition of MMP-9 expression by PPARgamma activators in human bronchial epithelial cells. *Thorax.* 2003, *58*, 778-783.
24. TAkool, el-ST., TKleinert, HT., THamada, F.MT., TAbdelwahab, M.HT., et al. Nitric oxide increases the decay of matrix metalloproteinase 9 mRNA by inhibiting the expression of mRNA-stabilizing factor HuR. *Mol. Cell. Biol.* 2003, *23*, 4901-4916.

25. TAudic, Y., Hartley, R.ST. Post-transcriptional regulation in cancer. *Biol. Cell.* 2004, *96*, 479-498.
26. TBartha, K., Rieger, HT., Vascular network remodeling via vessel cooption, regression and growth in tumors. *J Theor Biol.* 2006, *241*, 903-918.
27. THolash, J., Maisonpierre, P.C., Compton, D., Boland, P., et al., TVessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* 1999, *284*, 1994-1998.
28. TBussolati, B., Deambrosis, I., Russo, S., Deregibus, M.C., Camussi, G.,T Altered angiogenesis and survival in human tumor-derived endothelial cells. *FASEB J.* 2003, *17*, 1159-1161.
29. TReardon, D.A., Wen, P.Y.,T Therapeutic advances in the treatment of glioblastoma: rationale and potential role of targeted agents. *Oncologist.* 2006, *11*, 152-164.
30. TSimpson, L., Galanis, E.,T Recurrent glioblastoma multiforme: advances in treatment and promising drug candidates. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2006, *6*, 1593-1607.
31. Schuuring, J., Bussink, J., Bernsen, H.J., Peeters, W., van Der Kogel, A.J., Irradiation combined with SU5416: microvascular changes and growth delay in a human xenograft glioblastoma tumor line. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2005, *61*, 529-534.
32. Stupp, R., Mason, W.P., van der Bent, M.J., Weller, M., et al., European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005, *352*, 987-996.
33. TYuan, H., Gaber, M.W., Boyd, K., Wilson, C.M., et al., TEffects of fractionated radiation on the brain vasculature in a murine model: blood-brain barrier permeability, astrocyte proliferation, and ultrastructural changes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2006, *66*, 860-866.
34. TDemeule, M., Michaud-Levesque, J., Annabi, B., Gingras, D., et al., TGreen tea catechins as novel antitumor and antiangiogenic compounds. *Curr Med Chem Anticancer Agents.* 2002, *2*, 441-463.
35. TLopez de Silanes I, Fan J, Galban CJ, Spencer RG, Becker KG, Gorospe MT (2004) Global analysis of HuR-regulated gene expression in colon cancer systems of reducing complexity. *Gene Expr* 12:49-59
36. TLevy NS, Chung S, Furneaux H, Levy APT (1998) Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR. *J Biol Chem* 273:6417-6423

37. TSheflin LG, Zou AP, Spaulding SWT (2004) Androgens regulate the binding of endogenous HuR to the AU-rich 3'UTRs of HIF-1alpha and EGF mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 322:644-651
38. TMyzak, M.C., Dashwood, R.H.T, Histone deacetylases as targets for dietary cancer preventive agents: lessons learned with butyrate, diallyl disulfide, and sulforaphane. *Curr Drug Targets*. 2006, 7, 443-452.
39. TShin, Y., Yoon, S.H., Choe, E.Y., Cho, S.H., et al., PMA-induced up-regulation of MMP-9 is regulated by a PKCalpha-NF-kappaB cascade in human lung epithelial cells. *Exp Mol Med*. 2007, 39, 97-105.
40. TRose, P., Huang, Q., Ong, C.N., Whiteman, M.T Broccoli and watercress suppress matrix metalloproteinase-9 activity and invasiveness of human MDA-MB-231 breast cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005, 209, 105-113.
41. TAsakage, M., Tsuno, N.H., Kitayama, J., Tsuchiya, T., et al., Sulforaphane induces inhibition of human umbilical vein endothelial cells proliferation by apoptosis. *Angiogenesis*. 2006, 9, 83-91.
42. TERber, R., Thurnher, A., Katsen, A.D., Groth, G., et al., Combined inhibition of VEGF and PDGF signaling enforces tumor vessel regression by interfering with pericyte-mediated endothelial cell survival mechanisms. *FASEB J*. 2004, 18, 338-340.
43. TAnnabi, B., Thibeault, S., Lee, Y.T., Bousquet-Gagnon, N., et al., Matrix metalloproteinase regulation of sphingosine-1-phosphate-induced angiogenic properties of bone marrow stromal cells. *Exp. Hematol*. 2003, 31, 640-649.
44. TLanthier, J., Desrosiers, R.R.T Regulation of protein L-isoaspartyl methyltransferase by cell-matrix interactions: involvement of integrin alphavbeta3, PI 3-kinase, and the proteasome. *Biochem. Cell. Biol*. 2006, 84, 684-694.

Fig.1

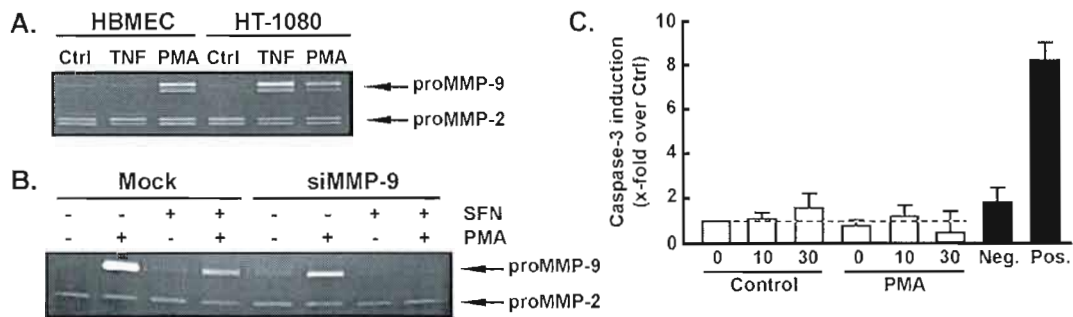


Fig.1 : MMP-9 secretion is selectively induced by PMA and inhibited by sulforaphane. HBMEC and HT-1080 fibrosarcoma cell lines were cultured as described in the Methods section. (A) Cells were then serum-starved in the presence or absence of 1 ng/ml TNF or 1 μ M PMA for 18 hrs. Conditioned media was then harvested and gelatin zymography performed in order to detect proMMP-9 and proMMP-2 hydrolytic activity. (B) In order to downregulate MMP-9 gene expression, control HBMEC (Mock) or HBMEC were transfected with either a mismatched or a specific siRNA (siMMP-9) as described in the Methods section. Cells were then serum-starved in the presence of 1 μ M PMA, 10 μ M SFN, or a combination of both for 18 hrs. Conditioned media was harvested and gelatin zymography performed in order to detect proMMP-9 and proMMP-2 hydrolytic activity. (C) Caspase-3 activity was measured as described in the Methods section in order to evaluate the potential cytotoxic effects of SFN. Caspase-3 activity upon treatment with 10 and 30 μ M SFN is shown for control and PMA-treated cells. A negative (Neg.) and a positive (Pos.) internal control for the assay were provided and consisted of marrow stromal cell lysates treated or not with the proapoptotic cytoskeleton disrupting agent Concanavalin-A [43].

