

MISE AU POINT

Ciblage pharmacologique de la MT1-MMP dans les cellules tumorales cérébrales par l'actinonine, un inhibiteur de l'aminopeptidase N/CD13

—A. Sina¹, S. Lord-Dufour¹, R. Roy², B. Annabi^{1,*}

¹ Centre de recherche BioMED et ² Centre de recherche Pharmaqam, Département de Chimie, Université du Québec à Montréal, Québec, Canada

E-mail : annabi.borhane@uqam.ca

Résumé

L'actinonine, un inhibiteur de l'aminopeptidase N/CD13, possède également la capacité d'inhiber l'activité de certaines métalloprotéinases matricielles (MMP) solubles. Les effets de l'actinonine sur les MMP membranaires, telle la MT1-MMP, demeurent par contre peu connus. La MT1-MMP étant associée à une résistance à la chimiothérapie et à la radiothérapie au cours du développement de tumeurs cérébrales, nous avons donc évalué son inhibition fonctionnelle par l'actinonine dans des cellules de glioblastome U87. Nous démontrons que l'actinonine inhibe l'activation de la proMMP-2 induite par la lectine concanavaleine-A (ConA), tandis qu'elle est sans effet sur l'expression génique de MT1-MMP induite par la ConA. De plus, les effets post-transcriptionnels de l'actinonine pourraient s'exercer par le biais d'un autre régulateur membranaire d'activité protéasique de RECK (Reversion-inducing Cysteine-rich Protein with Kazal Motifs). L'actinonine exerce également un effet antagoniste sur une forme recombinante fonctionnelle de la MT1-MMP, dont l'expression constitutive entraîne l'activation de la proMMP-2. Ainsi, nous apportons des preuves moléculaires supportant une nouvelle fonction inhibitrice de l'actinonine dans le ciblage direct de l'activation de la proMMP-2 par la MT1-MMP, une étape clé dans l'angiogénèse tumorale et dans l'acquisition du caractère infiltrant des tumeurs cérébrales.

Mots clés : Actinonine, MT1-MMP, inhibiteur de l'aminopeptidase N/CD13, glioblastome, concanavaleine A

Pharmacological targeting of MT1-MMP by actinonin in brain tumours

Abstract

Recent profiling has identified the aminopeptidase N/CD13 inhibitor actinonin as a selective soluble secreted matrix metalloproteinase (MMP) inhibitor. Given that actinonin's effects against membrane-bound MMPs remain unknown and that MT1-MMP has been linked to chemo- and radio-therapy resistance in brain tumour development, we therefore assessed MT1-MMP functional inhibition by actinonin in U87 glioblastoma cells. We show that actinonin inhibits concanavalin-A (ConA)-induced proMMP-2 activation, while it does not inhibit ConA-induced MT1-MMP gene expression suggesting post-transcriptional effects of the drug may possibly be mediated through the membrane-anchored protease regulator RECK. Specific gene silencing of MT1-

MMP with siRNA abrogated the ability of ConA to activate proMMP-2. Functional recombinant MT1-MMP, whose constitutive expression led to proMMP-2 activation, was also efficiently antagonized by actinonin. We provide evidence for actinonin's new therapeutic application in the direct targeting of MT1-MMP-mediated proMMP-2 activation, an essential step in both brain tumour infiltration and in brain tumour-associated angiogenesis.

Keywords: Actinonin, MT1-MMP, aminopeptidase N/CD13 inhibitor, glioblastoma, concanavalin A

INTRODUCTION

On attribue à l'actinonine (Figure 1A) un certain nombre d'effets antiprolifératifs sur des cellules tumorales humaines [1], ainsi que des activités inhibitrices, notamment envers la peptide déformylase et envers l'aminopeptidase N (APN)/CD13, une protéase membranaire [2-4]. Les niveaux d'expression élevés d'APN/CD13 caractérisant non seulement les lymphocytes T infiltrant les tumeurs dans les cancers du rein et du poumon [5, 6], mais ▷▷

LISTE DES ABRÉVIATIONS :

APN	Aminopeptidase N
HUVEC	Cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine
ConA	Concanavaleine-A
MEC	Matrice extracellulaire
MMP	Métalloprotéinase matricielle
MT1-MMP	Métalloprotéinase matricielle de type membranaire 1
RECK	Reversion-inducing Cysteine-rich Protein with Kazal Motifs

▷▷ aussi l'endothélium vasculaire tumoral [7], il est suggéré que l'APN/CD13 pourrait donc être une cible potentielle de l'actinonine. Bien que l'expression accrue des formes membranaires et/ou solubles de l'APN/CD13 ait été observée dans de nombreux cancers [8-11], l'actinonine inhibe, paradoxalement, aussi la croissance de lignées cellulaires lymphoïdes CD13 négatives, ce qui laisse penser que les effets de l'actinonine ne sont pas uniquement attribuables au ciblage de CD13 [12]. Enfin, l'inactivation du gène APN/CD13 dans des cellules endothéliales inhibe la tubulogénèse *in vitro*, suggérant que le ciblage d'APN/CD13 puisse modifier d'importants processus, tels que ceux qui se déroulent durant la morphogénèse de l'endothélium vasculaire et l'angiogénèse [13].

Hormis ces observations, il s'avère que d'autres protéases transmembranaires peuvent engendrer des effets similaires à ceux de l'APN/CD13 sur les mêmes processus critiques intervenant durant l'angiogénèse et le développement tumoral et potentiellement devenir, elles aussi, des cibles de l'actinonine. Parmi celles-ci, la métalloprotéinase matricielle de type membranaire 1 (MT1-MMP), est une protéine ancrée à la membrane plasmique et associée à la croissance tumorale et à l'angiogénèse. Incidemment, la MT1-MMP est exprimée dans des cellules tumorales malignes et dans des cellules endothéliales activées [14]. La MT1-MMP fait partie de la famille de protéases transmembranaires spécifiques intervenant dans la migration cellulaire, la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC) et la tubulogénèse des cellules endothéliales [15, 16]. Des études utilisant la technique d'interférence de l'ARN ont récemment révélé que la MT1-MMP régit également les processus de mobilisation et de localisation (homing) des cellules stromales mésenchymateuses, phénomène qui ne peut s'effectuer que par le franchissement des barrières de la MEC [17, 18], et qui peut possiblement contribuer au développement des tumeurs cérébrales [19]. Enfin, la démonstration selon laquelle la MT1-MMP peut fonctionner comme activateur de la proMMP-2 [20] a été confirmée dans divers tissus de souris invalidées pour le

gène MT1-MMP [21], et par l'inhibition de la MT1-MMP par des agents anticancéreux entravant la mobilisation des lymphocytes T diabétogènes dans le pancréas [22].

