INRS-INSTITUT ARMAND-FRAPPIER

RÉGULATION DE L'EXPRESSION ET FONCTION DES STROMÉLYSINES CHEZ LES LYMPHOMES NON-HODGKINIENS

Par

Céline Van Themsche

Thèse présentée
pour l'obtention
du grade de Philosophiae doctor (Ph.D.)
en Immunologie-Virologie

Directeur de recherche:	Dr Yves St-Pierre, INRS-Institut Armand-Frappier
Co-directeur de recherche:	Dr Édouard F. Potworowski, INRS-Institut Armand-Frappier
Examinateur interne et président du jury:	Dr François Denis, INRS-Institut Armand-Frappier
Examinatrice externe:	Dr Claire Dubois, Université de Sherbrooke
Examinateur externe:	Dr Louis A. Gaboury, Université de Montréal

Remerciements

À l'heure du bilan, je suis très satisfaite de mon parcours, au fil duquel j'ai eu la chance d'acquérir de belles aptitudes en recherche tout en prenant part à différents programmes favorisant la diffusion et l'accessibilité des connaissances scientifiques. Je me considère très chanceuse d'avoir pu évoluer dans un établissement où la recherche et la communication des connaissances sont des priorités.

Je tiens à remercier tous ceux et celles qui ont contribué à faire de mes études doctorales une aventure des plus agréable et enrichissante. Je suis particulièrement reconnaissante envers mon directeur de recherche Yves St-Pierre, qui a su orienter mes travaux vers une voie des plus fructueuse tout en préservant un climat de confiance et de bonne entente. Toute ma gratitude va aux étudiants présents et passés au laboratoire, à qui je souhaite une bonne continuation, ainsi qu'aux techniciennes Doris Legault et Claire Beauchemin, dont le travail appliqué et les qualités personnelles méritent d'être soulignés. Je remercie également le Dr Édouard F. Potworowski, mon co-directeur de thèse aujourd'hui retraité, pour sa précieuse collaboration à la préparation d'affiches et à la rédaction d'articles. Enfin, je remercie sincèrement mes parents et ma soeur, qui se sont montrés disponibles, encourageants et fiers tout au long de mes études.

Les travaux présentés dans cette thèse ont pu être réalisés grâce au support financier du FCAR et de la Fondation Armand-Frappier, ainsi que de l'Institut National du Cancer du Canada.

Table des matières

Remerciements iii
Table des matières iv
Liste des figures v
Liste des tableaux vii
Liste des abréviations viii
Résumé général x

CHAPITRE 1
Revue de littérature 1
1.1 Les lymphomes non-Hodgkiniens 2
1.1.1 Introduction 2
1.1.2 Réarrangements chromosomiques associés aux LNH 3
1.1.3 Incidence 4
1.1.4 Stades d'évolution 5
1.1.5 Traitements 5
1.1.5.1 Thérapies actuelles 5
1.1.5.2 Thérapies en développement 6
1.1.6 Modèle expérimental murin de lymphome non-Hodgkinien: le lymphome thymique 9
1.2 Les métalloprotéases de la matrice (MMP) 12
1.2.1 Introduction 12
1.2.2 Classification 12
1.2.3 Structure 14
1.2.4 Expression 17
1.2.5 Régulation de l'expression 19
1.2.5.1 Régulation transcriptionnelle 19
1.2.5.2 Régulation épigénétique 26
1.2.5.3 Régulation post-transcriptionnelle 30
1.2.6 Substrats 34
1.2.7 Fonctions 36
1.2.7.1 Fonctions physiologiques 36
1.2.7.2 Fonctions pathologiques 38
1.2.8 Inhibition thérapeutique des MMP 42
1.2.9 Les MMP chez les lymphomes non-Hodgkiniens 44
1.2.10 Les stromélysines et le cancer 45

CHAPITRE 2
Stromelysin-1 (MMP3) is inducible in T lymphoma cells and accelerates the growth of lymphoid tumors in vivo 50
Contribution des auteurs 51
Résumé 52
Introduction 53
Matériel et méthodes 55
Résultats 60

Discussion 63
Références 66
Figures 71
Légendes des figures 77

CHAPITRE 3
Stromelysin-2 (MMP10) is inducible in lymphoma cells and accelerates the growth of lymphoid tumors in vivo 79
Contribution des auteurs 80
Résumé 81
Introduction 82
Matériel et méthodes 84
Résultats 89
Discussion 93
Références 96
Figures 102
Légendes des figures 107

CHAPITRE 4
Gelatinase B (MMP9) and Stromelysin-2 (MMP10) delay the growth of subcutaneous lymphoma in vivo 110
Contribution des auteurs 111
Résumé 112
Introduction 113
Matériel et méthodes 115
Résultats 119
Discussion 123
Références 127
Figures 134
Légendes des figures 142

Discussion générale et conclusion 145
Annexe 1 167
Annexe 2 168
Annexe 3 169
Annexe 4 170
Annexe 5 171
Annexe 6 172
Annexe 7 173
Annexe 8 174
Annexe 9 175
Annexe 10 176
Annexe 11 177
Annexe 12 188
Annexe 13 211
Références 212

Liste des figures

CHAPITRE 1
Figure 1. Structure des MMP. 15

CHAPITRE 2
Figure 1. MMP3 gene expression is induced in lymphoma cells upon contact with endothelial cells. 71
Figure 2 MMP3 gene expression is specifically induced in lymphoma cells upon contact with endothelial cells 72
Figure 3. MMP3 gene expression is not modulated in stromal cells after contact with lymphoma cells 73
Figure 4. Constitutive expression of MMP3 in lymphoma cells upon transfection of cDNAs 74
Figure 5. MMP3 expression by lymphoma cells accelerates tumor growth 75
Figure 6. Effect of MMP3 on the invasive behavior of lymphoma cells 76

CHAPITRE 3
Figure 1. MMP10 gene expression is induced in lymphoma cells on contact with endothelial cells 102
Figure 2. The induction of MMP10 expression in lymphoma cells upon contact with endothelial cells is LFA-1- and ICAM-1-dependent 103
Figure 3. Upregulation of MMP10 in lymphoma cells upon exposure to cytokines 104
Figure 4. Generation of transfectant lymphoma cell clones over-expressing MMP10 and measure of their invasive behavior 105
Figure 5. Effect of MMP10 on lymphoma growth 106

CHAPITRE 4
Figure 1. Characterization of transfectant lymphoma cells over-expressing MMP9 and measure of their invasive behavior 135
Figure 2. MMP10 delays the growth of subcutaneous lymphoma in immunocompetent mice 136
Figure 3. MMP9 delays the growth of subcutaneous lymphoma in immunocompetent mice 137
Figure 4. Abolished growth-delaying effect of MMP10 on subcutaneous lymphoma in immunocompromised mice 138
Figure 5. MMP9 has reduced growth-delaying effect on subcutaneous lymphoma in immunocompromised mice 139
Figure 6. MMP9 and MMP10 mRNA are also present in established tumors originating from control lymphoma cells 140
Figure 7. MMP10 accelerates the growth of thymic lymphoma 141

DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION
Figure 1. Schéma de la régulation de l'expression de MMP3, MMP10 et TIMP1 chez les cellules lymphomateuses 149
Figure 2. Examen histologique de tumeurs sous-cutanées au stade avancé 157

Liste des tableaux

CHAPITRE 1

Tableau 1. Classification des MMP 13
Tableau 2. Distribution cellulaire et tissulaire des MMP 18
Tableau 3. Facteurs solubles modulant l'expression des MMP 21
Tableau 4. Protéases pouvant activer les différentes MMP 31
Tableau 5. Substrats des MMP 35

CHAPITRE 4

Table 1. Summary of individual *in vivo* subcutaneous growth experiments 134

Liste des abréviations

ADAM	*a disintegrin and metalloproteinase*
ADN	acide désoxyribonucléique
APMA	*4-aminophenylmercuric acid*
ARNm	acide ribonucléique messager
bFGF	*basic fibroblast growth factor*
DNMT	*DNA methyltransferase*
EC	*endothelial cells*
ECM	*extracellular matrix*
EGF	*epidermal growth factor*
FGF	*fibroblast growth factor*
GAPDH	glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase
GPI	glycosylphosphatidylinositol
HB-EGF	*heparin-binding epidermal growth factor*
HDAC	*histone deacetylase*
HGF	*hepatocyte growth factor*
ICAM-1	i*ntercellular adhesion molecule*-1
IFN	interféron
Ig	immunoglobuline
IGF	*insulin growth factor*
IGFBP	*insulin growth factor binding protein*
IL	interleukine
ILK	*integrin-linked kinase*
IRS	*insulin receptor substrate*
i.v.	intra-veineux
JNK/SAPK	*c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase*
kDa	kilodalton
LFA-1	l*ymphocyte function-associated molecule-1*
LNH	lymphome non-hodgkinien
MAPK	*mitogen-activated protein kinase*

MBP	*myelin basic protein*
MMP	*matrix metalloproteinase*
MT-MMP	métalloprotéases de la matrice liées à la membrane
NF-κB	*nuclear factor kappa B*
NK	*natural killer*
PCR	réaction en chaîne de la polymérase
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase
PKC	protéine kinase C
PMA	phorbol 12-myristate-13-acetate
RadLV	*radiation leukemia virus*
REAL	classification Européenne-Américaine Révisée des lymphomes
RECK	*reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs*
RT-PCR	réaction de transcription inverse suivie d'une PCR
s.c.	sous-cutané
STAT6	*signal transducer and activator of transcription-6*
TIMP	*tissue inhibitor of metalloproteinase*
TFPI-2	*tissue factor pathway inhibitor 2*
TGFβ	*transforming growth factor beta*
TNF	*tumor necrosis factor*
TPA	12-tetradecanoylphorbol-13-acetate

Résumé général

La famille des métalloprotéases de la matrice (MMP) suscite depuis longtemps un grand intérêt dans le domaine de la recherche sur le cancer. Sur la base de leur haut niveau d'expression au sein des tissus cancéreux ainsi que de leurs activités pro-tumorales variées, les MMP ont déjà été identifiées comme cibles thérapeutiques dans la lutte contre le cancer. Le récent échec d'inhibiteurs à large spectre des MMP en études cliniques a cependant semé un doute sur la validité de l'inhibition thérapeutique des MMP; un consensus se dégage maintenant au sein de la communauté scientifique sur la nécessité de caractériser en détail le patron d'expression et les activités de chaque MMP et ce, aux différents stades de progression des cancers. Dans le cas des lymphomes non-Hodgkiniens (LNH), les travaux de caractérisation de l'expression et de la fonction des MMP publiés à ce jour ont été presque qu'exclusivement orientés vers l'étude de MMP9 et MMP2; cependant, d'autres MMP, dont les stromélysines MMP3 et MMP10, sont susceptibles d'influencer la progression des LNH.

Les travaux de recherche dont fait état la présente thèse visaient à caractériser la régulation de l'expression de MMP3 et MMP10 dans les LNH, de même que leur rôle au sein du processus de croissance tumorale des LNH. Ces travaux ont permis d'établir que l'expression des stromélysines MMP3 et MMP10, qui sont habituellement sécrétées par les cellules stromales, peut également être induite dans les cellules lymphomateuses, notamment par contact intercellulaire; l'expression de MMP10 est également induite par l'exposition à certaines cytokines. Cette expression de MMP3 ou de MMP10 par les cellules lymphomateuses augmente leur capacité de migration à travers la matrice extracellulaire et module la croissance du lymphome, de façon dépendante du site de croissance tumorale. Ainsi, dans la région du thymus, qui constitue le site primaire de croissance tumorale dans notre modèle murin de LNH, l'expression de MMP3, MMP9 ou MMP10 par les cellules lymphomateuses accélère la croissance tumorale; à l'opposé, l'expression de MMP10 ou encore de MMP9 par les cellules lymphomateuses retarde la croissance des tumeurs lymphomateuses dans la région sous-cutanée. Cette apparente dualité dans le rôle de MMP9 et MMP10 dans la croissance du lymphome en différents

sites anatomiques est reliée à la présence de lymphocytes, puisque les tumeurs dérivant de cellules lymphomateuses surexprimant MMP9 ou MMP10 croissent plus rapidement chez des souris ne produisant pas de lymphocytes matures que chez des souris immunocompétentes.

Nos résultats mettent en évidence une expression ponctuelle et localisée des stromélysines, qui dicte leur rôle sur la progression du lymphome; ce rôle dépend en effet du microenvironnement où les tumeurs croissent. En outre, ces données nouvelles qui documentent un rôle anti-tumoral des MMP fournissent une explication au manque d'efficacité des inhibiteurs à large spectre des MMP en tests cliniques et suggèrent au contraire qu'il pourrait être bénéfique pour certains patients de favoriser l'expression et/ou l'activité de MMP particulières.

CHAPITRE 1

Revue de littérature

1.1 Les lymphomes non-Hodgkiniens

1.1.1 Introduction

Les lymphomes constituent un groupe hétérogène de néoplasmes caractérisés par la transformation néoplasique de cellules lymphoïdes. Plus spécifiquement, les types cellulaires qui donnent naissance aux lymphomes sont les lymphocytes T ou B, mature ou immatures, ou très rarement des cellules NK (Natural Killer). Les lymphomes s'apparentent ainsi aux leucémies, ces dernières étant caractérisées par la prolifération de cellules cancéreuses d'origine lymphoïde et myéloïde. Les lymphomes se divisent en deux catégories: le lymphome Hodgkinien classique (ou maladie de Hodgkin) et les lymphomes non-Hodgkiniens (LNH).

Le lymphome Hodgkinien représente l'un des lymphomes les plus fréquents en Amérique du Nord et en Europe. Dans ce type de lymphome, les cellules néoplasiques sont des lymphocytes B immatures[1], de phénotype $CD15^+$, $CD30^+$, $CD19^-$, $CD20^-$[2] qui présentent dans 96% des cas un réarrangement monoclonal du gène des immunoglobulines[3; 4]. Le diagnostic de la maladie de Hodgkin est facilité par l'analyse histologique, qui révèle la présence de deux types cellulaires tumoraux à morphologie particulière: de grosses cellules multinucléées appelées cellules de Reed-Sternberg et des cellules mononucléées appelées cellules de Hodgkin. De plus, les cellules de Reed-Sternberg et de Hodgkin sont entourées d'un grand nombre de lymphocytes, de plasmocytes, d'histiocytes et d'éosinophiles, qui lorsque rassemblés constituent plus de 90% de la masse tumorale. Enfin, contrairement à un grand nombre de LNH, le lymphome Hodgkinien tend à former des tumeurs isolées et très localisées, qui croissent relativement lentement. Par conséquent, le taux de réussite des traitements anti-cancéreux conventionnels est excellent: on observe une rémission complète des patients neuf fois sur dix après les premiers traitements et les rechutes sont rares[5].

Par opposition aux lymphomes Hodgkiniens, les LNH sont pour la plupart aggressifs (croissance tumorale rapide, tumeurs disséminées) et le taux moyen de survie associé aux LNH pour la période de 5 ans suivant le diagnostic est d'environ 50%[6]. Précisons toutefois que la famille des LNH regroupe une grande variété de lymphomes, à cellules B

ou T, ou exceptionnellement à cellules NK; la présentation clinique des différents LNH, de même que leur pronostic, varient considérablement. Cette diversité des LNH est associée avec une multiplicité de facteurs étiologiques, dont la susceptibilité génétique, certains agents infectieux et un état d'immunodéficience congénital ou acquis[7].

1.1.2 Réarrangements chromosomiques associés aux LNH

Un large éventail d'anomalies génétiques peuvent induire et/ou contribuer à la transformation progressive d'une cellule normale en une cellule néoplasique. Certaines anomalies chromosomiques spécifiques sont ainsi liées à un type particulier de cancer. Les plus fréquentes sont les translocations chromosomiques aboutissant à la dérégulation de l'expression d'un gène normal ou à la synthèse d'une protéine de fusion oncogénique possédant des éléments de séquences de deux protéines normales. Les produits normaux des gènes impliqués dans les réarrangements chromosomiques interviennent dans de nombreux processus cellulaires[8], dont la prolifération et le cycle cellulaire, l'apoptose et la signalisation cellulaire (en particulier les protéines à activité tyrosine kinase).

Des études cytogénétiques ont démontré que la plupart des LNH présentent des anomalies chromosomiques et que certaines translocations récurrentes sont associées à des profils histologiques et immunologiques spécifiques[9]. Ces translocations sont représentées clonalement dans les tumeurs de lymphomes non-Hodgkiniens, dont le génome est relativement stable par comparaison avec plusieurs autres types de cancers où prédomine une instabilité génomique[10]. De façon similaire à la plupart des autres types de cancer, les translocations associées aux LNH entraînent l'activation de proto-oncogènes ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs[11]. Les prototype de ces translocations sont les t(8;14), t(2;8) et t(8;22) du lymphome de Burkitt, qui activent l'expression du gène *MYC* localisé en 8q24, sous le contrôle de différentes régions enhancer des immunoglobulines et aboutissant à la formation des protéines de fusion IgH-MYC, Igκ-MYC et Igλ-MYC, respectivement[12; 13]. Le proto-oncogène c-MYC est un facteur de transcription impliqué dans la prolifération cellulaire qui, lorsque surexprimé après réarrangement chromosomique, favorise la prolifération des cellules pré-lymphomateuses.

Une autre translocation classique des LNH, cette fois associée aux lymphomes folliculaires, implique le proto-oncogène Bcl-2, localisé en 18q21, qui code pour une protéine mitochondriale impliquée dans la régulation de l'apoptose. La translocation t(14;18) associe Bcl-2 avec le gène des chaînes lourdes des immunoglobulines; la surexpression de la protéine Bcl-2 qui en résulte accroît les capacités de survie des cellules présentant la translocation, leur permettant d'accumuler davantage d'altérations génétiques et de progresser vers le phénotype cancéreux. Ce gène peut également être associé avec les gènes des chaînes légères des immunoglobulines kappa et lambda dans les translocations t(2;18) et t(18;22) respectivement, présentes dans diverses proliférations lymphoïdes de la lignée B[14].

Pour de nombreux cancers, la présence de translocation spécifique est importante pour le diagnostic et le pronostic et cette information a un impact direct sur la thérapie[15]. De plus, la découverte de ces anomalies chromosomiques conduit à l'identification de nouveaux gènes qui pourraient jouer un rôle dans la leucémogenèse.

1.1.3 Incidence

Selon les données de l'Institut National du Cancer du Canada, disponibles dans le document « Statistiques canadiennes sur le cancer 2003» (www.cancer.ca), il y aurait eu 6400 nouveaux cas de LNH au Canada en 2003, ce qui représente 4,6 % des 139 900 nouveaux cas totaux de cancer. Parallèlement, il y aurait eu 2800 décès associés aux LNH, soit 4,2 % de l'ensemble des décès reliés au cancer. De plus, à la différence de la plupart des autres types de cancer, les taux d'incidence et de mortalité associés aux LNH sont en progression en Amérique du Nord. Ces augmentations seraient attribuables à la fois à des augmentations réelles du nombre de cas et à une amélioration de la détection et de la classification des LNH. Ainsi, d'après les estimations, le nombre de nouveaux cas de LNH a plus que triplé au cours des trente dernières années chez les hommes comme chez les femmes. De façon similaire, le nombre de décès attribuables aux LNH chaque année a triplé au cours des trente dernières années.

Les taux d'incidence des LNH au Canada et aux États-Unis sont intermédiaires parmi les autres régions monde. Les taux pour l'année 2000 étaient faibles en Asie (10,3%), moyens en Australie-Nouvelle Zélande (14,4%), en Amérique du Nord (16%) et en Afrique (19,2%) et élevés en Europe (37%). Ces variations internationales reflètent une variation réelle associée à l'exposition à certains facteurs de risque mais également, des différences dans l'exhaustivité des rapports des organismes responsables.

Au Canada en 1998, parmi l'ensemble des cas adultes de LNH, les lymphomes B représentaient près de 90% des cas totaux. Pour leur part, les lymphomes T représentaient 8% des cas totaux et la presque totalité d'entre eux faisait partie de la classe des lymphomes T périphériques. Le pronostic des lymphomes T est généralement moins favorable que celui des lymphomes B[16; 17].

1.1.4 Stades d'évolution

L'évaluation rigoureuse du stade d'évolution des LNH au moment du diagnostic est cruciale afin d'établir le pronostic des patients et de choisir une thérapie adéquate. Il est à noter que les LNH sont plus susceptibles que les lymphomes Hodgkiniens à être disséminés au moment du diagnostic. Par ailleurs, l'état de santé général du patient influence également le pronostic et la planification du traitement. L'Index International[18], un outil quantitatif pour l'attribution du pronostic des patients atteints d'un LNH, a été conçu spécifiquement pour mieux évaluer les patients présentant des tumeurs disséminées au moment du diagnostic et est basé sur différents critères tels l'âge, le niveau sérique de lactate déshydrogénase et le nombre d'organes ou sites atteints. Un portrait précis de l'état de santé général du patient permet ultimement d'établir une stratégie thérapeutique personnalisée adéquate.

1.1.5 Traitements

1.1.5.1 Thérapies actuelles

Les thérapies anti-cancéreuses conventionnelles (radiothérapie, chimiothérapie) peuvent constituer des traitements de première ligne adéquats pour les patients souffrant de LNH. La radiothérapie, qui consiste en un schéma posologique de rayon-X dirigés sur une

région corporelle bien définie, est parfois administrée dans le but de réduire la taille de la tumeur avant l'ablation chirurgicale. Elle peut aussi être administrée après la chirurgie, pour réduire le nombre de cellules tumorales résiduelles dans l'organe atteint. Il est à noter que la radiothérapie s'avère un recours adéquat seulement dans le cas de patients présentant une seule ou un petit nombre de tumeurs solides bien localisées.

La chimiothérapie est mieux adaptée au traitement des patients diagnostiqués aux stades avancés. La chimiothérapie consiste en l'injection systémique d'un seul ou plus souvent, d'un mélange de plusieurs agents cytotoxiques. La combinaison la plus fréquemment utilisée, appelé CHOP, est un mélange de cyclophosphamide, de doxorubicine, de vincristine et de prednisolone. Les agents chimiothérapeutiques étant administrés par voie intraveineuse, ils peuvent atteindre les cellules cancéreuses circulantes (au niveau des réseaux lymphatique et sanguin) de même que celles qui peuplent la moelle osseuse. Toutefois, les nombreux effets secondaires associés à la chimiothérapie sont difficiles à supporter; l'état de santé général des patients avant et au cours des traitements dictera les doses et la durée des intervalles entre les injections. Par ailleurs, l'efficacité de la chimiothérapie conventionnelle est limitée dans le traitement des LNH: dans le cas du lymphome folliculaire par exemple, la forme de LNH la plus commune dans l'ensemble des pays occidentaux, le taux médian de survie après le traitement CHOP est de 4 à 6 ans et presque aucun patient ne survit au-delà de 10 ans[19].

1.1.5.2 Thérapies en développement

Plusieurs thérapies sont actuellement en voie de développement et font l'objet d'études cliniques dans le traitement de lymphomes non-Hodgkiniens. Elles sont regroupées en trois principales catégories, selon la nature du traitement: chimiothérapie, radio-immunothérapie et immunothérapie.

Les nouvelles approches de chimiothérapie évaluent le potentiel de nouveaux agents aux mécanismes d'action variés. Certains agents sont cytotoxiques ou cytostatiques alors que d'autres agents augmentent la sensibilité des cellules tumorales à diverses drogues. Parmi les nouveaux agents cytotoxiques et cytostatiques à l'essai se trouvent le depsipeptide

(NSC 630176) de même qu'un ADN antisens de Bcl-2 (G3139). Le depsipeptide est un peptide bicyclique isolé de *Chromobacterium violaceum*. Les mécanismes médiant son rôle antitumoral sont encore à l'étude, mais on sait déjà qu'il inhibe les déacétylases d'histones[20] de même que les voies de signalisation intracellulaire impliquant les MAP kinases (causant ainsi l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1, d'une façon indépendante de p53)[21]. Pour leur part, les oligonucléotides antisens sont de courtes molécules d'ADN simple brin synthétisées chimiquement dont la séquence est complémentaire à celle de l'ARN cible. Par conséquent, les antisens peuvent inhiber la traduction de l'ARN cible en protéine. Le gène Bcl-2 est une cible de choix dans le traitement du lymphome, étant surexprimé dans la plupart des lymphomes folliculaires et dans près du quart des lymphomes à grandes cellules B[22]. Dans ces tumeurs, la surexpression de Bcl-2 serait responsable de maintenir la viabilité des cellules tumorales de même que d'induire une résistance multiple aux drogues[23]. L'antisens de Bcl-2, en bloquant la synthèse de la protéine Bcl-2, pourrait donc diminuer la survie et la prolifération des cellules lymphomateuses; c'est en effet ce qui a été observé lors des études pré-cliniques en utilisant des modèles murins de LNH[24]. Le depsipeptide et l'antisens de Bcl-2 sont actuellement en phase II de tests cliniques.

Parallèlement au développement de nouveaux agents chimiothérapeutiques, de nouveaux protocoles d'administration des drogues chimiothérapeutiques font présentement l'objet d'études cliniques. À cet égard, la chimiothérapie à forte dose (salvage high-dose chemotherapy), couplée à une transplantation autologue de moelle osseuse, aurait le potentiel d'améliorer le taux de survie de patients répondant faiblement aux traitements de chimiothérapie conventionnels mais dont les cellules tumorales sont chimiosensibles[25]. Selon ce protocole, de fortes doses d'agents chimiothérapeutiques sont administrées à des intervalles très espacés, par comparaison avec le protocole conventionnel où une séquence d'administrations rapprochées de doses intermédiaires est privilégiée. Avec l'approche aggressive de chimiothérapie à forte dose cependant, la transplantation autologue de moelle osseuse, qui consiste à prélever de la moelle du patient avant sa première dose de chimiothérapie puis à la lui ré-injecter après la dernière

dose d'une séquence, est nécessaire afin de remplacer les cellules souches hématopoïétiques détruites lors du traitement.

Les immunothérapies anti-lymphome en développement incluent la transplantation de cellules souches allogéniques, les anticorps non-conjugués et les vaccins anti-idiotypiques. La transplantation de cellules souches allogéniques est une approche qui tire avantage de la réaction greffon versus hôte. Ainsi, un patient atteint d'un LNH pourrait se voir injecter des cellules souches d'un donneur compatible causant la destruction de ses propres cellules hématopoïétiques (en l'occurrence, ses cellules tumorales). Pour l'instant cependant, la mortalité reliée à la transplantation (près de 40% des cas) est considérable[26]. Les études actuelles utilisent donc des schémas posologiques de drogues chimiothérapeutiques à des doses non-myéloablatives, qui visent à maximiser l'effet greffon versus lymphome tout en miminisant la mortalité reliée à la transplantation[27]. Dans le cadre des études cliniques impliquant des anticorps non-conjugués, le principal antigène ciblé est CD20, qui est exprimé par 95% de l'ensemble des lymphomes à cellules B. L'anticorps monoclonal non-conjugué le mieux caractérisé est un anti-CD20 appelé Rituximab™, qui consiste en la fusion de la région variable d'un anti-CD20 murin et de la région constante d'un IgG1 humain[28]. Le principal mécanisme d'action du Rituximab™ serait le déclenchement de l'apoptose des cellules B[29]. Pour leur part, les vaccins anti-lymphome en développement sont principalement dirigés contre le déterminant idiotypique des immunoglobulines des lymphomes folliculaires, ce dernier constituant un antigène spécifique à la tumeur et au patient. Des adjuvants sont également en cours d'étude pour augmenter l'efficacité de la réponse immunitaire suscitée par le vaccin anti-idiotypique, tels que le GM-CSF, IL-12, IL-18 et les oligonucléotides-CpG[30; 31].

La radioimmunothérapie, qui consiste en l'injection d'anticorps conjugués à un radio-isotope, est un traitement anti-lymphome très prometteur étant donné la grande sensibilité des LNH aux radio-isotopes. Deux anti-CD20 radio-conjugués font présentement l'objet d'études cliniques: Tositumomab™ et Ibritumomab Tiuxetan™, utilisant l'Iode-131 ou l'Yttrium-90, respectivement. L'énergie émise par les radio-isotopes (tous deux émettent

des particules bêta) cause des dommages létaux à l'ADN des cellules cibles (cellules B matures exprimant le CD20) mais également, aux cellules voisines par dommage collatéral.

Les différentes thérapies anti-cancer ont d'abord été validées dans des modèles expérimentaux animaux avant de faire l'objet d'études cliniques. À cet égard, les modèles expérimentaux représentent un outil essentiel à l'acquisition de connaissances sur le développement et le traitement de différents types de cancer.

1.1.6 Modèle expérimental murin de lymphome non-Hodgkinien: le lymphome thymique

Le modèle expérimental initial de lymphome thymique chez les souris de souche C57BL/6, développé par le Dr Henri S. Kaplan dès le début des années 1950, a bénéficié avec le temps de nombreux ajouts et constitue aujourd'hui un modèle versatile pour l'étude de la génèse, de la croissance et de la dissémination des lymphomes non-Hodgkiniens. Dans ce modèle, les tumeurs lymphoblastiques aux phénotypes hétérogènes mimant bien les lymphomes non-Hodgkiniens humains[32; 33].

Le lymphome thymique chez la souris peut être induit par exposition aux rayons X ou par inoculation du Radiation Leukemia Virus (RadLV), un rétrovirus initialement isolé de lymphomes thymiques[34]. Les lymphomes thymiques issus des deux types d'agents leucémogènes sont identiques en termes de morphologie, d'origine cellulaire et de patron de dissémination. Dans le cas du lymphome thymique viro-induit toutefois, les cellules lymphomateuses produisent du RadLV dès leur apparition[34; 35], alors que le virus n'est que rarement détectable dans les nouvelles tumeurs radio-induites[34; 36].

Selon le protocole classique de leucémogénèse par radiations ionisantes (rayons X) du groupe Kaplan[37], l'irradiation fractionnée de souris C57BL/6 âgées de 1 à 2 mois, à raison de quatre doses de 175 Rad à intervalle hebdomadaire, résulte en l'apparition d'un lymphome thymique chez plus de 90% des animaux irradiés, après une période de latence de 3 à 6 mois[35; 38] au cours de laquelle des cellules pré-leucémiques apparaissent[39]. Les conséquences de l'irradiation sont multiples: l'équilibre des sous-populations de

thymocytes au sein du thymus est perturbé[33; 40], la capacité des pro-thymocytes de la moelle osseuse à repeupler le thymus est réduite[39; 40], certaines fonctions de l'épithélium thymique dans le processus de maturation des thymocytes sont altérées[41] parce que les cellules épithéliales nourricières thymiques d'animaux irradiés disparaissent[42] et ne peuvent plus interagir avec des thymocytes normaux[43; 44]; enfin, les cellules pré-leucémiques apparaissent dans la moelle osseuse et le thymus[40]. Ces cellules pré-néoplasiques dérivent probablement des thymocytes au stade le plus immature[33; 45].

Dans ce modèle de leucémogénèse par radiations ionisantes, les souris qui reçoivent une greffe de moelle osseuse (provenant de souris syngéniques et injectée par voie intraveineuse) immédiatement après l'irradiation ne développeront pas de lymphome thymique[39; 46]. Ce traitement n'inhibe pas l'émergence de cellules lymphomateuses mais entraîne plutôt leur disparition 1 à 2 mois après la greffe[41]. Les cellules lymphoïdes précurseurs greffées repeuplent le thymus[35; 39], rétablissant les sous-populations de thymocytes[33] et restaurant les cellules nourricières thymiques[41]. Il est à noter que les souris qui reçoivent une greffe de moelle osseuse plus d'un mois après l'irradiation développent un lymphome thymique[46]. Dans ces conditions, les cellules lymphoïdes précurseurs greffées atteignent bien le thymus, sans toutefois que les sous-populations de thymocytes et l'intégrité des cellules stromales thymiques ne reviennent à la normale[47]. Par conséquent, bien que les mécanismes qui médient la transformation des cellules pré-leucémiques en cellules lymphomateuses ne soient pas encore élucidés à ce jour, nous savons qu'ils sont thymus-dépendants[48] et nécessitent l'interaction entre les cellules pré-leucémiques et les cellules stromales thymiques[39; 41]. Par ailleurs, il semble que les radiations ionisantes constituent un agent promoteur plutôt qu'initiateur dans le processus de leucémogénèse, en activant un rétrovirus endogène similaire au RadLV dans certains thymocytes[35] et en stimulant son intégration dans les cellules leucémiques[49].

Les cellules pré-leucémiques, à l'instar des cellules lymphomateuses, peuvent induire un lymphome thymique chez des souris syngéniques après injection par voie intrathymique ou intraveineuse[39; 50]; toutefois, les cellules pré-leucémiques ne peuvent induire un lymphome thymique que lorsqu'elles sont injectées chez un animal pré-irradié. Une

méthode de détection des cellules pré-leucémiques qui exploite ce principe consiste à mesurer la fréquence du développement des lymphomes thymiques chez des souris syngéniques pré-irradiées (à raison d'une seule dose de 400 rad) ayant reçu par voie intrathymique la population cellulaire d'intérêt[39]. Les cellules lymphomateuses, quant à elles, génèrent presque systématiquement un lymphome thymique lorsqu'elles sont injectées en quantité suffisante par voie intrathymique chez des souris saines (non-irradiées). Conformément à la théorie du « seed and soil »[51], les paramètres qui influencent la fréquence et la vitesse de croissance du lymphome thymique ne sont cependant pas exclusivement reliés à la nature et au nombre de cellules lymphomateuses injectées, mais également à la nature du micro-environnement thymique et à l'interaction entre ces deux éléments[52]. En tant que modèle orthotopique, la voie d'injection intrathymique est parfaitement adaptée à l'étude des différents paramètres qui influencent la croissance du lymphome thymique. Il est ainsi possible de modifier le phénotype des cellules lymphomateuses injectées (e.g. augmenter ou diminuer le niveau d'expression d'un gène d'intérêt), de traiter les animaux avec différents agents (par exemple une cytokine dont on veut connaître l'effet) ou encore de modifier le génotype des animaux receveurs (en utilisant par exemple des souris déficientes en une molécule d'adhésion d'intérêt).

La grande majorité des souris qui développent un lymphome thymique radio-induit meurent des suites de l'insuffisance respiratoire causée par l'envahissement thoracique de la tumeur primaire thymique. Dans quelques cas seulement, il arrive qu'un petit nombre de cellules lymphomateuses quittent le thymus et se disséminent vers les organes où elles forment des tumeurs secondaires, dont la rate, le foie et les reins[35]. Le modèle murin de lymphome thymique radio-induit ne se prête donc que difficilement à l'étude de la dissémination du lymphome. Dans ce cas, il est préférable d'utiliser le modèle expérimental classique de métastasie, qui consiste en l'injection par voie intraveineuse de cellules tumorales (ici, des cellules lymphomateuses) chez des animaux syngéniques. Ce modèle murin de métastasie est également utilisé pour caractériser les différents paramètres qui influencent la dissémination d'autres types de cellules tumorales[53; 54]. Dans le cadre d'études de la métastasie des LNH, les cellules lymphomateuses injectées

sont habituellement des lignées cellulaires générées *ex vivo* à partir de lymphomes thymiques radio-induits[55] et elles se disséminent selon le même patron que dans le modèle de leucémogénèse radio-induit pour former des tumeurs secondaires dans les mêmes organes cibles (rate, foie, et reins principalement)[56]. Il est donc possible d'utiliser ce modèle de métastasie des LNH pour caractériser les différents paramètres reliés à la dissémination des cellules lymphomateuses (par exemple les patrons de domiciliation ou encore l'importance de l'expression péritumorale de certaines molécules d'intérêt).

1.2 Les métalloprotéases de la matrice (MMP)

1.2.1 Introduction

Les métalloprotéases de la matrice (MMP: matrix metalloproteinases) constituent une famille d'endoprotéases zinc-dépendantes. Elles appartiennent à la superfamille des métalloprotéases, qui comprend également les adamalysines (ADAM; a disintegrin and metalloproteinase), les astacines, les reprolysines et les serralysines; toutes sont zinc-dépendantes[57]. Les métalloprotéases classées parmi la famille des MMP présentent des domaines structuraux de base communs; les différentes MMP se distinguent toutefois entre elles par leur spécificité de substrat, leur origine cellulaire et la régulation de leur expression. La famille des MMP comprend à ce jour plus de 20 membres chez l'humain; elles ont également été isolées d'organismes aussi variés que des oursins de mer[58], des vers[59] et des végétaux[60]. Les MMP ont initialement été définies par leur capacité à dégrader les composantes de la matrice extracellulaire; elles ont par ailleurs été regroupées et classifiées en fonction de leur affinité envers certaines composantes matricielles.

1.2.2 Classification

Les MMP ont été divisées en plusieurs sous-groupes (**Tableau 1**), d'abord en fonction de leur spécificité de substrat, puis en fonction de leur structure. Les collagénases doivent leur nom à leur capacité à cliver les collagènes interstitiels (collagènes I, II et III). Le nom des stromélysines réflète leur origine cellulaire: elles sont généralement exprimées par les cellules stromales (cellules saines voisines des cellules tumorales au sein d'une tumeur) plutôt que les cellules tumorales elles mêmes[61]. Les gélatinases tirent leur nom de leur

affinité inégalée pour la gélatine (collagène dénaturé). Les matrilysines sont les plus petites MMP connues. MMP26 est également appelée endométase parce qu'elle a été clonée à partir d'une tumeur endométriale[62]. Les collagénases, stromélysines, gélatinases et matrilysines sont des protéines sécrétées; par opposition, les membre du groupe des MMP membranaires demeurent associés à la membrane cellulaire. Quatre d'entre elles (MMP14, MMP15, MMP16 et MMP24) sont des protéines transmembranaires de type I, alors que les deux autres (MMP17 et MMP25) sont ancrées à la membrane cellulaire via un lien glycosylphosphatidylinositol (GPI).

Tableau 1. Classification des MMP

Famille	*Membres*
Collagénases	MMP1 (collagénase -1) MMP8 (collagénase-2) MMP13 (collagénase-3)
Stromélysines	MMP3 (stromélysine-1) MMP10 (stromélysine-2) MMP11 (stromélysine-3)
Gélatinases	MMP2 (gélatinase A) MMP9 (gélatinase B)
Membranaires	MMP14 (MT1-MMP) MMP15 (MT2-MMP) MMP16 (MT3-MMP) MMP17 (MT4-MMP) MMP24 (MT5-MMP) MMP25 (MT6-MMP)
Matrilysines	MMP7 (matrilysine) MMP26 (matrilysine-2)
Autres	MMP12 (élastase des macrophages) MMP18 MMP19 MMP20 (énamelysine) MMP21/22 MMP23 MMP28 (épilysine)

Sept MMP présentent une structure et une spécificité de substrat distinctes et ne peuvent être incluses dans les groupes décrits ci-haut. L'élastase des macrophages, MMP12, est principalement exprimée par les macrophages[63] et s'avère essentielle à leur migration[64], entre autres fonctions. MMP19 a été clonée de cellules du foie[65] et constitue un auto-antigène chez les patients souffrant d'arthrite rheumatoïde[66]. L'énamelysine (MMP20) est presque exclusivement exprimée au niveau de l'émail dentaire[67]. MMP21 et MMP22 se sont révélées être la même enzyme; MMP22 a été clonée à partir de fibroblastes de poulet[68] et MMP23 est principalement exprimée au niveau des tissus des organes reproducteurs[69]. La MMP la plus récemment découverte, épilysine (MMP28), est principalement exprimée par les kératinocytes[70; 71]. On ne connaît, pour l'instant, que très peu de choses au sujet de la régulation de l'expression et de la fonction de ces sept MMP non-classées.

Historiquement, ce sont les gélatinases (MMP2 et MMP9) qui ont fait l'objet du plus grand nombre d'études, malgré que ce soit les MMP1, -2 et -3 qui aient été découvertes les premières[72-74]. L'explication réside principalement dans la disponibilité d'une méthode de détection simple et rapide des enzymes gélatinolytiques, la zymographie sur gélatine[75; 76]. On connaît néanmoins plusieurs des propriétés des autres MMP; notamment, la structure de la plupart des MMP répertoriées à ce jour a été caractérisée en détail.

1.2.3 Structure

La structure de base des MMP, dont une représentation linéaire est montrée à la **Figure 1**, consiste en l'assemblage de plusieurs domaines caractéristiques de cette famille de métalloprotéases. Toutes les MMP comportent un peptide signal N-terminal, qui dirige les MMP vers la voie sécrétoire ou membranaire. Ce peptide est clivé au moment de l'insertion de la protéine dans le réticulum endoplasmique. Toutes les MMP humaines possèdent également un prodomaine (constitué d'environ 80 acides aminés) qui est seulement présent dans les formes pro-enzymatiques des MMP. Par un mécanisme conservé entre les différentes MMP, le prodomaine leur confère un état d'inactivité; selon le mécanisme de « cystéine-switch »[77], le résidu cystéine du motif consensus PRCxxPD

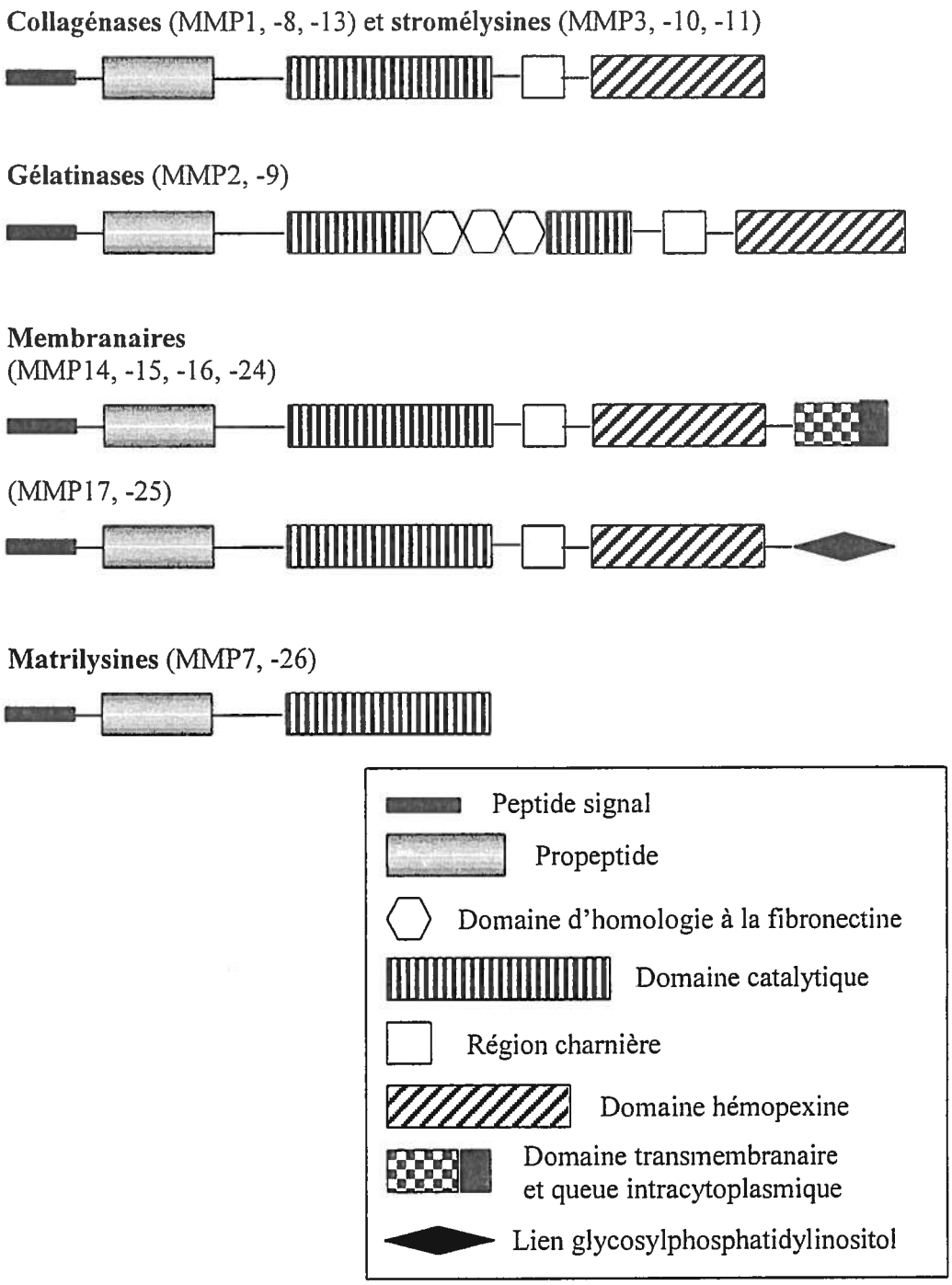


Figure 1. Structure des MMP. Adapté de Massova *et al*, 1998.

du prodomaine coordonne l'atome de zinc du site actif, repliant le prodomaine sur le site actif et empêchant toute liaison à d'éventuels substrats. Chez MMP23, le partie N-terminale du prodomaine serait remplacée par un domaine transmembranaire[78].

Le site actif, caractérisé par le motif consensus VAAHexGHxxGxxH de liaison du zinc, est inclus dans le domaine catalytique des MMP (composé d'environ 175 acides aminés). La structure formée par un résidu méthionine conservé du domaine catalytique et le motif consensus du site actif est appelée « met-turn » et est commune à l'ensemble des métalloprotéases[57]. De plus, trois résidus cystéines du site catalytique coordonnent l'atome de zinc du site actif, qui est nécessaire à l'activité enzymatique. Dans le cas particulier des gélatinases (MMP2 et MMP9), trois répétitions d'un domaine d'homologie à la fibronectine de type II sont présents à l'intérieur du domaine catalytique. Cet ajout leur permet de lier avec une grande affinité et de cliver efficacement la gélatine. Chez toutes les MMP humaines, le domaine catalytique est relié au prodomaine par une courte séquence d'acides aminés susceptible au clivage protéolytique. Les MMP11, -28, -14, -15, -16, -17, -24 et -25 possèdent un site consensus de clivage R-X-(R/K)-R, reconnu spécifiquement par des pro-convertases, dont la furine[78-80].

Un court domaine flexible, appelé la région charnière, est riche en résidus proline et relie le domaine catalytique au domaine hémopexine. Le domaine hémopexine, composé d'environ 210 acides aminés, médie les interactions protéines-protéines (notamment, la liaison enzyme-substrat) et c'est principalement lui qui confère la spécificité de substrat aux différentes MMP[81]. À titre d'exemple, la présence du domaine hémopexine est essentielle aux collagénases pour cliver les collagènes à triple hélice[82], bien que le domaine catalytique permette à lui seul une certaine activité protéolytique envers quelques autres molécules [83]. Le domaine hémopexine est présent chez toutes les MMP sauf les MMP7, -23 et -26; chez MMP23, il est remplacé par une région homologue au récepteur de l'IL-1, riche en résidus cystéines et prolines[84].

Enfin, les MMP membranaires contiennent des domaines supplémentaires en position C-terminale: un domaine transmembranaire relié à un court domaine intracytoplasmique[79] dans le cas des MMP transmembranaires (MMP14, -15, -16, -24) ou un groupement GPI[85] chez les MMP liées à la membrane (MMP17 et MMP25).

Depuis le début des années 1990, un grand nombre de structures tridimensionnelles de MMP ont été publiées, obtenues à l'aide de techniques cristallographiques et de résonnance magnétique nucléaire. Déjà en 1994, ont connaissait la structure du domaine catalytique de MMP1[86], MMP8[87] et MMP3[88] humaines, seules ou liées à un inhibiteur. On sait également que la plupart des MMP sont glycosylées, à différents sites et à différents niveaux. MMP14, par exemple, est glycosylée sur les résidus Thr291, Thr299 et Thr300[89]. MMP9 est plutôt glycosylée sur les résidus Asp98 et Asp 120[90] et MMP1 est glycosylée sur le résidu Asn120[91]. La glycosylation influence la liaison du substrat et/ou l'activité catalytique des MMP; chez MMP14 par exemple, la glycosylation est nécessaire pour permettre l'activité catalytique sur le substrat MMP2[89].