Fig.2

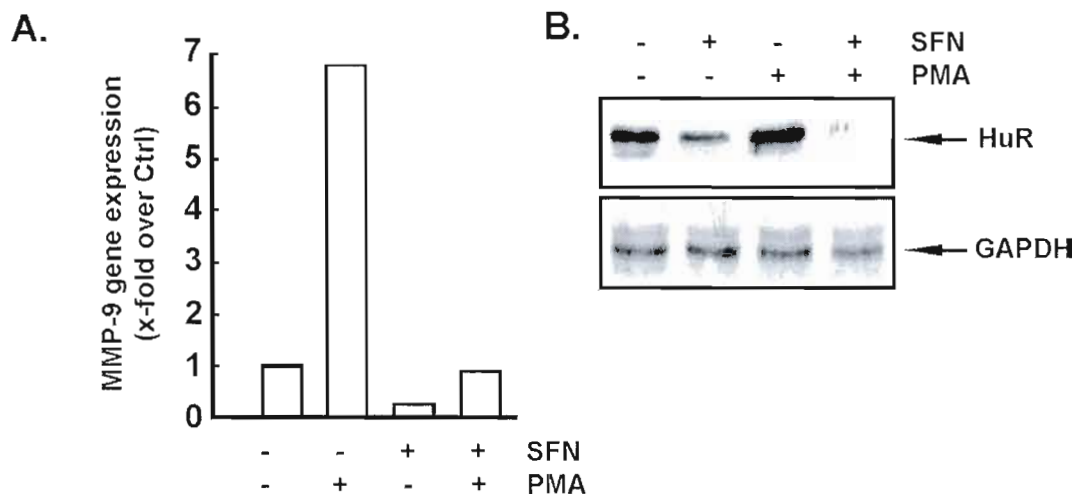


Fig.2 : **Reduction of MMP-9 transcripts by sulforaphane correlates with an effect on HuR protein expression.** (A) in order to confirm the zymography data obtained in Fig.1 for the MMP-9 gelatinolytic activity, HBMEC were cultured in the presence of 10 μ M SFN, 1 μ M PMA, or a combination of both, total RNA isolated and MMP-9 gene expression assessed by qRT-PCR as described in the Methods section (A). In parallel experiments, the cytosolic fraction of these same cells were isolated as described in [44], and HuR protein expression assessed by Western blotting (B). GAPDH expression was used as an internal house keeping gene control.

Fig.3

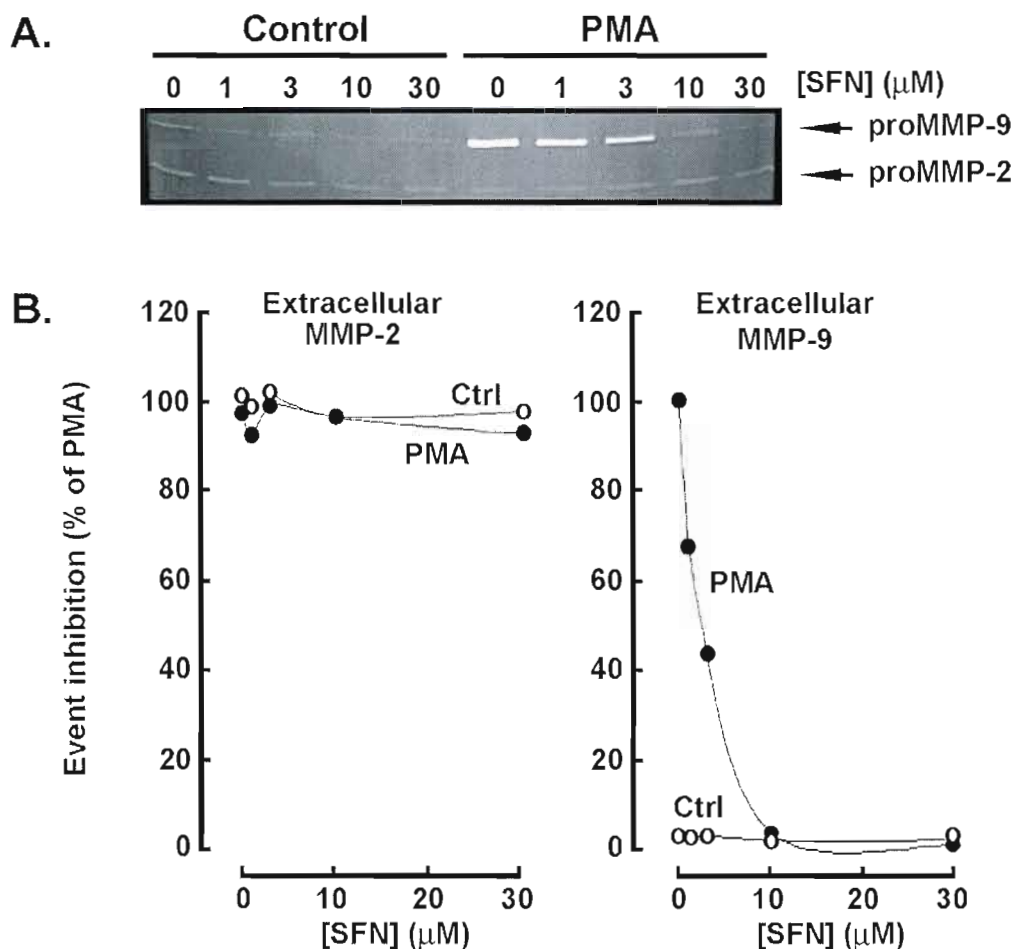


Fig.3 : **Sulforaphane specifically antagonizes PMA-induced proMMP-9 secretion in HBMEC.** HBMEC were serum-starved in the presence of increasing concentrations of sulforaphane (SFN) in combination with (or lacking) 1 μM PMA for 18 hrs. (A) Conditioned media was then harvested and gelatin zymography performed in order to detect proMMP-9 and proMMP-2 hydrolytic activity as described in the Methods section. (B) Scanning densitometry was used to quantify the extent of either proMMP-2 gelatin hydrolysis (left panel), or proMMP-9 gelatin hydrolysis (right panel). Data shown are representative from three independent experiments.