En raison de la capacité de la MT1-MMP à favoriser la migration cellulaire à travers des membranes basales reconstituées, autant au cours des processus métastatiques que dans l'angiogénèse tumorale, de nouvelles stratégies utilisant des immunoliposomes spécifiques contre la MT1-MMP [23] ou la technologie d'interférence de l'ARN, sont actuellement à l'étude [24]. La conception, l'utilisation et l'évaluation de ces approches se sont cependant avérées plus complexes que prévues. Récemment, nous avons caractérisé des constructions de glycodendrimères mannosylés qui pourraient servir à l'élaboration de stratégies anticancéreuses ciblant les protéines glycosylées à la surface de la membrane plasmique. Ces glycodendrimères se sont avérés efficaces en raison de leur capacité à cibler spécifiquement les fonctions de la MT1-MMP dans la survie cellulaire, la prolifération et la dégradation de la MEC [25]. Dans la présente étude, nous avons orienté nos efforts vers la caractérisation d'une molécule, l'actinonine, ayant des effets inhibiteurs anti-MT1-MMP et vers la mise en évidence de l'inhibition directe de la capacité de la MT1-MMP à activer la proMMP-2 dans des cellules hautement envahissantes de glioblastome U87.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1 Matériels

Le sodium dodécyl sulfate (SDS) et l'albumine bovine sérique (BSA) ont été achetés chez Sigma (Oakville, ON). Les milieux de culture cellulaire proviennent de Life Technologies (Burlington, ON). Les réactifs pour l'électrophorèse ont été achetés chez Bio-Rad (Mississauga, ON). Les réactifs pour la chemiluminescence (ECL) proviennent de chez Amersham Pharmacia Biotech (Baie d'Urfé, QC). Les réactifs pour le micro test de dosage des protéines utilisant l'acide bicinchonique (BCA) viennent de chez Pierce (Rockford, IL). Les anticorps polyclonaux dirigés contre la MT1-MMP proviennent de Chemicon (Temecula, CA).

2 Culture cellulaire, méthode de transfection et analyse de la survie cellulaire

La lignée cellulaire de glioblastome U87 provient de l'American Type Culture Collection (Manassas, VA) et a été cultivée dans du milieu minimum essentiel d'Eagle (MEM), contenant 10 % (v/v) de sérum bovin fœtal (FBS) (HyClone Laboratories, Logan, UT) et 2 mM de glutamine, à 37 °C, sous atmosphère humidifiée contenant 5 % de CO₂. Les cellules U87 ont subi une transfection transitoire avec une construction d'ADNc codant pour la séquence complète de la MT1-MMP fusionnée à la GFP [26], ou avec 20 nM de siRNA (voir ci-dessous) à l'aide de lipofectamine 2000 (Invitrogen, Burlington, ON). L'inactivation spécifique du gène codant pour la MT1-MMP a été évaluée en déterminant la capacité de la ConA à induire l'activation de la proMMP-2 par le biais de la MT1-MMP. On a utilisé comme témoins de transfection des cultures de cellules U87 transfectées avec des vecteurs d'expression de l'ADNc codant pour la GFP seule. La mort cellulaire a été quantifiée par la méthode de libération de la lactate déshydrogénase (LDH) selon le protocole du fabricant (Fisher Scientific, Nepean, ON).

3 Interférence de l'ARN

Les expériences d'interférence de l'ARN ont été réalisées à l'aide de lipofectamine 2000. Un court ARN interférant dirigé contre MT1-MMP (siMT1-MMP) et un siRNA mésapparié ont été synthétisés par EZBiolab Inc. (Westfield, IN) et hybridés pour former un duplex double brin. La séquence de siMT1-MMP utilisée dans cette étude est la suivante : 5'-CCAGAA GCUGAAGGUAGAAdTdT-3' (sens) et 5'-UUCUACCUUCAGCUUCUGGdTdT-3' (antisens) [27]. La diminution de l'expression de MT1-MMP, tel que déterminée par RT-PCR, était systématiquement supérieure à ~ 85 % (non montré). Les cellules U87 ont également subi une transfection transitoire avec 20 nM de siRNA dirigé contre RECK (Hs_RECK_5 HP siRNA, SI04146072; Hs_RECK_6 HP siRNA, SI04174282; Hs_RECK_7 HP siRNA, SI04195464; Hs_RECK_8 HP siRNA, SI04350318, QIAGEN, CA). L'inactivation spécifique du gène RECK a été évaluée

par RT-PCR quantitative, tel que décrit ci-dessous.

4 Zymographie sur gélatine

La technique de zymographie sur gélatine a été utilisée pour évaluer le degré d'activité des formes latentes proMMP-2) et matures de la MMP-2. Une aliquote (20 l) du milieu de culture a été soumise à un gel d'électrophorèse SDS-PAGE contenant 0,1 mg/ml de gélatine. Les gels sont ensuite incubés dans du Triton X-100 à 2,5 % puis rincés dans de l'H₂O distillée nanopure. Finalement, les gels sont incubés à 37 °C pendant 20 heures dans 20 mM de NaCl, 5 mM de CaCl₂, 0,02 % Brij-35, 50 mM de tampon Tris-HCl, pH 7,6, et colorés ensuite avec du bleu brillant de Coomassie R-250 à 0,1 %, puis décolorés dans une solution aqueuse d'acide acétique à 10 % et de méthanol à 30 %. L'activité gélatinolytique est mise en évidence par l'apparition de bandes non colorées sur un fond bleu.

