

**JEAN-SIMON ROY**

**Rôle de *mmp-9* dans la métastasie du lymphome T non hodkinien**

Mémoire (par article)

Présenté pour l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc) en virologie et immunologie

**Jury d'évaluation du mémoire**

Examinateuse interne et présidente du jury : Dr. Suzanne Lemieux

Examinateur externe : Dr. Philippe Tessier (Centre de recherche en infectiologie, CHUL)

Directeur de recherche : Dr. Yves St-Pierre

©Tous Droits réservés

Octobre 2007

INSTITUT ARMAND-FRAPPIER

Université du Québec

## **Remerciements**

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr. Yves St-Pierre, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, ainsi que pour m'avoir épaulé et conseillé tout au long de mon cheminement. Je remercie également les Drs Ghislain Opdenakker et Bernd Arnold, ainsi que les étudiantes Céline Van Themsche et Dr. Mélanie Demers, sans qui les outils indispensables à ces travaux n'auraient pas été disponibles.

Je remercie tous les étudiant(e)s du laboratoire avec qui j'ai eu la chance de travailler pour leur aide, leurs conseils et leur humour. J'aimerais aussi remercier Diane Tremblay pour l'aide et la bonne humeur qu'elle apporte au personnel du laboratoire ainsi que pour toutes les heures qu'elle dédie à s'occuper de nos précieuses souris et cellules.

J'aimerais finalement remercier la Fondation Armand-Frappier pour le soutien financier qui m'a été accordé tout au long de mes études de maîtrise.

## TABLE DES MATIÈRES

Page titre.....	I
Remerciements.....	II
Table des matières.....	III
Liste des abréviations.....	VI
Liste des figures et tableaux.....	IX
Sommaire.....	X

### Chapitre 1 : Revue bibliographique

Introduction.....	1
<b>Section 1 : Le cancer.....</b>	<b>3</b>
1.1 Définition du cancer.....	3
1.2 Principaux processus d'oncogenèse.....	3
1.2.1 Pression sélective et sélection clonale.....	3
1.2.2 Instabilité génétique.....	4
1.2.3 Blessure et inflammation chronique.....	4
1.2.4 Initiation et promotion.....	4
1.2.5 Immortalisation et transformation cellulaire.....	5
1.3 Gènes du cancer.....	6
1.4 Modifications génétiques.....	7
1.4.1 Mutations et translocations chromosomiques.....	7
1.4.2 Modifications épigénétiques.....	7
1.5 Métastasie.....	8
1.6 Angiogénèse.....	9
1.7 Apoptose.....	10
<b>Section 2 : Le lymphome T non hodgkinien.....</b>	<b>10</b>
2.1 Définition de la leucémie et du lymphome.....	10
2.2 Le lymphome T non hodgkinien.....	11
2.2.1 Classification des lymphomes non hodgkiens.....	11

2.2.2 Grades et agressivité des lymphomes T non hodgkiniens.....	12
2.2.3 Diagnostic du lymphome T non hodgkinien.....	13
2.3 Molécules d’adhésion cellulaire, tropisme et dissémination des lymphomes.....	13
2.4 Molécules d’adhésion et progression tumorale.....	16
<b>Section 3 : Les métalloprotéases de la matrice (MMP).....</b>	<b>17</b>
3.1 Définition des MMP.....	17
3.2 Structures générales et régulation des MMP .....	18
3.3 La matrice extracellulaire .....	19
3.4 Rôle des gélatinases dans l’organisme.....	20
3.5 Importance des MMP dans la progression tumorale.....	22
3.6 Développement d’inhibiteurs de MMP et essais cliniques.....	23
3.6.1 TIMP : Les inhibiteurs naturels des MMP .....	23
3.6.2 Inhibiteurs synthétiques des MMP.....	24
<b>Section 4 : La MMP-9 en particulier.....</b>	<b>26</b>
4.1 Définition de la MMP-9.....	26
4.2 Gène et promoteur de la MMP-9.....	27
4.3 Inducteurs et cascades de transduction pour la MMP-9.....	28
4.3.1 Activation via les Protéines kinases C (PKC).....	29
4.3.2 Activation via les MAPK.....	30
4.4 Régulation de la MMP-9.....	31
4.4.1 Régulation post-transcriptionnelle de MMP-9.....	32
4.4.2 Régulation post-traductionnelle et structure de MMP-9.....	32
4.4.3 Adhésion cellulaire et contrôle transcriptionnel de MMP-9.....	33
4.4.4 Activation de la protéine MMP-9.....	34
4.4.5 Inhibition de l’activité enzymatique et de l’expression de la MMP-9.....	34
4.5 Rôle de la MMP-9 dans la progression néoplasique .....	35
4.5.1 MMP-9 et angiogénèse tumorale.....	35
4.5.2 Invasion / Migration / Extravasation.....	36
4.5.3 MMP-9 et métastasie.....	37

4.5.4 MMP-9 et échappement à l'action du système immunitaire.....	37
<b>Section 5 : Inflammation et environnement péritumoral.....</b>	<b>38</b>
5.1 Réaction inflammatoire, MMP et cancer.....	38
5.2 Les MMP dans l'environnement péritumoral.....	39
5.3 Types cellulaires exprimant la MMP-9 : le rôle des cellules péritumorales.....	41
5.4 Modulation de l'expression de MMP-9 dans l'inflammation.....	42
5.5 La MMP-9 tumorale versus la MMP-9 stromale.....	42
<b>Section 6 : Modèle murin génétiquement modifié de déficience en MMP-9.....</b>	<b>43</b>
6.1 Pertinence du modèle.....	43
6.2 Souris déficiente en MMP-9 : génération et phénotype.....	43
 <b>Chapitre II</b>	
Collaboration des auteurs.....	46
Sommaire du travail expérimental : hypothèses, objectifs et résultats des travaux.....	47
Article et Figures.....	48
 <b>Chapitre III</b>	
Discussion générale.....	69
 <b>Bibliographie</b>	
Liste des références.....	77
 <b>Annexe I</b>	
Version publiée de l'article.....	91

## Liste des abréviations

%	pourcent
°C	degré Celsius
a.a.	acide aminé
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AP-1, AP-2	<i>activator protein-1, activator protein-2</i>
ARF	<i>adp-ribosylation factor 1</i>
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messager
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma/leukemia-2</i>
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
C57BL/6	C57 black 6
CAMs	<i>cell adhesion molecules</i>
(CBP)/p300	<i>CREB binding protein</i>
CD1, CD2, etc.	<i>cluster of differentiation 1, cluster of differentiation 2, etc.</i>
CO <sub>2</sub>	dioxyde de carbone
COX	cyclo-oxygénase
CSF-1	<i>colony stimulating factor 1</i>
Cys	résidu cystéine
EBV	Epstein Barr Virus
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ELK	<i>Eph-like kinase</i>
ERG	<i>early response gene</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinases</i>
ESL-1	<i>E-selectin ligand-1</i>
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FGFR	<i>fibroblast growth factor receptor</i>
Flk-1	<i>fetal liver kinase-1</i>

Flt-1	<i>fms-like tyrosine kinase-1</i>
GAG	glycoaminoglycans
glyCAM-1	<i>glycosylation-dependent cell adhesion molecule 1</i>
HGF	<i>hematopoietic growth factors</i>
HGF/SF	<i>hepatocyte growth factor-scatter factor</i>
HTLV	<i>Human T-cell Lymphotropic Virus</i>
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
IFN	interférons
I $\kappa$ B	<i>inhibitor of NF-<math>\kappa</math>B Kinase</i>
IKK	<i>I<math>\kappa</math>B kinase</i>
IL-1, IL-2, etc	interleukines 1, interleukine 2, etc.
IL-1R, IL-2R, etc	récepteur de l'interleukines 1, récepteur de l'interleukine 2, etc.
IRF	<i>interferon regulatory factor</i>
ISRE	<i>interferon-stimulated response element</i>
i.t.	intra-thymique
i.v.	intraveineux
JAK/STAT	<i>Janus kinases / signal transducers and activators of transcription</i>
JNK/SAPK	<i>Jun N-terminal kinase / Stress-activated protein kinase</i>
kDa	kilodalton
K.O.	<i>knock out</i>
LFA-1	<i>lymphocyte function-associated antigen-1</i>
LNH	lymphome non hodgkinien
LPS	lipopolysaccharides
Mac-1	<i>macrophage antigen-1</i>
MadCAM-1	<i>mucosal addressin cell adhesion molecule-1</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinases</i>
MAPKK	<i>mitogen-activated protein kinase kinases</i>
MCP	<i>monocyte chemotactic protein</i>
MEC	matrice extracellulaire
MEK	<i>MAPK/ extracellular signal-regulated kinase kinase</i>
MMP	Métalloprotéases de la matrice ( <i>Matrix metalloproteinases</i> )

MMP-9 <sup>-/-</sup>	homozygote déficient en MMP-9
MT-MMP	Métalloprotéases de la matrice de type membranaire
NF-κB	<i>nuclear factor-κB</i>
NGAL	<i>neutrophil gelatinase-B-associated lipocalin</i>
NK	<i>natural killer</i>
NO	oxyde d'azote
pH	potentiel hydrogène
p.b.	paires de bases
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PEA3	<i>Polyomavirus enhancer activator 3</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide-3 kinase</i>
PKC	protéine kinase C
PMA	<i>phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
PSGL-1	<i>P-selectin glycoprotein ligand-1</i>
RT-PCR	<i>reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
RTK	récepteur tyrosine kinase
SP-1	<i>stimulatory protein 1</i>
TAMs	<i>tumor associated macrophages</i>
TCR	<i>T-cell receptor</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TIE	<i>TGF-β1 inhibitory element</i>
TIMPs	<i>tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
TNFs	<i>tumor necrosis factors</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i>
uPA	<i>urokinase plasminogen activator</i>
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	<i>vascular endothelial growth factor receptor</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
Zn <sup>2+</sup>	ion zinc

## Liste des figures et tableaux

### Chapitre I : Revue bibliographique

<b>Figure 1</b> - Structure des métalloprotéases de la matrice (MMP).....	19
<b>Figure 2</b> - Inflammation : Immunité antitumorale vs inflammation chronique.....	40
<b>Tableau 1</b> - Classification WHO/EORTC des lymphomes T.....	12
<b>Tableau 2</b> - TIMP : les inhibiteurs endogènes des MMP.....	24
<b>Tableau 3</b> - Exemples d'inhibiteurs de MMP développés.....	25
<b>Tableau 4</b> - Quelques régulateurs de l'expression de MMP-9.....	32

### Chapitre II : Article publié

Légendes des figures 1 à 3.....	63
<b>Figure 1</b> - Courbe de survie des souris normales et déficientes en MMP-9.....	65
<b>Figure 2</b> - Génération et tumorigénicité des lymphomes déficients en MMP-9.....	66
<b>Figure 3</b> - Développement <i>in vivo</i> des lymphomes T en absence de MMP-9.....	67

## Sommaire

Le lymphome T non hodgkinien (LNH) est une néoplasie provenant de la conversion maligne des lymphocytes T. Contrairement au lymphome hodgkinien, le lymphome T non hodgkinien est souvent disséminé dans l'organisme, difficilement traitable et plus agressif. Ce type de cancer produit des métastases, principalement dans les organes comme le foie, la rate et les reins. Des études antérieures effectuées au laboratoire ont démontré que le taux d'expression de la MMP-9, une métalloprotéase de la matrice, était en corrélation directe avec l'agressivité du lymphome T non hodgkinien. De plus, l'expression normalement inductible de cette protéase devient constitutive dans les lignées de lymphomes T agressifs. Dans la littérature, la MMP-9 est associée à une multitude de processus néoplasiques (intravasation, progression, angiogénèse, dissémination, etc.) et ce, dans plusieurs types de cancers différents. D'ailleurs, beaucoup d'efforts ont été déployés ces dernières années dans la production d'inhibiteurs spécifiques à MMP-9 pour lutter contre le cancer.

L'activité enzymatique de la MMP-9 produit la libération du VEGF et de plusieurs fragments bioactifs lors de la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC), ce qui augmente l'angiogénèse dans le tissu. De plus, elle est impliquée dans la diapédèse des leucocytes à travers les endothéliums vasculaires et permet donc leur entrée dans les différents tissus de l'organisme. La MMP-9 est donc associée à la néo-angiogénèse, phénomène indispensable à la croissance tumorale, et à la dissémination des cellules circulantes dans l'organisme. À partir de ces conclusions, **le but premier de notre étude était de déterminer le rôle de MMP-9 dans la progression et la dissémination du lymphome T non hodgkinien, en plus de déterminer le rôle respectif des cellules tumorales et stromales dans l'expression de la MMP-9 dans l'espace péritumoral.**

Pour réaliser ce projet, nous avons utilisé des souris déficientes pour MMP-9 à partir desquelles des lymphomes T déficients en MMP-9 furent générés. À l'aide de ce modèle murin *in vivo*, il a été possible d'injecter des lymphomes T, avec ou sans MMP-9, dans les souris exprimant ou non la MMP-9. Il a ainsi été possible d'observer l'effet de l'absence, partielle ou totale, de la MMP-9 sur la croissance et la dissémination du lymphome T. Deux lignées de lymphome T déficients en

MMP-9 (KOM9-2325 et KOM9-2333) furent utilisées et donnèrent des résultats similaires. Nos résultats montrent que l'absence partielle de MMP-9 (dans le lymphome ou dans la souris) n'a pas d'effets marqués sur la progression ou la dissémination du lymphome dans l'organisme. De façon plus importante, nous avons constaté que le lymphome se développe de façon comparable en conditions normales et en absence totale de MMP-9, démontrant que la MMP-9 n'est pas essentielle à la progression et la dissémination du lymphome T *in vivo*.

## **Introduction**

Le lymphome est un cancer du système lymphatique provenant des lymphocytes B et T. Les lymphomes T peuvent être séparés en deux grandes catégories : les lymphomes hodgkiniens et non hodgkiniens. Le laboratoire du Dr. St-Pierre, où j'ai effectué mes études de maîtrise, s'intéresse principalement aux lymphomes T non hodgkiniens, qui représentent la majorité des cas diagnostiqués et sont plus difficilement traitables.

Des recherches antérieures dans notre laboratoire avaient montré que les lymphomes agressifs exprimaient la MMP-9 de façon constitutive plutôt que de façon inducible. Par contre, bien que l'expression inhabituelle de la MMP-9 ait été observée, son rôle dans cette agressivité ne fut pas démontré. Mon projet de maîtrise visait donc principalement à définir le rôle de la MMP-9 dans la progression et la dissémination du lymphome T non hodgkinien. Ce projet a été rendu possible grâce à deux outils essentiels : les souris déficientes en MMP-9 et les lignées de lymphome T déficientes en MMP-9. En utilisant un modèle murin syngénique, nous avons voulu étudier le rôle de la MMP-9 en comparant la progression et la dissémination du lymphome T non hodgkinien dans différentes conditions d'expression de la MMP-9 : expression normale, expression par la souris seulement, expression par le lymphome T seulement et en absence totale de MMP-9. Quatre lignées différentes de lymphome T non-hodgkiniens ont été utilisées lors de mes expériences : une lignée non aggressive, une lignée aggressive et deux lignées déficientes en MMP-9.

Ce mémoire de maîtrise présente d'abord une revue de littérature retracant les grands concepts et les connaissances actuelles liés à ce projet : le cancer et les lymphomes, les MMP dans l'organisme, les rôles et les inhibiteurs de la MMP-9, l'environnement péritumoral et le rôle de l'inflammation dans la néoplasie. Il contient ensuite l'article publié grâce aux résultats obtenus et, finalement, une discussion sur les principales conclusions tirées de ces recherches.

## **Chapitre I**

### **Revue Bibliographique**

## **Section 1 : Le cancer**

### **1.1 Définition du cancer**

Le cancer émerge à la base d'une cellule somatique portant une ou plusieurs mutations lui conférant un avantage sélectif de prolifération. Au fil des générations cellulaires, il y a sélection des phénotypes aux altérations génétiques et épigénétiques les plus avantageuses. Cette accumulation d'altérations génétiques et épigénétiques au sein de la cellule mène à l'émergence de cellules dites cancéreuses qui se développent pour former une tumeur puis dans certains cas, des métastases (Ponder, 2001). Comme la pression sélective exercée par l'organisme sur les cellules tumorales permet principalement la survie des phénotypes les plus agressifs, les cellules formant les métastases sont souvent plus agressives que celles de la tumeur primaire (Nguyen et Massagué, 2007)

### **1.2 Principaux processus d'oncogénèse**

#### **1.2.1 Pression sélective et sélection clonale**

Durant la croissance tumorale, les cellules doivent s'adapter à des pressions environnementales croissantes et changeantes comme l'« immunoediting » (pression exercée par le système immunitaire), la diminution de la tension d'oxygène dans le tissu (hypoxie) et l'acidification du milieu. Ces mécanismes exercent une pression sélective sur les cellules tumorales et accélèrent du même coup la sélection clonale des phénotypes possédant les altérations génétiques favorables (Nguyen et Massagué, 2007). Le niveau initial de mutations des cellules cancéreuses est donc amplifié par une accumulation importante de mutations au cours du développement de la maladie. Cette accumulation mène éventuellement à l'émergence de clones malins et agressifs possédant des avantages, en ce qui a trait à la survie et la prolifération, par rapport à leur contrepartie normale (Lengauer *et al.*, 1998).

### **1.2.2 Instabilité génétique**

Par définition, l'instabilité génétique n'est pas caractérisée par la présence de mutations ou d'altérations génétiques, mais plutôt la fréquence à laquelle ces dernières se produisent dans le génome cellulaire (Feinberg et Coffe, 1982). L'instabilité génétique existerait à deux niveaux distincts dans la cellule cancéreuse. Dans certains cas, plus rares, elle serait présente au niveau nucléotidique et serait le résultat de substitutions, délétions ou insertions de nucléotides dans l'ADN. Le **taux de mutations** dans une cellule est souvent augmenté par des anomalies des mécanismes de réparation de l'ADN, menant à l'instabilité des microsatellites (Karran *et al.*, 2003). Par contre, dans la vaste majorité des tumeurs, l'instabilité génétique serait plutôt présente au niveau chromosomique. En effet, la plupart des tumeurs présenteraient des pertes ou des gains de chromosomes entiers ou, du moins, de parties importantes de ces derniers (Lengauer *et al.*, 1998).

### **1.2.3 Blessure et inflammation chronique**

La guérison tissulaire et l'inflammation chronique sont depuis quelques années associées au développement du cancer. Les cellules inflammatoires de l'hôte, via les cytokines, les facteurs de croissance, les chimiokines et les protéases qu'elles libèrent, peuvent agir et promouvoir la tumorigénèse par l'activation paracrine des cellules du tissu (Coussens et Werb, 2002). L'inflammation chronique dans le tissu favorise ainsi de façon importante la mitogénèse et la mutagénèse des cellules (Ames et Gold, 1990).

### **1.2.4 Initiation et promotion**

En 1941, Peyton Rous fut le premier à reconnaître que le cancer se développait à partir « d'états néoplasiques latents » induits par des mutations, des agents carcinogènes chimiques ou vitaux, créant des changements somatiques au niveau de l'ADN de la cellule (Rous et Kidd, 1941). Cet état, aujourd'hui appelé initiation, peut rester latent de façon indéterminée, jusqu'à ce que la cellule subisse une seconde stimulation : la promotion. La promotion peut se produire :

- 1) au contact d'irritants chimiques
- 2) lors de la libération de facteurs de croissance ou d'hormones
- 3) lors d'ablations chirurgicales (stress tissulaire)
- 4) aux sites d'irritation ou d'inflammation chroniques

(Coussens et Werb, 2002)

D'autres études montrent que l'initiation peut également découler d'infections. En fait, environ 15% des néoplasies seraient dûes aux infections (Kuper *et al.*, 2000). Selon cette hypothèse, les infections persistantes induiraient une inflammation chronique des tissus, favorisant l'infiltration des leucocytes et autres cellules phagocytaires. Ces cellules seraient responsables des dommages à l'ADN des cellules proliférantes à la suite de la libération de dérivés oxygénés et azotés produits pour contrer l'infection. Ces dérivés réagissent pour former du peroxynitrite, un agent mutagène (Maeda et Akaike, 1998). Ces dommages peuvent se traduire par des mutations ponctuelles, des délétions et même des réarrangements chromosomiques. Par exemple, des mutations de p53, un gène suppresseur de tumeur, sont décelées à des fréquences semblables dans les tumeurs et les maladies inflammatoires chroniques telles l'arthrite rhumatoïde et certaines maladies entériques (Yamanishi *et al.*, 2002). Une autre preuve du lien existant entre infection et cancer : l'infection à *Helicobacter pylori* qui induit une inflammation chronique est la cause principale des cancers gastriques à travers le monde (Ernst et Gold, 2000).

### 1.2.5 Immortalisation et transformation cellulaire

L'immortalisation signifie qu'une cellule acquiert une capacité de prolifération illimitée. Cette capacité est observable chez les lignées cellulaires (Lodish *et al.*, 2000). La transformation, quant à elle, implique une multitude de modifications phénotypiques, comportementales et prolifératives. Elle peut être induite chez la cellule par la mise en présence d'agents transformants comme des agents chimiques, des radiations, certains virus transformants ou tout autre agent mutagène. Elle est le résultat de l'expression anormale d'un ou de plusieurs gènes dit « **gènes du cancer** », qui sont regroupés en trois classes selon leurs fonctions au sein de la cellule (voir section 1.3) (Michor *et al.*, 2004).

### 1.3 Gènes du cancer

Au plan génétique, plus de 350 gènes seraient impliqués dans le développement du cancer (Futreal *et al.*, 2004). Il est possible de regrouper ces gènes en trois grandes catégories, appelées cerbères (**Gatekeepers**), aides-soignants (**Caretakers**) et paysagistes (**Landscapers**), selon leur rôle dans la biologie de la cellule (Michor *et al.*, 2004). Ainsi, les cancers provenant d'un même type cellulaire à la base, mais contenant des combinaisons différentes de mutations, se développeront souvent de façons différentes dans l'organisme, d'où la complexité à traiter efficacement le cancer (Liotta et Pericoin, 2000).

Les gènes cerbères dits « **Gatekeepers** » régulent directement la croissance et la différenciation cellulaire. Ils comprennent les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeur associés aux gains et pertes de fonction (Kinzley et Vogelstein, 1997). Il y a « gain de fonction » lorsqu'une mutation, translocation chromosomique ou tout changement génétique ou épigénétique active de façon inappropriée l'expression d'un proto-oncogène et induit ainsi un phénotype néoplasique (Bishop, 1981). La perte de fonction, quant à elle, découle plutôt de la diminution, voir de l'inhibition de l'expression d'un gène dit suppresseur de tumeur (Ponder, 2001). Les gènes aides-soignants, dits « **Caretakers** », sont impliqués dans la tumorigénèse de façon indirecte, leurs fonctions étant reliées au maintien de l'intégrité du génome, comme dans les mécanismes de réparation de l'ADN. Une mutation de l'un de ces gènes peut mener à l'instabilité génomique de la cellule et donc à l'accumulation rapide de mutations dans le génome (Rajagopalan *et al.*, 2003) (Sieber *et al.*, 2003). Quant aux gènes paysagistes, appelés « **Landscapers** » ils sont impliqués dans les interactions de la cellule avec l'environnement péricellulaire. De façon générale, un débalancement dans ces gènes n'affecte pas directement la croissance cellulaire, mais génère un environnement stromal qui contribue à la transformation néoplasique de la cellule (Bissell et Radisky, 2001). L'altération d'un seul gène du cancer est rarement suffisante pour induire le phénotype oncogénique chez la cellule. En général, la cellule doit successivement acquérir, via la sélection clonale, plusieurs traits afin d'obtenir la tumorigénicité nécessaire à la formation de tumeurs. *Hanahan et Weinberg* décrivent que pour devenir tumorigénique, une cellule doit minimalement posséder des mutations permettant : 1) l'autosuffisance en facteurs de croissance, 2) l'insensibilité aux signaux d'arrêt de croissance, 3) l'inhibition des mécanismes apoptotiques,

4) un potentiel illimité de prolifération, 5) un potentiel angiogénique continu, et 6) un pouvoir invasif et métastatique (Hanahan et Weinberg, 2000).

## 1.4 Modifications génétiques

### 1.4.1 Mutations et translocations chromosomiques

Les mutations somatiques se produisent dans toutes les cellules en division, tant normales que néoplasiques. Il existe deux classes distinctes de mutations dans les cellules néoplasiques : 1) les mutations dites **promotrices**, qui se retrouvent dans les « gènes du cancer » et qui confèrent un avantage sélectif à la cellule en étant directement impliquées dans l'acquisition du phénotype néoplasique, et 2) les mutations dites **passives**, qui ne confèrent pas d'avantage durant la sélection clonale et ne sont pas impliquées directement dans le développement tumoral (Greenman *et al.*, 2007). Pour ce qui est des **translocations chromosomiques**, il en existe également deux principaux types : le type complexe, dont le patron de translocation diffère pour chaque tumeur d'un même type histologique et le type simple, caractérisé par des réarrangements précis et spécifiques à certaines maladies néoplasiques (Johansson *et al.*, 1996). Ce deuxième type de translocation chromosomique est abondamment retrouvé dans les leucémies, les lymphomes et certains sous-types de carcinomes (LeBeau et Rowley, 1986). Du point de vue organisationnel, les mutations ponctuelles et les réarrangements chromosomiques provoquent des modifications dans les régions promotrices et/ou dans les séquences protéiques exprimées, ce qui induit des changements importants dans l'expression, l'induction ou la suppression de gènes lors d'événements cellulaires répondants à des contextes particuliers, soit des gains et pertes de fonctions (Roix *et al.*, 2003).

### 1.4.2 Modifications épigénétiques

La régulation épigénétique est aussi impliquée dans la tumorigénèse de façon active. Ainsi, la méthylation des îlots CpG dans les régions promotrices de gène suppresseurs de tumeur tels que VHL, MLH1 et p16 ( $CDKN4/p16^{INK4A}$ ) chez les cellules somatiques augmente leur potentiel néoplasique (Baylin et Herman, 2000). Dans le même ordre d'idée, la déméthylation excessive

des oncogènes peut aussi entraîner un changement phénotypique. Les mécanismes qui dictent si le gain ou la perte de fonction d'un gène s'effectue par des mécanismes mutationnels (génétiques) ou épigénétiques sont encore mal connus. Par exemple, la perte de fonction de la protéine p16 (cyclin-dependant kinase inhibitor) peut se produire par délétion, mutation ou hyperméthylation du promoteur, mais la fréquence de chacun de ces mécanismes varie selon le type de tumeur observé (Baylin et Herman, 2000).

## 1.5 Métastasie

Un modèle évolutioniste proposé dans les années 70 par *Fidler et Kripke.*, affirmait que la métastasie était un événement résultant de la sélection de quelques rares clones émergeant d'une population génétiquement hétérogène et instable de cellules dans la tumeur primaire. Ces clones étaient prédestinés à métastasier dans certains organes spécifiques en vertu des mutations pro-métastatiques aléatoires subies lors des pressions sélectives antérieures (Fidler et Kripke, 1977). La métastasie peut ainsi être comparée à un processus évolutif dynamique prenant place au sein même de l'organisme. En effet, de façon semblable à la sélection naturelle exercée sur les populations, l'instabilité génomique des cellules cancéreuses produit une variabilité génomique des populations cellulaires, desquelles émergeront les clones métastatiques (Cresbi et Summers, 2005). Les métastases sont responsables d'environ 90% des décès liés aux tumeurs solides et possèdent des taux étonnantes de diversité dans leurs manifestations cliniques. Comme pour les gènes pro-tumorigéniques, l'activation de gènes pro-métastatiques peut avoir lieu de façon génétique (mutation, délétion, réarrangements chromosomiques, etc.) ou épigénétique (modification des histones, de la chromatine, de la méthylation, dérégulation des facteurs de transcription ou de la régulation post-transcriptionnelle / post-traductionnelle) (Nguyen et Massagué, 2007).

Malgré l'acquisition des caractéristiques tumorigéniques chez les cellules des tumeurs primaires, la grande majorité des cellules cancéreuses meurent en quittant leur tissu d'origine, dû aux divers stress causés par le déracinement du microenvironnement originel ou encore aux conditions inhospitalières rencontrées dans les tissus des organes distaux (Nguyen et Massagué, 2007). La métastasie requiert donc l'acquisition préalable d'altérations génétiques par certaines populations

clonales, leurs conférant la capacité de métastasier dans l'organisme. *Nguyen et Massagué*. font état de trois groupes de gènes essentiels à ce processus : 1) les gènes d'initiation métastatique, 2) les gènes de progression métastatique, et 3) les gènes de virulence métastatique. **Les gènes d'initiation métastatique** confèrent à la cellule un avantage sélectif dans la tumeur primaire. Bien que ces gènes n'interviennent pas directement dans la métastasie des cellules cancéreuses, ils préparent ces dernières à la conversion métastatique. Ils impliquent principalement les processus de détachement, de mobilité et d'invasion, d'angiogénèse et d'intravasation. **Les gènes de progression métastatique** sont impliqués dans la sélection clonale au sein des tumeurs primaires, mais vont aussi conférer des avantages lors de la colonisation métastatique ultérieure d'organes secondaires. Quant aux **gènes de virulence métastatique**, ils confèrent un avantage sélectif dans le tissu secondaire seulement. Ils peuvent participer à la colonisation du tissu secondaire, mais non au développement de la tumeur d'origine. Les gènes de virulence sont habituellement associés à la hausse du pouvoir métastatique des tumeurs envahissant les organes secondaires (Nguyen et Massagué, 2007).

## 1.6 Angiogénèse

L'angiogénèse, ou néovascularisation, est le processus biologique par lequel les précurseurs endothéliaux sont recrutés afin de former de nouveaux vaisseaux sanguins émergeant des vaisseaux sanguins préexistants (Chantrain *et al.*, 2006). Cette néovascularisation est essentielle à l'irrigation des tumeurs par le système sanguin. Dans le tissu normal, le système sanguin est hautement hiérarchisé et comprend des processus de maturation complexes afin de s'établir de façon adéquate. La maturation comprend le recrutement de cellules péri-endothéliales, soit les péricytes pour les capillaires et les cellules de muscle lisse pour les vaisseaux plus importants (Folkman et D'Amore, 1996). Par contre, l'angiogénèse prenant place dans la tumeur montre des lacunes en ce qui a trait à la différenciation et à la maturation des vaisseaux (Jain, 2005). Les vaisseaux sanguins tumoraux sont instables et anormalement perméables. Cette perméabilité accrue permet l'apport de macromolécules provenant du sang, amplifiant la formation de vaisseaux sanguins dans la tumeur (Carmeliet, 2003), mais surtout, facilite l'intravasation des cellules tumorales dans le sang à partir de la tumeur (O'Reilly *et al.*, 1997).

## **1.7 Apoptose**

L'apoptose est la forme de mort cellulaire programmée la plus courante chez les mammifères. Elle repose sur l'activation des protéases à cystéine, nommées caspases, pour induire la mort de la cellule (Salvesen et Dixit, 1997). Ce mode de contrôle de la prolifération est contourné chez les cellules métastatiques pendant plusieurs processus induisant normalement l'apoptose comme le détachement des cellules de la matrice extracellulaire, nommé anoikis, ou la perte du squelette d'actine, nommé amorphose (Streuli et Gilmore, 1999). L'inhibition de l'apoptose joue un rôle-clé dans l'intravasation des cellules cancéreuses ainsi que pour leur survie dans le système sanguin et dans le tissu secondaire (Wyckoff *et al.*, 2004). Bien que beaucoup de gènes puissent être impliqués dans l'inhibition de l'apoptose, les acteurs principaux de cette inhibition seraient la mutation des gènes de la famille de Bcl-2 (Del Bufalo *et al.*, 1997) et de p53 (Nikiforov *et al.*, 1996).

Les diverses néoplasies observées chez l'humain sont donc toutes imputables aux différents processus tumorigéniques et métastatiques expliqués ci-haut. Cependant, bien que les processus cellulaires/tissulaires menant au développement du cancer soient semblables pour l'ensemble des cancers (Hanahan et Weinberg, 2000), chaque type de néoplasie comporte ses particularités, selon le type cellulaire d'origine (Michor *et al.*, 2004).