Fig.4

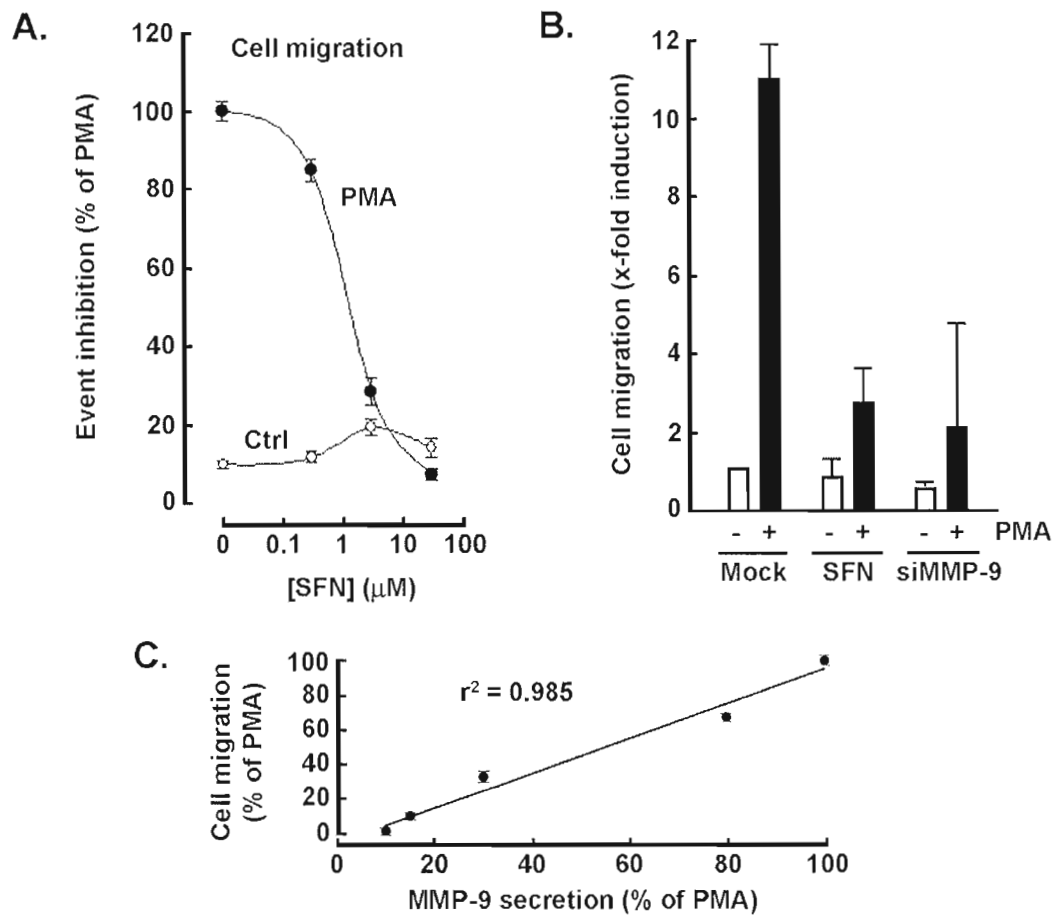


Fig.4: **Sulforaphane specifically antagonizes PMA-induced HBMEC migration.** (A) HBMEC migration was assessed in modified Boyden chambers using control (open circles) and PMA-treated cells (closed circles). Both were concomitantly treated with various SFN concentrations. At the end of the treatment, cells were harvested and $10\text{P}^{6\text{P}}$ cells seeded on top of gelatin-coated filters. Migration proceeded for 6 hrs. (B) Untransfected (Mock) cells were treated with or without $10\ \mu\text{M}$ SFN, $1\ \mu\text{M}$ PMA, or a combination of both for 16 hrs. HBMEC migration was then compared to that of cells transfected with a specific MMP-9 siRNA. (C) The effects of different concentrations of SFN upon PMA-induced cell migration and PMA-induced MMP-9 secretion were plotted and linear regression curve calculated.

Fig.5

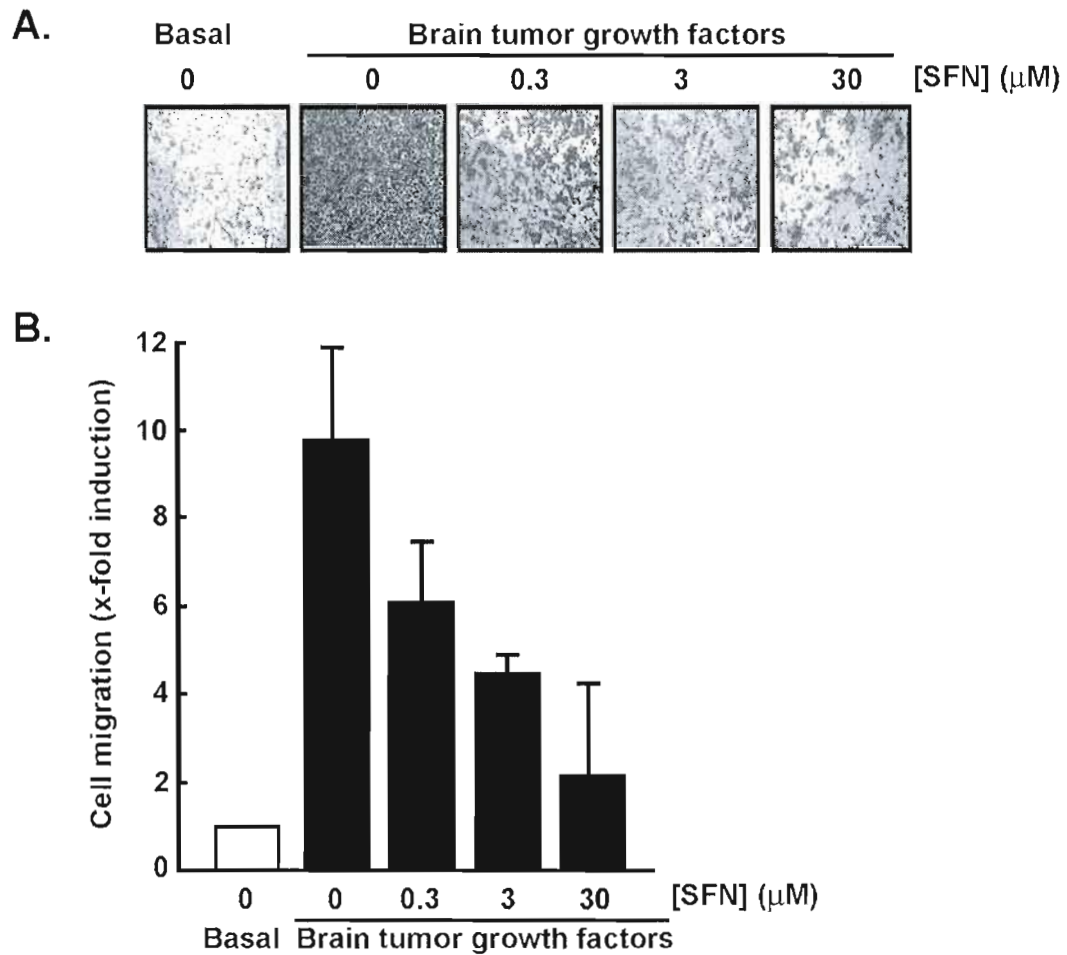


Fig.6 : Sulforaphane inhibits HBMEC migration in response to brain tumor-derived growth factors. (A) HBMEC migration was assessed in response to brain tumor-derived growth factors conditioned media, isolated from serum-starved U-87 glioma cells and that served as chemoattractant. In addition, various concentrations of SFN were added to the chemoattractant; cell migration was proceeded for 6 hrs and (B) was quantified.

Fig.6

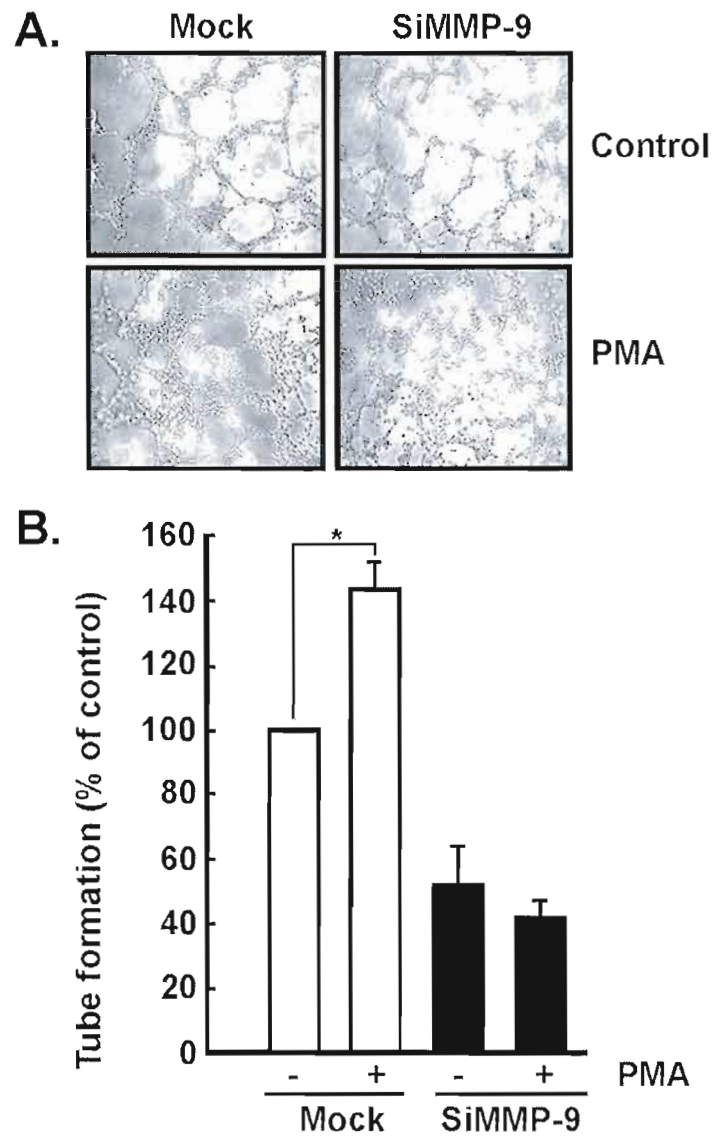


Fig.6 : **MMP-9 is involved in three-dimensional capillary-like structure formation by HBMEC.** (A) In order to assess *in vitro* tubulogenesis, untransfected (Mock) or siMMP-9-transfected (siMMP-9) HBMEC were treated with or without 1 μ M PMA and seeded on top of Matrigel for 16 hrs. (B) The extent of three-dimensional capillary-like structure formation was assessed as described in the Methods section for Mock (white bars) and siMMP-9-transfected (black bars) HBMEC. (*) depicts statistical significance ($P < 0.05$).