5 Synthèse de l'ADNc et RT-PCR quantitative en temps réel

L'ARN total a été extrait des cellules U87 en utilisant le réactif TRIzol (Invitrogen). Pour synthétiser l'ADNc, 1 g d'ARN total a été soumis à une transcription inverse en utilisant la trousse de transcription inverse de l'ADNc de haute capacité (Applied Biosystems, Foster City, CA). L'ADNc a été conservé à -80 ° C en vue de la PCR. L'expression génique a été quantifiée par PCR quantitative en temps réel en utilisant le iQ SYBR Green Supermix (BIO-RAD, Hercules, CA). L'amplification de l'ADN a été réalisée dans un iCycler iQ5 (BIO-RAD, Hercules, CA) et la détection des produits de PCR a été mesurée par la liaison du colorant fluorescent SYBR Green I à l'ADN double brin. Les amorces spécifiques de MT1-MMP et RECK ont été dérivées des séquences humaines et fournies par QIAGEN (Valencia, CA). Les quantités relatives d'ARNm du gène cible ont été mesurées par rapport à celles de l'ARN ribosomique 18S utilisé comme témoin interne, selon la méthode du C_T. On a tracé le graphique d'amplification du signal de fluorescence vs le nombre de cycles. La différence (C_T) entre les valeurs moyennes de triplicatas d'échantillons du gène cible et celles de l'ARN ribosomique 18S a été calculée à l'aide du logiciel iQ5 Optical System, version 2.0 (BIO-RAD,

Hercules, CA) et la valeur quantifiée relative (VQR) a été exprimée sous la forme 2^{-ΔC_T}.

6 Techniques d'immunobuvardage

Des lysats ou des préparations de membranes plasmiques [28] provenant de cellules témoins ou traitées ont été séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) en présence de SDS. Après l'électrophorèse, les protéines ont été électrotransférées sur des membranes de difluorure de polyvinylidène, où elles ont été fixées pendant une heure à température ambiante en présence de 5 % de poudre de lait écrémé, dans une solution saline de Tris (150 mM de NaCl, 20 mM de

Tris-HCl, pH 7,5) contenant 0,3 % de Tween-20 (TBS-T). Les membranes ont ensuite été rincées dans une solution de TBS-T et incubées avec un anticorps primaire anti-MT1-MMP (dilution 1/1,000) dans une solution de TBS-T contenant 3 % d'albumine bovine sérique et 0,02 % de Na₂S₂O₃. Cette incubation a été suivie d'une autre incubation de une heure avec de la peroxydase de raifort couplée avec des anti-IgG de lapin (dilution 1/2,500) dans une solution de TBS-T contenant 5 % de poudre de lait écrémé. Le matériel immunoréactif a été visualisé par chemiluminescence (Amersham Biosciences, Baie d'Urfée, QC).

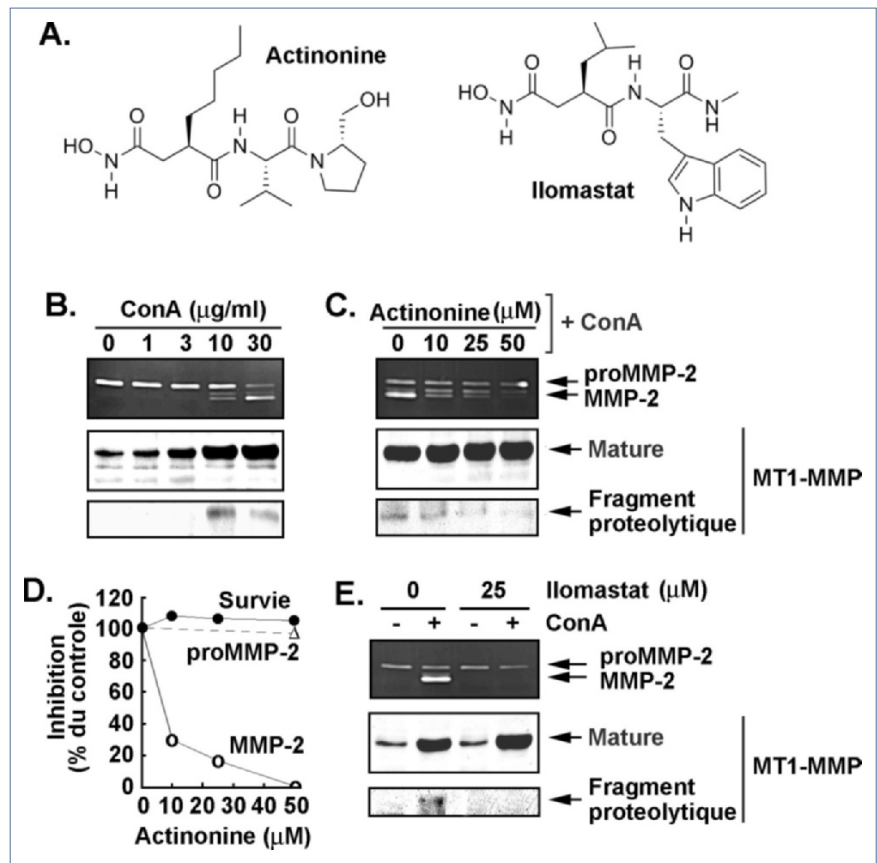


Figure 1 : L'actinonine inhibe la maturation protéolytique de la MT1-MMP et l'activation de la proMMP-2 induites par la concanavaleine-A. (A) Structures chimiques de l'actinonine et de l'ilomastat. Les cellules de gliome U87 carencées en sérum ont été cultivées selon la méthode décrite dans la section 2, en présence de (B) concentrations croissantes de concanavaleine-A (ConA), de (C) concentrations croissantes d'actinonine en présence de 30 µg/ml de ConA, ou de (E) 25 µM d'ilomastat en présence de 30 µg/ml de ConA. Le degré d'activation de la proMMP-2 a été évalué par zymographie sur gélatine dans les milieux de culture conditionnés (panneaux supérieurs en B, C et E). Les niveaux d'expression de la MT1-MMP (panneaux du milieu en B, C et E) et de sa maturation protéolytique (panneaux inférieurs en B, C et E) ont été évalués par immunobuvardage de type Western suivi d'une immunodétection réalisée selon la méthode décrite dans la section 2. (D) Les niveaux de proMMP-2 (triangles ouverts) et de MMP-2 (cercles ouverts) ont été quantifiés par densitométrie des zymogrammes obtenus en (C). La survie cellulaire a été évaluée en mesurant la libération de la lactate déshydrogénase dans les milieux de culture conditionnés (cercles fermés).