## **2e partie : Le lymphome T non hodgkinien**

### **2.1 Définition de la leucémie et du lymphome**

Le lymphome représente la contrepartie maligne des cellules lymphoïdes (lymphocytes B et T) et compterait pour 6% à 10% de l'ensemble des néoplasies (Fisher et Fisher, 2004). L'apparition du lymphome peut être attribuable à plusieurs causes distinctes, soit les processus de recombinaisons somatiques des segments V(D)J (Schatz, 2004) régissant la maturation des immunoglobulines et du TCR, les hypermutations somatiques (Pasqualucci *et al.*, 2001) et la commutation isotypique (Papavasiliou et Schatz, 2002). En effet, ces processus de maturation des lymphocytes B et T sont

des causes majeures de translocations chromosomiques responsables de l'acquisition des caractères néoplasiques du lymphome (Rowley, 2001). L'infection par certains virus spécifiques, comme l'HTLV (Human T-cell Lymphotropic Virus) et l'EBV (Epstein Barr Virus) (Rüdiger *et al.*, 2002) ainsi que la mutation de certains gènes clés comme p53 dans la cellule peuvent aussi provoquer l'apparition du lymphome (Sakata *et al.*, 2004).

## **2.2 Le lymphome T non hodgkinien**

Le lymphome T non hodgkinien (LNH) se présente habituellement dans les biopsies comme une maladie extranodale accompagnée de nécrose/apoptose (Rizvi *et al.*, 2004a). Il représente environ 12% de l'ensemble des lymphomes et sa fréquence varie de façon importante dans le monde (International Lymphoma Study Group, 1997). Alors qu'il n'est que de 1,5% à Vancouver, il atteint 18,3% à Hong Kong. Cette variation est principalement due à l'exposition des communautés asiatiques à certains facteurs pathogéniques comme le HTLV-1 et l'EBV (Rüdiger *et al.*, 2002). Contrairement au lymphomes hodgkiniens (LH) qui sont caractérisés par les cellules de Reed-Sternberg (RS) ainsi que par un développement peu agressif et localisé (Brown et Nazmi, 2002), les lymphomes non hodgkiniens sont plus agressifs et diffus dans l'organisme (Rizvi *et al.*, 2004a). Environ 286 000 cas de LNH sont diagnostiqués chaque année dans le monde et environ 161 000 personnes en meurent, soit un peu plus d'une personne sur deux (Statistiques du centre de recherche international sur le cancer (CRIC) pour 2000 : [www.lymphomacoalition.org](http://www.lymphomacoalition.org)).

### **2.2.1 Classification des lymphomes non hodgkiniens**

En 1994, la « Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms » (REAL) fut créée par un groupe d'hématopathologistes à partir des classifications préexistantes de Kiel (Lennert *et al.*, 1975), Lukes-Collins (Lukes et Collins, 1974) et de la « Working formulation » (National Cancer Institute Study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas, 1982) afin de définir un système uniifié de classification et de diagnostic des lymphomes non hodgkiniens basé sur les caractéristiques morphologiques, immunologiques et génétiques (Harris *et al.*, 1994). La classification WHO/EORTC (World Health Organization/European Organization for Research

and Treatment of Cancer, voir tableau I) est aujourd’hui utilisée pour classifier les lymphomes non hodgkiniens (Burg, 2005). Cette classification se base principalement sur des informations histologiques, cliniques, cytogénétiques, immunophénotypiques et génétiques dans ses profils de classification.

**Tableau 1**  
**Classification WHO/EORTC des lymphomes T**

Classes	Types
Leucémique/ disséminé	Leucémie/lymphome de cellules T matures*
Nodal	Lymphome T périphérique, non spécifié Lymphome T angioimmunoblastique Lymphome anaplasique à larges cellules/cellules anergiques, systémique primaire
Extranodal	Lymphome T sous-cutanées à panniculites ** Lymphome T $\gamma\delta$ sous-cutané ** Lymphome T $\gamma\delta$ hépato-splénique Lymphome NK / T extranodal, type nasal ***

\* : Requiert la présence du HTLV

\*\* : Présence de EBV chez la plupart de patients atteints

\*\*\* : EBV joue un rôle dans l'oncogénèse

Adapté de Rizvi *et al.*, 2004

## 2.2.2 Grades et agressivité des lymphomes T non hodgkiniens

La classification clinique en grades histologiques divise les lymphomes en grades lent, intermédiaire et élevé, selon l’observation des tissus atteints. Le grade lent représente les lymphomes à faible progression alors que les grades intermédiaire et élevé sont associés à des lymphomes à moyenne et forte progression néoplasique et sont considérés comme agressifs (Prosper *et al.*, 1994). Cette classification est sujette à controverse car elle repose en grande partie sur l’expertise visuelle subjective du clinicien catégorisant les échantillons et peut donc varier de façon importante selon les différents cliniciens/groupes d’étude qui l’utilisent (Halaas *et al.*,

2003). La classification WHO/REAL détermine plutôt trois grades histologiques basés sur le nombre de cellules présentes par champ microscopique de fort grossissement (400X). Le Grade 1 (moins de 5 centroblastes / champ), le grade 2, (entre 6 et 15 centroblastes / champ) et le grade 3 (plus de 15 centroblastes / champ) (Zhang *et al.* 2007) ([www.lymphomation.org/grade.htm](http://www.lymphomation.org/grade.htm)).

### **2.2.3 Diagnostic du lymphome T non hodgkinien**

Le lymphome apparaît souvent à la base comme une inflammation de un ou plusieurs ganglions lymphatiques, condition appelée lymphoadénopathie ([www.lymphomation.org](http://www.lymphomation.org)). Plusieurs facteurs tels l'âge, le stade de développement, les niveaux sériques de déshydrogénase lactique et les sites de développement extranodaux affectent la réponse aux traitements et la survie des patients atteints de LNH (Shipp *et al.*, 1993). La méthode d'analyse multiparamétrique de cytométrie en flux et la caractérisation immunohistochimique, permettant l'analyse de la morphologie et des chaînes  $\gamma$  et  $\beta$  du TCR, sont deux méthodes de choix dans la détection et la classification des LNH et sont souvent utilisées en parallèle par les laboratoires d'analyses (Kaleem, 2006). L'analyse des antigènes CD1, CD2, CD4, CD5, CD7, CD8 et principalement CD3 par cytométrie en flux est aussi communément utilisée dans la détection de motifs d'expression spécifiques à certains LNH pour leur classification (Last *et al.*, 2005). L'absence ou la présence de certains antigènes spécifiques peut aussi donner des informations importantes quant au pronostic de l'évolution de la maladie (Thornton *et al.*, 2004). L'utilisation de biopuces à ADN (microarrays) pour dresser le profil d'expression génique (Gene Expression Profiling) des populations lymphocytaires s'est également révélée un outil important dans le diagnostic, le pronostic et la gradation des LNH au cours des dernières années (Glas *et al.*, 2005). L'analyse de l'expression de gènes liés aux LNH peut aussi s'effectuer par les techniques de RT-PCR/PCR qui, par l'utilisation d'amorces spécifiques, permettent de détecter de façon rapide et précise les ARNm de fusion de translocations chromosomiques spécifiques à certains types précis de lymphome (Dey, 2006).

## **2.3 Molécules d'adhésion cellulaire, tropisme et dissémination des lymphomes**

Étant donné la similitude entre le répertoire des molécules de surface des lymphocytes normaux et des lymphomes, il a été proposé que les LNH puissent utiliser des mécanismes de dissémination similaires à ceux des lymphocytes normaux lors de leur dissémination aux sites inflammatoires. Les interactions des lymphocytes circulants avec les endothéliums vasculaires forment un des points centraux de régulation du système immunitaire, contrôlant l'accès de sous-types spécialisés de lymphocytes dans les divers tissus et influençant la nature des réponses immunitaires et inflammatoires locales (Drillenburg et Pals, 2000). Au niveau moléculaire, ces interactions sont régies via des récepteurs et des ligands à la surface du lymphocyte et des cellules endothéliales ainsi que par les chimiokines présentes dans le milieu au même moment (Salmi et Jalkanen, 1997). La double spécialisation des lymphocytes et des cellules endothéliales en ce qui a trait à la composition spécifique des récepteurs d'adhésion et des ligands exprimés par chaque sous-type cellulaire, donne aux lymphocytes un tropisme sélectif dans les tissus de l'organisme (Drillenburg et Pals, 2000). Il a été démontré depuis plusieurs années que les interactions récepteurs d'adhésion-ligands régulaient également l'organisation du cytosquelette, le cycle cellulaire et la survie cellulaire des populations lymphocytaires (Ruoslahti et Reed, 1994). Dans le flux sanguin, les leucocytes circulants sont confrontés à des forces importantes. La coordination de la capture, de l'arrêt et de l'extravasation de ces cellules hors du flux sanguin repose sur plusieurs classes de molécules : les sélectines, la superfamille des immunoglobulines, les intégrines et les chimiokines (Alon et Dustin, 2007). La régulation de ces classes de molécules d'adhésion permet ainsi la mise en place de réponses immunitaires adéquates et ciblées (Worthy lake et Burridge, 2001).

Les **sélectines** sont les principales initiatrices de l'arrêt des leucocytes circulants sur les endothéliums vasculaires (McEver, 2002). Cette famille se compose principalement de trois molécules classées selon la localisation de leur expression lors de leur découverte (L pour lymphocyte, E pour endothelium et P pour plaquette) (Springer, 1994). Il est connu aujourd'hui que la P-sélectine est aussi exprimée sur les cellules endothéliales et que la L-sélectine est présente sur la majorité des leucocytes circulants et non uniquement sur les lymphocytes (Ehrhardt *et al.*, 2003). Lors de la liaison avec leurs ligands, les sélectines sont principalement

impliquées dans les processus de capture (tethering) et de roulement (rolling) des lymphocytes sur l'endothélium vasculaire. La L-sélectine est le récepteur principal de la capture leucocytaire dans les tissus lymphoïdes secondaires et aux sites périphériques de blessure et d'inflammation (Rosen, 2004).

Les **chimiokines** regroupent un ensemble de protéines solubles classées selon la conformation de leurs résidus cystéines à l'extrémité amino-terminale (Rossi et Zlotnik, 2000). L'activation *in situ* des intégrines présentes sur les leucocytes lors du roulement est rapidement induite par la liaison des chimiokines aux récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs) (Campbell *et al.*, 1998). Les chimiokines sont exprimées de façon spécifique selon le site et activent certains sous-types précis de lymphocytes (Campbell *et al.*, 1999). Par exemple, les chimiokines CCL21 et CXCL12 exprimées par les cellules endothéliales induisent, via des signaux « inside-out » et « outside-in », l'activation de LFA-1 chez les lymphocytes T et ainsi l'adhésion ferme à l'endothélium vasculaire (Shamri *et al.*, 2005).

Finalement, les **intégrines** jouent des rôles importants dans l'adhésion ferme et l'extravasation des leucocytes ainsi que dans leurs interactions avec la matrice extracellulaire (Alon et Dustin, 2007). Elles sont exprimées sous conformation latente, c'est-à-dire compactes et repliées sur elles-mêmes, et requièrent une activation *in situ* afin d'acquérir la capacité de liaison de haute affinité pour leurs ligands spécifiques (Takagi *et al.*, 2001). La force de liaison des intégrines à la surface des leucocytes est augmentée par des signaux de stimulation provenant des cellules endothéliales et ce, en quelques centièmes de secondes seulement (Beglovia *et al.*, 2002) (Carman et Springer, 2003). La signalisation d'activation dite « inside-out », confère alors la conformation allongée et active des intégrines (Nishida *et al.*, 2006). Les intégrines forment des oligomères avant la liaison de façon à générer une adhésion ferme (Cambi *et al.*, 2006). L'arrêt du roulement des leucocytes sur l'endothélium vasculaire est régi uniquement par les membres de la superfamille des intégrines et par leurs ligands de la superfamille des immunoglobulines, exprimés sur la surface endothéliale (Hynes, 2002). Les intégrines les plus importantes pour l'adhésion des leucocytes à l'endothélium vasculaire sont les membres de la sous-famille  $\beta 2$  (CD18), spécialement LFA-1 (CD11a/CD18 ou  $\alpha L\beta 2$ ) et Mac-1 (Myeloid specific integrin) via leur liaison à ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule-1) (Yang *et al.*, 2007). LFA-1 contribue à

l'adhésion de plusieurs façons : elle forme des regroupements, interagit avec les ligands et induit des changements au niveau du cytosquelette (Alon et Dustin, 2007), ce qui confère aux lymphocytes T une conformation amoéboïde permettant l'extravasation et la mobilité trans-endothéliales dans différents tissus (Geissmann *et al.*, 2005). Le tropisme lymphocytaire est donc dicté par la combinaison ponctuelle des sélectines, chimiokines intégrines et molécules dites « IG-like », telle qu'ICAM-1 (Campbell *et al.*, 1999).

## 2.4 Molécules d'adhésion et progression tumorale

Les molécules d'adhésion cellulaire participent de façon importante à la dissémination métastatique des cellules cancéreuses lors de maladies néoplasiques. En effet, il a été proposé que les interactions entre les cellules cancéreuses circulantes et les endothéliums vasculaires jouent un rôle primordial dans les processus métastatiques (Weis *et al.*, 2004). Bien que n'étant pas essentielles à la migration trans-endothéliale des cellules néoplasiques, ces molécules agiraient principalement en induisant l'activation bi-directionnelle des cellules tumorales et stromales lors des stades « post-implantation » dans les tissus secondaires (St-Pierre, 2005). Par exemple, l'expression de PSGL-1, le ligand de la P-sélectine, par les cellules tumorales est en corrélation avec leur potentiel métastatique (Rosen, 2004). De la même façon, une altération de l'expression des motifs sialyl Lewis X et A chez les cellules tumorales, a été associée à la progression tumorale et la métastasie chez l'humain (Kannagi, 2004). Plusieurs autres processus impliquant les molécules d'adhésion cellulaire peuvent agir dans la progression néoplasique. Les intégrines sont essentielles à la progression métastatique pour les signaux de prolifération et de survie cellulaire qu'elles induisent chez les cellules tumorales (Aoudjit *et al.*, 1998a). Finalement, les chimiokines, via le recrutement des cellules leucocytaires de l'hôte aux sites des tumeurs primaires et secondaires, induisent un profil d'inflammation chronique dans le tissu, profil connu pour promouvoir la progression tumorale (voir section 5) (Coussens et Werb, 2002).

Plusieurs études ont montré l'implication des molécules d'adhésion dans les processus métastatiques chez les lymphomes (Drillenburg et Pals, 2000). Par exemple, la L-sélectine contribue à la croissance du lymphome thymique (Bélanger et St-Pierre, 2005) et semble impliquée dans plusieurs néoplasies lymphocytaires comme les leucémies lymphocytaires

chroniques de cellules B, les leucémies dites « hair cell » et « mantle zone » ainsi que dans les leucémies méningiques (Ehrhardt *et al.*, 2003). De plus, les souris déficientes en ICAM-1 sont résistantes à la dissémination secondaire des néoplasies malignes (Aoudjit *et al.*, 1998b) et les lymphomes ne possédant pas LFA-1 à leur surface ont un pouvoir métastatique restreint (Soede *et al.*, 1998). Bien que les études récentes tendent à démontrer que ces molécules n'agissent pas directement dans les processus d'implantation et de migration, les molécules d'adhésion joueraient un rôle dans la métastasie du lymphome principalement en tant qu'inducteurs de signaux intracellulaires. En effet, des liaisons telles que LFA-1/ICAM-1 seraient responsables de l'activation de plusieurs gènes pro-métastatiques, comme certaines MMP, dans les cellules de lymphome (Aoudjit *et al.*, 1998a).

## **Section 3 : Les métalloprotéases de la matrice (MMP)**

### **3.1 Définition des MMP**

La première métalloprotéase de la matrice (MMP) fut découverte en 1962, lors de l'étude des processus régissant la métamorphose de la queue chez la grenouille *Xenopus* (Gross et Lapierre, 1962) alors que le dernier membre de la famille, la MMP-28 (epilysine), fut découvert seulement en 2001 (Lohi *et al.*, 2001). À l'origine, les MMP étaient classées selon leurs principaux substrats (collagénases, gélatinases, stromélysin, etc.). À mesure qu'il devint clair que les MMP remplissaient des fonctions diverses et complexes au sein de l'organisme, cette classification fut restructurée selon un système numéroté (MMP-1, -2, -3, etc.), basé sur l'ordre de découverte des différents membres (Egeblad et Werb Z, 2002). Ce système exclut cependant MMP-4, -5 et -6, qui furent retirés de la liste après que des études eurent démontré l'absence de protéine transcrive ou des séquences identiques à d'autres MMP (Woessner et Nagase, 2000). La famille des MMP comprend aujourd'hui 25 membres chez la souris et 24 chez l'humain (Greenlee *et al.*, 2007). Ces membres sont des endopeptidases dépendantes du zinc qui, lorsque mises ensembles, peuvent dégrader la quasi totalité des composantes de la matrice extracellulaire (Kossakowska *et al.*, 2000). Selon la MMP concernée, les conditions et le type cellulaire impliqués, l'expression des MMP peut être constitutive (ex : MMP-2) ou inducible (ex : MMP-9) (Zucker et Vacirca,

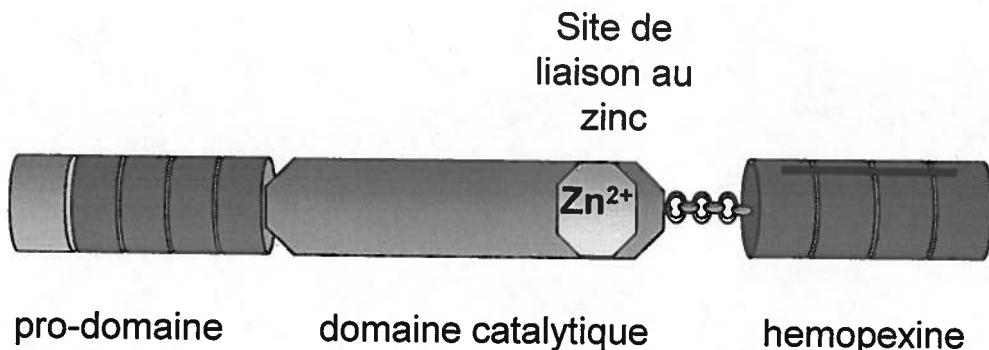
2004). Elles sont principalement produites et libérées par les cellules inflammatoires comme les macrophages, les neutrophiles, les mastocytes, les cellules dendritiques et les lymphocytes T (Coussens *et al.*, 2000) (Pollard, 2004). Les MMP jouent des rôles dans plusieurs maladies humaines auto-immunes, inflammatoires, cardiovasculaires et néoplasiques (Yan et Boyd, 2007). En effet, bon nombre d'études démontrent le lien existant entre les dérèglements de l'expression des MMP et le développement de cancers (Hanahan et Weinberg, 2000) (Egeblad et Werb, 2002) (Overall et Kleifield, 2006b). Dans le cas des LNH, plusieurs MMP sont exprimées de façon importante comparativement aux lymphocytes sains (Kossakowska *et al.*, 1998) (Kossakowska *et al.*, 1999).

### **3.2 Structures générales et régulation des MMP**

Les différents membres des MMP sont structurellement similaires (voir figure 1). Ils possèdent tous un domaine catalytique dépendant du zinc et un pro-domaine dont le clivage est nécessaire à l'activation de l'enzyme (Nagase et Woessner, 1999). Dans la forme inactive, le pro-domaine est replié sur le domaine catalytique par une liaison entre un résidu cystéine du pro-domaine et l'atome de zinc du domaine catalytique (Sternlicht et Werb, 2001). Finalement, une région charnière et un domaine hémopexine à l'extrémité carboxy-terminale sont responsables de la spécificité de substrat de chaque MMP (Zucker et Vacirca, 2004). Quelques exceptions existent cependant à ce propos, puisque les MMP-23, -26 et -27 ne contiennent pas les domaines charnière et hémopexine.

Les MMP sont synthétisées sous forme zymogène (proMMP) et sont sécrétées dans l'espace extracellulaire ou fixées à la membrane par la présence d'un segment transmembranaire, pour ensuite être clivées afin de dégrader localement leurs substrats respectifs (Yan et Boyd, 2007). La plupart des MMP sont ainsi activées à l'extérieur de la cellule par d'autres MMP ou par des sérine protéases (Brooks *et al.*, 1996). L'activité catalytique des MMP est régulée par plusieurs facteurs : l'expression génétique, la distribution dans l'espace (compartimentation), au niveau de la forme (pro-enzyme vs enzyme actif), selon la disponibilité et l'affinité des substrats ainsi qu'au niveau transcriptionnel par les signaux inducteurs extracellulaires (Parks *et al.*, 2004). L'activité des MMP peut être contrôlée par des inhibiteurs naturels, tels les TIMP (voir section 3.6.1) ou par

internalisation et dégradation par la cellule (Woessner et Nagase, 2000). Les niveaux d'expression des MMP varient selon les tissus et les conditions physiologiques telles l'inflammation, l'infection ou la tumorigénèse prenant place au sein de ces tissus (Parks *et al.*, 2004). Les cellules inflammatoires dans le tissu peuvent également régir l'activation/inhibition des MMP via les molécules réactives qu'elles sécrètent (Fu *et al.*, 2001).



**Figure 1 : Structure des métalloprotéases de la matrice (MMP).** Les différentes MMP possèdent une structure similaire : un pro-domaine qui doit être clivé lors de l'activation, un site catalytique dépendant du zinc et un domaine hémpoxine agissant sur la spécificité de substrat.

Il existe une **redondance** importante entre les substrats pouvant être clivés par les MMP, surtout pour les molécules de la matrice extracellulaire (Sternlicht et Werb, 2001). Cette redondance est régulée principalement par l'affinité des MMP pour les différents substrats ainsi que par la localisation spatiale de chaque MMP. Par exemple, l'affinité pour la gélatine est beaucoup plus grande pour MMP-2 et MMP-9 (gélatinases) que pour d'autres MMP possédant également un pouvoir gélatinolytique (Mackay *et al.*, 1990) alors que la séquestration des MMP, incluant MMP-2, MMP-7, MMP-9 et MMP-14, à la surface cellulaire est responsable de la dégradation tissulaire/matricielle localisée (Nakahara *et al.*, 1997).

### 3.3 La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) est une structure dynamique en relation directe avec les cellules du tissu (Mott et Werb, 2004). Les molécules formant la MEC sont hautement conservées dans l'évolution des animaux multicellulaires, spécialement celles engagées dans les interactions

cellules-matrice (Huxley-Jones *et al.*, 2007). Via plusieurs récepteurs spécifiques à la surface des cellules, les composantes de la MEC sont d'importants modulateurs des processus de développement et de maturation des tissus. De plus, les composantes de la MEC participent à la réponse des tissus face à divers stimuli que reçoit l'organisme (Rhodes et Simons, 2007). Au niveau cellulaire, les interactions cellule-matrice induisent une signalisation importante dans la différenciation, la migration et la survie cellulaire (Yan et Boyd, 2007). Les fonctions de la MEC sont diverses : elle sert de support pour l'intégrité tissulaire, de substrat de migration et de ligand pour les facteurs de croissance, cytokines et chimiokines (Werb, 1997). Bien que la quasi-totalité des cellules participant à sa formation, les principales cellules sécrétrices des composantes de la MEC sont les fibroblastes, les ostéoblastes, les cellules des muscles lisses et les cellules épithéliales (Yurchenko *et al.*, 2004). Deux classes principales de composantes forment la MEC : les protéines fibreuses (collagènes, laminines et élastines) et les glycosaminoglycans (GAG) (Rhodes et Simons, 2007). Les protéines fibreuses participent à l'échafaudage structurel de la matrice et à l'adhésion cellule-matrice, alors que les GAG, hautement hydratés et de texture gélantineuse, enrobent les protéines fibreuses et en augmentent la résistance aux forces de compression tout en laissant filtrer les nutriments du sang aux cellules (Yurchenko *et al.*, 2004).

### **3.4 Rôle des gélatinases dans l'organisme**

Les gélatinases (soit MMP-2 et MMP-9) participent à un nombre impressionnant de fonctions normales de l'organisme, principalement dans la formation et le remodelage des tissus. Chez les souris, l'absence de MMP-9 s'accompagne d'une déficience dans la formation des os longs du squelette (Vu *et al.*, 1998). La MMP-9 est également requise dans la réparation des os lors de fractures puisqu'elle y est fortement exprimée et que les os des souris MMP-9<sup>-/-</sup> guérissent plus lentement que ceux des souris normales (Colnot *et al.*, 2003). Chez l'humain, la mutation de MMP-2 induit la régression osseuse progressive (syndrome ostéolytique), le nanisme et l'arthrite (Martignetti *et al.*, 2001). La maturation des glandes mammaires et des tissus adjacents chez les femmes lors de l'adolescence, qui requiert un remodelage important de la matrice extracellulaire et des membranes basales afin de permettre la morphogenèse épithéliale et la vascularisation du tissu en croissance, implique également l'entrée en jeu de MMP-2 (Wiseman *et al.*, 2003).

Les gélatinases sont également indispensables à la régulation du processus d'inflammation, tant par des rôles pro-inflammatoires qu'anti-inflammatoires (Parks *et al.*, 2004). Une expression anormale des gélatinases est observée dans la quasi-totalité des maladies associées ou caractérisées par l'inflammation chronique (Nathan, 2002). Les gélatinases agissent sur plusieurs cytokines nécessaires à l'inflammation et aux processus de réparation de l'organisme, telles que l'IFN- $\beta$  (Nelissen *et al.*, 2003), le EGF (Suzuki *et al.*, 1997), le FGF (Levi *et al.*, 1996), le VEGF (Bergers *et al.*, 2000) et le TGF- $\beta$ 1 (Shull *et al.*, 1992). Les MMP-2 et MMP-9 activent également certains précurseurs, comme l'IL-1 $\beta$ , une cytokine pro-inflammatoire (Schonbeck *et al.*, 1998). Un autre rôle pro-inflammatoire des MMP se traduit par l'induction de chimiotactisme visant le recrutement des cellules inflammatoires dans les tissus (Haro *et al.*, 2000). Les gélatinases possèdent la capacité d'induire des gradients chimiotactiques via le clivage de chimiokines (CCL7, CCL12, CCL17, CXCL6 et CXCL8), participant ainsi de façon essentielle à la régulation des cellules inflammatoires présentes dans le tissu (Corry *et al.*, 2002) (Overall *et al.*, 2002). À l'inverse, ces deux MMP peuvent avoir des effets anti-inflammatoires en clivant la CCL-7, la CXCL1 et la CXCL4 en facteurs antagonistes, réduisant l'entrée des leucocytes dans le tissu (McQuibban *et al.*, 2000) (Van Den Steen *et al.*, 2003).

L'angiogénèse est une autre fonction de l'organisme dépendante des gélatinases. L'absence de MMP-9 produit un dérèglement dans l'angiogénèse des tissus osseux, bien que les niveaux de VEGF et VEGFR soient normaux (Zhou *et al.*, 2000). Lambert *et al.*, ont montré que l'angiogénèse est réduite chez les souris MMP2 $^{-/-}$ , MMP9 $^{-/-}$  et plus fortement encore dans le cas des doubles mutants MMP9 $^{-/-}$ /MMP2 $^{-/-}$ , soulignant une redondance dans le pouvoir gélatinase de MMP-2 et MMP-9 dans l'angiogénèse (Lambert *et al.*, 2003). De plus, l'absence de la MMP-9 diminuerait grandement l'épaisseur et la densité des couches de cellules périvasculaires (Chantrain *et al.*, 2004). Le clivage et la libération de VEGF par les gélatinases semblent avoir un rôle important dans l'angiogénèse (Page-McCaw *et al.*, 2007). La MMP-9 serait principalement responsable de la libération du VEGF de la matrice en plus de pouvoir aussi cliver le VEGF en une forme alternative. La forme clivée de VEGF induirait une augmentation du diamètre des vaisseaux alors que la forme entière induirait plutôt la formation de nouveaux vaisseaux par bourgeonnement (Lee *et al.*, 2005).

Bien que les gélatinases soient associées de façon classique à un rôle pro-angiogénique, certaines études montrent qu'elles auraient également des rôles anti-angiogéniques. En effet, la MMP-2 et la MMP-9 ont le pouvoir d'hydrolyser le plasminogène pour former un inhibiteur angiogénique efficace : l'angiotstatine (Dong *et al.*, 1997). Cet inhibiteur freine la migration et la prolifération des cellules endothéliales ainsi que la formation des tubules vasculaires, inhibant du même coup l'angiogénèse tumorale. D'autres inhibiteurs de l'angiogénèse peuvent être générés par les gélatinases à partir du domaine amino-terminal non-collagène 1 (NC1) de plusieurs types de chaînes  $\alpha$  de collagène : l'endostatine (chaîne  $\alpha$ 1 du collagène de type XVIII), la tumstatine (chaîne  $\alpha$ 3 du collagène de type IV), l'arrestine (chaîne  $\alpha$ 1 du collagène de type IV) et la canstatine (chaîne  $\alpha$ 2 du collagène de type IV) (Kalluri, 2003) (Nyberg *et al.*, 2005). La MMP-2 et la MMP-9 participent donc à la balance angiogénique tant par l'activation que par l'inhibition des processus angiogéniques.

### **3.5 Importance des MMP dans la progression tumorale**

La surexpression de plusieurs MMP dans les tumeurs primaires et/ou les métastases est associée à des processus tumorigéniques aussi variés que la croissance, la différenciation, la résistance à l'apoptose, le pouvoir invasif, la migration, la régulation de l'angiogénèse, le pouvoir métastatique, l'échappement des cellules cancéreuses à la surveillance immunitaire et de faibles taux de rémission chez les patients (Egeblad et Werb, 2002). Par exemple, la MMP-1 et la MMP-2 agissent dans la capacité des cellules humaines du cancer mammaire à métastaser de façon spontanée aux poumons chez les souris immunodéficientes (Minn *et al.*, 2005). Ensuite, la MMP-14 (MT1-MMP), un modificateur du microenvironnement tissulaire, est clairement associée à l'invasion et la croissance tumorale dans les modèles animaux (Hotary *et al.*, 2003) et dans la progression du cancer chez les patients humains (Zhai *et al.*, 2005). De la même façon, des études *in vitro* ont permis de démontrer que les MMP-7, -9, -10 et MMP-15 (MT2-MMP) exerçaient également des rôles protecteurs et anti-apoptotiques dans les cellules néoplasiques, aidant leur progression (Mitsiades *et al.*, 2001) (Meyer *et al.*, 2005). Par ailleurs, il est important de noter que les MMP engagées dans toutes ces étapes de la néoplasie y exercent des rôles souvent paradoxaux, tant pro-tumorigéniques qu'anti-tumorigéniques, selon la situation observée. Par exemple, une déficience génétique pour la MMP-8 accroît de façon importante la susceptibilité

des souris à développer des cancers de la peau (Balbin *et al.*, 2003) alors qu'une déficience en MMP-3 augmente les taux de croissance initiaux des tumeurs de la peau (McCawley *et al.*, 2004). Finalement, la capacité des MMP à libérer des facteurs pro-angiogéniques (VEGF, bFGF, TGF-1, etc.) est contre-balancée par leurs rôles dans l'inhibition de l'angiogénèse par la production d'antagonistes (endostatine, tumstatine, arrestine, angiotatine) (voir section 3.4).

Cette participation des différentes MMP aux processus tumoraux est associée tant aux MMP provenant de la tumeur qu'aux MMP sécrétées par les cellules péri-tumorales (Mueller et Fusenig, 2004). En effet, les cellules cancéreuses peuvent induire, de façon paracrine, une expression altérée de MMP dans les cellules péri-tumorales par la sécrétion de cytokines et de facteurs de croissance (Egeblad et Werb, 2002).