Fig.7

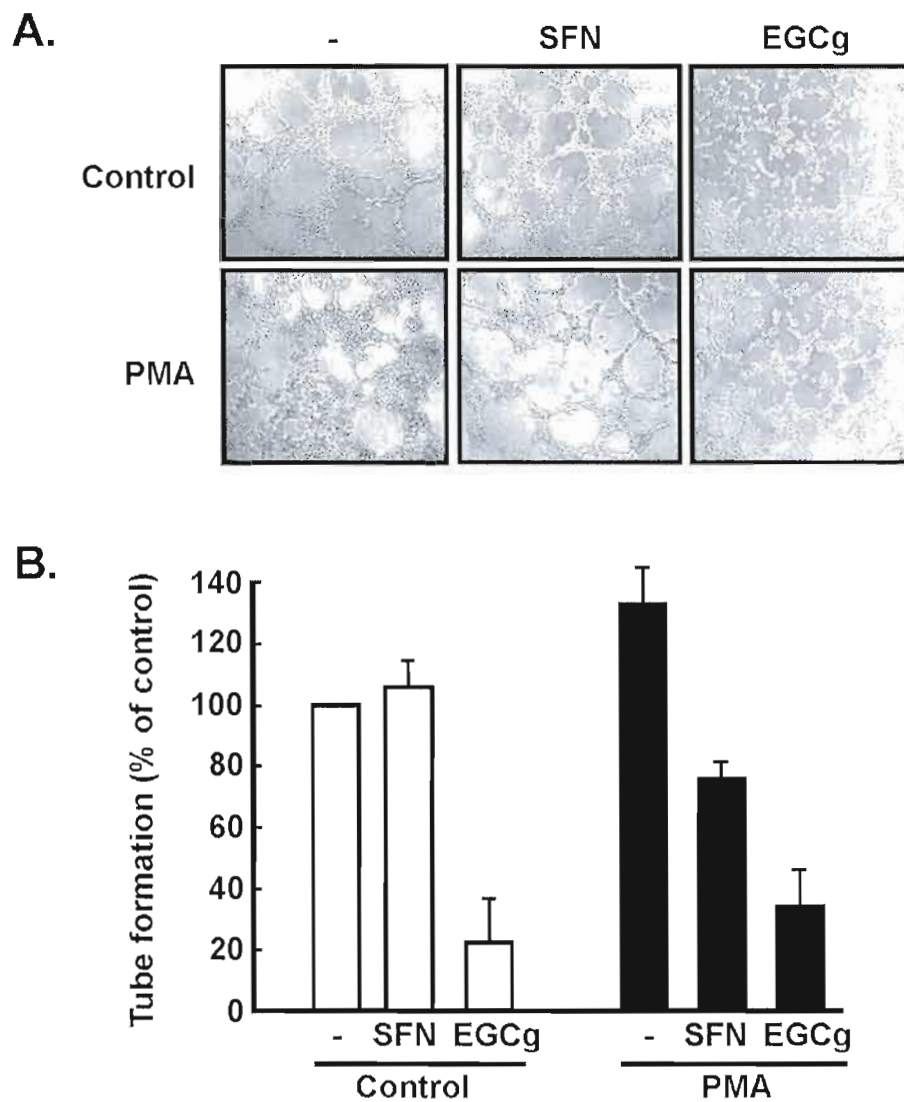


Fig.7 : Sulforaphane preferentially inhibits *in vitro* capillary-like structure formation in MMP-9 activated HBMEC. (A) The extent of capillary-like structure formation was assessed as described in the Methods section for control and PMA-treated HBMEC, in the presence of 10 μ M SFN or 10 μ M EGCg. (B) Tube formation was quantified in basal (white bars) and MMP-9-activated (black bars) HBMEC as described in the Methods section.

CHAPITRE IV

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Récemment, il a été montré qu'une sous-population de cellules CD133(+), isolées de tumeurs cérébrales, avait des propriétés apparentées aux cellules souches, telles que la capacité d'autorenouvellement, de division asymétrique et de différenciation en plusieurs types cellulaires (Neuzil *et al.*, 2007), mais aussi la quiescence cellulaire, la capacité de réparation de l'ADN et l'expression de plusieurs transporteurs ABC (Dean, Fojo et Bates, 2005). Hypothétiquement, ces cellules seraient impliquées dans l'initiation des tumeurs cérébrales, mais aussi dans leur croissance et leur récurrence (Liu *et al.*, 2006). Conséquemment, il est impératif d'accroître notre compréhension de la population de cellules souches associées aux tumeurs, et de développer de nouvelles approches cliniques afin d'augmenter l'efficacité des traitements actuels. Dans le premier volet de notre étude, nous avons identifié et évalué de nouvelles caractéristiques cellulaires et moléculaires impliquées dans la régulation du phénotype invasif associé à la formation de structures comparables aux neurosphères formées par les CSC CD133(+). En utilisant la technologie de l'ARN interférent, nous avons mis en évidence que MMP-9 et MT1-MMP, deux MMP importantes pour l'invasion cellulaire, les métastases et la résistance à la radiation (Wild-Bode *et al.*, 2001), avaient un rôle crucial dans la formation de structures apparentées aux neurosphères CD133(+) par les médulloblastomes DAOY.

Il est maintenant admis que l'implantation d'aussi peu que 100 cellules CD133(+) isolées de tumeurs cérébrales permet le développement de la tumeur d'origine dans le cerveau de souris NOD-SCID immunosupprimées, alors que l'injection de 10^5 cellules de la fraction négative n'arrive pas à réinitier la tumeur (Singh *et al.*, 2004). Camphausen *et al.* (2005) ont suggéré que l'environnement de croissance *in vivo* pouvait moduler l'expression des gènes et ainsi influencer le phénotype expérimental des tumeurs. En effet, il a été montré que le profil génétique d'une lignée de gliomes diffère selon qu'elle soit cultivée *in situ*, sous-cutanée ou intracrânienne (Camphausen *et al.*, 2005). Dans notre étude, nous avons implanté des DAOY au niveau du flanc ou du cerveau des souris afin de connaître

l'effet de l'environnement d'implantation. Nos résultats montrent que seul l'environnement cérébral permet la croissance d'une tumeur (Article #1, Figure 1). L'homogénat de ces tumeurs cérébrales a permis de détecter par immunobuvardage la présence de CD133, corrélée à une augmentation du niveau de transcription de VEGF et bFGF, ce qui pourrait refléter la mise en branle du processus angiogénique, voire de cooption.