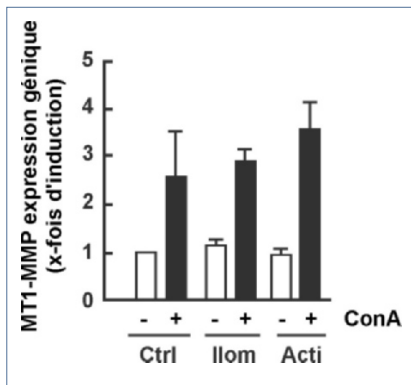


Figure 2 : L'actinonine n'inhibe pas l'expression génique de MT1-MMP induite par la concanavaleine-A. Les cellules de gliome U87 carencées en sérum ont été traitées (barres noires) ou non (barres blanches) avec 30 µg/ml de ConA pendant 18 heures et l'ARN total a été isolé selon la méthode décrite dans la section 2. L'expression génique de MT1-MMP a été mesurée par RT-PCR quantitative.

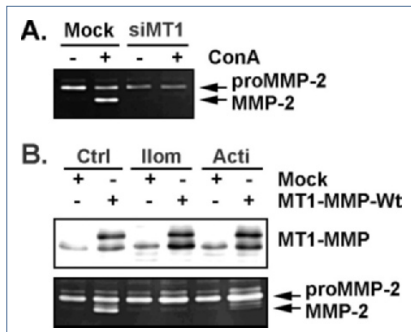


Figure 3 : L'actinonine inhibe l'activation de la proMMP-2 induite par la MT1-MMP recombinante. Le gène codant MT1-MMP a été inactivé (siMT1) dans les cellules de gliome U87 selon la technique décrite dans la section 2. (A) Les cellules témoins et les cellules transfectées avec siMT1-MMP, carencées en sérum, ont été traitées avec 30 µg/ml de ConA, et le degré d'activation de la proMMP-2 a été évalué par zymographie sur gélatine. (B) La transfection transitoire des cellules de gliome U87 avec un ADNc plasmidique codant pour la MT1-MMP a été réalisée selon la méthode décrite dans la section 2. Les cellules carencées en sérum ont ensuite été traitées avec 25 µM d'ilomastat (Ilom) ou 25 µM d'actinonine (Acti) pendant 18 heures. L'expression constitutive de la protéine MT1-MMP recombinante dans les cellules transfectées a été confirmée par immunobuvardage de type Western (panneau supérieur), tandis que l'activation de la proMMP-2 induite par la MT1-MMP recombinante a été évaluée par zymographie sur gélatine à partir de milieu de culture conditionnés (panneau inférieur).

RÉSULTATS

1 L'actinonine inhibe l'activation de la proMMP-2 et la maturation protéolytique de la MT1-MMP induite par la concanavaleine-A

Il est reconnu que la phytohémagglutinine concanavaleine-A (ConA) de *Canavalia ensiformis*, ayant une affinité pour les glycoconjugés mannosylés et glucosylés, déclenche l'activation de la forme latente de la proMMP-2 en sa forme active MMP-2 [25, 29]. Par conséquent, nous avons cultivé des cellules de gliome U87 dans un milieu dépourvu de sérum et les avons traitées avec des concentrations croissantes de ConA. Par la suite, nous avons récolté le milieu de culture conditionné pour y évaluer le degré d'activation de la proMMP-2 par zymographie sur gélatine. Nous avons observé que la ConA induisait l'activation de la proMMP-2 d'une manière dépendante de la concentration, et que ce phénomène corrélait avec l'induction de l'expression protéique de la MT1-MMP et de sa maturation protéolytique, comme en témoigne l'apparition de son fragment protéolytique de 43 kDa (Figure 1B). L'ajout de l'actinonine, en combinaison avec la ConA, mène à une diminution proportionnelle à la dose de l'activation de la proMMP-2 par la ConA, qui corrèle avec une diminution de la maturation protéolytique de la MT1-MMP (Figure 1C). L'effet inhibiteur de l'actinonine sur la MMP-2 était maximal à 50 µM (Figure 1D), et n'affectait pas la survie cellulaire ou l'expression de la proMMP-2 (Figure 1D). Afin de comparer l'efficacité d'inhibition de l'actinonine sur l'activation de la proMMP-2 induite par la ConA, nous avons également montré que l'ilomastat, un inhibiteur à large spectre des MMP [30], abrogeait l'activation de la proMMP-2 de façon similaire à l'actinonine (Figure 1E). Ces observations laissent entrevoir que l'actinonine antagoniserait les processus d'activation de la proMMP-2, possiblement en inhibant les fonctions de la MT1-MMP.

2 L'actinonine n'inhibe pas l'expression génique de MT1-MMP induite par la concanavaleine-A

Afin de mieux définir les effets moléculaires de l'actinonine sur les processus impliquant la MT1-MMP, nous avons tenté de déterminer si son expression génique était affectée. Nous avons traité des

cellules U87 avec de la ConA, isolé l'ARN total et évalué l'expression génique de MT1-MMP par RT-PCR quantitative. La ConA a induit l'expression du gène MT1-MMP (Figure 2), ce qui corrèle avec l'élévation des taux de protéine observée dans la figure 1A [17, 29, 31]. Tandis que l'ilomastat et l'actinonine ont inhibé efficacement l'activation de la proMMP-2 par la ConA (Figure 1), aucune des deux molécules n'a été en mesure de diminuer l'expression génique de MT1-MMP. Ceci nous permet de conclure que l'actinonine affecte les fonctions de la MT1-MMP au niveau de la surface cellulaire plutôt qu'au niveau transcriptionnel.