La structure des différentes MMP leur confère donc une spécificité de substrat et influence leur activité enzymatique; toutefois, un autre facteur influençant l'activité des MMP au sein d'un tissu réside en leur niveau d'expression.

1.2.4 Expression

Nous connaissons aujourd'hui certains des principes qui régissent l'expression des MMP. D'abord, leur niveau d'expression cellulaire basal est généralement faible, voire nul[92], alors qu'elles sont fortement exprimées dans des conditions d'activation cellulaire, le plus souvent associées à des pathologies. À titre d'exemple, les fibroblastes synoviaux expriment un faible niveau de MMP1, qui toutefois augmente après traitement avec de l'interleukine-1α[93]. Cette cytokine se retrouve en grande quantité dans les articulations enflammées des modèles expérimentaux d'arthrite, où la surexpression d'interleukine-1 acccompagne la destruction du cartilage[94]. Dans le même ordre d'idées, les MMP sont surexprimées dans presque tous les types de tumeurs par rapport aux tissus sains correspondants[95]; MMP24, par exemple, est surexprimée dans les différentes tumeurs

cérébrales, par comparaison avec le cerveau sain[96]. Par ailleurs, le niveau d'expression tissulaire d'une ou plusieurs MMP au sein des tumeurs est souvent corrélé positivement avec le stade d'évolution des différents cancers[97]. Une corrélation positive a ainsi été démontrée entre le niveau d'expression de MMP2 et les propriétés métastatiques de cellules du mélanome[98]. Les principaux types cellulaires et tissus exprimant les différentes MMP sont listés dans le **Tableau 2**. Il est à noter que bien que certaines MMP (MMP2, MMP9 et MMP14) soient surexprimées dans la plupart des types de tumeurs, la surexpression d'une MMP donnée n'est pas observable dans tous les spécimens analysés d'un type de tumeur[99].

Tableau 2. Distribution cellulaire et tissulaire des MMP

MMP	*Cellules ou tissus producteurs*
MMP1	Fibroblastes, cellules endothéliales, épithéliales et de carcinome, macrophages
MMP2	Cellules endothéliales, leukocytes, macrophages, fibroblastes
MMP3	Cellules endothéliales, fibroblastes, monocytes, cellules de carcinomes, cœur, poumons, foie
MMP7	Cellules épithéliales, utérus, cellules de carcinomes
MMP8	Neutrophiles, cellules endothéliales, fibroblastes, utérus
MMP9	Leukocytes, cellules endothéliales, macrophages, fibroblastes,
MMP10	Kératinocytes, fibroblastes, cellules épithéliales et de carcinome, monocytes
MMP11	Fibroblastes, cellules épithéliales, lymphocytes B, tissus mammaire
MMP12	Macrophages, cellules épithéliales, placenta
MMP13	Chondrocytes, ostéoblastes, fibroblastes, carcinome mammaire
MMP14	Cellules épithéliales et endothéliales, lymphocytes T, macrophages, fibroblastes, poumons, reins, rate, placenta
MMP15	Lymphocytes T, macrophages, fibroblastes, cœur, poumons, foie, côlon,
MMP16	Lymphocytes T, cœur, poumons
MMP17	Leukocytes, cœur, cerveau, côlon, ovaires, testicules
MMP18	Cœur, côlon, poumons, prostate
MMP19	Monocytes, kératinocytes, tissus mammaire
MMP20	Émail dentaire
MMP21	Tissus embryonnaire, cœur, pancréas, ovaires, prostate
MMP23	Ovaires, testicules, prostate
MMP24	Lymphocytes T, pancréas, poumons, reins
MMP25	Leukocytes, poumons, rate
MMP26	Lymphocytes B, cellules de carcinomes, utérus, placenta
MMP27	Lymphocytes B
MMP28	Lymphocytes T, poumons, placenta, cœur, utérus, peau, testicules

Ensuite, bien que dans plusieurs tumeurs les cellules cancéreuses elles-mêmes produisent des MMP, diverses cellules stromales peuvent également en synthétiser et contribuer à l'augmentation locale de l'activité protéolytique. En effet, une étude pionnière a démontré que les fibroblastes adjacents aux cellules stromales peuvent produire la stromélysine MMP11 dans les carcinomes mammaires[61]. De façon similaire, des analyses histologiques de spécimens de divers carcinomes humains ont révélé la présence d'ARN de différentes MMP dans les cellules stromales[100; 101]. De plus, il a été démontré par hybridation *in situ* que les ARNm de MMP1, MMP2, MMP3 et MMP14 étaient exprimées par les fibroblastes adjacents aux cellules tumorales et non par les cellules tumorales elles-mêmes, dans des spécimens de carcinomes mammaire, colorectal, du poumon, de la prostate et de l'ovaire chez l'humain[102].

1.2.5 Régulation de l'expression

De façon générale, l'expression des MMP est soumise à une fine régulation, qui s'exerce à différents paliers: transcriptionnel, épigénétique et post-transcriptionnel. Il en résulte une expression cellule-spécifique (qui dépend, entre autres, du niveau d'expression par chaque type de cellule des récepteurs des différents ligands modulant l'expression des MMP), signal-spécifique (qui varie selon la nature des éléments de signalisation intracellulaires mobilisés dans une condition donnée), promoteur-spécifique (basée sur la composition du promoteur des différentes MMP) ainsi que tissu-spécifique (l'activité des enzymes, une fois produits, étant modulée par l'interaction avec différents activateurs et inhibiteurs, dont la nature ainsi que la quantité varie au sein des différents tissus et dans des conditions données).

1.2.5.1 Régulation transcriptionnelle

Le contrôle transcriptionnel de l'expression des MMP constitue un palier de régulation pivot[103]. L'activité transcriptionnelle des gènes de MMP est influencée par différents types de stimuli: la liaison à la surface cellulaire de modulateurs solubles, de même que les interactions directes cellule-cellule et cellule-matrice. Les cytokines et facteurs de croissance constituent d'importants ligands solubles influençant l'expression des MMP[104; 105]; les rapports d'une modulation de l'expression des MMP par ces agents sont

nombreux (**Tableau 3**). À titre d'exemple, les cytokines pro-inflammatoires IL-1α et TNFα induisent l'expression de MMP9 dans les lymphocytes T[106]; ainsi, des cytokines différentes peuvent exercer le même effet sur l'expression d'une MMP donnée. Par ailleurs, EGF augmente le niveau de l'ARN de MMP1 et MMP3 dans les fibroblastes[107], alors que HGF augmente l'expression de MMP1, MMP3 et MMP9 dans des cellules de carcinome mammaire[108]. Un facteur de croissance donné peut donc moduler l'expression de plusieurs MMP différentes dans un type cellulaire particulier. Certains facteurs solubles peuvent également moduler à la baisse le niveau d'expression des MMP; par exemple, l'exposition à l'IL-4 ou à l'IFNγ diminue la quantité d'ARN de MMP9 dans les macrophages[109-111]. Par ailleurs, certains agents solubles peuvent exercer un effet synergique avec d'autres agents dans la régulation transcriptionnelle des MMP; dans les monocytes par exemple, TNFα ou encore IL-1β, en combinaison avec GM-CSF, stimulent ensemble l'expression de MMP9[112]. À l'opposé, certains agents solubles peuvent antagoniser l'action d'autres agents dans un type cellulaire donné. Dans une lignée de cellules de gliome par exemple, l'induction de MMP9 par IL-1 ou TNFα est inhibée par TGFβ2[113] de même que PDGF[114].

La régulation de l'expression des MMP par des agents solubles est promoteur-spécifique: dans les cellules de carcinome mammaire, le HGF module à la hausse le niveau des ARNm de MMP1, MMP3 et MMP9, alors que ceux de MMP2 ne varient pas significativement[108]. De façon similaire, même si les gélatinases MMP2 et MMP9 sont toutes les deux exprimées par les lymphocytes T circulants au repos[115; 116], seule MMP9 est régulée à la hausse par certaines chimiokines produites au cours de la réponse inflammatoire[117]. Outre les agents solubles, l'état d'activation cellulaire peut être induit par des contacts directs cellule-cellule ou cellule-matrice; ces contacts constituent un autre point de régulation transcriptionnelle de l'expression des MMP. Au cours de telles interactions, des molécules d'adhésion sont activées par la liaison de leur ligand à la surface cellulaire et certaines peuvent alors induire une cascade de signalisation intracellulaire via leur portion intracytoplasmique. Ultimement, certains de ces signaux conduisent à la modulation de la transcription des gènes codant pour les MMP.

Tableau 3. Facteurs solubles modulant l'expression des MMP. Adapté de [118].

Enzyme	*Modulateurs positifs*	*Modulateurs négatifs*
MMP1	PDGF, EGF, FGFα, FGFβ, FGF-7, FGF-9, HGF, TGFα, TGFβ1, VEGF, TNFα, TNFβ, IFNβ, IFNγ, IL-1α, IL-1β, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, MIF	FGFβ, FGF-9, IGF-1, TGFβ1, TGFβ2, TGFβ3, IFNγ, IL-1, IL-4, IL-11, IL-13
MMP2	PDGF, EGF, FGFβ, FGF-3, GM-CSF, IGF, TGFα, TGFβ1, VEGF, IL-1α, IL-1β, IL-3, IL-6, IL-8, IL-13	IFNβ, IFNγ, IL-4, IL-10
MMP3	PDGF, EGF, FGFβ, HGF, IGF, TGFα, TGF-β1, VEGF, IFNβ, IFNγ, IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18, TNFα	TGFβ1, IFNγ, IL-4, IL-11, IL-13
MMP7	EGF, FGFα, FGFβ, FGF-9, FGF-10, IFN-γ, TGFβ1, IL-1α, IL-1β, IL-4, IL-8, IL-10, TNFα	IL-4, IL-10, IFNγ
MMP8	TNFα, IL-1β	TGFβ1
MMP9	PDGF, EGF, FGFβ, FGF-3, GM-CSF, HGF, IGF, TGFα, TGFβ1, VEGF, IFNα, IFNγ, IL-1α, IL-1β, IL-3, IL-6, IL-8, IL-13, IL-15, IL-17, TNFα, TNFβ, MCP-1, CCL3, CCL4, CCL5	TGFβ1, TGFβ2, IFNβ, IFNγ, IL-1, IL-4, IL-10, TNFα
MMP10	EGF, KGF, TGFα, TGFβ1, TNFα, IL-1β	PDGF
MMP11	PDGF, EGF, FGFβ, IGF, IL-6	PGDF, FGF-2
MMP12	PDGF, GM-CSF, VEGF, IL-1β, IL-13, TNFα, CCL2	M-CSF, TGFβ1, IFNγ,
MMP13	PDGF, EGF, FGFβ, FGF-7, IGF, TGFα, TGFβ, IL-1β, IL-6, IL-13, TNFα	IGF, IFNγ, IL-4, IL-13
MMP14	GM-CSF, HGF, IL-1α, IL-1β, IL-13, TNFα	TNFα, IL-1β, PDGF

Différentes classes de molécules d'adhésion sont impliquées dans les contacts cellule-cellule et cellule-matrice, dont les intégrines. Ces dernières sont capables, via leur portion intracytoplasmique, de produire des signaux intracellulaires qui conduisent à la modulation de l'expression génique[119; 120] et leur activation a plusieurs fois été associée à l'expression et à l'activité des MMP au sein des tumeurs[121]. Ainsi, l'expression de MMP9 est induite dans les cellules lymphomateuses exprimant l'intégrine LFA-1 à la suite d'un contact direct avec des cellules exprimant le ligand ICAM-1[122]; de la même façon, le contact direct avec des cellules de carcinome du côlon induit l'expression de MMP9 dans les fibroblastes via l'engagement et l'activation de la sous-unité β1 des intégrines à leur surface[111]. Les intégrines peuvent également médier des contacts directs cellule-matrice; elles sont alors activées lors de leur engagement par différentes macromolécules de la matrice extracellulaire. Ainsi, l'expression de MMP14 est induite dans des cellules de carcinome mammaire cultivées dans un gel de collagène de type I[123], un processus probablement médié par l'intégrine α2β1[124]. Par ailleurs, dans les cellules de carcinome mammaire[125] et de neuroblastome[126], la liaison de l'intégrine αvβ3 au collagène est associée avec l'expression de MMP9, alors que dans les cellules de mélanome, αvβ3 induit l'expression de MMP9 lorsqu'elle lie la laminine-5[127]. Enfin, les intégrines peuvent aussi médier une modulation à la baisse de la transcription des gènes codant pour les MMP: à titre d'exemple, l'attachement au collagène de type IV dans les cellules de carcinome épidermoïde régule à la baisse l'expression de MMP9[128].

D'autres types de molécules d'adhésion que les intégrines peuvent moduler, après engagement et activation par leurs ligands spécifiques, l'expression des MMP. À titre d'exemple, l'expression des MMP1, -2 et -3 est induite dans les fibroblastes après leur contact avec des cellules tumorales exprimant EMMPRIN, un membre de la famille des immunoglobulines[129]. De plus, l'expression de MMP9 est induite dans les monocytes[130] et celle de MMP1, -2, -3 et -9 est induite dans les cellules endothéliales[131] après interaction avec des lymphocytes T, via l'interaction CD40/CD40L.

Les voies de signalisation qui modulent l'expression des MMP après activation cellulaire, par des agents solubles ou par contact direct cellule-cellule et cellule-matrice, sont

partiellement élucidées et s'avèrent stimulus-spécifique. Ainsi, tous les agents solubles n'induisent pas les même signaux intracellulaires. D'une part, les cytokines pro-inflammatoires telles que IL-1 et TNFα activent la voie des céramides[132], qui implique deux des trois cascades de MAPK (mitogen-activated protein kinase): JNK/SAPK (c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase) et p38MAPK. Ainsi, le traitement de cellules de gliome avec un inhibiteur spécifique de p38MAPKβ (SB203580) inhibe l'induction de MMP9 par IL-1 et TNFα[133]. La voie des céramides conduit à l'activation et à la translocation au noyau de différents facteurs de transcription, dont AP-1[134], NF-κB[135; 136] et possiblement ATF2[137]. D'autre part, les cytokines anti-inflammatoires telles que IL-4 et IL-13 induisent des voies de signalisation distinctes mais interconnectées avec celles induites par les cytokines pro-inflammatoires. Ainsi, la portion intracytoplasmique des récepteurs de ces cytokines recrute à la membrane des membres de la famille JAK (Janus kinase)[138; 139], qui phosphorylent le récepteur. STAT6 (signal transducer and activator of transcription-6) y est alors recrutée et phosphorylée; après dimérisation, STAT6 est transloquée au noyau où elle agira à titre de facteur de transcription[140]. STAT6 peut également inhiber l'interaction entre NF-κB et l'ADN[141]. La connexion entre les voies de signalisation activées par les cytokines pro- et anti-inflammatoires réside en p38MAPK, que l'IL-4 peut activer via Rac/Cdc42/PAK (p21-activated kinase)[142]; p38MAPK augmente l'activité du facteur de transcription STAT6[143], en phosphorylant son domaine de transactivation[144]. Une seconde voie de signalisation induite par IL-4 et IL-13 conduit au recrutement de IRS-1 et IRS-2 (insulin receptor substrate 1/2) au niveau de leur récepteur[138; 139], où elles sont phosphorylées avant de s'associer avec la sous-unité p85 de PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase), ce qui résulte en l'activation de la sous-unité catalytique p110 de PI3K. La suite de cette cascade demeure incomplètement caractérisée, bien que l'on sache qu'éventuellement MAPK est activée[145]. Partageant un récepteur avec l'IL-4, l'IL-13 active elle aussi la voie des JAK/STAT et particulièrement STAT6[146; 147], bien que l'IL-13 puisse également induire le recrutement et la phosphorylation de STAT1 et STA 3[148]. p38MAPK est également activée par l'IL-13 dans certains types cellulaires[148].

Plusieurs facteurs de croissance activent la voie de Ras, une GTPase[149; 150]. Ras se lie à PI3K pour augmenter son activité de phosphorylation sur PKB/Akt[151; 152], qui peut ensuite activer NF-κB. D'autres facteurs de croissance activent la voie des PKC (protéine kinase C). Les isoenzymes PKC sont divisées en trois groupes, en fonction de leur distribution cellulaire, de leur spécificité de substrat et de leur réponse aux activateurs: les PKC conventionnelles, nouvelles et atypiques[153]. Les PKC conventionnelles sont notamment activables par les esters de phorbol, dont le PMA (phorbol 12-myristate-13-acetate) et le TPA (12-tetradecanoylphorbol-13-acetate)[153]. Les PKC participent à la régulation transcriptionnelle de différentes MMP[154-156] via, entre autres, l'activation des facteurs de transcription NF-kB et AP-1[157-159].

Les signaux intracellulaires activés par les intégrines sont multiples. Certains impliquent des PKC; c'est le cas de l'induction de MMP9 par l'engagement de αvβ6 dans des cellules de carcinome du côlon[160]. Alternativement, la cascade de signalisation débute par la liaison de ILK (integrin-linked kinase) à la portion intracytoplasmique des sous-unités β1, β2 et β3 des intégrines[161]. ILK phosphoryle et active Akt[162], ou induit la phosphorylation de PI3K et l'inhibition de GSK-3β; l'induction consécutive de MMP9 impliquera alors les facteurs de transcription AP-1[163; 164] ou NF-κB[165].

Ces différentes voies de signalisation aboutissent à l'activation et à la translocation au noyau de certains facteurs de transcription. Les principaux facteurs de transcription impliqués dans la régulation transcriptionnelle des MMP sont connus. Toutefois, les MMP diffèrent quant à la composition de leur promoteur et ce, même chez les membres d'une même classe, bien que certains sites de liaison pour des facteurs de transcription soient communs à plusieurs des promoteurs. Le site AP-1 par exemple, situé dans la région comprise entre -65 et -79, est présent chez les MMP1, -3, -7, -9, -10, -12, et -13. Ce site lie le facteur de transcription AP-1, un hétérodimère formé d'une sous-unité des familles Fos et Jun; AP-1 est impliqué dans l'expression basale de même qu'induite des MMP[166-169]. Plusieurs voies de signalisation induites par des cytokines ou facteurs de croissance convergent vers le site AP-1, qui constitue également l'élément de réponse aux esters de phorbol[166; 167; 170-172].

Plusieurs copies du site PEA3 sont présentes chez les promoteurs des MMP1, -3, -7, -10, -11, -12 et -13; à l'exception de MMP12, au moins un des sites PEA3 est adjacent au site AP-1. Le site PEA3 lie les facteurs de transcription de la famille ETS[173; 174], particulièrement Ets-1 et Ets-2, deux protéines ubiquitaires présentant un haut degré d'homologie[175]. Bien que les protéines ETS puissent transactiver des constructions de promoteur contenant seulement un élément PEA3, elles dimérisent rarement pour lier l'ADN et forment plutôt des complexes protéiques avec d'autres facteurs de transcription tels que AP-1[173; 176; 177]. L'interaction fonctionnelle entre les membres de familles AP-1 et ETS est impliquée dans la régulation transcriptionnelle de l'expression des MMP[178]. Un site de liaison du facteur de transcription NF-κB a été caractérisé en position -600 chez le promoteur de MMP9; NF-kB active en effet la transcription des gènes de nombreuses MMP, incluant MMP9[165]. Ce site participe également, en coopération avec le site AP-1, à l'induction transcriptionnelle par la voie des PKC PMA-activables[169; 179] et par la voie de Ras[180]; dans ce dernier cas, le site PEA3 est également requis[180].

Enfin, un élément AP-2 contribue à l'expression cellule-spécique de MMP2 et MMP9; chez MMP2 par exemple, le site AP-2, situé en position -1650, est indispensable à la transcription basale du gène dans la lignée de fibrosarcome humain HT1080[181]. Le promoteur de MMP2 se distingue de celui des autres MMP, ne comportant aucun site AP-1 ou PEA3. À cet égard, MMP2 est constitutivement exprimée par la plupart des types cellulaires et son expression est rarement modulée par des cytokines ou des facteurs de croissance[182-184]. De plus, le promoteur de MMP2 ne contient pas de boîte TATA classique: une séquence située à la position -26 serait responsable de sa transcription basale[185].

L'activité transcriptionnelle d'un promoteur dépend non-seulement des éléments qu'il contient, mais également de leur accessibilité par la machinerie transcriptionnelle. Des mécanismes épigénétiques contrôlent cette accessibilité; la régulation épigénétique de l'expression des MMP est présentée dans la section 1.2.5.2.

1.2.5.2 Régulation épigénétique

Les mécanismes épigénétiques contrôlent l'expression génique sans altérer la séquence nucléotidique des gènes. Les deux principaux types d'événements épigénétiques documentés, la méthylation de l'ADN et la modification des histones (acétylation, méthylation et phosphorylation), sont interreliés. Les données expérimentales accumulées à ce jour soulignent des aberrations dans ces événements épigénétiques, qui seraient impliquées dans certaines conditions pathologiques, dont le cancer.

La méthylation de l'ADN consiste en un transfert d'un groupement méthyl en position C5 de l'anneau pyrimidine du nucléotide cytosine, exécuté par des méthyltransférases de l'ADN (DNMT, DNA methyltransferases). Au moins trois DNMT sont impliquées dans la méthylation de l'ADN: DNMT1, DNMT3A et DNMT3B[186; 187]. DNMT1 est la méthyltransférase la plus active dans les cellules somatiques et démontre une grande affinité envers l'ADN hémiméthylé (dont un seul des deux brins est méthylé, à la suite de la réplication de l'ADN)[188]. DNMT1 est ainsi la principale enzyme responsable du maintien du patron de méthylation génomique lors de la division cellulaire. Pour leur part, DNMT3A et DNMT3B possèdent une affinité comparable envers l'ADN hémiméthylé et non-méthylé et sont requises pour la méthylation *de novo*[189], notamment dans le cadre du développement embryonnaire[190]. Environ 3 à 5 % de toutes les cytosines sont ainsi méthylées dans le génome des vertébrés[191] et l'activité méthyltransférase des DNMT n'est optimale qu'au niveau de régions spécifiques du génome riches en dinucléotides CpG appelées ilots CpG[192]. Ces ilots CpG, d'une longueur variant de 200 pb à 5 kb, sont composés de 60 à 70 % de cytosines et guanosines[193; 194] et sont le plus souvent situés au niveau de séquences régulatrices du génome, principalement les promoteurs[192].

Il y vingt ans déjà, l'utilisation d'enzymes de restriction méthylation-spécifiques couplée à l'immunobuvardage de type Southern avait permis d'observer que la majorité des ilots CpG qui étaient méthylés dans des tissus normaux étaient non-méthylés dans les cellules cancéreuses[195]. Plus tard, l'analyse de 98 différentes tumeurs primaires humaines a révélé qu'il existait en moyenne 600 ilots CpG méthylés de façon aberrante dans chaque tumeur[196]. L'altération du processus de méthylation au sein d'une tumeur se manifeste à

deux niveaux différents: le niveau génomique global et le niveau génique individuel. Les premiers rapports faisaient déjà état d'une hypométhylation génomique globale dans des cellules tumorales[195]; par la suite, de nombreuses autres études ont confirmé cette observation. C'est notamment le cas pour les tumeurs d'origine hématopoïétiques, où une hypométhylation généralisée a été démontrée dans les leucémies myéloïdes aigües[197] et les leucémies lymphocytaires chroniques[198]. Le processus de méthylation de l'ADN au niveau génique individuel se manifeste de façon gène-spécifique: à cet égard, il a été démontré qu'au sein d'une même tumeur, le promoteur de certains gènes pouvait être hypométhylé alors que d'autres étaient hyperméthylés[199]. Jusqu'à maintenant, la plupart des rapports faisaient état d'une hyperméthylation localisée[200], résultat du type d'approche expérimentale utilisée[201].

Il a été démontré que le promoteur du gène *p15* est fréquemment hyperméthylé dans les tumeurs d'origine myéloïdes et la leucémie lymphoblastique aigüe[202-204]; une hyperméthylation localisée a également été rapportée dans les lymphomes non-Hodgkiniens, notamment au niveau du promoteur du gène *p16*[205]. *p15* et *p16* sont des gènes suppresseurs de tumeur, qui codent pour un inhibiteur de kinases dépendantes des cyclines. Néanmoins, certaines études ont souligné la présence d'hypométhylation localisée dans les cellules cancéreuses[206-208]; de fait, de récentes analyses basées sur la technologie des matrices différentielles d'ADN complémentaire suggèrent indirectement une fréquence élevée de sites hypométhylés dans les diverses cellules cancéreuses[209-211].

Un lien fonctionnel a été suggéré entre l'altération du processus de méthylation de l'ADN et l'expression génique dans les cellules malignes[212]. L'hyperméthylation est généralement accompagnée d'une répression transcriptionnelle[187; 213]: on a pu identifier un grand nombre de gènes reliés à la progression tumorale qui étaient réprimés par hyperméthylation[214]; la perte d'expression de certains gènes contribuerait à la progression tumorale dans différents types de cancers[215]. Par opposition à l'hyperméthylation, l'hypométhylation serait associée à l'activation de l'expression d'un gène. En effet, dans les tissus somatiques, plusieurs ilots CpG sont normalement méthylés et associés à l'absence d'activité transcriptionnelle[216]; ces ilots méthylés peuvent devenir

hypométhylés dans les cellules cancéreuses et les gènes correspondants seraient alors exprimés. Ainsi par exemple, une hypométhylation localisée active l'expression des antigènes MAGE dans le mélanome[217]; de la même façon, l'hypométhylation du promoteur du gène *CAGE*, qui précède l'apparition des cancers du foie et de l'estomac, active l'expression de cet antigène[218].

Les mécanismes qui médient la répression transcriptionnelle associée avec l'hyperméthylation régionale ont été partiellement élucidés. Brièvement, l'ADN méthylé interagit directement avec des protéines liant l'ADN méthylé telles que MeCP2[219], qui contient un domaine liant les CpG méthylés et un domaine de répression transcriptionnelle. MeCP2 s'associe ensuite avec des corépresseurs tels que des déacétylases d'histones (HDAC, histone deacetylase)[220; 221] au sein d'un complexe protéique répresseur[222]. L'importance de l'interaction entre les DNMT, MeCP2 et les HDAC a été démontré par l'utilisation combinée d'un inhibiteur de méthylation d'ADN (la 5-aza-2'-deoxycytidine) et d'un inhibiteur de HDAC (la trichostatine A), qui a résulté en l'activation synergique de différents gènes reliés à la progression tumorale[223-225].

De récents travaux démontrent que la méthylation de l'ADN influence également l'expression des gènes codant pour les MMP. Les premières indications de la présence d'un tel mécanisme de régulation épigénétique de l'expression des MMP ont été fournies par l'équipe du Dr Kerbel, qui a démontré que le traitement de cellules du mélanome avec l'inhibiteur de méthylation d'ADN 5-aza-2'deoxycytidine augmente les niveaux de l'ARN de MMP9[226]. Par la suite, des travaux effectués avec des lignées de cellules lymphomateuses ont confirmé l'influence de la méthylation sur l'expression du gène *MMP9*. Ainsi, l'équipe du Dr St-Pierre a observé que le traitement avec la 5-aza-2'deoxycytidine induisait l'expression de MMP9 dans des cellules lymphomateuses[227], un effet qui avait déjà été observé dans les cellules du mélanome[226]. Les mêmes auteurs ont également démontré qu'il existait dans les cellules lymphomateuses une corrélation inverse entre le niveau de méthylation du promoteur de MMP9 et son niveau d'activité transcriptionnelle et traductionnelle; qu'il existait une corrélation inverse entre le niveau de méthylation de certaines régions du promoteur de MMP9 et son expression aux

niveaux de l'ARN et de la protéine; enfin que la méthylation du promoteur de MMP9 abolissait son activité transcriptionnelle dans les cellules de fibrosarcome HT1080[227]. Il s'agissait de la première étude démontrant que des changements au niveau du statut de méthylation du promoteur de MMP9 pouvait en affecter l'activité transcriptionnelle.

Tel que mentionné dans la section 1.2.5.1, les gélatinases MMP2 et MMP9 diffèrent au niveau de leur régulation transcriptionnelle. De façon similaire, elles diffèrent au niveau de leur régulation par la méthylation. En effet, contrairement à MMP9, l'expression de MMP2 n'est pas induite par le traitement à la 5-aza-2'-deoxycytidine dans les cellules lymphomateuses[227] ou du mélanome[226]. Par ailleurs, il a récemment été démontré que l'expression de MMP2 n'était pas modifiée par l'analogue de cytosine 5-azacytidine dans des cellules de neuroblastome[228]. Il semble donc que par opposition à MMP9, l'expression du gène de MMP2 ne serait pas soumise à une régulation par la méthylation d'ADN dans ces types de cellules cancéreuses. Dans plusieurs lignées de cellules de carcinome du pancréas toutefois, l'expression de MMP2 est induite après traitement avec la 5-aza-2'-deoxycytidine; de plus, l'expression de MMP2 dans ces cellules est corrélée négativement avec le niveau de méthylation de son promoteur[229]. Ces résultats suggèrent que dans les cellules de carcinome du pancréas, l'expression de MMP2 serait soumise à une répression transcriptionnelle via une hyperméthylation de certaines régions de son promoteur; de tels résultats soulignent également la spécificité reliée au type cellulaire des mécanismes de régulation épigénétiques.

D'autres MMP pourraient également être soumises à une régulation de l'expression par la méthylation d'ADN. En effet, une première étude a rapporté une influence de la méthylation sur le niveau d'expression des MMP1, -3, -7 et -14 dans plusieurs lignées de cellules de carcinome du pancréas; outre MMP2 et MMP9, les auteurs n'ont pas analysé l'expression d'autres MMP[229].

La régulation transcriptionnelle et épigénétique de l'expression des MMP régissent les événements qui conduisent à la synthèse de leur ARN. Par la suite, un palier

supplémentaire de régulation de l'expression des MMP consiste en divers mécanismes post-transcriptionnels, qui sont décrits dans la section 1.2.5.3.

1.2.5.3 Régulation post-transcriptionnelle

Lorsque l'ARN des MMP est synthétisé, divers mécanismes entrent en scène pour réguler leur expression protéique ainsi que leur activité. Ces mécanismes, qui incluent la stabilisation de l'ARNm, la localisation extracellulaire ciblée des enzymes, l'activation pro-enzymatique et l'inhibition enzymatique, sont décrits ci-après.

L'expression de certaines MMP dépend de la stabilité et du temps de demi-vie de leur ARNm. Il a été démontré que l'expression de MMP1, MMP2 et MMP3 était soumise à une telle régulation, bien que les mécanismes de stabilisation des ARNm en cause n'aient pas été élucidés[184; 230; 231]. Dans le cas de MMP-9 par contre, il a été démontré que le facteur de stabilisation HuR était impliqué[232; 233].

Les enzymes qui sont synthétisées sont ciblées à des endroits spécifiques à la surface de la cellule qui les produit. Ainsi, dans les kératinocytes qui lient le collagène de type I par leur intégrine $\alpha 2\beta 1$, l'expression de MMP1 est induite et l'enzyme est sécrétée spécifiquement au point de contact cellule-matrice[234]. De façon similaire, MMP2 après sécrétion par des cellules tumorales lie l'intégrine $\alpha v\beta 3$ à la surface cellulaire[235]. Cette localisation ciblée des MMP à la surface des cellules qui les produisent permettrait de favoriser leur interaction avec des substrats particuliers.

De plus, les MMP, qui sont d'abord synthétisées sous forme de proenzyme inactif, doivent acquérir la forme active afin d'exercer leur activité catalytique. Cette forme active est obtenue après clivage et relarguage de leur prodomaine, qui obstrue le site actif. Dans le cas des MMP11, -28 et des MMP membranaires (MMP14, -15, -16, -17, -24, -25), qui possèdent un site consensus de clivage R-X-(R/K)-R reconnu spécifiquement par les pro-convertases telles que la furine[78-80], le clivage du prodomaine aurait lieu au niveau de l'appareil de Golgi, au cours des dernières étapes de maturation des protéines. Ces MMP seront donc exprimées sous forme active à la surface cellulaire[85; 236]. Dans le cas des

autres MMP, l'activation, qui a lieu dans l'espace extracellulaire, nécessite le bris de l'interaction « cysteine switch » qui relie le prodomaine au site actif[77]. Plusieurs agents peuvent effectuer ce bris, incluant des protéases ainsi que divers agents chimiques dont le plus courant est l'APMA (4-aminophenylmercuric acid)[77]. L'activation par des protéases est un processus séquentiel[237]: d'abord, une première attaque protéolytique déstabilise la « cysteine switch » puis, une deuxième attaque protéolytique permet de relarguer complètement le prodomaine[238, 239]. Les principales protéases qui peuvent activer les MMP sont regroupées dans le **Tableau 4**.

Tableau 4. Protéases pouvant activer les différentes MMP

MMP	*Peut être activée par*
1	MMP3, MMP7, MMP10, plasmine, kallikréine, chymase
2	MMP1, MMP7, MMP9, MMP13, MMP14, MMP15, MMP16, MMP17, MMP24, MMP25
3	MMP1, plasmine, kallikréine, chymase, tryptase
7	MMP3, MMP10, plasmine
8	MMP3, MMP7, MMP10, plasmine
9	MMP1, MMP2, MMP3, MMP7, MMP10, MMP13, plasmine
10	Élastase, cathepsine G, plasmine
11	Furine
12	?
13	MMP2, MMP3, MMP7, MMP9, MMP10, MMMP14, MMP15, plasmine
14	Furine
15	Furine ?
16	Furine
17	Furine ?
24	Furine
25	Furine ?

MMP2, contrairement aux autres MMP sécrétées, n'est pas optimalement activée par la plupart des protéases habituelles, mais est très efficacement et spécifiquement activée par les MMP membranaires. Le mécanisme d'activation de MMP2 par MMP14, qui présente la particularité d'impliquer une tierce partie, a été caractérisé en détails[240-242]. Brièvement, proMMP2 forme d'abord un complexe avec TIMP-2 (tisue inhibitor of metalloproteinase-2) via leur domaine C-terminal, ce qui permet au domaine N-terminal de TIMP-2 de lier simultanément MMP14 à la surface cellulaire. proMMP2 est alors activée par une molécule de MMP14 adjaçente, non-liée à une molécule de TIMP-2.

Enfin, l'activité protéolytique des MMP qui ont acquis la forme active est modulée par la liaison de différents inhibiteurs. Conséquemment, l'activité protéolytique nette résulte de l'état d'équilibre entre les niveaux de MMP actives et ceux de leurs inhibiteurs. Les premiers inhibiteurs naturels des MMP a avoir été caractérisés sont les TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinases). Quatre TIMP ont été clonés, purifiés et caractérisés (TIMP-1 à TIMP-4)[243-246]; bien que chacun possède une affinité variable envers les différentes MMP, tous sont capables d'inhiber chacun des membres de cette famille de protéases[247].

Les glycoprotéines TIMP-1 et TIMP-2 présentent environ 40% d'identité. TIMP-3 présente une plus grande homologie de séquence avec TIMP-2 que TIMP-1, alors que TIMP-4 présente 37% d'identité avec TIMP-1 et 51% d'identité avec TIMP-2 et TIMP-3[248]. Les TIMP sont des protéines sécrétées; cependant, TIMP-3 est séquestré au niveau de la matrice extracellulaire en liant les protéoglycans contenant de l'héparan sulfate et possiblement, de la chondroïtine sulfate[249]. Par ailleurs, TIMP-1 lie un récepteur encore non-identifié à la surface des cellules de carcinome mammaire humain MCF-7[250], tandis que TIMP-2 lierait un récepteur spécifique qui activerait des protéines G et la voie de l'AMP cyclique[251]. L'expression des TIMP est stimulée par plusieurs cytokines, dont les interleukines-1, -6 et -11, de même que par divers facteurs de croissance et hormones[252; 253].

Une surexpression des TIMP a été observée dans différents types de tumeur, tels que des carcinomes mammaires[254], colorectaux[255], gastriques[256], pulmonaire[257] et les lymphomes non-Hodgkiniens[258]; cette surexpression des TIMP est souvent associée avec un mauvais pronostic pour les patients atteints de différents cancers. Dans les lymphomes non-Hodgkiniens par exemple, une expression élevée de TIMP-1 est associée à un stade d'évolution avancé et à un mauvais pronostic[258]. Les TIMP exercent différentes fonctions reliées à la progression tumorale; certaines sont MMP-dépendantes, d'autres sont MMP-indépendantes. D'abord, les TIMP influencent la prolifération cellulaire. Ainsi, la surexpression des TIMP inhibe la croissance de tumeurs primaires[259-261]. Paradoxalement, TIMP-1 peut également promouvoir la croissance d'une variété de cellules saines et transformées[243; 262; 263]. Cette activité stimulant la prolifération cellulaire de TIMP-1 est parfois indépendante[264; 265], mais également parfois dépendante[266] de son activité inhibitrice des MMP. De plus, les TIMP modulent l'activité apoptotique des cellules cancéreuses. Ainsi, l'expression de TIMP-1 par les cellules de lymphome de Burkitt confère une résistance à l'apoptose médiée ou non par FasL[267], alors que TIMP-2 protège les cellules de mélanome B16 de l'apoptose[268]; toutefois, TIMP-2 promouvoit l'apoptose dans un modèle *in vivo* de cancer colorectal[261]. TIMP-3 peut lui aussi stimuler l'apoptose, notamment dans plusieurs types cellulaires *in vitro* et *in vivo*[269-271]. Enfin, les TIMP inhibent l'invasion et la métastasie par les cellules tumorales. En effet, l'injection intrapéritonéale de TIMP-1 ou TIMP-2 recombinant inhibe la formation de métastases au poumon par les cellules de mélanome B16[272; 273]; la surexpression de TIMP-1 supprime également le potentiel métastastatique des cellules tumorales de mélanome[260] et de carcinomes gastrique[274] et de la peau[275]. De même, le transfert adénoviral de TIMP-3 supprime la capacité métastatique des cellules de carcinome Hela et des cellules de fibrosarcome HT1080[261; 269] et la surexpression de TIMP-4 par les cellules de carcinome mammaire MDA-MB-435 inhibe leur capacité invasive et de métastasie[259].

Outre les TIMP, d'autres inhibiteurs endogènes des MMP ont été caractérisés: les molécules homologues aux TIMP, l'alpha2-macroglobuline et RECK. TFPI-2 (tissue factor pathway inhibitor 2) contient une région interne similaire aux TIMP et peut inhiber

MMP1, -2, -9 et-13 par un mécanisme de séquestration[276]. La trombospondine-2 présente également une homologie partielle avec les TIMP et peut inhiber l'activation de proMMP2 et proMMP9 de même que moduler la synthèse de MMP2[277]. L'alpha2-macroglobuline est une protéine plasmatique qui peut inhiber tous les types de protéases[278] en séquestrant les enzymes et leur interdisant ainsi l'accès à leur propres substrats protéiques[279]. La glycoprotéine RECK (reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs) est associée à la membrane cellulaire par un lien GPI[280]; jusqu'à aujourd'hui, les études du potentiel d'inhibition des MMP par RECK ont démontré une inhibition modérée de MMP2 et MMP14[281] de même que de MMP9[280].

Les divers inhibiteurs des MMP contribuent donc au contrôle du niveau d'activité protéolytique nette au sein d'un tissus ou d'une tumeur. Les principaux mécanismes par lesquels ils exercent leur fonction inhibitrice consistent en un blocage de l'activation des pro-MMP en leur forme catalytiquement active ou encore, en une contrainte stérique empêchant les MMP actives de lier et par conséquent, de cliver leurs différents substrats protéiques.

1.2.6 Substrats

Les MMP ont initialement été caractérisées pour leur capacité de clivage des différentes composantes de la matrice cellulaire; aujourd'hui le spectre de substrats s'étend également à diverses protéines non-matricielles. La spécificité de substrat des MMP a été déterminée par l'identification de leur site de clivage chez des substrat protéiques (en général, les MMP clivent un lien peptidique situé avant un acide aminé contenant une chaîne hydrophobe tel que Leu, Ile, Met, Phe ou Tyr) ou par incubation avec une série de peptides synthétiques[282]. Les principaux substrats des MMP qui ont été identifiés à ce jour sont présentés dans le **Tableau 5**.

Bien que chaque MMP soit décrite comme présentant une spécificité de substrat limitée, chacune peut dégrader plusieurs composés matriciels et non-matriciels, ce qui en fait des protéases relativement polyvalentes. Il demeure toutefois que chaque MMP présente une

Tableau 5. Substrats des MMP. Adapté de St-Pierre et Van Themsche, 2003.

Enzyme	*Substrats matriciels*	*Substrats non-matriciels*
MMP1	Collagènes (I, II, III, VII, VIII, X), gélatine, aggrécan, nidogène, entactine	α1-antitrypsine, α1-chymotrypsine, α2-macroglobuline, MBP, TNF, L-sélectine, IL-1β, amyloïde A sérique, MMP2, MMP3, MMP9
MMP2	Collagènes (I, IV, V, VII, X, XI), gélatine, élastine, fibronectine, laminine-1 and –V, aggrécan, décorine	galectine-3, MBP, TNF, IL-1β, β-amyloïde, α1-antitrypsine, IGF, FGF-R1, CCL7, MMP9, MMP13
MMP3	Collagènes (I, III, IV, IX), gélatine, aggrécan, perlecan, décorine, élastine, fibronectine, laminine, entactine, caséine	α1-antitrypsine, α1-antichymotrypsine, antithrombine-III, α2-macroglobuline, MBP, TNF, IL-1β, amyloïde A sérique, fibrinogène, plasminogène, MMP1, MMP7, MMP8, MMP9, MMP13
MMP7	Collagènes (IV, X), gélatine, aggrécan, décorine, fibronectine, laminine, entactine, élastine, caséine	MBP, α1-antitrypsine, TNF, plasminogène, MMP1, MMP8, MMP9, MMP13, L-sélectine
MMP8	Collagènes (I,II, III, V, VII, VIII, X), gélatine, aggrécan, fibronectine	α1-antitrypsine, α1-antichymotrypsine, α2-antiplasmine, L-sélectine
MMP9	Collagènes (IV, V, VII, X), gélatine, élastine, aggrécan, fibronectine, entactine, laminine, vitronectine	α1-antitrypsine, galectine-3, MBP, TNF, IL-1β, β-amyloïde, plasminogène, FGF-R1, MMP2, MMP13, précurseur TGFβ
MMP10	Collagènes (I, III, IV, IX), gélatine, caséine, aggrécan, élastine, entactine	MMP1, MMP7, MMP8, MMP9
MMP11	Collagène IV, caséine, laminine, fibronectine, gélatine, aggrécan	α1-antitrypsine, α2-macroglobuline
MMP12	Collagène IV, gélatine, élastine, caséine, fibronectine, vitronectine, laminine, entactine	α1-antitrypsine, MBP, fibrinogène, fibrine, plasminogène
MMP13	Collagènes (I, II, III, IV, IX, X), gélatine, aggrécan, perlecan, fibronectine	α1-antitrypsine, PAI-2, MMP2, MMP9, α2-macroglobuline, α1-antichymotrypsine
MMP14	Collagènes (I, II, III), gélatine, caséine, élastine, fibronectine, laminine, vitronectine, entactine	α1-antitrypsine, α2-macroglobuline, MMP2, MMP13

affinité variable envers ses différents substrats; ainsi, en présence de différents substrats protéiques MMP12 dégrade majoritairement l'élastine, envers laquelle elle présente la plus grande affinité[283]. Par ailleurs, les différentes MMP démontrent une certaine redondance parce que plusieurs d'entre elles peuvent cliver le même substrat; toutefois, des études de cinétique ont démontré que certaines MMP dégradent un substrat donné plus efficacement que les autres MMP. À titre d'exemple, MMP2 et MMP9 lient et clivent le collagène avec une affinité et une efficacité inégalées parmi les autres MMP[284].

En fonction du tissu et de la section tissulaire où elles sont exprimées, les MMP sont exposées à différents substrats et peuvent donc contribuer à des fonctions cellulaires et tissulaires distinctes.

1.2.7 Fonctions

L'activité protéolytique des MMP est associée à divers processus physiologiques (dont le développement embryonnaire, la croissance osseuse et la réparation des blessures), de même qu'à de nombreuses situations pathologiques (telles que les maladies neurodégénératives, les maladies pulmonaires inflammatoires et le cancer). Les deux principaux facteurs déterminant la fonction d'une MMP dans un microenvironnement donné sont 1) la nature des substrats clivés par l'enzyme et 2) la nature des produits de clivage générés à partir du substrat, différents sites de clivage des MMP étant parfois présents dans un même substrat. Bien que les fonctions les mieux caractérisées des MMP impliquent un remodelage par dégradation de la matrice extracellulaire, il apparaît aujourd'hui que l'activité protéolytique des MMP altère également la fonction biologique de diverses molécules matricielles et non-matricielles.

1.2.7.1 Fonctions physiologiques

Les MMP régulent, positivement ou négativement, la survie et la prolifération cellulaire et ce, par divers moyens. Les MMP peuvent modifier les signaux intracellulaires engendrés par l'adhésion à la surface cellulaire; ainsi, MMP3 induit l'apoptose de cellules épithéliales mammaires en culture en altérant la signalisation intracellulaire induite par

des intégrines présentes à leur surface cellulaire qui lient la fibronectine, en clivant ces intégrines[285] ; cet effet est renversé par des inhibiteurs de MMP[286]. Alternativement, les MMP peuvent moduler directement la biodisponibilité de molécules solubles induisant l'apoptose ou la prolifération cellulaire. En effet, MMP7 et MMP-3 peuvent cliver et relarguer FasL de la surface cellulaire[287]; la forme soluble de FasL relâchée après clivage par MMP-7 peut induire l'apoptose de cellules épithéliales adjacentes exprimant le recepteur Fas[287]. Toutefois, lorsque le traitement avec MMP7 est prolongé, on observe plutôt un effet protecteur du clivage de FasL, qui se traduit par une sélection des cellules épithéliales adjacentes résistantes à l'apoptose[288]. De plus, MMP7 peut inhiber l'apoptose de cellules non-transformées en clivant et relarguant le facteur de croissance HB-EGF[289], qui assure la survie cellulaire en liant son récepteur ErbB4.

Les MMP contribuent également au processus de migration cellulaire, qui est notamment requis pour la réparation des blessures. Ainsi, MMP1 initie la migration des kératinocytes responsables de la réépithélialisation en clivant le collagène de type I autour d'une plaie[290]; la migration de cellules endothéliales à travers un gel de collagène ou de fibrine est inhibée par des inhibiteurs de MMP[291; 292], empêchant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins au sein du tissu cicatriciel; enfin, la réparation tissulaire est retardée chez des souris traitées avec un inhibiteur de MMP[293] et chez des souris déficientes en MMP3[294]. Le processus de migration cellulaire MMP-dépendant est également impliqué dans le développement fœtal: ainsi, des anticorps bloquants sélectifs pour MMP9 inhibent la migration des trophoblastes à travers la matrice extracellulaire *in vitro*[295]. Enfin, la migration cellulaire MMP-dépendante est requise pour le développement neuronal: un anticorps bloquant sélectif pour MMP9 inhibe la migration des oligodendrocytes en culture[296] et MMP2 favorise la migration neuronale en dégradant le sulfate de chondroïtine, un inhibiteur de la migration neuronale[297].