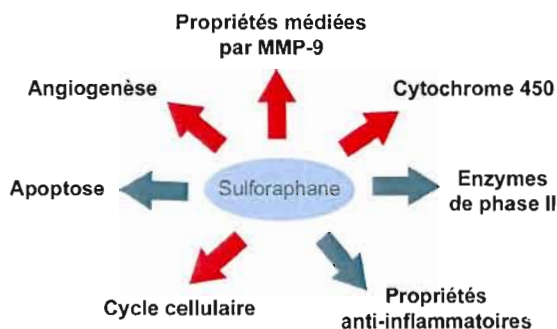
Les propriétés des CSC cérébrales ont récemment été étudiées via un modèle de neurosphères non-adhérentes et il a été montré que l'expression des marqueurs de surface pouvait varier entre les cellules formant les sphères non-adhérentes et les cellules cultivées en monocouche (Inagaki *et al.*, 2007). Il n'y avait cependant pas de données concernant l'implication des MMP dans la formation de structures apparentées aux neurosphères. Dans notre étude, nous avons montré que MT1-MMP joue un rôle dans la formation, par les médulloblastomes, de structures apparentées aux neurosphères. Notre étude n'a cependant pas permis de savoir quel segment spécifique de l'enzyme était impliqué, la portion extracellulaire de MT1-MMP comprenant le site actif, ou celle intracellulaire ayant la capacité d'induire des cascades de signalisation. De plus, nous avons mis en évidence que l'inhibition de MT1-MMP et de MMP-9 pouvait perturber le processus de formation de ces structures, en plus de diminuer les propriétés invasives des cellules (Article #1, Figure 3). Dans un contexte physiologique, les cellules souches sont situées dans un microenvironnement spécialisé, ou niche cellulaire, qui les maintient dans un état de quiescence (Heissig *et al.*, 2002). La niche, composée d'un groupe de cellules (p. ex. ostéoblastes), constitue un site de liaison physique pour les cellules souches, où les molécules d'adhésion sont responsables des interactions entre les cellules souches, la niche et la MEC. De plus, la niche génère des facteurs extrinsèques qui contrôlent le nombre de cellules souches, leur prolifération et leur devenir (Li et Neaves, 2006). Lors d'un stress physiologique, Heissig *et al.* (2002) ont montré que l'induction de MMP-9 dans les cellules de la moelle modifie ce microenvironnement en altérant les interactions avec les autres cellules ou la MEC, en clivant des molécules d'adhésion et en relâchant les cytokines séquestrées dans la MEC. La MMP-9 promeut ainsi la prolifération et la mobilisation des cellules souches. Ainsi, l'activation de la métalloprotéinase servirait de point de contrôle pour la reconstitution rapide d'un groupe de cellules progénitrices (Heissig *et al.*, 2002). Il

est intéressant de remarquer que dans notre étude MMP-9 et MT1-MMP sont impliquées dans la formation de neurosphères enrichies en CD133 et l'acquisition de leur phénotype invasif. Il est alors tentant d'émettre l'hypothèse que dans notre contexte de culture *in vitro*, ces MMP favorisent la formation de structures de type neurosphère en modifiant les interactions entre les cellules. Par conséquent, cibler MMP-9 et MT1-MMP dans les CSC pourrait contribuer à l'élaboration de nouvelles thérapies qui permettraient de détruire les cellules souches associées aux tumeurs cérébrales.

La transformation de l'endothélium vasculaire d'un tissu normal en un réseau hétérogène de capillaires est décrite par des modèles incluant la croissance tumorale, la cooption des vaisseaux, la néo-vascularisation, l'affaissement des vaisseaux et la mort cellulaire (Bartha et Rieger, 2006). Bien que plusieurs processus de vascularisation tumorale aient été décrits, peu d'informations étaient disponibles concernant leur interaction avec les molécules provenant de notre diète. Le second volet de l'étude a permis d'accroître notre compréhension des propriétés chimiopréventives du SFN en ciblant spécifiquement les CET cérébrales possiblement impliquées dans la cooption. En effet, nous avons mis en évidence une inhibition presque complète (> 90 %) de la migration des HBMEC activées par le PMA comparativement à un potentiel d'inhibition de la tubulogénèse moindre (~ 45 %) par le SFN.

Il a été montré que les CE composant les vaisseaux d'une tumeur sont différentes des cellules composant les vaisseaux normaux. Principalement, leur résistance aux agents de chimiothérapie (Iwahana *et al.*, 1998) fait qu'elles ne répondent pas aux thérapies antiangiogéniques (Jung *et al.*, 2000). Ces résultats orientent la recherche vers la découverte de nouvelles molécules, tel que le SFN, capables de cibler ces CET. En effet, notre étude montre que le SFN pourrait faire partie d'un groupe de molécules capables de cibler efficacement les propriétés migratoires des CET dépendantes de la MMP-9, indépendamment de leur capacité angiogénique. Cet effet s'additionne à ceux déjà documentés (voir le schéma ci-dessous), tel que la suppression des enzymes du cytochrome P450, l'induction de l'apoptose, l'arrêt du cycle cellulaire et l'activité anti-inflammatoire (Juge, Mithen et Traka, 2007). Sachant que le SFN agirait comme inhibiteur des histones

déacétylases, prévenant ainsi l'activation de NF- κ B (Myzak et Dashwood, 2006) et que le PMA initie l'activation de NF- κ B qui en retour induit la transcription de MMP-9 (Shin *et al.*, 2007), il est tentant de postuler que l'inhibition des histones déacétylases par le SFN puisse jouer un rôle dans l'inhibition de MMP-9 dans les HBMEC.



L'administration quotidienne de SFN (intraveineux 100 nmol/jour pour sept jours) à des souris Balb/c, portant un implant de Matrigel contenant du VEGF, montre que le SFN peut supprimer efficacement la progression angiogénique *in vivo* (Jackson, Singletary et Venema, 2007). La combinaison de ces résultats avec les nôtres suggère que le SFN peut cibler la population de CE *in vitro* et *in vivo*. De plus, Asakage *et al.* (2006) ont montré que dans une lignée de CE humaines de veine ombilicale (HUVEC), le SFN n'affecte pas la production de MMP, bien qu'il réussisse à inhiber la tubulogénèse sur Matrigel (Asakage *et al.*, 2006). Pour leur part, Rose *et al.* (2005) ont montré que le SFN inhibe l'activité de MMP-9 ainsi que le potentiel invasif d'une lignée de cellules cancéreuses mammaires, MDA-MB-231, tous deux induits par le PMA (Rose *et al.*, 2005). Notre étude montre que le SFN peut cibler spécifiquement le phénotype différencié des HBMEC et plus particulièrement les mécanismes impliquant MMP-9. L'ensemble de ces observations permet de postuler que le SFN peut affecter le niveau de MMP dans une tumeur, soit en ciblant le compartiment cellulaire tumoral ou les CET. Le SFN pourrait donc interférer avec toutes les étapes de néo-vascularisation en ciblant les mécanismes d'angiogenèse comme la cooption dans des tissus où les CE prolifèrent, migrent et forment des tubules. Ainsi, les résultats obtenus dans notre étude suggèrent que les molécules présentes dans notre régime,

comme le SFN, pourraient cibler les CET cérébrales composant la masse tumorale et impliquées dans la cooption. Des études *in vivo* seront nécessaires pour le démontrer.

Les résultats décrits précédemment ont suscité plusieurs questions qui pourront être le point de départ pour de futurs projets de recherche entrepris au sein de mon laboratoire d'accueil. D'abord, il serait intéressant de savoir quelle portion de MT1-MMP régule la signalisation menant à la formation de neurosphères à partir des médulloblastomes. Il s'agirait de comparer les structures obtenues suite à la transfection de la forme native de MT1-MMP, avec celles obtenues suite à la transfection d'un mutant tronqué de sa portion cytoplasmique. Ainsi, sachant que les CSC sont généralement résistantes aux agents de chimiothérapie, des traitements ciblant les MMP pourraient constituer une avenue envisageable. Des résultats préliminaires dans une lignée de fibrosarcomes montrent une augmentation de l'expression de certains LRP par le SFN, corrélée avec une diminution de la quantité de MMP-9 extracellulaire. Si le SFN pouvait augmenter les LRP à la surface des DAOY, la formation de structures comparables aux neurosphères et le phénotype invasif pourraient être affectés de la même façon que lors de l'utilisation de l'ARN interférant contre MMP-9. D'un autre côté, bien que le SFN semble prometteur pour cibler les propriétés des HBMEC médiées par la MMP-9, il serait intéressant de savoir si d'autres molécules dérivées de notre diète ont des effets similaires. De plus, sachant que l'activité de la MMP-9 dépend du ratio TIMP : MMP, l'ajout d'une forme recombinante de TIMP-1 pourrait avoir des effets similaires à ceux obtenus par le traitement au SFN et constituer une avenue thérapeutique envisageable. Cependant, bien que les résultats *in vitro* contribuent à accroître nos connaissances sur les propriétés anticancéreuses de composés naturels, il n'est pas dit qu'une telle molécule réussirait seule, dans un contexte physiologique, à atteindre le site tumoral. Il a cependant été rapporté que certains membres de la famille des *Brassica* peuvent atteindre le cerveau et y prévenir la progression tumorale (Gingras *et al.*, 2004) en passant vraisemblablement la BHE. La perméabilité accrue des vaisseaux sanguins composants la tumeur pourrait contribuer à livrer le SFN au cœur de la tumeur. En ce sens, des molécules de SFN radiomarquées permettraient de vérifier si 1) le SFN arrive effectivement à passer la BHE et 2) si le passage se fait préférentiellement au site de la tumeur.