3 L'actinonine inhibe l'activation de la proMMP-2 induite par une forme recombinante de la MT1-MMP

Alors que la plupart des études antérieures, visant à déterminer les effets de l'actinonine sur les MMP, ont été effectuées sur des MMP solubles sécrétées (MMP-1, -2, -3, -7, -8, -9, -10, -12 et -13), l'effet direct de l'actinonine sur les fonctions de la MT1-MMP restait à démontrer [32]. Afin d'évaluer le rôle joué par la MT1-MMP dans l'activation de la proMMP-2 induite par la ConA, nous avons d'abord dû confirmer le fait que la MT1-MMP participait à l'activation de la proMMP-2 médiée par la ConA. Nous avons utilisé des stratégies d'inactivation génique par siRNA pour diminuer spécifiquement l'expression génique de MT1-MMP dans les cellules U87. Nous avons traité avec de la ConA les cellules transfectées avec siMT1-MMP, ou les cellules témoins, et observé que l'inactivation génique de MT1-MMP antagonisait de manière effective la capacité de la ConA à activer la proMMP-2 (Figure 2A). Nous avons ensuite réalisé une transfection transitoire des cellules U87 avec un ADNc plasmidique codant pour la MT1-MMP que nous avons préalablement validé [17, 29]. L'expression constitutive de la MT1-MMP recombinante dans les cellules transfectées a été confirmée par immunobuvardage de type Western, et elle n'a été inhibée ni par l'actinonine ni par l'ilomastat (Figure 3B, panneau supérieur). Nous avons ensuite montré que la MT1-MMP recombinante était totalement active puisque son expression à la surface cellulaire induisait constitutivement

l'activation de la proMMP-2, évaluée par zymographie à partir des milieux de culture conditionnés (Figure 3B, panneau inférieur). Enfin, l'activation de la proMMP-2 induite par la MT1-MMP recombinante était complètement abolie autant par l'ilotastat que par l'actinonine (Figure 3B), suggérant pour la première fois un effet direct de l'actinonine sur les fonctions catalytiques de la MT1-MMP.

4 L'inactivation du gène RECK prévient l'activation protéolytique de la MT1-MMP induite par la concanavoline-A

Il a récemment été démontré que la protéine RECK (Reversion-inducing Cysteine-rich Protein with Kazal Motifs) interagissait avec la MT1-MMP et la CD13/aminopeptidase N, et qu'elle pouvait moduler leurs voies endocytaires [33]. Cette modulation corrélait avec une internalisation et une dégradation accélérées de MT1-MMP et de CD13. En nous basant sur ces données, nous avons utilisé des

stratégies d'inactivation génique (siRNA) pour déterminer si ce mécanisme était possiblement impliqué dans le modèle de traitement des cellules U87 par l'actinonine. L'hypothèse sous-jacente étant que si RECK intervient dans un des processus d'internalisation de la MT1-MMP, une déplétion différentielle de la MT1-MMP dans des préparations de membranes cellulaires devrait également en résulter. Nous avons donc testé quatre séquences différentes de siRNA pour diminuer l'expression génique de RECK et avons utilisé la RT-PCR quantitative pour démontrer qu'une diminution de l'expression de RECK efficace à plus de ~72 % dans les cellules U87 était obtenue avec la construction siRNA n°4 (Figure 4A). Par ailleurs, nous démontrons également que les effets de l'actinonine (à savoir l'inhibition de l'activation de la proMMP-2 induite par la MT1-MMP), pourraient en fait dépendre des processus d'internalisation de la MT1-MMP

médiés par RECK. L'inactivation du gène RECK a prévenu partiellement l'activation protéolytique de la MT1-MMP induite par la concanavoline-A (Figure 4B, panneau supérieur), alors que l'actinonine était incapable de neutraliser l'activation protéolytique de la MT1-MMP dans les cellules transfectées avec siRECK (Figure 4B). Fait étonnant, l'actinonine était capable de renverser l'activation de la proMMP-2 autant dans les cellules témoins que dans les cellules transfectées avec siRECK (Figure 4B, panneau inférieur). Cette observation permet de croire qu'une partie des molécules MT1-MMP présentes à la surface cellulaire reste insensible à une interaction avec RECK. L'ensemble de ces résultats confirme l'existence d'un lien moléculaire entre MT1-MMP et CD13/aminopeptidase N [33], ce qui pourrait expliquer en partie les effets inhibiteurs de l'actinonine sur l'activation de la proMMP-2 induite par la MT1-MMP.

DISCUSSION

La découverte de la MT1-MMP (MMP-14), une MMP ancrée à la membrane plasmique cellulaire, et la démonstration ultérieure de ses fonctions pléiotropiques, se sont avérées primordiales dans le domaine de l'oncologie et particulièrement de l'angiogénèse tumorale [20]. Alors que l'inactivation du gène de MMP-2 chez la souris n'avait qu'un effet marginal sur le développement et la croissance [34], celle du gène de MT1-MMP provoquait une dysmorphie crânio-faciale, de l'arthrite, une ostéopénie, un nanisme et une fibrose des tissus mous, dus en partie à la suppression de l'activité collagénolytique [35]. L'invalidation du gène MT1-MMP bloque également le développement de maladies liées à l'angiogénèse [24] ainsi que les propriétés invasives des cellules tumorales [27]. Ces découvertes supportent donc un rôle central de la MT1-MMP non seulement dans le métabolisme physiologique des tissus conjonctifs, mais aussi dans les processus invasifs pathologiques associés au développement tumoral [16, 36]. Les glioblastomes continuent à représenter de nos jours un défi de taille en oncologie, puisqu'ils comptent pour plus de 50 % de l'ensemble des tumeurs cérébrales et qu'ils représentent de loin