Les MMP contribuent par ailleurs au processus d'angiogénèse, qui est requis non seulement pour la réparation des blessures mais également pour le développement des os longs chez l'adulte. Ainsi, MMP1 et MMP3 peuvent dégrader le perlecan et permettre le relarguage de bFGF, une molécule pro-angiogénique qui y est liée[298]; MMP2 peut cliver

et diminuer l'activité du facteur pro-angiogénique FGF-1[299]; MMP12 diminue l'angiogénèse dans des gels de fibrine en clivant le récepteur de l'uPA[300]; les MMP3, -7, -9 et –12 peuvent générer l'inhibiteur d'angiogénèse angiostatine en clivant le plasminogène[301-304]; enfin, les souris MMP9-déficientes présentent un défaut d'angiogénèse qui inhibe l'ossification[305].

Enfin, l'activité des MMP peut influencer la réponse immunitaire. Ainsi, MMP9 clive IL-8 et augmente son activité chimiotactique envers les différents types cellulaires impliquées dans la réponse immunitaire[306]; de la même façon, plusieurs MMP peuvent cliver TNFα de la surface cellulaire pour en relarguer la forme active[307]. De plus, le précurseur de la cytokine pro-inflammatoire IL-1β peut être clivée par MMP2, MMP3 et MMP9 pour générer sa forme active[308], bien qu'une incubation prolongée avec ces MMP résulte en la dégradation de l'IL-1β et en la perte de son activité biologique[309]. Enfin, MMP9 et MMP14 peuvent cliver la forme latente de TGFβ stockée dans la matrice extracellulaire, libérant ainsi une forme soluble et active de la cytokine anti-inflammatoire[310; 311].

1.2.7.2 Fonctions pathologiques

Un niveau d'expression et/ou d'activité inappropriés des MMP sont associés avec un grand nombre de situations pathologiques, incluant la destruction du cartilage et des os dans l'arthrite et l'arthrose[312; 313], la dégradation de la MBP (myelin basic protein) dans les maladies neuroinflammatoires[314] et le bris de la barrière hémato-encéphalique lors d'un traumatisme cérébral[315]. Les MMP sont également associées aux maladies pulmonaires inflammatoires: des niveaux élevés de MMP2 et MMP14 sont présentes dans les liquides alvéolaires bronchiques des patients souffrant d'asthme bronchique[316] et dans les tissus de patients souffrant d'emphysème pulmonaire[317]; de plus, MMP14 peut inactiver SDF-1[318], une chimiokine impliquée dans le recrutement des leukocytes observé dans diverses lésions inflammatoires du poumon[319], de même que CCL7[320; 321], également associée à l'inflammation pulmonaire[322]. Parmi tous les rôles pathologiques suspectés ou confirmés des MMP, ce sont ceux reliés au cancer qui ont reçu la plus grande attention. Les MMP contribuent en effet à tous les différents aspects de la

progression tumorale, incluant la tumorigénèse (apparition de la tumeur primaire), la prolifération cellulaire, l'évasion de l'apoptose, la croissance tumorale, l'évasion de la réponse immunaire, l'angiogénèse, l'invasion et la métastasie.

Certaines MMP contribuent à la transformation néoplasique des tissus sains. Il a ainsi été rapporté que les souris déficientes en MMP11 développent moins de tumeurs épithéliales que les souris témoins[323]; de même, la surexpression de MMP3 dans des cellules épithéliales mammaires initie leur transformation néoplasique[324]. L'utilisation de souris transgéniques exprimant MMP3 sous un promoteur inductible a effectivement permis de bien caractériser le rôle de MMP3 dans la carcinogénèse mammaire *in vivo*[325]. L'importance des MMP d'origine stromale dans la tumorigénèse a été démontrée dans un modèle de carcinogénèse de la peau, où les souris déficientes en MMP9 développent un moins grand nombre de tumeurs invasives; cet effet est renversé par la reconstitution de l'expression stromale de MMP9 par la transplantation de moelle osseuse provenant de souris normales[326]. Dans ces conditions, l'apport de MMP9 par les cellules stromales, en l'occurence des cellules infiltrantes du système immunitaire, s'est avéré suffisant pour le développement tumoral.

Les MMP favorisent également la prolifération des cellules cancéreuses, principalement en augmentant la biodisponibilité ou en activant des facteurs de croissance dont les cellules tumorales expriment les récepteurs. À titre d'exemple, plusieurs MMP dégradent IGFBP (insulin growth factor binding protein), ce qui permet de libérer le facteur de croissance IGF-1 qui y était complexé[327]; de même, l'activité de MMP3 permet de mettre en circulation la forme active de HB-EGF, qui était autrement liée à la membrane cellulaire sous forme latente[328]; HB-EGF est un puissant mitogène pour les cellules tumorales[329]. En outre, les MMP peuvent conférer aux cellules tumorales une résistance à l'apoptose, notamment par le clivage de molécules exprimées à leur surface. Ainsi, le traitement de cellules tumorales par des inhibiteurs de MMP empêche le clivage et la relâche de FasL à la surface cellulaire et rend les cellules tumorales plus vulnérables à l'activité cytotoxique des lymphocytes T $CD8^+$ [330]; de même, le traitement de cellules tumorales exprimant MMP7 par un oligonucléotide antisens ciblant MMP7 augmente la

sensibilité des cellules tumorales à l'apoptose médiée par Fas[331]. Enfin, l'inhibition de l'expression de MMP7 par des cellules tumorales, au moyen d'un ADN antisens, augmente l'effet cytotoxique de la doxorubicin[332].

Les MMP jouent également un rôle important dans la croissance tumorale. À titre d'exemple, la surexpression de MMP7 par les cellules tumorales accélère la croissance tumorale dans un modèle murin de carcinome du côlon[333] et MMP9 accélère la croissance des tumeurs dans un modèle murin de LNH[334]. Tout en favorisant la croissance tumorale, les MMP contribuent à l'évasion de la réponse immunitaire anti-tumorale, notamment en dégradant les chimiokines CCL7 et SDF-1 qui attirent les cellules du système immunitaire dans le stroma péritumoral[318; 320; 321]. Les MMP influencent également le processus d'angiogénèse tumorale, nécessaire notamment à l'approvisionnement en nutriments et en oxygène des tumeurs en croissance. Ainsi, le traitement des souris avec des inhibiteurs à large spectre de MMP inhibe l'angiogénèse dans différents modèles expérimentaux de cancer[335; 336]. De plus, les souris déficientes en MMP2 présentent une réduction des niveaux d'angiogénèse et de croissance tumorale[337] et l'activité de MMP9 est requise pour l'initiation du processus d'angiogénèse des carcinomes pancréatiques[338]. Les MMP pourraient également moduler à la baisse le niveau d'angiogénèse tumorale: bien qu'une telle observation *in vivo* n'ait pas été rapportée à ce jour, il a été démontré *in vitro* que les MMP3, -7, -9 et -12 peuvent générer l'agent anti-angiogénique angiostatine à partir du plasminogène[301-304].

L'invasion tumorale est un processus multiséquentiel au cours duquel les cellules tumorales migrent à travers la matrice extracellulaire du stroma péritumoral après s'être détachées de la tumeur. Les capacités invasives des cellules tumorales sont souvent corrélées positivement avec la surexpression de membres de la famille des MMP; une telle corrélation a notamment été établie par les carcinomes épidermoïdes avec les MMP1, -2, -3, –9 et –14[339; 340] ainsi que dans le carcinome de l'œsophage avec les MMP7, -9 et –14[341]. De plus, l'invasion requiert des activités de migration cellulaire, lesquelles sont partiellement médiées par des MMP. Expérimentalement, les capacités invasives des cellules tumorales sont déterminées par le test d'invasion, qui consiste à

analyser la migration de cellules tumorales à travers une couche de protéines de la matrice extracellulaire puis un filtre poreux, sous l'effet d'un chimioattractant. La capacité d'invasion des cellules du fibrosarcome HT1080 par exemple, mesurée par le pourcentage de cellules parvenant à traverser le filtre poreux, est augmentée par l'ajout de MMP2 recombinante soluble et inhibée en présence de TIMP-2, qui inhibe MMP2 avec une grande affinité[342]. De la même façon, les cellules HT1080 transfectées avec l'ADNc de MMP14 présentent une plus grande capacité invasive que les cellules témoins (en l'occurrence, des HT1080 non-transfectées)[343].

Enfin, le rôle des MMP dans le processus de métastasie, c'est-à-dire la formation de tumeurs secondaires générées par la prolifération de cellules dérivant de la tumeur primaire qui se sont disséminées, a été démontré à l'aide du modèle expérimental de métastasie. Ce modèle consiste en l'injection de cellules tumorales par la voie sanguine et l'énumération subséquente des tumeurs secondaires apparaissant dans les organes cibles (la nature des organes cibles variant en fonction du type de cancer étudié). Ainsi, des cellules tumorales non-métastatiques (incapables de produire des tumeurs secondaires dans le modèle expérimental de métastasie) acquièrent des propriétés métastatiques après transfection d'ADNc codant pour des MMP[344; 345], alors que les capacités métastatiques d'autres cellules tumorales sont inhibées chez des souris transgéniques surexprimant TIMP-1[346; 347]. L'importance des MMP d'origine stromale au sein du processus métastatique a été démontrée par des études de métastasie expérimentale chez des animaux génétiquement modifiés. En effet, lorsque des lignées de cellules mélanomateuses ou de carcinome du poumon ont été injectées chez des souris déficientes en MMP2 ou MMP9, la dissémination s'est avérée moins efficace par comparaison avec l'injection de ces mêmes cellules chez des souris de souche sauvage[337; 348].

Les multiples contributions des MMP aux diverses étapes de la progression tumorale leur ont rapidement valu le titre de cibles thérapeutiques dans la lutte contre le cancer. Tout un secteur de l'industrie pharmaceutique s'est ainsi tourné vers le développement de nouveaux composés capables d'inhiber les MMP.

1.2.8 Inhibition thérapeutique des MMP

Différentes stratégies de ciblage thérapeutique des MMP ont été envisagées jusqu'à aujourd'hui, dont quelques unes ont déjà fait l'objet d'études pré-cliniques et cliniques. Ainsi, puisqu'une surexpression des MMP est associée à différents cancers, il semble pertinent d'en inhiber la production en ciblant, par exemple, les agents solubles qui les induisent. Cependant, tous les gènes des MMP ne sont pas modulés de la même façon par les différents agents solubles; de plus, ces agents solubles ne modulent pas seulement l'expression génique des MMP, mais exercent aussi un effet sur diverses classes de molécules, ce qui augmente les risques d'engendrer des effets secondaires importants. À cet égard, peu de composés inhibant l'expression de MMP ont fait l'objet d'études cliniques jusqu'à présent. La stratégie la plus populaire d'inhibition thérapeutique des MMP se situe plutôt au niveau post-transcriptionnel et consiste à bloquer leur site actif. Les premiers essais impliquaint l'utilisation des TIMP, présentent deux limitations majeures: ils constituent des inhibiteurs à large spectre des MMP et des ADAM, ce qui augmente les effects secondaires associés à leur utilisation; par ailleurs, les TIMP peuvent promouvoir la croissance tumorale, un effet contraire à celui escompté. L'industrie pharmaceutique s'est donc tournée vers la synthèse d'inhibiteurs synthétiques de MMP. Plusieurs sont des agents peptidomimétiques, c'est-à-dire qu'ils miment la structure du substrat de ces molécules, ce qui leur permet de bloquer le site actif des enzymes; certains d'entre eux comportent également une portion hydroxamate qui séquestre l'atome de zinc nécessaire à l'activité catalytique des MMP. Se situent dans cette catégorie les composés BB-94 (Batimastat^{TM}) et BB-2516 (Marimastat^{TM}) de British Biotech Pharmaceuticals. D'autres composés, tels que les tétracyclines[349] et les biphosphonates[350], lient spécifiquement la portion du site actif des MMP qui coordonne l'atome de zinc, inhibant ainsi toute activité catalytique en empêchant les MMP de coordonner un atome de zinc. Ces différents agents ont démontré leur efficacité à contrer la progression tumorale lors d'essais pré-cliniques dans les modèles murins de cancer, validant ainsi le concept d'inhibition thérapeutique des MMP. Dès 1988 par exemple, l'inhibiteur à large spectre SC-44463 a réussi à bloquer le processus de métastasie chez la souris[351]. Plus tard, le traitement de souris immuno-déficientes avec le Batimastat après l'ablation d'une

xénogreffe de carcinome mammaire a inhibé la réapparition locale de la tumeur et retardé l'apparition de métastases[352].

En études cliniques par contre, les inhibiteurs synthétiques des MMP n'ont pas produit les effets escomptés chez les patients cancéreux. Dès la phase I, des douleurs musculosquelettiques et inflammatoires ont été associées au traitement prolongé avec ces agents[353, 354]; au cours des phases II/III qui ont suivi, les inhibiteurs synthétiques des MMP ont démontré une efficacité faible ou nulle[102; 354]. Incidemment, il a été démontré à l'aide de modèles expérimentaux de lymphome et de carcinome mammaire que le traitement au Batimastat facilitait l'apparition de micrométastases au foie[355] et que l'expression de MMP9 était induite dans les cellules de fibrosarcome HT1080 après traitement avec des inhibiteurs synthétiques[356]. Bien que plusieurs études cliniques aient été définitivement interrompues, faute de pouvoir démontrer l'efficacité des composés testés, de récents rapports d'études cliniques avec un inhibiteur synthétique de MMP se sont malgré tout avérés encourageants. En effet, le Marimastat™ ralentit la progression du carcinome pancréatique[357] et la survie de patients atteints de carcinome gastrique au stade avancé a été prolongée par le traitement avec ce composé[358]; par ailleurs, l'utilisation du Marimastat™ en combinaison avec le temozolomide, une drogue chimiothérapeutique cytotoxique, a permis une amélioration significative des symptômes chez des patients atteints de glioblastome[359]. Ces résultats encourageants incitent à persévérer dans le développement d'inhibiteurs synthétiques de MMP pour la thérapie anti-cancéreuse; plusieurs recommandations ont déjà été faites qui doivent baliser les futurs travaux[354].

Peu d'études ont été consacrées à la régulation de l'expression et aux rôles des MMP dans les LNH. Néanmoins, les informations disponibles à ce jour, présentées dans la section 1.2.9, soulignent l'importance des MMP dans la progression des LNH et incitent à poursuivre la caractérisation de leur régulation et de leurs rôles afin d'établir une stratégie optimale de lutte contre ce groupe de cancers.

1.2.9 Les MMP dans les lymphomes non-Hodgkiniens

Certaines MMP sont plus fortement exprimées que d'autres dans les LNH. Dans une étude du patron de l'expression des MMP dans les lymphomes malins humains, par exemple, il a été démontré à l'aide des techniques d'hybridation *in situ* et d'immunobuvardage de type Northern que MMP9 est exprimée dans la majorité des LNH. Selon cette étude, MMP9 est produite en plus grande quantité dans les tumeurs des patients au stade avancé plutôt qu'au stade précoce, à la fois par les cellules stromales (principalement les macrophages) et les cellules tumorales[360]. De plus, alors que les MMP1, -2 et -7 ne sont détectables que dans quelques cas, les MMP3 et -10 ne sont exprimées par aucune des tumeurs testées[360]. Une autre étude par la même équipe, visant à mesurer MMP9 et MMP11 par immunobuvardage de type Northern, a démontré que MMP9 était surexprimée dans les LNH, alors que MMP11 y était indétectable[361]. Par ailleurs, il a été démontré que les lignées lymphomateuses humaines SB (lymphocytes B transformés) de même que CEM et Jurkat (lymphocytes T transformés) sécrètent MMP2 et MMP9 constitutivement dans le milieu de culture[362]; enfin, les niveaux de MMP9 dans le foie dans un modèle murin de lymphome T sont positivement corrélés avec la progression de la métastasie au foie[363]. Toutes ces données suggèrent un rôle important de MMP9 dans les LNH; MMP9 est d'ailleurs considérée aujourd'hui comme un marqueur de la progression des LNH[364]. Il est cependant à noter que TIMP-1 est également surexprimé dans la majorité des LNH et que les niveaux d'expression de l'inhibiteur sont en relation directe avec l'agressivité des tumeurs[360; 361]. Il est donc possible que TIMP-1 favorise ici la croissance tumorale, tel que décrit à la section 1.2.5.3. Il est aussi possible que de hauts niveaux de TIMP-1 empêchent l'activation de proMMP9 ou l'activité de MMP9, ce qui minimiserait alors l'importance de la surexpression de MMP9 dans les LNH. Des tests d'activité protéolytique sont donc requis pour déterminer le niveau d'activité nette de MMP9 dans les LNH. La seule étude en ce sens démontre, à l'aide de tests d'invasion sur Matrigel, que les MMP constituent la principale classe de protéases impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire par les LNH[365].

À l'instar d'autres types de cancer mieux caractérisés, les MMP semblent faire l'objet d'une régulation transcriptionnelle complexe dans les LNH, autant par des facteurs

solubles tels que des cytokines que par les interactions cellule-cellule. Ainsi, IL-6 augmente les niveaux d'expression de MMP2 et MMP9 dans des lignées de lymphome d'origine B et T (Raji, Jurkat et NC-37). De plus, une corrélation positive entre les niveaux d'IL-6 et de MMP2 et MMP9 a été observée dans différentes tumeurs de LNH; cette modulation de l'expression des MMP est spécifique à l'IL-6, puisque d'autres cytokines telles que IL-1β, TNFα et TGFβ n'ont pas produit d'effet[366]. L'importance des cytokines dans la régulation de l'expression des MMP dans les LNH a été confirmée par une autre étude, qui rapporte que l'IL-6 de même que l'IL-13 augmentent le niveau d'expression de MMP9 dans la lignée de lymphome B Raji[367]. Cependant, les contacts directs cellule-cellule modulent également l'expression des MMP dans les LNH; ainsi, l'expression de MMP9 est induite dans des lignées de lymphome T murines lors de leur contact direct avec une lignée de cellules endothéliales[122]. Dans ce cas, l'intégrine LFA-1 est essentielle à l'induction de l'expression de MMP9 dans les cellules lymphomateuses lorsqu'elle lie son ligand ICAM-1 exprimé à la surface des cellules endothéliales.

Bien que les données disponibles à ce jour suggèrent déjà un rôle important des MMP dans la progression des LNH, il faut garder à l'esprit que la plupart des travaux sur la régulation de l'expression des MMP dans les LNH portent principalement sur les gélatinases; des données cruciales concernant la régulation d'autres MMP devront être rassemblées avant d'établir et de valider une stratégie thérapeutique d'inhibition des MMP dans la lutte contre les LNH. La section 1.2.10 décrit comment l'étude de la régulation et du rôle des stromélysines MMP3 et MMP10 se place au premier rang pour l'atteinte de cet objectif.

1.2.10 Les stromélysines et le cancer

Les stromélysines MMP3 (stromélysine-1) et MMP10 (stromélysine-2) sont exprimées par divers types cellulaires, dans des contextes physiologiques et pathologiques. MMP3 est notamment exprimée par les fibroblastes[72] et les lymphocytes B périphériques[368]; l'expression de MMP10 par les kératinocytes a été caractérisée en détail, particulièrement dans le cadre du processus de réparation des blessures[369; 370]. Bien que l'expression des deux stromélysines soit largement associée aux épithéliums, elles sont rarement produites

par les tumeurs d'origine épithéliale. En effet, l'ARNm de MMP3 n'est pas détecté dans les carcinomes épidemoïdes de la tête et du cou[371], du pancréas[372], du côlon[373], de l'estomac[373] ou de la prostate[374], alors que l'ARNm de MMP10 n'a pas été détecté dans les carcinomes gastriques et du côlon[373] et de la peau[375]. Dans les tumeurs où des stromélysines sont détectables, elles sont le plus souvent produites par les cellules stromales; MMP3 par exemple est exprimée par les fibroblasts stromaux dans 50% des spécimens analysés de carcinome du côlon[376], alors que MMP10 est produite par des fibroblastes stromaux dans 60% des spécimens analysés de carcinome épidermoïde de la tête et du cou[377]. Dans certains cas toutefois, les cellules tumorales produisent elles-mêmes des stromélysines: en effet, les cellules de carcinome de la tête et du cou[378] et de la peau[379], de même que différentes lignées de mésothéliome par exemple[380], expriment MMP10. De la même façon, les cellules de carcinomes mammaires[381], ainsi que diverses lignées de mésothéliome[380], produisent MMP3.

Le niveau d'expression de MMP3 et MMP10 est parfois associé avec un plus grand potentiel tumorigénique des cellules cancéreuses qui les produisent. Ainsi, MMP3 est davantage exprimée dans les tumeurs malignes (carcinomes) de la peau que dans les tumeurs bénignes ou les lésions pré-cancéreuses[382]; par ailleurs, MMP3 et MMP10 sont exprimées plus fortement par des lignées cellulaires d'embryons de rat de potentiel métastatique élevé que par les cellules à faible potentiel métastatique, qui en produisent peu ou pas du tout[383]. Dans le même ordre d'idées, le niveau d'expression de MMP10 dans des carcinomes épidermoïdes de l'œsophage est corrélé positivement avec la taille des tumeurs de même qu'avec la présence de métastases chez les patients[384]; pour les carcinomes de la peau cependant, aucune corrélation n'a pu être établie entre le niveau d'expression de MMP10 et les propriétés invasives des tumeurs[379].

MMP3 et MMP10 présentent une grande similitude de structure, leur séquence en acides aminés étant identique à 82%[385]. Les deux MMP présentent par ailleurs une redondance au niveau de leur activité catalytique, toutes deux pouvant notamment cliver les collagènes de type I, III, IV et IX de même que les MMP1, -7, -8 et -9, (**Tableau 5**). MMP3 et MMP10 font néanmoins l'objet d'une régulation transcriptionnelle

différentielle. Ainsi, les deux stromélysines sont souvent exprimées par des populations cellulaires distinctes, à l'état basal ou activé. À titre d'exemple, ce ne sont pas les mêmes types de kératinocytes qui expriment MMP3 et MMP10[370] et seule MMP3 est exprimée constitutivement par les fibroblastes[72]; par ailleurs, le PMA induit l'expression de MMP10 seulement dans les lymphocytes T périphériques[386], alors que HGF induit l'expression de MMP3 uniquement dans les cellules du carcinome hépatique[387]. MMP3 et MMP10 font donc l'objet, de façon individuelle, d'une régulation transcriptionnelle complexe au sein des tumeurs, par des agents solubles, tel que décrit plus haut, mais également par des interactions cellule-cellule ou cellule-matrice. L'expression de MMP3 par les cellules de carcinome mammaire, par exemple, est induite par l'engagement, au contact de protéines de la matrice extracellulaire, des sous-unités $\alpha 1$ et $\alpha 2$ des intégrines qu'elles expriment à leur surface[388]; par ailleurs, le niveau d'expression de MMP3 dans les fibroblastes augmente à la suite d'un contact direct avec des lignées de cellules de carcinomes mammaires[389].

Parmi les différents substrats, matriciels et non-matriciels, de MMP3 et de MMP10 on compte plusieurs molécules susceptibles d'influencer, positivement ou négativement, la progression tumorale. Des tests fonctionnels ont par ailleurs déjà permis de caractériser certains rôles associés aux deux stromélysines au sein du processus tumoral. MMP3 par exemple peut favoriser la transformation des cellules épithéliales mammaires[324; 325; 390]. De plus, les stromélysines peuvent favoriser la prolifération des cellules tumorales en augmentant la biodisponibilité de facteurs de croissance. MMP3 peut ainsi dégrader IGFBP et libérer IGF qui y était complexé[327; 391], de même que cliver HB-EGF de son site d'ancrage à la surface cellulaire[328]. Par ailleurs, les stromélysines peuvent moduler la réponse immunitaire anti-tumorale. Ainsi, MMP3 peut freiner le processus inflammatoire en dégradant l'IL-1β[309], et réduire l'infiltration par des cellules immunitaires dans la tumeur en dégradant la chimiokine SDF-1 (stromal cell-derived factor-1)[318] ou en clivant les MCP (monocyte chemoattractant proteins) de façon à générer un antagoniste de leur récepteur[321].

MMP3 peut également moduler le processus d'angiogénèse tumoral, de manière positive ou négative selon la nature des substrats clivés. Ainsi, MMP3 peut freiner l'angiogénèse en produisant la molécule anti-angiogénique angiostatine par clivage du plasminogène[303; 304]; à l'opposé, MMP3 peut dégrader le perlecan auquel était complexé bFGF et ainsi augmenter la biodisponibilité de la molécule pro-angiogénique bFGF[298]. MMP3 ainsi que MMP10 influencent indirectement le processus d'angiogénèse, en clivant et en activant proMMP9(392; 393). En effet, MMP9 peut générer de l'angiostatine par clivage du plasminogène(303); MMP9 peut aussi cliver et relarguer la molécule pro-angiogénique VEGF(338).

L'expression de MMP3 et MMP10 par divers types de cellules tumorales est généralement associée à l'acquisition de propriétés invasives, notamment dans le cas du carcinome épidermoïde de la peau(394) et de l'astrocytome(395). Le clivage de certaines molécules d'adhésion par les stromélysines peut en effet limiter les événements d'adhésion cellule-cellule ou cellule-matrice et ainsi favoriser la migration cellulaire et l'invasion tumorale. MMP3 par exemple peut cliver E-cadhérine et la relarguer de la surface cellulaire, inhibant l'aggrégation intercellulaire médiée par E-cadhérine et facilitant l'invasion cellulaire à travers le collagène de type I[396]; de la même façon, en clivant la portion N-terminale de la chaîne $\gamma 2$ de la composante matricielle laminine-5, MMP3 favorise la migration des cellules de carcinome mammaire à travers la matrice extracellulaire[397]. Dans certains cas toutefois, l'expression de stromélysines par les cellules tumorales pourrait nuire à l'invasion tumorale: en effet, il a été rapporté que MMP3 pouvait inhiber l'invasion du Matrigel par des cellules de carcinome mammaire, via un mécanisme impliquant la dégradation du plasminogène(398).

En somme, l'expression dans les tumeurs des stromélysines MMP3 et MMP10, par les cellules tumorales elles-mêmes et par les cellules stromales, n'est induite que dans des conditions d'activation cellulaire particulières. Il est donc possible que l'expression de MMP3 et MMP10 varie en fonction du type tumoral analysé (primaire ou secondaire, localisation), ou du stade d'évolution de la maladie, puisque les propriétés des cellules tumorales de même que leurs interactions avec le stroma évoluent au cours de la

progression tumorale. La seule analyse de l'expression des stromélysines dans des spécimens de LNH publiée à ce jour révélait l'absence de niveaux détectables des ARNm de MMP3 et MMP10[360]; il faudrait cependant caractériser la régulation de l'expression de ces MMP dans les LNH afin de déterminer si l'absence d'expression des stromélysines observée au sein de ces tumeurs est reliée au stade d'évolution de la maladie et/ou à la nature du tissu atteint. Il faudrait également caractériser les rôles de MMP3 et MMP10 dans la progression des LNH.

Les travaux de recherche dont fait état la présente thèse visaient à caractériser la régulation de l'expression de MMP3 et MMP10 dans des LNH, de même que leur rôle au sein du processus de croissance tumorale des LNH. Des cocultures de lignées de cellules lymphomateuses avec des lignées de cellules stromales ont permis d'observer que l'expression de MMP3 et MMP10 est induite chez les cellules lymphomateuses de type T murines après contact spécifique avec des cellules endothéliales; l'expression de MMP10 est également inductible chez des cellules lymphomateuses de type T et B humaines après contact avec des cellules endothéliales. Outre cette régulation de l'expression par contact intercellulaire, l'expression de MMP10 est induite chez des lignées de cellules lymphomateuses humaines de type B par certaines cytokines, qui sont reconnues pour leur contribution à la pathophysiologie des LNH. Ensuite, des tests biologiques effectués à l'aide d'un modèle murin de LNH ont permis d'observer qu'à l'image de MMP9, la surexpression de l'une ou l'autre des deux stromélysines par les cellules lymphomateuses accélère la croissance du lymphome dans le thymus. Cependant, la surexpression de MMP10, de même que celle de MMP9, ralentissent plutôt la croissance des tumeurs lymphomateuses lorsque les cellules sont injectées dans la région sous-cutanée. Une telle dualité dans le rôle de MMP10 et MMP9 lorsque produites par des cellules lymphomateuses renforce le concept que bien que les propriétés intrinsèques des cellules tumorales influencent l'évolution du cancer, l'environnement qu'elles colonisent ainsi que la nature des relations qu'elles établissent avec lui ont également un impact sur la progression tumorale.

CHAPITRE 2

Stromelysin-1 (MMP3) is inducible in T lymphoma cells and accelerates the growth of lymphoid tumors in vivo

Van Themsche C, Potworowski EF and St-Pierre Y

Biochemical and Biophysical Research Communications 2004 **315**(4): 884-891

Contribution des auteurs

J'ai réalisé toutes les expériences décrites dans cet article, de même que celles ajoutées en annexe. J'ai également rédigé le manuscrit dans son entier, avant de le soumettre au Dr Édouard F. Potworowski (co-directeur de thèse) ainsi qu'au Dr Yves St-Pierre, qui ont lu et corrigé le manuscrit avant soumission au journal.

Résumé

MMP3 (stromélysine-1) peut non seulement cliver différentes composantes de la matrice extracellulaire mais également, différentes biomolécules non-matricielles. Par son activité protéolytique, MMP3 peut notamment activer d'autres protéases ayant une fonction pro-tumorale, incluant MMP9; l'expression de MMP3 dans le microenvironnement tumoral pourrait donc favoriser la progression du cancer. Il a déjà été démontré que des contacts intercellulaires pouvaient réguler la transcription des gènes codant pour les MMP, en faveur de l'augmentation de leur niveau d'expression par les cellules cancéreuses et/ou stromales. Dans le présent article, nous démontrons que l'expression de MMP3, qui est habituellement associée aux cellules stromales péritumorales, peut également être induite dans les cellules T lymphomateuses, de façon transitoire et via un contact intercellulaire direct et spécifique avec des cellules endothéliales. Nos résultats démontrent donc que l'expression de MMP3 au sein des tumeurs lymphomateuses est soumise à une fine régulation transcriptionnelle et suggèrent que MMP3 puisse moduler localement la progression du lymphome. Lors de tests subséquents de caractérisation de l'effet de l'expression de MMP3 par les cellules lymphomateuses sur la progression du lymphome, nous avons observé à l'aide de transfectants stables de cellules lymphomateuses surexprimant MMP3 que l'activité de cette enzyme augmentait la capacité de migration des cellules lymphomateuses à travers la matrice extracellulaire *in vitro*, suggérant que l'expression de MMP3 par ces dernières puisse en effet favoriser la progression du lymphome. De plus, dans notre modèle murin de lymphome thymique, les souris ayant reçu une injection intrathymique de cellules lymphomateuses surexprimant MMP3 ont développé une tumeur intrathymique plus rapidement que les souris ayant reçu une injection de cellules lymphomateuses témoin, ce qui indique que MMP3 accélère la croissance du lymphome thymique *in vivo*. Ces résultats constituent la première indication que l'expression locale de MMP3 facilite la progression du lymphome *in vivo*.

Introduction

Non-Hodgkin's lymphomas, and several other cancers, are associated with severe metastatic disease that results in high mortality rates. The metastatic properties of tumor cells are acquired through the regulation of the expression of various molecules, including some involved in angiogenesis as well as in cellular migration and invasion. Matrix metalloproteinases (MMPs) constitute one of these families of regulated molecules that plays a central role in all these events [1-4]. In this regard, a direct link between the level of MMP9 (Gelatinase B) produced by lymphoma cells and their metastatic potential has been established [5-7]. MMP3 has already been associated with metastatic potential of different types of cancer cells: MMP3 transcript is more abundant in malignant than benign skin squamous cell carcinomas [8]; there is a correlation between MMP3 expression and high metastatic potential of transformed rat embryo cell lines [9]; in endometrial sarcoma, staining for MMP3 is more pronounced in high grade than in low grade tumors [10]. The exact role of MMP3 in lymphoma development remains, however, unknown. A better understanding of the regulatory mechanisms controlling its expression and of its effect on tumor growth is thus crucial for the development of new avenues for therapeutic intervention.

The expression of MMPs is regulated at four different levels: gene transcription, secretion, activation upon proteolytic cleavage of their catalytic site-blocking amino-terminal prodomain and inhibition by the specific tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMPs) [11]. Among these four, a pivotal level of regulation consists of gene transcription. Even though both human [12] and murine [13] MMP3 cDNAs have been cloned and characterized, the regulation of MMP3 expression in lymphoma cells remains largely unknown. Transcriptional regulation of MMP gene expression has been shown to occur upon cell-to-cell contact, notably via integrin-mediated signal transduction [14] or membrane-bound ligand-receptor activation [15]. In the case of lymphoma, it was shown that contact between lymphoma cells and endothelial cells (EC) generates a reciprocal induction of MMP9 in both cell types [16]. However, to our

knowledge, MMP3 transcriptional regulation upon cell-to-cell contact in lymphoma has not yet been demonstrated.

In the present work, we report that MMP3 gene and protein expression is inducible in lymphoma cells upon specific contact with endothelial cells. Furthermore, injection of lymphoma cells overexpressing MMP3 into syngeneic mice accelerates the development of thymic lymphoma when compared with the control transfectants. Moreover, MMP3 overexpression increased ability of lymphoma cells to degrade the extracellular matrix. These results underline a tight control of local MMP3 expression upon lymphoma cell-stromal cell interaction and highlight the functional importance of MMP3 in promoting lymphoma growth.

Materials and methods

Mice. Male and female C57BL/6 mice were bred in our animal facility and maintained under specific pathogen-free conditions and in accordance with institutional guidelines. Breeder pairs for C57BL/6 mouse colony were purchased from Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA).

Cell lines and reagents. The origin of the 267 and 164T2 lymphoma cell lines has been described [16]. As a model to study lymphoma-EC interaction, we used the endothelioma cell line bEnd.3 (American Type Culture Collection, Manassas, VA). In addition to expressing the von Willebrand factor, these cells express the same repertoire of cell adhesion molecules than that found on normal EC, including ICAM-1, VCAM-1, E-and P-selectins, CD31, and ICAM-2; they upregulate their expression after stimulation with inflammatory cytokines such as IL-1 and TNFα, with kinetics similar to those reported for primary ECs. Endothelioma cell lines have been extensively used by many investigators as an *in vitro* model to study the ability of leukocytes to interact with vascular endothelium [16-19]. The Hi-7 fibroblastic cells were kindly provided by Dr. Claude Daniel (INRS-Institut Armand-Frappier). 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 μg/ml streptomycin and 55 μM β-mercaptoethanol). All products were from GIBCO Life Technologies (Burlington, ON, Canada). Polyclonal antibody directed against murine MMP3 (sc-6839) was obtained from Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA). Horseradish peroxydase-conjugated rabbit anti-goat IgG secondary antibody (67 411) was purchased from ICN (Irvine, CA).

T lymphoma-EC interactions. bEnd.3 or Hi-7 cells were seeded at a density of 0.8 x 10^5 and 10^6 cells per well (Corning 12-well plate) respectively and were incubated in 2 ml of complete medium at 37°C in a 5 % CO_2 atmosphere until they reached approximately 80% confluence. Aliquots of 10^6 164T2 or 267 cells resuspended in 2 ml of complete RPMI medium were then added to the layer of bEnd.3 or Hi-7 cells, and the cocultures incubated at the indicated time at 37°C. Lymphoma cells were separated from adherent

cells using a warm solution of 0.004% trypsin-0.002% EDTA for 3 min. Adherent bEnd.3 or Hi-7 cells were subsequently collected using a 0.05% trypsin-0.025% EDTA solution. Cell suspension were immediately centrifuged and processed for RNA and protein analyses.

RNA isolation and analysis. Total RNA was isolated using RNeasy kit (Qiagen, Burlington, ON) according to the manufacturer's instructions. First strand cDNA was synthesized from 2-3 μg of total cellular RNA using the Superscript II (GIBCO Life Technologies). For RNA analysis by polymerase chain reaction (PCR) amplification, oligonucleotide primers were designed according to DNA sequences for mouse stromelysin-1 (MMP3) and MT4-MMP (MMP17) obtained from Genbank (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD) and chosen to have approximately a 50% GC content. Sense and antisense primers for mouse MMP3 were 5'-ATTGCATGACAGTGCAAGGG-3' and 5'-TGGAGGACTTGTAGACTGGG-3', respectively. The MT4-MMP-specific primers were 5'-CTGTCCAAAGCGATTACTGC-3' (sense) and 5'-AGTGCTAGACCGATTGTTGG-3' (antisense). Amplification of β-actin cDNA was used as an RNA loading control. The β-actin-specific primers were 5'-CATGGATGACGATATCGCTGCGC-3' (sense) and 5'-GCTGTCGCCACGCTCGGTCAGGATC-3' (anti-sense). Amplification of MMP3, MT4-MMP, and β-actin was performed in a MJ Research Thermal cycler (model PTC-100TM) using the following parameters: 1 min at 94°C, 1 min at 60°C and 1 min at 72°C for 35 cycles, except for β-actin which required only 25 cycles. The amplification for each gene was in the linear part of the curve. The reaction mixture was size-separated on an agarose gel, and specifically amplified products were detected by ethidium bromide staining and ultraviolet transillumination. Quantitative analysis was carried out using a computerized densitometric imager (BioRad, model GS-670, Mississauga, ON). The specificity of the PCR reactions was confirmed by DNA sequencing of the amplicons.

Western blot analysis. Cells were washed with PBS and homogenized over ice in lysis

buffer (10 mM Tris pH 7.5, 2.5% Triton X-100) supplemented with a cocktail of protease inhibitors (Complete, Roche, Laval, QC). Equal amounts of cell lysates (as determined by Bio-Rad protein assay) were separated onto a 7.5% SDS-PAGE gel and then transferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad Laboratories). The membranes were blocked with 10% milk in PBS/0.05% Tween-20 overnight at 4°C and then probed for 2 hours at room temperature with primary antibody (Santa Cruz cat. number sc-6839), a polyclonal goat anti-murine MMP3 diluted 1:100 in PBS/0.05% Tween-20/5% BSA. After several washes in PBS/0.05% Tween-20, membranes were probed with secondary antibody (ICN cat. number 67411), a horseradish peroxidase-coupled rabbit anti-goat IgG diluted 1:10 000 in PBS/0.05% Tween-20/10% milk for 45 min at room temperature, followed by several washes in PBS/0.05% Tween-20. Detection was performed using the enhanced chemiluminescence method (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC).

Generation of stable transfectants expressing MMP3. The 1740 bp cDNA encoding the proform of murine MMP3 protein was amplified from 267 lymphoma cells that were previously induced to express MMP3 upon coculture with bEnd.3 endothelioma cells, using the following primers: 5'-CCGGAATTCCGGATGAAAATGAAGGGTCTTCC-3' (sense) and 5'-CGCGGATCCGCGTTAACAATTAAACCAGCT-3' (antisense). These primers were designed to create EcoRI and BamH1 sites at 5' and 3' ends of the cDNA, respectively. MMP3 cDNA was then inserted into the Srα eukaryotic expression vector containing the puromycin selection marker (kindly provided by Dr. François Denis, INRS-Institut Armand-Frappier), at the EcoRI-BamHI cloning site. Selected colonies were digested with EcoRI-BamHI to sequence and verify the construct. To generate stable transfectants of lymphoma cells expressing MMP3 constitutively, 267 T lymphoma cells were transfected by electroporation (Gene Pulser, Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON) using the following parameters: 40 μg of DNA per $1x10^7$ cells in PBS on ice; 960 μF; 250 mV. Control cells consisted in 267 lymphoma cells transfected with SRα empty vector alone. After 24 hours of culture in complete medium, transfected cells were allowed to grow in complete medium containing 5 μg/ml of puromycin (Sigma) before individual colonies were selected and expanded. MMP3 expression was assessed

by RT-PCR and Western blot analyses. RT-PCR analysis also revealed that transfection of 267 lymphoma cells with MMP3 did not alter other MMPs expression by these cells.

Gelatin zymography. Aliquots of 200 µl of conditioned serum-free media from cocultured cells (bEnd.3 + 164T2) or monocultures (bEnd.3 or 164T2 alone) grown for 24 hr were collected and assessed by zymography for the presence of extracellular MMP9 enzymes. Samples were applied without heating or reduction to 7.5% polyacrylamide gel containing 1 mg/ml gelatin (Sigma). After electrophoresis, the gels were washed twice for 60 min with 2.5% Triton X-100 and incubated for 16 hr in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) containing 5 mM $CaCl_2$, 1% Triton X-100, and 0.02% NaN_3 at 37°C. After incubation, the gel was stained with 0.25% Coomassie Blue R-250 and destained with 10% methanol and 10% acetic acid. Proteolytic bands appeared clear on blue-stained background.

Casein zymography. Aliquots of 200 µl of conditioned serum-free media from subconfluent transfectants grown for 24 hr were collected and assessed by zymography for the presence of extracellular MMP3 enzymes. Samples were applied without heating or reduction to 7.5% polyacrylamide gel containing 1 mg/ml β-casein (Sigma). After electrophoresis, the gels were washed twice for 60 min with 2.5% Triton X-100, then with brief water washes, and incubated for 40 hr in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) containing 5 mM $CaCl_2$, 1 µM $ZnCl_2$, and 0.02% NaN_3 at 37°C. After incubation, the gel was stained with 0.25% Coomassie Blue R-250 and destained with 10% methanol and 10% acetic acid. Proteolytic bands appeared clear on blue-stained background.

Induction of primary thymic lymphoma. Five to six-week-old C57BL/6 mice (5-10 mice per group) were injected intrathymically (i.t.) in each lobe with 5 X 10^3 MMP3-expressing or control 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. At this stage, tumors derived from varying clones and control lymphoma cells showed similar size and weight.

All the animal research was reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at the INRS-Institut Armand-Frappier in accordance with institutional and Canadian guidelines for animal experiments.

Invasion assay. The invasive properties of MMP3-expressing lymphoma cell clones were measured by the invasion of cells through Matrigel-coated Transwell inserts (Costar, Corning, Cambridge, MA). Briefly, Transwell inserts with an 8-μm pore-size were coated with a 2 mg/ml Matrigel and lymphoma cells (2 x 10^6 cells) added to the upper chamber inserts in chamber plates filled with prewarmed complete medium containing supernatant (1:1) from mitogenic-activated (Con A) T cell cultures as a source of T cell chemoattractants (29). Plates were incubated for 24 hours in a CO_2 incubator. Percentage of cell invasion was calculated from the ratio of cells recovered from the lower compartment to the total number of cells loaded in the upper compartment. In some experiments, lymphoma cells were resuspended in RPMI containing 5 mM 1,10-phenanthroline (PHEN) and incubated at 37°C for 30 min before their addition to the Transwell plates. At least two independent experiments were performed in duplicates for each lymphoma cell clone.

Statistical analysis. Statistical significance was measured using a log rank test and the level of significance was established at $p < 0.05$.

Results

MMP3 is induced in lymphoma cells upon contact with endothelial cells

To study MMP3 gene expression in lymphoma cells upon contact with EC, we performed *in vitro* adhesion assays of lymphoma cell lines (267 and 164T2) to an endothelioma cell line (bEnd.3) and examined by RT-PCR the levels of MMP3 transcripts. Lymphoma cells, which firmly adhered to bEnd.3, were detached at the indicated time after initiation of the culture using a low concentration of trypsin-EDTA, as previously described [16]. This procedure allowed removal of more than 95% of lymphoma cells while less than 1% of bEnd.3 were detached by this procedure, leaving intact the bEnd.3 monolayer, as assessed by flow cytometric analysis (*data not shown*)(**Annexe 1**). Our results showed that contact with bEnd.3 induced time-dependent *de novo* expression of MMP3 mRNA in both 267 and 164T2 lymphoma cells (**Fig. 1**). The induction was transient, as it reached a maximum of expression at 12 h post-contact, and then decreased but remained detectable 24h after contact. MMP3 induction required direct contact between lymphoma and bEnd.3 cells, since coculture in transwells, where the two cell types are separated by a porous filter that only allows exchange of small soluble molecules, did not result in the induction of MMP3 in lymphoma cells (data not shown)(**Annexe 2**). In contrast to MMP3, the expression of MT4-MMP was not modulated upon interaction of lymphoma cells with bEnd.3 (**Fig. 1**). Western blot analysis was performed to confirm the induction of MMP3 protein in lymphoma cells upon contact with bEnd.3. Cell lysates from isolated lymphoma cells that had been cocultivated with endothelial cells for 12h were indeed shown to contain MMP3 protein (**Fig. 1C**). It is important to note that since MMP3 is expressed by bEnd.3, lysates were collected from lymphoma cells after they had first been in contact with bEnd.3, then purified and subsequently cultured for 12 h before analysis. This procedure ruled out the possibility that the MMP3 protein detected by Western blot could originate from endothelial cells. Moreover, the levels of MMP3 detected in post-coculture lymphoma cells is higher than that of bEnd.3, further establishing that there is an induction of MMP3 protein in lymphoma cells after contact with endothelial cells.

MMP3 is not induced in lymphoma cells upon contact with fibroblastic cells

In local tumoral microenvironment, lymphoma cells are susceptible to interact not only with endothelial cells, but also with other types of stromal cells such as fibroblasts. We thus determined whether fibroblastic cells could induce MMP3 gene expression in lymphoma cells upon coculture. We found that, similar to bEnd.3 endothelial cells, fibroblasts themselves express MMP3 transcripts constitutively, even though to a low level, as was previously reported by others [20,21]; however, unlike endothelial cells, they are unable to induce MMP3 gene expression by lymphoma cells (**Fig. 2**).

MMP3 is not modulated in stromal cells upon contact with lymphoma cells

It has been shown using a similar model of lymphoma-endothelium interaction that regulation upon cell-to-cell contact of an MMP-encoding gene, namely MMP9, can be bi-directional, resulting in MMP9 induction in both cell types [16]. Similarly, others had shown that levels of MMP3 are upregulated in fibroblasts after coculture with human breast adenocarcinoma MCF-7 cells [22], indicating that tumor cells can induce fibroblastic cells to express MMPs. We thus examined if contact between lymphoma cells and stromal cells resulted in an upregulation of MMP3 in stromal cells as well. We found that the constitutive levels of MMP3 mRNA in bEnd.3 endothelial cells and Hi-7 fibroblastic cells were left unchanged after increasing periods of contact with 267 lymphoma cells (**Fig. 3a and b**) or with 164T2 lymphoma cells (data not shown)(**Annexe 3**). The fact that MMP9 was induced in bEnd.3 upon adhesion with 164T2 proved that the absence of modulation of MMP3 gene expression in stromal cells was not due to the inability of lymphoma cells to deliver functional signals upon intercellular contact (**Fig. 3c**) [16].

MMP3 accelerates lymphoma growth in vivo

To study the effect of MMP3 expression on tumor development, 267 lymphoma cells were transfected with the pSRα expression vector encoding the murine MMP3 cDNA, and puromycin-selected cell clones were isolated. These clones were characterized for MMP3 expression at the mRNA and protein levels by RT-PCR and zymograpgy respectively (**Fig. 4a and 4b**). MMP3 mRNA and enzymatic activity was only detected

in lymphoma cells transfected with the MMP3 cDNA (clones B2 and B9) but not in cells transfected with the control vectors (empty vector; clones 6D and 24). The levels of MMP3 secreted by stable transfectants (clones B2 and B9) were similar to those secreted by lymphoma cells after contact with endothelial cells (**Fig. 4c**). To test the effect of MMP3 overexpression in thymic lymphoma, we compared the capacity of control 267 cells (Srα clones) and of 267 cells transfected with the MMP3 cDNA-encoding vector to modulate tumor growth *in vivo* following intrathymic injection in young C57BL/6 syngeneic mice. As thymic tumors cannot be measured externally, effects of MMP3 overexpression by injected lymphoma cell clones on tumor growth could be assessed upon sacrifice of moribund mice: different tumor growth rates are associated with different survival times. Mean survival time (MST) was thus determined for two clones of each group. Our results showed that expression of MMP3 significantly ($p = 0.0058$) accelerated the development of thymic lymphoma in vivo as MST values were significantly reduced when MMP3-expressing cells were injected as compared to control cells (23 ± 3 days vs 41 ± 4 days, respectively) (Fig. 5).