CHAPITRE V

CONCLUSION

Nos travaux ont permis de montrer que dans un contexte expérimental de tumeur cérébrale, la MMP-9 semble être d'une importance capitale. En effet, elle aurait un rôle dans la formation et le caractère invasif des structures apparentées aux neurosphères CD133(+) obtenues à partir des cellules DAOY, en plus d'être fortement impliquée dans le potentiel migratoire de notre modèle de CET. De plus, il n'est pas exclu que cette MMP soit impliquée, *in vivo*, dans la formation de la « niche de CSC » favorable à la prolifération des cellules initiatrices de tumeurs, et causant ainsi la réapparition de tumeurs suite à des traitements de chimiothérapie et/ou radiothérapie. D'un autre côté, nous avons montré que le SFN arrive à inhiber presque complètement les fonctions des HBMEC médiées par MMP-9 et induites par un carcinogène, en l'occurrence le PMA. Ainsi, ce composé phytochimique pourrait possiblement interférer avec le processus de cooption vasculaire impliquée dans les premiers stades de développement de tumeurs cérébrales.

En somme, MMP-9 semble constituer une cible de choix pour le traitement des cancers cérébraux, que ce soit au niveau du compartiment tumoral ou vasculaire. De plus, nous pensons que plusieurs molécules dérivées de notre alimentation ont des propriétés anticancéreuses, constituant ainsi une arme accessible pour contrer le cancer.

BIBLIOGRAPHIE

- Aguado, T., *et al.* 2007. «Cannabinoids induce glioma stem-like cell differentiation and inhibit gliomagenesis». *J Biol Chem.* vol. 282, no 9, p. 6854-62.
- Al-Hajj, M., *et al.* 2003. «Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells». *Proc Natl Acad Sci U S A.* vol. 100, no 7, p. 3983-8.
- Alessandri, G., *et al.* 1998. «Isolation and characterization of human tumor-derived capillary endothelial cells: role of oncofetal fibronectin». *Lab Invest.* vol. 78, no 1, p. 127-8.
- Annabi, B., *et al.* 2007. «Inhibition of HuR and MMP-9 expression in macrophage-differentiated HL-60 myeloid leukemia cells by green tea polyphenol EGCg». *Leuk Res.* vol. 31, no 9, p. 1277-84.
- Annabi, B., *et al.* 2001. «Localization of membrane-type 1 matrix metalloproteinase in caveolae membrane domains». *Biochem J.* vol. 353, no Pt 3, p. 547-53.
- Asakage, M., *et al.* 2006. «Sulforaphane induces inhibition of human umbilical vein endothelial cells proliferation by apoptosis». *Angiogenesis.* vol. 9, no 2, p. 83-91.
- Auguste, P., *et al.* 2005. «Molecular mechanisms of tumor vascularization». *Crit Rev Oncol Hematol.* vol. 54, no 1, p. 53-61.
- Bannikov, G. A., *et al.* 2002. «Substrate binding of gelatinase B induces its enzymatic activity in the presence of intact propeptide». *J Biol Chem.* vol. 277, no 18, p. 16022-7.
- Barreau, C., L. Paillard et H. B. Osborne. 2005. «AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles?». *Nucleic Acids Res.* vol. 33, no 22, p. 7138-50.
- Bartha, K., et H. Rieger. 2006. «Vascular network remodeling via vessel cooption, regression and growth in tumors». *J Theor Biol.* vol. 241, no 4, p. 903-18.
- Béliveau, Richard, et Denis Gingras. 2005. *Les aliments contre le cancer.* Outremont.
- Bertl, E., H. Bartsch et C. Gerhauser. 2006. «Inhibition of angiogenesis and endothelial cell functions are novel sulforaphane-mediated mechanisms in chemoprevention». *Mol Cancer Ther.* vol. 5, no 3, p. 575-85.
- Bussolati, B., *et al.* 2003. «Altered angiogenesis and survival in human tumor-derived endothelial cells». *Faseb J.* vol. 17, no 9, p. 1159-61.

- Camphausen, K., *et al.* 2005. «Influence of in vivo growth on human glioma cell line gene expression: convergent profiles under orthotopic conditions». *Proc Natl Acad Sci U S A.* vol. 102, no 23, p. 8287-92.
- Carmeliet, P. 2000. «Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis». *Nat Med.* vol. 6, no 4, p. 389-95.
- Chen, X., *et al.* 2005. «Increased plasma MMP9 in integrin α 1-null mice enhances lung metastasis of colon carcinoma cells». *Int J Cancer.* vol. 116, no 1, p. 52-61.
- Chirco, R., *et al.* 2006. «Novel functions of TIMPs in cell signaling». *Cancer Metastasis Rev.* vol. 25, no 1, p. 99-113.
- Choi, S., *et al.* 2007. «D,L-Sulforaphane-induced cell death in human prostate cancer cells is regulated by inhibitor of apoptosis family proteins and Apaf-1». *Carcinogenesis.* vol. 28, no 1, p. 151-62.
- Cobb, M. H., et E. J. Goldsmith. 1995. «How MAP kinases are regulated». *J Biol Chem.* vol. 270, no 25, p. 14843-6.
- Corbeil, D., *et al.* 2001. «Prominin: a story of cholesterol, plasma membrane protrusions and human pathology». *Traffic.* vol. 2, no 2, p. 82-91.
- Davidoff, A. M., *et al.* 2001. «Bone marrow-derived cells contribute to tumor neovasculature and, when modified to express an angiogenesis inhibitor, can restrict tumor growth in mice». *Clin Cancer Res.* vol. 7, no 9, p. 2870-9.
- Dean, M., T. Fojo et S. Bates. 2005. «Tumour stem cells and drug resistance». *Nat Rev Cancer.* vol. 5, no 4, p. 275-84.
- Dean, M., Y. Hamon et G. Chimini. 2001. «The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily». *J Lipid Res.* vol. 42, no 7, p. 1007-17.
- Deryugina, E. I., et J. P. Quigley. 2006. «Matrix metalloproteinases and tumor metastasis». *Cancer Metastasis Rev.* vol. 25, no 1, p. 9-34.
- Diaz-Flores, L., R. Gutierrez et H. Varela. 1994. «Angiogenesis: an update». *Histol Histopathol.* vol. 9, no 4, p. 807-43.
- Eberhard, A., *et al.* 2000. «Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: implications for antiangiogenic tumor therapies». *Cancer Res.* vol. 60, no 5, p. 1388-93.