### **3.6 Développement d'inhibiteurs de MMP et essais cliniques**

#### **3.6.1 TIMP : Les inhibiteurs naturels des MMP**

Appelés « Tissue inhibitors of Metalloproteinases » (ou **TIMP**), les principaux inhibiteurs naturels endogènes des MMP comprennent quatre molécules, soit TIMP-1, -2, -3 et -4 (voir tableau 2), qui inhibent les MMP en se liant à leur domaine catalytique (Visse et Nagase, 2003). Les TIMP diffèrent dans leurs affinités avec les différentes MMP et, selon de récentes études, la liaison TIMP-MMP ne mène pas toujours à l'inactivation des MMP. Par exemple, la liaison du TIMP-2 (complexé à MMP-14) à MMP-2 serait nécessaire à son activation (Parks *et al.*, 2004). De plus, les TIMP peuvent avoir des rôles indépendants des MMP dans l'organisme, comme l'action de TIMP-3 dans l'inhibition de l'angiogénèse (Qi *et al.*, 2003).

Puisque les MMP sont liées à autant de processus néoplasiques différents, des études ont observé l'effet de la surexpression des TIMP sur la progression tumorale. La surexpression de TIMP-1 dans les souris inhibe les gélatinases, mais est associée à la tumorigénèse du carcinome et n'empêche pas la progression tumorale ou la métastasie (Rhee *et al.*, 2004). La surexpression de TIMP-1 s'est aussi soldée par une augmentation de 50% des tumeurs agressives fibromateuses (Kong *et al.*, 2004). Pour le TIMP-2, la surexpression dans les cellules cancéreuses peut réduire

la tumorigénèse, mais ne peut inhiber la métastasie, tel que montré dans un modèle de mélanomes métastatiques (Montgomery *et al.*, 1994).

**Tableau 2**  
**TIMP : les inhibiteurs endogènes des MMP**

<b>TIMP</b>	<b>Effet antiangiogénique</b>
TIMP-1	Inhibe la migration basale induite par le VEGF des cellules endothéliales
TIMP-2	Inhibe la prolifération des cellules endothéliales liée au bFGF
TIMP-3	Inhibe la migration et la prolifération des cellules endothéliales
TIMP-4	Inhibe la formation des tubules par les cellules endothéliales dans la membrane basale

Adapté de Jiang *et al.*, 2002 ; Oh *et al.*, 2004

### **3.6.2 Inhibiteurs synthétiques des MMP**

L'action protéolytique des MMP, spécialement des gélatinases, a été associée à plusieurs événements menant au développement du cancer et en particulier à la métastasie et l'angiogénèse des tumeurs cancéreuses (Krüger *et al.*, 2005). Il semblait donc approprié de développer des inhibiteurs spécifiques aux gélatinases afin de diminuer ou d'inhiber leur action dans la progression tumorale (Zucker *et al.*, 2000) (voir tableau 3). Malheureusement, les essais cliniques d'inhibiteurs de MMP effectués au cours des années se sont soldés par une déficience marquée dans l'efficacité thérapeutique ainsi que par des effets secondaires importants encourus lors des traitements (Coussens *et al.*, 2002).

La faible sélectivité des premiers inhibiteurs pour les différentes MMP serait une cause majeure des échecs obtenus, puisque la plupart des inhibiteurs testés étaient des chélateurs de zinc et ne faisaient aucune distinction entre les diverses protéases dépendantes du zinc (Matrisian *et al.*, 2003) (Pavlaki et Zucker, 2003). D'autres inhibiteurs furent alors conçus de façon à posséder une haute affinité de liaison pour certaines MMP particulières (Hidalgo et Eckhard, 2001). Malheureusement, même ces inhibiteurs firent preuve d'un manque important de sélectivité, en plus d'être cliniquement peu efficaces et d'induire des effets secondaires importants chez les patients (Brown *et al.*, 2004) (Hande *et al.*, 2004). Bien que les inhibiteurs synthétiques de

générations ultérieures produisent des effets intéressants sur l'angiogénèse et même sur la progression tumorale dans les modèles de recherche, les essais cliniques effectués avec les inhibiteurs synthétiques (MMPI) dans les thérapies contre le cancer ont donné des résultats décevants (Overall et Lopez-Otin, 2002).

La conception et l'amélioration d'inhibiteurs sélectifs de MMP dans la lutte contre le cancer se poursuit toujours aujourd'hui (Brown *et al.*, 2004) (Manello *et al.*, 2005) et il existe maintenant des inhibiteurs de MMP sélectifs à certaines classes, par exemple pour les gélatinases (Krüger *et al.*, 2005), ou même à certaines MMP particulières comme la MMP-2 (Ikejiri *et al.*, 2005). La phase la plus importante du développement de ces inhibiteurs de MMP est de vérifier *in vivo* l'inhibition des MMP visées, ce qui est possible grâce au dosage des produits de leur activité enzymatique (activity-based probe) dans les modèles murins (Saghatelian *et al.*, 2004).

**Tableau 3**  
Exemples d'inhibiteurs de MMP développés

Type	Inhibiteurs	Inhibe	MMP visées	Ref
<b>Collagène-peptide hydroxamate-zinc</b>	(BHPA)	angiogénèse tumeur primaire métastasie (foie, poumon)	MMP-2, MMP-9, MT1-MMP	(Maekawa <i>et al.</i> , 1999) (Lozonschi, 1999)
	KB-R7785		MMP-1, -3, -9	
<b>Peptidomimétique</b>	Batimastat BB-94	angiogénèse	---	
<b>Non peptidique Conformation 3D du site de liaison au zinc</b>	AG3340 tanomastat	---	---	(Vihinen et Kähäri, 2002)
<b>Analogue de tetracycline non- antimicrobien</b>	Metastat COL-3	Synthèse et activité des MMP	---	
<b>Extrait cartilage de requin</b>	neovastat Æ-941	Inhibe l'activité de MMP et de VEGFR-2	MMP-2, -9, -12, -13	
<b>« sulfhydryl- based »</b>	BMS-275291	Angiogénèse via VEGF et bFGF. Métastases (poumons)	MMP-1, -2, -7, -9 et MT1-MMP	(Naglich <i>et al.</i> , 2001)

Récemment, l'emploi d'un inhibiteur « spécifique » pour le site catalytique de la MMP-9, le SB-3CT, a produit des résultats intéressants dans un modèle de lymphome murin (L-Cl.5s T-cell lymphoma) (Krüger *et al.*, 2005). L'inhibiteur diminue de façon marquée la métastasie dans les tissus, sans toutefois empêcher le processus complètement. Il faut noter que les résultats obtenus avec des modèles murins ne garantissent pas l'efficacité du traitement lors des phases cliniques ultérieures chez l'humain. Il reste donc encore plusieurs étapes à franchir avant l'obtention d'inhibiteurs de métalloprotéases qui s'avèreront efficaces dans le traitement du cancer chez l'humain sans entraîner des effets secondaires importants.

## **Section 4 : La MMP-9 en particulier**

### **4.1 Définition de la MMP-9**

Tel que mentionné précédemment, la MMP-9 fait partie de la classe des gélatinases avec la MMP-2. Au niveau de leur structure, ces deux MMP sont caractérisées par trois insertions de domaines d'homologie avec la fibronectine de type II dans leur site catalytique, leur conférant un pouvoir catalytique particulier pour la gélatine (collagène dénaturé), les collagènes de type I, II, IV, V, VII et X, l'élastine, les acides gras, la thrombospondine, la fibronectine et la laminine (Bertoni *et al.*, 2001) (Visse et Nagase, 2003). La MMP-9 exerce des fonctions régulatrices de l'homéostasie des tissus en libérant des peptides-signaux et des facteurs de croissance lors de la dégradation de la matrice extracellulaire, mais aussi en activant des cytokines, facteurs de croissance et chimiokines (McQuibban *et al.*, 2001) (Hamano *et al.*, 2003) (Schonbeck *et al.*, 1998). Elle participe également au développement de plusieurs maladies humaines auto-immunes, inflammatoires et néoplasiques (Coussens et Werb, 2002) (Ram *et al.*, 2006). La MMP-9 est principalement exprimée par les macrophages, les neutrophiles, les lymphocytes et autres leucocytes en plus d'être exprimée de façon importante par une multitude de cellules néoplasiques dont les lymphomes hodgkiniens (LH) et non hodgkiniens (LNH) (Nelson *et al.*, 2000) (Ram *et al.*, 2006).

Tel que mentionné précédemment, une corrélation existe entre une forte expression de la MMP-9 et l'agressivité des LNH (Kossakowska *et al.*, 2000). Lors du développement des foyers néoplasiques, la MMP-9, principalement libérée par les cellules stromales péri-tumorales (Coussens *et al.*, 2000), favorise la progression tumorale surtout via la libération du VEGF contenu dans la matrice extracellulaire. En plus, elle intervient dans les processus métastasiques d'intravasation, d'extravasation et de colonisation des tissus secondaires (Bergers *et al.*, 2000).

## 4.2 Gène et promoteur de la MMP-9

La MMP-9 est encodée chez l'humain par le gène *CLG4B* (locus 20q11.2-q13.1), situé sur le chromosome 20, et qui comprend une séquence régulatrice de 2.2 kb, produisant un transcrit de 2,5 kb équivalent à la forme latente de 92 kDa de la protéine (proMMP-9). La séquence régulatrice du promoteur comprend un éventail particulièrement élevé de sites de liaison pour les facteurs de transcription, principalement situés dans les 670 p.b. en amont du site d'initiation de la transcription. Cette séquence inclut des sites AP-1, AP-2, (PEA)3/E-Twenty-six (Ets), NF-κB et Sp-1 (ST-Pierre *et al.*, 2004) qui sont conservés tant chez l'homme que chez le rat et la souris (Eberhardt *et al.*, 2000) et qui en font l'une des MMP aux motifs d'expression et de régulation les plus complexes (Opdenakker *et al.*, 2001). Au cours des dernières années, plusieurs études ont précisé le rôle de ces différents sites de liaison de facteurs de transcription dans l'expression de la MMP-9 par la cellule.

Le site **AP-1** (<sup>-79</sup> TGAGTCA <sup>-73</sup>) peut être considéré comme un des principaux sites dans l'induction transcriptionnelle de la MMP-9 par les cytokines et les esters de phorbol, une mutation de ce site inhibant complètement l'induction de la MMP-9 par le TNF $\alpha$ , un facteur de régulation tout aussi important (Sato et Seiki, 1993). L'induction maximale de la MMP-9 via l'AP-1 requiert cependant d'autres facteurs de transcription tels que le SP-1 (<sup>-563</sup> Boîte GC <sup>-558</sup>) et le NF-κB (-600) (ST-Pierre *et al.*, 2004). Le site **AP-2** est quant à lui principalement associé à l'expression de la MMP-9 dans les kératinocytes (Kobayashi *et al.*, 2001). Le site **NF-κB** (-600), un autre site majeur dans la transcription de la MMP-9, se trouve à proximité d'un site « IFN enhancer core séquence » (GGAATTCC) normalement retrouvé dans les gènes répondant à

l'interféron. Cette caractéristique explique que l'induction de la MMP-9 par le TNF $\alpha$  soit bloquée par un traitement à l'interféron de type I (IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ ) ou de type II (IFN $\gamma$ ) dans les cellules de sarcome EW-7 (Ewing's sarcoma) et de fibrosarcome humain U3A et 2Ftgh. Ceci est dû au fait que le NF- $\kappa$ B et l'Interferon Regulatory Factor (IRF)1, exprimé à la suite de l'exposition à l'interféron, compétitionnent pour la liaison au promoteur de la MMP-9. La balance entre l'IRF1 et le NF- $\kappa$ B (p50/p65) est donc critique dans l'induction de la MMP-9 dépendante du TNF $\alpha$  (Sancéau *et al.*, 2002). Le promoteur de la MMP-9 contient deux sites de liaison au NF- $\kappa$ B, un de sous-type p65 (-600bp) et un de sous-type p50 (-328bp) (Han *et al.*, 2001). Le site en -600bp régule la réponse à l'IL-1 $\beta$  (Yokoo et Kitamura, 1996), au Bcl-2 (Ricca *et al.*, 2000), à KiSS-1 (Yan *et al.*, 2001) ainsi qu'à certaines combinaisons synergiques de cytokines et facteurs de croissance (Bond *et al.*, 1998) et agit en coopération avec d'autres motifs, particulièrement AP-1 (Bond *et al.*, 2001). Le site PEA3 (GGAGAGGAAG), présent dans la majorité des MMP inductibles, lie les facteurs de transcription de type ETS tels ETS1 et ETS2, ERG, ELK1 et ELK2. Le promoteur de la MMP-9 comprend 3 sites PEA3 qui agiraient sur l'expression basale de la MMP-9 (Sato et Seiki, 1993) et en tant qu'activateurs (enhancers), en synergie avec d'autres facteurs de transcription tels NF- $\kappa$ B ( $^{-600}$ ), SP-1 ( $^{-563}$ ) et AP-1 ( $^{-79}$ ) (Gum *et al.*, 1996) (Watabe *et al.*, 1998). Les sites PEA3 (-541bp) et AP-1 (-533bp) augmentent l'activité transcriptionnelle du promoteur de la MMP-9 dans les cellules humaines de cancer du sein en réponse à l'EGF (Van den Steen *et al.*, 2002).

### **4.3 Inducteurs et cascades de transduction pour la MMP-9**

En 2002, Van den Steen *et al.*, ont compilé une liste exhaustive des inducteurs de la MMP-9 pour les différents types cellulaires, montrant ainsi le nombre impressionnant de modulateurs pour cette protéase (Van den Steen *et al.*, 2002). Les inducteurs principaux de la MMP-9 sont les cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\alpha$  et IL-1 $\beta$ , TGF- $\alpha$  et - $\beta$ , amphiréguline, TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ ), les facteurs de croissance (EGF, PDGF, HGF/SF, bFGF) et les esters de phorbol, comme la PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate) (Van den Steen *et al.*, 2002). Comme la MMP-9 comprend une multitude d'inducteurs différents, son induction peut se faire via plusieurs voies de transduction différentes au sein de la cellule selon la nature de l'agent inducteur ainsi que du type

cellulaire impliqué. L'induction de la MMP-9 est d'autant plus forte lorsqu'elle survient avec plusieurs inducteurs de classes différentes (e.g. PMA / cytokines / facteurs de croissance), travaillant en synergie et activant des voies de transduction parallèles (Han *et al.*, 2001). Bond *et al.*, donnent un bon exemple d'une telle synergie par l'induction de la MMP-9 avec le PDGF et le TNF- $\alpha$  dans des fibroblastes humain de la peau. Alors que le PDGF mène à l'expression du facteur de transcription AP-1, le TNF- $\alpha$  permet quant à lui le relâchement de NF- $\kappa$ B au noyau. La présence simultanée des deux facteurs de transcription permet alors l'augmentation marquée de la MMP-9 dans la cellule (Bond *et al.*, 2001).

#### **4.3.1 Activation via les protéines kinases C (PKC)**

Les **Protéines kinases C** (ou PKC) forment une famille de protéines agissant sur l'induction de la MMP-9 par la libération du NF- $\kappa$ B. Elles peuvent être séparées en trois groupes distincts, dont deux agissent dans l'induction de la MMP-9 : les PKC classiques et atypiques.

Les **PKC classiques** (PKC $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II et  $\gamma$ ) sont activées par le calcium, le dyacylglycérol (DAG) et les esters de phorbol (analogues synthétiques du diacylglycérol). Les esters de phorbol induisent l'activation des PKC et la cascade de transduction des MAPK (Van den Steen *et al.*, 2002). L'induction maximale de la MMP-9 par le PMA emprunte plusieurs voies distinctes et requiert la présence de plusieurs facteurs de transcription tels AP-1, NF- $\kappa$ B, Sp-1 et Ets (Genersch *et al.*, 2000). La cascade mitogène Raf-MEK-ERK (Genersch *et al.*, 2000) et la voie p38 (Simon *et al.*, 2001), induisent la libération de AP-1 menant à l'expression de la MMP-9 dans la cellule. La **PKC $\beta$**  jouerait un rôle-clé dans l'induction de la MMP-9 par le PMA dans les lignées cellulaires de leucémies myéloïdes telles HL-60 (Xie *et al.*, 1998).

Les **PKC atypiques** (PKC $\zeta$  et  $\lambda$ (souris)/ $\iota$ (humain) sont quant à elles insensibles au calcium et au diacylglycérol. La **PKC $\zeta$**  est la voie unique de transduction menant à l'expression de la MMP-9 par le NF- $\kappa$ B dans les cellules de gliome C-6 lors d'induction par l'IL-1 ou le TNF $\alpha$  (Estève *et al.*, 2002). La PKC $\zeta$  est associée à l'activation du NF- $\kappa$ B, en phosphorylant l'I $\kappa$ B- $\alpha$  (Diaz-Meco *et al.*, 1994a). L'oncogène Ras agirait également sur la PKC $\zeta$  pour activer le NF- $\kappa$ B dans les cellules néoplasiques (Diaz-Meco *et al.*, 1994b).

### 4.3.2 Activation via les MAPK

Les **MAPK** (mitogen-activated protein kinases) sont activées par des cytokines, des facteurs de croissance, des agents mitogènes, des hormones, le stress ou encore l'inflammation. Elles contribuent au contrôle de la croissance, de la différenciation et de la survie cellulaire (Lewis *et al.*, 1998) (Garrington et Johnson, 1999). L'activation des MAPK requiert la phosphorylation de résidus tyrosine et thréonine par les MAPK kinases (MAPKK) spécifiques, permettant leur translocation au noyau où elles activent les facteurs de transcription par phosphorylation (Cobb et Goldsmith, 1995). La transduction des MAPK mène donc à la libération/formation de divers facteurs de transcription tels le NF- $\kappa$ B, l'AP-1 et l'Ets-1 (Van den Steen *et al.*, 2002). Il existe trois voies distinctes pour les MAPK, mais plusieurs voies peuvent être activées simultanément dans l'induction de la MMP-9.

La **voie classique** est régulée par les signaux extracellulaires et passe par ERK1/2 (Extracellular Regulated Kinase). Cette voie est fortement activée par les stimulations provenant de facteurs de croissance et des esters de phorbol et de façon plus modérée par divers mécanismes cellulaires tels la différenciation et la migration (Van den Steen *et al.*, 2002). Certaines études montrent aussi un rôle de la voie ERK1/2 dans l'induction de la MMP-9 par le TNF- $\alpha$  dans les cellules endothéliales (Genersch *et al.*, 2000). La **voie JNK/SAPK** est plutôt induite par le stress métabolique et fait intervenir la protéine SAPK (stress-activated protein kinase). Les facteurs de croissance, comme l'EGF, ont la particularité d'induire de façon importante la MMP-9 en plus de déclencher une multitude d'altérations cellulaires (croissance, différenciation, morphogénèse, etc.) principalement via les récepteurs tyrosine kinase (RTK) (McCawley *et al.*, 1999). La transduction des récepteurs RTK passe souvent par les voies ERK1/2 et JNK afin d'induire la MMP-9 (Schlessinger, 2000). La production constitutive de la MMP-9 chez les cellules néoplasiques passerait principalement par l'activation constitutive des voies ERK (Simon *et al.*, 1999) et JNK (Gum *et al.*, 1996). Finalement, la troisième voie des MAPK est nommée **la voie p38**. L'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$  induisent la MMP-9 via les MAPK des voies JNK/SAPK et p38, menant à la liaison des facteurs nucléaires NF- $\kappa$ B et AP-1 (Baud et Karin, 2001). La capacité de *ras* à induire la MMP-9 est liée aux MAPK par les voies JNK et p38 (Gum *et al.*, 1996). La voie

p38 induirait également la stabilisation des ARNm de la MMP-9, menant à une expression plus soutenue de la protéine (Johansson *et al.*, 2000).

#### 4.4 Régulation de la MMP-9

L'expression de la MMP-9 par les cellules est régulées à plusieurs niveaux différents, soit la transcription, la synthèse, l'activation de la pro-enzyme, l'inactivation et la glycosylation (Ram *et al.*, 2006). Nair et Boyd produisaient en 2005 une liste de gènes régulateurs de la MMP-9, montrant la diversité des protéines cellulaires pouvant moduler l'expression de la MMP-9 de façon intracellulaire (Nair et Boyd, 2005). Dans certaines conditions, la MMP-9 atteint des niveaux d'expression de plus de 100 fois supérieurs au niveau basal (Van den Steen *et al.*, 2002) alors que, dans certaines cellules endothéliales et inflammatoires, les MMP sont emmagasinées dans des vésicules, plutôt que d'être sécrétées, afin de pouvoir être libérées rapidement au moment opportun (Opdenakker *et al.*, 2001) (Taraboletti *et al.*, 2002). Par contre, dans la majorité des types cellulaires, la MMP-9 est sécrétée immédiatement après sa traduction et est accompagnée par des niveaux variables de TIMP-1 et de MMP-2 (Van den Steen *et al.*, 2002).

Ainsi, les lymphocytes et monocytes activés sécrètent la MMP-9 selon la régulation induite par plusieurs classes de messagers chimiques, comme les cytokines, les chimiokines, les eicosanoïdes (prostaglandines, leucotriènes, etc.) et les peptidoglycans, ainsi qu'en réponse aux contacts cellulaires (Matache *et al.*, 2003) (voir tableau 4). Par exemple, bien que le TGF- $\beta$  inhibe la production de la majorité des MMP via c-Fos, TIE et AP-1 (Benbow et Brinckerhoff, 1997) et via la déstabilisation des ARNm (Rydziel *et al.*, 1997), il est aussi connu pour augmenter l'expression de la MMP-9 dans plusieurs types cellulaires dont les monocytes du sang et les kératinocytes (Wahl *et al.*, 1993) ainsi que dans plusieurs types néoplasiques comme les cellules cancéreuses de la prostate (Sehgal et Thompson, 1999) et les cellules métastasiques osseuses (Duivenvoorden *et al.*, 1999) via les voies ERK et p38 des MAPK.

**Tableau 4**  
**Quelques régulateurs de l'expression de la MMP-9**

Interactions / Molécules	Activité
<b>IL-1, TNF<math>\alpha</math>, IL-2</b>	<b>Stimulent la production de la majorité des MMP, dont la MMP-9</b>
<b>Contacts avec les cellules endothéliales</b>	<b>Augmentent directement l'expression de la MMP-9 dans les lymphocytes T et les monocytes via ICAM-1 / LFA-1</b>
<b>Contacts cellules - matrice extracellulaire</b>	<b>Régulent l'expression des gélatinases</b>
<b>IL-8</b>	<b>Stimule la dégranulation des neutrophiles (source importante de la MMP-9)</b>
<b>IL-4, IL-6, IL-10, IFN-<math>\beta</math></b>	<b>Inhibent l'expression de la MMP-9 dans plusieurs types cellulaires</b>

Adapté de Ram *et al.*, 2006

#### 4.4.1 Régulation post-transcriptionnelle de la MMP-9

En 1993 *Saarialho-Kere et al.*, montraient que la stimulation par le LPS de cellules prétraitées avec du PMA augmentait la demi-vie des ARNm de la MMP-9 (*Saarialho-Kere et al.*, 1993). Des études plus récentes montraient que l'induction de la MMP-9 par le TGF- $\beta$  s'accompagnait une synthèse *de novo* de molécules stabilisatrices des ARNm, un mécanisme de régulation post-transcriptionnelle faisant intervenir certaines MAPK cytoplasmiques (Chang et Karin, 2001). L'efficacité de transcription des ARNm de la MMP-9 par les polysomes varie également selon le type cellulaire étudié (Jiang et Muschel, 2002).

#### 4.4.2 Régulation post-traductionnelle et structure de la MMP-9

Trois sites de glycosylation (N-linked glycans) sont présents dans la MMP-9, soit un dans le pro-domaine et deux dans le domaine catalytique de la protéine (dont un est présent dans la majorité des MMP) (*Van den Steen et al.*, 2002). Elle possède également plusieurs sites de O-

glycosylation, dans les répétitions T/SXXP (domaine homologue au collagène V), liant les sucres et étant nécessaires à la forme tridimensionnelle de type « bottle-brush » de la protéine (Royle *et al.*, 2002). La glycosylation de la MMP-9 pourrait avoir comme principal effet de moduler la capacité du TIMP-1 à lier MMP-9 et la capacité de la MMP-9 à lier ses différents substrats (Van den Steen *et al.*, 2001).

La structure tridimensionnelle de la MMP-9 peut aussi varier selon le type cellulaire sécréteur. Habituellement, la MMP-9 se présente sous forme de monomère ou d'homodimères (Van den Steen *et al.*, 2002). Par contre, chez les neutrophiles, la MMP-9 est associée à la NGAL (Neutrophil Gelatinase-B-Associated Lipocalin) par des liaisons covalentes (Kjeldsen *et al.*, 1993) alors que, chez les macrophages, des liaisons covalentes l'associent plutôt à la « chondroitin sulfate proteoglycans » (Winberg *et al.*, 2000). Deux cystéines, Cys<sub>449</sub> et Cys<sub>615</sub>, seraient responsables de l'homodimérisation covalente de la MMP-9 et de l'hétérodimérisation de cette dernière avec NGAL. Le rôle de ces liaisons sur l'activité de MMP-9 semble encore peu étudié à ce jour.

#### **4.4.3 Adhésion cellulaire et contrôle transcriptionnel de la MMP-9**

L'adhésion ferme cellule-cellule, principalement avec les cellules endothéliales, induit la production de la MMP-9 dans plusieurs types cellulaires, dont les monocytes (Mostafa *et al.*, 2001), les mastocytes (Baram *et al.*, 2001) et les lymphocytes T (Aoudjit *et al.*, 1998a) via la liaison ICAM-1 / LFA-1 et en induisant les MAPK de la même façon que les cytokines et les facteurs de transcription. La liaison de CD40 à la surface des monocytes avec CD40L des lymphocytes T induit également la production de la MMP-9 (Schönbeck *et al.*, 1997). La liaison des cellules à l'endothélium ou à la matrice peut également induire la MMP-9 de façon indirecte en activant la production de cytokines et de facteurs de croissance qui, par action autocrine/paracrine, induiront la production de la MMP-9 dans la cellule, tel que mentionné dans la section 4.3 (Baram *et al.*, 2001).

La régulation de l'expression de la MMP-9 est aussi grandement régulée par la liaison des intégrines de la cellule aux composantes de la matrice. Déjà en 1989, Werb *et al.*, montraient que

les intégrines aux sous-unités  $\alpha/\beta$ , à la surface de la cellule, reconnaissaient certaines séquences d'a.a. sur les protéines de la MEC, comme la séquence Arg-Gly-Asp de la fibronectine (Werb *et al.*, 1989). Plus récemment, Vacca *et al.*, démontraient l'induction de la MMP-9 dans les cellules lymphoïdes mises en contact avec de la fibronectine, via la sous-unité  $\alpha_v$  des intégrines de surface (Vacca *et al.*, 2001). La surexpression de la sous-unité  $\beta_6$  des intégrines induit une augmentation marquée de MMP-2 et MMP-9 dans les cellules (Ahmed *et al.*, 2002) alors que les intégrines  $\alpha_M\beta_2$  et  $\alpha_3\beta_1$  stimulent également l'expression de la MMP-9 (Wize *et al.*, 1998). Le regroupement des intégrines induirait la transduction des MAPK, principalement par la voie ERK (via PI3K), mais également via les voies JNK (via Rho) et p38 (Juliano, 2002). L'intégrine  $\alpha_3\beta_1$  serait responsable du maintien de la production de la MMP-9 dans des cellules épithéliales transformées (DiPersio *et al.*, 2000) et dans des carcinomes mammaires (Morini *et al.*, 2000).

#### 4.4.4 Activation de la protéine MMP-9

Les formes proMMP-9 et MMP-9 ne possèdent pas les mêmes affinités de liaison. Par exemple, la forme proMMP-9 possède une affinité de liaison supérieure pour le collagène de type I et la gélatine, mais inférieure pour le collagène de type IV, comparativement à la forme active (Allan *et al.*, 1995). L'ablation des 73 a.a. de l'extrémité amino-terminale de la proMMP-9 (équivalent au pro-domaine) permet l'activation catalytique de la MMP-9 (Nair et Boyd, 2005). Ce clivage peut s'effectuer par une multitude de protéases et molécules distinctes : la trypsine, la cathepsine G, la chymase et les MMP-1, -2, -3, -7, -9, 13, -26 peuvent toutes cliver la proMMP-9 (Toth *et al.*, 2003). La plasmine, provenant du clivage du plasminogène par « l'urokinase plasminogen activator » (uPA) est également un activateur important de la proMMP-9 dans l'organisme (Lee *et al.*, 1999). MMP-9 peut aussi être activée de façon chimique, comme par l'acide hypochlorique dans le cas des neutrophiles (Ram *et al.*, 2006).

#### 4.4.5 Inhibition de l'activité enzymatique et de l'expression de la MMP-9

L'inhibition de l'activité enzymatique de la MMP-9 peut être provoquée par des inhibiteurs non-spécifiques comme l' $\alpha$ -macroglobuline (inhibiteur généraliste de protéases) ou par des inhibiteurs spécifiques comme les TIMP-1 et TIMP-3 (Lambert *et al.*, 2004). Le TIMP-1 possède

la plus grande affinité pour la MMP-9 et est une protéine inducible souvent exprimée en même temps que cette dernière. C'est donc l'équilibre entre les activateurs et les inhibiteurs de la MMP-9 qui dicte l'activité catalytique de cette dernière dans l'espace péricellulaire (Ram M *et al.*, 2006).

Plusieurs cytokines inhibent l'expression de la protéine MMP-9. Les cytokines IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$  et IFN- $\beta$  diminuent le niveau d'expression tant chez les cellules exprimant la MMP-9 de façon basale que chez les cellules à la surface desquelles l'expression de la MMP-9 a été induite (Van den Steen *et al.*, 2002). Les interférons IFN- $\gamma$  et IFN- $\beta$  agiraient via les cascades de transduction JAK/STAT, où les dimères STAT viendraient lier les motifs ISRE du promoteur de la MMP-9 et ainsi diminuer sa transcription (Ramana *et al.*, 2000). Finalement, tel que mentionné dans la section 3.5, plusieurs fragments bioactifs, générés par la MMP-9 lors du clivage des molécules de la MEC, inhibent son expression (Felbor *et al.*, 2000).

#### **4.5 Rôle de la MMP-9 dans la progression néoplasique**

La MMP-9 joue un rôle dans la plupart des processus menant à la progression néoplasique, dont la croissance primaire, l'angiogénèse tumorale, l'intravasation, la migration ainsi que l'invasion et la croissance des cellules métastatiques dans les tissus secondaires (Egeblad et Werb, 2002). Des études montrent en effet que l'absence de la MMP-9 diminue de 66% l'incidence tumorale et de 76% la grosseur des tumeurs dans un modèle de carcinome cervical chez les souris déficientes en MMP-9 (Giraudo *et al.*, 2004), alors qu'elle diminue grandement le nombre et la taille des tumeurs dans un modèle de cancer du poumon (Lewis lung carcinoma) (Itoh *et al.*, 1999). La MMP-9 est également associée à la diminution de l'apoptose chez les cellules néoplasiques (Bergers *et al.*, 2000). À des stades avancés, il est connu que la MMP-9 est exprimée de façon constitutive et importante par les cellules de LNH (Kossakowska *et al.*, 1998) ainsi que dans les lymphomes agressifs murins (Lalancette *et al.*, 2000).

#### **4.5.1 MMP-9 et angiogénèse tumorale**

Le rôle de la MMP-9 dans le phénomène d'angiogénèse a été observée tant *in vitro* (Seftor *et al.*, 2001) qu'*in vivo* (Vu *et al.*, 1998). En 2004, Chantrain *et al.*, ont mis en évidence des micro-vaisseaux significativement plus petits chez les souris déficientes en MMP-9 que chez les souris normales. Ils ont aussi déterminé que la MMP-9 agissait comme recruteur de péricytes autour des cellules endothéliales, un phénomène clé dans l'initiation de la néoangiogénèse, montrant l'importance de la MMP-9 dans le « switch angiogénique » nécessaire à la progression néoplasique (Chantrain *et al.*, 2004). Dans un modèle similaire, il a été établi que la transplantation de cellules hématopoïétiques normales dans des souris déficientes en MMP-9 restaurait le flux des cellules inflammatoires et la vascularisation des xénogreffes implantées, prouvant la capacité de MMP-9 à promouvoir la migration des cellules dans l'endothélium vasculaire et à augmenter la perméabilité de ce dernier (Jodele *et al.*, 2005). Ces observations sont principalement attribuables à la libération, par l'activité catalytique de la MMP-9, des facteurs de croissance comme le VEGF (Kalluri, 2003) et les TGF- $\beta$ 1 et TGF- $\beta$ 2 (Yu et Stamenkovic, 2000) emprisonnés dans la MEC. La MMP-9 peut aussi activer la cytokine pro-angiogénique et pro-inflammatoire IL-8, en plus de dégrader et d'inactiver le « angiogenesis inhibitor platelet factor-4 » (Opdenakker *et al.*, 2001).