MMP3 confers invasive behavior to lymphoma cells

Owing to their catalytic activity over matrix proteins, MMPs have been associated with increased invasive behavior of tumor cells. Thus, we next investigated the influence of MMP3 expression on the invasive ability of lymphoma cells by an *in vitro* invasion assay using a filter coated with Matrigel as a model of the basement membrane. Cells that invaded the lower compartment of chamber through the filter were counted after a 24-h incubation. We found that the number of invasive cells expressing MMP3 was significantly higher than that in cells without MMP3 **(Fig. 6)**. Moreover, the ability of PHEN to inhibit this effect confirmed that this behavior was MMP-dependent.

Discussion

Most of our knowledge on the role of MMP3 in tumor development comes from studies during mammary gland development. Sternlicht and collaborators [23] have shown, for instance, that MMP3 is expressed in stromal cells throughout mammary development and promotes spontaneous premalignant changes and malignant conversion in mammary glands of transgenic mice. After malignant conversion is completed however, there is accumulating evidence that transcriptional regulation of MMP gene expression occurs upon interaction between malignant cells and peritumoral cells. The recent demonstration that MMP9 is transcriptionally regulated upon lymphoma/endothelial cells contact in both cell types supports this hypothesis [16]. In the present work, we have shown that interaction between T lymphoma cells and stromal cells results in a precise pattern of MMP3 expression. Indeed, MMP3 expression is transiently induced in T lymphoma cells that have been directly in contact with bEnd.3 endothelioma cell line, whereas no such induction occurs when lymphoma cells interact with Hi-7 fibroblastic cells. Moreover, constitutive levels of MMP3 in bEnd.3 endothelioma cell line and in Hi-7 fibroblastic cells were not modulated upon interaction with lymphoma cells, although induction of the MMP9 pro-form in bEnd.3 endothelioma cell line after coculture with lymphoma cells was observed. This indicates that the absence of modulation of MMP3 gene expression in stromal cells was not due to the inability of lymphoma cells to deliver functional signals upon intercellular contact. This observation highlights the tightly regulated control of expression of MMP3 upon lymphoma cells/stromal cells interaction. It is noteowrthy that although our co-culture experiment was performed over a 24-hour period, we did not detect by gelatin zymography the active form of MMP9 in EC supernatant, suggesting that either MMP9-activating proteases were not secreted in sufficient quantity, or converted into their catalytically active form.

Even though we could observe induction of MMP3 expression in lymphoma upon coculture with endothelial cells, we could not detect such an induction in coculture systems using transwells, where lymphoma cells were physically separated from EC by a porous filter that only allowed selective exchange of small molecules, indicating that cell-cell contact was necessary (*data not shown*)(**Annexe 2**). Since MMP9, in similar

experimental conditions, is induced in lymphoma cells upon direct contact with endothelial via LFA-1/ICAM-1 signalling [16], we have tested whether MMP3 was also regulated by ICAM-1-mediated signalling. We found that blocking antibodies to lymphocyte function-associated LFA-1 or to ICAM-1 failed to inhibit induction of MMP3 in lymphoma cell lines after contact with EC (*data not shown*)(**Annexe 4**). Although membrane-bound chemokines/growth factors are prime candidates as signals that can be involved in the induction of MMP3 in lymphoma cells, further studies using gene profiling experiments on EC and blocking antibodies will help to determine the repertoire of factors expressed by these cells and the signal(s) involved.

We also showed that MMP3 accelerates lymphoma growth rate *in vivo*. The mechanisms by which MMP3 accelerates lymphoma growth in our model remain unknown and we are currently investigating several hypotheses. The more plausible hypothesis is that MMP3 would contribute to tumor angiogenesis. Indeed, considering the capacity of MMP3 to activate the zymogen forms of MMP1 and of MMP9 [24-28] as well as the role of these MMPs in angiogenesis [3, 29-30], it is possible that MMP3 participates, at least indirectly, to lymphoma angiogenesis. Indeed, the results presented here and those of Aoudjit and collaborators [16] show that both *MMP3* and *MMP9* gene expression are induced upon contact with EC. Consequently, MMP3, upon activation of pro-MMP9, could enhance MMP9 participation to angiogenesis within the lymphoid tumor. The availability of MMP9-deficient mouse models should help to clarify the functional relationship between MMP9 and MMP3 in the development of lymphoid tumors.

Our results showing that MMP3 is constitutively expressed in the murine bEnd.3 endothelioma cell lines is consistent with those previously reported by Mach and collaborators [15] using human vascular endothelial cells. They reported that in vitro capillary-like tube formation following T cell-endothelial interaction were strongly dependent on MMP3 and MMP9, and could thus play a significant role in tumor growth. The results presented here provide strong support for this hypothesis. The hypothesis of a role for MMP3 in angiogenesis is also attractive considering the facts that 1) MMP3 is induced only in lymphoma cells interacting with endothelial cells and not with

fibroblasts, suggesting a targeting of its proteolytic activity towards the surrounding endothelium, and 2) MMP3 has been shown by others to proteolytically release ECM-bound pro-angiogenic factor bFGF [31]. However, it has also been demonstrated that MMP3 can generate angiostatin, an inhibitor of angiogenesis, from plasminogen [32,33]. Immunohistochemical staining of lymphoid tumors for vascularization should help clarify the outcome in the present context of lymphoma.

Another plausible mechanism accounting for the role of MMP3 in lymphoma growth is that MMP3 could enhance tumor cell proliferation, via its catalytic activity over ECM components of the thymic microenvironment, leading to the release of growth factor and cytokines, and/or directly regulating the bioactivity of soluble mediators. In this regard, MMP3 proteolytically releases membrane-anchored HB-EGF [34], which is a potent mitogenic factor for tumor cells [35]; there are increased MMP3 levels in the proliferating epidermis of wounds [21]; MMP3 degrades IGFBP component of IGF/IGFBP-3 complex, which augments bioavailability of intact IGF and increases cellular proliferation [36].

MMP3 has been shown to increase or at least correlate with invasiveness of several tumor cell types [37-39]. Our results thus confirm that MMP3 can confer tumor cells, in this case here, transformed T lymphocytes, with the capacity to degrade components of the extracellular matrix. It is also possible, however, that the ability of MMP3 to_increase tumorigenicity is directed towards non-matrix proteins that found in the peritumoral environement or that are trapped within the pericellular matrix. Identification of MMP3 substrates in the context of thymic lymphoma is crucial in order to unravel the role of this stromelysin in promoting lymphoma growth. To this aim, our murine lymphoma model will be particularly useful. Moreover, it will allow us to assess the effects of specific inhibitors of lymphoma growth.

References

[1] E. J. Bernhard, S. B. Gruber, and R. J. Muschel, Direct evidence linking expression of matrix metalloproteinase-9 (92-ka gelatinase/collagenase) to the metastatic phenotype in transformed rat embryo cells, Proc. Natl. Acad. Sci. 91 (1994) 4293-4297.

[2] A. M. Chambers, LM, Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis, J. Natl. Cancer Inst. 89 (1997) 1260-1270.

[3] G. Bergers, R. Brekken, G. McMahon, T. H. Vu, T. Itoh, K. Tamaki, K. Tanzawa, P. Thorpe, S. Itohara, Z. Werb, and D. Hanahan, Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis, Nature Cell Biol. 2 (2000) 737-744.

[4] A. Baker, D. Edwards, and G. Murphy, Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities, J. Cell Sci. 115 (2002) 3719-3727.

[5] M. M. Stetler-Stevensen, A; Lim, M; Fukushima, P; Kehrl, J; Marti, G; Ptaszynski, K; Wang, J; Stetler-Stevenson, WG., Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in reactive and neoplastic lymphoid cells, Blood 89 (1997) 1708-1715.

[6] A. S. Kruger, R; Sopov, I; Kopitz, C; Arlt, M; Magdolen, V; Harbeck, N; Gansbacher, B; Schmitt, M, Hydroxamate-type matrix metalloproteinase inhibitor batimastat promotes liver metastasis, Cancer Res. 61 (2001) 1272-1275.

[7] M. Arlt, C. Kopitz, C. Pennington, K. Watson, H.-W. Krell, W. Bode, B. Gansbacher, R. Khokha, D. E. Edwards, and A. Krüger, Increase in gelatinase-specificity of matrix metalloproteinase inhibitors correlates with antimetastatic efficacy in a T-cell lymphoma model, Cancer Res. 62 (2002) 5543-5550.

[8] L. Matrisian, G. Bowden, P. Krieg, G. Furstenberger, J. Briand, P. Leroy, and R. Breathnach, The mRNA coding for the secreted protease transin is expressed more abundantly in malignant than in benign tumors, Proc. Natl Acad. Sci. 83 (1986) 9413-9417.

[9] T. Sreenath, L. M. Matrisian, W. G. Stetler-Stevensen, S. Gattoni-Celli, and R. Pozzatti, Expression of matrix metalloproteinase genes in transformed rat cell lines of high and low metastatic potential, Cancer Res. 52 (1992) 4942-4947.

[10] P. Liokumovich, I. Goldberg, and B. Davidson, Expression of metalloproteinases in endometrial stromal sarcoma: immunohistochemical study using image analysis, J. Clin. Pathol. 52 (1999) 198-202.

[11] G. Opdenakker, L. Paemen, K. Norga, and S. Masure, Proteinase inhibition in invasive cancer therapy: four control levels of matrix degradation, Int. J. Cancer 70 (1997) 628-630.

[12] K. Sirum, and C. E. Brinckerhoff, Cloning of the genes for human stromelysin and stromelysin 2: differential expression in rheumatoid synovial fibroblasts, Biochemistry 28 (1989) 8691-8698.

[13] K. Hammani, P. Henriet, and Y. Eeckhout, Cloning and sequencing of a cDNA encoding mouse stromelysin-1, Gene 120 (1992) 321-322.

[14] A. M. Romanic, and J. A. Madri, The induction of 72-KDA gelatinase in T cells upon adhesion to endothelial cells is VCAM-1 dependent, J. Cell Biol. 125 (1994) 1165-1171.

[15] F. Mach, U. Schonbeck, R. P. Fabunmi, C. Murphy, E. Atkinson, J.-Y. Bonnefoy, P. Graber, and P. Libby, T lymphocytes induce endothelial cell matrix metalloproteinase expression by a CD40L-dependent mechanism. Implications for tubule formation, Am. J. Pathol. 154 (1999) 229-238.

[16] F. Aoudjit, E. F. Potworowski, and Y. St-Pierre, Bi-directional induction of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 during T lymphoma/endothelial cell contact: implication of ICAM-1, J. Immunol. 160 (1998) 2967-2973.

[17] Y. Reiss, and B. Engelhardt, T cell interaction with ICAM-1-deficient endothelium in vitro: transendothelial migration of different T cell populations is mediated by endothelial ICAM-1 and ICAM-2, Int. Immunol. 11 (1999) 1527-1539.

[18] A. J. Potocnik, C. Brakebusch, and R. Fassler, Fetal and adults hematopoietic stem cells require beta1 integrin function for colonizing fetal liver, spleen, and bone marrow., Immunity 12 (2000) 653-663.

[19] C. Mueller, N. Corazza, S. Trachsel-Loseth, H. P. Eugster, M. Buhler-Jungo, T. Brunner, and M. A. Imboden, Noncleavable transmembrane mouse tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha) mediates effects distinct from those of wild-type TNFalpha in vitro and in vivo., J. Biol. Chem. 274 (1999) 38112-38118.

[20] L. J. Windsor, H. Grenett, B. Birkedal-Hansen, M. K. Bodden, J. A. Engler, and H. Birkedal-Hansen, Cell type-specific regulation of SL-1 and SL-2 genes, J. Biol. Chem. 268 (1993) 17341-17347.

[21] U. K. Saarialho-kere, A. P. Pentland, H. Birkedal-Hansen, W. C. Parks, and H. G. Welgus, Distinct populations of basal keratinocytes express stromelysin-1 and stromelysin-2 in chronic wounds, J. Clin. Invest. 94 (1994) 79-88.

[22] A. Ito, S. Nakahima, Y. Sasaguri, H. Nagase, and Y. Mori, Co-culture of human breast adenocarcinoma MCF-7 cells and human dermal fibroblasts enhances the production of matrix metalloproteinases 1, 2 and 3 in fibroblasts, Br. J. Cancer 71 (1995) 1039-1045.

[23] M. Sternlicht, A. Lochter, C. Sympson, B. Huey, D. Pinkel, M. Bissell, and Z. Werb, The stromal proteinase MMP3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis, Cell 98 (1999) 137-146.

[24] G. Murphy, M. Cockett, P. Stephens, B. Smith, and A. Docherty, Stromelysin is an activator of procollagenase. A study with natural and recombinant enzymes, Biochem. J. 248 (1987) 265-268.

[25] Y. Ogata, J. Enghild, and H. Nagase, Matrix metalloproteinase-3 (stromelysin) activates the precursor for the human matrix metalloproteinase 9, J. Biol. Chem. 267 (1992) 3581-3584.

[26] S. Shapiro, C. Fliszar, T. Broekelmann, R. Mecham, R. Senior, and H. Welgus, Activation of the 92-kDa gelatinase by stromelysin and 4-aminophenylmercuric acetate, J. Biol. Chem. 270 (1995) 6351-6356.

[27] E. Hahn-Dantona, N. Ramos-DeSimone, J. Sipley, H. Nagase, D. French, and J. Quigley, Activation of proMMP9 by a plasmin/MMP3 cascade in a tumor cell model. Regulation by tissue inhibitors of metalloproteinases, Ann. NY Acad. Sci. 878 (1999) 372-387.

[28] N. Ramos-DeSimone, E. Hahn-Dantona, J. Sipley, H. Nagase, D. French, and J. Quigley, Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP9) via a converging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion, J. Biol. Chem. 274 (1999) 13066-13076.

[29] M. Reed, A. Corsa, S. Kudravi, R. McCormick, and W. Arthur, A deficit in collagenase activity contributes to impaired migration of aged microvascular encothelial cells, J. Cell Biochem. 77 (2000) 116-126.

[30] T. H. Vu, M. Shipley, G. Bergers, J. E. Berger, J. A. Helms, D. Hanahan, S. D. Shapiro, R. M. Senior, and Z. Werb, MMP9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes, Cell 93 (1998) 411-422.

[31] J. Whitelock, A. Murdoch, R. Iozzo, and P. Underwood, The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin and heparanases, J. Biol. Chem. 271 (1996) 10079-10086.

[32] L. Cornelius, L. Nehring, E. Harding, M. Bolanowski, W. Welgus, D. Kobayashi, R. Pierce, and S. Shapiro, Matrix metalloproteinases generate angiostatin: effects on neovascularization, J. Immunol. 161 (1998) 6845-6852.

[33] H. Lijnen, F. Ugwu, A. Bini, and D. Collen, Generation of an agiostatin-like fragment from plasminogen by stromelysin-1 (MMP3), Biochemistry 37 (1998) 4699-4702.

[34] M. Suzuki, G. Raab, M. Moses, C. Fernandez, and M. Klagsbrun, Matrix metalloproteinase-3 releases active heparin-binding EGF-like growth factor by cleavage at a specific juxtamembrane site, J. Biol. Chem. 272 (1997) 31730-31737.

[35] G. Peoples, S. Blotnik, K. Takahashi, M. Freeman, M. Klagsbrun, and T. Eberlein, T lymphocytes that infiltrate tumors and atherosclerotic plaques produce heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and basic fibroblast growth factor: a potential pathological role, Proc. Natl Acad. Sci. 92 (1995) 6547-6551.

[36] J. Fowlkes, D. Serra, H. Nagase, and K. Thrailkill, MMPs are IGFBP-degrading proteinases: implications for cell proliferation and tissue growth, Ann. NY Acad. Sci. 878 (1999) 696-699.

[37] T. De Angelis, A. Noe, M. Chatterjee, and J. Mulholland, Stromelysin-1 activation correlates with invasiveness i squamous cell carcinoma, J. Invest. Dermatol. 118 (2002) 759-766.

[38] A. Monvoisin, C. Bisson, K. Si-Tayeb, C. Balabaud, A. Desmouliere, and J. Rosenbaum, Involvement of matrix metalloproteinase type-3 in hepatocyte growth factor-induced invasion of human hepatocellular carcinoma cells, Int. J. Cancer 97 (2002) 157-162.

[39] A. Lochter, A. Srebrow, C.J. Sympson, N. Terracio, Z. Werb, M.J. Bissell, Misregulation of stromelysin-1 expression in mouse mammary tumor cells accompanies acquisition of stromelysin-1-dependent invasive properties, J. Biol. Chem. 272 (1997) 5007-5015.

Figure 1

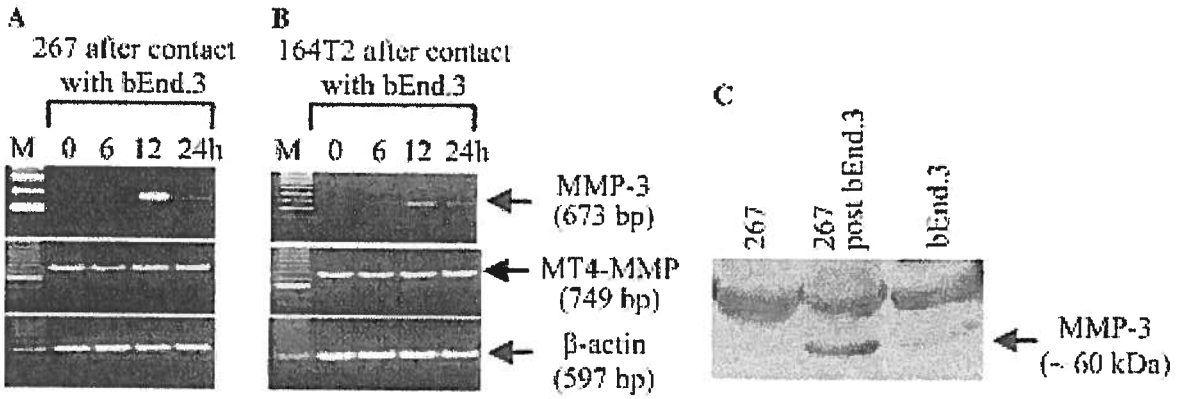

A
267 after contact with bEnd.3
M 0 6 12 24h
B
164T2 after contact with bEnd.3
M 0 6 12 24h
MMP-3 (673 bp)
MT4-MMP (749 bp)
β-actin (597 bp)
C
267
267 post bEnd.3
bEnd.3
MMP-3 (~ 60 kDa)

Figure 2

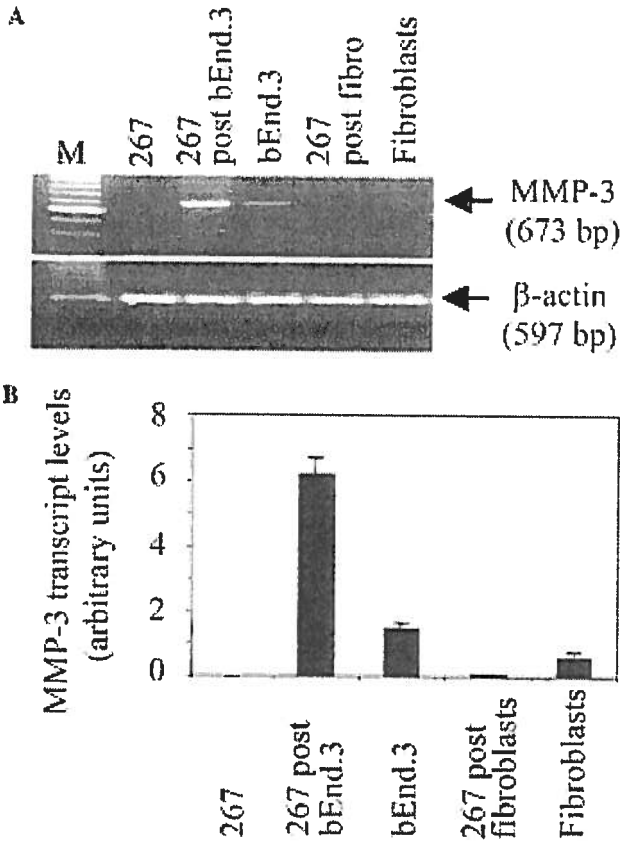

A
M
267
267 post bEnd.3
bEnd.3
267 post fibro
Fibroblasts
MMP-3 (673 bp)
β-actin (597 bp)
B
MMP-3 transcript levels (arbitrary units)
0
2
4
6
8
267
267 post bEnd.3
bEnd.3
267 post fibroblasts
Fibroblasts

Figure 3

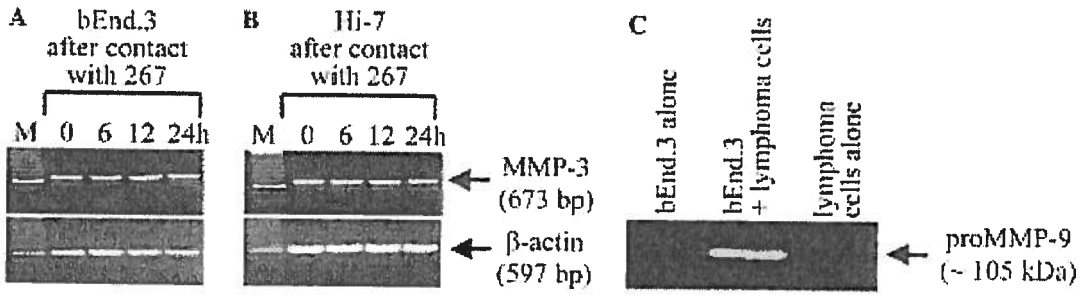

A
bEnd.3
after contact
with 267
M 0 6 12 24h
B
Hi-7
after contact
with 267
M 0 6 12 24h
MMP-3
(673 bp)
β-actin
(597 bp)
C
bEnd.3 alone
bEnd.3
+ lymphoma cells
lymphoma
cells alone
proMMP-9
(~ 105 kDa)

Figure 4

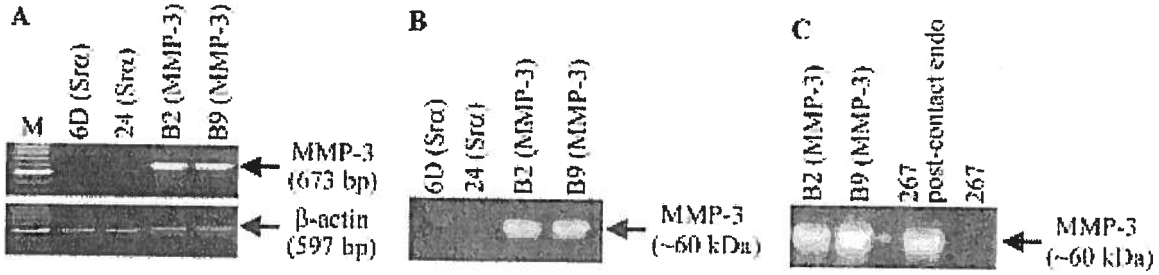

A
M
6D (Srα)
24 (Srα)
B2 (MMP-3)
B9 (MMP-3)
MMP-3
(673 bp)
β-actin
(597 bp)
B
6D (Srα)
24 (Srα)
B2 (MMP-3)
B9 (MMP-3)
MMP-3
(~60 kDa)
C
B2 (MMP-3)
B9 (MMP-3)
267
post-contact endo
267
MMP-3
(~60 kDa)

Figure 5

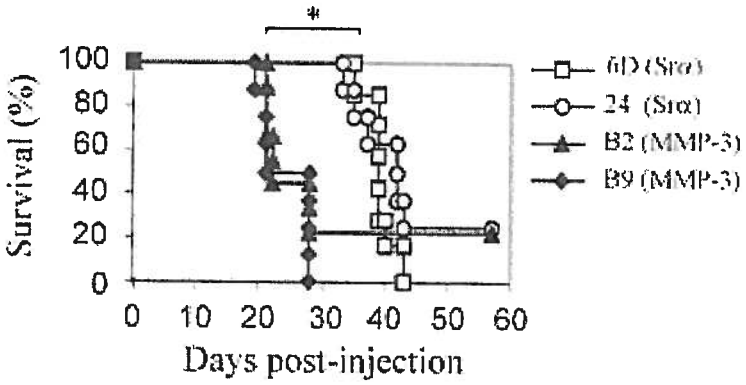

*
100
80
60
40
20
0
Survival (%)
0 10 20 30 40 50 60
Days post-injection
6D (Sτα)
24 (Sτα)
B2 (MMP-3)
B9 (MMP-3)

Figure 6

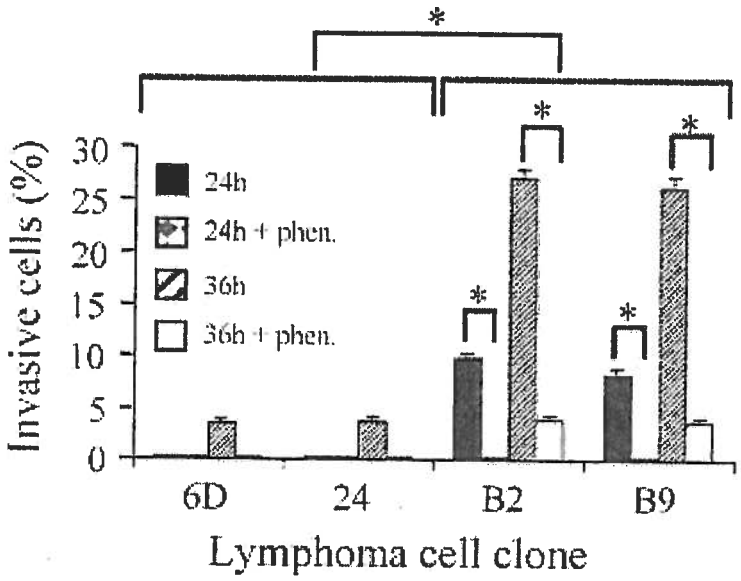

*
*
*
*
*
30
25
20
15
10
5
0
Invasive cells (%)
24h
24h + phen.
36h
36h + phen.
6D
24
B2
B9
Lymphoma cell clone

Figure legends

Figure 1. MMP3 gene expression is induced in lymphoma cells upon contact with endothelial cells. Levels of MMP3 transcripts in **(A)** 267 and **(B)** 164T2 lymphoma cells after 0, 6, 12 and 24h contact with bEnd.3 endothelioma cells were determined by RT-PCR analysis. M, m.w. standards (100-bp DNA ladder). The lower thick band represents the 600-bp marker. Levels of MT4-MMP transcripts are shown as a control of specificity. **(C)** Levels of MMP3 protein in 267 lymphoma cells after contact with bEnd.3 endothelioma cells. Lymphoma cells were co-cultured for 12 h with bEnd.3 cells, harvested by mild trypsin treatment, and proteins (100 μg) from cell lysates were immunodetected with MMP3-specific antibody as described. Results are representative of at least two independent experiments.

Figure 2. MMP3 gene expression is specifically induced in lymphoma cells upon contact with endothelial cells. Levels of MMP3 expression in 267 lymphoma cells following 12h contact with bEnd.3 endothelioma cells or Hi-7 fibroblasts were analyzed by RT-PCR followed by **(A)** gel electrophoresis and **(B)** densitometry and compared to those of untreated 267, bEnd.3 and Hi-7 cell lines. M, m.w. standards (100-bp DNA ladder). The lower thick band represents the 600-bp marker. Results are representative of three independent experiments.

Figure 3. MMP3 gene expression is not modulated in stromal cells after contact with lymphoma cells. Levels of MMP3 transcripts in **A)** bEnd.3 endothelioma cells or **B)** Hi-7 fibroblastic cells following 0, 6, 12 and 24h contact with 267 lymphoma cells were analyzed by RT-PCR. M, m.w. standards (100-bp DNA ladder). The lower thick band represents the 600-bp marker. **C)** Gelatin zymography of serum-free conditioned media from bEnd.3 endothelioma cells after 24h contact with 164T2 lymphoma cells or from monocultures of bEnd.3 or 164T2 cells alone. Results are representative of at least two independent experiments.

Figure 4. Constitutive expression of MMP3 in lymphoma cells upon transfection of cDNAs. **(A)** RT-PCR analysis and **(B)** casein zymography of serum-free conditioned media from 267 lymphoma cells transfected with the empty vector (SRα), or with the same vector containing the murine MMP3 cDNA. Stable transfectants were selected using puromycin-containing medium. All SRα clones and MMP3 transfectants shown were used for independent *in vivo* studies. M, m.w. standards (100-bp DNA ladder). **(C)** Simultaneous casein zymography of serum-free conditionned media from 267 lynphoma cells stably transfected with MMP3 cDNA or after 12h contact with bEnd.3 endothelioma cells. Results are representative of at least two independent experiments.

Figure 5. MMP3 expression by lymphoma cells accelerates tumor growth. Lymphoma cells (5×10^3) were injected in each lobe in young C56BL/6 syngeneic mice. Animals were monitored 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. The results are representative of two independent experiments with two different clones expressing MMP3. *: p value ≤ 0.05.

Figure 6. Effect of MMP3 on the invasive behavior of lymphoma cells. The effect of MMP3 on the invasive behavior of lymphoma cells overexpressing MMP3 was determined using Matrigel-coated Transwell inserts. Assays were conducted for 24h and 36h in serum-free media alone or in presence of 5 mM 1,10-phenanthroline (PHEN). Results are means +/- SE for two independent experiments, each performed in duplicates. *: p value ≤ 0.05.

CHAPITRE 3

Stromelysin-2 (MMP10) is inducible in lymphoma cells and accelerates the growth of lymphoid tumors in vivo

Céline Van Themsche, Tommy Alain, Anna E. Kossakowska, Stefan Urbanski, Édouard F. Potworowski, and Yves St-Pierre

The Journal of Immunology 2004 **173**(6): 3605-11.

Contribution des auteurs

J'ai réalisé toutes les expériences décrites dans cet article, de même que celles ajoutées en annexe. J'ai également rédigé le manuscrit dans son entier, avant de le soumettre au Dr Édouard F. Potworowski (co-directeur de thèse) ainsi qu'au Dr Yves St-Pierre, qui ont lu et corrigé le manuscrit. Ce dernier a finalement été lu et approuvé par les co-auteurs Tommy Alain et Stefan Urbanski, avant soumission au journal.

Le groupe de Tommy Alain, Anna E. Kossakowska et Stefan Urbanski (des collaborateurs du Dr St-Pierre à l'Université de Calgary) a effectué la collecte des échantillons de tumeurs de patients présentant des lymphomes non-Hodgkiniens variés, puis ont préparé des ADNc à partir de ces tumeurs et nous les ont fait parvenir. J'ai utilisé ces ADNc pour préparer une figure pour ce manuscrit qui, après révision par le journal, a plutôt été placée en annexe (Annexe 10). Ces collaborateurs nous ont également fourni les lignées de LNH OCY avec lesquelles j'ai pu étudier la régulation de MMP10 et dont les résultats sont illustrés à la Figure 3.

Résumé

MMP10 (stromélysine-2) peut cliver diverses composantes de la matrice extracellulaire ainsi que d'autres biomolécules non-matricielles. Bien que des indications expérimentales indirectes d'un rôle pro-tumoral de MMP10 aient déjà été rapportées, et malgré le fait que MMP3 (stromélysine-1), qui présente une redondance fonctionnelle avec MMP10, joue un rôle notoire dans la progression de certains cancers, le patron d'expression de MMP10 au sein des différentes tumeurs de même que son rôle dans la progression des cancers n'ont pas été caractérisés en détails à ce jour. C'est notamment le cas des lymphomes non-Hodgkiniens, où les signaux qui régulent l'expression de MMP10 au sein des tumeurs, de même que son rôle dans la progression tumorale, demeurent inconnus. Dans le présent article, nous démontrons que bien que certaines cellules stromales produisent MMP10, les cellules lymphomateuses elles-mêmes peuvent aussi l'exprimer dans des conditions précises, notamment après contact direct et spécifique avec des cellules endothéliales. Dans ces conditions, nous avons pu identifier les molécules d'adhésion LFA-1 et ICAM-1 comme étant partiellement responsables des signaux conduisant à l'induction de l'expression de MMP10 dans les cellules lymphomateuses. De plus, l'expression de MMP10 dans les cellules lymphomateuses peut être induite par l'exposition à certaines cytokines telles que les interleukines-4, -6 et -13 et ce, contrairement à l'expression de MMP3 (stromélysine-1). Enfin, à l'aide de notre modèle murin de lymphome thymique, nous avons pu observer que l'expression de MMP10 par des transfectants stables de cellules lymphomateuses permettait d'accélérer la croissance du lymphome dans le thymus. Nos résultats fournissent ainsi les premières indications *in vivo* que MMP10 puisse favoriser la progression tumorale et indiquent que l'induction de MMP10 est l'aboutissement d'une importante voie de signalisation intracellulaire dans les cellules lymphomateuses, qui est activée non seulement par le contact intercellulaire médié par LFA-1/ICAM-1, mais également par des médiateurs solubles de l'inflammation.

Introduction

Non-Hodgkin's lymphomas, and several other cancers, are associated with severe metastatic disease that results in high mortality rates. The metastatic properties of tumor cells are acquired through the regulation of the expression of various molecules, including some involved in angiogenesis as well as in cellular migration, cell growth, apoptosis, differentiation, and invasion. Matrix metalloproteinases (MMPs)[¶] play a central role in all these events (1-4). In this regard, a direct link between the level of MMP9 (Gelatinase B) produced by lymphoma cells and their metastatic potential has been established (5-7). MMPs constitute a family of enzymes that exhibit a high affinity and lytic activity for a variety of ECM components, including collagens, proteoglycans, elastin, laminin, and fibronectin (8). Recent evidence has also established that MMPs have an important role in processing enzymes that regulate cellular behavior and function by selective proteolysis of cell surface receptors and adhesion molecules, cytokines and growth factors (9, 10).

Stromelysins are recognized as collagenase-related connective-tissue-degrading metalloproteinases capable of degrading multiple components of the extracellular matrix, or «stroma» (8). Stromelysin-1 (MMP3) and stromelysin-2 (MMP10) isoforms are similar in their amino acid sequence and substrate specificity. The most significant differences between MMP3 and MMP10 reside in their differential patterns of expression on normal and transformed cells (11-14). In both cases, however, their expression has been associated mostly with parenchymal cells found in various tissues, and with increased metastatic behavior, most notably in the case of embryonic fibroblasts and other stromal cells (15-18).

We previously showed that MMP9 expression is regulated by bi-directional signaling during contact between T lymphoma cells and endothelial cells (19). Since MMP10 expression in normal human tissues has been reported in T cells (20), we investigated here its expression and its role in lymphomagenesis. We found that MMP10 gene expression is inducible in T lymphoma cells upon specific contact with endothelial cells, an effect that is partially mediated by ICAM-1 and LFA-1 adhesion molecules.

Expression of MMP10, but not that of MMP3, was also induced in human B cell lymphoma upon exposure to IL-4, IL-6 and IL-13, but not to IL-1. Finally, using an *in vivo* experimental model, we found that over-expression of MMP10 by lymphoma cells accelerated the growth of thymic lymphoma. Our results indicate that both intercellular contact and cytokine secretion control the expression of MMP10 in lymphoma cells, which, in turn, plays an important role in the growth of thymic lymphoma.

Materials and methods

Mice. Male and female C57BL/6 mice were bred in our animal facility and maintained under specific pathogen-free conditions and in accordance with institutional guidelines. Breeder pairs for the C57BL/6 mouse colony were purchased from Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA).

Cell lines and reagents. The origin of the 267 and 164T2 T lymphoma cell lines have been described (21). As a model to study lymphoma-EC interaction, we used the endothelioma cell line bEnd.3. In addition to expressing the von Willebrand factor, these cells express the same repertoire of cell adhesion molecules than that found on normal EC, including ICAM-1, VCAM-1, E-and P-selectins, CD31, and ICAM-2. The bEnd.3 cells upregulate the expression of cell adhesion molecules after stimulation with inflammatory cytokines such as IL-1 and TNFα, with kinetics similar to those reported for primary ECs. Endothelioma cell lines have been used by many investigators as an *in vitro* model to study the ability of leukocytes to interact with vascular endothelium (19, 22-26). The Hi-7 fibroblastic cells were kindly provided by Dr. Claude Daniel (INRS-Institut Armand-Frappier) (27). The human Burkitt lymphoma Raji cell line was obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA). The diffuse large B-cell lymphomas (OCY lines) have been described previously (28). HUVEC cell lines were obtained from GlycoTech Corporation (Rockville, MD) and were maintained in EC complete medium containing EBM (endothelial cell basal medium) supplemented with 2% fetal bovine serum, 0.01 μg/ml hEGF, 0.001 mg/ml hydrocortisone, 0.012 mg/ml bovine brain extract, 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES buffer and 0,001% gentamycin/amphotericin (Cambrex, Walkersville, MD). Except for the human B lymphoma cell lines, which were maintained in B-cell medium (RPMI-1640 supplemented with 10 % (v/v) serum, 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES buffer, 0.1 unit/ml penicillin, 50 μg/ml streptomycin, 1 mM sodium pyruvate and 0,075 % (w/v) sodium bicarbonate), all other cell lines 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 μg/ml streptomycin and 55 μM β-mercaptoethanol. The

hybridomas R1/2 (anti-VLA-4 used as an isotype-matched control) and I27.7/7 (anti-LFA-1) were purchased from the American Type Culture Collection (Rockville, MD). The anti-VCAM-1 (429 antibody) has been described (25). These antibodies were purified using the standard protein G affinity chromatography. The 3E2 mAb (anti-ICAM-1) was purchased from PharMingen (San Diego, CA). The polyclonal antibody directed against murine MMP10 was obtained from Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA). Horseradish peroxydase-conjugated rabbit anti-goat IgG secondary antibody was purchased from ICN (Irvine, CA). Recombinant human cytokines (IL-4, IL-6, IL-13 and IL-1) were purchased from R&D Systems, MN, USA.

***In vitro* lymphoma-EC interactions**. Endothelial cell lines (HUVECs or bEnd.3) were seeded at the indicated density in 6- or 12-well plates (Corning) and incubated overnight at 37°C in a 5 % CO_2 atmosphere until they reached approximately 80% confluence. Aliquots of 10^6 lymphoma cells re-suspended in complete RPMI medium were then added to the layer of endothelial cells (or control fibroblastic Hi-7 cells), and the co-cultures incubated for the indicated time at 37°C. In some cases, lymphoma or adherent cells were pre-incubated with blocking mAb (or isotypic controls) for 30 min at 37°C and then washed to remove excess mAb before they were used in co-cultures. Lymphoma cells were separated from adherent cells using a warm solution of 0.004% trypsin-0.002% EDTA for 3 min. Resulting cell suspensions were immediately centrifuged and processed for RNA analysis or, in the case of protein analysis, were grown for 3h in complete medium before centrifugation.

RNA isolation and analysis. Total RNA was isolated using RNeasy kit (Qiagen, Burlington, ON) according to the manufacturer's instructions. First strand cDNA was synthesized from 2-3 μg of total cellular RNA using the Superscript II (GIBCO Life Technologies). For RNA analysis by polymerase chain reaction (PCR) amplification, oligonucleotide primers were designed according to DNA sequences for mouse stromelysin-2 (MMP10) and MT4-MMP (MMP17) obtained from Genbank (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD) and chosen to have approximately

a 50% GC content. In the case of mouse MMP10, the sense (5'AGG GAC CAA CTT ATT CCT GG 3') and anti-sense (5' CAG TAT GTG TGT CAC CGT CC 3') primers were located in exons V and X respectively. The murine MT4-MMP-specific primers were 5' CTG TCC AAA GCG ATT ACT GC 3' (sense) and 5' AGT GCT AGA CCG ATT GTT GG 3' (antisense) and the murine E-selectin-specific primers were 5' GGA CTG TGT AGA GAT TTA CAT CC 3' (sense) and 5' GCA GGT GTA ACT ATT GAT GGT (antisense). Primers for human MMP10 were 5' GTC ACT TCA GCT CCT TTC CT 3' (sense) and 5' ATC TTG CGA AAG GCG GAA CT 3' (antisense); primers for human MMP3 were 5' AGA GGT GAC TCC ACT CAC AT 3' (sense) and 5' GGT CTG TGA GTG AGT GAT AG 3' (antisense); primers for human TIMP-1 were 5' AGC GCC CAG AGA GAC ACC 3' (sense) and 5' CCA CTC CGG GCA GGA TT 3' (antisense), respectively. Primers for GAPDH were 5' CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT 3' (sense) and 5' AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC 3' (antisense), while the β-actin-specific primers were 5' CAT GGA TGA CGA TAT CGC TGC GC 3' (sense) and 5' GCT GTC GCC ACG CTC GGT CAG GAT C-3' (anti-sense). Amplification of GAPDH or β-actin cDNA was used as RNA loading controls. Amplification of specific genes was performed in a MJ Research Thermal cycler (model PTC-100TM) using the following parameters: 1 min at 94°C, 1 min at 60°C and 1 min at 72°C for 35 cycles, except for β-actin, GAPDH and E-selectin which only required 25 cycles. The amplification for each gene was in the linear part of the curve. The reaction mixture was size-separated on an agarose gel, and specifically amplified products were detected by ethidium bromide staining and ultraviolet transillumination. Quantitative analysis was carried out using a computerized densitometric imager (BioRad, model GS-670, Mississauga, ON). DNA sequencing of the amplicons confirmed the specificity of the PCR reactions.

Western blot analysis. Cells were washed with PBS and homogenized over ice in lysis buffer (10 mM Tris pH 7.5, 2.5% Triton X-100) supplemented with a cocktail of protease inhibitors (Complete, Roche, Laval, QC). Equal amounts of cell lysates (as determined by Bio-Rad protein assay) were separated onto a 7.5% SDS-PAGE gel and then transferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad Laboratories). The membranes were

blocked with 10% milk in PBS/0.05% Tween-20 overnight at 4°C and then probed for 2 hours at room temperature with primary antibody (polyclonal goat anti-murine MMP10 diluted 1:100 in PBS/0.05% Tween-20/5% BSA). After several washes in PBS/0.05% Tween-20, membranes were probed with secondary antibody (horseradish peroxidase-coupled rabbit anti-goat IgG diluted 1:10 000 in PBS/0.05% Tween-20/10% milk) for 45 min at room temperature, followed by several washes in PBS/0.05% Tween-20. Detection was performed using the enhanced chemiluminescence method (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC).

Stimulation of lymphoma cells with cytokines. Human B lymphoma cells (10^6) were cultured in one ml of fresh B-cell medium for 14 hours in the presence or absence of recombinant human IL-4 (1 U/ml), IL-6 (1.5 ng/ml), IL-13 (6 ng/ml) or IL-1 (100 ng/ml). Cells were then centrifuged, RNA extracted, and processed for analysis of gene expression by RT-PCR.

Generation of stable transfectants expressing MMP10. The 1744 bp cDNA encoding the murine MMP10 gene (kindly provided by Drs M. Madlener and S. Werner, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, Germany) was inserted into the Srα eukaryotic expression vector containing the puromycin selection marker (kindly provided by Dr. François Denis, INRS-Institut Armand-Frappier). To generate stable transfectants of lymphoma cells expressing MMP10 constitutively, 267 T lymphoma cells were transfected by electroporation (Gene Pulser, Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON) using the following parameters: 40 μg of DNA per 10^7 cells in PBS on ice; 960 μF; 250 mV. Control cells consisted in 267 lymphoma cells transfected with SRα empty vector alone. After 24 hours of culture in complete medium, transfected cells were allowed to grow in complete medium containing 5 μg/ml of puromycin (Sigma) before individual colonies were selected and expanded. MMP10 expression was assessed by RT-PCR and Western blot analyses.

Invasion assay. The invasive properties of MMP10-expressing lymphoma cell clones were measured by the invasion of cells through Matrigel-coated Transwell inserts (Costar, Corning, Cambridge, MA). Briefly, Transwell inserts with an 8-μm pore-size were coated with a 2 mg/ml Matrigel and lymphoma cells (2 x 10^6 cells) added to the upper chamber inserts in Transwell chamber plates filled with pre-warmed complete medium containing supernatant (1:1) from mitogen-activated (Con A) T cell cultures as a source of T cell chemoattractant (29). Plates were incubated for 24 or 36 hours in a CO_2 incubator. Percentage of cell invasion was calculated from the ratio of cells recovered from the lower compartment to the total number of cells loaded in the upper compartment. In some experiments, lymphoma cells were re-suspended in RPMI containing 5 mM 1,10-phenanthroline and incubated at 37°C for 30 min before their addition to Transwell chamber plates. At least two independent experiments were performed for each lymphoma cell clone, where each clone was analyzed in duplicate.

Induction of primary thymic lymphoma. Five to six-week-old C57BL/6 mice (5-10 mice per group) were injected intra-thymically (i.t.) in each of the two thymic lobes with 5 X 10^3 MMP10-expressing or control lymphoma cells. Mice were then regularly observed for clinical signs of thymic lymphoma (runting, swelling of the thorax, and dyspnea), which only appear at the end-stage of the disease and reveal imminent death owing to pulmonary compression by oversized thymic tumor. In this thymic lymphoma growth model, injected lymphoma cells generate tumors that grow with various speeds, depending notably on the phenotype of the injected lymphoma cells (in this case, over-expression or not of MMP10). Thus, survival of the animals depends on the growth rate of their thymic lymphoma, which dictates at what moment the animals will display dyspnea and will have to be sacrificed. The presence of thymic tumors is then confirmed at necropsy. All the animal research was reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at the INRS-Institut Armand-Frappier in accordance with institutional and Canadian guidelines for animal experiments.

Statistical analysis. Statistical significance was measured using a log rank test and the level of significance was established at $p < 0.05$.

Results

Basal MMP10 gene expression in lymphoma and endothelioma cells. We began our investigation on the role of MMP10 in lymphoma by measuring constitutive levels of its expression in our lymphoma and endothelial cell lines. We found that, in contrast to the endothelioma cells, murine T lymphoma cell lines did not express MMP10 constitutively (**Fig. 1A**). Both cell types expressed, however, MMP17 (MT4-MMP), a GPI-anchored protease which has the capacity to degrade gelatin and activate proMMP2 (30).

To study MMP10 gene expression in lymphoma cells upon contact with EC, we co-cultured lymphoma cells with bEnd.3 and examined the levels of MMP10 transcripts in lymphoma cells after contact. Lymphoma cells, which firmly adhered to bEnd.3, were detached at the indicated time after initiation of the culture using a low concentration of trypsin-EDTA, as previously described (19). This procedure allowed removal of more than 95% of lymphoma cells while less than 1% of bEnd.3 were detached by this procedure, leaving intact the bEnd.3 monolayer, as assessed by flow cytometric analysis (*data not shown)* (**Annexe 1**). Our results showed that contact with bEnd.3 induced time-dependent *de novo* expression of MMP10 mRNA in both 164T2 and 267 T lymphoma cells (**Fig. 1B**). The induction was transient, as it reached maximal expression at 12 h post-contact. No such induction was observed upon contact of lymphoma cells with fibroblasts. To ensure that no EC were present among lymphoma cells that were removed after co-culture, we routinely measured by RT-PCR the levels of EC-specific E-selectin transcripts in isolated T lymphoma cells; no detectable levels were present (**Fig. 1C**). These results indicated that no significant numbers of EC were present among lymphoma cells after contact and argued against the possibility that MMP10 expression in T lymphoma cells following contact with EC was attributable in part to constitutive expression of MMP10 by contaminating endothelial cells. Western blot analysis was performed to confirm the induction of MMP10 at the protein level (**Fig. 1D**). To rule out contamination of lymphoma cell suspension by EC which express endogenous levels of MMP10, Western blot analysis was performed on lysates obtained from lymphoma cells that had been removed from 18-hour contact with EC and subsequently cultured alone for

3h. In these conditions, rare EC that could have contamined the lymphoma suspension would adhere to the bottom of the plates, while lymphoma cells would remain unadherent which facilitated their purification from EC. These procedures were carried out to ensure that the MMP10 protein detected by Western blot in Fig 1C did not originated from contaminating EC. Activation of MMP10, but not of MMP3, gene expression was also observed following contact of human B and T lymphoma cells with HUVECs (*data not shown*)(**Annexe 5**).