- Emonard, H., *et al.* 2005. «Regulation of matrix metalloproteinase (MMP) activity by the low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP). A new function for an "old friend"». *Biochimie*. vol. 87, no 3-4, p. 369-76.
- Fan, X. C., et J. A. Steitz. 1998. «Overexpression of HuR, a nuclear-cytoplasmic shuttling protein, increases the in vivo stability of ARE-containing mRNAs». *Embo J*. vol. 17, no 12, p. 3448-60.
- Feige, J. J., et S. Bailly. 2000. «[Molecular bases of angiogenesis]». *Bull Acad Natl Med*. vol. 184, no 3, p. 537-44; discussion 44-5.
- Fimognari, C., *et al.* 2002. «Cyclin D3 and p53 mediate sulforaphane-induced cell cycle delay and apoptosis in non-transformed human T lymphocytes». *Cell Mol Life Sci*. vol. 59, no 11, p. 2004-12.
- Folkman, J. 1972. «Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors». *Ann Surg*. vol. 175, no 3, p. 409-16.
- Folkman, J. 1995. «Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease». *Nat Med*. vol. 1, no 1, p. 27-31.
- Forget, M. A., R. R. Desrosiers et R. Beliveau. 1999. «Physiological roles of matrix metalloproteinases: implications for tumor growth and metastasis». *Can J Physiol Pharmacol*. vol. 77, no 7, p. 465-80.
- Foulds, L. 1954. «The experimental study of tumor progression: a review». *Cancer Res*. vol. 14, no 5, p. 327-39.
- Gamet-Payraastre, L., *et al.* 2000. «Sulforaphane, a naturally occurring isothiocyanate, induces cell cycle arrest and apoptosis in HT29 human colon cancer cells». *Cancer Res*. vol. 60, no 5, p. 1426-33.
- Genersch, E., *et al.* 2000. «Sustained ERK phosphorylation is necessary but not sufficient for MMP-9 regulation in endothelial cells: involvement of Ras-dependent and -independent pathways». *J Cell Sci*. vol. 113 Pt 23, p. 4319-30.
- Gingras, D., *et al.* 2004. «Induction of medulloblastoma cell apoptosis by sulforaphane, a dietary anticarcinogen from Brassica vegetables». *Cancer Lett*. vol. 203, no 1, p. 35-43.
- Gittoes, N. J. 2003. «Radiotherapy for non-functioning pituitary tumors--when and under what circumstances?». *Pituitary*. vol. 6, no 2, p. 103-8.
- Hahn-Dantona, E., *et al.* 2001. «The low density lipoprotein receptor-related protein modulates levels of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) by mediating its cellular catabolism». *J Biol Chem*. vol. 276, no 18, p. 15498-503.

- Hanahan, D., et R. A. Weinberg. 2000. «The hallmarks of cancer». *Cell*. vol. 100, no 1, p. 57-70.
- Hashizume, H., *et al.* 2000. «Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness». *Am J Pathol*. vol. 156, no 4, p. 1363-80.
- Heiss, E., *et al.* 2001. «Nuclear factor kappa B is a molecular target for sulforaphane-mediated anti-inflammatory mechanisms». *J Biol Chem*. vol. 276, no 34, p. 32008-15.
- Heissig, B., *et al.* 2002. «Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand». *Cell*. vol. 109, no 5, p. 625-37.
- Hemmati, H. D., *et al.* 2003. «Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors». *Proc Natl Acad Sci U S A*. vol. 100, no 25, p. 15178-83.
- Herz, J., et D. K. Strickland. 2001. «LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor». *J Clin Invest*. vol. 108, no 6, p. 779-84.
- Holash, J., *et al.* 1999. «Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF». *Science*. vol. 284, no 5422, p. 1994-8.
- Huhtala, P., *et al.* 1991. «Complete structure of the human gene for 92-kDa type IV collagenase. Divergent regulation of expression for the 92- and 72-kilodalton enzyme genes in HT-1080 cells». *J Biol Chem*. vol. 266, no 25, p. 16485-90.
- Inagaki, A., *et al.* 2007. «Long-term maintenance of brain tumor stem cell properties under at non-adherent and adherent culture conditions». *Biochem Biophys Res Commun*. vol. 361, no 3, p. 586-92.
- Iwahana, M., *et al.* 1998. «Drug resistance and P-glycoprotein expression in endothelial cells of newly formed capillaries induced by tumors». *Anticancer Res*. vol. 18, no 4C, p. 2977-80.
- Jackson, S. J., et K. W. Singletary. 2004. «Sulforaphane inhibits human MCF-7 mammary cancer cell mitotic progression and tubulin polymerization». *J Nutr*. vol. 134, no 9, p. 2229-36.
- Jackson, S. J., et K. W. Singletary. 2004. «Sulforaphane: a naturally occurring mammary carcinoma mitotic inhibitor, which disrupts tubulin polymerization». *Carcinogenesis*. vol. 25, no 2, p. 219-27.

- Jackson, S. J., K. W. Singletary et R. C. Venema. 2007. «Sulforaphane suppresses angiogenesis and disrupts endothelial mitotic progression and microtubule polymerization». *Vascul Pharmacol.* vol. 46, no 2, p. 77-84.
- Jadhav, U., et al. 2004. «Inhibition of matrix metalloproteinase-9 reduces in vitro invasion and angiogenesis in human microvascular endothelial cells». *Int J Oncol.* vol. 25, no 5, p. 1407-14.
- Jain, R. K., et al. 2007. «Angiogenesis in brain tumours». *Nat Rev Neurosci.* vol. 8, no 8, p. 610-22.
- Johansson, N., M. Ahonen et V. M. Kahari. 2000. «Matrix metalloproteinases in tumor invasion». *Cell Mol Life Sci.* vol. 57, no 1, p. 5-15.
- Juge, N., R. F. Mithen et M. Traka. 2007. «Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: a comprehensive review». *Cell Mol Life Sci.* vol. 64, no 9, p. 1105-27.
- Jung, Y. D., et al. 2000. «Role of the tumor microenvironment in mediating response to anti-angiogenic therapy». *Cancer Metastasis Rev.* vol. 19, no 1-2, p. 147-57.
- Kahari, V. M., et U. Saarialho-Kere. 1997. «Matrix metalloproteinases in skin». *Exp Dermatol.* vol. 6, no 5, p. 199-213.
- Kalluri, R. 2003. «Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis». *Nat Rev Cancer.* vol. 3, no 6, p. 422-33.
- Karin, M., Z. Liu et E. Zandi. 1997. «AP-1 function and regulation». *Curr Opin Cell Biol.* vol. 9, no 2, p. 240-6.
- Karmakar, S., et al. 2006. «Activation of multiple molecular mechanisms for apoptosis in human malignant glioblastoma T98G and U87MG cells treated with sulforaphane». *Neuroscience.* vol. 141, no 3, p. 1265-80.
- Klein, G., et al. 2004. «The possible role of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in cancer, e.g. acute leukemia». *Crit Rev Oncol Hematol.* vol. 50, no 2, p. 87-100.
- Kreutzer, J., et R. Fahlbusch. 2004. «Diagnosis and treatment of pituitary tumors». *Curr Opin Neurol.* vol. 17, no 6, p. 693-703.
- Lakka, S. S., et al. 2005. «Specific interference of urokinase-type plasminogen activator receptor and matrix metalloproteinase-9 gene expression induced by double-stranded RNA results in decreased invasion, tumor growth, and angiogenesis in gliomas». *J Biol Chem.* vol. 280, no 23, p. 21882-92.