#### **4.5.2 Invasion / migration / extravasation**

La MMP-9 entre en jeu dans la migration des cellules inflammatoires. Par exemple, elle est régulée à la hausse dans les lymphocytes T durant l'activation de ces derniers et aide à la transmigration dans les divers tissus de l'organisme (Leppert *et al.*, 1995). Il a été démontré que l'absence de MMP-9 diminue de façon importante l'intravasation des cellules cancéreuses (Kim *et al.*, 1998). La MMP-9 agirait en lien avec l'intégrine  $\alpha V\beta 5$  dans la dissémination des cellules néoplasiques aux tissus secondaires (De *et al.*, 2003). De la même façon, l'intégrine  $\alpha v\beta 3$  agit de concert avec la MMP-9 dans la régulation de la migration des cellules métastatiques du cancer du sein (Rolli *et al.*, 2003). Lors de l'extravasation, la MMP-9 joue un rôle dans la perméabilisation de l'endothélium et la diapédèse des cellules dans les tissus secondaires en plus de cliver ICAM-1 et d'ainsi diminuer l'entrée subséquente des cellules immunitaires (Sultan *et al.*, 2004).

#### **4.5.3 MMP-9 et métastasie**

La MMP-9 est la seule MMP dont l'expression est en corrélation avec la signature métastatique de la lignée parentale (Yang *et al.*, 2004). L'expression de la MMP-9 dans le cancer de la prostate est directement liée avec le potentiel métastatique et la survie des patients (Dong *et al.*, 2001), tout comme elle est associée à un mauvais pronostic dans le cancer du sein (Van Veer *et al.*, 2002) ainsi qu'à une augmentation des foyers métastasiques dans le mélanome, le carcinome (Itoh *et al.*, 1999) et dans le cancer du poumon (Hiratsuka *et al.*, 2002).

Les « clusters » hématopoïétiques pré-métastatiques expriment la MMP-9 (Kaplan *et al.*, 2005), ce qui induit la dégradation de la membrane basale et la libération du VEGF et du ligand soluble de *kit*, permettant le recrutement des cellules provenant de la moelle osseuse (Heissig *et al.*, 2002). La libération de ces composés altère le microenvironnement, attire les cellules tumorales circulantes et supporte leur croissance dans ces foyers pré-métastatiques (Hiratsuka *et al.*, 2002). La MMP-9 peut également agir de façon indirecte dans le tropisme métastatique par son action sur la libération de diverses chimiokines (voir section 3.4), créant ainsi des gradients chimiotactiques dans les différents tissus de l'organisme (Muller *et al.*, 2001). D'ailleurs, Coussens *et al.* ont observé que l'absence de la MMP-9 retardait l'apparition des caractéristiques hyperplasiques et métastasiques avec une diminution de l'incidence de la conversion maligne dans un modèle de carcinome épithelial de souris. Par la suite, les chimères de moelle osseuse, réintroduisant la MMP-9 au système, rétabissaient le pouvoir métastasique (Coussens *et al.*, 2002).

#### **4.5.4 MMP-9 et échappement à l'action du système immunitaire**

La MMP-9 agit de plusieurs façons dans la diminution de la réponse antitumorale, soit par l'activation du TGF- $\beta$  (Yu et Stamenkovic, 2000), le clivage de l'IL-2R $\alpha$  et surtout via le clivage d'ICAM-1. Le clivage de l'IL-2R $\alpha$  diminue les capacités prolifératives des cellules T associées aux tumeurs et donc leur activité immunitaire (Sheu *et al.*, 2001). Quant à lui, le clivage d'ICAM-1 augmente la résistance des cellules néoplasiques à l'activité cytotoxique des cellules T

et NK (Fiore *et al.*, 2002), puisqu'ICAM-1 intervient dans l'immunité antitumorale des lymphocytes T cytotoxiques et des cellules NK (Robertson *et al.*, 1990). Ceci explique partiellement le grand nombre de lymphocytes anergiques infiltrés dans les tumeurs (Rivoltini *et al.*, 2002). De plus, le clivage d'ICAM-1 sur l'endothélium vasculaire, empêche la liaison LFA-1 / ICAM-1, ce qui diminue l'entrée ultérieure des leucocytes au site tumoral (Sultan *et al.*, 2004). De ce fait, les seuls lymphomes capables de s'établir dans les souris ICAM-1<sup>-/-</sup> sont les lignées agressives exprimant MMP-9 de façon constitutive, puisque la liaison LFA-1/ICAM-1 est nécessaire à l'expression de MMP-9 (Aoudjit *et al.*, 1998a), qui elle, est nécessaire à l'extravasation des cellules circulantes vers le tissu secondaire (Sultan *et al.*, 2004).

## **Section 5 : Inflammation et environnement péritumoral**

### **5.1 Réaction inflammatoire, MMP et cancer**

La réaction inflammatoire chronique met en action un réseau complexe de cytokines pro-inflammatoires et de facteurs de croissance, faisant persister la réaction inflammatoire au sein du tissu atteint et formant un milieu pouvant favoriser la prolifération néoplasique (Dvorak, 1986). La production accrue et prolongée de ces médiateurs pro-inflammatoires tend à promouvoir la progression néoplasique plutôt que de l'enrayer (voir figure 2), principalement en diminuant l'efficacité des mécanismes immunitaires antitumoraux (Smyth *et al.*, 2004) (Ben-Baruch, 2006). En effet, une prolifération cellulaire soutenue dans un microenvironnement pro-inflammatoire chronique contenant des concentrations importantes de cellules immunitaires inflammatoires, de facteurs de croissance, de cytokines pro-inflammatoires et d'agents induisant des dommages génétiques tend à induire la transformation néoplasique dans les populations cellulaires (Coussens et Werb, 2002). Les molécules de stress oxydatif comme le NO, les superoxydes, le peroxyde d'hydrogène, l'acide hypochlorique et les dérivés oxygénés sont principalement responsables des dommages à l'ADN menant à la promotion néoplasique (Babior, 2000).

L'inflammation chronique péritumorale est due en grande partie à l'incapacité des cellules immunitaires à établir un phénotype anti-inflammatoire, nécessaire à la résolution de

l'inflammation dans le tissu. Cette incapacité est due en grande partie aux concentrations trop importantes de cytokines et de divers facteurs pro-inflammatoires sécrétés par la tumeur et induisant le recrutement constant de leucocytes au site en question, et donc la production *de novo* de molécules pro-inflammatoires dans le tissu (Kuper *et al.*, 2000). Cet état pro-inflammatoire chronique mène à la promotion et la progression néoplasique, la néo-angiogénèse, l'invasion des tissus avoisinants et la métastasie (Karin et Greten, 2005). La migration des cellules cancéreuses est également influencée de façon importante par les cellules inflammatoires (Wyckoff *et al.*, 2004), principalement via la production d'EGF et de CSF-1 (colony stimulating factor 1) par les macrophages (Goswami *et al.*, 2005).

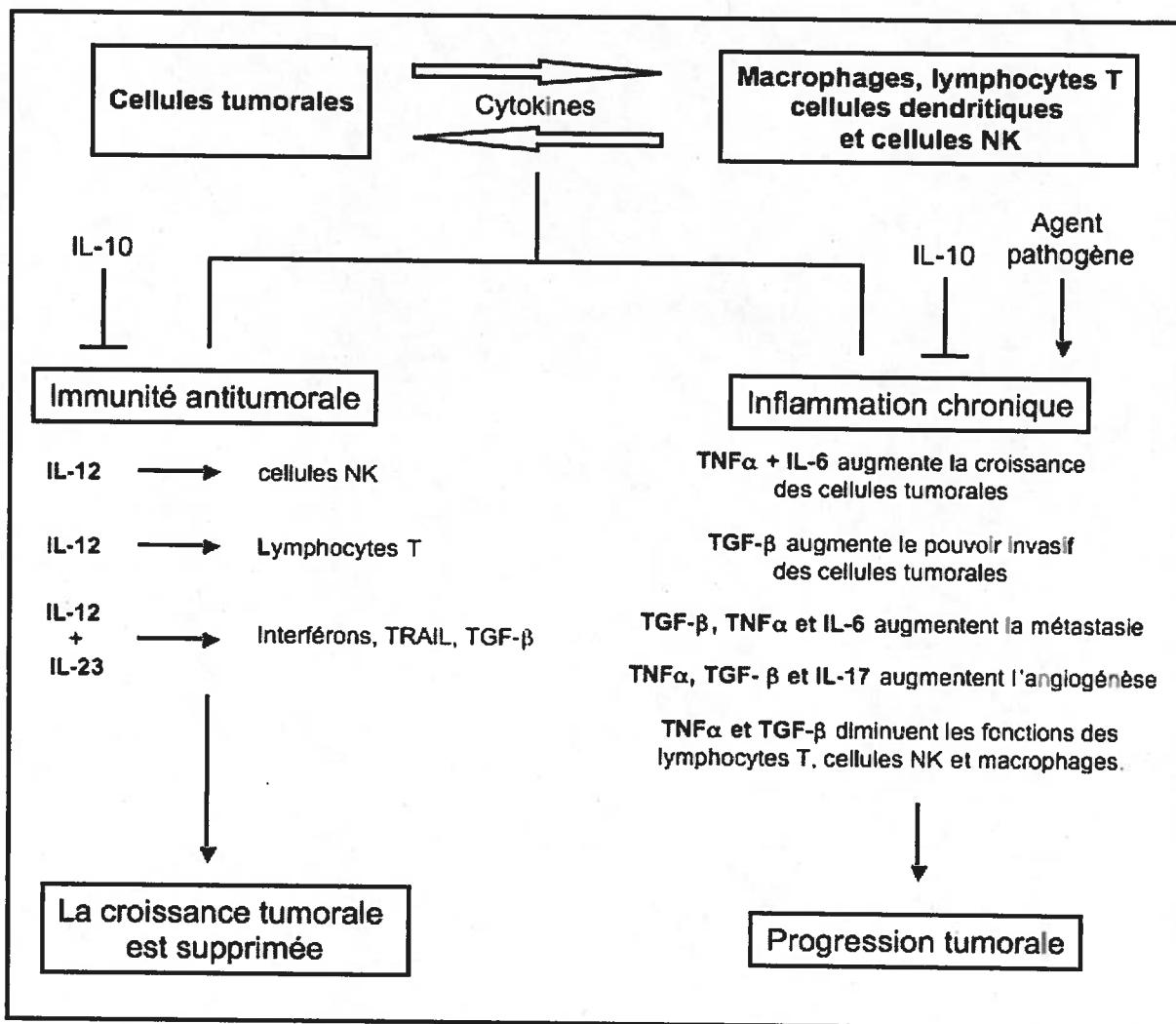
De récentes études dans des modèles murins montrent que l'inflammation joue un rôle primordial dans la mise en place d'un microenvironnement propice à la promotion et la progression tumorale, en partie via l'action du TNF $\alpha$  et de NF- $\kappa$ B (Karin et Greten, 2005). Il a été observé que la prise à long terme d'aspirine, ou d'autres anti-inflammatoires non-stéroïdiens, réduisait les risques de cancer colorectal de 40 à 50% et pouvait réduire le risque d'autre types de cancers tels que le cancer des poumons, de l'œsophage et de l'estomac (Baron et Sandler, 2000) (Garcia-Rodriguez et Huerta-Alvarez, 2001).

## 5.2 Les MMP dans l'environnement péritumoral

Les MMP peuvent promouvoir ou atténuer la progression tumorale en agissant sur plusieurs processus inflammatoires dans les néoplasies. Elles peuvent recruter les cellules inflammatoires en libérant des chimiokines de la MEC ou en générant des facteurs de croissance et ainsi augmenter l'inflammation (Egeblad *et al.* Werb, 2002), mais peuvent également générer des signaux cytostatiques diminuant la prolifération cellulaire (Sudakar *et al.*, 2003). Elles activent l'angiogénèse, mais produisent également des fragments anti-angiogéniques à partir du collagène et du plasminogène en plus de posséder des fonctions pro-apoptotiques ainsi qu'anti-apoptotiques (Egeblad et Werb, 2002).

Les traitements aux inhibiteurs de MMP donnent des résultats antitumoraux principalement durant les premiers stades de développement de la progression tumorale (Coussens *et al.*, 2002),

ce qui peut être attribuables à l'inhibition des processus pro-angiogéniques précoces des MMP dans le tissu inflammé (Overall et Lopez-Otin, 2002).



**Figure 2 : Inflammation → Immunité antitumorale vs inflammation chronique.** Différence entre les processus d'immunité antitumorale et d'inflammation chronique au sein du tissu et effet de l'inflammation chronique sur la progression tumorale.

Adapté de Lin et Karin, 2007

Les MMP sont des modulateurs essentiels des cellules inflammatoires et peuvent modifier la balance des cytokines inflammatoires et anti-inflammatoires ainsi que les chimiokines présentes dans le milieu, participant ainsi à l'amorce, l'exécution et la résorption de l'inflammation (Hu *et al.*, 2007). Creighton *et al.* démontrent en 2003, par l'utilisation de matrices d'ADNc, qu'il y

avait une corrélation significative entre l'expression de la MMP-9 et le développement des maladies inflammatoires, de la même façon qu'avec les maladies néoplasiques (Creighton et Hanash, 2003).

### **5.3 Types cellulaires exprimant la MMP-9 : le rôle des cellules péritumorales.**

L'expression de la MMP-9 dans l'inflammation chronique ainsi que dans les néoplasies n'est pas confinée uniquement aux cellules tumorales. Au contraire, des analyses immunohistochimiques ont révélé que la MMP-9 est souvent exprimée de façon plus importante par les cellules stromales péritumorales que par cellules tumorales (Nielson *et al.*, 1996). Ainsi, l'importante sécrétion de MMP-9 dans le lit tumoral a été associé aux lymphocytes T, monocytes et neutrophiles isolés des tumeurs (Leppert *et al.*, 1995). Owen *et al.* observaient en 2003 que, bien que les cellules tumorales de cancer mammaire exprimaient la MMP-9, les lymphocytes T infiltrés dans la tumeur exprimaient MMP-9 de façon plus importante et en rapport avec la taille de la tumeur observée (Owen *et al.*, 2003). De la même façon, la MMP-9 était principalement exprimée par les neutrophiles, les macrophages et les mastocytes plutôt que par les cellules néoplasiques dans le carcinome murin (Coussens *et al.*, 2000) et par les macrophages dans un modèle murin de carcinome ovarien (Huang *et al.*, 2002). L'expression de la MMP-9 est aussi associée aux cellules stromales péritumorales dans les cas de cancers colorectaux (Mook *et al.*, 2004).

Coussens *et al.* ont démontré que la MMP-9 sécrétée par les cellules inflammatoires est suffisante pour l'induction de la carcinogénèse dans le modèle murin HPV16 (carcinome épithelial produit par le virus du papillome humain de type 16) et serait surtout sécrétée par les neutrophiles (lors de la dégranulation), les mastocytes, les macrophages et les lymphocytes T (Coussens *et al.*, 2000). Bien que la source principale de MMP dans le microenvironnement péritumoral reste les cellules immunitaires, particulièrement celles de l'immunité innée, les études dans les modèles de cancers tant humains que murins montrent que les cellules épithéliales, vasculaires et stromales (e.g. fibroblastes) participent également à la production de MMP-9 (Coussens *et al.*, 2000). Par exemple, les cellules endothéliales, les péricytes et les cellules de muscles lisses du tissu expriment la MMP-9 et des facteurs de croissance tels que le HGF, le FGF et l'EGF, en réponse à la liaison du VEGF au VEGFR1 (Hiratsuka *et al.*, 2002) (Bhowmick *et al.*, 2004).

## **5.4 Modulateurs de l'expression de la MMP-9 dans l'inflammation**

Les niveaux d'expression de MMP-9 dans l'espace péritumoral sont grandement régulés par les diverses cytokines et facteurs de croissance sécrétés par les cellules néoplasiques et immunitaires, tels le TNF $\alpha$  et le TGF- $\beta$ 1 (Chang et Werb, 2001). La cascade de transduction de NF- $\kappa$ B est activée par plusieurs cytokines pro-inflammatoires et mène à la transcription d'une myriade de gènes agissant dans plusieurs processus, dont la libération de MMP-9 (Karin et Greten, 2005).

Des effets pro-tumorigéniques, liés de façon directe ou indirecte à l'induction de la MMP-9 dans l'inflammation, ont également été observés pour plusieurs autres médiateurs pro-inflammatoires tels l'IL-1, l'IL-6 (Haura *et al.*, 2005), l'IL-17 (Park *et al.*, 2005), l'IL-12 et l'IL-23 (Watford *et al.*, 2004). L'expression accrue de COX-2 et de prostaglandines (PGE<sub>2</sub>) est également en corrélation avec une hausse de l'expression de la MMP-9 dans divers types cellulaires, tels que les monocytes et les macrophages (Corcoran *et al.*, 1995). Enfin, les récepteurs Flt-1 (VEGFR-1) et Flk-1 (kinase domain region/VEGFR-2), qui sont connus pour être surexprimés dans plusieurs lignées cellulaires T leucémiques (Ferrera *et al.*, 2003), induisent une augmentation de la MMP-9 chez les lymphocytes T en contact avec le VEGF recombinant murin (rmVEGF), montrant la capacité de la liaison VEGF/VEGFR à induire la MMP-9 dans ces cellules (Owen *et al.*, 2003).

## **5.5 La MMP-9 tumorale versus la MMP-9 stromale**

Différentes études dans des modèles murins de lymphomes T ont montré que la MMP-9 est la principale MMP jouant un rôle dans l'agressivité et la métastasie du lymphome T aux organes secondaires (Arlt *et al.*, 2002) (Krüger *et al.*, 2005). Comme mentionné précédemment, la MMP-9 peut provenir de deux sources distinctes dans le développement néoplasique : les cellules cancéreuses de lymphome et les cellules péritumorales. Aoudjit *et al.*, montraient en 1997 que les souris ayant des lymphomes thymiques possédaient des taux de MMP-9 trois fois supérieurs aux niveaux normaux. Or, les cellules de lymphome T testées ne produisaient pas de MMP-9 *in vivo*, mais semblaient plutôt induire la sécrétion de cette protéase par les macrophages, les monocytes et les cellules stromales (Aoudjit *et al.*, 1997), augmentant ainsi les concentrations de MMP-9

dans le microenvironnement péritumoral (Owen *et al.*, 2003). L'expression de la MMP-9 par ces différents types cellulaires augmente, et accélère la progression néoplasique du LNH via l'induction de VEGF et l'activation du TGF $\beta$  (Yu et Stamenkovic, 2000). Le traitement avec le Prinomastat (AG3340), un inhibiteur de la MMP-9, ou l'ablation génétique de la MMP-9 chez l'hôte se traduit par la diminution du nombre et de la taille des vaisseaux sanguins dans la tumeur, montrant l'importance des cellules péritumorales de l'hôte dans la sécrétion de la MMP-9 et dans le développement du lymphome T (Chantrain *et al.*, 2004).

## **Section 6 : Modèle murin génétiquement modifié de déficience en MMP-9**

### **6.1 Pertinence du modèle**

Il y a déjà plusieurs années que les gènes humains et murins de la MMP-9 ont été comparés. La distribution et les séquences des 13 introns et exons du gène étant similaires entre les deux espèces (Masure *et al.*, 1993), il est pertinent de concevoir des modèles murins pour les études, dont les résultats pourront s'extraire à l'humain (Huhtala *et al.*, 1991).

### **6.2 Souris déficientes en MMP-9 : génération et phénotype**

Dans le modèle de Dubois *et al.*, les souris MMP-9<sup>-/-</sup> ont été générées par recombinaison homologue, grâce au vecteur *pPNT/mGEL-B*, contenant une cassette néomycine (NÉO : 1,840 bp), au niveau des introns 3-8 du gène MMP-9. Cette recombinaison homologue inhibe l'expression de la MMP-9 principalement en remplaçant les régions codantes pour le domaine catalytique (exons 3-4) et le site liant le zinc (exon 8) (Dubois *et al.*, 1999). Cette mutation entraîne la production d'un ARNm partiel qui ne permet pas la traduction d'une protéine MMP-9 complète et active. Les souris MMP-9<sup>-/-</sup> ainsi obtenues présentent quelques différences phénotypiques mineures comparativement aux souris de type sauvage desquelles elles sont issues, soit un léger retard au niveau de la croissance et la vascularisation des os longs des pattes

postérieures. Ce retard de l'ossification disparaît toutefois dans les trois à quatre premières semaines post-natales (Vu *et al.*, 1998). Corry *et al.*, font également état d'une déficience mineure chez ces souris en ce qui a trait à l'angiogénèse développementale et dans la formation du cartilage des articulations (Corry *et al.*, 2002).

Au plan moléculaire, et malgré les divers rôles joués par la MMP-9 dans la biologie des leucocytes, les souris déficientes en MMP-9 ne présentent pas d'immunodéficiences marquées (Van den Steen *et al.*, 2002). Les cellules polymorphonucléaires sont distribuées également dans les souris normales et déficientes en MMP-9 (Dubois *et al.*, 1999) et l'infiltration des tissus néoplasiques par les cellules inflammatoires n'est pas perturbée par l'absence de MMP-9 dans un modèle murin HPV16 (Giraudo *et al.*, 2004). Bien que la MMP-9 des leucocytes ait une action pro-angiogénique directe (Zijlstra *et al.*, 2005), celle-ci semble restreinte aux conditions particulières de l'environnement péritumoral puisque les souris adultes déficientes pour la MMP-9 n'ont pas une vascularisation significativement différente des souris normales (Chantrain *et al.*, 2004). De la même façon, les souris portant une double délétion génétique pour les deux gélatinases, soit les souris MMP-2<sup>-/-</sup>/MMP-9<sup>-/-</sup>, sont viables et ne présentent que des différences mineures en ce qui a trait à l'inflammation, au remodelage microvasculaire et à la mobilisation leucocytaire (Baluk *et al.*, 2004) (Corry *et al.*, 2004). Finalement, les souris déficientes en MMP-9, comme l'ensemble des souris déficientes pour une ou plusieurs MMP, expriment des niveaux d'expression d'IL-6 anormalement élevés (Ashizawa *et al.*, 2005) (Cesari *et al.*, 2003).

## **Chapitre II**

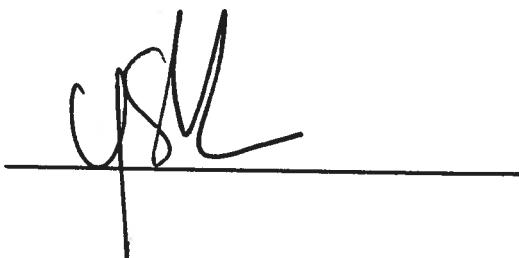
**Triggering of T cell leukemia and dissemination T cell lymphoma**

**In MMP-9-deficient mice**

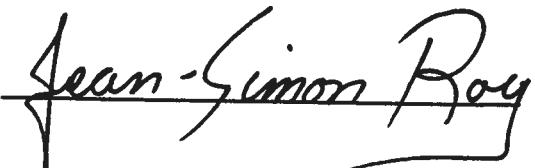
## **Collaboration des auteurs**

J'ai effectué, sous la direction du Dr. Yves St-Pierre, l'ensemble des travaux de recherche des figures présentées dans l'article de ce mémoire. Céline Van Themsche et Mélanie Demers ont participé, avant mon arrivée au laboratoire, à la production des lignées cellulaires de lymphome T déficientes en MMP-9 à partir des souris MMP-9-déficientes générées par les Drs Ghislain Opdenakker et Bernd Arnold.

**Signature du directeur de recherche :**

A handwritten signature consisting of stylized initials, possibly 'YSP', followed by a surname.

**Signature de l'étudiant :**

A handwritten signature of the student's name.

## **Sommaire du travail expérimental**

### **Hypothèses, objectifs et résultats des travaux :**

On sait depuis plusieurs années que les métalloprotéases de la matrice (MMP) jouent divers rôles dans le développement tumoral, notamment dans le développement des lymphomes non hodgkiniens (NHL). Il a été démontré que les lignées agressives de lymphome T expriment la MMP-9 de façon importante et constitutive. Cette gélatinase est connue pour dégrader le collagène de type IV (constituante majeure des membranes basales). Plusieurs études récentes attribuent cette surproduction de MMP-9 à la fois aux cellules cancéreuses et aux cellules péritumorales.

L'objectif principal du travail présenté dans l'article était de déterminer l'importance relative de la sécrétion de la MMP-9 par les cellules du lymphome et par les cellules péritumorales dans la croissance et la métastasie du lymphome T. Les études *in vivo* effectuées ont démontré que l'injection de lymphome T MMP-9<sup>-/-</sup> par voie intraveineuse mène à l'infiltration des cellules cancéreuses dans divers organes non lymphoïdes (foie, rate, reins) chez la souris et ce tant chez les souris exprimant MMP-9 que chez celles ne l'exprimant pas. Comme l'infiltration de cellules cancéreuses déficientes en MMP-9 peut être observée en totale absence de MMP-9, il semble donc que cette métalloprotéase, contrairement à ce qui a déjà été avancé, ne soit pas essentielle à la prolifération et à l'infiltration des lymphomes T non hodgkiniens dans l'organisme. Les résultats obtenus dans cette étude ont été publiés dans le périodique *Leukemia* en septembre 2007.

#### **Référence :**

**Roy J-S, Van Temsche C, Demers M, Opdenakker G, Arnold B, St-Pierre Y. 2007. Triggering of T cell leukemia and dissemination of T cell lymphoma in MMP-9-deficient mice. Leukemia, Sept. 2007 (e-pub ahead of print).**

[www.nature.com/leu/journal/v21/n12/abs/2404936a.html;jsessionid=97696648DCD8E8B28D5CD579B3E8A470](http://www.nature.com/leu/journal/v21/n12/abs/2404936a.html;jsessionid=97696648DCD8E8B28D5CD579B3E8A470)

*LEUKEMIA*

**Triggering of T cell leukemia and dissemination T cell lymphoma**

**In MMP-9-deficient mice**

**Running title:** T cell lymphoma in MMP-9-deficient mice

Jean-Simon Roy <sup>1</sup>, Céline Van Themsche <sup>2</sup>, Mélanie Demers<sup>1</sup>, Ghislain Opdenakker <sup>3</sup>, Bernd Arnold <sup>4</sup> and Yves St-Pierre <sup>1,5</sup>.

<sup>1</sup>INRS-Institut Armand-Frappier [J.S.R., Y.S.P.] University of Québec, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7, <sup>2</sup> Department of Chemistry Biology, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, QC, Canada, G9A 5H7, <sup>3</sup> Laboratory of Immunobiology, Rega Institute, University of Leuven, Leuven, Belgium [ G.O.], and <sup>4</sup> Laboratory for Molecular Immunology, German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany [ B.A.]

<sup>5</sup> To whom requests should be addressed:

INRS-Institut Armand-Frappier,  
University of Quebec,  
531 Boul. Des Prairies,  
Laval, Québec, Canada, H7V 1B7.  
Phone : 450-686-5354  
Fax : 450-686-5501  
E-mail : [yves.st-pierre@iaf.inrs.ca](mailto:yves.st-pierre@iaf.inrs.ca)

**ABSTRACT:**

Previous studies have shown that high levels of MMP-9 can be detected in the serum of patients with various lymphoid malignancies and in leukemia/lymphoma culture supernatants. Indeed, aggressive forms of lymphoma constitutively produce MMP-9 and its elevated levels in the serum or in tissues correlate with advanced stage and poor patient survival. In vitro, MMP-9, which is also produced by the host peritumoral cells in response to the presence of tumors, plays an important role in migration of tumor cells through artificial basement membranes or endothelial cells. In this study, using mmp-9-deficient mice, we show that absence of MMP-9 does not prevent the development of primary T cell leukemia. Furthermore, MMP-9-deficient cell lines retained their tumorigenic potential, as shown by their ability to induce thymic lymphoma in young syngeneic wild-type animals. In addition, these MMP-9-deficient tumor cells disseminate in normal mice, or mice that are deficient for MMP-9, indicating that tumor growth and dissemination can occur in total absence of MMP-9. These results show for the first time than lymphoma growth can occur in total absence of MMP-9 and have consequences for therapy of invasive cancers with inhibitors of MMPs.

**Key words:** T cell leukemia, thymic lymphoma, MMP-9, knock out mice.

## **Introduction**

Matrix metalloproteinases (MMPs) have been recognized as extracellular enzymes that favour the development of cancer by enhancing escape of individual tumor cells from the primary tumor and the growth of metastasis <sup>1-3</sup>. For these reasons, several strategies have been developed to inhibit their expression or enzymatic activity in different types of cancer <sup>4</sup>. The failure of these strategies have often been attributed to the complexity of MMP expression pattern since in many types of cancer, MMPs are expressed by both the cancer cells and cells from the host <sup>5-7</sup>. *In vitro* and *in vivo* studies have reported that an elevated expression of MMP-9 correlates with clinically aggressive tumors, including high-grade non-Hodgkin's lymphomas (NHL) <sup>8,9</sup>. NHL patients with high levels of MMP-9 in their tissues have a significantly worse prognosis than patients who do not express MMP-9 <sup>9</sup>. MMP-9 expression is also markedly increased in high grade Burkitt cell lines and in primary T leukemic cells derived from adult T-cell leukemia (ATL) patients <sup>10,11</sup>, suggesting that overexpression of MMP-9 in HTLV-I- infected T leukemic cells or lymphoma cells is responsible for the invasiveness of these cells in peripheral organs. These observations in the human are correlated with results obtained in experimental mouse models. For instance, abnormally high levels of MMP-9 have been found in radiation-induced thymic lymphomas and in the serum of T lymphoma bearing mice<sup>12</sup>. Moreover, overexpression of MMP-9 in T lymphoma cells accelerates the growth of thymic lymphoma<sup>13</sup> and treatment with gelatinase inhibitors has been found to significantly reduce the number and the growth rate of experimental metastases induced by injection of T lymphoma cells into normal mice<sup>14</sup>. Nevertheless, clinical trials with MMP inhibitors have been frustratingly negative, because of their unselectivity and the ignorance of the complete biology of any MMP member. In addition, whether lymphoma growth or dissemination can occur in total absence of MMP-9 remains untested to date.

## **Material and Methods**

**Animals.** Male and female *mmp-9*-deficient, in which the exons and corresponding introns 3–7 and about half of exon 8 (2,067 bp total) were deleted and replaced by the neomycin resistance gene (*neo*; 1,840 bp)<sup>15</sup> were backcrossed for at least eight generations into a C57BL/6 background, and wild-type C57BL/6 were bred in our animal facility and maintained under specific pathogen-free conditions in accordance with institutional guidelines. All animal studies were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee.

**Radiation-induced T thymic lymphoma.** For thymic lymphoma induction, four- to eight-week-old normal and MMP-9-deficient C57BL/6 mice received a whole-body leukemogenic X-ray treatment of 4 x 175 rad at a rate of 25 rad/min at weekly intervals. When moribund, mice were killed and thymic lymphoma was confirmed at necropsy as previously described<sup>16</sup>.

**Culture of cell lines and reagents.** The mouse T lymphoma cell line 164T2 was established in our laboratory from radiation-induced primary T cell lymphomas in C57BL/6<sup>17</sup>. Flow cytometric analysis of these cells, as well as those of the S11 variant, showed that both cells express LFA-1, CD31, CD62L, CD90, ICAM-1, ICAM-2, but not  $\alpha 4\beta 1$ . They all express CD3 $\varepsilon$  and the TcR $\alpha\beta$ , as well as the gp70 and the TL antigen<sup>18</sup>. All cells were maintained in RPMI-1640 complete medium (supplemented with 10 % (v/v) FCS, 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES buffer, 0.1 unit/ml penicillin, 50  $\mu$ g/ml streptomycin and 55  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoethanol). All products were from GIBCO Life Technologies (Burlington, ON, Canada). All other reagents were purchased from Sigma, unless otherwise indicated.