The essential role of LFA-1 and ICAM-1 in the induction of MMP10 expression. Integrins play a key role in intercellular adhesion events, notably in the delivery of signals regulating MMP gene expression (19, 31). Since lymphoma cells express high levels of LFA-1, an integrin involved in the activation of *MMP9* gene in lymphoma cells upon contact with endothelial cells (19), we next tested the effect of blocking LFA-1 on the induction of MMP10 in lymphoma cells following contact with bEnd.3. Our results showed that pre-incubation of T lymphoma cells with anti-LFA-1 mAb reduced the *de novo* induction of MMP10 in pre-treated lymphoma cells after contact with EC by approximately 80% (**Fig. 2A and B**). This effect specifically blocked LFA-1 signalling, as no such reduced induction was observed after pre-incubation of lymphoma cells with an anti-VCAM-1 control mAb, VCAM-1 beeing constitutively expressed on bEnd.3 cells but not on T lymphoma cells (*data not shown*). Alternatively, to determine whether ICAM-1, a major ligand for LFA-1 (32), played a role in the interaction between tumor cells and endothelial cells, we pre-treated bEnd.3 endothelial cells with anti-ICAM-1 blocking mAb and observed a decrease of approximatively 75% in the induction of MMP10 expression in 164T2 T lymphoma cells after contact with pre-treated EC (**Fig. 2C and 2D**). Again, this effect specifically blocked ICAM-1 signalling, as no such decrease was observed when EC were pre-treated with an anti-VLA-4 control mAb (VLA-4 is not expressed by bEnd.3 endothelial cells).

Induction of MMP10 in human B lymphoma cells following stimulation with cytokines. MMP gene expression, in addition to being regulated by intercellular contact, most notably in B lymphoma cells, has been shown to be under the control of cytokines

(33-36). Since previous studies have shown that cytokines such as IL-4, IL-6 and IL-13 play a significant role in lymphomagenesis (37-39), we investigated whether these cytokines could modulate MMP10 expression and found that exposure of Raji lymphoma cells to IL-4, IL-6, and to IL-13 induced the expression of MMP10 (**Fig. 3A**). This induction was specific, as no such induction was observed with MMP3, another member of the stromelysin subfamily of MMP, although MMP3 transcripts were detected in HT1080 positive control cell line; moreover, no modulation of TIMP-1 expression was observed. The ability of IL-13 to up-regulate MMP10 was not specific to the Raji B cell line, as other, albeit not all, B lymphoma cell lines could express MMP10 in response to this cytokine (**Fig. 3B**).

Invasive *in vitro* behavior of lymphoma cells over-expressing MMP10. Extracellular proteases have been shown to cooperatively influence tumorigenicity through proteolytic cascades, with individual proteases having distinct roles in matrix degradation, invasion, and migration. To determine whether increased expression of MMP10 conferred to lymphoma cells an increased proteolytic activity, we first generated T lymphoma cell lines over-expressing MMP10. Murine T lymphoma cells (267 cell line) were transfected with the pSRα expression vector encoding the murine MMP10 cDNA, and puromycin-selected cell clones were isolated. These clones were characterized for MMP10 expression at the mRNA and protein levels by RT-PCR and Western blot analyses (**Fig. 4A and B**). MMP10 mRNA and protein was detected in cells transfected with the MMP10 cDNA (clones C7, A2, and C4) but not in lymphoma cells transfected with the control vector (clones 6D and 24). We then measured the effect of MMP10 expression on the ability of lymphoma cells to migrate through a matrigel-based matrix. We found that over-expression of MMP10 by lymphoma transfectants significantly improved their ability to migrate through the matrix compared to cells transfected with the control vector (**Fig. 4C**). The ability of the metalloproteinase-specific inhibitor phenanthroline (PHEN) to inhibit the invasive behavior of lymphoma transfectants shows that this effect is indeed MMP-dependent. It is worth noting that the observed decrease in invasive behavior associated with pre-treatment of lymphoma transfectants with PHEN was not caused by cytotoxicity. (**Fig 4D**).

MMP10 accelerates lymphoma growth *in vivo*. To measure the effect of MMP10 over-expression in thymic lymphoma growth, we compared the capacity of control (Srα clones) and MMP10 transfectants to modulate tumor growth *in vivo* following intra-thymic injection in young C57BL/6 syngeneic mice. In this orthotopic thymic lymphoma growth model, injected lymphoma cells generated tumors that grew with various speeds, depending notably on the phenotype of the injected lymphoma cells (in this case, over-expression or not of MMP10). Clinical signs of thymic lymphoma (runting, swelling of the thorax, and dyspnea) only appeared at the end-stage of the disease and were a sign of imminent death owing to pulmonary compression by oversized thymic tumor. Thus, survival of the animals depended on the growth rate of their thymic lymphoma, which dictated at what moment the animals would display dyspnea and would have to be sacrificed. Two clones of control (Srα clones) and MMP10-over-expressing lymphoma transfectants were thus injected intra-thymically in mice and the frequency of tumor development as well as the mean survival time (MST) were determined. Our results showed that expression of MMP10 by lymphoma cells significantly (p = 0.0001) accelerated the growth of thymic lymphoma *in vivo,* since mice injected with MMP10 transfectants presented dyspnea earlier and had to be sacrificed more rapidly than those who received control lymphoma cells (**Fig. 5**). Indeed, MST values were significantly reduced when MMP10-expressing cells were injected as compared to control cells (22 ± 3 days vs 41 ± 4 days, respectively). Similar results were obtained with the clone A2 (*data not shown*)(**Annexe 6**).

Discussion

We have shown here that: (1) MMP10 expression can be induced in murine T lymphoma cells after contact with endothelial cells, an effect that is partially mediated by ICAM-1 and LFA-1 adhesion molecules; (2), MMP10 expression can also be induced in human B lymphoma cells after exposure to cytokines such as IL-4, IL-6, and IL-13, but not IL-1; and (3) MMP10 expression by lymphoma cells accelerates the growth of thymic lymphoma. To our knowledge, the present study is the first to directly address the expression of MMP10 in lymphoma and the signals that regulate its expression in lymphoma cells; moreover, it provides the first indication for a role of MMP10 in tumor growth.

We found that both T and B lymphoma cells of human and mouse origin secrete MMP10 on contact with endothelial cells, but not with fibroblasts. It must be noted that the inability of fibroblasts to induce MMP10 gene expression is not due to their lack of ICAM-1 expression, as Hi-7 cells transfected with ICAM-1 were unable to induce MMP10 gene expression in lymphoma cells (*data not shown*)(**Annexe 7**). This suggest that binding to ICAM-1 is insufficient to induce MMP10 expression in lymphoma cells and that a co-stimulatory signal generated from molecules other than the LFA-1/ICAM-1 complex is necessary for the induction of MMP10. A similar situation was observed in the case of MMP9 induction upon contact with EC (19). In fact, these data are consistent with those obtained from co-culture systems using Transwells, where lymphoma cells were physically separated from EC by a porous filter that only allowed selective exchange of small molecules. In these experiments, we did not observe induction of MMP10 gene expression in lymphoma cells (*data not shown*)(**Annexe 8**), indicating that cell-cell contact was necessary. Although membrane-bound chemokines/growth factors are prime candidates for signals inducing MMP10 in lymphoma cells, further studies using gene profiling experiments on EC and blocking antibodies will help to determine the repertoire of factors expressed by these cells and the signal(s) involved.

Stromelysins are considered collagenase-related connective-tissue-degrading metalloproteinases. The ability of MMP10 to promote neoplasia has therefore been

inferred to its secretion by peri-tumoral cells in response to the presence of signals provided by the tumor cells (16). Our study, however, clearly shows that tumor cells themselves can secrete MMP10, notably following exposure to cytokines such as IL-4, IL-6, and IL-13. It is likely that these cytokines can be provided by a variety of peri-tumoral cells, including endothelial cells, macrophages, or even infiltrating activated lymphocytes. IL-13, as well as IL-6, has been shown to be involved in the pathophysiology of human lymphomas (37-39). These results are in fact consistent with the observation that Hodgkin/Reed-Sternberg cells, which are responsive to IL-13 (41), express MMP10 in vivo (42). This suggests that the contribution of these cytokines to the pathophysiology of lymphoma can be attributed, at least in part, to their ability to up-regulate MMP genes, such as MMP10. We have observed that IL-13, however, selectively induces expression of MMP10 in some B lymphoma cells such as Raji cell line, but not in others. This distinct ability to express MMP10 following exposure to IL-13 may vary according to: 1) the levels of expression of functional IL-13 receptors, 2) the integrity of the IL-13 signaling cascade involved in the activation of the MMP10 promoter, or 3) the clinical status of the patient,and/or the type of lymphoma. Further studies with more patients will thus be required to determine whether the expression of MMP10 in NHL is associated with a particular growth phenotype or with a particular clinical outcome. Moreover, our results showing that IL-4 stimulates MMP10 secretion in both human T and B lymphoma cells has important implications for the success of IL-4 as a treatment for low and high grade lymphomas. They may explain, at least in part, the limited success of clinical trials of using recombinant human interleukin-4 in patients with NHL (43).

Although MMP3 and MMP10 are encoded by different genes, both enzymes are considered as isozymes as they share significant structural characteristics and substrate specificity. The most significant differences between these enzymes are within their differential pattern of expression (8), despite the fact that both enzymes are encoded by genes flanked by common consensus sequences specific for transcription factors such as AP-1 and PEA3. MMP10, for example, has been shown to be much less responsive than MMP3 to growth factors such as IL-1 in human fibroblasts (11, 44). We found a similar

pattern in human lymphoma cells, namely that MMP10, but not MMP3, was induced by IL-4, IL-6, and IL-13. However, lymphoma cells and fibroblasts have distinct abilities to express MMP10 and MMP3 following exposure to cytokine, since IL-1 is ineffective in inducing MMP3 and MMP10 expression in lymphoma cells. This concept is also supported by our data showing that in lymphoma cells, MMP10 can be induced by IL-4, a cytokine previously associated with down-regulation of IL-1-induced stromelysin expression in stromal cells (45-47). It is also important to note that while MMP10 mRNA levels were increased in lymphoma cells upon treatment with IL-4, IL-6 or IL-13, the mRNA level of TIMP-1, a natural inhibitor of MMPs, including MMP10, was not modulated by these cytokines, suggesting that stimulation of lymphoma cells by these cytokines shifted the equilibrium between MMP and their inhibitors. The limited inductibility of MMP3 in lymphoma cells suggests that its expression is under tight regulatory control, possibly involving epigenetic mechanisms such as DNA methylation. We and others have indeed shown that the expression of some members of the MMP family is subjected to changes in the methylation status at the level of their promoter in lymphoma cells (48-50). Future investigations on the signaling cascade leading to activation of both genes in lymphoma cells should clarify this issue.

In the light of the side effects that have been observed in clinical trials, recent studies have focused on the importance of using specific rather than broad-spectrum MMP inhibitors for the treatment of cancer (51). For this reason, it is of prime importance to understand MMP pathophysiology in cancer. The combined use of *in vitro* and *in vivo* experimental models has allowed us to identify MMP10 has a new target for lymphoma therapy. Although the underlying mechanisms by which MMP10 accelerates lymphoma growth in our model remains to be elucidated, our results showing that expression of MMP10 increases the ability of lymphoma cells to break down the extracellular matrix is likely to play an important role in promoting lymphoma growth. This would lead, for instance, to the release of growth factors and cytokines, and/or directly regulate the bioactivity of soluble mediators. Our model may thus be suitable to assess the effects of specific inhibitors of lymphoma growth.

References

1. Bernhard, E. J., S. B. Gruber, R. J. Muschel. 1994. Direct evidence linking expression of matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/collagenase) to the metastatic phenotype in transformed rat embryo cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:4293.*

2. Chambers, A. F., L. M. Matrisian. 1997. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J. Natl. Cancer Inst., 89:1260.*

3. Bergers, G., R. Brekken, G. McMahon, T. H. Vu, T. Itoh, K. Tamaki, K. Tanzawa, P. Thorpe, S. Itohara, Z. Werb, D. Hanahan. 2000. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat.Cell Biol., 2:737.*

4. Baker, A. H., D. R. Edwards, G. Murphy. 2002. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J. Cell Sci. 115:3719.*

5. Stetler-Stevenson, M., A. Mansoor, M. Lim, P. Fukushima, J. Kehrl, G. Marti, K. Ptaszynski, J. Wang, W. G. Stetler-Stevenson. 1997. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in reactive and neoplastic lymphoid cells. *Blood 89:1708.*

6. Kruger, A., R. Soeltl, I. Sopov, C. Kopitz, M. Arlt, V. Magdolen, N. Harbeck, B. Gansbacher, M. Schmitt. 2001. Hydroxamate-type matrix metalloproteinase inhibitor batimastat promotes liver metastasis. *Cancer Res., 61:1272.*

7. Arlt, M., C. Kopitz, C. Pennington, K. L. Watson, H. W. Krell, W. Bode, B. Gansbacher, R. Khokha, D. R. Edwards, A. Kruger. 2002. Increase in gelatinase-specificity of matrix metalloproteinase inhibitors correlates with antimetastatic efficacy in a T-cell lymphoma model. *Cancer Res., 62:5543.*

8. Nagase, H., J. F. Woessner. 1999. Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem., 274:21491.*

9. Overall, C. M., C. Lopez-Otin. 2002. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat. Rev. Cancer 2:657.*

10. Nakamura, H., Y. Fujii, E. Ohuchi, E. Yamamoto, Y. Okada. 1998. Activation of the precursor of human stromelysin 2 and its interactions with other matrix metalloproteinases. *Eur. J. Biochem., 253:67.*

11. Sirum, K., C. E. Brinckerhoff. 1989. Cloning of the genes for human stromelysin and stromelysin 2: differential expression in rheumatoid synovial fibroblasts. *Biochemistry, 28:8691.*

12. Saarialho-kere, U. K., A. P. Pentland, H. Birkedal-Hansen, W. C. Parks, H. G. Welgus. 1994. Distinct populations of basal keratinocytes express stromelysin-1 and stromelysin-2 in chronic wounds. *J. Clin. Invest., 94:79.*

13. Windsor, L. J., H. Grenett, B. Birkedal-Hansen, M. K. Bodden, J. A. Engler, H. Birkedal-Hansen. 1993. Cell type-specific regulation of SL-1 and SL-2 genes. *J. Biol. Chem., 268:17341.*

14. Madlener, M., S. Werner. 1997. cDNA cloning and expression of the gene encoding murine stromelysin-2 (MMP10). *Gene, 202:75.*

15. Sreenath T., L. M. Matrisian, W. Stetler-Stevenson, S. Gattoni-Celli, and R. O. Pozzatti. 1992. Expression of matrix metalloproteinase genes in transformed rat cell lines of high and low metastatic potential. *Cancer Res. 52:4942.*

16. Sternlicht M. D, M. J. Bissell, Z. Werb. 2000. The matrix metalloproteinase stromelysin-1 acts as a natural mammary tumor promoter. *Oncogene. 19:1102.*

17. Liu Z., A. Ivanoff, J. Klominek. 2001. Expression and activity of matrix metalloproteases in human malignant mesothelioma cell lines. *Int J Cancer. 91:638.*

18. Nikkola J., P. Vihinen, T. Vlaykova, M. Hahka-Kemppinen, V. M. Kahari, S. Pyrhonen. 2002. High expression levels of collagenase-1 and stromelysin-1 correlate with shorter disease-free survival in human metastatic melanoma. *Int J Cancer. 97:432.*

19. Aoudjit, F., E. F. Potworowski, Y. St-Pierre, 1998. Bi-directional induction of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 during T lymphoma/endothelial cell contact: implication of ICAM-1. *J. Immunol., 160:2967.*

20. Conca, W., F. Willmroth. 1994. Human T lymphocytes express a member of the matrix metalloproteinase gene family. *Arthritis Rheum., 37:951.*

21. Aoudjit, F., E. F. Potworowski, T. A. Springer, Y. St-Pierre. 1998. Protection from Lymphoma Cell Metastasis in ICAM-1 mutant mice: A Post-Homing Event. *J. Immunol. 161: 2333.*

22. Williams, W. W. Risau, H. Zerwes, H. Drexler, A. Aguzzi, E. Wagner. 1989. Endothelioma cells expressing the polyoma middle T oncogene induce hemangiomas by host cell recruitment. *Cell, 57:1053.*

23. Weller, A., S. Isenmann, D. Vestweber. 1992. Cloning of the mouse endothelial selectins. *J. Biol. Chem., 267:15176.*

24. Hahne, M., M. Lenter, U. Jager, S. Isenmann, D. Vestweber. 1993. VCAM-1 is not involved in LPAM-1 (alpha 4 beta p/alpha 4 beta 7) mediated binding of lymphoma cells to high endothelial venules of mucosa-associated lymph nodes. *Eur. J. Cell Biol., 61:290.*

25. Kinashi, T., Y. St-Pierre, T. A. Springer. 1995. Expression of glycophosphatidylinositol-anchored and -non-anchered isoforms of vascular cell adhesion molecule 1 in murine stromal and endothelial cells. *J. Leukoc. Biol., 57:168.*

26. Reiss, Y., B. Engelhardt. 1999. T cell interaction with ICAM-1-deficient endothelium in vitro: transendothelial migration of different T cell populations is mediated by endothelial ICAM-1 and ICAM-2. *Int. Immunol, 11:1527.*

27. Robledo, O., A. Papaioannou, B. Ochietti, C. Beauchemin, C. Daniel, A. Cantin, P. D. King, E. F. Potworowski, Y. St-Pierre. 2003. Susceptibility of ICAM-1 isoforms to proteolytic cleavage by leukocyte elastase and cathepsin G. *Eur. J. Immunol. 33:1351.*

28. Tweeddale, M. E., B. Lim, N., Jamal, J. Robinson, J. Zalcberg, G. Lockwood, M. D. Minden, H. A. Messner. 1987. The presence of clonogenic cells in high-grade malignant lymphoma: a prognostic factor. *Blood. 69:1307.*

29. Carr, M. W., S. J. Roth, E. Luther, S. S. Rose, T. A. Springer. 1994. Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proc Natl Acad Sci U S A. 91:3652.*

30. Wang, Y., A. R. Johnson, Q. Z. Ye, R. D. Dyer. 1999. Catalytic activities and substrate specificity of the human membrane type 4 matrix metalloproteinase catalytic domain. *J. Biol. Chem. 274:33043.*

31. Romanic, A. M., J. A. Madri. 1994. The induction of 72-KD gelatinase in T cells upon adhesion to endothelial cells is VCAM-1 dependent. J. Cell Biol., *125:*1165.

32. Makgoba, M., M. Sanders, G. E. Ginther Luce, E. Gugel, M. Dustin, T. A. Springer, S. Shaw. 1988. Functional evidence that intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for LFA-1-dependent adhesion in T cell-mediated cytotoxicity. *Eur. J. Immunol., 18:637.*

33. Barille, S., C. Akhoundi, M. Collette, M. P. Mellerin, M. J. Rapp, J. L. Harousseau, R. Bataille, M. Amiot. 1997. Metalloproteinases in multiple myeloma: production of matrix metalloproteinase-9 (MMP9), activation of proMMP2, and induction of MMP1 by myeloma cells. *Blood. 90:1649.*

34. Kossakowska, A. E., D. E. Edwards, C. Prusinkiewicz, M. Zhang, D. Guo, S. J. Urbanski, T. Grogan, L. A. Marquez, A. Janowska-Wieczorek. 1999. Interleukin-6 regulation of MMP2, MMP9 and TIMP-1 expression in malignant non-hodgkin's lymphoma. *Blood, 94:2080.*

35. Festuccia, C., A. Angelucci, G. L. Gravina, I. Villanova, A. Teti, A. Abini, M. Bologna. 2000. Osteoblast-derived TGF-B1 modulates matrix degrading protease expression and activity in prostate cancer cells. *Int. J. Cancer, 85:407.*

36. Wahlgren, J., P. Maisi, T. Sorsa, M. Sutinen, T. Tervahartiala, E. Pirila, O. Teronen, J. Hietanen, L. Tjaderhane, T. Salo. 2001. Expression and induction of collagenases (MMP8 and -13) in plasma cells associated with bone-destructive lesions. *J. Pathol. 194:217.*

37. Fassone, L., G. Gaidano, C. Ariatti, D. Vivenza, D. Capello, A. Gloghini, A. M. Cilia, D. Buonaiuto, D. Rossi, C. Pastore, A. Carbone, G. Saglio. 2000. The role of cytokines in the pathogenesis and management of AIDS-related lymphomas. *Leuk. Lymphoma. 38:481.*

38. Kossakowska, A., E., S. J. Urbanski, A. Janowska-Wieczorek. 2000. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors - expression, role and regulation in human malignant non-Hodgkin's lymphomas. *Leuk. Lymphoma. 39:485.*

39. Skinnider, B., F., A. J. Elia, R. D. Gascoyne, L. H. Trumper, F. von Bonin, U. Kapp, B. Patterson, B. E. Snow, T. W. Mak. 2001. Interleukin 13 and interleukin 13 receptor are frequently expressed by Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood. 97:250.*

40. Aoudjit, F., P.-O. Estève, M. Desrosiers, E. F. Potworowski, Y. St-Pierre. 1997. Gelatinase B (MMP9) production and expression by stromal cells in the normal and adult thymus and experimental thymic lymphoma. *Int. J. Cancer. 71:71.*

41. Kapp, U., W. C. Yeh, B. Patterson, A. J. Elia, D. Kagi, A. Ho , A. Hessel, M. Tipsword, A. Williams, C. Mirtsos, A. Itie, M. Moyle, T. K. Mak. 1999. Interleukin 13 is secreted by and stimulates the growth of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *J. Exp. Med. 189:1939.*

42. Thorns, C., Hé W. Bernd, D. Hatton, H. Merz, A. C. Feller, K. Lange. 2003. Matrix-metalloproteinases in Hodgkin lymphoma. *Anticancer Res. 23:1555.*

43. Taylor, C.W., M. LeBlanc, R. I. Fisher, D. F. Moore Sr, R. W. Roach, L. Elias, T. P. Miller. 2000. Phase II evaluation of interleukin-4 in patients with non-Hodgkin's lymphoma: a Southwest Oncology Group trial. *Anticancer Drugs. 11:695.*

44. Reunanen, N.., S. P. Li , M. Ahonen, M. Foschi, J. Han, V. M. Kahari. 2002. Activation of p38 alpha MAPK enhances collagenase-1 (matrix metalloproteinase (MMP)-1) and stromelysin-1 (MMP3) expression by mRNA stabilization. *J. Biol. Chem. 277:32360.*

45. Sciavolino, P., J., T. H. Lee, J. Vilcek. 1994. Interferon-beta induces metalloproteinase mRNA expression in human fibroblasts. Role of activator protein-1. *J. Biol. Chem. 269:21627.*

46. Prontera, C., G. Crescenzi, D. Rotilio. 1996. Inhibition by Interleukin-4 of stromelysin expression in human skin fibroblasts: role of PKC. *Exp. Cell Res. 224:183.*

47. Nemoto, O., H. Yamada, T. Kikuchi, M. Shinmei, K. Obata, H. Sato, M. Seiki, M. Shimmei. 1997. Suppression of matrix metalloproteinase-3 synthesis by interleukin-4 in human articular chondrocytes. *J. Rheumatol. 24:1774.*

48. Chicoine, E., P. O. Estève, O. Robledo, C. Van Themsche, E. F. Potworowski, and Y. St-Pierre. 2002. Evidence for the role of promoter methylation in the regulaiton of MMP9 gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun. 297:765.*

49. Sato, N., N. Maehara, G. H. Su, M. Goggins. 2003. Effects of 5-aza-2'-deoxycytidine on matrix metalloproteinase expression and pancreatic cancer cell invasiveness. *J. Natl. Cancer Inst. 95:327-30.*

50. St-Pierre, Y., C. Van Themsche, P. O. Estève. 2003. Emerging features in the regulation of MMP9 gene expression for the development of novel molecular targets and therapeutic strategies. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy 2:206.*

51. Arlt M., C. Kopitz, C. Pennington, K. L. Watson, H. W. Krell, W. Bode, B. Gansbacher, R. Khokha, D. R. Edwards, A. Kruger. 2002. Increase in gelatinase-specificity of matrix metalloproteinase inhibitors correlates with antimetastatic efficacy in a T-cell lymphoma model. *Cancer Res. 62:5543-50.*

Figure 1

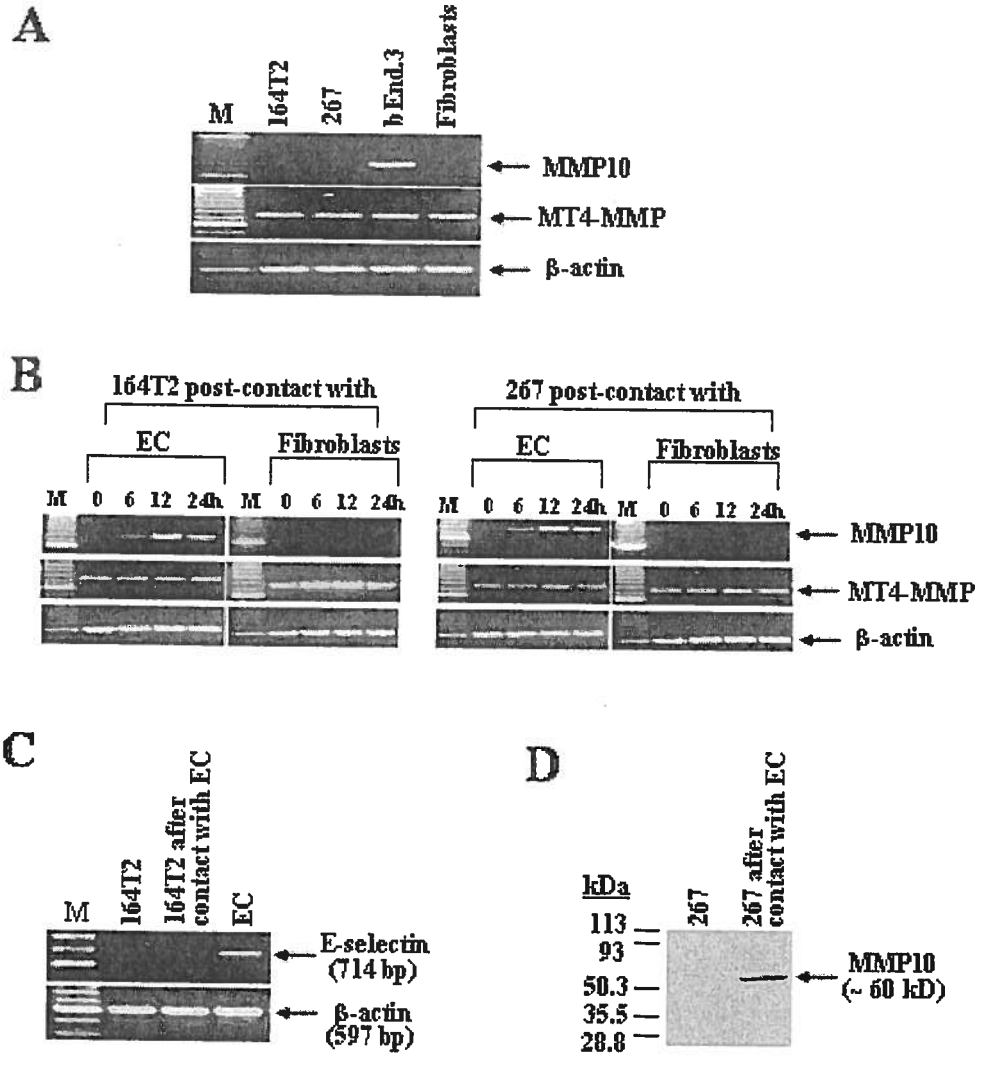

A
M
164T2
267
bEnd.3
Fibroblasts
MMP10
MT4-MMP
β-actin
B
164T2 post-contact with
EC
Fibroblasts
267 post-contact with
EC
Fibroblasts
M 0 6 12 24h M 0 6 12 24h
M 0 6 12 24h M 0 6 12 24h
MMP10
MT4-MMP
β-actin
C
M
164T2
164T2 after contact with EC
EC
E-selectin (714 bp)
β-actin (597 bp)
D
kDa
113
93
50.3
35.5
28.8
267
267 after contact with EC
MMP10 (~ 60 kD)

Figure 2

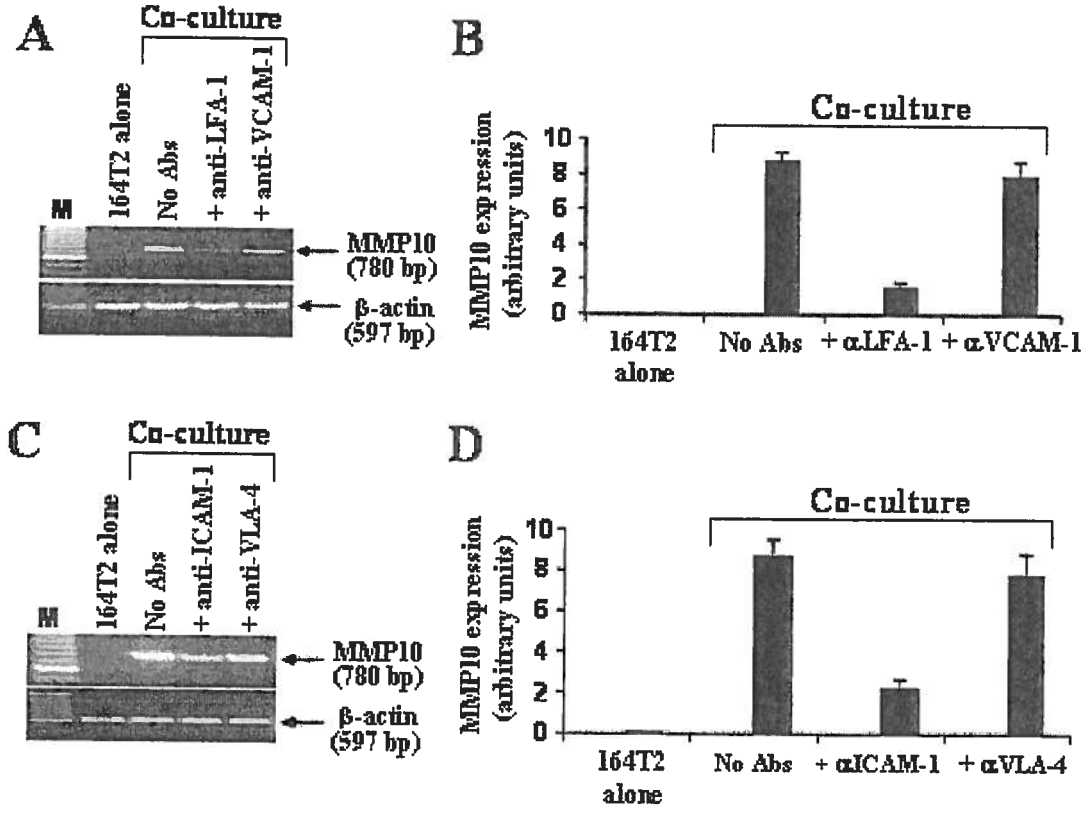

A
Co-culture
M
164T2 alone
No Abs
+ anti-LFA-1
+ anti-VCAM-1
MMP10 (780 bp)
β-actin (597 bp)
B
Co-culture
MMP10 expression (arbitrary units)
0
2
4
6
8
10
164T2 alone
No Abs
+αLFA-1
+αVCAM-1
C
Co-culture
M
164T2 alone
No Abs
+ anti-ICAM-1
+ anti-VLA-4
MMP10 (780 bp)
β-actin (597 bp)
D
Co-culture
MMP10 expression (arbitrary units)
0
2
4
6
8
10
164T2 alone
No Abs
+αICAM-1
+αVLA-4

Figure 3

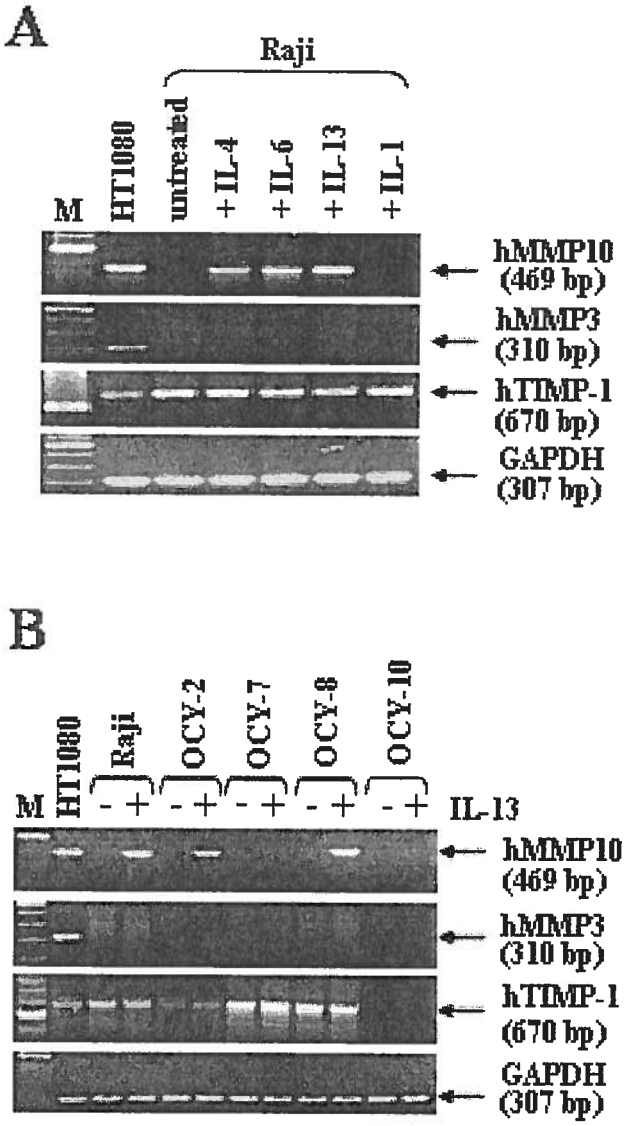

A
Raji
M
HT1080
untreated
+IL-4
+IL-6
+IL-13
+IL-1
hMMP10
(469 bp)
hMMP3
(310 bp)
hTIMP-1
(670 bp)
GAPDH
(307 bp)
B
M
HT1080
Raji
OCY-2
OCY-7
OCY-8
OCY-10
- + - + - + - + - +
IL-13
hMMP10
(469 bp)
hMMP3
(310 bp)
hTIMP-1
(670 bp)
GAPDH
(307 bp)

Figure 4

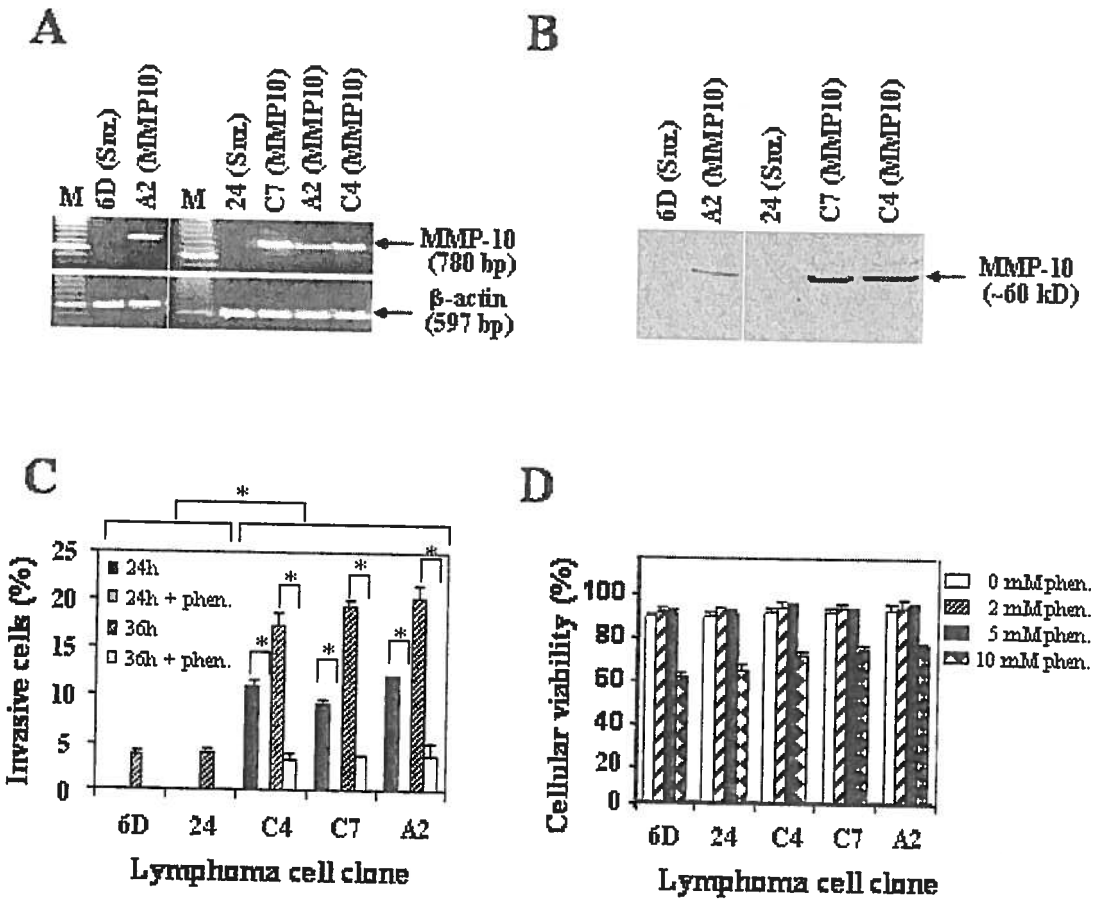
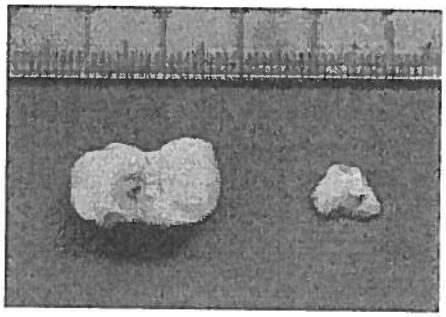
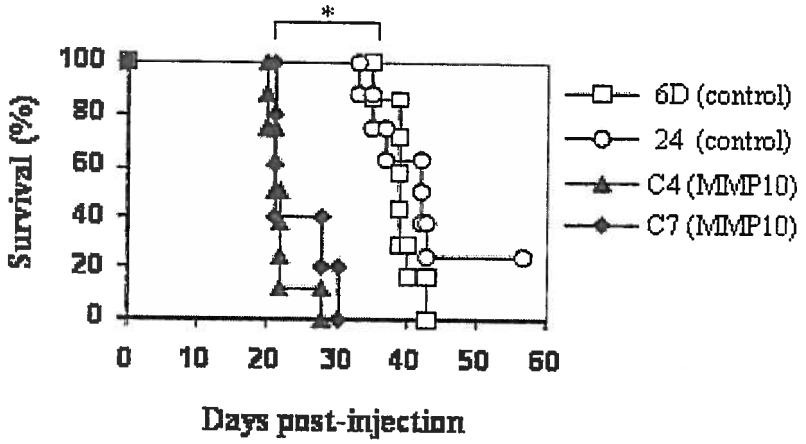

A
M
6D (Snx.)
A2 (MMP10)
M
24 (Snx.)
C7 (MMP10)
A2 (MMP10)
C4 (MMP10)
MMP-10 (780 bp)
β-actin (597 bp)
B
6D (Snx.)
A2 (MMP10)
24 (Snx.)
C7 (MMP10)
C4 (MMP10)
MMP-10 (~60 kD)
C
Invasive cells (%)
24h
24h + phen.
36h
36h + phen.
6D
24
C4
C7
A2
Lymphoma cell clone
D
Cellular viability (%)
0 mM phen.
2 mM phen.
5 mM phen.
10 mM phen.
6D
24
C4
C7
A2
Lymphoma cell clone

Figure 5

A



B


*
100
80
60
40
20
0
Survival (%)
0
10
20
30
40
50
60
Days post-injection
6D (control)
24 (control)
C4 (MMP10)
C7 (MMP10)

Legend to figures

Figure 1. MMP10 gene expression is induced in lymphoma cells on contact with endothelial cells. (**A**) MMP10 gene expression in murine T lymphoma and stromal cells. Levels of MMP10 transcripts were determined by RT-PCR analysis in 164T2 and 267 T lymphoma cells and in bEnd.3 endothelial cells and Hi-7 fibroblastic cells. Levels of MT4-MMP transcripts are shown as a specificity control . M, m.w. standards (100-bp DNA ladder). The lower thick band represents the 600-bp marker. Results are representative of at least three independent experiments. (**B**) Induction of MMP10 in lymphoma cells after contact with endothelioma cells, but not fibroblasts. The bEnd.3 endothelioma or Hi-7 fibroblastic cells were seeded at a density of 0.8×10^5 and 10^6 cells per well (Corning 12-well plate), respectively, and were cultured for 12 hours to reach approximatively 80% confluency. 164T2 or 267 T lymphoma cells (10^6 cells per well) were then added to the endothelial or fibroblastic layers. After indicated periods of intercellular contact, lymphoma cells were collected, total RNA extracted, and RT-PCR analysis using MMP10 and β-actin-specific primers was performed as described in «*Materials and Methods*». M, m.w. standards (100-bp DNA ladder). The lower thick band represents the 600-bp marker. Levels of MT4-MMP transcripts are shown as a specificity control . Results are representative of three independent experiments. (**C**) Control showing absence of endothelial cells in lymphoma cells preparations collected after contact with EC. Transcripts of E-selectin, a specific marker of EC, were found in RNA extracted from endothelioma cells but were undetectable in RNA samples of lymphoma cells collected after co-culture with EC. M, m.w. standards (100-bp DNA ladder). The lower thick band represents the 600-bp marker. Results are representative of at least three independent experiments with 164T2 as well as 267 T lymphoma cells. (**D**) Induction of MMP10 detected at the protein level. Western blot analysis of MMP10 in 267 T lymphoma cells that had been cultured alone during 3 hours after removal from an 18-hour interaction with bEnd.3 cells. Proteins (100 μg) from cell lysates were immunodetected with MMP10-specific polyclonal antibodies as described. Results are representative of two independent experiments.

Figure 2. The induction of MMP10 expression in lymphoma cells upon contact with endothelial cells is LFA-1- and ICAM-1-dependent. Involvement of LFA-1 and ICAM-1 in the induction of MMP10 expression in 164T2 T lymphoma cells after contact with EC was determined by pre-incubating (**A**) 164T2 T lymphoma cells for 30 min with blocking mAbs specific for LFA-1 (or VCAM-1 as an isotypic control) or (**B**) endothelial cells with mAbs specific for ICAM-1 (or VLA-4 as an isotypic control), and then washing pre-treated cells to remove excess Ab, before lymphoma and endothelial cells were co-cultured for 12 h. MMP10 gene expression was then analyzed at the mRNA level by RT-PCR as previously described and quantitative analysis of antibody inhibition was performed by imaging densitometry. M, m.w. standards (100-bp DNA ladder). The lower thick band represents the 600-bp marker. Results are representative of three independent experiments.

Figure 3. Upregulation of MMP10 in lymphoma cells upon exposure to cytokines. (**A**) Raji cells and (**B**) several B lymphoma cell lines were stimulated with various cytokines, including IL-13, for 14 hours. MMP10, MMP3 and TIMP-1 mRNA expression was then measured by RT-PCR, using HT1080 fibrosarcoma cell line as a positive control. Results are representative of at least three independent experiments. The expression of GAPDH was included as an RNA loading control. Results are representative of at least two independent experiments.

Figure 4. Generation of transfectant lymphoma cell clones over-expressing MMP10 and measure of their invasive behavior. (**A**) mRNA and (**B**) Western blot (100 μg/lane) analyses of MMP10 expression in 267 lymphoma cells transfected with the empty vector (SRα), or with the MMP10 cDNA. Clones were selected using puromycin-containing medium. Both control (empty SRα vector) and all MMP10 expressing clones shown were used for independent *in vivo* studies. M, m.w. standards (100-bp DNA ladder). Results are representative of at least two independent experiments. (**C**) The effect of MMP10 on the invasive behavior of lymphoma cells over-expressing MMP10 was determined using Matrigel-coated Transwell inserts. Invasion assays were conducted for 24h or 36h in serum-free media after pre-treatment or not of transfectant lymphoma cells with 5 mM 1,10-phenanthroline (PHEN) for 30 min. Results are means +/- SE for two

independent experiments, each performed in duplicates. *: p value ≤ 0.05. (**D**) Lack of cytotoxicity of PHEN treatment (5mM for 30 min). The different lymphoma cell transfectants were incubated with various concentrations of PHEN for 30 min before cell count with Trypan blue. Results are means +/- SE for two independent experiments, each performed in duplicates.

Figure 5. Effect of MMP10 on lymphoma growth. Lymphoma cell transfectants (5 x 10^3) were injected in each of the two thymic lobe in young C57BL/6 syngeneic mice. Mice exhibiting signs of distress and becoming moribund were killed by carbon monoxyde anesthesia and autopsied. Thymic lymphomas were confirmed at necropsy and fixed for histological examination. (**A**) Representative thymic lymphoma harvested at necropsy following intrathymic injection of lymphoma transfectant compared to a normal thymus on the right. (**B**) Survival analysis of tumor bearing-mice over a time period of 57 days after tumor injection. Thymic lymphoma induced by intrathymic inoculation of T lymphoma cells are restricted to the thymus, and do not metastasize to peripheral organs (40). The results are representative of two independent experiments with three different clones expressing MMP10. *: p value ≤ 0.05.

CHAPITRE 4

MMP9 (Gelatinase B) and MMP10 (stromelysin-2) delay the growth of subcutaneous lymphoma in vivo

Van Themsche C, Potworowski EF and St-Pierre Y

Contribution des auteurs

J'ai réalisé toutes les expériences décrites dans cet article. J'ai également réalisé toutes les expériences ajoutées en annexe. J'ai rédigé le manuscrit dans son entier, avant de le soumettre au Dr Édouard F. Potworowski (co-directeur de thèse) ainsi qu'au Dr Yves St-Pierre, qui l'ont lu et corrigé.