- Lapidot, T., *et al.* 1994. «A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice». *Nature*. vol. 367, no 6464, p. 645-8.
- Lechat, Phillipe (2007). *Pharmacologie*. Paris
- Lee, J. T., et M. Herlyn. 2007. «Old disease, new culprit: tumor stem cells in cancer». *J Cell Physiol*. vol. 213, no 3, p. 603-9.
- Levy, A. P. 1998. «Hypoxic regulation of VEGF mRNA stability by RNA-binding proteins». *Trends Cardiovasc Med*. vol. 8, no 6, p. 246-50.
- Li, L., et W. B. Neaves. 2006. «Normal stem cells and cancer stem cells: the niche matters». *Cancer Res*. vol. 66, no 9, p. 4553-7.
- Li, M. C., *et al.* 2006. «[Isolation and characterization of brain tumor stem cells in human medulloblastoma]». *Ai Zheng*. vol. 25, no 2, p. 241-6.
- Liu, G., *et al.* 2006. «Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma». *Mol Cancer*. vol. 5, p. 67.
- Mancini, A., et J. A. Di Battista. 2006. «Transcriptional regulation of matrix metalloprotease gene expression in health and disease». *Front Biosci*. vol. 11, p. 423-46.
- Mandal, M., *et al.* 2003. «Clinical implications of matrix metalloproteinases». *Mol Cell Biochem*. vol. 252, no 1-2, p. 305-29.
- Maniotis, A. J., *et al.* 1999. «Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry». *Am J Pathol*. vol. 155, no 3, p. 739-52.
- Massova, I., *et al.* 1998. «Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification». *Faseb J*. vol. 12, no 12, p. 1075-95.
- McLaughlin, N., *et al.* 2006. «Combined low dose ionizing radiation and green tea-derived epigallocatechin-3-gallate treatment induces human brain endothelial cells death». *J Neurooncol*. vol. 80, no 2, p. 111-21.
- McQuibban, G. A., *et al.* 2000. «Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3». *Science*. vol. 289, no 5482, p. 1202-6.
- Michor, F., *et al.* 2005. «Dynamics of chronic myeloid leukaemia». *Nature*. vol. 435, no 7046, p. 1267-70.

- Miraglia, S., *et al.* 1997. «A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning». *Blood*. vol. 90, no 12, p. 5013-21.
- Myzak, M. C., et R. H. Dashwood. 2006. «Histone deacetylases as targets for dietary cancer preventive agents: lessons learned with butyrate, diallyl disulfide, and sulforaphane». *Curr Drug Targets*. vol. 7, no 4, p. 443-52.
- Myzak, M. C., *et al.* 2004. «A novel mechanism of chemoprotection by sulforaphane: inhibition of histone deacetylase». *Cancer Res*. vol. 64, no 16, p. 5767-74.
- Nagase, H., R. Visse et G. Murphy. 2006. «Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs». *Cardiovasc Res*. vol. 69, no 3, p. 562-73.
- Naldini, A., et F. Carraro. 2005. «Role of inflammatory mediators in angiogenesis». *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. vol. 4, no 1, p. 3-8.
- Neuzil, J., *et al.* 2007. «Tumour-initiating cells vs. cancer 'stem' cells and CD133: what's in the name?». *Biochem Biophys Res Commun*. vol. 355, no 4, p. 855-9.
- Nowell, P. C. 1976. «The clonal evolution of tumor cell populations». *Science*. vol. 194, no 4260, p. 23-8.
- Obrenovitch, A., et M. Monsigny. 1986. «[Tumor angiogenesis]». *Pathol Biol (Paris)*. vol. 34, no 3, p. 189-201.
- Ozen, O., *et al.* 2004. «Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in medulloblastomas and their prognostic relevance». *Clin Cancer Res*. vol. 10, no 14, p. 4746-53.
- Patan, S., L. L. Munn et R. K. Jain. 1996. «Intussusceptive microvascular growth in a human colon adenocarcinoma xenograft: a novel mechanism of tumor angiogenesis». *Microvasc Res*. vol. 51, no 2, p. 260-72.
- Pavlaki, M., *et al.* 2002. «A conserved sequence within the propeptide domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase is critical for function as an intramolecular chaperone». *J Biol Chem*. vol. 277, no 4, p. 2740-9.
- Rafii, S. 2000. «Circulating endothelial precursors: mystery, reality, and promise». *J Clin Invest*. vol. 105, no 1, p. 17-9.
- Rafii, S., *et al.* 2002. «Contribution of marrow-derived progenitors to vascular and cardiac regeneration». *Semin Cell Dev Biol*. vol. 13, no 1, p. 61-7.
- Richardson, G. D., *et al.* 2004. «CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells». *J Cell Sci*. vol. 117, no Pt 16, p. 3539-45.

- Rose, P., *et al.* 2005. «Broccoli and watercress suppress matrix metalloproteinase-9 activity and invasiveness of human MDA-MB-231 breast cancer cells». *Toxicol Appl Pharmacol.* vol. 209, no 2, p. 105-13.
- Rüegg, C (2002). Une nouvelle cible pour la thérapie anticancéreuse: la vascularisation tumorale. Nouveaux paradigmes et questions non résolues. Forum Med Suisse. 14
- Rundhaug, J. E. 2005. «Matrix metalloproteinases and angiogenesis». *J Cell Mol Med.* vol. 9, no 2, p. 267-85.
- Sato, T., *et al.* 2002. «Inhibition of activator protein-1 binding activity and phosphatidylinositol 3-kinase pathway by nobiletin, a polymethoxy flavonoid, results in augmentation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 production and suppression of production of matrix metalloproteinases-1 and -9 in human fibrosarcoma HT-1080 cells». *Cancer Res.* vol. 62, no 4, p. 1025-9.
- Sato, T. N., *et al.* 1995. «Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation». *Nature.* vol. 376, no 6535, p. 70-4.
- Shigemori, Y., *et al.* 2006. «Matrix metalloproteinase-9 is associated with blood-brain barrier opening and brain edema formation after cortical contusion in rats». *Acta Neurochir Suppl.* vol. 96, p. 130-3.
- Shin, Y., *et al.* 2007. «PMA-induced up-regulation of MMP-9 is regulated by a PKC α -NF- κ B cascade in human lung epithelial cells». *Exp Mol Med.* vol. 39, no 1, p. 97-105.
- Shmelkov, S. V., *et al.* 2005. «AC133/CD133/Prominin-1». *Int J Biochem Cell Biol.* vol. 37, no 4, p. 715-9.
- Sindelar, W. F., *et al.* T. J. Kinsella. 2003. «Normal tissue tolerance to intraoperative radiotherapy». *Surg Oncol Clin N Am.* vol. 12, no 4, p. 925-42.
- Singh, S. K., *et al.* 2004. «Identification of human brain tumour initiating cells». *Nature.* vol. 432, no 7015, p. 396-401.
- Torrente, Y., *et al.* 2004. «Human circulating AC133(+) stem cells restore dystrophin expression and ameliorate function in dystrophic skeletal muscle». *J Clin Invest.* vol. 114, no 2, p. 182-95.
- Van den Steen, P. E., *et al.* 2002. «Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)». *Crit Rev Biochem Mol Biol.* vol. 37, no 6, p. 375-536.

- Vibhakar, R., *et al.* 2007. «Dickkopf-1 is an epigenetically silenced candidate tumor suppressor gene in medulloblastoma». *Neuro Oncol.* vol. 9, no 2, p. 135-44.
- Wang, D., J. C. Anderson et C. L. Gladson. 2005. «The role of the extracellular matrix in angiogenesis in malignant glioma tumors». *Brain Pathol.* vol. 15, no 4, p. 318-26.
- Weinberg, Robert A. 2007. *The biology of cancer*. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group.
- Weinstein, I. B. 1987. «Growth factors, oncogenes, and multistage carcinogenesis». *J Cell Biochem.* vol. 33, no 3, p. 213-24.
- Weinstein, I. B. 1988. «The origins of human cancer: molecular mechanisms of carcinogenesis and their implications for cancer prevention and treatment--twenty-seventh G.H.A. Clowes memorial award lecture». *Cancer Res.* vol. 48, no 15, p. 4135-43.
- Wild-Bode, C., *et al.* 2001. «Sublethal irradiation promotes migration and invasiveness of glioma cells: implications for radiotherapy of human glioblastoma». *Cancer Res.* vol. 61, no 6, p. 2744-50.
- Yuan, X., *et al.* 2004. «Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme». *Oncogene.* vol. 23, no 58, p. 9392-400.