**PCR genotype analysis.** The genotypes of the MMP-9-deficient mice and wild-types were confirmed by PCR from genomic DNA obtained from tail biopsies. The primers used for amplification of the normal allele were 5'-ACAGGCATACTTGTACCGCTATGG-3' (sense) which is specific for the exon II of the murine mmp-9 gene and 5'-GAAGCAGCGACTAGGGATTGTGGG-3' (antisense) which is specific for intron III were used to detect the normal (N) allele (a 700 bp amplicon) in both mmp-9-deficient mice and radiation-induced thymic lymphoma cell lines derived from these mice). To detect the mutated allele (M), an antisense primer (5'-AACGAGATCAGCAGCCTCTGTTCC -3') specific for the *neo* cassette used to disrupt the *mmp-9* gene<sup>15</sup> was used for PCR analysis. The 5'-CGGAGTCAACGGATTGGTCGTAT-3' (sense) and 5'-AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3' (antisense) primers were used for the amplification of the *GAPDH* gene as a control. Amplification was performed in a PTC-100 thermal cycler (MJ Research, Waltham, MA) using the following protocol: 120 s at 94°C and then 35 cycles of three steps consisting of 60 s at 94°C, 60 s at 58°C, and 60 s at 72°C. The reaction mixture was size-separated on an agarose gel, and specifically amplified products were detected by ethidium bromide staining and ultraviolet transillumination.

**Zymography.** Zymography was performed in polyacrylamide gels that had been cast in the presence of gelatin as previously described<sup>18</sup>. Briefly, samples (100 µl) were resuspended in loading buffer and, without prior denaturation, were run on a 7.5% SDS-polyacrylamide gel containing 0.5 mg/ml of gelatin. After electrophoresis, gels were washed to remove SDS and incubated for 18 h at 37°C in a renaturing buffer (50 mM Tris, 5mM CaCl<sub>2</sub>, 0.02% NaN<sub>3</sub>, 1%

Triton X-100). Gels were subsequently stained with Coomassie brilliant blue G-250 and destained in 30% methanol/ 10% acetic acid (v/v) to detect gelatinase secretion.

**Tumorigenic and metastasis assays.** Four-five week-old male or female C57BL/6 mice were injected intrathymically in each lobe with the indicated number of lymphoma cells. Mice were observed periodically for clinical signs of thymic lymphoma: runting, swelling of the thorax, and dyspnea. When moribund, mice were killed and thymic lymphoma was confirmed at necropsy. To induce lymphoma in peripheral organs, mice at least 6-8 week-old were injected via the tail vein with the indicated number of lymphoma cells <sup>18</sup>. When clinical signs of lymphoma became evident (dyspnea, runting, and splenomegaly), the animals were killed and spleen, kidneys, and liver harvested, weighed and fixed in 10% formalin for histological examination or frozen for PCR analysis.

**RNA isolation and semi-quantitative PCR.** Total RNA was isolated from tissues or lymphoma cells using Trizol reagent according to the manufacturer's instructions (Invitrogen Canada Inc., Burlington, ON). Two micrograms of total RNA were reverse transcribed using the Omniscript<sup>TM</sup> reverse transcriptase (QIAGEN) and PCR amplified using the following conditions: 94°C for 0.5 min., 58°C for 1 min., and 72°C for 1 min. This was followed by a final extension step at 72°C for 10 min. The primers used for PCR amplification were (5'-CGAGTGGACCGCACCGTAGTTGG-3') for sense murine MMP-9 and (5'-CAGGCTGAGCACGCCATACAG-3') for antisense, (5'-CGGAGTCACGGATTGGTCTGTAT-3') for sense GAPDH and (5'-AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3') for antisense. Amplifications were performed in a thermal cycler (model PTC-100 TM, MJ Research, Watertown, MA). PCR assays using equal amounts of

RNAs that were reverse-transcribed and amplified by PCR for 25–40 cycles with gene-specific primers confirmed that the amplification was in the linear range for each gene. Furthermore, each assay was repeated two to four times to verify the accuracy of the results. As an internal control, amplification of GAPDH mRNA was carried out by RT-PCR using specific primers. Amplified products were analyzed by electrophoresis on agarose gels using ethidium bromide staining and UV illumination. Loading was equalized to the internal control mRNA.

**Statistical analysis.** Comparisons between different groups for tumor uptake and survival distribution (mean survival time) were made using a log-rank test. The level of significance was determined at  $P < 0.05$ .

## Results and Discussion

To determine whether leukemogenesis can occur in absence of MMP-9, we have compared the incidence of radiation-induced leukemia in normal and in MMP-9-deficient mice. Such a model (4 weekly doses of 175 cGy) results in thymic lymphomas in most of the animals after a latency period varying between 3 and 6 months<sup>17</sup>. Our results showed that T cell leukemogenesis occurred in all mice treated with the radioleukemogenic regimen (**Fig. 1**), whether or not MMP-9 was present. Moreover, the absence of MMP-9 did not significantly accelerate or delay the onsets of thymic leukemia, as the mean survival time (MST) in wild type and MMP-9-deficient mice ( $150.8 \pm 34.6$  days *versus*  $149.2 \pm 21.7$  days respectively) in both groups of mice was similar ( $p > 0.05$ ).

Since MMP-9-deficient mice did develop thymic lymphoma upon exposure to radiation, we took advantage of this opportunity to generate MMP-9-deficient T lymphoma cell lines to test whether absence of MMP-9 in lymphoma cells can affect their tumorigenic potential and their ability to

disseminate at distant sites after their intravenous injection in normal and MMP-9-deficient animals. Two MMP-9-deficient T lymphoma cell lines, lines 2325 and 2333, were thus established from two different tumors that were collected from MMP-9-deficient mice. These cell lines were characterized at the genomic level and the presence of the homozygous mutation at the *mmp-9* locus was confirmed by PCR on the genomic DNA (**Fig. 2A**). Moreover, their inability to express MMP-9 either constitutively or following stimulation with PMA, a pharmacological agent known to stimulate MMP-9 in most cell types<sup>19</sup>, including lymphoma cells, was confirmed at the mRNA and protein level by RT-PCR (**Fig 2B**) and gelatin zymography (**Fig 2C**). The MMP-9 deficiency in these leukemic cells did not affect the levels of MMP-2, or other MMP tested, including MMP-3, MMP-10, and MMP-7 as compared to 164T2 lymphoma cells (**Fig. 2B and 2C**, and *Data not shown*). Most importantly, we found that both MMP-9-deficient cell lines retained their tumorigenic potential, as shown by their ability to induce thymic lymphoma following intrathymic injection in young syngeneic wild-type animals (**Fig. 2D**). Both cell lines were also capable of inducing thymic lymphoma in MMP-9-deficient mice, indicating that total absence of MMP-9 did not affect the tumorigenic potential of T lymphoma cells. Interestingly, the intrathymic injection of the MMP-9-deficient 2333 lymphoma cells induced the growth of thymic lymphoma within a shorter time interval than that of another MMP-9-deficient cell line (2325) in both wild-type ( $55.0 \pm 9.6$  days versus  $29.8 \pm 0.4$  days;  $p < 0.01$ ) and MMP-9-deficient mice ( $50.25 \pm 4.1$  days versus  $35.0 \pm 0.1$  days;  $p < 0.01$ ), indicating that the tumorigenic potential of T lymphoma cells can be expressed independently of MMP-expression.

To determine whether the incapacity of lymphoma cells to express MMP-9 can impair their ability to disseminate at distant sites, we injected the MMP-9 deficient lymphoma cells intravenously and compared the distribution of lymphoma in MMP-9-deficient mice with that of normal mice. In this model, injection of T lymphoma cells induces the formation of lymphoid tumors in spleen, kidneys, and liver with massive infiltration of tumor cells in the parenchyma<sup>20-</sup>

<sup>22</sup>. Evidence of tumor development was ascertained by macroscopic and histological examinations. Our results showed that MMP-9-deficient lymphoma cells can induce the formation of lymphoid tumors at distant sites without significant differences in the MST in both normal or MMP-9-deficient mice (Fig. 3A). The MST for the wild-type mice (36,21 days ± 0,43) and the *mmp-9*-deficient mice (37,75 days ± 2,48) was indeed comparable when mice were injected with 2333 *mmp-9*-deficient mice ( $p > 0.05$ ). Similar results were obtained in mice injected with the 2325 *mmp-9*-deficient cell line. The MST for the wild-type mice (53,67 days ± 9,22) and the *mmp-9*-deficient mice (58,82 days ± 7,41) was also comparable when mice were injected with the wild-type 164T2 T lymphoma cells ( $p > 0.05$ ). The ability of T lymphoma to form secondary tumor in peripheral tissues in complete absence of MMP-9 was confirmed by RT-PCR analysis in from tissues isolated from tumors in the liver and the kidneys (Fig. 3B). While we could detect a constitutive expression of *mmp-9* gene expression in normal tissues from kidneys and the liver of wild-type mice, no *mmp-9* expression was detected in normal or tumor-bearing *mmp-9*-deficient mice. At necropsy, macroscopic examinations of mice injected with the MMP-9-deficient cells showed that MMP-9-deficient mice had large tumors in liver, spleen, and kidneys, comparable to that observed in wild-type hosts. This observation was evident by histological analysis, which showed a severe infiltration of lymphoma cells in tissues of these organs in MMP-9-deficient animals and in normal mice (Fig. 3C).

Overexpression of MMP-9 has been shown to promote the migration and invasion of cancer cells in several experimental models<sup>24-25</sup>. This activity has been attributed at least in part to the ability of MMP-9 to increase blood vessel formation by proteolytically degrading type IV collagen in the basement membrane<sup>26</sup>. Recent studies using *in vivo* models have shown, however, that inhibition of *mmp-9* gene expression does not always results in the inhibition of tumor growth or metastasis, as predicted from many studies conducted using *in vitro* experiments. For instance, Deryugina *et al.*<sup>27</sup> have observed that a substantial down-regulation of MMP-9 expression by

siRNA increased intravasation and metastasis *in vivo*. These results are reminiscent to a certain extent of those observed by Coussens *et al.*,<sup>28</sup> who found that although MMP-9-deficient mice crossed with K14-HPV16 mice developed fewer tumours, higher-grade carcinomas with a less differentiated phenotype were found in MMP-9-deficient animals as compared to wild-types. Few other cases also exist where expression of MMPs negatively correlates with cancer progression. MMP-8-deficient mice have been shown to be more susceptible to 7,12-dimethylbenz[α]anthracene (DMBA), to 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA) and to methylcholantrene (MCA) chemically-induced papillomas than normal mice<sup>29</sup>. Like MMP-8, MMP-9 is also highly expressed by granulocytes, supporting the idea that MMP secreted by the host, such as the immune cells, can be protective against different types of cancer<sup>30</sup>. More recently, Houghton *et al.*<sup>31</sup> have also shown that MMP-12-deficient mice develop significantly more pulmonary metastases than their wild-type counterparts, suggesting that macrophage-derived MMP-12 may serve the host in some circumstances against tumor growth. The question then remains why the lymphoma cells disseminate with efficiency in the liver, kidneys, and spleen in total absence of MMP-9 since this enzyme has been associated with high grade lymphomas? We propose that while MMP-9 is not essential for the development of primary lymphoid tumors and the dissemination of lymphoma cells in peripheral tissues, elevated levels of MMP-9 may nevertheless increase the tumorigenic potential of lymphoma cells. In the present study, although mice injected with the *mmp-9*-deficient and wild-type T lymphoma cells may have had some apparent differences in their tumorigenic potential when injected intrathymically in normal or *mmp-9*-deficient mice, it has not been possible to directly compare the aggressive behavior of these lymphoma cells since they were derived from different primary tumors, thus expressing a distinct genomic profile, a scenario which is reminiscent of what we

find in clinical situation. To determine the importance of MMP-9 alone in conferring an aggressive behavior will necessitate the use of specific clones overexpressing MMP-9 and/or the use of siRNA strategies against aggressive lymphoma cell lines expressing high levels of MMP-9 constitutively, and/or to determine whether MMP-9-deficient T lymphoma cells can evolve toward an aggressive phenotype as efficiently as do lymphoma cells with an intact *mmp-9* gene. These experiments are currently in progress in our laboratory.

In conclusion, although the overall survival of mice was not affected by the absence of MMP-9 by the host, our results clearly show that leukemogenesis can occur in absence of MMP-9 and that lymphoma growth and dissemination can occur in total absence of MMP-9, and this deficiency does not alter the ability of tumor cells to invade peripheral sites, bringing up a cautionary note in the use of selective MMP-9 inhibitors for the treatment of invasive cancer. Thus although treatment with such inhibitors may at least partially overcome the aggressive behavior of lymphoma cells mediated by elevated levels of MMP-9, our results suggest such inhibitors will not be sufficient to completely eradicate the dissemination of lymphoma cells, and that combinatorial therapy to achieve such goal. Finally, our results further provide a new model to study the molecular mechanisms that distinguish the role of MMP-9 in different microenvironments, and most importantly what the importance is of the source of MMP-9 in tumor metastasis.

**Acknowledgements :** We thank Doris Legault and Diane Tremblay for their excellent technical support, and Dr. Edouard F. Potworowski for critical reading of the manuscript. Y.S.P is a scholar of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). M.D. and C.V.T. were supported by studentships from the Fonds de la Recherche FRSQ. J.S.R. is supported by a

studentship from the Fondation Armand-Frappier. This work was supported by the Canadian Institute for Health Research and the National Cancer Institute of Canada (Y.S.P.) and the Belgian Foundation against Cancer, the Fund for Scientific Research of Flanders and the Geconcerdeerde OnderzoeksActies (2006-2010) (G.O.).

## REFERENCES.

1. Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* 2001; **411**: 375-379.
2. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**: 161-174.
3. Bhowmick MA, Neilson EG, Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 2004; **432**: 332-337.
4. Overall CM, Kleifeld O. Tumour microenvironment - opinion: validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy. *Nature Rev Cancer* 2006; **6**: 227-239.
5. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; **420**: 860-867.
6. Jodele S, Chantrain CF, Blavier L, Lutzko C, Crooks GM, Shimada H, *et al.* The contribution of bone marrow-derived cells to the tumor vasculature in neuroblastoma is matrix metalloproteinase-9 dependent. *Cancer Res* 2005; **65**: 3200-3208.
7. Littlepage LE, Egeblad M, Werb Z. Coevolution of cancer and stromal cellular responses. *Cancer Cell* 2005; **7**: 499-500.
8. Kossakowska AE, Edwards DR, Prusinkiewicz C, Zhang MC, Guo D, Urbanski SJ. Interleukin-6 regulation of matrix metalloproteinase (MMP-2 and MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1) expression in malignant non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 1999; **94**: 2080-2089.
9. Sakata K, Satoh M, Someya M, Asanuma H, Nagakura H, Ouchi A.. Expression of matrix metalloproteinase 9 is a prognostic factor in patients with non-Hodgkin lymphoma. *Cancer* 2004; **100**:356-365.

10. Stetler-Stevenson M, Mansoor A, Lim M, Fukushima P, Kerhl J, Marti G, et al. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in reactive and neoplastic lymphoid cells. *Blood* 1997; **89**:1708-1715.
11. Mori N, Sato H, Hayashibara T, Senba M, Hayashi T, Yamada Y, et al. Human T-cell leukemia virus type I Tax transactivates the matrix metalloproteinase-9 gene: potential role in mediating adult T-cell leukemia invasiveness. *Blood* 2002; **99**:1341-1349.
12. Aoudjit F, Esteve PO, Desrosiers M, Potworowski EF, St-Pierre Y. Gelatinase B (MMP-9) production and expression by stromal cells in the normal and adult thymus and experimental thymic lymphoma. *Int J Cancer* 1997; **71**: 71-78.
13. Aoudjit F, Masure S, Opdenakker G, Potworowski EF, St-Pierre Y. Gelatinase B (MMP-9), but not its inhibitor (TIMP-1), dictates the growth rate of experimental thymic lymphoma. *Int J Cancer* 1999; **82**: 743-747.
14. Kruger A, Arlt MJ, Gerg M, Kopitz C, Bernado MM, Chang M, et al. Antimetastatic activity of a novel mechanism-based gelatinase inhibitor. *Cancer Res* 2005; **65**: 3523-3526.
15. Dubois B, Masure S, Hurtenbach U, Paemen L, Heremans H, Van den Oord J. Resistance of young gelatinase B-deficient mice to experimental autoimmune encephalomyelitis and necrotizing tail lesions. *J Clin Invest* 1999; **104**: 1507-1515.
16. Moisan S, Demers M, Mercier J, Magnaldo T, Potworowski EF, St-Pierre Y. Upregulation of galectin-7 in murine lymphoma cells is associated with progression toward an aggressive phenotype. *Leukemia* 2003; **17**: 751-759.
17. Kaplan HS. On the natural history of the murine leukemias: presidential address. *Cancer Res* 1967; **27**: 1325-1340.
18. Lalancette M, Aoudjit F, Potworowski EF, St-Pierre Y. Resistance of ICAM-1-deficient mice to metastasis overcome by increased aggressiveness of lymphoma cells. *Blood* 2000; **95**: 314-319.

19. Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2002; **37**: 375-536.
20. Lieberman M, Decleve M, Ricciardi-Castagnoli P, Boniver J, Finn OJ, Kaplan HS. Establishment, characterization and virus expression of cell lines derived from radiation- and virus-induced lymphomas of C57BL/Ka mice. *Int J Cancer* 1979; **24**: 168-177.
21. Aoudjit F, Potworowski EF, St-Pierre Y. The metastatic characteristics of murine lymphoma cell lines in vivo are manifested after target organ invasion. *Blood* 1998; **91**: 623-629.
22. Demers M, Magnaldo T, St-Pierre Y. A novel function for galectin-7: promoting tumorigenesis by up-regulating MMP-9 gene expression. *Cancer Research* 2005; **65**: 5205-5010.
23. Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, et al. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2000; **2**: 737-744.
24. Van de Broek I, Asosingh K, Allegaert T, Leleu X, Facon T, Vanderkerken K, et al. Bone marrow endothelial cells increase the invasiveness of human multiple myeloma cells through upregulation of MMP-9: evidence for a role of hepatocyte growth factor. *Leukemia* 2004; **18**: 976-982.
25. Lakka SS, Gondi CS, Yanamandra M, Olivero WC, Dinh DH, Gujrati M. Inhibition of cathepsin B and MMP-9 gene expression in glioblastoma cell line via RNA interference reduces tumor cell invasion, tumor growth and angiogenesis. *Oncogene* 2004; **23**: 4681-4689.
26. Huang S, Van Arsdall M, Tedjarati S, McCarty M, Wu W, Langley R, et al. Contributions of stromal metalloproteinase-9 to angiogenesis and growth of human ovarian carcinoma in mice. *J Natl Cancer Inst* 2002; **94**: 1134-1142.
27. Deryugina EI, Zjilstra A, Partridge JJ, Kupriyanova TA, Madsen MA, Papagianakopoulos T, et al. Unexpected 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.

28. Coussens LM, Tinkle CL, Hanahan D, Werb Z. MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell* 2000; **103**: 481-490.
29. Balbin M, Fueyo A, Tester AM, Pendas AM, Pitiot AS, Astudillo A, *et al.* Loss of collagenase-2 confers increased skin tumor susceptibility to male mice. *Nat Genet* 2003; **35**: 252-257.
30. de Visser KE, Eichten A, Coussens LM. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer* 2006; **6**: 24-37.
31. Houghton AM, Grisolano JL, Baumanm ML, Kobayashi DK, Hautamaki RD, Nehring LC. Macrophage elastase (matrix metalloproteinase-12) suppresses growth of lung metastases. *Cancer Res* 2006; **66**: 6149-6155.

## FIGURE LEGENDS

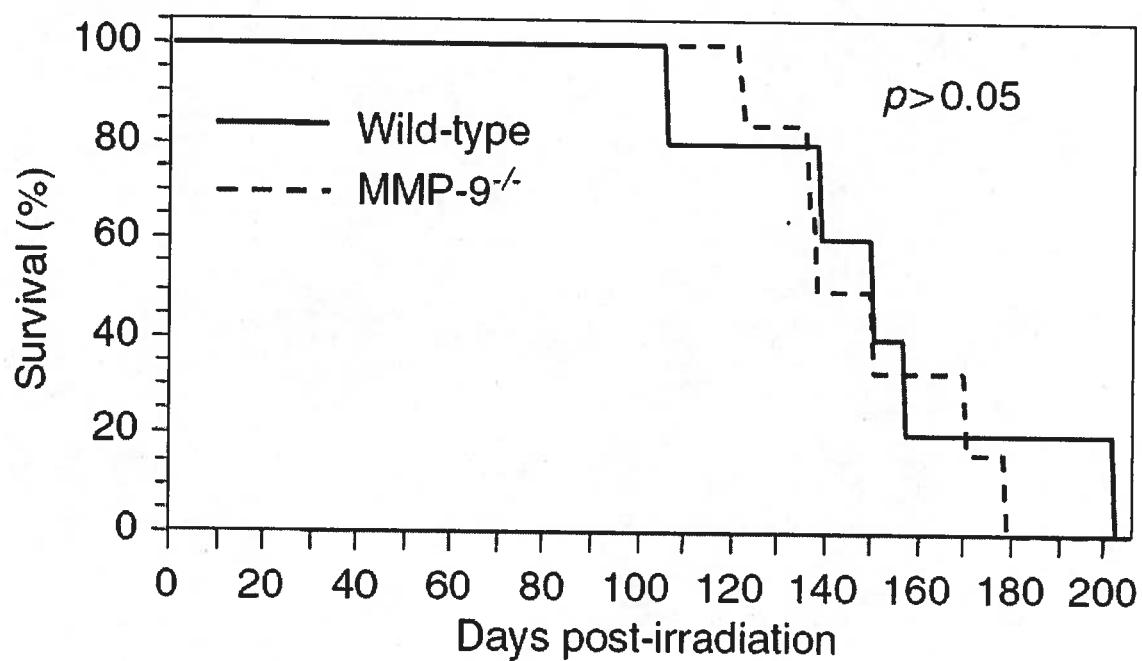
**Figure 1: Development of radiation-induced thymic lymphoma in wild-type versus MMP-9-deficient mice.** Groups of young normal ( $n = 6$ ) and MMP-9-deficient ( $n = 6$ ) C57BL/6 mice received whole-body irradiation applied as  $4 \times 175$  rads at weekly interval. Animals were carefully monitored periodically for clinical signs of thymic lymphoma: i.e., runting, swelling of the thorax and dyspnea. When moribund, mice were sacrificed, and thymic lymphoma was confirmed and collected at necropsy, as previously described <sup>18</sup>.

**Figure 2: Generation of mmp-9-deficient lymphoma cell lines.** (A) Genotype of MMP-9-deficient T lymphoma cell lines (2325 cell line) showing the absence of the normal (N) allele in wild-type C57BL/6 mice and the presence of the mutated (M) allele following the disruption of the *mmp-9* gene by the insertion of the neo cassette (*neo*) in the *mmp-9*-deficient mice and 2325 T lymphoma cells derived from a thymic lymphoma from *mmp-9*-deficient mouse. Identical results were obtained for the 2333 T lymphoma cells derived from another thymic lymphoma induced in another *mmp-9*-deficient mouse (*data not shown*). (B) and (C) Effect of the mutation on the ability of 2325 T lymphoma cells to express MMP-9 constitutively or following PMA as compared T lymphoma cells (control: 164T2) derived from wild-type mice as measured by RT-PCR and gelatin-zymography respectively. For PMA stimulation, cells were stimulated for 12 (RT-PCR) or 24 hrs (zymography) in serum-free medium at 50 nm and collected for analysis. Controls also included cells incubated with medium alone. Similar results were obtained with the 2333 T lymphoma cells (*Data not shown*). MW: molecular weight markers. (D) Tumorigenicity of MMP-9-deficient lymphoma cell lines. Young syngeneic wild-type and MMP-9-deficient mice were injected with wild-type cells (164T2) or both MMP-9-deficient cell lines intrathymically

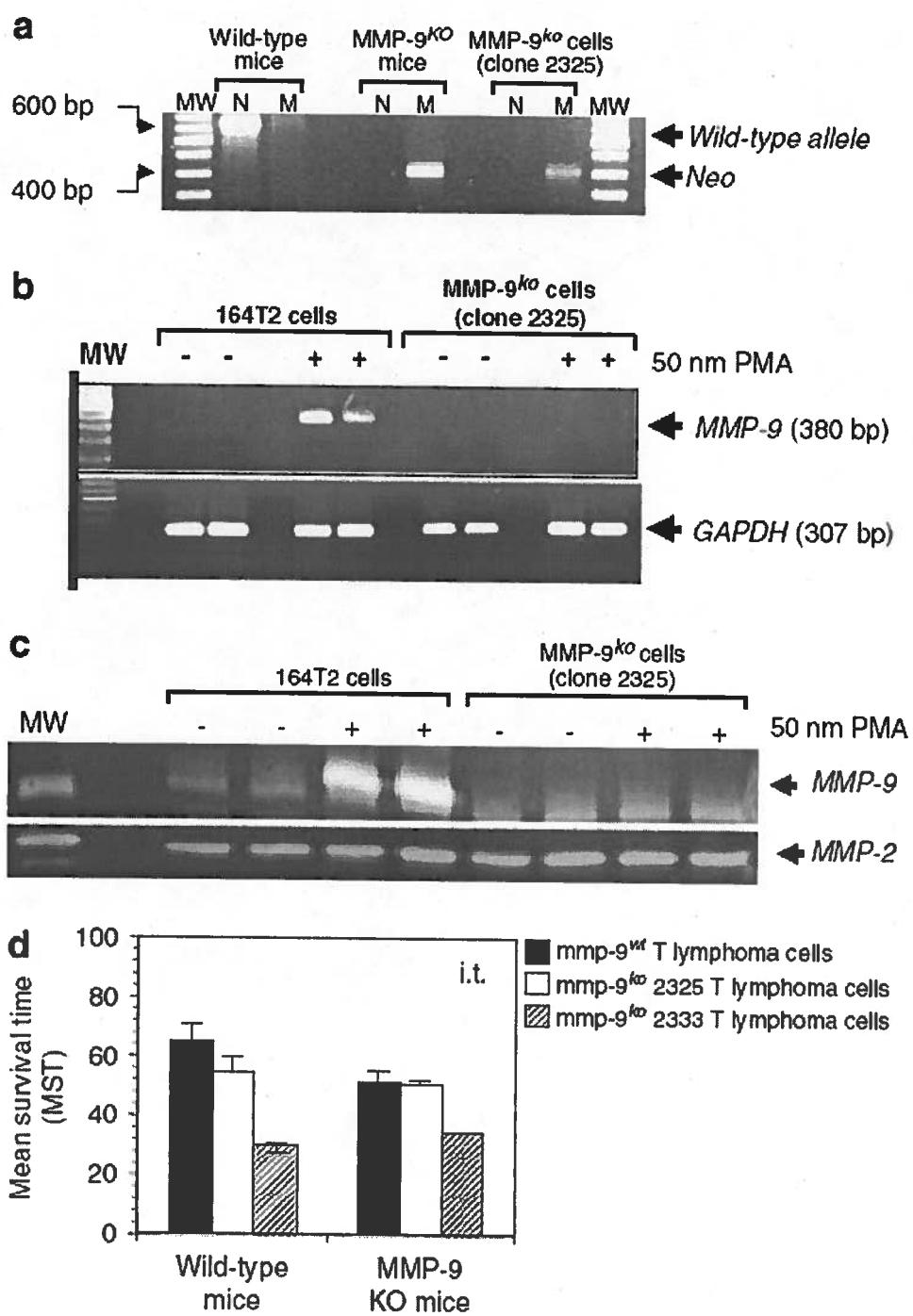
(i.t.) at a dose of  $5 \times 10^3$  cells/lobe. When moribund, mice were killed and thymic lymphoma confirmed at necropsy. These results are representative of two independent experiments.

**Figure 3: Development of T cell lymphoma in mice in absence of MMP-9.** (A) Histogram showing the mean survival times (MST) of normal and MMP-9-deficient mice following intravenous injection of *mmp-9*-deficient (*upper histogram*) or wild-type (*lower histogram*) T lymphoma cells. (B) Undetectable *mmp-9* gene expression in lymphoid tumors induced peripheral organs (e.g. kidneys and liver) by injection of *mmp-9*-deficient T lymphoma cells. Constitutive expression of MMP-9 in wild-type mice was observed in both liver and kidneys (*Normal lanes*) but not in normal or tumor-bearing *mmp-9*-deficient mice. The data are representative of at least 10 individual analyses of tissues of mice injected with either 2325 or 2333 *mmp-9*-deficient lines. Extracts from 164T2 cells stimulated with 50 nm PMA was used as a positive control for the detection of *mmp-9* gene expression by RT-PCR analysis. (C) Histological analysis of the liver and kidneys of normal and MMP-9-deficient mice injected intravenously with  $10^7$  2325 MMP-9-deficient lymphoma cells. The slides show extensive infiltration of T lymphoma cells in the perivascular areas of the liver and in the parenchyma of the kidneys in MMP-9-deficient animals. Similar results were obtained with the 2333 *mmp-9*-deficient lymphoma cell line (*Data not shown*).