Résumé

Les MMP sont depuis longtemps considérées comme des enzymes pro-tumorales. Plusieurs études mettent notamment en évidence la capacité des MMP à accélérer la croissance de diverses tumeurs, dont les lymphomes non-Hodgkiniens. Il a en effet été démontré, en utilisant le modèle expérimental de lymphome thymique, que MMP9 et MMP10 pouvaient accélérer la croissance de tumeurs lymphoïdes dans le microenvironnement thymique. Le présent article, cependant, démontre au contraire que MMP9 et MMP10 retardent la croissance de tumeurs lymphoïdes dans la région sous-cutanée, où des transfectants stables de cellules lymphomateuses surexprimant MMP9 ou MMP10 génèrent des tumeurs plus tardivement que les cellules lymphomateuses témoin. Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse du « seed and soil », qui prédit que les propriétés tumorigéniques des cellules cancéreuses dépendent du microenvironnement qu'elles colonisent. De plus, nos résultats démontrent que les lymphocytes matures sont impliqués dans l'activité anti-tumorale de MMP9 et MMP10 sur la croissance du lymphome dans la région sous-cutanée, puisque des transfectants stables de cellules lymphomateuses surexprimant l'une ou l'autre de ces MMP sont davantage tumorigéniques chez des souris dont le gène Rag a été inactivé que chez des souris immunocompétentes. Ces résultats suggèrent ainsi que MMP9 et MMP10 augmentent la réponse immunitaire anti-tumorale dans l'environnement sous-cutané, un phénomène qui ne pouvait pas être observé dans le cadre d'études similaires basés sur l'utilisation de souris immunodéficientes. Enfin, nous avons obtenu des indications expérimentales que MMP9 et MMP10 exerçaient leur activité anti-tumorale à un stade précoce du processus de croissance du lymphome sous-cutané, puisque le temps de latence précédant l'apparition d'une tumeur palpable après injection de cellules lymphomateuses surexprimant une MMP est plus long que celui associé à l'injection de cellules lymphomateuses témoin; par ailleurs, MMP9 ou MMP10 sont présentes en quantités similaires dans les tumeurs au stade avancé dérivant de cellules lymphomateuses surexprimant une MMP et dans les tumeurs dérivant de cellules lymphomateuses témoin.

Introduction

Matrix metalloproteinases (MMPs) constitute a family of proteolytic enzymes that can cleave various matrix components (such as collagen and fibronectin), as well as several non-matrix proteins (including cytokines and growth factors, adhesion molecules and other proteases) (reviewed in (Visse et Nagase, 2003). Compelling data indicates that MMPs favor cancer progression. Indeed, MMPs are highly expressed in malignant tissues and in many types of tumor cells, their substrate-specific proteolytic activity correlates with the acquisition of enhanced invasive as well as metastatic abilities. In addition, several reports suggest a growth-promoting activity of MMPs towards cancer cells (reviewed by (Hojilla et al., 2003). Nonetheless, after the recent failure of MMP inhibitors in clinical trials, an emerging concept is that MMPs may not exert such a tumor-promoting role at all stages of cancer progression and therefore, the precise role of individual MMPs must be delimited at each stage of the different cancers (Coussens et al., 2002).

Non-Hodgkin's lymphomas (NHLs), as well as several other cancers, are associated with rapid tumor growth and severe metastatic disease that result in high mortality rates. MMP9 is highly expressed in aggressive NHL tumors (Kossakowska et al., 1993; Kossakowska et al., 1996), and our experimental model of NHL has previously allowed us to determine that MMP9, as well as MMP3 and MMP10, accelerate lymphoma growth in the primary thymic micro-environment (Aoudjit et al., 1999; Van Themsche et al., 2004a,b). These results were in agreement with previous reports on the tumorigenic role of MMPs. However, since tumorigenic properties of cancer cells depend on the organ microenvironment they are colonizing (Dougherty et al., 1994; Bonnotte et al., 2003), as predicted by the seed and soil hypothesis (Paget, 1989; Fidler, 2001), we hypothesized that the ability of MMP9- and MMP10-expressing transfectant lymphoma cells to rapidly generate tumors in the primary thymic microenvironment might not be as pronounced in different, secondary organ microenvironments. Since patients with various NHLs present secondary tumours in the cutaneous region and because most available data concerning the role of MMPs in tumor growth has been obtained using the subcutaneous route of injection, we characterized the influence of MMP9 and MMP10 on lymphoma growth in

the subcutaneous region. We found that 1) both MMP9 and MMP10 delay subcutaneous lymphoma growth in wild-type C57BL/6 mice; 2) the growth-delaying activity of MMP10 and MMP9 involves mature peripheral T and/or B lymphocytes, and 3) the anti-tumorigenic properties of these MMPs on subcutaneous lymphoma takes place at an early stage in the process of tumor growth.

Materials and methods

Mice. Male and female C57BL/6 mice were bred in our animal facility and maintained under specific pathogen-free conditions and in accordance with institutional guidelines. Breeder pairs for the C57BL/6 mouse colony were purchased from Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). Rag-deficient C57BL/6 mice were a kind gift from Dr Alain Lamarre (INRS-Institut Armand-Frappier).

Cell lines and reagents. The origin of the 267 T lymphoma cell line, which was isolated from a radiation-induced thymic lymphoma in C57BL/6 mice, has been described previously (21). MMP10 stable transfectants (267-MMP10) (Van Themsche et al., 2004b) and MMP9 stable transfectants (267-MMP9) had been generated previously by our group (Aoudjit et al., 1999). Transfectant lymphoma cells and control cells (267-Sr□ in the case of MMP10 and 267-PBK-RSV in the case of MMP9) 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 □g/ml streptomycin and 55 □M □-mercaptoethanol.

RNA isolation and analysis. Total RNA was isolated using RNeasy kit (Qiagen, Burlington, ON) according to the manufacturer's instructions. First strand cDNA was synthesized from 2-3 □g of total cellular RNA using the Superscript II (GIBCO Life Technologies). For RNA analysis by polymerase chain reaction (PCR) amplification, oligonucleotide primers were designed according to DNA sequences for mouse stromelysin-2 (MMP10) obtained from Genbank (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD) and chosen to have approximately a 50% GC content. In the case of mouse MMP10, the sense (5'AGG GAC CAA CTT ATT CCT GG 3') and anti-sense (5' CAG TAT GTG TGT CAC CGT CC 3') primers were located in exons V and X, respectively. Primers for MMP9 were 5' CCATGAGTCCCTGGCAG 3' (sense) and 5' AGTATGGATGTTATGATG 3' (antisense); the β-actin-specific primers were 5' CAT GGA TGA CGA TAT CGC TGC GC 3' (sense) and 5' GCT GTC GCC ACG CTC GGT CAG GAT C-3' (anti-sense). Amplification of β-actin cDNA was used as an RNA

loading control. Amplification of specific genes was performed in a MJ Research Thermal cycler (model PTC-100TM) using the following parameters: 1 min at 94°C, 1 min at 60°C and 1 min at 72°C for 35 cycles, except for □-actin which only required 25 cycles. The amplification for each gene was in the linear part of the curve. The reaction mixture was size-separated on an agarose gel, and specifically amplified products were detected by ethidium bromide staining and ultraviolet transillumination. Quantitative analysis was carried out using a computerized densitometric imager (BioRad, model GS-670, Mississauga, ON). DNA sequencing of the amplicons confirmed the specificity of the PCR reactions.

Gelatin zymography. Aliquots of 200 μl of serum-free conditioned media from subconfluent transfectants cultured for 24h were collected and assessed by zymography for the presence of extracellular MMP9 enzyme. Samples were applied without heating or reduction to a 7.5% polyacrylamide gel containing 1mg/ml bovine gelatin (Sigma). After electrophoresis, gels were washed twice for 60 min with 2.5% Triton X-100, then briefly with water, and incubated for 40h in 50 mM Tris-HCl (pH 5.5) containing 5 mM CaCl2, and 0.02% NaN3 at 37°C. After incubation, the gels were stained with 0.25% Coomassie blue R-250 and destained with 10% methanol and 10% acetic acid. Proteolytic bands appeared clear on blue-stained background. Conditioned media from PMA-stimulated human fibrosarcoma cells HT1080, which express MMP9 and MMP2, was used as a positive control.

Invasion assay. The invasive properties of MMP9-expressing lymphoma cell clones were measured by the invasion of cells through Matrigel-coated Transwell inserts (Costar, Corning, Cambridge, MA). Briefly, Transwell inserts with an 8-□m pore-size were coated with a 2 mg/ml Matrigel and lymphoma cells (2 x 105 cells) were added to the upper chamber inserts in Transwell chamber plates filled with pre-warmed complete medium containing supernatant (1:1) from mitogen-activated (Con A) T cell cultures as a source of T cell chemoattractant (29). Plates were incubated for 24 or 36 hours in a CO2 incubator. Percentage of cell invasion was calculated from the ratio of cells recovered from the lower compartment to the total number of cells loaded in the upper compartment. In some experiments, lymphoma cells were re-suspended in RPMI

containing 5 mM 1,10-phenanthroline and incubated at 37□C for 30 min before their addition to Transwell chamber plates. At least two independent experiments were performed for each lymphoma cell clone, where each clone was analyzed in duplicate.

Induction of subcutaneous lymphoma. Five to six-week-old wt or Rag-deficient C57BL/6 mice (3-7 mice per group) were injected subcutaneously (s.c.) in the right flank with 2 X 107 MMP-expressing or control lymphoma cells. Size of tumors was then regularly measured and mice were killed when tumor reached 2500 mm3. In this s.c. growth model, injected lymphoma cells generate tumors that grow with various speeds, depending notably on the phenotype of the injected lymphoma cells (in this case, over-expression or not of MMPs). Thus, survival of the animals depends on the growth rate of their subcutaneous tumor, which dictates at what moment the animals will have to be sacrificed. All the animal research was reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at the INRS-Institut Armand-Frappier in accordance with institutional and Canadian guidelines for animal experiments.

Induction of primary thymic lymphoma. Five to six-week-old C57BL/6 mice (5-10 mice per group) were injected intra-thymically (i.t.) in each of the two thymic lobes with 5 X 103 MMP10-expressing or control lymphoma cells. Mice were then regularly observed for clinical signs of thymic lymphoma (runting, swelling of the thorax, and dyspnea), which only appear at the end-stage of the disease and reveal imminent death owing to pulmonary compression by oversized thymic tumor. In this thymic lymphoma growth model, injected lymphoma cells generate tumors that grow with various speeds, depending notably on the phenotype of the injected lymphoma cells (in this case, overexpression or not of MMP10). Thus, survival of the animals depends on the growth rate of their thymic lymphoma, which dictates at what moment the animals will suffer from dyspnea and will have to be sacrificed. The presence of thymic tumors is then confirmed at necropsy. All the animal research was reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at the INRS-Institut Armand-Frappier in accordance with institutional and Canadian guidelines for animal experiments.

Statistical analysis. Statistical significance was measured using a log rank test and the level of significance was established at $p < 0.05$.

Results

Invasive in vitro behavior of lymphoma cells overexpressing MMP9. Before proceeding to the in vivo subcutaneous lymphoma growth experiments, which required the injection of MMP-expressing lymphoma cells and control cells, we routinely performed an in vitro characterization of MMP expression by the various cell lines. The generation and characterization of MMP10 transfectant lymphoma cells (clones A2, C4, and C7) as well as empty vector-containing control lymphoma cells (clones 6D and 24) has been described recently (Van Themsche et al., 2004b); the characterization of MMP9 stable transfectants, which had been generated earlier by our group (Aoudjit et al., 1999) is presented here. MMP9 nucleic (Fig. 1A) and proteic (Fig. 1B) levels were thus determined in thawed transfectants using RT-PCR and gelatin zymography, respectively. In both cases, MMP9 production was detectable in MMP9 transfectants but not in control cells. We then measured the effect of MMP9 expression on the ability of lymphoma cells to migrate through a matrigel-based matrix. We found that overexpression of MMP9 by lymphoma transfectants significantly improved their ability to migrate through the matrix compared to cells transfected with the control vector (Fig. 1C). The ability of the metalloproteinase-specific inhibitor phenanthroline (phen) to inhibit the invasive behavior of lymphoma transfectants shows that this effect is indeed MMP-dependent.

MMP10 delays the growth of subcutaneous lymphoma in immunocompetent mice. To determine the tumorigenic properties of MMP10 in subcutaneous lymphoma growth, the characterized lymphoma transfectants were then injected subcutaneously in wild-type C57BL/6 mice. At this site of tumor growth, MMP10-overexpressing lymphoma transfectants (clones A2, C4 and C7) repeatedly generated tumors less efficiently than empty vector-transfected control lymphoma cells (clones 6D and 24), which resulted in longer survival time of recipient animals (Fig. 2). Indeed, mean survival time of mice injected with MMP10 transfectants clones A2, C4 and C7 was 24 +/- 2 days, 25 +/- 2 days and 22 +/- 1 days, respectively, compared to 18 +/- 2 days, 19 +/- 2 days and 16 +/- 1 days for control lymphoma cells ($p < 0.05$; see Table I). Moreover, in the case of clone C7, only half of recipient animals developed tumors; in this case mean survival time was

calculated using data from animals that developed a tumor. The longer survival time associated with MMP10 overexpression by lymphoma cells was the result of a longer latency period, i.e. the number of days post-injection before a palpable tumor was detectable at the site of injection. Indeed, mean latency period of mice injected with MMP10 transfectants clones A2, C4 and C7 was 14 +/- 2 days, 15 +/- 2 days and 13 +/- 2 days, respectively, compared to 8 +/- 2 days, 7 +/- 1 days and 6 +/- 1 days for control lymphoma cells ($p < 0.05$; see Table I). We thus conclude from these series of in vivo tumor growth experiments that MMP10 delays the growth of subcutaneous lymphoma in immunocompetent mice.

MMP9 delays the growth of subcutaneous lymphoma in immunocompetent mice. Similarly to MMP10, in the subcutaneous region, MMP9-overexpressing lymphoma transfectant repeatedly generated tumors less efficiently than empty vector-transfected control lymphoma cells, which again resulted in longer survival time of recipient animals; in the case of MMP9 however, the prolonged survival time associated with MMP9 overexpression by lymphoma cells was even more pronounced (Fig. 3). Indeed, mean survival time of mice injected with MMP9 transfectants was 40 +/- 3 days, compared to 19 +/- 1 days for control lymphoma cells (Table I). This longer survival time was also accompanied by a longer latency period; mean latency period of mice injected with MMP9 transfectant was 15 +/- 2 days, compared to 8 +/- 1 days for control lymphoma cells (Table I). These results lead us to conclude that MMP9 delays the growth of subcutaneous lymphoma in immunocompetent mice.

The growth-delaying activity of MMP10 requires the presence of mature lymphocytes. It has previously been showed that bone marrow-derived cells that infiltrate developing tumors can supply MMP9 to the tumor microenvironment and influence cancer progression (Coussens et al., 2000a). To determine whether bone marrow-derived immune cells such as lymphocytes were involved in the growth-delaying properties of MMP10 and MMP9 on subcutaneous lymphoma in immunocompetent mice, we performed additional series of subcutaneous injection of transfectant lymphoma cells but this time, using Rag-deficient immunocompromised mice. These animals do not produce

mature peripheral T and B cells as a result of the lack of recombinases encoded by rag (recombination-activating gene), which are responsible for the maturation of T and B cell receptors. In these conditions, we found that MMP10 entirely lost its growth-delaying properties; indeed, the survival plots of Rag-deficient animals injected with MMP10 transfectant or control lymphoma cells were almost identical (Fig. 4). Correspondingly, mean survival time (26 +/- 2 days for MMP10 transfectant and 26 +/- 3 days for control lymphoma cells) and mean latency period (16 +/- 1 days for MMP10 transfectant and 16 +/- 2 days for control lymphoma cells) were not significantly different whether lymphoma cell overexpressed MMP10 or not (Table I). These results indicate that the growth-delaying effect of MMP10 on subcutaneous lymphoma depends on the presence of peripheral T and/or B lymphocytes.

Lymphocytes also contribute to the growth-delaying activity of MMP9. Similar to MMP10, we found that a lack of mature T and B lymphocytes also reduced the growth-delaying properties of MMP9 on subcutaneous lymphoma. As shown in Figure 5, Rag-deficient mice injected with MMP9 transfectant survived less longer than wild-type mice injected with this MMP9 transfectant, although they lived longer than Rag-deficient mice who received control lymphoma cells (Fig. 5). Rag-deficient mice who received MMP9 transfectant had mean survival time of 32 +/- 3 days, whereas the group of wild-type mice survived 39 +/- 4 days; in comparison, mean survival times of wild-type mice and Rag-deficient mice who received control lymphoma cells were 22 +/- 2 days and 21 +/- 2 days, respectively (Table I). These results indicate that mature lymphocytes contribute to the growth-delaying properties of MMP9.

To determine at which stage in the process of tumor growth did MMP9 and MMP10 exert their anti-tumorigenic activities, we determined the expression level of MMP9 or MMP10 in tumors originating from both MMP transfectants as well as control lymphoma cells. Tumors were collected from tumor-bearing animals whose tumor had reached a size of 2500 mm3; tumor samples were thus representative of established, end-stage tumors. In these conditions, we found that MMP10 mRNA was indeed present within tumors originating from MMP10 transfectant and also that MMP9 mRNA was present within

tumors originating from MMP9 transfectant (Fig. 6). In addition, we found that similar levels of these MMPs were also present in tumors originating from control lymphoma cells, which did not express any detectable level of MMPs before injection (Fig. 1 and Van Themsche et al., 2004b). These result suggest that the growth-delaying activity of MMP10 and MMP9 on subcutaneous lymphoma does not take place at a late stage, but rather at an early stage in the process of tumor growth.

Discussion

Our group has previously shown that MMP9 as well as MMP10 can accelerate the growth of primary thymic lymphoma (Aoudjit et al., 1999)(Van Themsche et al., 2004b). In the present study, we report that MMP9 as well as MMP10 can delay the growth of subcutaneous lymphoma tumors in vivo, in immunocompetent mice. Moreover, we have provided evidence that mature T and/or B lymphocytes are involved in this process and that the anti-tumorigenic activity of MMP9 and MMP10 takes place at an early stage in the process of tumor growth.

The transfectant lymphoma cells that were used to characterize the role of MMP9 and MMP10 in lymphoid tumor growth have been characterized in vitro and were shown to exhibit enhanced invasive properties, in agreement with other studies reporting improved invasive properties of various MMP-overexpressing tumor cells in vitro (Uhm et al., 1996; Sawicki et al., 1998; Kossakowska et al., 1999; Kondraganti et al., 2000) as well as in vivo (Adachi et al., 2001; Hu et al., 2003; Mercapide et al., 2003). This MMP-enhanced invasive phenotype is generally attributed to the proteolytic degradation of complex proteins forming the extracellular matrix and consequent tissue loosening that facilitates migration of tumor cells; it is also widely assumed to augment tumorigenic properties of tumor cells. In this regard, our results indicating that highly invasive MMP-overexpressing lymphoma cells can exhibit reduced tumorigenic properties could seem surprising. Nonetheless, other studies had previously showed that tumorigenic properties of cancer cells vary depending on the organ microenvironment they are colonizing (Dougherty et al., 1994; Bonnotte et al., 2003). Their results and ours are in agreement with the seed and soil hypothesis (Paget, 1989; Fidler, 2001), which predicts that the outcome of cancer progression is not only influenced by properties inherent to the tumor cells, but also by properties of the organ microenvironment they are colonizing. Indeed, albeit MMP9 (Aoudjit et al., 1999) and MMP10 (Fig. 7; Van Themsche et al., 2004b) stable transfectants were previously shown to be more tumorigenic than control lymphoma cells in the thymic microenvironment, the present study shows that they are less tumorigenic than control lymphoma cells in the subcutaneous region. The key to

understanding the mechanisms whereby MMP10 and MMP9 delay the growth of subcutaneous lymphoma thus probably resides within the particularities of the subcutaneous microenvironment.

The subcutaneous route of injection is a well-established model of tumor growth; it has notably been used to assess the influence of various agents on tumor growth, namely Cox inhibitors (Kamate et al., 2002), reoviruses (Alain et al., 2002), interleukins (Stearns et al., 1997), several cytotoxic drugs (O-Charoenrat et al., 2002) and MMPs. However, most experimental data on the role of MMPs in tumor growth was obtained using immunocompromised nude or SCID mice, mostly because it involved the injection of human tumor cells. These experiments showed that, although increased MMP expression in tumors may sometimes have no effect on s.c tumor growth, as observed when MMP7 is overexpressed by colorectal cancer cells (Adachi et al., 1999; Adachi et al., 2001), it is often associated with increased tumorigenicity; it is notably the case for MMP2 expression by melanoma cells (Hofmann et al., 1999a; Gershenwald et al., 2001), MMP9 expression in gliomas (Lakka et al., 2003), MMP11 expression by breast carcinoma cells (Noel et al., 1996), as well as MMP13 expression within squamous cell carcinomas (Ala-Aho et al., 2004). In these conditions, therefore, the impact of lymphocyte-mediated antitumor immune response on MMP-modulated tumor growth was not taken into account. On the contrary, in the rare reports of subcutaneous injection into immunocompetent hosts, MMPs were shown to lose their tumor-promoting properties: it is notably the case for MMP9, which causes a reduction in subcutaneous growth of colonic carcinoma in wild-type Balb/c mice (Pozzi et al., 2002). It thus appears that the presence of lymphocytes modulates the growth-promoting abilities of MMPs.

In our experimental model of lymphoma, the disparity between the tumorigenic properties of MMP-expressing lymphoma cells in different microenvironments could thus be attributable to local differences in antitumor immune response. Indeed, besides the fact that the thymus represents the primary organ, whereas the skin is considered as a secondary organ, another factor that distinguishes the two sites of tumor growth relies on their susceptibility to specific antitumor immune response. Indeed, the thymus is an

immunoprivileged organ that cannot be infiltrated by peripheral lymphocytes; therefore, the only immune response that can be elicited against thymic lymphoma is non-specific as it is mediated by resident thymic cells. However, this is not the case in the subcutaneous region, where a specific antitumor immune response involving mature T and/or B lymphocytes can be mounted (Khar et al., 1996; Jurianz et al., 1998; Aruga et al., 2000). In fact, there appears to be a lymphocyte-mediated immune response to lymphoma tumors in our experimental model of subcutaneous growth, since mean latency period was longer when control lymphoma cells were injected in Rag-deficient mice compared to wild-type animals (Table 1). Strikingly, MMP-overexpressing lymphoma transfectants are less tumorigenic in the subcutaneous region of immunocompetent mice than within the immuno-privileged thymus of immunocompetent mice or the subcutanenous region in the absence of T and B lymphocytes. This suggests that MMP10 and MMP9 produced by lymphoma cells enhance the T and/or B lymphocyte-mediated immune response to subcutaneous tumors in immunocompetent mice; in this regard, it is tempting to speculate that MMP9 and MMP10 could directly modulate the antitumor immune response in the subcutaneous region of immunocompetent mice, presumably by favoring peripheral T and/or B lymphocyte infiltration or activity in the lymphoid tumors. It has notably been shown that MMP9 can cleave IL-8 and potentiate its chemoattractant properties over immune cells (Van den Steen et al., 2000; Van den Steen et al., 2003); we are currently evaluating whether tumors originating from MMP9 transfectants in wild-type mice are infiltrated with more immune cells than those originating from control lymphoma cells. Alternatively, MMP9 can cleave membrane-bound TNF□ (Goetzl et al., 1996), which is notably produced by CD4+ T lymphocytes (Rotteveel et al., 1988); it has been shown that TNF□ can reduce tumor growth (Palladino et al., 1987; Mule et al., 1988; Mauceri et al., 2002).

Since MMP9 and MMP10 can cause a reduction of s.c. tumor growth, expression and activity of these MMPs may therefore be deleterious for subcutaneous tumors; incidently, tumor cells isolated from s.c. tumors often do not produce MMPs themselves, but MMP expression is rather induced in adjacent stromal cells (Nakajima et al., 1990; Mc Donnell et al., 1999). It is also the case with our lymphoma cells, which were previously shown to

induce the expression of MMP9 in stromal cells in vitro (Aoudjit et al., 1998b). Stromal origin of MMPs in tumors was generally considered as an host response to tumor cell-derived signals and is thought to favor cancer progression, since many studies pointed to a pro-tumorigenic role of MMPs (Bernhard et al., 1994; Witty et al., 1994) and anti-tumorigenic effect of MMP inhibitors (Khokha, 1994; Bu et al., 1998). It appears, however, that local MMP production can decrease tumorigenic abilities of tumor cells in particular organ microenvironments. This induction of MMP expression in stromal cells could therefore constitute a host mechanism of antitumor response. It should then be determined whether stromal-derived MMPs are sufficient to delay the growth of subcutaneous tumors; the availability of MMP9-deficient mice will allow us to address this matter in the case of lymphoma.

References

Adachi Y., Itoh F., Yamamoto H., Iku S., Matsuno K., Arimura Y., Imai K. Retinoic acids reduce matrilysin (matrix metalloproteinase 7) and inhibit tumor cell invasion in human colon cancer. Tumour Biol. 2001; 22(4): 247-53.

Adachi Y., Yamamoto H., Itoh F., Hinoda Y., Okada Y., Imai K. Contribution of matrilysin (MMP7) to the metastatic pathway of human colorectal cancers. Gut. 1999; 45(2): 252-8.

Ala-Aho R., Ahonen M., George S. J., Heikkila J., Grenman R., Kallajoki M., Kahari V. M. Targeted inhibition of human collagenase-3 (MMP13) expression inhibits squamous cell carcinoma growth in vivo. Oncogene. 2004;

Alain T., Hirasawa K., Pon K. J., Nishikawa S. G., Urbanski S. J., Auer Y., Luider J., Martin A., Johnston R. N., Janowska-Wieczorek A., Lee P. W., Kossakowska A. E. Reovirus therapy of lymphoid malignancies. Blood. 2002; 100(12): 4146-53.

Aoudjit F, Masure S., Opdenakker G., Potworowski EF, St-Pierre Y. Gelatinase B/MMP9 but not its inhibitor (TIMP-1) dictates the growth rate of experimental thymic lymphoma. Int J Cancer. 1999; 82(5): 43-7.

Aoudjit F., Potworowski E.F., St-Pierre Y. Bi-directional induction of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 during T lymphoma/endothelial cell contact: implication of ICAM-1. The journal of immunology. 1998; 160(6): 2967-73.

Aruga E., Tanigawa K., Aruga A., Arai H., Smith J. W., 2nd, Nickoloff B. J., Nabel G. J., Chang A. E. CD95-mediated tumor recognition by CD4+ effector cells in a murine mammary model. J Immunother. 2000; 23(2): 225-34.

Bernhard EJ, Gruber SB, Muschel RJ. Direct evidence linking expression of matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/collagenase) to the metastatic phenoype in transformed rat embryo cells. Proc Natl Acad Sci USA. 1994; 91(10): 4293-7.

Bonnotte B., Gough M., Phan V., Ahmed A., Chong H., Martin F., Vile R. G. Intradermal injection, as opposed to subcutaneous injection, enhances immunogenicity and suppresses tumorigenicity of tumor cells. Cancer Res. 2003; 63(9): 2145-9.

Bu W., Tang Z. Y., Sun F. X., Ye S. L., Liu K. D., Xue Q., Chen J., Gao D. M. Effects of matrix metalloproteinase inhibitor BB-94 on liver cancer growth and metastasis in a patient-like orthotopic model LCI-D20. Hepatogastroenterology. 1998; 45(22): 1056-61.

Coussens L. M., Tinkle C. L., Hanahan D., Werb Z. MMP9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. Cell. 2000; 103(3): 481-90.

Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. Science. 2002; 295(5564): 2387-92.

Dougherty G. J., Thacker J. D., Lavey R. S., Belldegrun A., McBride W. H. Inhibitory effect of locally produced and exogenous interleukin-6 on tumor growth in vivo. Cancer Immunol Immunother. 1994; 38(5): 339-45.

Fidler IJ. Seed and soil revisited. Contribution of the organ microenvironment to cancer metastasis. Surg Oncol Clin N Amer. 2001; 10(2): 257-68.

Gershenwald J. E., Sumner W., Calderone T., Wang Z., Huang S., Bar-Eli M. Dominant-negative transcription factor AP-2 augments SB-2 melanoma tumor growth in vivo. Oncogene. 2001; 20(26): 3363-75.

Goetzl E. J., Banda M. J., Leppert D. Matrix metalloproteinases in immunity. J Immunol. 1996; 156(1): 1-4.

Hofmann U. B., Westphal J. R., Waas E. T., Zendman A. J., Cornelissen I. M., Ruiter D. J., van Muijen G. N. Matrix metalloproteinases in human melanoma cell lines and xenografts: increased expression of activated matrix metalloproteinase-2 (MMP2) correlates with melanoma progression. Br J Cancer. 1999; 81(5): 774-82.

Hojilla C. V., Mohammed F. F., Khokha R. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors direct cell fate during cancer development. Br J Cancer. 2003; 89(10): 1817-21.

Hu B., Guo P., Fang Q., Tao H. Q., Wang D., Nagane M., Huang H. J., Gunji Y., Nishikawa R., Alitalo K., Cavenee W. K., Cheng S. Y. Angiopoietin-2 induces human glioma invasion through the activation of matrix metalloprotease-2. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003; 100(15): 8904-9.

Jurianz K., von Hoegen P., Schirrmacher V. Superiority of the ear pinna over a subcutaneous tumour inoculation site for induction of a Th1-type cytokine response. Cancer Immunol Immunother. 1998; 45(6): 327-33.

Kamate C., Baloul S., Grootenboer S., Pessis E., Chevrot A., Tulliez M., Marchiol C., Viguier M., Fradelizi D. Inflammation and cancer, the mastocytoma P815 tumor model revisited: triggering of macrophage activation in vivo with pro-tumorigenic consequences. Int J Cancer. 2002; 100(5): 571-9.

Khar A., Kausalya S., Kamal M. A. AK-5 tumor-induced modulation of host immune function: upregulation of Th-1-type cytokine response mediates early tumor regression. Cytokines Mol Ther. 1996; 2(1): 39-46.

Khokha R. Suppression of the tumorigenic and metastatic abilities of murine B16F10 melanoma cells in vitro by the overexpression of the tissue inhibitor of the metalloproteinases-1. J Natl Cancer Inst. 1994; 86(4): 299-304.

Kondraganti S., Mohanam S., Chintala S. K., Kin Y., Jasti S. L., Nirmala C., Lakka S. S., Adachi Y., Kyritsis A. P., Ali-Osman F., Sawaya R., Fuller G. N., Rao J. S. Selective suppression of matrix metalloproteinase-9 in human glioblastoma cells by antisense gene transfer impairs glioblastoma cell invasion. Cancer Res. 2000; 60(24): 6851-5.

Kossakowska AE, Edwards DR, Prusinkiweicz C, Zhang MC, Guo D, Urbanski SJ, Grogan T, Marquez LA, Janowska-Wieczorek A. Interleukin-6 regulation of matrix metalloproteinase (MMP2 and MMP9) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1) expression in malignant non-Hodgkin's lymphomas. Blood. 1999; 94(6): 2080-9.

Kossakowska AE, Huchcroft SA, Urbanski SJ, Edwards DR. Comparative analysis of the expression patterns of metalloproteinases and their inhibitors in breast neoplasia, sporadic colorectal neoplasia, pulmonary carcinomas and malignant non-Hodgkin's lymphomas in humans. Br J Cancer. 1996; 73(11): 1401-8.

Kossakowska AE, Urbanski SJ, Watson A, Hayden LJ, Edwards DR. Patterns of expression of metalloproteinases and their inhibitors in human malignant lymphomas. Oncol Res. 1993; 5(1): 19-28.

Lakka S. S., Gondi C. S., Yanamandra N., Dinh D. H., Olivero W. C., Gujrati M., Rao J. S. Synergistic down-regulation of urokinase plasminogen activator receptor and matrix metalloproteinase-9 in SNB19 glioblastoma cells efficiently inhibits glioma cell invasion, angiogenesis, and tumor growth. Cancer Res. 2003; 63(10): 2454-61.

Mauceri H. J., Seetharam S., Beckett M. A., Lee J. Y., Gupta V. K., Gately S., Stack M. S., Brown C. K., Swedberg K., Kufe D. W., Weichselbaum R. R. Tumor production of angiostatin is enhanced after exposure to TNF-alpha. Int J Cancer. 2002; 97(4): 410-5.

Mc Donnell S., Chaudhry V., Mansilla-Soto J., Zeng Z. S., Shu W. P., Guillem J. G. Metastatic and non-metastatic colorectal cancer (CRC) cells induce host metalloproteinase production in vivo. Clin Exp Metastasis. 1999; 17(4): 341-9.

Mercapide J, Lopez De Cicco R, Castresana SS, Klein-Szanto AJP. Stromelysin-1/matrix metalloproteinase-3 (MMP3) expression accounts for invasive properties of human astrocytoma cell lines. Int J Cancer. 2003; 106(5): 676-82.

Mule J. J., Asher A., McIntosh J., Lafreniere R., Shiloni E., Lefor A., Reichert C. M., Rosenberg S. A. Antitumor effect of recombinant tumor necrosis factor-alpha against murine sarcomas at visceral sites: tumor size influences the response to therapy. Cancer Immunol Immunother. 1988; 26(3): 202-8.

Nakajima M., Morikawa K., Fabra A., Bucana C. D., Fidler I. J. Influence of organ environment on extracellular matrix degradative activity and metastasis of human colon carcinoma cells. J Natl Cancer Inst. 1990; 82(24): 1890-8.

Noel A. C., Lefebvre O., Maquoi E., VanHoorde L., Chenard M. P., Mareel M., Foidart J. M., Basset P., Rio M. C. Stromelysin-3 expression promotes tumor take in nude mice. J Clin Invest. 1996; 97(8): 1924-30.

O-Charoenrat P, Rhys-Evans P., Eccles S. A synthetic matrix metalloproteinase inhibitor prevents squamous carcinoma cell proliferation by interfering with epidermal growth factor receptor autocrine loops. Int J Cancer. 2002; 100(5): 527-33.

Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. Cancer Metastasis Rev. 1989; 8(2): 98-101.

Palladino M. A., Jr., Shalaby M. R., Kramer S. M., Ferraiolo B. L., Baughman R. A., Deleo A. B., Crase D., Marafino B., Aggarwal B. B., Figari I. S., et al. Characterization of

the antitumor activities of human tumor necrosis factor-alpha and the comparison with other cytokines: induction of tumor-specific immunity. J Immunol. 1987; 138(11): 4023-32.

Pozzi A, LeVine WF, Gardner HA. Low plasma levels of matrix metalloproteinase 9 permit increased tumor angiogenesis. Oncogene. 2002; 21(2): 272-81.

Rotteveel F. T., Kokkelink I., van Lier R. A., Kuenen B., Meager A., Miedema F., Lucas C. J. Clonal analysis of functionally distinct human CD4+ T cell subsets. J Exp Med. 1988; 168(5): 1659-73.

Sawicki G., Matsuzaki A., Janowska-Wieczorek A. Expression of the active form of MMP2 on the surface of leukemic cells accounts for their in vitro invasion. J Cancer Res Clin Oncol. 1998; 124(5): 245-52.

Stearns M. E., Fudge K., Garcia F., Wang M. IL-10 inhibition of human prostate PC-3 ML cell metastases in SCID mice: IL-10 stimulation of TIMP-1 and inhibition of MMP2/MMP9 expression. Invasion Metastasis. 1997; 17(2): 62-74.

Uhm J. H., Dooley N. P., Villemure J. G., Yong V. W. Glioma invasion in vitro: regulation by matrix metalloprotease-2 and protein kinase C. Clin Exp Metastasis. 1996; 14(5): 421-33.

Van den Steen P. E., Proost P., Wuyts A., Van Damme J., Opdenakker G. Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO-alpha and leaves RANTES and MCP-2 intact. Blood. 2000; 96(8): 2673-81.

Van den Steen PE, Wuyts A, Husson SJ, Proost P, Van Damme J, Opdenakker G. Gelatine B/MMP9 and neutrophil collagenase/MMP8 process the chemokines human

GCP-2/CXCL6, ENA-78/CXCL5 and mouse GCP-2/LIX and modulate their physological activities. Eur J Biochem. 2003; 270(18): 3739-49.

Van Themsche C, Potworowski EF, St-Pierre Y. Stromelysin-1 (MMP3) is inducible in T lymphoma cells and accelerates the growth of lymphoid tumors in vivo. Biochem Biophys Res Commun. 2004a; 315(4): 884-91.

Van Themsche C, Tommy Alain, Anna E. Kossakowska, Stefan Urbanski, Édouard F. Potworowski, Yves St-Pierre. Stromelysin-2 (MMP10) is inducible in lymphoma cells and accelerates the growth of lymphoid tumors in vivo. J Immunol (sous presse). 2004b.

Visse R., Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. Circ Res. 2003; 92(8): 827-39.

Witty JP, McDonnell S, Newell KJ, Cannon P, Navre M, Tressler RJ, Matrisian LM. Modulation of matrilysin levels in colon carcinoma cell lines affects tumorigenicity in vivo. Cancer Res. 1994; 54(17): 4805-12.

Table 1

Figure	Lymphoma clone	Mouse strain	Number of tumor-bearing mice	Mean latency period (days)	p value	Mean survival time (days)	p value
2A	MMP-10 # A2	wt	6/6	14 +/- 2	0.0054	24 +/- 2	0.0470
	Control # 6D	wt	7/7	8 +/- 2		18 +/- 2	
2B	MMP-10 # C4	wt	5/5	15 +/- 2	0.0027	25 +/- 2	0.0039
	Control # 6D	wt	4/4	7 +/- 1		19 +/- 2	
2C	MMP-10 # C7	wt	2/4	13 +/- 2	0.0037	22 +/- 1	0.0019
	Control # 24	wt	5/5	6 +/- 1		16 +/- 1	
3	MMP-9	wt	4/4	15 +/- 2	0.0280	40 +/- 3	0.0058
	Control	wt	4/4	8 +/- 1		19 +/- 1	
4	MMP-10 # C7	Rag -/-	5/5	16 +/- 1	0.8100	26 +/- 2	0.7518
	Control # 24	Rag -/-	6/6	16 +/- 2		26 +/- 3	
5	MMP-9	wt	3/3	17 +/- 1	] 0.0025	39 +/- 4	] 0.0149
	Control	wt	5/5	7 +/- 1		22 +/- 2	
	MMP-9	Rag -/-	5/5	19 +/- 2	] 0.0402	32 +/- 3	] 0.0016
	Control	Rag -/-	5/5	12 +/- 1		21 +/- 2	

Figure 1

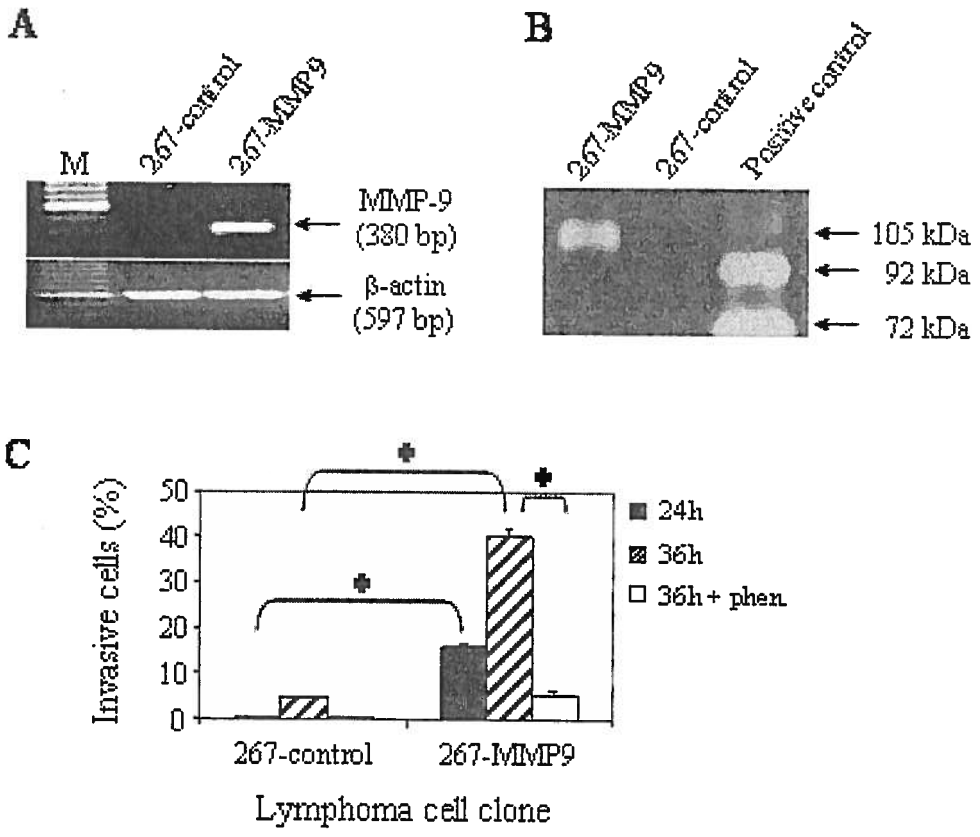

A
M
267-control
267-MMP9
MMP-9
(380 bp)
β-actin
(597 bp)
B
267-MMP9
267-control
Positive control
105 kDa
92 kDa
72 kDa
C
Invasive cells (%)
50
40
30
20
10
0
24h
36h
36h + phen.
267-control
267-MMP9
Lymphoma cell clone

Figure 2

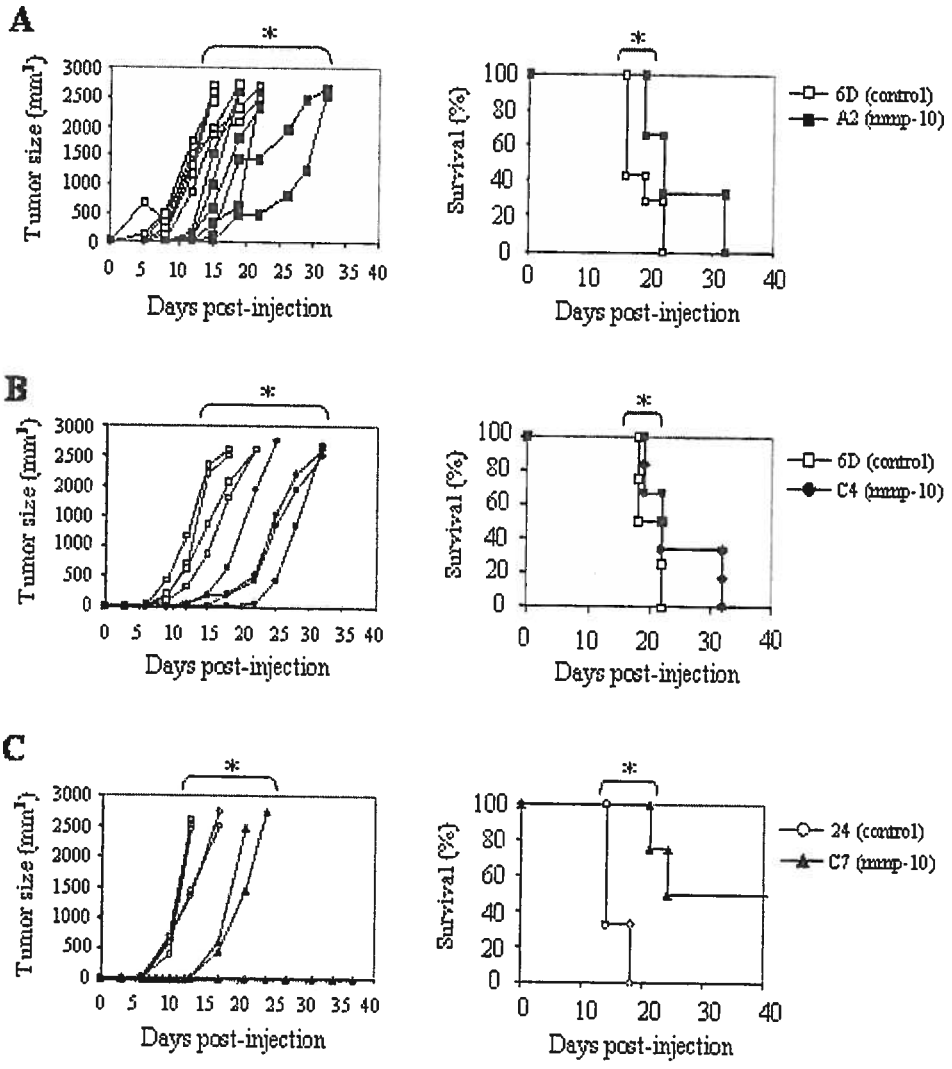

A
B
C
Tumor size (mm³)
Days post-injection
Survival (%)
6D (control)
A2 (mmp-10)
C4 (mmp-10)
24 (control)
C7 (mmp-10)
*

Figure 3

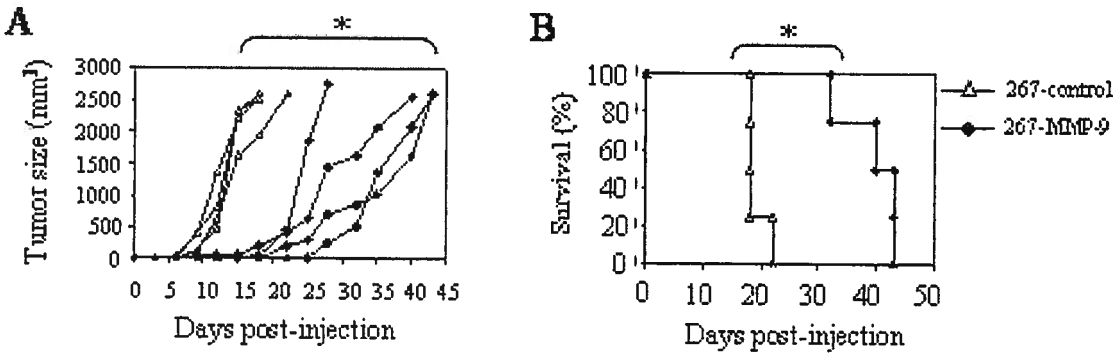

A
*
Tumor size (mm³)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45
Days post-injection
B
*
Survival (%)
100
80
60
40
20
0
0 10 20 30 40 50
Days post-injection
267-control
267-MMP-9

Figure 4

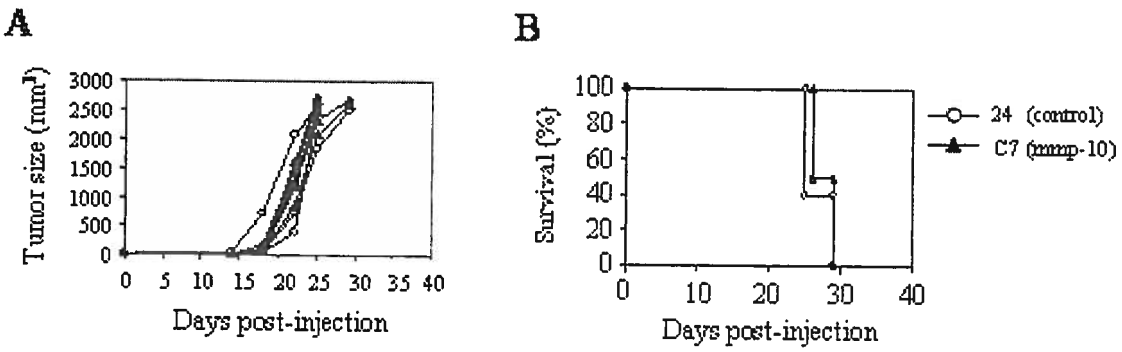

A
Tumor size (mm³)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0 5 10 15 20 25 30 35 40
Days post-injection
B
Survival (%)
100
80
60
40
20
0
0 10 20 30 40
Days post-injection
24 (control)
C7 (mmp-10)

Figure 5

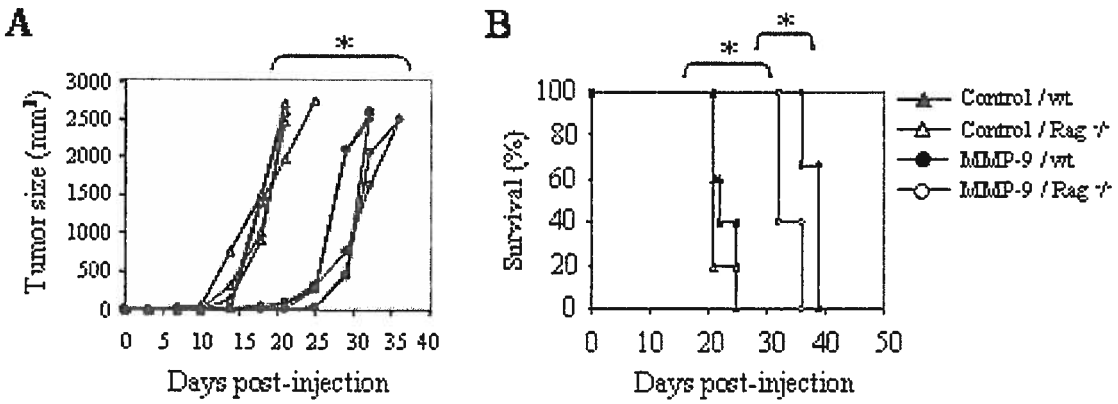

A
*
Tumor size (mm³)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0 5 10 15 20 25 30 35 40
Days post-injection
B
*
*
Survival (%)
100
80
60
40
20
0
0 10 20 30 40 50
Days post-injection
Control / wt
Control / Rag -/-
MMP-9 / wt
MMP-9 / Rag -/-

Figure 6

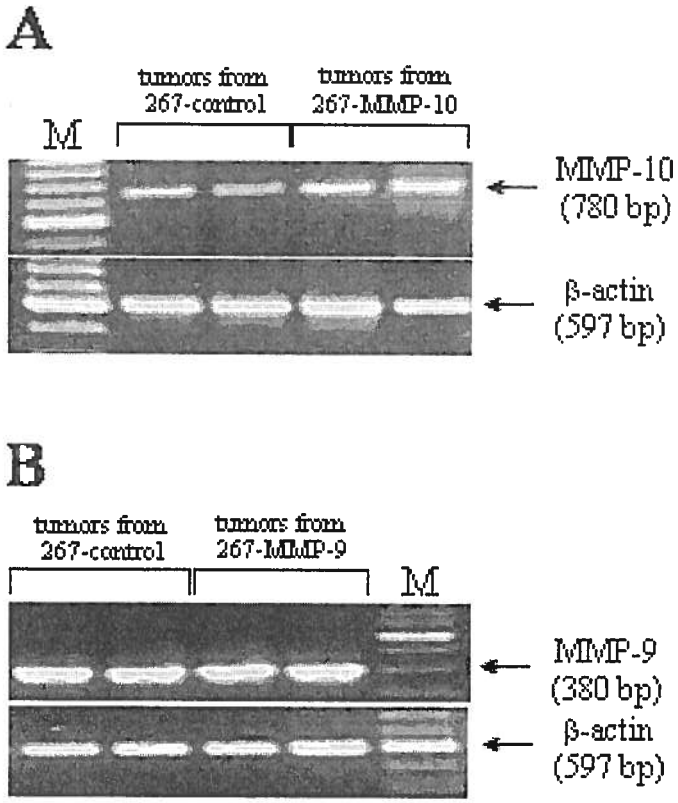
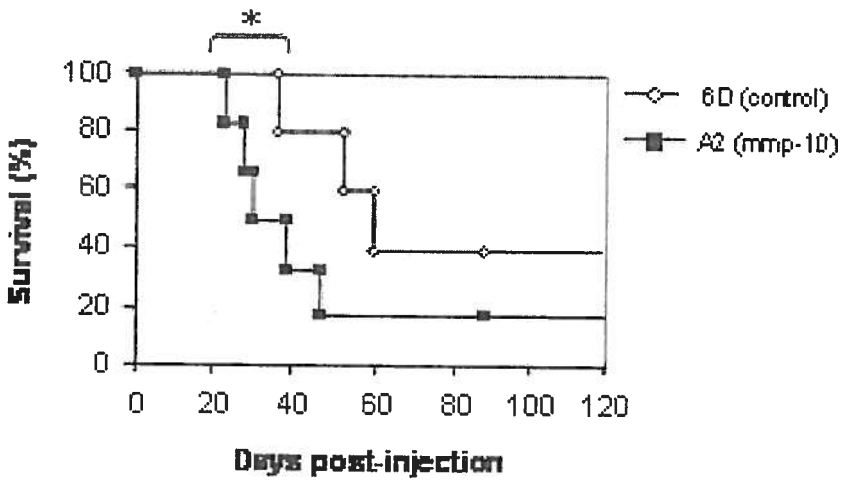

A
tumors from 267-control
tumors from 267-MMP-10
M
MMP-10 (780 bp)
β-actin (597 bp)
B
tumors from 267-control
tumors from 267-MMP-9
M
MMP-9 (380 bp)
β-actin (597 bp)

Figure 7


*
100
80
60
40
20
0
Survival (%)
0
20
40
60
80
100
120
Days post-injection
6D (control)
A2 (mmp-10)

Legends to Table and Figures

Table I. Summary of individual in vivo subcutaneous growth experiments. For each experiment presented in Figures 2 to 5, mean latency period and survival time values are indicated and accompanied by p value as determined by the Log Rank statistical test.