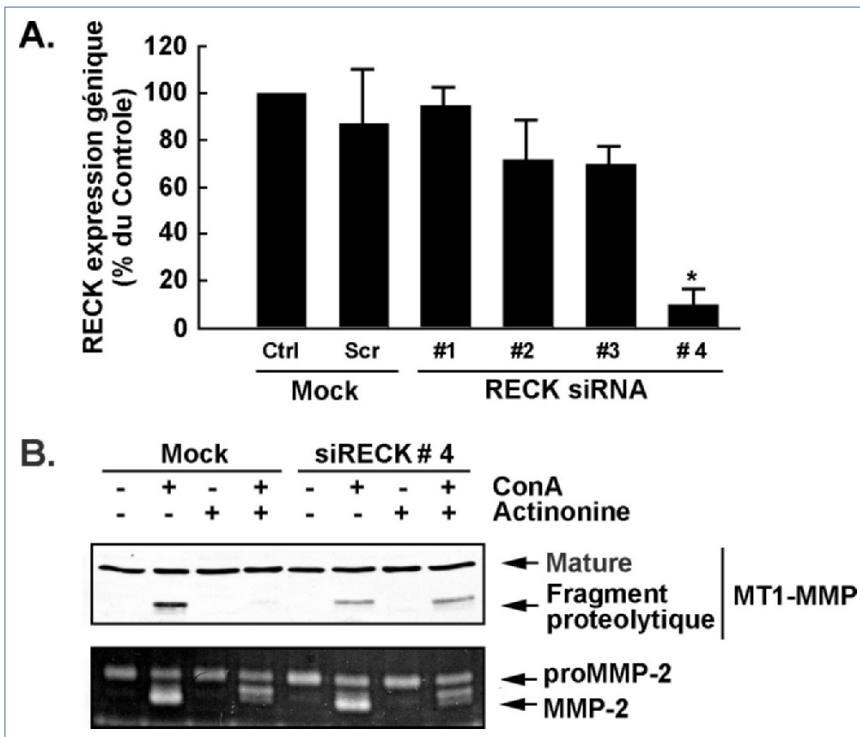


Figure 4 : L'inactivation du gène RECK prévient l'activation protéolytique de la MT1-MMP induite par la concanavoline-A. (A) Le gène de RECK a été inactivé (siRECK) dans les cellules de gliome U87 selon la technique décrite dans la section 2 et l'expression génique de RECK a été évaluée par RT-PCR quantitative (séquence siRNA aléatoire, Scr). (B) Les cellules témoins et transfectées avec siRECK, carencées en sérum, ont été traitées avec 30 µg/ml de ConA ou 25 µM d'actinonine pendant 18 heures. Nous avons réalisé une préparation de membranes cellulaires et évalué le degré de maturation protéolytique de la MT1-MMP par la immunobuvardage de type Western (panneau supérieur), tandis que l'activation de la proMMP-2 a été évaluée par zymographie sur gélatine (panneau inférieur).

▷▷ les tumeurs cérébrales primaires les plus fréquentes chez l'adulte [37]. La plupart des mécanismes qui interviennent dans la résistance des tumeurs cérébrales à la chimiothérapie ou à la mort cellulaire radio-induite [38] ont été identifiés, et on a clairement établi qu'une expression élevée de la MT1-MMP est un des mécanismes moléculaires pouvant contribuer à la résistance aux traitements des glioblastomes [39, 40]. Étant donné que la protéolyse de la MEC est essentielle au processus d'envahissement et d'infiltration des tumeurs cérébrales et que la MT1-MMP joue un rôle central dans la protéolyse de la MEC [41, 42], la recherche sur des molécules telles l'actinonine alliée au développement d'approches pharmaceutiques ciblant directement l'expression et/ou les interrelations fonctionnelles entre MT1-MMP et APN/CD13, pourraient s'avérer bénéfiques dans le ciblage des cellules tumorales envahissantes.

Nos données démontrent la nécessité de reconsidérer les cibles et mécanismes moléculaires qui sous-tendent les effets anti-angiogéniques de certaines molécules telles l'actinonine, impliquant à l'origine la métalloprotéinase APN/CD13. Incidemment, l'expression accrue d'APN/CD13 a également été démontrée dans les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVEC) des vaisseaux angiogéniques, mais non des vaisseaux normaux [43]. Des antagonistes fonctionnels d'APN, tels la bestatine, l'amastatine, et les anticorps anti-CD13, ont la capacité d'abolir l'organisation de réseaux de type capillaires *in vitro* chez les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine HUVEC [10, 44]. Néanmoins, l'implication directe d'APN/CD13 dans le mécanisme moléculaire anti-angiogénique de l'actinonine demeure obscure. L'un des principaux arguments est que l'angiogenèse pathologique s'accompagne souvent de la formation d'une matrice fibrineuse complexe, composée de fibrine, de fibres de collagène et de protéines plasmatiques, autant de protéines pouvant être la cible de d'autres protéases de surface cellulaire, telle la MT1-MMP [45, 46]. De ce fait, on pense désormais que la morphogenèse des cellules endothéliales en des structures de

type capillaires dans des gels de collagène/fibrine requiert l'activité de la MT1-MMP [47-49]. Des inhibiteurs comme l'actinonine pourraient donc avoir une double fonction : l'inhibition de protéases membranaires spécifiques, telles que l'APN/CD13 et la MT1-MMP, et un effet combiné sur la dégradation de la MEC et le processus de tubulogénèse.

En conclusion, nos travaux décrivent pour la première fois un effet cellulaire direct de l'actinonine sur la MT1-MMP. L'action spécifique de l'actinonine serait donc liée à sa capacité à neutraliser directement l'activation de la forme proMMP-2 induite par la MT1-MMP dans les cellules de gliome U87. Tandis que l'exploration de nouvelles approches visant à inhiber l'activité de la MT1-MMP se poursuit [23-25], nos observations nous amènent à mettre en évidence une portée moléculaire et thérapeutique plus large, qui ne se limiterait pas à la capacité de la MT1-MMP à activer la proMMP-2 ou à contribuer à la résistance au traitement. Nos résultats nous permettent de croire que l'inhibition des fonctions de la MT1-MMP pourrait aussi abroger la migration cellulaire par le biais de mécanismes tels la transactivation induite par la MT1-MMP du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGF) ou la signalisation associée à ce récepteur [50]. Finalement, les voies d'exploration futures devraient consister à tester l'action de l'actinonine sur les fonctions de la MT1-MMP rapportée récemment accroître les propriétés invasives des cellules souches cancéreuses CD133 positives, et que l'actinonine pourrait éventuellement cibler [51].