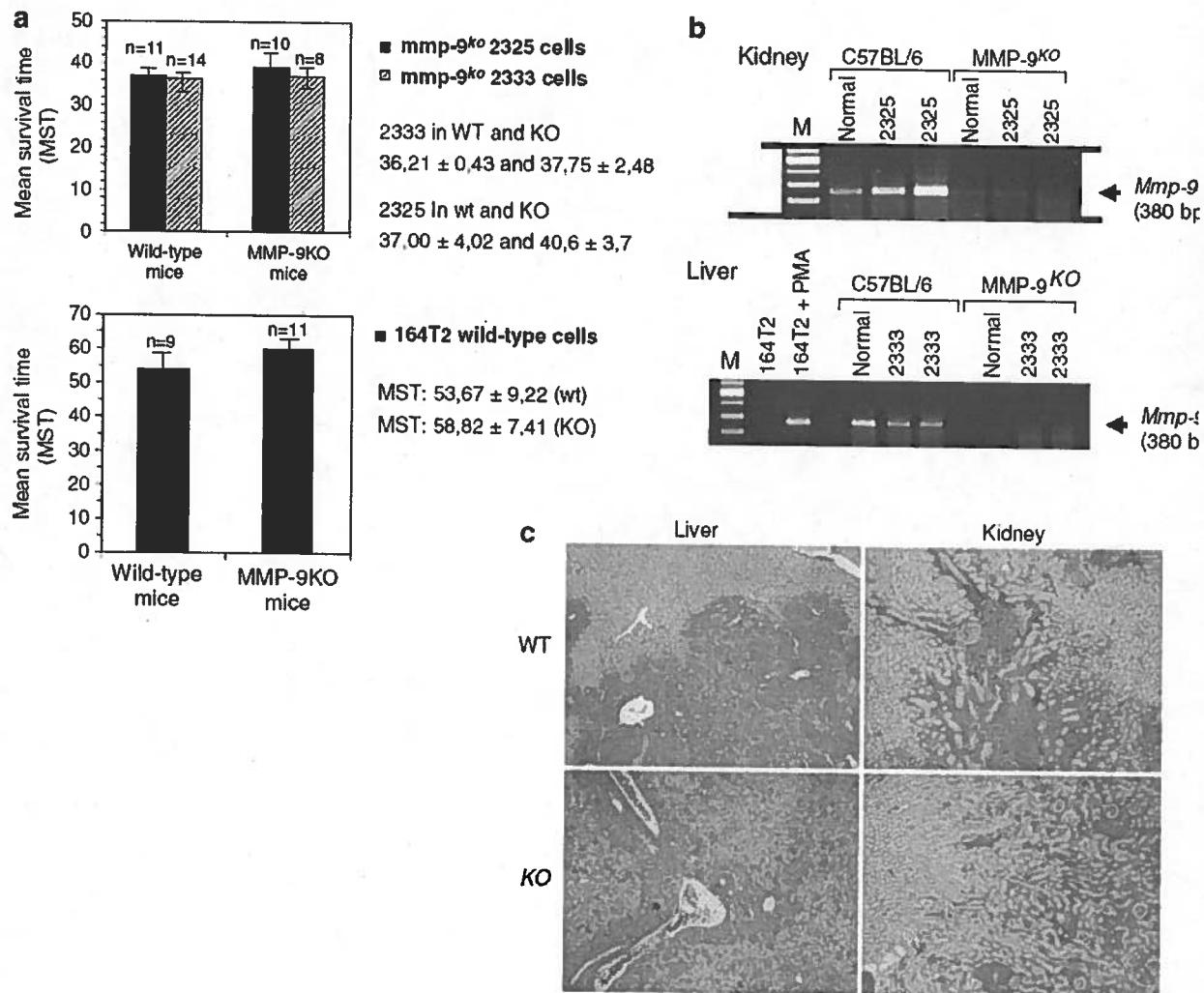
**Figure 1**



**Figure 2**



**Figure 3**



## Chapitre III

### **Discussion générale**

## **Discussion et conclusions**

### **La MMP-9 dans le cancer**

Nos travaux sont les premiers à démontrer que la présence de la MMP-9 n'est pas essentielle au développement de lymphome thymique et à la dissémination de ces derniers aux organes périphériques. Notre étude a permis de démontrer le rôle de la MMP-9 dans la dissémination des LNH à partir de modèles de souris « knock out », un modèle d'étude fort utile qui a été récompensé cette année par l'attribution du prix Nobel de médecine et physiologie au Professeur Mario Capecchi et ses collègues ([http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2007/index.html](http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2007/index.html)). Comme il en a été question précédemment, bien des raisons font que la MMP-9 soit ciblée dans la lutte au cancer, étant associée à la majorité des processus de progression néoplasique du lymphome et de la plupart des types de cancers, principalement dans l'angiogénèse, l'invasion et la métastasie aux organes secondaires (Huang *et al.*, 2002) (Van de Broek *et al.*, 2004). Le clivage et la libération du VEGF de la matrice extracellulaire est le principal rôle de la MMP-9 dans l'angiogénèse alors que la capacité de la MMP-9 à cliver le collagène de type IV, composante importante des membranes basales, expliquerait son rôle dans l'invasion. La MMP-9 jouerait aussi un rôle dans la métastasie par sa capacité à perméabiliser les barrières que représentent les tissus endothéliaux ainsi que par divers rôles pro-métastatiques au sein du tissu secondaire, notamment sur les systèmes immunitaire et inflammatoire. Plusieurs des études qui se sont penchées sur le rôle de la MMP-9 dans les diverses néoplasies, dont le LNH, suggèrent également qu'il existe un lien entre le niveau d'expression de la MMP-9, un mauvais pronostic chez les patients et des lymphomes de grades plus agressifs. Il a aussi été démontré que la MMP-9 dans l'environnement péritumoral provient à la fois de la tumeur et des cellules inflammatoires stromales.

Les rôles donnés à la MMP-9 dans la carcinogénèse au cours des dernières années à eu comme effet de multiplier les efforts afin de trouver des inhibiteurs capable de stopper l'action de cette MMP dans la progression néoplasique. Les premiers inhibiteurs bloquaient l'activité de nombreuses MMP à la fois, causant des effets non désirés importants. Par exemple, le Batimastat, inhibiteur à large spectre, montrait une propension à augmenter la métastasie au foie plutôt que

de la diminuer dans un modèle de carcinome chez les souris dites « nudes » (Della Porta *et al.*, 1999) ainsi que dans un modèle de lymphome T chez les souris DBA/2 (Kruger *et al.*, 2001). La succession des différentes générations d'inhibiteurs de MMP produisit des inhibiteurs de plus en plus spécifiques permettant l'inhibition mieux ciblées de MMP particulières sans nuire aux fonctions des autres MMP dans l'organisme. Les inhibiteurs plus spécifiques à MMP-9 tels que l'AG 3340, le Ro 28-2653 et le Ro 206-0222 réduisent ainsi de façon plus importante la métastasie au foie dans le modèle de lymphome T murin que les inhibiteurs à large spectre (Arlt *et al.*, 2002), probablement via l'inhibition de l'angiogénèse (Sang, 1998). Arlt *et al.* démontrent ainsi que la hausse du pouvoir sélectif des inhibiteurs face à la MMP-9 dans les modèles murins de carcinome et lymphome T pouvait diminuer la métastasie au foie (Arlt *et al.*, 2002). De la même façon, Krüger *et al.* publiaient en 2005 que le SB-3CT, un inhibiteur de nouvelle génération encore plus spécifique pour la MMP-9, ne semblait pas interagir avec d'autres MMP (Krüger *et al.*, 2005). Cet inhibiteur diminue les foyers métastatiques hépatiques induits par des lymphomes T jusqu'à 70%, plutôt que de les augmenter comme le Batimastat. La thérapie par inhibiteurs de MMP-9 semblait donc une idée pertinente et prit dès lors de l'ampleur dans le domaine de la recherche contre le cancer. Cependant, les présents résultats démontrent que cette avenue, dans le traitement du cancer, est vouée à l'échec.

### **Insuccès cliniques des inhibiteurs de MMP et MMP-9 dans le traitement du cancer**

Quoique des résultats encourageant aient été obtenus dans les modèles animaux, les essais cliniques effectués avec des inhibiteurs de MMP ont toujours donné des résultats décevants dans l'inhibition de la croissance et du développement néoplasique. De plus, les inhibiteurs de MMP produisent des effets secondaires importants, sans augmenter l'espérance de vie des patients (Arlt *et al.*, 2002). La sélectivité des inhibiteurs de MMP-9 a souvent été mise en cause pour expliquer les résultats décevants obtenus dans les études cliniques. Beaucoup de groupes, encore aujourd'hui, tentent de trouver des inhibiteurs toujours plus sélectifs pour la MMP-9, présageant qu'une hausse de la sélectivité pour MMP-9 permettra un meilleur ciblage de l'effet thérapeutique et aura moins d'effets néfastes pour le patient. Un deuxième problème majeur avec les inhibiteurs de MMP se situent au niveau des connaissances limitées concernant les interactions des MMP entre elles et leur intervention dans les divers processus physiologiques

normaux et pathologiques. Cet aspect représente encore aujourd’hui un obstacle de taille pour les chercheurs dans la prévision des effets possibles de l’inhibition des MMP. L’utilisation de modèles transgéniques/knock-out de MMP représente une alternative intéressante dans ce contexte afin de déterminer si la surexpression ou la diminution de MMP altère de façon significative le déroulement d’une maladie et si des mécanismes compensatoires peuvent intervenir. Il est en effet important de prendre en compte que le risque de réactions croisées entre les inhibiteurs de MMP et d’autres constituants du métabolisme reste présent malgré l’augmentation de la spécificité de l’inhibiteur pour une MMP en particulier. Par exemple, *Nuti et al.* montrent que les inhibiteurs de MMP de type « sulfonylated hydroxamates », inhibant uniquement les gélatinases MMP-9 et MMP-2, inhibent également des membres de la famille d’enzymes dites « Carbonic Anhydrase, ou CA » impliquée dans la régulation du pH, la sécrétion d’électrolytes, la respiration et les réactions de biosynthèse impliquant la formation de CO<sub>2</sub>, ainsi que la calcification et la résorption des os (*Nuti et al.*, 2007). Les effets observés par ces inhibiteurs ne sont donc pas uniquement en corrélation avec l’inhibition de la MMP-2 et de la MMP-9. Les lourds effets secondaires persistants provoqués par la prise d’inhibiteurs de MMP soulèvent donc plusieurs questions face à ce type de traitement.

L’inhibition d’une MMP ne garantit pas l’inhibition des processus auxquels elle participe dans l’organisme. Le fait qu’il existe aujourd’hui plus de 10 types différents de souris déficientes en MMP qui soient viables, dont les MMP-2 (*Itoh et al.*, 1998), MMP-3 (*Mudgett et al.*, 1998), MMP-7 (*Wilson et al.*, 1997), MMP-9 (*Dubois et al.*, 1999) et MMP-12 (*Shipley et al.*, 1996), exception faite de MMP-14, MT1-MMP (*Atkinson et al.*, 2005) (*Irie et al.*, 2005) sur les 25 MMP connues démontre que les MMP, bien qu’importantes dans l’embryogénèse et le développement physiologique post-natal, possèdent des mécanismes de redondance et de compensation entre-elles leur permettant de prendre le relais et de remplir, du moins en partie, les rôles de la MMP absente (*Greenlee et al.*, 2007). La **redondance** chez les MMP s’explique en grande partie par leurs similitudes structurelles (voir section 3 : les MMP) et s’exprime principalement par le chevauchement des substrats que ces protéases peuvent cliver. La redondance des substrats se voit d’abord entre les membres d’une même classe de MMP (gélatinases, collagénases, etc.) dont les substrats sont, pour la plupart, partagés par plusieurs protéases. Ce chevauchement de substrats se retrouve également entre les diverses classes de

MMP, par exemple, la MMP-9 possède la capacité de cliver plusieurs types de collagène, la plupart étant aussi des substrats des collagénases. Il y a donc « prise en charge » du clivage de la plupart des substrats d'une MMP, malgré son absence. De plus, les régions promotrices des différentes MMP sont également semblables dans la majorité des cas, bien que certaines, comme la MMP-9, possèdent des promoteurs beaucoup plus complexes, par leur nature inductible. Ainsi, leur expression répond souvent aux mêmes facteurs de transcription (NF-κB, AP-1, SP-1, etc.), ce qui peut expliquer, du moins en partie, que dans un KO, la déficience en une ou plusieurs MMP soit compensée par l'expression d'autres MMP répondant aux mêmes stimuli. Ainsi, les anomalies observées à la naissance chez les souris déficientes pour MMP-9, chez qui l'angiogénèse et le développement des os longs sont légèrement déficients, se résorbent quelques semaines après la naissance (Vu *et al.*, 1998), probablement grâce à ces phénomènes.

Bien sûr, la redondance des MMP n'est pas applicable à toutes les situations. Si on s'en tient, par exemple, à l'activation du système immunitaire, l'inhibition de MMP-2 diminue grandement l'infiltration d'éosinophiles malgré la présence de MMP-9 (Corry *et al.*, 2004). À l'inverse, dans un autre modèle d'allogreffe pulmonaire, l'alloréactivité des lymphocytes T est induite par la MMP-9 mais pas par la MMP-2 (Fernandez *et al.*, 2005), montrant que ces deux MMP, bien que très semblables, possèdent des mécanismes de compensation limités l'une envers l'autre. De plus, les effets compensatoires et redondants des MMP observés en conditions normales sont souvent inadéquats lorsque observés en situation pathologiques (Corry *et al.*, 2004) (Li *et al.*, 2004) (McMillan *et al.*, 2004). Il faut noter également que les MMP ne sont pas toutes exprimées dans les même tissus et sécrétées par les mêmes populations cellulaires dans l'organisme (Corry *et al.*, 2004) (Masumoto *et al.*, 2005), ce qui limite également les mécanismes compensatoires. Par contre, sur ce point, de nombreux articles ont rapporté que plusieurs MMP sont sur-exprimées par les tumeurs et les cellules stromales péritumorales, ce qui renforce ainsi les phénomènes compensatoires des ces dernières dans l'espace péritumoral, outrepasstant le caractère tissu-spécifique de plusieurs MMP. Il est donc possible que de tels mécanismes soient entrés en jeu pour compenser l'ablation génétique de la MMP-9 dans les lymphomes et dans les cellules péritumorales afin de permettre le développement de lymphomes primaires et la dissémination en absence totale de MMP-9. Nonobstant cette possibilité, nos résultats démontrent clairement que des interventions thérapeutiques visant spécifiquement la MMP-9 ne pourraient empêcher le

développement de lymphomes et leur dissémination. Toutefois, nos résultats antérieurs de même que ceux obtenus par d'autres groupes démontrant que la surexpression de la MMP-9 accélère la dissémination des cellules cancéreuses, dont celles des lymphomes, laissent envisager que de tels traitements pourraient néanmoins être efficaces pour ralentir la progression de la maladie ou dans un contexte de thérapie combinée.

### **Effets pléiotropiques de la MMP-9**

L'inhibition de MMP dans la lutte contre le cancer pose un autre problème majeur. En effet, la majorité des MMP ont des effets pléiotropiques dans l'organisme : étant protectrices dans certains cas et nuisibles dans d'autres, selon le tissu, le métabolisme et le modèle pathogénique observé (Parks *et al.*, 2004). L'inhibition de MMP risque donc fortement de produire plusieurs effets parallèles à ceux désirés. Par exemple, MMP-11 augmente l'implantation et la survie des cellules cancéreuses dans l'environnement stromal (Boulay *et al.*, 2001) mais chez les souris déficientes en MMP-11, il y a prédisposition de ces dernières aux cancers des glandes mammaires (Andarawewa *et al.*, 2003). Le même effet est observé pour MMP-3 (McCawley *et al.*, 2004) MMP-7 (Andarawewa *et al.*, 2003) et MMP-9, connue pour promouvoir le carcinome mammaire (Sternlicht *et al.*, 2000), mais dont l'ablation prédispose aux carcinomes de la peau (McCawley *et al.*, 2004). Malgré les données de la littérature associant fortement la MMP-9 à l'angiogénèse tumorale et à la métastasie, il est important de prendre en considération l'implication de la MMP-9 dans une multitude de processus physiologiques normaux essentiels tels que l'immunité, l'inflammation, et la réparation tissulaire (comprenant la néo-angiogénèse). L'inhibition de la MMP-9 risque donc de mettre en péril le bon fonctionnement de plusieurs processus métaboliques de première importance chez le patient. La prise à long terme d'inhibiteurs de MMP ou d'autres enzymes homéostasiques lors de maladies inflammatoires chroniques risque notamment d'induire des processus de fibrose au sein des tissus inflammés (Hu *et al.*, 2007). De plus, la MMP-9 peut s'avérer anti-angiogénique sous certaines conditions, principalement en produisant les fragments anti-angiogéniques tels que l'angiotensine, la tumstatine, etc (voir section 4 : MMP-9) (Nelson *et al.*, 2000). Cette protéase exerce donc des effets protecteurs non négligeables pour l'organisme (de Visser *et al.*, 2006). La MMP-9 exerce des fonctions protectrices entre autres dans certains tissus de l'organisme, notamment les voies

respiratoires, où son inhibition diminue de façon importante la migration des cellules inflammatoires, prédisposant ainsi à plusieurs maladies respiratoires graves (Cataldo *et al.*, 2002).

**Modèle présent : Effet de l'absence partielle ou totale de la MMP-9 dans un modèle *in vivo* de lymphome T non hodgkinien**

Tel que mentionné dans l'article présenté ici, le régime leucémogénique du modèle de Kaplan appliqué aux souris déficientes en MMP-9 s'est avéré utile pour la génération de lignées cellulaires de lymphomes T déficientes en MMP-9. Les temps de latence entre le régime leucémogénique et l'apparition des lymphomes T est comparable entre les deux types de souris et les lignées cellulaires déficientes en MMP-9 (KOM9-2325 et KOM9-2333) conservent leur potentiel métastatique et leur capacité à induire le lymphome lorsqu'elles sont injectées de façon intraveineuse, tant chez les souris C57BL/6 que C57BL/6-KOMMP-9. À partir de ces lignées et des souris déficientes en MMP-9 (C57BL/6-KOMMP-9), il nous a été possible de déterminer l'effet de l'absence (partielle ou totale) de MMP-9 dans un système tumeur – hôte de lymphome T non hodgkinien. Une observation majeure de notre étude est que le tropisme métastatique du lymphome T n'est pas altéré par la déficience en MMP-9, tant chez la souris normale que chez la souris déficiente en MMP-9, c'est-à-dire que des métastases sont apparues au foie, à la rate et aux reins. Le présent modèle confirme donc qu'il y a bel et bien progression néoplasique et métastatique de façon comparable, pour le lymphome T non hodgkinien, en situation normale, en présence de MMP-9 seulement chez le lymphome ou seulement chez l'hôte, ainsi qu'en totale absence de MMP-9 dans le système. De plus, l'absence de MMP-9 ne produit pas de différence significative dans le taux de survie moyen des souris injectées ainsi que dans l'infiltration et la métastasie aux organes secondaires.

En résumé, le développement et la métastasie du lymphome T n'est pas perturbé de façon significative par l'absence partielle ou totale de MMP-9, du moins dans notre modèle expérimental. À partir de ces résultats, il est ainsi possible de conclure que, bien que la surexpression de la MMP-9 augmente le pouvoir tumorigénique du lymphome T, tel que mentionné dans une pléiade d'études diverses discutées précédemment, elle n'est pas essentielle à l'**induction de tumeurs lymphoïdes primaires et à la dissémination de lymphomes T dans**

**les organes secondaires.** Par ailleurs, il est important de noter que l'agressivité des lignées de lymphome T de type sauvage et déficient en MMP-9 ne peuvent ici être comparées directement puisqu'elles découlent de tumeurs différentes et ne possèdent donc pas le même profil génomique. La réintroduction par vecteur de MMP-9 dans les lignées déficientes en MMP-9 permettrait de comparer directement la différence de pouvoir tumorigénique/métastatique imputable à MMP-9 en suivant le développement du lymphome avec, par exemple, KOM9-2325/vecteur-vide versus KOM9-2325/vecteur-MMP-9.

### **Pertinence des inhibiteurs de la MMP-9 dans la lutte au lymphome T non hodgkinien**

Comme cette étude démontre que la leucémogénèse, la croissance et la dissémination du lymphome T peuvent survenir en totale absence de MMP-9 et posséder les mêmes pouvoirs invasif et métastatique qu'en présence de la MMP-9, il paraît logique de suggérer que l'utilisation d'inhibiteurs de la MMP-9 semble inappropriée pour arrêter la progression néoplasique. L'inhibition de la MMP-9 pourrait tout au plus ralentir la progression dans les premiers stades de la croissance du lymphome T. Cela pourrait expliquer qu'à ce jour, aucun inhibiteur de la MMP-9 testé *in vivo* dans des modèles de lymphome T n'aït réussi à inhiber totalement la métastasie. Bien que les études *in vitro* semblent montrer que l'inhibition de la MMP-9 bloque la croissance tumorale et la métastasie, les récentes études *in vivo* tendent plutôt à démontrer que ce n'est pas toujours le cas. Par exemple, certaines études montrent que la diminution de l'expression de la MMP-9 augmente l'intravasation et la métastasie *in vivo* (Deryugina *et al.*, 2005) et que l'absence de MMP-9 réduit la survie des cellules métastatiques au cours des stades précoce de développement mais n'influence pas la croissance des foyers métastatiques établis (Acuff *et al.*, 2006). De plus, bien que plusieurs études montrent que les souris déficientes en MMP-9 produisent moins de métastases que les souris normales (Ram *et al.*, 2006) (Black et Dinner, 2007), les tumeurs et métastases qui s'y développent sont de grades plus élevés et de phénotypes moins différenciés que dans les carcinomes observés en présence de MMP-9 (Coussens *et al.*, 2000). Finalement, Hamano *et al.* ont démontré que, bien que similaire dans les premiers stades de croissance, les tumeurs se développaient significativement plus rapidement en absence de MMP-9 dans les stades plus avancés, différence attribuée à l'absence des fragments bioactifs anti-angiogéniques produits habituellement par la MMP-9 (Hamano Y 2003).

La mise au point d'inhibiteurs de la MMP-9 de plus en plus spécifiques permettra peut-être un jour de produire des molécules aux effets secondaires minimes pouvant être utilisés en combinaison avec d'autres molécules dans le traitement de certains cancers. De plus, bien que montrant ici des effets limités sur l'inhibition de la progression néoplasique, des inhibiteurs de MMP-9 sans effets secondaires importants pourraient s'avérer utiles dans le traitement de plusieurs maladies inflammatoires chroniques, vasculaires et auto-immunes, maladies dans lesquelles la MMP-9 joue également un rôle de premier plan lors du développement.

En conclusion, un fait demeure sur lequel la grande majorité des groupes d'études s'entendent en ce qui a trait à l'usage des inhibiteurs de MMP, et particulièrement de la MMP-9, dans le traitement du cancer ou d'autres maladies humaines : il est essentiel de mieux comprendre la biologie des MMP, leurs interactions entre-elles, leurs mécanismes de redondance et de compensation, leurs rôles pléiotropiques au sein de l'organisme, mais surtout le rôle exact de chacune d'elle dans la maladie traitée afin de pouvoir comprendre l'étendue des effets de leur inhibition sur l'organisme du patient et ainsi de mieux peser le pour et le contre qu'implique leur inhibition dans le traitement de la maladie (Arlt *et al.*, 2002) (Coussens et Werb, 2002) (Krüger *et al.*, 2005) (Black et Dinner, 2007) (Greenlee *et al.*, 2007) (Hu *et al.*, 2007).

## Liste des références

- Acuff HB, Carter KJ, Fingleton B, Gorden DL, and Matrisian LM (2006): Matrix metalloproteinase-9 from bone marrow-derived cells contributes to survival but not growth of tumor cells in the lung microenvironment. *Cancer Res.* 66, 259-266.
- Ahmed N, Pansino F, Clyde R, Murthi P, Quinn MA, Rice GE, Agrez MV, Mok S, and Baker MS (2002): Overexpression of alpha(v)beta6 integrin in serous epithelial ovarian cancer regulates extracellular matrix degradation via the plasminogen activation cascade. *Carcinogenesis* 23, 237-244.
- Allan JA, Docherty AJ, Barker PJ, Huskisson NS, Reynolds PJ, and Murphy G (1995): Binding of gelatinases A and B to type-I collagen and other matrix components. *Biochem. J.* 309, 299-306.
- Alon R, and Dustin ML (2007): Force as a Facilitator of Integrin Conformational Changes during Leukocyte Arrest on Blood Vessels and Antigen-Presenting Cells. *Immunity* 26, 17-27.
- Ames BN, and Gold LS (1990): Too many rodent carcinogens : mitogenesis increases mutagenesis. *Science* 249, 970-971.
- Andarawewa KL, Boulay A, Masson R, Mathelin C, Stoll I, Tomasetto C, Chenard MP, Gintz M, Bellocq JP, and Rio MC (2003): Dual stromelysin-3 function during natural mouse mammary tumor virus-ras tumor progression. *Cancer Res.* 63, 5844.
- Aoudjit F, Esteve PO, Desrosiers M, Potworowski EF, and St-Pierre Y (1997): Gelatinase B (MMP-9) production and expression by stromal cell in the normal and adult thymus and experimental thymic lymphoma. *Int. J. Cancer* 71, 71-78.
- Aoudjit F, Potworowski EF, and St-Pierre Y (1998a): Bi-directionnal induction of matrix metalloproteinases-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 during T lymphoma/endothelial cell contact : implication of ICAM-1. *J immunol* 160, 2967-2973.
- Aoudjit F, Potworowsky EF, Springer TA, and St-Pierre Y (1998b): Protection from lymphoma cell metastasis in ICAM-1 mutant mice : a posthoming event. *J Immunol.* 161, 2333-2338.
- Apte RN, Dotan S, Elkabets M, White MR, Reich E, Carmi Y, Song X, Dvozkin T, Krelin Y, and Voronov E (2006): The involvement of IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions. *Cancer metastasis Rev.* 25, 387-408.
- Arlt M, Kopitz C, Pennington C, Watson KL, Krell HW, Bode W, Gansbacher B, Khokha R, Edwards DR, and Krüger A (2002): Increase in gelatinase-specificity of matrix metalloproteinase inhibitors correlates with antimetastatic efficacy in a T-cell lymphoma model. *Cancer Res.* 62, 5543.
- Ashizawa T, Okada R, Suzuki Y, Takagi M, Yamazaki T, Sumi T, Aoki T, Ohnuma S, and Aoki T (2005): Clinical significance of interleukin-6 (IL-6) in the spread of gastric cancer: role of IL-6 as a prognostic factor. *Gastric cancer* 8, 124.
- Atkinson JJ, Holmbeck K, Yamada S, Birddal-Hanson H, Parks WC, and Senior RM (2005): Membrane-type 1 matrix metalloproteinase is required for normal alveolar development. *Dev Dyn* 232, 1079-1090.
- Babior BM (2000): Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med* 109, 33-44.
- Balbin M, Fueyo A, Tester AM, Pendas Am, Pitiot AS, Astudillo A, Overall CM, Shapiro SD, and Lopez-Otin C (2003): Loss of collagenase-2 confers increased skin tumor susceptibility to male mice. *Nat Genet* 35, 252-257.
- Baluk P, Raymond WW, Ator E, Coussens LM, McDonald DM, and Caughey GH (2004): Matrix metalloproteinase 2 and 9 expression increases in mycoplasma-infected airways but is not required for microvascular remodeling. *Am j Physiol* 9, 9.
- Baram D, Vaday GG, Salamon P, Drucker I, Herskoviz R, and Mekori YA (2001): Human mast cells release metalloproteinase-9 on contact with activated T cells: juxtacrine regulation by TNF-alpha. *J immunol* 167, 4008-4016.
- Baron JA, and Sandler RS (2000): Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cancer prevention. *Annu. Rev. Med.* 51, 511-523.
- Baud V, and Karin M (2001): Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol.* 11, 372-377.
- Baylin SB, and Herman JG (2000): DNA methylation in tumorigenesis. *Trends Genet.* 16, 168-174.
- Beglovia N, Blacklow SC, Takagi J, and Springer TA (2002): Cysteine-rich module structure reveals a fulcrum for integrin rearrangement upon activation. *Nat. Struct. Biol.* 9, 282-287.
- Bélanger SD, and St-Pierre Y (2005): Role of selectins in the triggering, growth and dissemination of T-lymphoma cells : implication of L-selectin in the growth of thymic lymphoma. *Blood* 105, 4800-4806.

- Ben-Baruch A (2006): Inflammation-associated immune suppression in cancer : the rôles played by cytokines, chemokines and additional mediators. *Semin. Cancer Biol.* 16, 38-52.
- Benbow U, and Brinckerhoff CE (1997): The AP-1 site and MMP gene regulation : what is all the fuss about? *Matrix Biol.* 15, 519-526.
- Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, Tanzawa K, Thorpe P, Itohara S, Werb Z, and Hanahan D (2000): Matrix metalloproteinases-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2, 737-744.
- Bertoni A, Rigot V, Huet E, Decarme M, Eeckhout Y, Pathy L, Godeau G, Hornebeck W, Bellon G, and Emonard H (2001): Involvement of fibronectin type II repeats in the efficient inhibition of gelatinases A and B by long-chain unsaturated fatty acids. *J. Biol. Chem.* 276, 20458-20465.
- Bhowmick NA, Neilson EG, and Moses HL (2004): Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 432, 332-337.
- Bishop JM (1981): Enemies within : the genesis of retrovirus oncogenes. *Cell* 23, 5-6.
- Bissell MJ, and Radisky D (2001): Putting tumors in context. *Nature Rev. Cancer* 1, 46-54.
- Black PC, and Dinner CPN (2007): Bladder cancer angiogenesis and metastasis—translation from murine model to clinical trial. *Cancer metastasis Rev.* [Epub ahead of print].
- Bond M, Chase AJ, Baker AH, and Newby AC (2001): Inhibition of transcription factor NF-kappaB reduces matrix metalloproteinase-1, -3 and -9 production by vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc. Res.* 50, 556-565.
- Bond M, Fabunmi RP, Baker AH, and Newby AC (1998): Synergistic upregulation of metalloproteinase-9 by growth factors and inflammatory cytokines: an absolute requirement for transcription factor NF-kappa B. *FEBS Lett* 435, 29-34.
- Boulay A, Masson R, Chenard MP, El Fahime M, Cassard L, Bellocq JP, Sautes-Fridman C, Basset P, and Rio MC (2001): High cancer cell death in syngeneic tumors developed in host mice deficient for the stromelysin-3 matrix metalloproteinase. *Cancer Res.* 61, 2189-2193.
- Brooks PC, Aimes RT, Sanders LC, Von Schalscha TL, Stetler-Stevenson WG, Quigley JP, and Cheresh DA (1996): Localisation of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin  $\alpha v\beta 3$ . *Cell* 85, 683-693.
- Brown RE, and Nazmi RK (2002): The Reed-Steinberg cell: molecular characterization by proteomic analysis with therapeutic implications. *Ann Clin Lab Sci* 32, 339-351.
- Brown S, Meroueh SO, Fridman R, and Mobashery S (2004): Quest for selectivity in inhibition of matrix metalloproteinases. *Curr Top Med Chem* 4, 1227-1238.
- Burg G, Kempf W, Cozzio A, Feit J, Willemze R, S Jaffe E, Dummer R, Berti E, Cerroni L, Chimenti S, Diaz-Perez JL, Grange F, Harris NL, Kazakov DV, Kerl H, Kurrer M, Knobler R, Meijer CJ, Pimpinelli N, Ralfkiaer E, Russell-Jones R, Sander C, Santucci M, Sterry W, Swerdlow SH, Vermeer MH, Wechsler J, and Whittaker S (2005): WHO/EORTC classification of cutaneous lymphomas 2005: histological and molecular aspects. *Blood* 105, 3768-3785.
- Cambi A, Joosten B, Koopman M, de Lange F, Beeren I, Tuorensma R, Fransen JA, Garcia-Parajo M, Van Leeuwen FN, and Figdor CG (2006): Organization of the integrin LFA-1 in nanoclusters regulates its activity. *Mol. Biol. Cell* 17, 4270-4281.
- Campbell JJ, Haraldsen G, Pan J, Rottman J, Qin S, Ponath P, Andrew DP, Warnke R, Ruffing N, Kassam N, Wu L, and Butcher EC (1999): The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cell. *Nature* 400.
- Campbell JJ, Hedrick J, Zoltnik A, Siani MA, and Thompson DA (1998): Chemokines and the arrest of lymphocyte rolling under flow conditions. *Science* 279, 381-384.
- Carman CV, and Springer TA (2003): Integrin avidity regulation : are changes in affinity and conformation underemphasized. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 547-556.
- Carmeliet P (2003): Angiogenesis in health and disease. *Nat. Med.* 9, 653-660.
- Cataldo DD, Tournoy KG, Vermaelen K, Munaut C, Foidart JM, Louis R, Noël A, and Pauwels RA (2002): Matrix metalloproteinase-9 deficiency impairs cellular infiltration and bronchial hyperresponsiveness during allergen-induced airway inflammation. *Am. J. Pathol.* 161, 491-498.
- Cesari M, Penninx BW, Newman AB, Kritchevsky SB, Nicklas BJ, Sutton-Tyrrell K, Tracy RP, Rubin SM, Harris TB, and Pahor M (2003): Inflammatory markers and cardiovascular disease (The Health, Aging and Body Composition [Health ABC] Study). *Am J Cardiol* 92, 522-528.
- Chang C, and Werb Z (2001): The many faces of metalloproteinases: cell growth, invasion, angiogenesis, and metastasis. *Trends Cell Biol.* 11.
- Chang L, and Karin M (2001): Mammalian MAPK signalling cascades. *Nature* 410, 37-40.