Figure 1. Characterization of transfectant lymphoma cells over-expressing MMP9 and measure of their invasive behavior. MMP9-expressing or control transfectants have been generated previously by our group (Aoudjit et al., 1999) and freezed for long-term storage. After they were thawed, (A) mRNA and (B) gelatin zymography analysis of MMP9 expression in 267 lymphoma cells transfected with the empty vector (PBK-Rsv), or with the MMP9 cDNA were performed. In the gelatin zymography experiments, conditioned media from MMP9- and MMP2-expressing PMA-stimulated human fibrosarcoma cells HT1080 was used as a positive control. M, m.w. standards (100-bp DNA ladder); the largest band represents the 600 bp marker. Results are representative of at least two independent experiments. (C) The effect of MMP9 on the invasive behavior of lymphoma cells over-expressing MMP9 was determined using Matrigel-coated Transwell inserts. Invasion assays were conducted for 24h or 36h in serum-free media after pre-treatment or not of transfectant lymphoma cells with 5 mM 1,10-phenanthroline (phen) for 30 min. Results are means +/- SE for two independent experiments, each performed in duplicates. *: p value ≤ 0.05.

Figure 2. MMP10 delays the growth of subcutaneous lymphoma in immunocompetent mice. Lymphoma cell transfectants (2 x 107) or control cells were injected subcutaneously in the right flank of young wild-type C57BL/6 syngeneic mice. Size of tumors was regularly measured and mice were killed when tumor size reached 2500 mm3. Tumor growth curves (A, C, E) and corresponding survival curves of mice injected with B) MMP10-transfected lymphoma cells (clone A2) or empty vector–transfected control lymphoma cells (clone 6D) D) MMP10-transfected lymphoma cells (clone C4) or empty vector–transfected control lymphoma cells (clone 6D) and F) MMP10-transfected lymphoma cells (clone C7) or empty vector–transfected control

lymphoma cells (clone 24) are presented. The results are representative of at least two independent experiments. *: p value ≤ 0.05 (see Table I).

Figure 3. MMP9 delays the growth of subcutaneous lymphoma in immunocompetent mice. Lymphoma cell transfectants (2 x 107) or control cells were injected subcutaneoulsy in the right flank of young wild-type C57BL/6 syngeneic mice. Size of tumors was regularly measured and mice were killed when tumor size reached 2500 mm3. A) Tumor growth curves and B) corresponding survival curves for mice injected subcutaneously with MMP9-transfected lymphoma cells or empty vector–transfected control lymphoma cells are presented. The results are representative of two independent experiments. *: p value ≤ 0.05 (see Table I).

Figure 4. Abolished growth-delaying effect of MMP10 on subcutaneous lymphoma in immunocompromised mice. Lymphoma cell transfectants (2 x 107) or control cells were injected subcutaneously in the right flank of young Rag-deficient C57BL/6 mice. Size of tumors was regularly measured and mice were killed when tumor size reached 2500 mm3. A) Tumor growth curves and B) corresponding survival curves for mice injected subcutaneously with MMP10-transfected lymphoma cells (clone C7) or empty vector–transfected control lymphoma cells (clone 24) are presented. The results are representative of two independent experiments. See Table I for p value.

Figure 5. MMP9 has reduced growth-delaying effect on subcutaneous lymphoma in immunocompromised mice. Lymphoma cell transfectants (2 x 107) or control cells were injected subcutaneoulsy in the right flank of young wild-type C57BL/6 syngeneic mice or young Rag-deficient C57BL/6 mice. Size of tumors was regularly measured and mice were killed when tumor size reached 2500 mm^3. A) Tumor growth curves and B) corresponding survival curves for mice injected subcutaneously with MMP9-transfected lymphoma cells or empty vector–transfected control lymphoma cells in both mouse strains are presented. The results are representative of two independent experiments. *: p values ≤ 0.05 (see Table I).

Figure 6. MMP9 and MMP10 mRNA are also present in established tumors originating from control lymphoma cells. Levels of mRNA for A) MMP10 and B) MMP9 were determined using RT-PCR analysis of samples of established, end-stage tumors originating from MMP-overexpressing transfectant lymphoma cells as well as empty vector-containing control cells injected in wild-type C57BL/6 mice. M, m.w. standards (100-bp DNA ladder); the largest band represents the 600 bp marker. Results are representative of two independent experiments.

Figure 7. MMP10 accelerates the growth of thymic lymphoma. MMP10-expressing lymphoma transfectant (clone A2) or empty vector-containing control lymphoma cells (5 x 103 cells) were injected in each of the two thymic lobe in young C57BL/6 syngeneic mice. Mice exhibiting dyspnea and becoming moribund were killed by carbon dioxyde anesthesia and autopsied. The presence of thymic lymphomas were confirmed at necropsy; these tumors are restricted to the thymus and do not metastasize to peripheral organs. As they increase in size, they compress animal lungs and cause dyspnea symptoms. Thymic lymphoma growth rates thus dictates the moment at which they are sacrificed, which is represented in the survival curves. Survival analysis of tumor bearing-mice was performed over a time period of over 100 days after lymphoma cells injection. The results are representative of two independent experiments with three different clones expressing MMP10. *: p value < 0.05.

Discussion générale et conclusion

5.1 Rappel de la problématique et des objectifs

Les MMP font l'objet d'une attention particulière dans le cadre des travaux de recherche portant sur le cancer, notamment en raison de leur haut niveau d'expression au sein des tissus cancéreux ainsi que de leurs activités pro-tumorales diverses. Cette famille de protéases a rapidement été identifiée comme cible thérapeutique dans la lutte contre le cancer; toutefois, malgré des résultats pré-cliniques encourageants où des inhibiteurs à large spectre des MMP se sont avérés efficaces pour contrer la croissance des tumeurs et/ou la dissémination des cellules cancéreuses dans des modèles murins de cancers variés, ces même inhibiteurs se sont avérés inefficaces en études cliniques chez des patients humains, en plus de générer d'importants effets secondaires. La communauté scientifique s'entend aujourd'hui sur la nécessité de caractériser en détail les patrons d'expression et les diverses activités de chaque MMP et ce, aux différents stades de progression des cancers, avant de valider l'utilisation d'inhibiteurs sélectifs de MMP. Dans le cas des LNH, les travaux de caractérisation de l'expression et de la fonction des MMP publiés à ce jour ont été presque qu'exclusivement orientés vers l'étude des gélatinases MMP9 et MMP2; cependant, d'autres MMP, dont les stromélysines MMP3 et MMP10, sont susceptibles d'influencer la progression des LNH.

Les travaux de recherche dont fait état la présente thèse visaient à caractériser la régulation de l'expression de MMP3 et MMP10 dans des LNH, de même que leur rôle au sein du processus de croissance tumorale des LNH.

5.2 Principaux résultats obtenus

Les travaux de recherche visant à caractériser la régulation de l'expression de MMP3 et MMP10 dans les LNH ont permis d'établir que 1) les stromélysines MMP3 et MMP10 ne sont pas exprimées constitutivement par les cellules de LNH murines et humaines; 2) l'expression de MMP10 par les cellules lymphomateuses humaines, contrairement à celle de MMP3, peut cependant être induite suite à l'exposition à certains agents solubles, notamment les cytokines IL-4, IL-6 et IL-13; 3) l'expression de MMP10 est également

inductible, dans les cellules de LNH humaines et murines, par contact intercellulaire, notamment avec des cellules endothéliales; 4) dans les cellules lymphomateuses murines, l'induction de l'expression de MMP10 lors du contact avec des cellules endothéliales implique l'interaction entre les molécules d'adhésion LFA-1 et ICAM-1, exprimées respectivement à la surface des cellules lymphomateuses et endothéliales; 5) l'expression de MMP3 n'est inductible par contact intercellulaire que dans les cellules lymphomateuses murines, qui interagissent spécifiquement avec des cellules endothéliales; 6) contrairement à MMP10 toutefois, le blocage des molécules d'adhésion LFA-1 ou ICAM-1 n'inhibe pas l'induction de l'expression de MMP3 dans ces conditions, indiquant que les récepteurs de la surface cellulaire impliqués dans l'induction des deux stromélysines sont distincts.

Pour leur part, les travaux visant à caractériser le rôle de MMP3 et MMP10 au sein du processus de croissance du lymphome ont permis de démontrer que: 1) l'expression de MMP3 ou de MMP10 par les cellules lymphomateuses augmente leur capacité de migration à travers la matrice extracellulaire, un effet dépendant de l'activité protéolytique; 2) dans un modèle murin de LNH, les tumeurs intrathymiques dérivant de cellules lymphomateuses génétiquement modifiées qui expriment constitutivement MMP3 ou MMP10 croissent plus rapidement que des tumeurs intrathymiques dérivant des cellules lymphomateuses parentales n'exprimant pas de niveau détectable de stromélysines, indiquant que ces stromélysines accélèrent la croissance du lymphome thymique *in vivo*; 3) dans ce même modèle murin, les tumeurs sous-cutanées dérivant de cellules lymphomateuses qui expriment constitutivement MMP10 ou MMP9 croissent plus lentement que des tumeurs sous-cutanées dérivant des cellules lymphomateuses parentales n'exprimant pas de niveau détectable de stromélysines, soulignant que MMP10 et MMP9 retardent la croissance des tumeurs sous-cutanées de LNH *in vivo*; 4) le retard de la croissance des LNH au site sous-cutané lorsque MMP10 est surexprimée par les cellules lymphomateuses nécessite la présence de lymphocytes T et/ou B matures, puisque chez des souris déficientes pour le gène *rag*, les tumeurs sous-cutanées dérivant de cellules lymphomateuses surexprimant MMP10 croissent à la même vitesse que celles dérivant des cellules parentales; 5) de la même façon, le retard de la croissance des LNH

au site sous-cutané lorsque MMP9 est surexprimée par les cellules lymphomateuses nécessite l'action de lymphocytes T et/ou B matures, puisque les tumeurs dérivant de cellules lymphomateuses surexprimant MMP9 croissent plus rapidement chez les souris immunodéficientes que chez des souris immunocompétentes (sans toutefois croître aussi vite chez les souris immunocompétentes que les tumeurs dérivant de cellules parentales n'exprimant pas MMP9, ce qui suggère que l'action des lymphocytes T et/ou B n'est pas le seul mécanisme responsable du délai de croissance causé par MMP9).

5.3 Originalité des travaux et nouveauté des résultats

Les travaux de recherche effectués au cours de cette thèse doctorale, bien qu'appuyés sur approche expérimentale classique et déjà bien établie, présentent un bon niveau d'originalité et de nouveauté. Mentionnons en premier lieu qu'ils font partie des premiers efforts de caractérisation de la régulation de l'expression et du rôle des stomélysines dans les LNH. En effet, tel que décrit dans la section 1.2.9, peu de travaux traitant de la régulation de l'expression des MMP au sein des LNH ont été publiés jusqu'à ce jour; de surcroît, la majorité d'entre eux ont été orientés vers l'étude de l'expression des gélatinases MMP2 et MMP9. Les présents travaux de caractérisation de la régulation de l'expression des stromélysines dans les LNH font donc figure de proue dans leur domaine, en examinant les mécanismes responsables de l'expression de MMP3 et MMP10 par les cellules lymphomateuses murines et humaines, stimulées par des contacts directs avec d'autres types cellulaires ou encore par des facteurs solubles éminemment présents au sein des tumeurs de LNH. Par ailleurs, les seuls travaux consacrés à l'étude du rôle des MMP dans la progression des LNH jusqu'à aujourd'hui se sont limités à l'étude *in vitro* des propriétés invasives qu'elles confèrent aux cellules lymphomateuses. À cet égard, les travaux de recherche présentés dans cette thèse sont les premiers à caractériser le rôle des stromélysines au sein de la progression des LNH *in vivo*, en tirant bénéfice d'un modèle murin de LNH.

Soulignons en deuxième lieu la nouveauté des résultats présentés dans cette thèse; en effet, ils constituent les premières indications que l'expression des stromélysines est inductible chez les cellules lymphomateuses humaines et murines. De plus, les présents

travaux font la démonstration directe que l'expression de MMP10 par des cellules tumorales (en l'occurence, des lignées de cellules lymphomateuses murines) peut en faciliter la migration à travers l'enchevêtrement protéique de la matrice extracellulaire (modélisé par du Matrigel dans le cadre de tests d'invasion *in vitro*). Les seuls travaux publiés à ce sujet jusqu'à aujourd'hui suggéraient de façon indirecte seulement un rôle de MMP10 dans la migration cellulaire, en rapportant l'expression ciblée de MMP10 au niveau du front migratoire de kératinocytes migrant vers des ulcères de la peau afin de participer à la réparation tissulaire[370]. Enfin, les présents travaux fournissent les premières indications directes qu'une même MMP peut exercer un rôle global positif ou encore négatif sur la croissance tumorale *in vivo* et ce, en fonction du site anatomique de croissance de la tumeur qui la produit. En effet, il a été démontré à l'aide du modèle murin de LNH que MMP10, lorsque surexprimée par les cellules lymphomateuses injectées, accélère la croissance du lymphome au site intrathymique mais retarde la croissance tumorale au site sous-cutané. Jusqu'alors, on savait seulement que certaines MMP pouvaient influencer de façon positive ou négative certaines fonctions cellulaires/tissulaires associées à la progression tumorale; par exemple, il avait déjà été établi que MMP9 pouvait influencer positivement ou négativement le processus d'angiogénèse nécessaire à la croissance tumorale, selon qu'elle générait des sous-produits pro- ou anti-angiogéniques par son activité catalytique sur certains substrats[303; 338]. Les résultats des travaux effectués au cours de la présente thèse démontrent donc pour la première fois une telle dualité dans le rôle des MMP au sein de la progression tumorale *in vivo*.

5.4 Régulation de l'expression des stromélysines dans les cellules lymphomateuses

Les données disponibles dans la littératures à ce jour soulignent la prédominance de l'origine stromale des MMP au sein des différentes tumeurs. Les résultats de la présente thèse démontrent néanmoins que dans le cas des LNH, les stromélysines MMP3 et MMP10 peuvent être produites par les cellules lymphomateuses elles-mêmes, dans certaines conditions d'activation cellulaire engendrées notamment par des contacts intercellulaires ou encore par l'exposition à certaines cytokines (**Figure 1**). Il a ainsi été démontré que la molécule d'adhésion ICAM-1, via l'engagement de son ligand LFA-1[399]

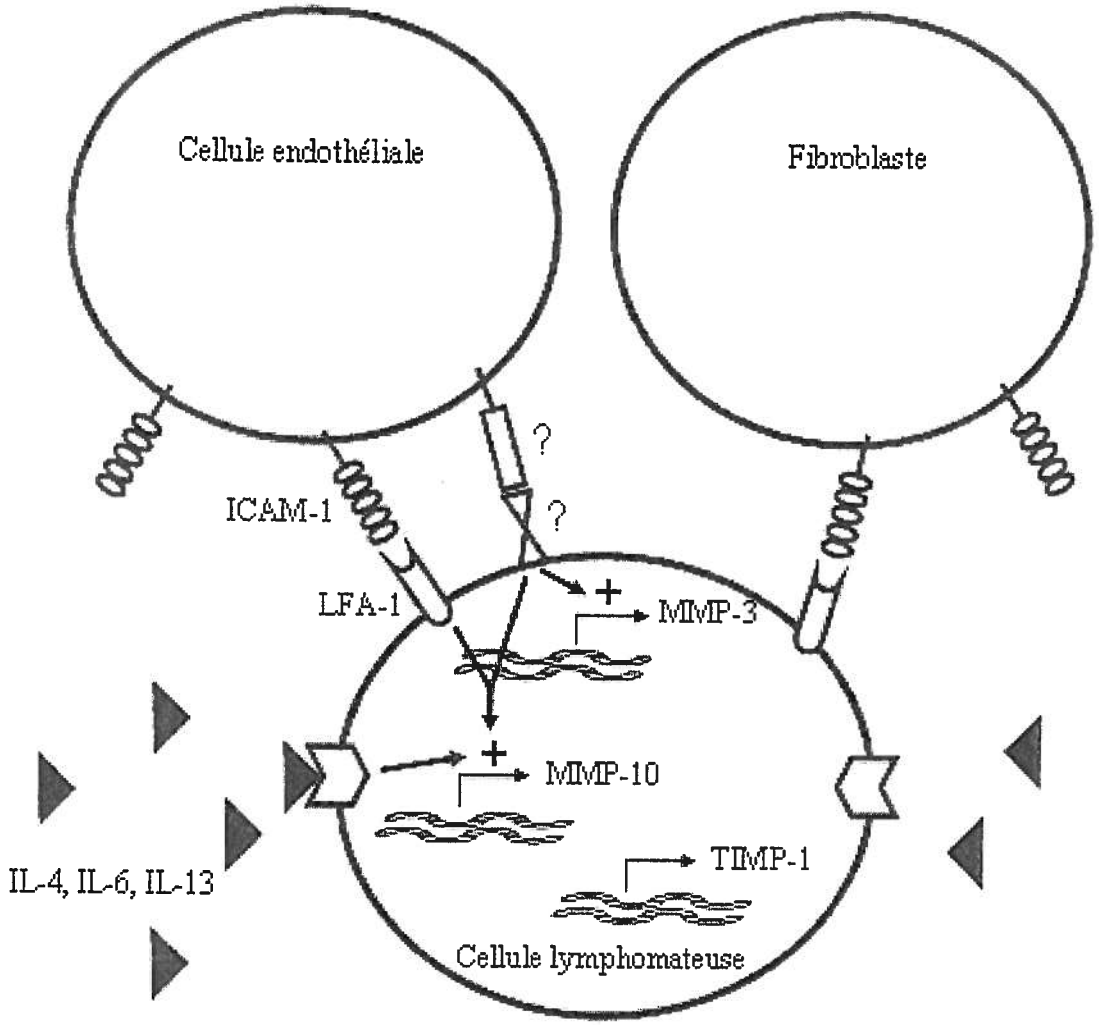


Figure 1. Schéma représentant la régulation de l'expression de MMP3, MMP10 et TIMP-1 chez le lymphome. L'expression de MMP3 n'est inductible que par contact direct avec des cellules endothéliales, via des récepteurs non-identifiés, dans les cellules lymphomateuses murines. Contrairement à TIMP-1, dont l'expression basale n'est pas modulée, l'expression de MMP10 est inductible par des facteurs solubles dont IL-4, IL-6 et IL-13, de même que par contact direct et spécifique avec des cellules endothéliales, en partie via ICAM-1/LFA-1.

exprimé à la surface des cellules lymphomateuses, était principalement responsable de l'induction de l'expression de MMP10, mais pas de MMP3, dans les cellules lymphomateuses qui interagissent directement avec des cellules endothéliales; *MMP10* fait donc maintenant partie du groupe des gènes, tels que *MMP9*[122], dont l'activité transcriptionnelle est régulée par ICAM-1. Certaines données suggèrent qu'ICAM-1 serait associée à la progression tumorale, notamment dans le cas des LNH[400]; de plus, une corrélation positive entre les niveaux sériques de la forme soluble d'ICAM-1 et différents paramètres associés à la progression tumorale tels que la taille de la tumeur ou le stade de la maladie a été rapportée, notamment dans le cas des LNH[401-403], mais aussi dans d'autres cancers tels que celui de la vessie[404]. Dans ce contexte, l'observation que l'expression de MMP10 est régulée par ICAM-1 suggère que cette MMP jouerait un rôle favorable à la progression tumorale. Toutefois, plusieurs indications expérimentales soulignent qu'ICAM-1 joue un rôle prépondérant dans la réaction immunitaire/inflammatoire, en participant notamment à la costimulation des lymphocytes T[405-407] ainsi qu'aux événements d'adhésion impliqués dans la migration et l'extravasation des leukocytes[408; 409]. Le niveau basal d'expression d'ICAM-1 est d'ailleurs augmenté par des cytokines pro-inflammatoires telles que IL-1 et TNFα à la surface des cellules endothéliales[410; 411] ainsi que IL-6 à la surface de cellules tumorales[412]. Par ailleurs, l'engagement d'ICAM-1 induit l'expression de gènes contribuant à la réponse immunitaire tels que *vcam-1*[413] dans les cellules endothéliales, *ccl5* dans les fibroblastes[414] et *ccl3* dans les monocytes[415]. Il est donc possible, puisque l'expression de MMP10 dans les cellules lymphomateuses est régulée par ICAM-1, que l'induction de l'expression de MMP10 serve un dessein immunitaire/inflammatoire, qui peut inclure une réponse immunitaire anti-tumorale. Cette hypothèse est d'ailleurs étayée par l'observation que la surexpression de MMP10 par les cellules lymphomateuses retarde la croissance du lymphome sous-cutané *in vivo* et ce, chez des souris immunocompétentes seulement.

Dans le même ordre d'idées, si l'on considère les cellules lymphomateuses comme un modèle de lymphocytes T, étant donné qu'elles sont des lymphocytes T transformés (bien qu'au stade immature), l'induction de l'expression de MMP10 dans ces cellules après

contact, via ICAM-1, avec des cellules endothéliales (une interaction qui a notamment lieu au cours du processus d'extravasation des lymphocytes au site enflammé), permettrait l'acquisition de propriétés invasives par ces lymphocytes, tel qu'observé lors des tests d'invasion sur Matrigel. Dans ces circonstances également, MMP10 faciliterait donc la réponse inflammatoire/immunitaire.

De façon similaire à ce qui a été observé dans les cellules lymphomateuses T murines, l'expression de MMP10 est induite dans les cellules lymphomateuses humaines, de type T et B, lors du contact avec des cellules endothéliales; les molécules d'adhésion impliquées dans cette induction n'ont toutefois pas été caractérisées et un parallèle avec le modèle murin n'est pas possible pour l'instant. L'expression de MMP10 dans les cellules lymphomateuses humaines est également inductible par des cytokines aux propriétés pro- et anti-inflammatoires, notamment IL-4, IL-6 et IL-13. Ces cytokines sont éminemment présentes au sein des tumeurs de LNH[366; 367; 416] et contribueraient à la physiopathologie des LNH, principalement en favorisant la prolifération des cellules lymphomateuses[417-420]. Une telle induction de MMP10 par des facteurs solubles s'est avérée cytokine-spécifique, puisque la cytokine pro-inflammatoire IL-1, également exprimée dans divers LNH[416; 421], ne module pas l'expression de MMP10 dans les cellules lymphomateuses humaines T ou B. Ces derniers résultats, qui suggèrent que l'expression de MMP10 ne soit souhaitable que dans certaines conditions pro- ou anti-inflammatoires, sont en accord avec le récent concept de relation causale entre l'inflammation et la néoplasie, qui prédit que la balance entre les cytokines/chimiokines pro- et anti-inflammatoires dicterait le niveau d'angiogénèse intratumoral et la vitesse de croissance tumorale[422]. Par ailleurs, des données récentes révèlent qu'au même titre qu'une réaction anti-inflammatoire, une réaction inflammatoire peut favoriser la progression tumorale, notamment en fonction du stade de progression de la maladie. Ainsi, l'infiltration de lymphocytes T $CD4^+$ favorise le processus de carcinogénèse au niveau de lésions pré-malignes de la peau[423], alors que dans un autre modèle murin de carcinome, à partir du moment où des tumeurs sont présentes, une inflammation locale permettant l'infiltration de lymphocytes T $CD4^+$ est nécessaire à la restriction efficace de la croissance tumorale[424]. Il est donc possible qu'à l'instar du carcinome, l'effet d'une réaction immunitaire/inflammatoire sur la progression

du lymphome dépende du stade de la maladie; dans ces circonstances, l'induction séquentielle de MMP10 par des cytokines tantôt pro-, tantôt anti-inflammatoires pourrait servir un seul et unique dessein, pro- ou anti-lymphomateux.

Enfin, il semble que l'expression de MMP3 dans les cellules lymphomateuses humaines ne soit pas inductible, ni par le contact intercellulaire ni par diverses cytokines, ce qui souligne la différence fondamentale existant entre MMP3 et MMP10 au niveau de la régulation de leur expression. Cette disparité, qui avait déjà été rapportée dans d'autres types cellulaires (tel que décrit dans la section 1.2.10), pourrait être attribuable à une différence au niveau des mécanismes épigénétiques de régulation de l'expression des deux gènes. Une telle difficulté à stimuler l'expression de MMP3 dans les cellules lymphomateuses suggère en effet une hyperméthylation au niveau de son promoteur; dans ce cas, le traitement préalable des cellules avec la 5-aza-2'-deoxycytidine avant la stimulation par des agents solubles ou par contact intercellulaire devrait permettre d'augmenter l'activité transcriptionnelle du gène codant pour MMP3, tel que déjà observé dans des cellules de carcinome pancréatique[229].

5.5 Hypothèses sur les mécanismes par lesquels MMP3, MMP9 et MMP10 exercent leur rôle pro- ou anti-tumoral aux différents sites de croissance

Dans la foulée des travaux de caractérisation du rôle des stromélysines dans la croissance des LNH, une prochaine série d'expériences sera consacrée à l'élucidation des mécanismes par lesquels MMP3 et MMP10 accélèrent la croissance des LNH au site intrathymique, ainsi que des mécanismes par lesquels MMP9 et MMP10 retardent la croissance du lymphome sous-cutané. Certaines hypothèses s'imposent d'emblée, qui s'appuient sur des données déjà disponibles dans la littérature.

5.5.1 Accélération de la croissance du lymphome thymique par MMP3

Le mécanisme le plus plausible par lequel MMP3 accélère la croissance du lymphome au site thymique consiste en une facilitation du processus d'angiogénèse tumoral. En effet, l'expression de MMP3 au sein des lymphomes thymiques semble ciblée au niveau de l'endothélium vasculaire, puisque son expression est induite dans les cellules

lymphomateuses lorsqu'elles interagissent spécifiquement avec des cellules endothéliales[425]; de plus, les cellules de la lignée endothéliale murine bEnd.3 l'expriment constitutivement[425]. Cette expression ciblée au niveau de l'endothélium thymique suggère un rôle particulier de MMP3 au sein de processus tels que l'angiogénèse, qui nécessite la participation des cellules endothéliales. De plus, MMP3 peut générer des produits de clivage aux propriétés pro-angiogéniques, tels que le bFGF qu'elle rend biodisponible en le libérant de son complexe avec le perlecan au sein de la matrice extracellulaire[298]; des analyses par RT-PCR démontrent que l'ARNm de bFGF est effectivement présent au sein des tumeurs lymphomateuses intrathymiques (**Annexe 9**). La véracité de l'hypothèse d'une facilitation du processus d'angiogénèse par MMP3 pourrait être vérifiée par des analyses histologiques et/ou immunohistochimiques permettant la comparaison de la densité de la vascularisation entre les tumeurs dérivant de cellules lymphomateuses surexprimant ou non MMP3.

MMP3 pourrait également favoriser indirectement l'angiogénèse des tumeurs lymphomateuses, en clivant et activant proMMP9; MMP9 est effectivement exprimée au sein des tumeurs lymphomateuses intrathymiques[155] et à l'instar de MMP3, son expression est induite dans les cellules lymphomateuses qui interagissent spécifiquement avec des cellules endothéliales[122]. MMP9 est notamment reconnue pour sa capacité à cliver et à relarguer la molécule pro-angiogénique VEGF[338]. Dans ce contexte, MMP3 pourrait amplifier l'activité pro-angiogénique de MMP9 dans des tumeurs lymphomateuses intrathymiques. L'utilisation de souris receveuses déficientes en MMP9 pourrait permettre de vérifier cette hypothèse, au moyen d'injections intrathymiques de cellules lymphomateuses surexprimant ou non MMP3 suivi d'une analyse de la densité de vascularisation dans les deux types de tumeurs qui en résulteraient.

Un second mécanisme par lequel MMP3 peut accélérer la croissance de certains types de tumeurs consiste en la facilitation du processus de prolifération des cellules tumorales. En effet, tel que décrit dans la section 1.2.10, MMP3 peut, par son activité protéolytique, relarguer et donc augmenter la biodisponibilité de facteurs de croissances aux propriétés mitogènes tels que HB-EGF et IGF[327; 328; 391]. Dans cet ordre d'idées, afin de déterminer

si MMP3 facilite la prolifération des cellules lymphomateuses dans le microenvironnement thymique, il est possible de procéder à des tests de prolifération *in vivo*. Si les résultats indiquaient que les cellules lymphomateuses surexprimant MMP3 prolifèrent plus rapidement *in vivo* que les cellules lymphomateuses témoin, la nature du ou des substrats de MMP3 dans ce microenvironnement pourrait ensuite être précisée; à la lumière des connaissances actuelles au sujet des substrats mitogéniques de MMP3, une telle démarche pourrait débuter par la détermination du niveau d'expression de HB-EGF et IGF au sein des tumeurs intrathymiques, en procédant par exemple à des analyses prélimaires par RT-PCR ou par matrices différentielles d'ADN, de même que par immunobuvardage de type Western. De la même façon, il faudrait déterminer si les lignées de cellules lymphomateuses utilisées expriment les récepteurs de ces facteurs de croissance; il est possible qu'elles expriment au moins IGF-R, étant donné leur statut de lymphocyte T immature (thymocytes transformés) et que les thymocytes sains expriment IGF-R[426].

Notons enfin que puisque MMP3 peut cliver différentes composantes de la matrice extracellulaire, tel que démontré *in vitro* lors de test d'invasion sur Matrigel[425], il est possible qu'elle facilite la prolifération des cellules lymphomateuses en libérant une variété de cytokines et/ou facteurs de croissances autres que HB-EGF et IGF, qui seraient également séquestrés au niveau de la matrice extracellaire.

5.5.2 Accélération de la croissance du lymphome thymique par MMP10

À l'instar de MMP3, MMP10 pourrait accélérer la croissance du lymphome au site thymique en facilitant le processus d'angiogénèse tumoral. En effet, l'expression de MMP10 au sein des tumeurs de lymphome thymique semble également ciblée au niveau de l'endothélium vasculaire, puisque son expression est induite dans les cellules lymphomateuses lorsqu'elles interagissent spécifiquement avec des cellules endothéliales[427]; de plus, les cellules des lignées endothéliales murine bEnd.3 et humaine HUVEC l'expriment constitutivement[427]. Les connaissances actuelles au sujet des substrats de MMP10 ne suggèrent pour l'instant qu'un rôle indirect de MMP10 dans le processus d'angiogénèse, par sa capacité de clivage et d'activation de proMMP9[393].

Dans ce contexte, il faudrait maintenant déterminer si les tumeurs thymiques dérivant de cellules lymphomateuses surexprimant MMP10 sont davantage vascularisées que celles dérivant de cellules lymphomateuses témoins, chez des souris saines de même que chez des souris déficientes en MMP9.

Il est alternativement possible que MMP10 favorise, par son activité protéolytique, la prolifération des cellules lymphomateuses au sein du thymus. Des tests de migration cellulaire dans du Matrigel ont en effet suggéré que l'activité catalytique zinc-dépendante de MMP10 augmentait la capacité de migration à travers la matrice extracellulaire des transfectants qui la produisent; la chélation du zinc nécessaire à l'activité protéolytique de MMP10, au moyen de la phénanthroline, a supprimé cet effet. La possibilité que la phénanthroline ait plutôt inhibé la migration des cellules lymphomateuses en altérant leur viabilité a été évaluée au moyen de comptes cellulaires en présence de bleu de Trypan; le prétraitement de 30 minutes des transfectants avec la phénanthroline n'a pas affecté significativement leur viabilité[427]. Il aurait cependant été préférable de prolonger la durée des traitements pendant une période de temps correspondant à celle utilisée pour les tests de migration (soit 24h et 36h), étant donné qu'une exposition de 30 minutes à la phénanthroline aurait pu déclencher des mécanismes apoptotiques qui bien que non-détectables après seulement 30 min par le bleu de Trypan, pouvaient réduire la capacité de migration des cellules testées au bout de 24h ou 36h en provoquant la mort cellulaire. Tels qu'effectués, les tests de migration sur Matrigel n'ont donc pas permis de conclure hors de tout doute que l'activité protéolytique de MMP10 était responsable de l'augmentation de la capacité migratoire des transfectants; néanmoins, il a été démontré par zymographie que MMP10 produite par les transfectants était capable d'activité protéolytique envers la caséine *in vitro*[427], ce qui suggère fortement qu'elle soit également capable d'activité protéolytique lorsque les transfectants sont injectés *in vivo*. Il est donc possible, bien que la nature des quelques substrats de MMP10 qui aient été identifiés à ce jour ne permette pas d'étayer cette hypothèse, que l'activité de MMP10 permette la libération de diverses molécules qui seraient complexées au sein de la matrice extracellulaire et qui possèdent des propriétés mitogéniques envers les cellules lymphomateuses, favorisant la prolifération de ces dernières. Des tests de prolifération *in*

vivo permettraient de déterminer si l'expression de MMP10 par les cellules lymphomateuses favorise leur prolifération.

5.5.3 Délai de la croissance du lymphome sous-cutané par MMP10 et MMP9

Les hypothèses de mécanismes par lesquels MMP10 et MMP9 ralentissent la croissance du lymphome sous-cutané sont variées et prennent en considération la nature des cellules stromales qui interagissent avec les cellules lymphomateuses dans le microenvironnement sous-cutané. D'abord, il est possible que MMP10 et/ou MMP9 y favorisent la réponse immunitaire anti-tumorale. En effet, une réponse immunitaire classique est susceptible d'être induite dans la région sous-cutanée, médiée par les lymphocytes T et/ou B, les cellules NK, les macrophages ou les cellules dendritiques. Des test *in vivo* utilisant des souris déficientes pour le gène *rag* ont d'ailleurs démontré que la présence de lymphocytes T et/ou B matures est impliquée dans l'effet de ralentissement de MMP10 et MMP9 sur la croissance des tumeurs lymphomateuses sous-cutanées. Il est donc possible que MMP10 et/ou MMP9 favorisent l'infiltration des tumeurs sous-cutanées par des cellules du système immunitaire, notamment en clivant et relarguant certaines chimiokines qui attirent les cellules immunitaires/inflammatoires vers la tumeur. A cet égard, l'analyse histologique des différentes tumeurs sous-cutanées (**Figure 2**) ne permet pas de conclure hors de tout doute à une plus grande densité de lymphocytes dans les tumeurs dérivant de cellules lymphomateuses surexprimant MMP9 ou MMP10 que dans les tumeurs dérivant des cellules témoin. Une méthode alternative de mesure de l'infiltration des lymphocytes périphériques dans les tumeurs consisterait en un double marquage immunohistochimique pour dénombrer les lymphocytes T matures exprimant à la fois le TCR-CD3 et CD45, par exemple (car les lymphocytes périphériques infiltrant les tumeurs se distinguent des cellules lymphomateuses T par leur stade de maturation).

Il a déjà été démontré que MMP9 pouvait cliver IL-8 de façon à augmenter son pouvoir chimioattractant envers les lymphocytes T[(306)]. MMP10 et/ou MMP9 pourraient également favoriser le processus migratoire nécessaire à l'infiltration tumorale par les lymphocytes T, puisque le rôle de MMP9 dans la migration des leukocytes du compartiment vasculaire vers les sites d'inflammation a déjà été démontré[(428)]; par

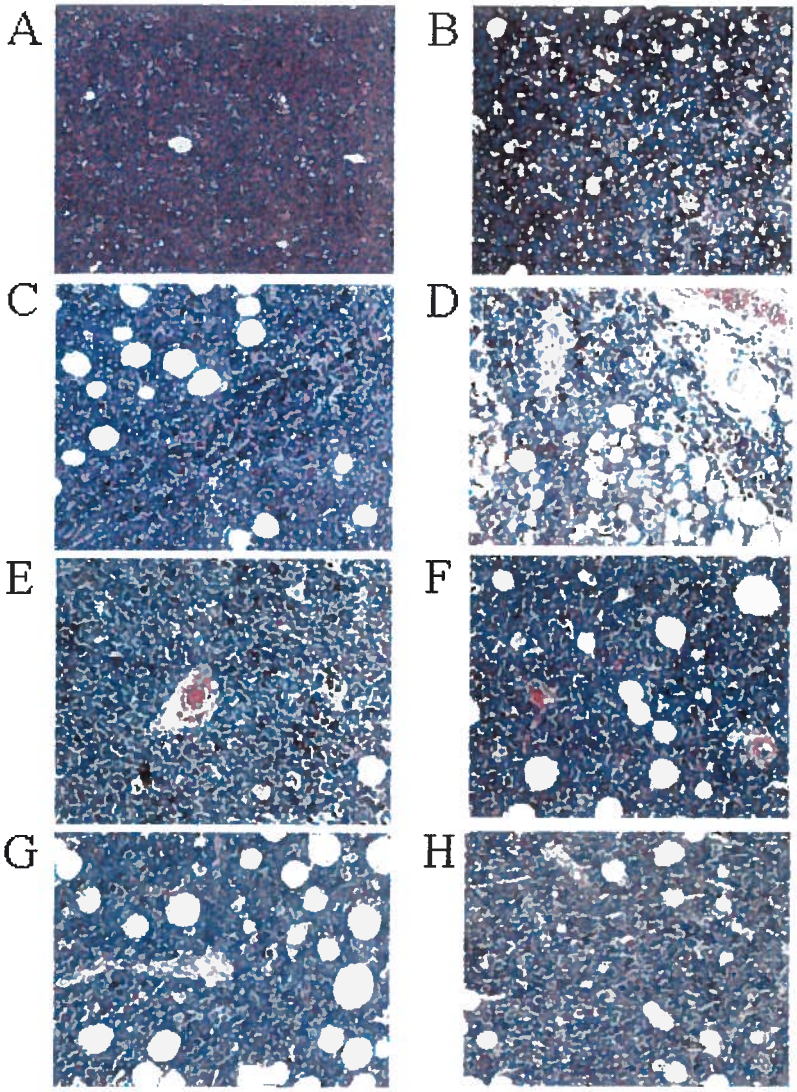


Figure 2. Examen histologique de tumeurs sous-cutanées au stade avancé. Des sections de tumeurs fixées à la formalines dérivant de cellules lymphomateuses surexprimant MMP-10 (**A**, **B**) ou de cellules lymphomateuses témoin (**C**, **D**), ou de cellules lymphomateuses surexprimant MMP-9 (**E**, **F**) ou de cellules lymphomateuses témoin (**G**, **H**) injectées chez des souris C57BL/6 de type sauvage (**A**, **C**, **E**, **G**) ou déficientes en Rag (**B, D, F, H**) ont été colorées avec l'hématoxyline/éosine puis visualisées sous microscope à un grossissement de 200X.

ailleurs, les lymphocytes T infiltrant les tumeurs expriment des niveaux plus élevés de MMP9 que les lymphocytes T périphériques de souris saines, ce qui suggère un rôle de MMP9 dans le processus d'infiltration tumoral par les lymphocytes T[429].

MMP10 et/ou MMP9 pourraient alternativement favoriser la réponse immunitaire anti-tumorale en contenant eux-mêmes des épitopes immunogènes. À cet égard, la présence de cellules T de même que d'anticorps reconnaissant spécifiquement certains peptides immunodominants de MMP10 a déjà été rapportée chez des souris présentant les symptômes d'arthrite rheumatoïde[430]; de plus, des patients atteints d'arthrite rheumatoïde développent une réaction immunitaire contre des épitopes T peptidiques dérivant de certaines MMP[431]. Ces études suggèrent que les MMP peuvent, dans certaines conditions, constituer des auto-antigènes capables d'induire une réponse immunitaire spécifique *in vivo*; il a également été démontré que la production d'auto-anticorps dirigés contre une MMP permettait d'induire une protection antitumorale, à la fois préventive et thérapeutique, dans des modèles murins de fibrosarcome et d'hépatome sous-cutanés[432]. Dans le modèle murin de lymphome sous-cutané, la véracité de l'hypothèse selon laquelle MMP9 et MMP10 constituent des auto-antigènes favorisant une réponse immunitaire anti-tumorale pourrait donc être vérifiée en recherchant la présence, dans le sérum des souris portant des tumeurs sous-cutanées dérivant de cellules lymphomateuses surexprimant l'une ou l'autre de ces MMP, d'auto-anticorps reconnaissant spécifiquement MMP9 ou MMP10.

Dans un autre ordre d'idées, puisque la présence de lymphocytes T et/ou B matures est impliquée dans l'effet de ralentissement de la croissance des tumeurs lymphomateuses sous-cutanées par MMP10 et MMP9, il est possible que ces lymphocytes, en infiltrant le microenvironnement tumoral, fournissent des substrats à ces MMP qui, lorsque clivés, génèrent des produits aux propriétés anti-tumorales. Ainsi, les lymphocytes T $CD4^+$ produisent du TNFα membranaire[433], qui peut être clivé par MMP9 de façon à ce que la forme soluble et active de TNFα soit générée[434]; incidemment, le TNFα soluble peut induire une régression tumorale en induisant la production de MMP9 par les cellules tumorales accompagnée d'une production intratumorale d'angiostatine[435]. Par ailleurs,

les lymphocytes peuvent sécréter du TGF sous sa forme latente; TGF beta possède des propriétés chimio-attractantes envers les cellules du système immunitaire[436; 437] et la capacité de MMP9 à activer, par clivage protéolytique, la forme latente du TGF beta[310] pourrait engendrer une inhibition de la croissance des tumeurs en amplifiant la réponse immunitaire anti-tumorale[438]. Il faut mentionner toutefois qu'à l'inverse, la présence de TGF beta sous sa forme active dans la tumeur pourrait favoriser la croissance des tumeurs lymphomateuses sous-cutanées chez les souris immunocompétentes; d'une part, Yu et Stamenkovic ont démontré que l'activation de MMP-9 par TGF beta favorisait l'angiogénèse tumorale et la survie d'une lignée de carcinome mammaire[439]; d'autre part, le TGF beta contribue à la prolifération et à l'activité immunosuppressive des lymphocytes T régulateurs[440].

Bien que la présence de lymphocytes soit impliquée dans l'effet de ralentissement de la croissance des tumeurs lymphomateuses sous cutanées par MMP10 et MMP9, il n'est pas exclu que d'autres mécanismes d'action de ces MMP, indépendants du système immunitaire, soient également mis à contribution. Un rôle d'inhibition du processus d'angiogénèse par ces MMP est particulièrement plausible. Ainsi, MMP9 peut cliver le plasminogène pour générer la molécule anti-angiogénique angiostatine[302]; à cet égard, il a déjà été démontré que la surexpression de MMP9 *in vivo* entraînait une augmentation de la synthèse d'angiostatine à partir du plasminogène, accompagnée d'une inhibition de la vascularisation ainsi que de la croissance tumorale[441]. Par ailleurs, l'activité protéolytique de MMP10 et/ou MMP9 pourrait altérer la balance des cytokines/chimiokines pro- et anti-inflammatoires présentes au sein de la tumeur, en faveur de conditions anti-inflammatoires qui réduiraient notamment l'infiltration et l'activité pro-angiogénique des macrophages[442].

Enfin, selon les deux hypothèses décrites plus haut, une surexpression de MMP9 au sein des tumeurs sous-cutanées pourrait entraîner un double effet d'induction d'une réponse immunitaire anti-tumorale et d'inhibition d'angiogénèse intra-tumorale; concrètement, ces deux mécanismes pourraient survenir simultanément et de façon synergique, tel que précédemment observé dans un autre modèle murin de lymphome. En effet, il a déjà été

démontré que la combinaison d'une thérapie immunogénique et de la réduction de la vascularisation tumorale par la production d'angiostatine constituait un moyen très efficace d'induire une réponse immunitaire anti-lymphome[443].