REMERCIEMENTS

BA est titulaire d'une Chaire de Recherche du Canada en Oncologie Moléculaire des Instituts de Recherches en Santé du Canada (IRSC). RR est titulaire d'une Chaire de Recherche du Canada en Chimie Thérapeutique du Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et Génie (CRSNG). La réalisation de cette étude a été rendue possible grâce à une subvention octroyée conjointement à BA et à RR par le Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT). ●

/+ Références.

- ① Lee MD, She Y, Soskis MJ, Borella CP, Gardner JR, Hayes PA, Dy BM, et al (2004) Human mitochondrial peptide deformylase, a new anticancer target of actinonin-based antibiotics. *J Clin Invest* 114: 1107-16
- ② Bauvois B, Dauzonne D (2006) Aminopeptidase-N/CD13 (EC 3.4.11.2) inhibitors: chemistry, biological evaluations, and therapeutic prospects. *Med Res Rev* 26: 88-130
- ③ Giglione C, Pierre M, Meinel T (2000) Peptide deformylase as a target for new generation, broad spectrum antimicrobial agents. *Mol Microbiol* 36: 1197-205
- ④ Van Aller GS, Nandigama R, Petit CM, DeWolf WE Jr, Quinn CJ, Aubart KM, Zalacain M, Christensen SB, et al. (2005) Mechanism of time-dependent inhibition of polypeptide deformylase by actinonin. *Biochemistry* 44: 253-60
- ⑤ Riemann D, Kehlen A, Thiele K, Löhn M, Langner J (1997) Induction of aminopeptidase N/CD13 on human lymphocytes after adhesion to fibroblast-like synoviocytes, endothelial cells, epithelial cells, and monocytes/macrophages. *J Immunol* 158: 3425-32
- ⑥ Kehlen A, Olsen J, Langner J, Riemann D (2000) Increased lymphocytic aminopeptidase N/CD13 promoter activity after cell-cell contact. *J Cell Biochem* 80: 115-23
- ⑦ Rangel R, Sun Y, Guzman-Rojas L, Ozawa MG, Sun J, Giordano RJ, Van Pelt CS, et al. (2007) Impaired angiogenesis in aminopeptidase N-null mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 4588-93
- ⑧ Fujii H, Nakajima M, Saiki I, Yoneda J, Azuma I, Tsuruo T (1995) Human melanoma invasion and metastasis enhancement by high expression of aminopeptidase N/CD13. *Clin Exp Metastasis* 13: 337-44
- ⑨ Ikeda N, Nakajima Y, Tokuhara T, Hattori N, Sho M, Kanehiro H, Miyake M (2003) Clinical significance of aminopeptidase N/CD13 expression in human pancreatic carcinoma. *Clin Cancer Res* 9: 1503-8
- ⑩ Hashida H, Takabayashi A, Kanai M, Adachi M, Kondo K, Kohno N, Yamaoka Y, Miyake M (2002) Aminopeptidase N is involved in cell motility and angiogenesis: its clinical significance in human colon cancer. *Gastroenterology* 122: 376-86
- ⑪ Kehlen A, Lendeckel U, Dralle H, Langner J, Hoang-Vu C (2003) Biological significance of aminopeptidase N/CD13 in thyroid carcinomas. *Cancer Res* 63: 8500-6
- ⑫ Xu Y, Lai LT, Gabrielove JL, Scheinberg DA (1998) Antitumor activity of actinonin in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 4: 171-6
- ⑬ Fukasawa K, Fujii H, Saitoh Y, Koizumi K, Aozuka Y, Sekine K, Yamada M, Saiki I, Nishikawa K (2006) Aminopeptidase N (APN/CD13) is selectively expressed in vascular endothelial cells and plays multiple roles in angiogenesis. *Cancer Lett* 243: 135-43