- Chantrain CF, Henriet P, Jodele S, Emonard H, Feron O, Courtoy PJ, DeClerck YA, and Marbaix E (2006): Mechanisms of pericyte recruitment in tumour angiogenesis: A new role for metalloproteinases. *Eur J Cancer*.
- Chantrain CF, Shimana H, Jodele S, Groshen S, Ye W, Shalinsky DR, Werb Z, Coussens LM, and DeClerck YA (2004): Stromal matrix metalloproteinase-9 regulate the vascular architecture in neuroblastoma by promoting pericyte recruitment. *Cancer Res.* 64, 1675-1686.
- Chicoine E, Esteve PO, Robledo O, Van Themsche C, Potworowski EF, and St-Pierre Y (2002): Evidence for the role of promoter methylation in the regulation of MMP-9 gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297, 765-772.
- Cobb MH, and Goldsmith EJ (1995): How MAP kinases are regulated. *J. Biol. Chem.* 270, 14843-14846.
- Colnot C, Thompson Z, Miclau T, Werb Z, and Helms JA (2003): Altered fracture repair in the absence of MMP-9. *Development* 130, 4123-4133.
- Corcoran ML, Kibbey MC, and Kleinman HK (1995): Laminin SIKVAV peptide induction of monocyte/macrophage prostaglandin E2 and matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 270, 10365-10368.
- Corry DB, Kiss A, Song LZ, Song L, Xu J, Lee SH, Werb Z, and Kheradmand F (2004): Overlapping and independent contributions of MMP2 and MMP9 to lung allergic inflammatory cell egression through decreased CC chemokines. *FASEB J* 18, 995-997.
- Corry DB, Rishi K, Kanellis J, Kiss A, Song LZ, Xu J, Feng L, Werb Z, and Kheradmand F (2002): Decreased allergic lung inflammatory cell regression and increased susceptibility to asphyxiation in MMP2-deficiency. *Nature Immunol.* 3, 347-353.
- Coussens LM, Fingleton B, and Matrisian LM (2002): Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer : trials and tribulations. *Science* 295, 2387-2392.
- Coussens LM, Tinkle CL, Hanahan D, and Werb Z (2000): MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell* 103, 481-490.
- Coussens LM, and Werb Z (2002): Inflammation and cancer. *Nature* 420, 860.
- Creighton C, and Hanash S (2003): Expression of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9/gelatinase B) in adenocarcinomas strongly correlated with expression of immune response genes. *In Silico Biol.* 3, 301-311.
- Cresbi B, and Summers K (2005): Evolutionary biology of cancer. *Trends Ecol. Evol.* 20, 545-552.
- Dajee M, Lazarov M, Zhang JY, Cai T, Green CL, Russell AJ, Marinkovich MP, Tao S, Lin Q, Kubo Y, and Khavari PA (2003): NF-kappaB blockade and oncogenic Ras trigger invasive human epidermal neoplasia. *Nature* 421, 639-643.
- De S, Chen J, Narizhneva NV, Heston W, Brainard J, Sage EH, and Byzova TV (2003): Molecular pathway for cancer metastasis to bone. *J. Biol. Chem.* 278, 39044-39050.
- de Visser KE, Eichten A, and Coussens LM (2006): Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat. Rev. Cancer* 6, 24-37.
- Del Bufalo D, Biroccio A, Leonetti C, and Zupi G (1997): Bcl-2 overexpression enhances the metastatic potential of a human breast cancer line. *FASEB J.* 11, 947-953.
- Della Porta P, Soeltl R, Krell HW, Collins K, O'Donoghue M, Schmitt M, and Krüger A (1999): Combined treatment with serine protease inhibitor aprotinin and matrix metalloproteinase inhibitor Batimastat (BB-94) does not prevent invasion of human esophageal and ovarian carcinoma cells in vivo. *Anticancer Res.* 19, 3809-3816.
- Deryugina EI, Zijlstra A, Partridge J, Kupriyanova T, Madsen MA, Papagiannakopoulos T, and Quigley JP (2005): Unexpected effect of matrix metalloproteinase downregulation on vascular intravasation and metastasis of human fibrosarcoma cells selected *in vivo* for high rates of dissemination. *Cancer Res.* 65, 10959-10969.
- Dey P (2006): Role of ancillary techniques in diagnosis and subclassifying non-Hodgkin's lymphomas on fine needle aspiration cytology. *Cytopathology* 17, 275-287.
- Diaz-Meco MT, Dominguez I, Sanz L, Dent P, Lozano J, Municio MM, Berra E, Hay RT, Sturgill TW, and Moscat J (1994a): PKC $\zeta$  induces phosphorylation and inactivation of I $\kappa$ B- $\alpha$  *in vitro*. *EMBO J.* 13, 2842-2848.
- Diaz-Meco MT, Lozano J, Municio MM, Berra E, Frutos S, Sanz L, and Moscat J (1994b): Evidence for the *in vitro* and *in vivo* interaction of Ras with protein kinase C  $\zeta$ . *J Biol Chem.* 269, 31706-31710.
- DiPersio CM, Shao M, Di Costanzo L, Kreidberg JA, and Hynes, R. (2000): Mouse keratinocytes immortalized with large T antigen acquire alpha3beta1 integrin-dependent secretion of MMP-9/gelatinase. *B. J. Cell Sci.* 113, 2909-2921.
- Dong Z, Kumar R, Yang X, and Fidler IJ (1997): Macrophage-derived metalloelastase is responsible for the generation of angiostatin in Lewis lung carcinoma. *Cell* 88, 801-810.

- Dong Z, Nemeth JA, Cher ML, Palmer KC, Bright RC, and Fridman R (2001): Differential regulation of matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) and TIMP-2 expression in co-cultures of prostate cancer and stromal cells. *Int J Cancer* 93, 507-515.
- Drillenburg P, and Pals ST (2000): Cell adhesion receptors in lymphoma dissemination. *Blood* 95, 1901-1910.
- Dubois B, Masure S, Hurtenbach U, Paemen L, Heremans H, Van den Oord J, Sciot R, Meinhart T, Hämerling G, Opdenakker G, and Arnold B (1999): Resistance of young gelatinase B-deficient mice to experimental autoimmune encephalomyelitis and necrotizing tail lesions. *J Clin Invest.* 104, 1507-1515.
- Duivenvoorden WC, Hirte HW, and Singh G (1999): Transforming growth factor beta1 acts as an inducer of matrix metalloproteinase expression and activity in human bone-metastasizing cancer cells. *Clin Exp Metastasis* 17, 27-34.
- Dvorak HF (1986): Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N. Engl. J. Med.* 315, 1650-1659.
- Eberhardt W, Huwiler A, and Beck KF (2000): Amplification of IL-1 $\beta$ -induced matrix metalloproteinase-9 expression by superoxide in rat glomerular mesangial cells is mediated by increased activities of NF- $\kappa$ B and activating protein-1 and involves activation of the mitogen-activated protein kinase pathways. *J Immunol.* 165, 5788-5797.
- Egeblad M, and Werb Z (2002): New functions for matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2, 161.
- Ehrhardt C, Kneuer C, and Bakowsky U (2003): Selectins - an emerging target for drug delivery. *Adv. Drugs Delivery Reviews* 56, 527-549.
- Ernst PB, and Gold BD (2000): The disease spectrum of *Helicobacter pylori* : the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 615-640.
- Estève PO, Chicoine E, Robledo O, Aoudjat F, Descoteaux A, Potworowski EF, and St-Pierre Y (2002): Protein kinase C- $\zeta$  regulates transcription of the matrix metalloproteinase-9 gene induced by IL-1 and TNF- $\alpha$  in glioma cell via NF- $\kappa$ B. *J Biol Chem.* 277, 35150-35155.
- Feinberg AP, and Coffe DS (1982): Organ site specificity for cancer in chromosomal instability disorders. *Cancer Res.* 42, 3252-3254.
- Felbor U, Dreier L, Bryant RA, Ploegh HL, Olson BR, and Mothes W (2000): Secreted cathepsin L generates endostatin from collagen XVIII. *EMBO J.* 19, 1187-1194.
- Fernandez FG, Campbell LG, Liu W, Shipley JM, Itohara S, Patterson GA, Senior RM, Mohanakumar T, and Jaramillo A (2005): Inhibition of obliterative airway disease development in murine tracheal allografts by matrix metalloproteinase-9 deficiency. *Am J Transplant* 5, 671-683.
- Ferrera N, Gerber HP, and LeCouter J (2003): The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.* 9.
- Fidler IJ, and Kripke ML (1977): Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. *Science* 197, 893-895.
- Fiore E, Fusco C, Romero P, and Stamenkovic I (2002): Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9/gelatinase B) proteolytically cleaves ICAM-1 and participates in tumor cell resistance to natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Oncogene* 21, 5213-5223.
- Fisher SG, and Fisher RI (2004): The epidemiology of Non-Hodgkin's lymphoma. *Oncogene* 23, 6524-6534.
- Folkman J (2003): Angiogenesis and apoptosis. *Semin. Cancer Biol.* 13, 159-167.
- Folkman J, and D'Amore PA (1996): Blood vessel formation : what is its molecular basis? *Cell* 87, 1153-1155.
- Fu X, Kassim SY, Parks WC, and Heinecke JW (2001): Hypochlorous acid oxygenates the cysteine switch domain of pro-matriLySIN (MMP-7). A mechanism for matrix metalloproteinase activation and atherosclerotic plaque rupture by myeloperoxidase. *J Biol Chem.* 276, 41279-41287.
- Futreal PA, Coin L, Marshall M, Down T, Hubbard T, Wooster R, Rahman N, and Stratton MR (2004): A census of human cancer genes. *Nature Rev. Cancer* 4, 177-183.
- Galis ZS, Johnson C, Godin D, Magid R, Shipley JM, Senior RM, and Ivan E (2002): Targeted disruption of the matrix metalloproteinase-9 gene impairs smooth muscle cell migration and geometrical arterial remodeling. *Circ Res* 91, 852-859.
- Garcia-Rodriguez LA, and Huerta-Alvarez C (2001): Reduced risk of colorectal cancer among long-term users of aspirin and nonaspirin nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Epidemiology* 12, 88-93.
- Garrington TP, and Johnson GL (1999): Organisation and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 211-218.
- Geissmann F, Cameron TO, Sidobre S, Manlongat N, Kronenberg M, Briskin MJ, Dustin ML, and Littman DR (2005): Intravascular immune surveillance by CXCR6+ NKT cells patrolling liver sinusoids. *PLoS Biol.* 3.

- Genersch E, Hayess K, Neuenfeld Y, and Haller H (2000): Sustained ERK phosphorylation is necessary but not sufficient for MMP-9 regulation in endothelial cells: involvement of Rasdependent and-independent pathways. *J. Cell Sci.* 113, 4319-4330.
- Giraudo E, Inoue M, and Hanahan D (2004): An amino-biphosphonate targets MMP-9-expressing macrophage and angiogenesis to impair cervical carcinogenesis. *J Clin Invest.* 114, 623-633.
- Glas AM, Kersten MJ, Delahaye LJ, Witteveen AT, Kibbelaar RE, Velds A, Wessels LF, Joosten P, Kerkhoven RM, Bernards R, van Krieken JH, Kluin PM, van't Veer LJ, and de Jong D (2005): Gene expression profiling in follicular lymphoma to assess clinical aggressiveness and to guide the choice of treatment. *Blood* 105, 301-307.
- Goswami S, Sahai E, Wyckoff JB, Cammer M, Cox D, Pixley FJ, Stanley ER, Segall JE, and Condeelis JS (2005): Macrophages promotes the invasion of breast carcinoma cells via a colony-stimulating factor-1/ epidermal growth factor paracrine loop. *Cancer Res.* 64, 5278-5284.
- Greenlee KJ, Werb Z, and Kheradmand F (2007): Matrix Metalloproteinases in Lung : Multiple, Multifarious, and Multifaceted. *Physiol Rev* 87, 69-98.
- Greenman C, Stephens P, Smith R, Dalgliesh GL, Hunter C, Bignell G, Davies H, Teague J, Butler A, Stevens C, Edkins S, O'Meara S, Vastrik I, Schmidt EE, Avis T, Barhorpe S, Bhamra G, Buck G, Choudhury B, Clements J, Cole J, Dicks E, Forbes S, Gray K, Halliday K, Harrison R, Hills K, Hinton J, Jenkinson A, Jones D, Menzies A, Mironenko T, Perry J, Raine K, Richardson D, Shepherd R, Small A, Tofts C, Varian J, Webb T, West S, Widaa S, Yates A, Cahill DP, Louis DN, Goldstraw P, Nicholson AG, Brasseur F, Looijenga L, Weber BL, Chiew YE, DeFazio A, Greaves MF, Green AR, Campbell P, Birney E, Easton DF, Chenevix-Trench G, Tan MH, SK, T. B., Yuen ST, Leung SY, Wooster R, Futreal PA, and Stratton MR (2007): Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* 446, 153-158.
- Gross J, and Lapierre CM (1962): Collagenolytic activity in amphibian tissues : a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci* 48, 1014-1022.
- Gum R, Lengyel E, Juarez J, Chen JH, Sato H, Seiki M, and Boyd D (1996): Stimulation of 92-kDa gelatinase B promoter activity by ras is mitogen-activated protein kinase kinase-1 independant and requires multiple transcription factor binding sites including closely spaced PEA3/ets and AP-1 sequences. *J Biol. Chem.* 271, 10672-10680.
- Hadden JW (2003): Immunodeficiency and cancer : prospects for correction. *Int. Immunopharmacol.* 3, 1061-1071.
- Halaas JL, Teruya-Feldstein J, and Zelenetz AD (2003): Follicular lymphoma Grade 3 Is not Equivalent to follicular Large Cell Lymphoma: Comparaison of the WHO and IWF Classification System. *Blood* 102.
- Hamano Y, Zeisberg M, Sugimoto H, Lively JC, Maeshima Y, Yang C, Hynes RO, Werb Z, Sudhakar A, and Kalluri R (2003): Physiological levels of tumstatin, a fragment of collagen IV alpha3 chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via alphaV beta3 integrin. *Cancer cell* 3, 589-601.
- Han YP, Tuan TL, Hugues M, Wu H, and Garner WL (2001): Transforming growth factor-beta – and tumor necrosis factor-alpha-mediated induction and proteolytic activation of MMP-9 in human skin. *J. Biol. Chem.* 276, 22341-22350.
- Hanahan D, and Weinberg RA (2000): The Hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hande KR, Collier M, Paradiso L, Stuart-Smith J, Dixon M, Clendeninn N, Yeun G, Alberti D, Binger K, and Wilding G (2004): Phase I and pharmacokinetic study of prinomastat, a matrix metalloproteinase inhibitor. *Clin Cancer Res* 10, 909-915.
- Haro H, Crawford HC, Fingleton B, MacDougall JR, Shinomiya K, Spengler DM, and Matrisian LM (2000): Matrix metalloproteinase-3-dependent generation of a macrophage chemoattractant in a model of herniated disc resorption. *J. Clin. Invest.* 105, 133-141.
- Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, Delsol G, De Wolf-Peeters C, Falini B, and Gatter KC (1994): A revised European-American classification of lymphoid neoplasms : a proposal from the the international Lymphoma study group. *Blood* 84, 1361-1392.
- Haura EB, Turkson J, and Jove R (2005): Mechanisms of disease: insights into the emerging role of signal transducers and activators of transcription in cancer. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 2, 315-324.
- Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, Crystal RG, Besmer P, Lyden D, Moore MA, Werb Z, and Rafii S (2002): Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* 109, 625-637.
- Hidalgo M, and Eckhardt SG (2001): Developpement of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *J Natl Cancer Inst.* 93, 178-193.

- Hiratsuka S, Nakamura K, Iwai S, Murakami M, Itoh T, Kijima H, Shipley JM, Senior RM, and Shibuya M (2002): MMP-9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell* 2, 289-300.
- Hotary KB, Allen ED, Brooks PC, Datta NS, Long MW, and Weiss SJ (2003): Membrane type 1 matrix metalloproteinase usurps tumor growth control imposed by the three-dimensional extracellular matrix. *Cell* 114, 33-45.
- Hu J, Van den Steen PE, Sang QXA, and Opdenakker G (2007): Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 6, 480-498.
- Huang S, Van Arsdall M, Tedjarati S, McCarty M, Wu W, Langley R, and Fidler IJ (2002): Contributions of stromal metalloproteinase-9 to angiogenesis and growth of human ovarian carcinoma in mice. *J Natl Cancer Inst.* 94, 1134-1142.
- Huhtala P, Tuuttila A, Chow LT, Lohi J, Keski OJ, and Tryggvason K (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.* 266, 16485-16490.
- Huxley-Jones J, Robertson DL, and Boot-Hanford RP (2007): On the origins of extracellular matrix in vertebrates. *Matrix Biol.* 26, 2-11.
- Hynes RO (1992): Integrins: versatility, modulation, and signalling in cell adhesion. *Cell* 69.
- Hynes RO (2002): Integrins : bidirectionnal, allosteric signaling machines. *Cell* 110, 673-687.
- Ikejiri M, Bernardo MM, Bonfil RD, Toth M, Chang M, Fridman R, and Mobashery S (2005): Potent mechanism-based inhibitors for matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 280, 33992-34002.
- International Lymphoma Study Group (1997): A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma: the Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Blood* 89, 3909-3918.
- Irie K, Komori K, Tsuruga E, Sakakura Y, Kaku T, and Yajima T (2005): Impaired alveolization in mice deficient in membranetype matrix metalloproteinase 1 (MT1-MMP). *Med Mol Morphol* 38, 43-46.
- Itoh T, Tanioka M, Matsuda H, Nishimoto H, Yoshioka T, Suzuki R, and Uchira M (1999): Experimental metastasis is suppressed in MMP-9-deficient mice. *Clin Exp Metastasis* 17, 177-181.
- Itoh T, Tanioka M, Yoshioka H, Yoshioka T, Nishimoto H, and Itohara S (1998): Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. *Cancer Res.* 58, 1048-1051.
- Jain RK (2005): Normalization of tumor vasculature : an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 307, 58-62.
- Jiang Y, Goldberg ID, and Shi YE (2002): Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer. *Oncogene* 21, 2245-2252.
- Jiang Y, and Muschel RJ (2002): Regulation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) by translational efficiency in murine prostate carcinoma cells. *Cancer Res.* 62, 1910.
- Jodele S, Chatrain CF, Blavier L, Lutzko C, Crooks GM, Shimada H, Coussens LM, and DeClerk YA (2005): The contribution of bone marrow-derived cells to the tumor vasculature in neuroblastoma is matrix metalloproteinase-9 dependent. *Cancer Res.* 65, 3200-3208.
- Johansson B, Mertens F, and Mitelman F (1996): Primairy vs. secondary neoplasia-associated chromosomal abnormalities - balanced rearrangements vs. genomic imbalances ? *Genes Chromosomes Cancer* 16, 155-163.
- Johansson N, Ala-aho R, Uitto V, Grenman R, Fusenig NE, Lopez- Otin C, and Kahari VM (2000): Expression of collagenase-3 (MMP-13) and collagenase-1 (MMP-1) by transformed keratinocytes is dependent on the activity of p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Cell Sci.* 113, 227-235.
- Juliano RL (2002): Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin- superfamily members. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 42, 283-323.
- Kaleem Z (2006): Flow cytometric Analysis of lymphomas : Current status and usefulness. *Arch Pathol Lab Med* 130, 1850-1858.
- Kalluri R (2003): Basement membranes : Structure, assembly and role in tumor angiogenesis. *Nature Review Cancer* 3, 422-433.
- Kannagi R (2004): Molecular mechanism for cancer-associated induction of sialyl Lewis X and sialyl Lewis A expression - The Warburg effect revisited. *Glycobiol J* 20, 353-364.
- Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C, MacDonald DD, Jin DK, Shido K, Kerns SA, Zhu Z, Hicklin D, Wu Y, Port JL, Altorki N, Port ER, Ruggero D, Shmelkov SV, Jensen KK, Rafii S,

- and Lyden D (2005): VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the premetastatic niche. *Nature* 438, 820-827.
- Karin M (2006a): NF- $\kappa$ B and cancer: mechanisms and targets. *Mol. Carcinog.* 45, 355-361.
- Karin M (2006b): Nuclear factor- $\kappa$ B in cancer development and progression. *Nature*.
- Karin M, and Greten FR (2005): NF- $\kappa$ B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 749-759.
- Karran P, Offman J, and Bignami M (2003): Human mismatch repair, drug induced DNA damage, and secondary cancer. *Biochimie* 85, 1149-1160.
- Kim J, Yu W, Kovalski K, and Ossowski L (1998): Requirement for specific proteases in cancer cell intravasation as revealed by a novel semi-quantitative PCR-based assay. *Cell* 94, 353-362.
- Kinzley KW, and Vogelstein B (1997): Gatekeepers and caretakers. *Nature* 386, 761-763.
- Kjeldsen L, Johnsen AH, Sengel H, and Borregaard N (1993): Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *J. Biol. Chem.* 268, 10425-10432.
- Kobayashi T, Kishimoto J, Ge Y, Jin W, Hudson DL, Ouahes N, Ehama R, Shinkai H, and Burgeson RE (2001): A novel mechanism of matrix metalloproteinase-9 gene expression implies a role for keratinization. *EMBO Rep.* 2, 604-608.
- Kong Y, Poon R, Nadesan P, Di Muccio T, Fodde R, Khorkha R, and Alman BA (2004): Matrix metalloproteinase activity modulates tumor size, cell motility, and cell invasiveness in murine aggressive fibromatosis. *Cancer Res.* 64, 5795-5803.
- Kossakowska AE, Edwards DR, Prusinkiewicz C, Zhang MC, Guo D, Urbanski SJ, Grogan T, Marquez LA, and Janowska-Wieczorek A (1999): Interleukin-6 regulation of matrix metalloproteinase (MMP-2 and MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1) expression in malignant non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 94, 2080.
- Kossakowska AE, Hinek A, Edwards DR, Lim MS, Zhang CL, Breitman DR, Prusinkiewicz C, Stabbler AL, Urbanski LS, and Urbanski SJ (1998): Proteolytic activity of human non-Hodgkin's lymphomas. *Am. J. Pathol.* 152, 565-576.
- Kossakowska AE, Urbanski SJ, and Janowska-Wieczorek A (2000): Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors - expression, role and regulation in human malign non-Hodgkin's lymphomas. *Leuk Lymphoma* 39, 485-493.
- Krüger A, Arlt MJE, Gerg M, Kopitz C, Bernardo MM, Chang M, Mobashery S, and Fridman R (2005): Antimetastatic Activity of novel Mechanism-Based Gelatinase inhibitor. *Cancer Res.* 65, 3523-2526.
- Kruger A, Soeltl R, Sopov I, Kopitz C, Arlt M, Magdolen V, Harbeck N, Gansbacher B, and Schmitt M (2001): Hydroxamate-type matrix metalloproteinase inhibitor batimastat promotes liver metastasis. *Cancer Res.* 61, 1272-1275.
- Kuper H, Adami HO, and Trichopoulos D (2000): Infections as a major preventable cause of human cancer. *J. Intern. Med.* 248, 171-183.
- Lalancette M, Aoudjit F, Potworowski EF, and St-Pierre Y (2000): Resistance of ICAM-1-deficient mice to metastasis overcome by increased aggressiveness of lymphoma cells. *Blood* 95, 314-319.
- Lambert E, Dassé E, Haye B, and Petitfrère E (2004): TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol* 49, 187-198.
- Lambert V, Wielockx B, Munaut C, Galopin C, Jost M, Itoh T, Werb Z, Baker A, Libert C, Krell HW, Foidart JM, Noël A, and Rakic JM (2003): MMP-2 and MMP-9 synergize in promoting choroidal neovascularization. *FASEB J* 17, 2290-2292.
- Last K, Debernardi S, and Lister TA (2005): Molecular diagnosis of lymphoma : outcome prediction by gene expression profiling in diffuse large B cell lymphoma. *Methods Mol Med* 115, 15-63.
- LeBeau MM, and Rowley JD (1986): Chromosomal abnormalities in leukemia and lymphoma : clinical and biological significance. *Adv. Hum Genet.* 15, 1-54.
- Lee MH, and Murphy G (2004): Matrix metalloproteinases at a glance. *J Cell Science* 117, 4015-4016.
- Lee AY, Akers KT, Collier M, Li L, Eisen AZ, and Seltzer JL (1999): Intracellular activation of gelatinase A (72-kDa type IV collagenase) by normal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci* 94, 4424-4429.
- Lee S, Jilani SM, Nikolova GV, Carpizo D, and Irueala-Arispe ML (2005): Processing of VEGF-A by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors. *J Cell Biol.* 169, 681-691.
- Lengauer C, Kingsley KW, and Vogelstein B (1998): Genetic instability in human cancers. *Nature* 396, 643-649.
- Lennert K, Mohri N, Stein H, and Kaiserling E (1975): The histopathology of malignant lymphoma. *Br J Hematol.* 31, 193.

- Leppert D, Hauser SL, Kishiyama JL, An S, Zeng L, and Goetzl EJ (1995): Stimulation of matrix-metalloproteinase-dependant migration of T cells by eicosanoids. *FASEB J*, 1473-1481.
- Levi E, Fridman R, Miao HQ, Ma YS, Yayon A, and Vlodavsky I (1996): Matrix metalloproteinase 2 releases active soluble ectodomain of fibroblast growth factor receptor 1. *Proc Natl Acad Sci* 93, 7069-7074.
- Lewis TS, Shapiro PS, and Ahn NG (1998): Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv. Cancer Res.* 74, 49-139.
- Li CKF, Pender SLF, Pickard KM, Chance V, Holloway JA, Huett A, Goncalves NS, Mudgett JS, Dougan G, Frankel G, and MacDonald TT (2004): Impaired immunity to intestinal bacterial infection in stromelysin-1 (matrix metalloproteinase-3)-deficient mice. *J Immunol* 173, 5171-5179.
- Lin WW, and Karin M (2007): A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin. Invest.* 117, 1175-1183.
- Liotta L, and Pericoin E (2000): Molecular profiling of human cancers. *Nature Rev. Genet.* 1, 48-56.
- Lodish H, Berk A, Zipurski SL, Matsudaira P, Baltimore D, and Darnell J (2000): *Biologie moléculaire de la cellule*. DeBoeck University.
- Lohi J, Wilson CL, Roby JD, and Parks WC (2001): Epilysin, a novel human matrix metalloproteinase (MMP-28) expressed in testis and keratinocytes and in response to injury. *J Biol Chem.* 276, 10134-10144.
- Lozonschi L (1999): Controlling tumor angiogenesis and metastasis of C26 murine colon adenocarcinoma by a new matrix metalloproteinases inhibitor, KB-R7785, in two tumor models. *Cancer Res.* 59, 1252.
- Lukes RF, and Collins RD (1974): Immunological characterisation of human malignant lymphomas. *Cancer* 34, 1488-1503.
- Mackay AR, Hartzler JL, Pelina MD, and Thorgeirsson UP (1990): Studies on the ability of 65-kDa and 92-kDa tumor cell gelatinases to degrade type IV collagen. *J. Biol. Chem.* 265, 21929-21934.
- Maeda H, and Akaike T (1998): Nitrite oxide and oxygen radicals in infection, inflammation and cancer. *Biochemistry* 63, 854-864.
- Maekawa R, Maki H, Yoshida H, Hojo K, Tanaka H, Wada T, Uchida N, Takeda Y, Kasai H, Okamoto H, Tsuziki H, Kambayashi Y, Watanabe F, Kawada K, Toda KI, Ohtani M, Sugita K, and Yoshioka T (1999): Correlation of antiangiogenic and antitumor efficacy of N-biphenyl sulfonylphenylalanine hydroxamic acid (BPNA), an orally-active, selective matrix metalloproteinase inhibitor. *Cancer Res.* 59, 1231-1235.
- Maekawa Y, and Yasutomo K (2005): Antigen-driven T-cell repertoire selection. *Crit Rev Immunol.* 25, 59-74.
- Manello F, Toni G, and Papa S (2005): Matrix metalloproteinase inhibitors as anticancer therapeutics. *Curr Cancer Drug Targets* 5, 285-298.
- Martignetti JA, Aqeel AA, Sewairi WA, Boumrah CE, Kambouris M, Mayouf SA, Sheth KV, Eid WA, Dowling O, Harris J, Glucksman MJ, Bahabri S, Meyer BF, and Desnick RJ (2001): Mutation of the matrix metalloproteinase 2 gene (MMP2) causes a multicentric osteolysis and arthritis syndrome. *Nature Genet.* 28, 261-265.
- Masumoto K, de Rooij JD, Suita S, Rottier R, Tibboel D, and de Krijger RR (2005): Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases during normal human pulmonary development. *Histopathology* 47, 410-419.
- Masure S, Nys G, Fiten P, Van Damme J, and Opdenakker G (1993): Mouse gelatinase B. cDNA cloning, regulation of expression and glycosylation in WEHI-3 macrophage and gene organisation. *Eur J Biochem* 218, 129-141.
- Matache C, Stefanescu M, Dragomir C, Tanaseanu S, Onu A, Ofiteru A, and Szegli G (2003): Matrix metalloproteinase-9 and its natural inhibitor TIMP-1 expressed or secreted by peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun* 20, 323-331.
- Matrisian LM, Sledge GW Jr, and Mohla S (2003): Extracellular proteolysis and cancer : meeting summary and future directions. *Cancer Res.* 63, 6105.
- McCawley LJ, Crawford HC, King LE, Mudgett J Jr, and Matrisian LM (2004): A protective role for matrix metalloproteinase-3 in squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 64, 6965-6972.
- McCawley LJ, Li S, Wattenberg EV, and Hudson LG (1999): Sustained activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. A mechanism underlying receptor tyrosine kinase specificity for matrix metalloproteinase 9 induction and cell migration. *J. Biol. Chem.* 274, 4347-4353.
- McCawley LJ, and Matrisian LM (2001): Matrix metalloproteinases : they're not just for matrix anymore! *Curr Opin Cell Biol.* 13, 534-540.
- McEver RP (2002): Selectins : lectins that initiate cell adhesion under flow. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 581-586.

- McMillan SJ, Kearley J, Campbell JD, Zhu XW, Larbi KY, Shipley JM, Senior RM, Nourshargh S, and Lloyd CM (2004): Matrix metalloproteinase-9 deficiency results in enhanced allergen-induced airway inflammation. *J Immunol* 172, 2586-2594.
- McQuibban GA, Butler GS, Gong JH, Bendall L, Power C, Clark-Lewis I, and Overall CM (2001): Matrix metalloproteinase activity inactivate the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1. *J Biol Chem.* 276, 43503-43508.
- McQuibban GA, Gong JH, Tam EM, McCulloch CA, Clark-Lewis I, and Overall CM (2000): Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3. *Science* 289, 1202-1206.
- Meyer E, Vollmer JY, Bovey R, and Stamenkovic I (2005): Matrix metalloproteinases 9 and 10 inhibit protein kinase C-potentiated, p53-mediated apoptosis. *Cancer Res.* 65, 4261-4272.
- Michor F, Iwasa Y, and Nowak MA (2004): Dynamics of cancer progression. *Nature Rev. Cancer* 4, 197-205.
- Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, Bos PD, Shu W, Giri DD, Viale A, Olshen AB, Gerald WL, and Massague J (2005): Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature* 436, 518-524.
- Missé D, Esteve PO, Renneboog B, Vidal M, Cerutti M, St Pierre Y, Yssel H, Parmentier M, and Veas F (2001): HIV-1 glycoprotein 120 induces the MMP-9 cytopathogenic factor production that is abolished by inhibition of the p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Blood* 98, 541-547.
- Mitsiades N, Yu WH, Poulaki V, Tsokos M, and Stamenkovic I (2001): Matrix metalloproteinase-7-mediated cleavage of Fas ligand protects tumor cells from chemotherapeutic drug cytotoxicity. *Cancer Res.* 61, 577-581.
- Montgomery AM, Mueller BM, Reisfeld RA, Taylor SM, and DeClerk Ya (1994): Effects of tissue inhibitor of the matrix metalloproteinase-2 expression on the growth and spontaneous metastasis of a human melanoma cell line. *Cancer Res.* 54, 5467-5473.
- Mook OR, Frederiks WM, and Van Noorden CJ (2004): the role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. *Biochim Biophys Acta* 1705, 69-89.
- Morini M, Mottolese M, Ferrari N, Ghiorzo F, Buglioni S, Mortarini R, Noonan DM, Natali PG, and Albini A (2000): The alpha 3 beta 1 integrin is associated with mammary carcinoma cell metastasis, invasion, and gelatinase B (MMP-9) activity. *Int J Cancer* 87, 336-342.
- Mostafa ME, Chollet-Martin S, Oudghiri M, Laquay N, Jacob MP, Michel JB, and Feldman LJ (2001): Effects of interleukin-10 on monocyte/endothelial cell adhesion and MMP-9/ TIMP-1 secretion. *Cardiovasc. Res.* 49, 882-890.
- Mott JD, and Werb Z (2004): Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 558-564.
- Mudgett JS, Hutchinson NI, Chartrain NA, Forsyth AJ, McDonnell J, Singer II, Bayne EK, Flanagan J, Kawka D, Shen CF, Stevens K, Chen H, Trumbauer M, and Visco DM (1998): Susceptibility of stromelysin 1-deficient mice to collagen-induced arthritis and cartilage destruction. *Arthritis Rheum.* 41, 110-121.
- Mueller MM, and Fusenig NE (2004): Friends or foes - bipolar effects of the tumor stroma in cancer. *Nat Rev Cancer* 4, 839-849.
- Muller A, Horney B, Soto H, Ge N, Carton D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verastegui E, and Zlotnik A (2001): Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410, 50-56.
- Nagase H, and Woessner JF Jr (1999): Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 274, 21491-21494.
- Naglich JG, Jure-kunkel M, Gupta E, Farnoli J, Henderson AJ, Lewin AC, Talbott R, Baxter A, Bird J, Savopoulos R, Wills R, Kramer RA, and Trail PA (2001): Inhibition of angiogenesis and metastasis in two murine models by the matrix metalloproteinase inhibitor. BMS-275291. *Cancer Res.* 61, 8480-8485.
- Nair RR, and Boyd DD (2005): Expression cloning of novel regulators of 92 kDa type IV collagenase expression. *Biochim Biophys Acta* 2005, 1135-1136.
- Nakahara H, Howard L, Thompson EW, Sato H, Seiki M, Yeh Y, and Chen WT (1997): Transmembrane/cytoplasmic domain-mediated membrane type 1-matrix metalloprotease docking to invadopodia is required for cell invasion. *Proc Natl Acad Sci* 94, 7959-7964.
- Nathan C (2002): Points of control in inflammation. *Nature* 420, 846-852.
- National Cancer Institute Study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas (1982): Summary and description of a Working Formulation for clinical Usage. *Cancer* 49, 2112-2135.
- Nelissen I, Martens E, Van den Steen PE, Proost P, Ronsse I, and Opdenakker G (2003): Gelatinase B/matrix metalloproteinase-9 cleaves interferon- $\beta$  and is a target for immunotherapy. *Brain* 126, 1371-1381.
- Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, and Matrisian LM (2000): Matrix metalloproteinase: Biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* 18, 1135-1149.

- Nguyen DX, and Massagué J (2007): Genetic determinants of cancer metastasis. *Nat Rev Genet.* 8, 341-352.
- Nielson BS, Timshel S, Kjeldsen L, Sehested M, Pyke C, Borregaard N, and Dan K (1996): 92 kDa type IV collagenase (MMP-9) is expressed in neutrophils and macrophages but not in malignant epithelial cells in human colon cancer. *Int. J. Cancer* 65.
- Nikiforov MA, Hagen K, Ossovskaya VS, Connor TM, Lowe SW, Deichman GI, and Gudkov AV (1996): p53 modulation of anchorage independent growth and experimental metastasis. *Oncogene* 13, 1709-1719.
- Nishida N, Xie C, Shimaoka M, Cheng Y, Walt T, and Springer TA (2006): Activation of leucocyte beta 2 integrins by conversion from bent to extended conformations. *Immunity* 25, 583-594.
- Nowell PC (1976): The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194, 23-28.
- Nuti E, Orlandini E, Nencetti S, Rossello A, Innocenti A, Scozzafava A, and Supuran CT (2007): Carbonic anhydrase and matrix metalloproteinase inhibitors. Inhibition of human tumor-associated isozymes IX and cytosolic isozyme I and II with sulfonylated hydroxamates. *Bioorg Med Chem* 15, 2298-2311.
- Nyberg P, Xie L, and Kalluri R (2005): Endogenous inhibitors of angiogenesis. *Cancer Res.* 65, 3967-3979.
- O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olson BR, and Folkman J (1997): Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 88, 277-285.
- Oh, J., Seo DW, Diaz T, Wei B, Ward Y, Ray JM, Morioka Y, Shi S, Kitaama H, Takahashi C, Noda M, and Stettler-Stevenson WG (2004): Tissue inhibitors of metalloproteinase 2 inhibits endothelial cell migration through increased expression of RECK. *Cancer Res.* 64, 9062.
- Opdenakker G, Van den Steen PE, and Van Damme J (2001): Gelatinase B : A tuner and amplifier of immune functions. *Trends Immunol.* 22, 571-579.
- Overall CM, and Kleifield O (2006b): Tumor microenvironnement - opinion : validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-target for cancer therapie. *Nat Rev Cancer* 6, 227-39.
- Overall CM, and Lopez-Otin C (2002): Strategies for MMP inhibition in cancer : Innovations for the post-trial era. *Nature Reviews Cancer* 2, 657-672.
- Overall CM, McQuibban GA, and Clark-Lewis I (2002): Discovery of chemokine substrates for matrix metalloproteinases by exosite scanning: a new tool for degradomics. *Biol. Chem.* 383, 1059-1066.
- Owen JL, Iragavarapu-Charyulu V, Gunja-Smith Z, Herbert LM, Grossi JF, and Lopez DM (2003): Up-regulation of matrix metalloproteinase-9 in T lymphocytes of mammary tumor bearers : role of vascular endothelial growth factor. *J Immunol.* 171, 4340-4351.
- Page-McCaw A, Ewald AJ, and Werb Z (2007): Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodeling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 221-233.
- Papavasiliou FN, and Schatz DG (2002): Somatic hypermutation of immunoglobulin genes: Merging mechanisms for genetic Diversity. *Cell* 109, S35-S44.
- Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, and Dong C (2005): A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat. Immunol.* 6, 1133-1141.
- Parks WC, Wilson CL, and Lopez-Boado YS (2004): Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 617-629.
- Pasqualucci L, Neumeister P, Goosens T, Nanjangud G, Chaganti RS, Kuppers R, and Dalla-Favera R (2001): Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* 412, 341-346.
- Pavlaki M, and Zucker S (2003): Matrix Metalloproteinase inhibitors (MMPIs): the beginning of phase I or the termination of phase III clinical trials. *Cancer metastasis Rev.* 22, 177-203.
- Pollard JW (2004): Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* 4, 71-78.
- Ponder BA (2001): Cancer genetics. *Nature* 411, 336-341.
- Prosper F, Robledo C, Cuesta B, Rifon J, Bordolla JR, Pardo J, and Rocha E (1994): Incidence of non-Hodgkin's lymphoma in patients treated for Hodgkin's disease. *Leuk Lymphoma* 12, 457-462.
- Qi JH, Ebrahem Q, Moore N, Murphy G, Claesson-Welsh L, Bond M, Baker A, and Anand-Apte B (2003): A novel function for tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) : inhibition of angiogenesis by blockage of VEGF binbing to VEGF receptor-2. *Nature Med.* 9, 407-415.
- Rajagopalan H, Nowak MA, Vogelstein B, and Lengauer C (2003): Tht significance of unstable chromosomes in colorectal cancer. *Nature Rev. Cancer* 3, 695-701.
- Ram M, Sherer Y, and Shoenfeld Y (2006): Matrix metalloproteinase-9 and Autoimmune Diseases. *J Clin Immunol.* 26, 299-307.
- Ramana CV, Chatterjee-Kishore M, Nguyen H, and Stark GR (2000): Complex roles of Stat1 in regulating gene expression. *Oncogene* 19, 2619-2627.

- Rhee JS, Diaz R, Korets L, Hodgson JG, and Coussen LM (2004): Timp-1 alters susceptibility to carcinogenesis. *Cancer Res.* 64, 952-961.
- Rhodes JM, and Simons M (2007): The extracellular matrix and blood vessel formation : not just a scaffold. *J Cell Mol Med* 11, 176-205.
- Ricca A, Biroccio A, Del Bufalo D, Mackay AR, Santoni A, and Cippitelli M (2000): Bcl-2 over-expression enhances NF-kappaB activity and induces MMP-9 transcription in human MCF7(ADR) breast-cancer cells. *Int J Cancer* 86, 188-196.
- Rivoltini L, Carrabba M, Huber V, Castelli C, Novellino L, Dalerba P, Mortarini R, Arancia G, Anichini A, Fais S, and Parmiani G (2002): Immunity to cancer : attack and escape in T lymphocyte-tumor cell interaction. *Immunol Rev* 188, 97-113.
- Rizvi MA, Evans AM, Tallman MS, Nelson BP, and Rosen ST (2004a): T-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 107, 1255-1264.
- Robertson MJ, Caligiuri MA, Manley TJ, Levine H, and Ritz J (1990): Human natural killer cell adhesion molecules. Differential expression after activation and participation in cytotoxicity. *J Immunol.* 145, 3194-3201.
- Roix JJ, McQueen PG, Munson PJ, Parada LA, and Misteli T (2003): spatial proximity of translocation-prone gene loci in human lymphomas. *Nature Genet.* 34, 287-291.
- Rolli M, Fransvea E, Pilch J, Saven A, and Felding-Habermann B (2003): Activated integrin  $\{\alpha\}v\{\beta\}3$  cooperates with metalloproteinase MMP-9 in regulating migration of metastatic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci* 21.
- Rosen SD (2004): Ligands for L-selectin : homing, inflammation, and beyond. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 129-156.
- Rossi D, and Zlotnik A (2000): The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 18, 217-242.
- Rous P, and Kidd J (1941): Conditional neoplasms and subthreshold neoplastic states : a study of the tar tumors of rabbits. *J. Exp. Med.* 73, 365-389.
- Rowley JD (2001): Chromosome translocations : dangerous. *Nat. Rev. Cancer* 1, 245-250.
- Royle L, Mattu TS, Hart E, Langridge JI, Merry AH, Murphy N, Harvey DJ, Dwek RA, and Rudd PM (2002): An analytical and structural database provides a strategy for sequencing o-glycans from microgram quantities of glycoproteins. *Anal. Biochem.* 304, 70-90.
- Rüdiger T, Weisenburger DD, Anderson JR, Armitage JO, Diebold J, MacLennan KA, Nathwani BN, Ullrich F, and Müller-Hermelink HK (2002): Peripheral T-cell lymphoma (excluding anaplastic large-cell lymphoma): results from the Non- Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Ann Oncol* 13, 140-149.
- Ruoslahti E, and Reed JC (1994): Anchorage dependence integrins, and apoptosis. *Cell* 77.
- Rydziel S, Varghese S, and Canalis E (1997): Transforming growth factor beta1 inhibits collagenase 3 expression by transcriptional and post-transcriptional mechanisms in osteoblast cultures. *J. Cell Physiol.* 170, 145-152.
- Saarialho-Kere UK, Welgus HG, and Parks WC (1993): Distinct mechanisms regulate interstitial collagenase and 92-kDa gelatinase expression in human monocytic-like cells exposed to bacterial endotoxin. *J. Biol. Chem.* 268, 17354-17361.
- Saghatelyan A, Jessani N, Joseph A, Humphrey M, and Cravatt BF (2004): Activity-based probes for the proteomic profiling of metalloproteinases. *Proc Natl Acad Sci* 101, 10000-10005.
- Sakata K, Satoh M, Someya M, Asanuma H, Nagakura H, Ouchi A, Nakata K, Kogawa K, Koito K, Hareyama M, and Himi T (2004): Expression of matrix metalloproteinase 9 is a prognostic factor in patients with non-Hodgkin lymphoma. *Cancer* 100, 356-365.
- Salmi M, and Jalkanen S (1997): How do lymphocytes know where to go:current concepts and enigmas of lymphocytes homing. *Adv Immunol.* 64.
- Salvesen GS, and Dixit VM (1997): Caspases: Intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 91, 443-446.
- Sancéau J, Boyd DD, Seiki M, and Bauvois B (2002): Interferons inhibit tumor necrosis factor- $\alpha$ -mediated matrix metalloproteinase-9 activation via interferon regulatory factor-1 binding competition with NF- $\kappa$ B. *J Biol. Chem.* 277, 35766-35775.
- Sang QX (1998): Complex role of matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Cell Res.* 8, 171-177.
- Sato H, and Seiki M (1993): Regulatory mechanism of 92 kDa Type IV collagenase gene expression which is associated with invasiveness of tumor cells. *Oncogene* 8, 395-405.
- Schatz DG (2004): V(D)J recombination. *Immunol Rev* 200, 5-11.
- Schlessinger J (2000): Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103, 211-225.
- Schonbeck U, Mach F, and Lybba, P. (1998): Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases : a novel caspase-1-independant pathway of IL-1 beta processing. *J Immunol* 161, 3340-3346.

- Schönbeck U, Mach F, Sukhova GK, Murphy C, Bonnefoy JY, Fabunmi RP, and Libby P (1997): Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells by T lymphocytes: a role for CD40 signaling in plaque rupture? *Circ Res* 81, 448-454.
- Seftor RE, Seftor EA, Koshikawa N, Meltzer PS, Gardner LM, Bilban M, Stetler-Stevenson WG, Quaranta V, and Hendrix MJ (2001): Cooperative interactions of laminin 5 gamma2 chain, matrix metalloproteinase-2, and membrane type-1-matrix/metalloproteinase are required for mimicry of embryonic vasculogenesis by aggressive melanoma. *Cancer Res.* 61, 6322-6327.
- Sehgal I, and Thompson TC (1999): Novel regulation of type IV collagenase (matrix metalloproteinase-9 and -2) activities by transforming growth factor- $\beta$ 1 in human prostate cancer cell lines. *Mol. Biol. Cell* 10, 407-416.
- Sehouli J, Mustea A, Konsgen D, Katsares I, and Lichtenegger W (2002): Polymorphism of IL-1 receptor antagonist gene: role in cancer. *Anticancer Res.* 22, 3421-3424.
- Seo DW, Li H, Guedez L, Wingfield PT, Diaz T, Salloum R, Wei BY, and Stetler-Stevenson WG (2003): TIMP-2 mediated inhibition of angiogenesis : an MMP-independent mechanism. *Cell* 114, 171-180.
- Shamri R, Grabovsky V, Gauguet JM, Feigelson S, Manevich E, Kolanus W, Robinson MK, Staunton DE, Von Andrian UH, and Alon R (2005): Lymphocyte arrest requires instantaneous induction of an extended LFA-1 conformation mediated by endothelium-bound chemokines. *Nat. Immunol.* 6, 497-506.
- Sheu BC, Hsu SM, Ho HN, Lien HC, Huang SC, and Lin RH (2001): A novel role of metalloproteinase in cancer-mediated immunosuppression. *Cancer Res.* 61, 237-242.
- Shipley JM, Doyle GA, Fliszar CJ, Ye QZ, Johnson LL, Shapiro SD, Welgus HG, and Seniro RM (1996): The structural basis for the elastolytic activity of the 92-kDa and 72-kDa gelatinases. Role of the fibronectin type II-like repeats. *J Biol Chem.* 271, 4335-4341.
- Shipp MA, Harrington DL, and Anderson J (1993): Development of practice model for aggressive lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 329, 987-994.
- Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, Allen R, Sidman C, Proetzel G, and Calvin D (1992): Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- $\beta$ 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 359, 693-699.
- Sieber OM, Heinemann K, and Tomlinson IP (2003): Genomic instability - the engine of tumorigenesis? *Nature Rev. Cancer* 3, 701-708.
- Simon C, Hicks MJ, Nemechek AJ, Mehta R, O'Malley BW Jr, Goepfert H, Flaitz CM, and Boyd, D. (1999): PD 098059, an inhibitor of ERK1 activation, attenuates the in vivo invasiveness of head and neck squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 80, 1412-1419.
- Simon C, Simon M, Vucelic G, Hicks MJ, Plinkert PK, Koitschev A, and Zenner HP (2001): The p38 SAPK pathway regulates the expression of the MMP-9 collagenase via AP-1-dependent promoter activation. *Exp. Cell Res.* 271, 344-355.
- Smyth MJ, Cretney E, Kershaw MH, and Hayakawa Y (2004): Cytokines in cancer immunity and immunotherapy. *Immunol. Rev.* 202, 275-293.
- Soede RD, Wijnands YM, Van Kouteren-Cobzaru I, and Roos E (1998): ZAP-70 tyrosine kinase is required for LFA-1-dependant T cell migration. *J Cell Biol.* 142, 1371-1379.
- Springer TA (1994): Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76.
- St-Pierre Y (2005): Organizing a tête-à-tête between cell adhesion Molecules and Extracellular proteases : A risky business that could lead to the survival of tumor cells. *Front. Bioscience* 10, 1040-1049.
- ST-Pierre Y, Couillard J, and Van Themsche C (2004): Regulation of MMP-9 gene expression for the development of novel molecular targets against cancer and inflammatory diseases. *Expert Opin. Ther. Targets* 8, 1-17.
- Sternlicht MD, Bissell MJ, and Werb Z (2000): The matrix metalloproteinase stromelysin-1 acts as a natural mammary tumor promoter. *Oncogene* 19, 1102-1113.
- Sternlicht MD, and Werb Z (2001): How matrix metalloproteinases regulate cell behaviour. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 463-516.
- Streuli CH, and Gilmore AP (1999): Adhesion-mediated signaling in the regulation of mammary epithelial cell survival. *J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia* 4, 183-191.
- Sudakar A, Sugimoto H, Yang C, Lively J, Zeisberg M, and Kalluri R (2003): Human tumstatin and endostatin exhibit distinct antiangiogenic activities mediated by  $\alpha v \beta 3$  and  $\alpha 5 \beta 1$  integrins. *Proc Natl Acad Sci* 100, 4766.
- Sultan S, Gosling M, Nagase H, and Powell JT (2004): Shear stress-induced shedding of intercellular adhesion molecule-1 from saphenous vein endothelium. *FEBS Lett* 2004, 161-165.

- Suzuki M, Raab G, Moses MA, Fernandez CA, and Klagsburn M (1997): Matrix metalloproteinase-3 releases active heparin-binding EGF-like growth factor by cleavage at a specific juxtamembrane site. *J. Biol. Chem.* 272, 31730-31737.
- Takagi J, Erickson HP, and Springer TA (2001): C-terminal opening mimics "inside-out" activation of integrin alpha $\beta$ 1. *Nat Struct Biol.* 8, 412-416.
- Taraboletti G, D'Ascenzo S, Borsotti P, Giavazzi R, Pavan A, and V., D. (2002): Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9 and MT1-MMP as membrane vesicle-associated components by endothelial cells. *Am J Pathol* 160, 673-680.
- Thornton PD, Fernandez C, and Giustolisi GM (2004): CD38 expression as a prognostic indicator in chronic lymphocytic leukaemia. *Hematol J.* 5, 145-151.
- Toth M, Chvyrkova I, Bernardo MM, Hernandez-Barrantes S, and Fridman R (2003): Pro-MMP-9 activation by the MT1-MMP/MMP-2 axis and MMP-3: role of TIMP-2 and plasma membranes. *Biochem Biophys Res Commun.* 308, 386-395.
- Vacca A, R. R., Presta M, Ribatti D, Iurlaro M, Merchionne F, Tanghetti E, Dammacco F, (2001): alpha(v)beta(3) integrin engagement modulates cell adhesion, proliferation, and protease secretion in human lymphoid tumor cells. *Exp. Hematol.* 29, 993-1003.
- Van de Broek I, Asosingh K, Allegaert T, Leleu X, Facon T, Vanderkerken K, Van Camp B, and Van Riet I (2004): Bone marrow endothelial cells increase the invasiveness of human multiple myeloma cell through upregulation of MMP-9 : evidence for a role of hepatocyte growth factor. *Leukemia* 18, 976-982.
- Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Rudd PM, Dwek RA, and Opdenakker G (2002): Biochemistry and Molecular Biology of Gelatinase B or Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit Rev Biochem Mol Biol* 37, 375-536.
- Van den Steen PE, Opdenakker G, Wormald MR, Dwek RA, and Rudd PM (2001): Matrix remodelling enzymes, the protease cascade and glycosylation. *Biochim Biophys Acta* 1528, 61-73.
- Van Den Steen PE, Wuys A, Husson SJ, Proost P, Van Damme J, and Opdenakker G (2003): Gelatinase B/MMP-9 and neutrophil collagenase/MMP-8 process the chemokines human GCP-2/CXCL6, ENA-78/CXCL5 and mouse GCP-2/LIX and modulate their physiological activities. *Eur J Biochem* 270, 3739-3749.
- Van Veer LJ, Dai H, Van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, Van des Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM, Roberts C, Linsley PS, Bernards R, and Friend SH (2002): Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415, 530-536.
- Vihinen P, and Kähäri VM (2002): Matrix metalloproteinases in cancer : Prognostic markers and therapeutic targets. *Int J Cancer* 99, 157-166.
- Visse R, and Nagase H (2003): Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases : structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 92, 827-839.
- Vu TH, Shipley JM, Bergers G, Bergers JE, Helms JA, Hanahan D, Shapiro SD, Senior RM, and Werb Z (1998): MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell* 93, 411-22.
- Wahl SM, Allen JB, Weeks BS, Wong HL, and Klotman PE (1993): Transforming growth factor beta enhances integrin expression and type IV collagenase secretion in human monocytes. *Proc Natl Acad Sci* 90, 4577-4581.
- Watabe T, Yoshida K, Shindoh M, Kaya M, Fujikawa K, Sato H, Seiki M, Ishii S, and Fujinaga K (1998): The Ets-1 and Ets-2 transcription factors activate the promoters of invasion-associated urokinase and collagenase genes in response to epidermal growth factor. *Int. J. Cancer* 77, 128-137.
- Watford WT, Hissong BD, Bream JH, Kanno Y, Muul L, and O'Shea JJ (2004): Signaling by IL-12 and IL-23 and the immunoregulatory roles of STAT4. *Immunol. Rev.* 202, 139-156.
- Weis S, Cui J, Barnes L, and Cheresh D (2004): Endothelial barrier disruption by VEGF-mediated Src activity potentiates tumor cell extravasation and metastasis. *J Cell Biol.* 167, 223-229.
- Werb Z (1997): ECM and cell surface proteolysis : regulating cellular ecology. *Cell* 91, 439-442.
- Werb Z, Tremble PM, Behrendtsen O, Crowley E, and Damsky CH (1989): Signal transduction through the fibronectin receptor induces collagenase and stromelysin gene expression. *J. Cell Biol.* 109, 877-889.
- Wilson CL, Heppner KJ, Labosky PA, Hogan BLM, and Matrisian L (1997): Intestinal tumorigenesis is suppressed in mice lacking the metalloproteinase matrilysin. *Proc Natl Acad Sci* 94, 1402-1407.
- Winberg JO, Kolset SO, Berg E, and Uhlin-Hansen L (2000): Macrophages secrete matrix metalloproteinase 9 covalently linked to the core protein of chondroitin sulfate proteoglycans. *J Molec Biol* 304, 669-680.

- Wiseman BS, Sternlicht MD, Lund LR, Alexander CM, Mott J, Bissell MJ, Soloway P, Itohara S, and Werb Z (2003): Site-specific inductive and inhibitory activities of MMP-2 and MMP-3 orchestrate mammary gland branching morphogenesis. *J. Cell. Biol.* 162, 1123-1133.
- Wize J, Sopata I, Smerdel A, and Maslinski S (1998): Ligation of selectin L and integrin CD11b/CD18 (Mac-1) induces release of gelatinase B (MMP-9) from human neutrophils. *Inflamm. Res.* 47, 325-327.
- Woessner F, and Nagase H (2000): *Matrix Metalloproteinases and TIMPs*. Oxford University Press. New York.
- Wong CW, Lee A, Shientag L, Yu J, Dong Y, Kao G, Al-Mehdi AB, Bernhard EJ, and RJ., M. (2001): Apoptosis : an early event in metastatic inefficiency. *Cancer Res.* 61, 333-338.
- Worthy lake RA, and Burridge K (2001): Leukocyte transendothelial migration : orchestrating the underlying molecular machinery. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 569-577.
- Wyckoff J, Wang W, Lin EY, Wang Y, Pixley F, Stanley ER, Graf T, Pollard JW, Segall J, and Condeelis J (2004): A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors. *Cancer Res.* 7922-7029.
- Xie B, Laouar A, and Huberman E (1998): Fibronectin-mediated cell adhesion is required for induction of 92-kDa Type IV collagenase/gelatinase (MMP-9) gene expression during macrophage differentiation. The signaling role of protein kinase C-β. *J. Biol. Chem.* 273, 11576-11582.
- Yamanishi Y, Boyle DL, Rosengren S, Green DR, Zvaifler NJ, and GS., F. (2002): Regional analysis of p53 mutations in rheumatoid arthritis synovium. *Proc Natl Acad Sci* 99, 10025-10030.
- Yan C, and Boyd DD (2007): Regulation of matrix Metalloproteinase Gene Expression. *J. Cell Physiol.* 211, 19-26.
- Yan C, Wang H, and Boyd DD (2001): KiSS-1 represses 92-kDa type IV collagenase expression by down-regulating NF-kappa B binding to the promoter as a consequence of Ikappa Balpha-induced block of p65/p50 nuclear translocation. *J. Biol. Chem.* 276, 1164-1172.
- Yang H, Yu J, Fu G, Shi X, Xiao L, Chen Y, Fang X, and He C (2007): Interaction between single molecules of Mac-1 and ICAM-1 in living cells: An atomic force microscopy study. *Exp Cell Res* 313, 3497-3504.
- Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, and Weinberg RA (2004): Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 117, 927-939.
- Yokoo T, and Kitamura M (1996): Dual regulation of IL-1 beta-mediated matrix metalloproteinase-9 expression in mesangial cells by NF-kappa B and AP-1. *Am. J. Physiol.* 270, F123-F130.
- Yu Q, and Stamenkovic I (2000): Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-B and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev.* 14, 163-176.
- Yurchenko PD, Amenta PS, and Patton BL (2004): Basement membrane assembly, stability and activities observed through a developmental lens. *Matrix Biol.* 22, 521-538.
- Zhai Y, Hotary KB, Nan B, Bosch FX, Munoz N, Weiss SJ, and Cho KR (2005): Expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase is associated with cervical carcinoma progression and invasion. *Cancer Res.* 65, 6543-6550.
- Zhang K, Prichard JW, Yoder S, De J, and Lin F (2007): Utility of SKP2 and MIB-1 in grading follicular lymphoma using quantitative imaging analysis. *Hum Pathol.* 38, 878-882.
- Zhou Z, Apte SS, Soininen R, Cao R, Baaklini GY, Rauser RW, Wang J, Cao Y, and Tryggvason K (2000): Impaired endochondral ossification and angiogenesis in mice deficient in membrane-type matrix metalloproteinase 1. *Proc Natl Acad Sci* 97, 4052-4057.
- Zijlstra A, Seandel M, Kupriyanova TA, Partridge JJ, Madsen MA, Hahn-Dantona EA, Quigley JP, and Deryungina EI (2005): Pro-angiogenic role of neutrophil-like inflammatory heterophils during neovascularization induced by growth factors and human tumor cells. *Blood* 107, 317-327.
- Zucker S, Cao J, and Chen WT (2000): Critical appraisal of the use of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer treatment. *Oncogene* 19, 6642.
- Zucker S, and Vacirca J (2004): Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer. *Cancer metastasis Rev.* 23, 101-117.

## **Annexe I**

**Version publiée de l'article**

## ORIGINAL ARTICLE

# Triggering of T-cell leukemia and dissemination of T-cell lymphoma in MMP-9-deficient mice

J-5 Roy<sup>1</sup>, C Van Themsche<sup>2</sup>, M Demers<sup>1</sup>, G Opdenakke, B Arnold<sup>4</sup> and Y St-Pierre<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INRS-Institut Armand-Frappier, University of Québec, Laval, Québec, Canada; <sup>2</sup>Department of Chemistry Biology, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Québec, Canada; <sup>3</sup>Laboratory of Immunobiology, Rega Institute, University of Leuven, Leuven, Belgium and <sup>4</sup>Laboratory for Molecular Immunology, German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany

Previous studies have shown that high levels of MMP-9 can be detected in the serum of patients with various lymphoid malignancies and in leukemian lymphoma culture supernatants. Indeed, aggressive forms of lymphoma constitutively produce MMP-9 and its elevated levels in the serum or in tissues correlate with advanced stage and poor patient survival. *In vitro*, MMP-9, which is also produced by the host peritumoral cells in response to the presence of tumors, plays an important role in migration of tumor cells through artificial basement membranes or endothelial cells. In this study, using MMP-9-deficient mice, we show that absence of MMP-9 does not prevent the development of primary T-cell leukemia. Furthermore, MMP-9-deficient cells retained their tumorigenic potential, as shown by their ability to induce thymic lymphoma in young syngeneic wild-type animals. In addition, these MMP-9-deficient tumor cells disseminate in normal mice, or mice that are deficient for MMP-9, indicating that tumor growth and dissemination can occur in total absence of MMP-9. These results show for the first time that lymphoma growth can occur in total absence of MMP-9 and have consequences for therapy of invasive cancers with inhibitors of MMPs.

Leukemia advance online publication, 6 September 2007;  
doi:10.1038/sj.leu.2404936

Keywords: T-cell leukemia; thymic lymphoma; MMP-9; knockout mice

## Introduction

Matrix metalloproteinases (MMPs) have been recognized as extracellular enzymes that favour the development of cancer by enhancing escape of individual tumor cells from the primary tumor and the growth of metastasis.<sup>1,2</sup> For these reasons, several strategies have been developed to inhibit their expression or enzymatic activity in different types of cancer.<sup>3</sup> The failure of these strategies has often been attributed to the complexity of MMP expression pattern since in many types of cancer, MMPs are expressed by both the cancer cells and cells from the host.<sup>5,6</sup> *In vitro* and *in vivo* studies have reported that an elevated expression of MMP-9 correlates with clinically aggressive tumors, including high-grade non-Hodgkin's lymphomas (NHL).<sup>8,9</sup> NHL patients with high levels of MMP-9 in their tissues have a significantly worse prognosis than patients who do not express MMP-9.<sup>9</sup> MMP-9 expression is also markedly increased in high-grade Burkitt's cell lines and in primary

T-leukemic cells derived from adult T-cell leukemia patients,<sup>10,11</sup> suggesting that overexpression of MMP-9 in HTLV-1-infected T-leukemic cells or lymphoma cells is responsible for the invasiveness of these cells in peripheral organs. These observations in the human are correlated with results obtained in experimental mouse models. For instance, abnormally high levels of MMP-9 have been found in radiation-induced thymic lymphomas and in the serum of T lymphoma-bearing mice.<sup>12</sup> Moreover, overexpression of MMP-9 in T-lymphoma cells accelerates the growth of thymic lymphoma<sup>1</sup> and treatment with gelatinase inhibitors has been found to significantly reduce the number and the growth rate of experimental metastases induced by injection of T-lymphoma cells into normal mice.<sup>14</sup> Nevertheless, clinical trials with MMP inhibitors have been frustratingly negative, because of their unselectivity and the ignorance of the complete biology of any MMP member. In addition, whether lymphoma growth or dissemination can occur in total absence of MMP-9 remains untested to date.

## Materials and methods

### Animals

Male and female MMP-9-deficient, in which the exons and corresponding introns 3-7 and about half of exon 8 (2067 bp total) were deleted and replaced by the neomycin resistance gene (*neo*; 1840 bp),<sup>15</sup> were backcrossed for at least eight generations into a C57BL/6 background, and wild-type C57BL/6 were bred in our animal facility and maintained under specific pathogen-free conditions in accordance with institutional guidelines. All animal studies were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee.

### Radiation-induced T-thymic lymphoma

For thymic lymphoma induction, 4- to 8-week-old normal and MMP-9-deficient C57BL/6 mice received a whole-body leukemogenic X-ray treatment of 4 × 175 rad at a rate of 25 rad min<sup>-1</sup> at weekly intervals. When moribund, mice were killed and thymic lymphoma was confirmed at necropsy as previously described.<sup>16</sup>

### Culture of cell lines and reagents

The mouse T-lymphoma cell line 164T2 was established in our laboratory from radiation-induced primary T-cell lymphomas in C57BL/6.<sup>17</sup> Flow cytometric analysis of these cells, as well as those of the 511 variant, showed that both cell lines express LFA-1, CD31, CD62L, CD90, ICAM-1, ICAM-2, but not cx4p1. They also express CD3t and the TcR $\alpha\beta$ , as well as the gp70 and the TL antigen.<sup>18</sup> All cells were maintained in RPMI-1640 complete

Correspondence: Professor Y St-Pierre, INRS-Institut Armand-Frappier, University of Quebec, 531 Boul. Des Prairies, Laval, Québec H7V 1E7, Canada.

E-mail: yves.st-pierre@iaf.inrs.ca

Received 9 January 2007; revised 24 July 2007; accepted 3 August 2007