- 14 Sato H, Takino T, Miyamori H (2005) Roles of membrane-type matrix metalloproteinase-1 in tumor invasion and metastasis. *Cancer Sci* 96: 212-7
- 15 Bauvois B (2004) Transmembrane proteases in cell growth and invasion: new contributors to angiogenesis? *Oncogene* 23: 317-29
- 16 Genis L, Gálvez BG, Gonzalo P, Arroyo AG (2006) MT1-MMP: universal or particular player in angiogenesis? *Cancer Metastasis Rev* 25: 77-86
- 17 Currie JC, Fortier S, Sina A, Galipeau J, Cao J, Annabi B (2007) MT1-MMP down-regulates the glucose 6-phosphate transporter expression in marrow stromal cells: a molecular link between pro-MMP-2 activation, chemotaxis, and cell survival. *J Biol Chem* 282: 8142-9
- 18 Ries C, Egea V, Karow M, Kolb H, Jochum M, Neth P (2007) MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines. *Blood* 109: 4055-63
- 19 Nakamizo A, Marini F, Amano T, Khan A, et al. (2005) Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Res* 65: 3307-18. Erratum in: *Cancer Res* 2006; 66: 5975
- 20 Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmor BL, Grant GA, Goldberg GI (1995) Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem* 270: 5331-8
- 21 Zhou Z, Apte SS, Soininen R, Cao R, Baaklini GY, Rauser RW, et al. (2000) Impaired endochondral ossification and angiogenesis in mice deficient in membrane-type matrix metalloproteinase I. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 4052-7
- 22 Savinov AY, Rozanov DV, Golubkov VS, Wong FS, Strongin AY (2005) Inhibition of membrane type-1 matrix metalloproteinase by cancer drugs interferes with the homing of diabeticogenic T cells into the pancreas. *J Biol Chem* 280: 27755-8
- 23 Atobe K, Ishida T, Ishida E, Hashimoto K, Kobayashi H, Yasuda J, et al. (2007) In vitro efficacy of a sterically stabilized immunoliposomes targeted to membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *Biol Pharm Bull* 30: 972-8
- 24 Arroyo AG, Genis L, Gonzalo P, Matías-Román S, Pollán A, Gálvez BG (2007) Matrix metalloproteinases: new routes to the use of MT1-MMP as a therapeutic target in angiogenesis-related disease. *Curr Pharm Des* 13: 1787-802
- 25 Fortier S, Touaibia M, Lord-Dufour S, Galipeau J, Roy R, Annabi B (2008) Tetra- and hexavalent mannosides inhibit the pro-apoptotic, antiproliferative and cell surface clustering effects of concanavalin-A: impact on MT1-MMP functions in marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Glycobiology* 18: 195-204
- 26 Cao J, Chiarelli C, Kozarekar P, Adler HL (2005) Membrane type 1-matrix metalloproteinase promotes human prostate cancer invasion and metastasis. *Thromb Haemost* 93: 770-8
- 27 Neth P, Ciccarella M, Egea V, Hoelters J, et al. (2006) Wnt signaling regulates the invasion capacity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24: 1892-903
- 28 Annabi B, Lachambre M, Bousquet-Gagnon N, Pagé M, et al. (2001) Localization of membrane-type 1 matrix metalloproteinase in caveolae membrane domains. *Biochem J* 353: 547-53
- 29 Belkaid A, Fortier S, Cao J, Annabi B (2007) Necrosis induction in glioblastoma cells reveals a new « bioswitch » function for the MT1-MMP/G6PT signaling axis in proMMP-2 activation versus cell death decision. *Neoplasia* 9: 332-40
- 30 Saghatelian A, Jessani N, Joseph A, Humphrey M, Cravatt BF (2004) Activity-based probes for the proteomic profiling of metalloproteases. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 10000-5
- 31 Annabi B, Thibeault S, Lee YT, Bousquet-Gagnon N, Eliopoulos N, et al. (2003) Matrix metalloproteinase regulation of sphingosine-1-phosphate-induced angiogenic properties of bone marrow stromal cells. *Exp Hematol* 31: 640-9
- 32 Antczak C, Radu C, Djabballah H (2008) A profiling platform for the identification of selective metalloprotease inhibitors. *J Biomol Screen* 13: 285-94
- 33 Miiki T, Takegami Y, Okawa K, Muraguchi T, Noda M, Takahashi C (2007) The reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) interacts with membrane type 1 matrix metalloproteinase and CD13/aminopeptidase N and modulates their endocytic pathways. *J Biol Chem* 282: 12341-52
- 34 Itoh T, Tanioka M, Yoshida H, Yoshioka T, Nishimoto H, Itohara S (1998) Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. *Cancer Res* 58: 1048-51
- 35 Holmbeck K, Bianco P, Caterina J, Yamada S, et al. (1999) MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell* 99: 81-92
- 36 Itoh Y, Seiki M (2006) MT1-MMP: a potent modifier of pericellular microenvironment. *J Cell Physiol* 206: 1-8
- 37 Glioma Meta-analysis Trialists (GMT) Group. *Lancet* 2002; 359: 1011-8
- 38 Berens ME, Giese A (1999) «...those left behind.» Biology and oncology of invasive glioma cells. *Neoplasia* 1: 208-19
- 39 Annabi B, Bouzeghrane M, Mouldjian R, Moghrabi A, Béliveau R (2005) Probing the infiltrating character of brain tumors: inhibition of RhoA/ROK-mediated CD44 cell surface shedding from glioma cells by the green tea catechin EGCG. *J Neurochem* 94: 906-16
- 40 McLaughlin N, Annabi B, Bouzeghrane M, Temme A, Bahary JP, Mouldjian R, Béliveau R (2006) The Survivin-mediated radioresistant phenotype of glioblastomas is regulated by RhoA and inhibited by the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Brain Res* 1071: 1-9
- 41 Fillmore HL, VanMeter TE, Broaddus WC (2001) Membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs): expression and function during glioma invasion. *J Neurooncol* 53: 187-202
- 42 Nakada M, Kita D, Futami K, Yamashita J, Fujimoto N, Sato H, Okada Y (2001) Roles of membrane type 1 matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinases 2 in invasion and dissemination of human malignant glioma. *J Neurosurg* 94: 464-73
- 43 Pasqualini R, Koivunen E, Kain R, Lahdenranta J, Sakamoto M, Stryhn A, et al. (2000) Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis. *Cancer Res* 60: 722-7
- 44 Bhagwat SV, Petrovic N, Okamoto Y, Shapiro LH (2003) The angiogenic regulator CD13/APN is a transcriptional target of Ras signaling pathways in endothelial morphogenesis. *Blood* 101: 1818-26
- 45 Hiraoka N, Allen E, Apel IJ, Gyetko MR, Weiss SJ (1998) Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins. *Cell* 95: 365-77
- 46 Collen A, Hanemaaijer R, Lupu F, Quax PH, van Lent N, Grimbergen J, Peters E, Koolwijk P, van Hinsbergh VW (2003) Membrane-type matrix metalloproteinase-mediated angiogenesis in a fibrin-collagen matrix. *Blood* 101: 1810-7
- 47 d'Ortho MP, Stanton H, Butler M, Atkinson SJ, Murphy G, Hembry RM (1998) MT1-MMP on the cell surface causes focal degradation of gelatin films. *FEBS Lett* 421: 159-64
- 48 Lafleur MA, Handsley MM, Knäuper V, Murphy G, Edwards DR (2002) Endothelial tubulogenesis within fibrin gels specifically requires the activity of membrane-type-matrix metalloproteinases (MT-MMPs). *J Cell Sci* 115: 3427-38
- 49 Koike T, Vernon RB, Hamner MA, Sadoun E, Reed MJ (2002) MT1-MMP, but not secreted MMPs, influences the migration of human microvascular endothelial cells in 3-dimensional collagen gels. *J Cell Biochem* 86: 748-58
- 50 Kheradmand F, Rishi K, Werb Z (2002) Signaling through the EGF receptor controls lung morphogenesis in part by regulating MT1-MMP-mediated activation of gelatinase A/MMP2. *J Cell Sci* 115: 839-48
- 51 Annabi B, Rojas-Sutterlin S, Laflamme C, Lachambre MP, Rolland Y, Sartelet H, Béliveau R (2008) Tumor environment dictates medulloblastoma cancer stem cell expression and invasive phenotype. *Mol Cancer Res* 6: 907-16