5.6 Dualité fonctionnelle de MMP10 et MMP9 dans la croissance tumorale aux sites thymique et sous-cutané

À première vue, les résultats des tests de caractérisation du rôle de MMP10 (ainsi que MMP9) sur la croissance du lymphome *in vivo* peuvent sembler contradictoires. En effet, la croissance tumorale s'avère accélérée ou freinée selon le site d'injection des cellules lymphomateuses surexprimant ces MMP. On trouve cependant, après réflexion, une explication à cette apparente dualité dans le rôle de MMP9 et MMP10, qui réside dans trois principaux éléments. Ainsi, 1) les types cellulaires qui résident ou infiltrent les deux sites de croissance (thymique et sous-cutané) et qui interagissent avec les cellules tumorales sont distincts, ce qui résulte en une différence au niveau de la régulation post-transcriptionnelle de l'activité des MMP selon le site anatomique (production distincte des différents activateurs ou inhibiteurs protéiques des MMP), ainsi qu'une différence au niveau de la nature de la réponse immunitaire anti-tumorale qui peut être induite (le thymus étant un organe immunoprivilégié, la seule activité anti-tumorale qui puisse se produire sera exercée localement par les populations cellulaires résidentes, tandis qu'une réponse immunitaire anti-tumorale spécifique, médiée par des lymphocytes, est susceptible d'être élicitée au site sous-cutané); 2) la nature et la quantité des différents substrats de MMP10 et MMP9 présents aux deux sites de croissance tumorale sont distincts, en partie parce que les types cellulaires qui les produisent varient, mais également parce que la composition de la matrice extracellulaire est elle-même distincte. Ainsi, puisque les MMP peuvent générer différents sous-produits de clivage ayant des propriétés pro- ou anti-tumorales, la nature des substrats auxquels les MMP sont exposées dicte leur influence sur la progression tumorale. Dans cette optique, il s'impose de porter une attention particulière à la nature des composantes cellulaires et matricielles du microenvironnement où une tumeur donnée croît; 3) l'effet global d'une MMP sur la progression tumorale est multifactoriel. Ainsi, le rôle d'une MMP sur la croissance tumorale résulte notamment de l'équilibre entre ses activités pro- et anti-angiogéniques,

pro-et anti-apoptotiques ainsi que pro- et anti-inflammatoires. Par extrapolation, il est également possible qu'une MMP joue un rôle global favorable à la croissance d'une tumeur, tout en freinant sa dissémination par exemple. En effet, dans le cas du modèle murin de LNH, MMP10 et MMP9 exerçent un effet global favorable à la croissance de la tumeur primaire (au sein du thymus) tout en freinant la croissance des tumeurs secondaires (dans la région sous-cutanée). Il importe donc de caractériser en détail les différentes contributions des MMP chacune des étapes de la progression tumorale, avant de valider et de préciser une stratégie d'inhibition thérapeutique des MMP dans la lutte contre les LNH.

5.7 Portée des résultats chez l'humain

La caractérisation de la régulation de l'expression et du rôle des stromélysines dans les LNH peut servir à des fins thérapeutiques; elle permettra éventuellement d'établir s'il serait pertinent d'utiliser MMP3 et/ou MMP10 à titre d'outils diagnostic/pronostic des LNH, ou encore de cibles thérapeutiques dans la lutte contre cette famille de cancers. Naturellement, les données recueillies à ce sujet au cours de la présente thèse sont fragmentaires et doivent être interprétées avec prudence, étant donné que 1) l'effet d'autres interactions intercellulaires de même que d'autres cytokines et facteurs de croissance doit encore être déterminé sur la régulation de l'expression des stromélysines, dans les cellules lymphomateuses mais également dans les cellules stromales qui leur sont associées dans les différents LNH; à cet égard, il faut tenir compte du fait que 2) les différents cancers classifiés parmi la famille des LNH sont hétérogènes et n'ont pas été étudiés individuellement; 3) de la même façon que le rôle des stromélysines sur la croissance du lymphome a été caractérisé *in vivo*, leur rôle global au sein du processus de dissémination du lymphome *in vivo* devra être déterminé, afin de posséder une vision élargie du rôle des MMP3 et -10 sur la progression des LNH. À cet égard, il est évident que 4) ces travaux ont été ou seront effectués dans un modèle murin qui, bien qu'étant parfaitement adapté à la caractérisation du rôle global d'une MMP sur un paramètre donné de la progression tumorale, ne permet pas d'évaluer simultanément son rôle dans d'autres processus physiologiques, qui pourrait être à l'origine d'effets secondaires indésirables associés à une stratégie thérapeutique ciblant cette MMP.

Bien qu'il existe, dans certains types de cancer, une corrélation positive entre le niveau d'expression des stromélysines et le potentiel tumorigénique[382-384] et malgré le fait que leur ARNm soit présent dans plusieurs LNH humains testés (**Annexe 10**), il serait prématuré de proposer de quantifier les niveaux d'expression de MMP3 et MMP10 à titre d'outils de diagnostic/pronostic pour les LNH humains. En effet, nos collaborateurs ont rapporté l'absence d'expression de ces stromélysines dans d'autres tumeurs de LNH humains[360; 361]; par ailleurs, leur expression par les cellules lymphomateuses, qui n'est mesurable que dans certaines conditions, s'est avérée transitoire. Pour éclaircir cette question, il faudrait déterminer s'il existe ou non une corrélation entre le niveau d'expression intratumoral ou encore sérique de MMP3 et MMP10 et le stade de progression de la maladie chez des patients atteints de différents LNH. Selon un scénario plus plausible toutefois, le niveau de méthylation d'éléments spécifiques du promoteur des stromélysines dans les cellules lymphomateuses pourrait constituer un outil précieux de diagnostic et/ou pronostic des LNH; en effet puisque l'expression de MMP3 et MMP10 dans les cellules lymphomateuses n'est observable qu'à la suite de certains types de stimulation, il est possible que certains éléments de leur promoteur, où convergent notamment les signaux intracellulaires induits par les agents incapables de stimuler l'expression de ces stromélysines (tel que l'IL-1), soient hyperméthylés. Afin de valider l'utilisation de tels marqueurs épigénétiques à titre d'outils de diagnostic/pronostic, il faudrait au préalable déterminer s'il existe une corrélation entre les niveaux de méthylation d'éléments du promoteur des stromélysines et certains paramètres cliniques tel que le stade de progression de la maladie.

Dans un autre ordre d'idées, il semble que MMP9 et MMP10 ne constitueraient pas de bonnes cibles d'inhibition thérapeutique dans certains LNH; en effet, bien qu'elles accélèrent la croissance du lymphome dans un modèle d'injection orthotopique au niveau d'un organe immunoprivilégié, ces MMP freinent plutôt la croissance du lymphome sous-cutané dans un microenvironnement immunocompétent. Étant donné la redondance fonctionnelle entre MMP3 et MMP10, il est à prévoir qu'à l'instar de MMP10, MMP3 freine la croissance du lymphome sous-cutané; incidemment, MMP3 exerce un effet similaire à celui de MMP10 sur la croissance du lymphome intrathymique. Toutes ces

MMP qui peuvent freiner la croissance tumorale exercent donc, dans certaines circonstances, un rôle anti-tumoral. Ce concept d'un rôle anti-tumoral des MMP va à l'encontre du dogme selon lequel les MMP constitueraient, tout enzyme confondu, des agents pro-tumoraux et des cibles de choix à inhiber dans le cadre de thérapies anti-cancéreuses. En effet, chez certains patients atteints de LNH, notamment ceux qui présentent une ou plusieurs tumeurs en des endroits susceptibles d'être le site de réactions immunitaires/inflammatoires (ce qui est vraisemblablement le cas de la majorité des patients atteints de LNH), des enzymes qui exercent un tel rôle anti-tumoral ne devraient pas faire partie des cibles d'une inhibition thérapeutique.

Le manque notoire d'efficacité, doublé d'importants effets secondaires, associé aux inhibiteurs à large spectre de MMP testés en clinique suggère également qu'il n'est pas approprié d'inhiber l'activité de toutes les MMP lors du traitement des différents cancers. Ces même inhibiteurs s'étaient pourtant avérés efficaces pour freiner la progression tumorale dans divers modèles murins de cancer lors des essais pré-cliniques; différentes raisons, qui dépassent largement les variations attribuables à la différence inter-espèces, expliquent la disparité observable entre les résultats cliniques et pré-cliniques. D'abord, plusieurs modèles expérimentaux de cancers, où un rôle pro-tumoral de certaines MMP a été observé, impliquaient l'utilisation de souris immunodéficientes; l'absence de réponse immunitaire a sans aucun doute des répercussions importantes sur la progression tumorale dans ces modèles, ce qui fausse l'analyse du rôle des MMP dans ces conditions. Les présents résultats démontrent en effet que MMP9 et MMP10 perdent, en grande partie ou en totalité, leur capacité à freiner la croissance du lymphome sous-cutané lorsque les expériences sont effectuées chez des souris immunodéficientes. Par ailleurs, on sait aujourd'hui que les MMP peuvent moduler certains éléments de la réponse immunitaire; l'effet de l'inhibition des MMP sur la réponse immunitaire n'est donc pas évalué chez des animaux immunodéficients. Ensuite, alors qu'au cours des test pré-cliniques dans les modèles animaux, les inhibiteurs étaient généralement administrés dès les phases précoces de la tumorigénèse et de façon soutenue pendant la progression tumorale, des doses maximales des composés ont été administrées à des patients au stade avancé du cancer lors des études cliniques. Nous savons aujourd'hui que les MMP jouent un rôle

important à diverses étapes de la progression tumorale; dans le modèle de lymphome thymique notamment, MMP3 et MMP10 favorisent la croissance de la tumeur primaire. À cet égard, les bénéfices de l'inhibition thérapeutique des MMP au stade avancé de la maladie seulement, tel que pratiqué dans le cadre des études cliniques chez l'humain, ne peuvent être que partiels. Enfin, la plupart des composés testés en clinique sont des inhibiteurs à large spectre des MMP, ce qui entraîne l'inhibition non-spécifique de certaines MMP; nos résultats qui démontrent que certaines MMP peuvent jouer un rôle bénéfique en freinant la progression tumorale expliquent, en partie, le manque d'efficacité des agents à large spectre lors des études cliniques.

Pour leur part, les raisons des importants effets secondaires associés à l'inhibition thérapeutique des MMP sont multiples. Ainsi, un certain nombre d'agents synthétiques testés inhibent non seulement les MMP mais également, un autre groupe de protéases appelées sheddases, qui appartient à la famille des adamalysines, ce qui contribuerait à l'atteinte musculo-squelettique; en effet, des patients qui ont été traités avec le composé BMS-275291, qui présente une faible activité envers les sheddases, n'ont pas ressenti les effets secondaires musculo-squelettiques habituels[444]. Par ailleurs, en dehors de leur rôle dans certains processus pathologiques tels que le cancer, les MMP participent à d'importantes fonctions physiologiques et leur inhibition, en nuisant au maintien de ces fonctions, est susceptible d'engendrer des effets secondaires, tel qu'observé lors des études cliniques[354].

Dans le but de pallier le manque d'information qui a contribué au développement hâtif et infructueux de stratégies thérapeutiques anti-cancéreuses d'inhibition des MMP, différentes pistes de travail ont été proposées[354]. Ainsi, il faudra déterminer les patrons d'expression temporo-spatiaux et tissus-spécifiques des MMP, de même que les rôles pro- et anti-tumoraux de chacune des MMP, afin de déterminer laquelle peut être ciblée à un stade donné d'un cancer précis. Les travaux de caractérisation de la régulation de l'expression et du rôle des stromélysines dans les LNH effectués au cours de la présente thèse s'inscrivent dans cet effort de caractérisation. Il faudra également développer des modèles murins de cancer qui miment plus efficacement les néoplasmes humains

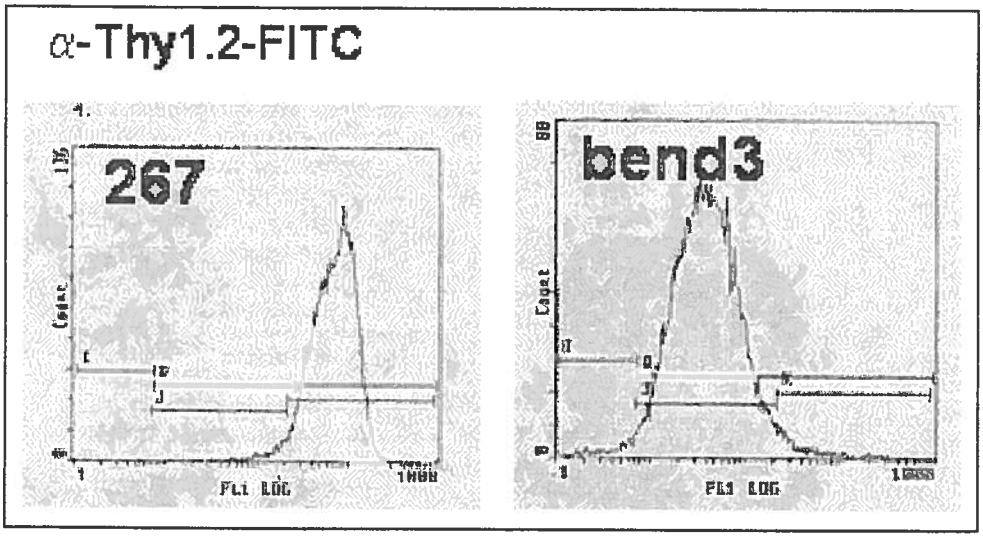
correspondants[445], auxquels devront être appliqués des protocoles thérapeutiques conformes à ceux pratiqués chez les patients dans le cadre des essais cliniques. Lorsqu'il aura été démontré qu'une MMP donnée joue un rôle favorable à la progression d'un type de cancer précis à un stade donnée de la maladie, l'utilisation thérapeutique d'inhibiteurs pourra être validée; ces composés devront toutefois rencontrer certains critères. Il faudra notamment développer des inhibiteurs de MMP n'ayant pas d'effet sur les sheddases. De plus, ces inhibiteurs devront être sélectifs envers une ou quelques MMP dont le rôle dans la progression du cancer étudié a été confirmé, ce qui permettra de limiter les effets secondaires associés aux inhibiteurs à large spectre. À cet égard, il a déjà été démontré à l'aide d'un modèle murin de lymphome T que l'augmentation de la sélectivité envers MMP9 des inhibiteurs synthétiques est corrélée positivement avec leur efficacité anti-métastatique[363]. Enfin, il faudra tester les différents inhibiteurs à la fois chez des patients atteints de cancer aux stades précoce et avancé, ainsi que seuls ou en combinaison avec d'autres drogues, afin de les administrer au moment opportun et d'optimiser leur effet.

Les résultats présentés dans cette thèse suggèrent plutôt que favoriser l'expression ou l'activité de certaines MMP pourrait permettre de contrer efficacement la croissance de certaines tumeurs; dans ce cas également, il faudra s'inspirer des leçons tirées des tests d'inhibiteurs à large spectre en clinique pour développer des stratégies les plus sélectives et ponctuelles possibles. Tout ce travail concerté permettra ultimement de développer des outils supplémentaires permettant de lutter plus efficacement contre les différents cancer.

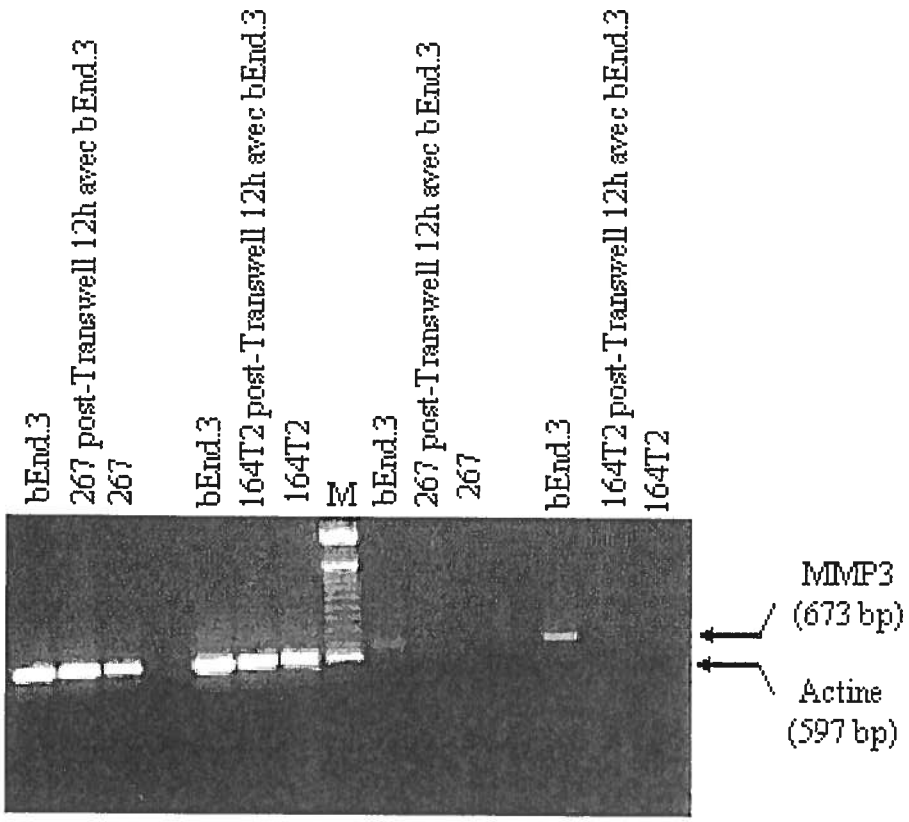
5.8 Conclusion

Il est maintenant établi que l'expression des stromélysines MMP3 et MMP10 est soumise à une fine régulation au sein des tumeurs de LNH. En effet, bien que ces MMP puissent être constitutivement exprimées par certains types cellulaires dont les cellules endothéliales, leur expression basale est nulle dans les cellules lymphomateuses et n'est inductible que dans certaines conditions d'activation cellulaire, engendrées par certains facteurs solubles ou encore par le contact direct et spécifique avec des cellules endothéliales. Ces mécanismes de régulation permettent non seulement de contrôler le niveau d'expression des stromélysines au sein des tumeurs mais également, de déterminer

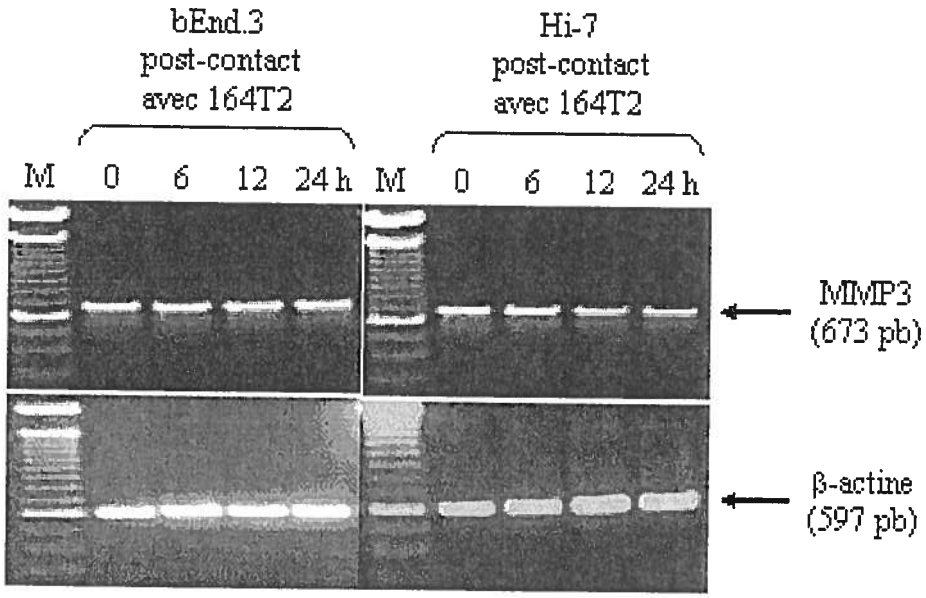
la localisation intra- et péri-tumorale des stromélysines et par le fait même, de favoriser une activité pro- ou anti-tumorale; en effet, il a été démontré que le rôle de MMP10 sur la progresion tumorale varie en fonction du microenvironnement où croissent les tumeurs lymphomateuses. Le travail de caractérisation de l'expression et du rôle des stromélysines dans les LNH amorcé au cours de la présente thèse devra être poursuivi et complété afin de pouvoir établir dans quelles circonstances il serait approprié d'inhiber l'expression et/ou l'activité de ces MMP, ou au contraire de les favoriser, dans un effort de lutte contre les LNH.



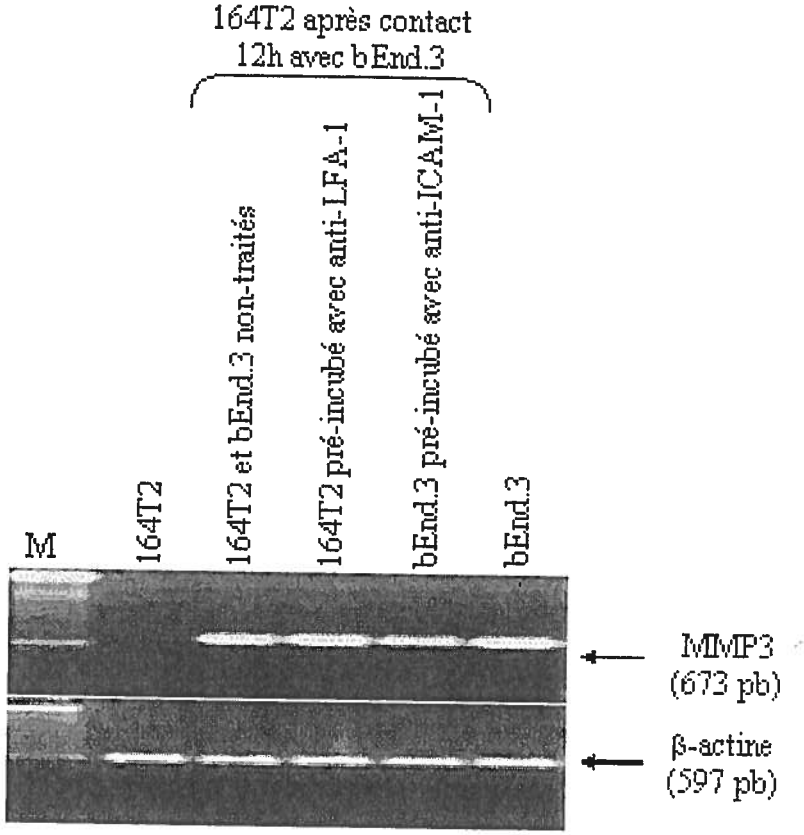
Annexe 1. La pureté des populations de cellules lymphomateuses et endothéliales récupérées après coculture est élevée. La pureté des populations de cellules lymphomateuses et endothéliales séparées à la suite d'une coculture de 12h a été analysée par cytométrie en flux, en utilisant un anticorps reconnaissant spécifiquement Thy1.1 (CD90), un marqueur des cellules de la lignée T (dont font partie les lignées de lymphome thymique 267 et 164T2). L'anti-Thy1.1 était couplé au fluorochrome FITC, dont l'émission est détectée en FL1. Moins de 1% des cellules lymphomateuses 267 isolées après coculture n'exprimaient pas Thy1.1 (suggérant une quasi-absence de cellules endothéliales dans la préparation); de la même façon, moins de 1% des cellules endothéliales bEnd.3 isolées après coculture exprimaient Thy1.1, ce qui suggère que la préparation de cellules endothéliales était pratiquement dénuée de cellules lymphomateuses. Les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes.



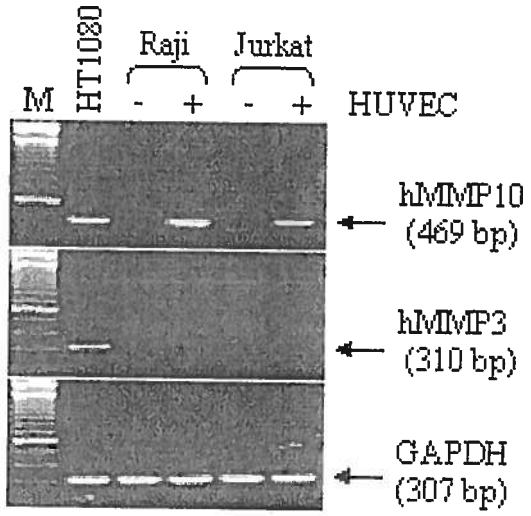
Annexe 2. L'expression de MMP3 n'est pas induite chez les cellules lymphomateuses après interaction à distance avec les cellules endothéliales. L'expression de MMP3 dans les cellules lymphomateuses 164T2 après coculture en Transwell avec les cellules endothéliales bEnd.3 a été analysée par RT-PCR. Dans ces conditions, les deux types cellulaires sont séparés par un filtre poreux ne permettant que l'échange de molécules solubles. Contrairement au contact direct, ce contact indirect n'a pas été suffisant pour l'induction de l'expression de MMP3 dans les cellules lymphomateuses après interaction avec des cellules endothéliales. M: échelle de masse moléculaire d'ADN (100 pb). Les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes.



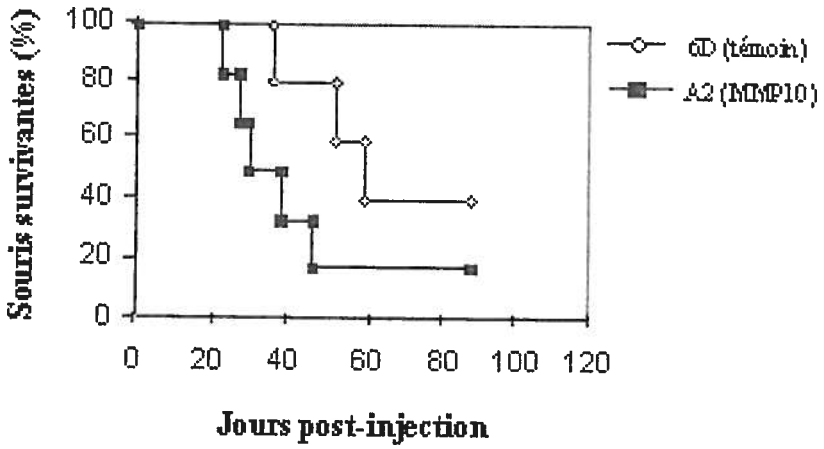
Annexe 3. L'expression de MMP3 chez les cellules endothéliales et les fibroblastes n'est pas modulée par le contact avec les cellules lymphomateuses. L'effet du contact direct avec les cellules lymphomateuses 164T2 sur l'expression de MMP3 par les cellules endothéliales bEnd.3 et les cellules fibroblastiques Hi-7 a été analysé par RT-PCR, au moyen de cocultures d'une durée de 12h. M: échelle de masse moléculaire d'ADN (100 pb). Les résultats sont représentatifs d'au moins deux expériences indépendantes.



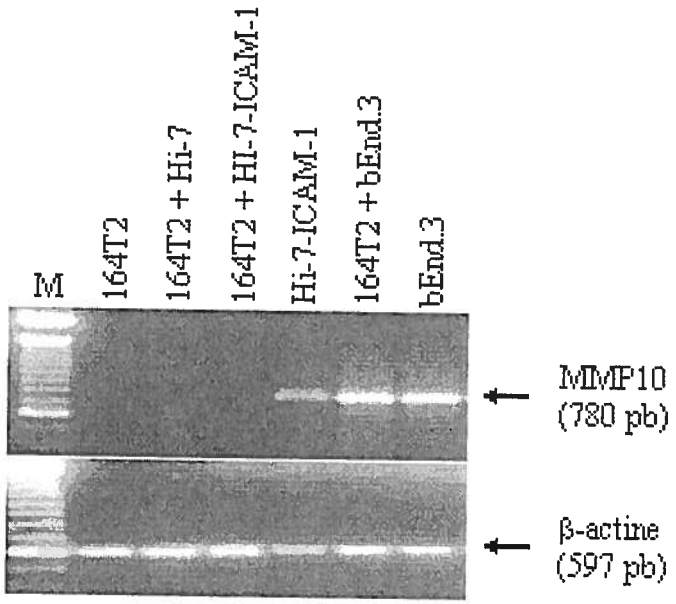
Annexe 4. ICAM-1 et LFA-1 ne sont pas impliqués dans l'induction de l'expression de MMP3 chez les cellules de lymphome après contact avec des cellules endothéliales. Le rôle des molécules d'adhésion ICAM-1 et LFA-1 dans l'induction de l'expression de MMP10 dans les cellules lymphomateuses après contact avec les cellules endothéliales a été analysé par RT-PCR. Dans certains cas, les cellules lymphomateuses 164T2 ont été pré-incubées pendant 30 min avec un anticorps neutralisant dirigé contre LFA-1, ou les cellules endothéliales bEnd.3 ont été pré-incubées avec un anticorps neutralisant dirigé contre ICAM-1, avant que les deux types cellules soient cocultivés pendant 12h. M: échelle de masse moléculaire d'ADN (100 pb). Les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes.



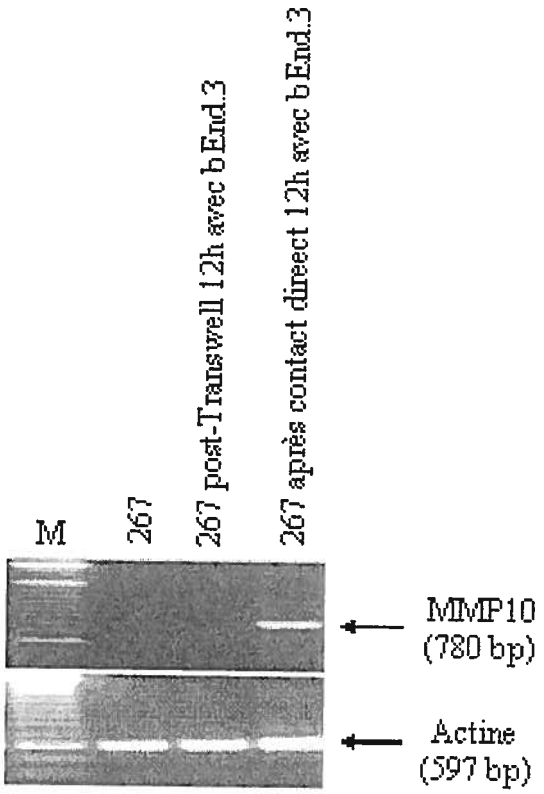
Annexe 5. L'expression de MMP10, mais pas MMP3, est induite chez les cellules lymphomateuses humaines après contact avec des cellules endothéliales. Le rôle du contact direct (pendant 12h) avec des cellules endothéliales (HUVEC) sur l'expression de MMP10 et MMP3 par des lignées de lymphome B (Raji) et T (Jurkat) humaines a été analysé par RT-PCR. M: échelle de masse moléculaire d'ADN (100 pb). Les cellules de fibrosarcome humaines HT1080, qui expriment MMP3 et MMP10 constitutivement, ont été utilisées comme témoin positif. Les résultats sont représentatifs d'au moins deux expériences indépendantes.



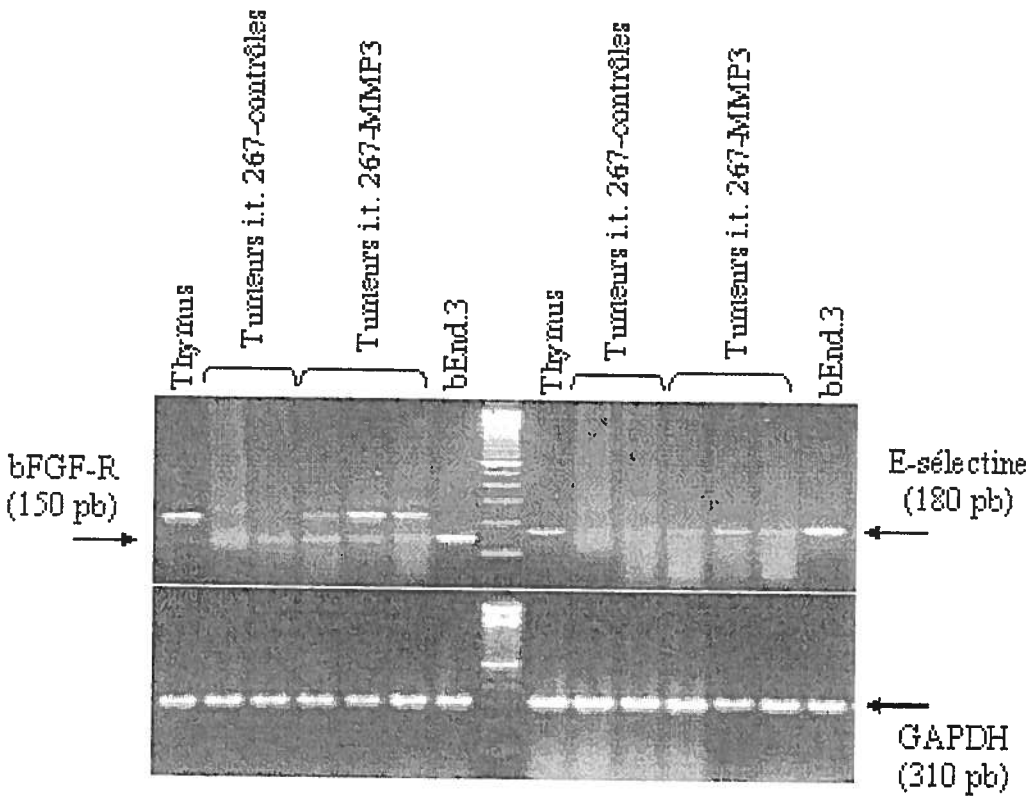
Annexe 6. MMP10 accélère la croissance de tumeurs lymphoïdes dans la région thymique. La courbe de survie des souris ayant reçu une injection par voie intrathymique de cellules lymphomateuses surexprimant MMP10 (267-MMP10, clone A2) est différente (p=0.0401) de celle des souris ayant reçu une injection de cellules lymphomateuses témoin (267-vecteur, clone 6D). Le temps moyen de survie des souris ayant reçu une injection du clone A2 (36 jours) est plus plus court que celui des souris ayant reçu une injection de cellules témoin (53 jours). Les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes avec ces clones.



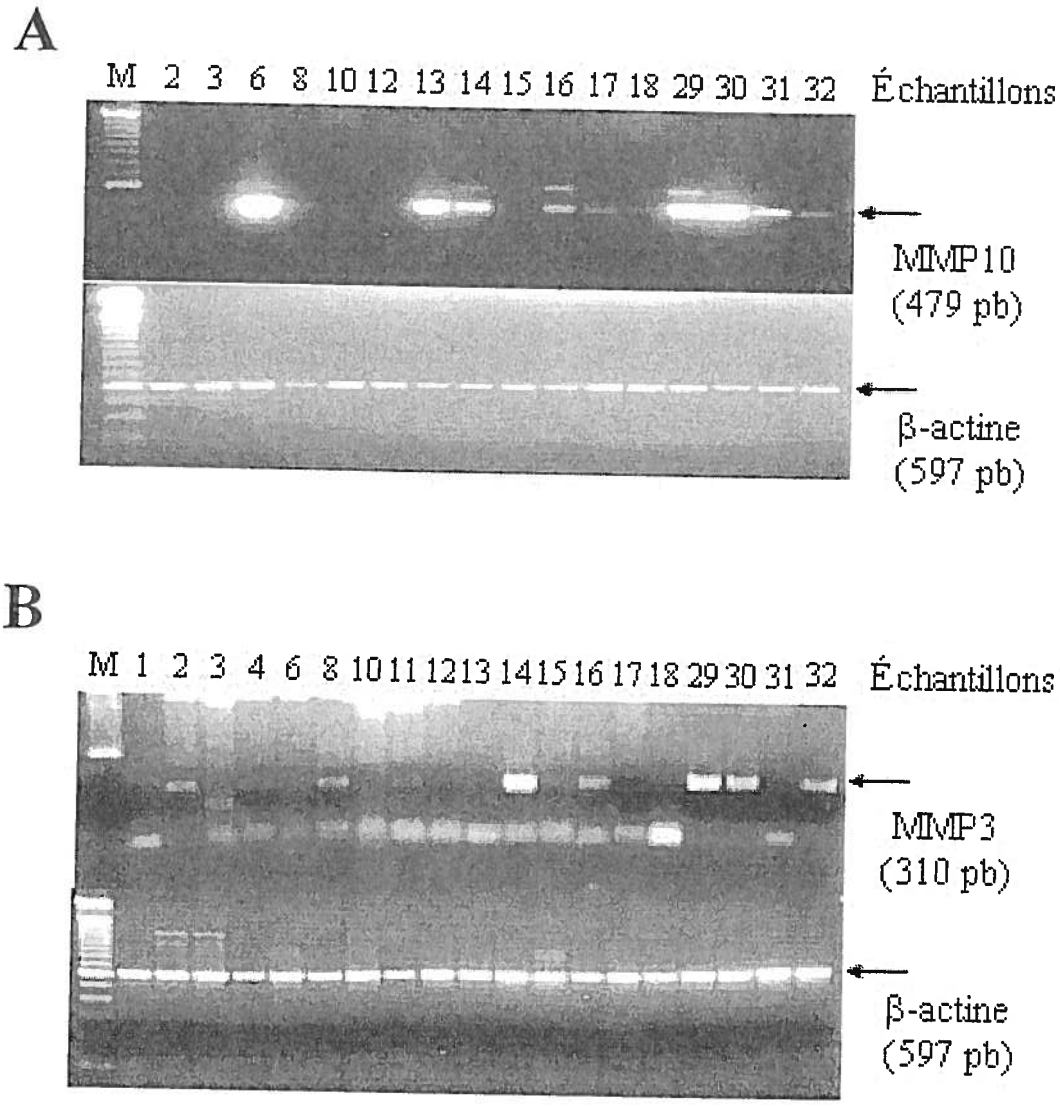
Annexe 7. L'expression de ICAM-1 à la surface de cellules stromales n'est pas suffisante pour induire l'expression de MMP10 chez les cellules lymphomateuses en coculture. Bien que l'expression de MMP10 dans les cellules lymphomateuses (164T2) soit induite par contact avec des cellules endothéliales (bEnd.3) via ICAM-1, elle n'est pas induite par contact avec des fibroblastes transfectés avec ICAM-1 (HI-7-ICAM-1). M: échelle de masse moléculaire d'ADN (100 pb). Les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes.



Annexe 8. L'expression de MMP10 n'est pas induite chez les cellules lymphomateuses après interaction à distance avec les cellules endothéliales. L'expression de MMP10 dans les cellules lymphomateuses 267 après coculture en Transwell avec les cellules endothéliales bEnd.3 a été analysée par RT-PCR. Dans ces conditions, les deux types cellulaires sont séparés par un filtre poreux ne permettant que l'échange de molécules solubles. Contrairement au contact direct, ce contact indirect n'a pas été suffisant pour l'induction de l'expression de MMP10 dans les cellules lymphomateuses après interaction avec des cellules endothéliales. M: échelle de masse moléculaire d'ADN (100 pb). Les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes.



Annexe 9. Évaluation du niveau d'angiogénèse au sein des tumeurs i.t. Les niveaux des marqueurs des cellules endothéliales bFGF-R et E-sélectine ont été analysés par RT-PCR et sont plus fortement exprimés au sein des tumeurs i.t. dérivant de cellules lymphomateuses surexprimant MMP3 que celles dérivant des cellules témoin. M: échelle de masse moléculaire d'ADN (100 pb). L'ARN des cellules endothéliales bEnd.3 a été utilisé comme témoin positif. Les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes.



Annexe 10. Analyse de l'expression des stromélysines chez différentes tumeurs de LNH. Les différents numéros correspondent à des échantillons tumoraux prélevés dans des patients atteints de LNH variés. La présence des ARN de **A)** MMP10 et **B)** MMP3 a été déterminée par RT-PCR. M= échelle de masse moléculaire d'ADN (100 bp). MMP3 et MMP10 sont exprimées dans une fraction des différentes tumeurs analysées seulement.

Annexe 11.

Emerging features in the regulation of MMP9 gene expression for the development of novel molecular targets and therapeutic strategies.

Yves St-PieiTe, Céline Van Themsche and Pierre-Olivier Estève

Current Drug Targets-lnjlammation and Allergy 2003 2:206-215.
DOI**:** 10.2174/1568010033484133

Article de revue auquel j'ai contribué à titre de co-auteure.

Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.

Annexe 12.

Matrix metalloproteinases in inflammation of the Jung.

Yves St-Pierre and Céline Van Themsche

Proteases in Tissue Remodeling of Lung and Heart, Edited by
Lendeckel and Hooper, Kluwer Academie/Plenum Publishers, New York, 2003

Chapitre de livre auquel j'ai contribué à titre de co-auteure

Ce chapitre a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.

Annexe 13. Origine et description des lignées lymphomateuses 164T2 et 267.

Les lignées de cellules lymphomateuses 164T2 et 267 utilisées dans le cadre du présent travail ont été obtenues *in vitro* à partir de lymphomes thymiques radio-induits chez des souris C57BL/6, selon la procédure décrite par Lieberman et ses collaborateurs [55]. Brièvement, les lymphomes thymiques *ex vivo* étaient homogénéisés dans du PBS; les cellules récoltées étaient lavées avant d'être resuspendues dans du milieu de culture frais puis ensemencées dans des pétris. Les cultures étaient maintenues pendant plusieurs semaines, de façon à sélectionner les cellules transformées. Des lignées cellulaires clonales ont finalement été obtenues par dilution limite.

Le caractère tumorigénique de chacune des lignées de cellules lymphomateuses obtenues était démontré au moyen d'injections par voie intrathymique ou intraveineuse, qui engendrent chez les animaux receveurs (syngéniques C57BL/6) des lymphomes thymiques ou des tumeurs secondaires disséminées, respectivement. Ainsi, les 267 inoculées dans le thymus de souris hôte génèrent un lymphome thymique après une période de latence variant de 3 à 5 semaines [155], tandis que les 164T2 injectées par voie intraveineuse produisent en 6 à 8 semaines des tumeurs lymphoïdes dans les reins, le foie et la rate des souris hôtes [56].

L'expression de certaines molécules à la surface des lignées cellulaires 164T2 et 267 a été caractérisée par cytométrie en flux: le fait qu'elles expriment CD3 et le TCRαβ confirme qu'il s'agit de lymphomes T, tandis que l'absence d'expression de CD4 et CD8 (bien qu'une expression faible et peu reproductible de CD8 ait été parfois observée chez les 267) souligne le stade immature des thymocytes au moment de leur transformation, à l'image des autres lignées de lymphome radio-induit générées précédemment [40; 55].

Enfin, les lignées 164T2 et 267 expriment LFA-1, ICAM-1 et ICAM-2 et L-sélectine constitutivement.

Références

1. Cossman J, Annunziata CM, Barash S, Staudt L, Dillon P, He WW, Ricciardi-Castagnoli P, Rosen CA, Carter KC. Reed-Sternberg cell genome expression supports a B-cell lineage. Blood. 1999; 94(2): 411-6.

2. Watanabe K, Yamshita Y, Nakayama A, Hasegawa Y, Kojima H, Nagasawa T, Mori N. Varied B-cell immunophenotypes of Hodgkin/Reed-Sternberg cells in classic Hodgkin's disease. Histopathology. 2000; 36(4): 353-61.

3. Kuppers R, Rajewsky K. The origin of Hodgkin and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's disease. Annu Rev Immunol. 1998; 16(1): 471-93.

4. Marafioti T, Hummel M, Foss HD, Laumen H, Korbjuhn P, Anagnostopoulos I, Lammert H, Demel G, Theil J, Wirth T, Stein H. Hodgkin and Reed-Sternberg cells represent an expansion of single clone originating from a germinal center B-cell with functional immunoglobulin gene rearrangements but defective immunoglobulin transcription. Blood. 2000; 95(4): 1443-50.

5. Aisenberg AC. Historical review of lymphomas. Br J Haematol. 2000; 109(3): 466-76.

6. Garber K. Lymphoma rate rise continues to baffle researchers. J Natl Cancer Inst. 2001; 93(7): 494-6.

7. Vose JM, Chiu BC-H, Cheson BD, Dancey J, Wright J. Update of epidemiology and therapeutics for non-hogkin's lymphoma. Hematology. 2002; 241-62.

8. Rabbitts TH. Chromosomal translocation master genes, mouse models and experimental therapeutics. Oncogene. 2001; 20(40): 5763-77.

9. Staudt LM. Gene expression profiling of lymphoid malignancies. Annu Rev Med. 2002; 53(1): 303-18.

10. Mitelman F, Mertens F, Johansson B. A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. Nat Genet. 1997; 15(numéro spécial): 417-74.

11. Evans LS, Hancock BW. Non-hodgkin lymphoma. Lancet. 2003; 362(9378): 139-46.

12. Haluska FG, Tsujimoto Y, Croce CM. The t(8;14) chromosome translocation of the Burkitt lymphoma cell line Daudi occured during immunoglobulin gene rearrangement and involved the heavy chain diversity region. Proc Natl Acad Sci USA. 1987; 84(19): 6835-9.

13. Hecht JL, Aster JC. Molecular biology of Burkitt's lymphoma. J Clin Oncol. 2000; 18(21): 3707-21.

14. Willis TG, Dyer MJS. The role immunoglobulin translocations in the pathogenesis of B-cell malignancies. Blood. 2000; 96(3): 808-22.

15. Rowley JD. The role of chromosome translocations in leukemogenesis. Semin Hematol. 1999; 36(Suppl 7): 59-72.

16. Armitage JO, Greer JP, Levine AM, Weisenberger DD, Formenti SC, Bast M, Conley S, Pierson J, Linder J, Cousar JB. Peripheral T-cell lymphoma. Cancer. 1989; 63(1): 158-63.

17. Coiffier B, Brousse N, Peuchmaur M, Berger F, Gisselbrecht C, Bryon PA, Diebold J. Peripheral T-cell lymphomas have a worse prognosis than B-cell lymphomas: a prospective study of 361 immunophenotyped patients treated with the LNH-84 regimen. Ann Oncol. 1990; 1(1): 45-50.

18. Anonyme. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The international non-Hodgkin's lymphoma prognostic factors project. N Engl J Med. 1993; 329(14): 987-94.

19. Gallagher CJ, Gregory WM, Jones AE, Stansfeld AG, Richards MA, Dhaliwal HS, Malpas JS, Lister TA. Follicular lymphomas: prognostic factors for response and survival. J Clin Oncol. 1986; 4(10): 1470-80.

20. Nakajima H, Kim YB, Terano H, Yoshida M, Horinouchi S. FR9011228, a potent antitumor antibiotic, is a novel histone deacetylase inhibitor. Exp Cell Res. 1998; 241(1): 126-33.

21. Sandor V, Senderowicz A, Sackett D. Depsipeptide causes G1 cell cycle arrest through disruption of signal transduction through MAPkinase. Proc Am Assoc Cancer Res. 1998; 39(abstract): A3812.

22. Tsujimoto Y, Cossamn J, Jaffe E, Croce CM. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. Science. 1985; 228(4706): 1440-3.

23. Miyashita T, Reed JC. Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line. Blood. 1993; 81(1): 151-7.

24. Klasa RJ, Bally MB, Goldie JH, Gascoyne RD, Wong FM. Eradication of non-Hodgkin's lymphoma in SCID mice by Bcl-2 antisense oligonucleotides combined with low-dose cyclophosphamide. Clin Cancer Res. 2000; 6(6): 2492-500.

25. Philip T, Guglielmi C, Hagenbeek A, Somers R, Van der Lelie H, Bron D, Sonneveld P, Gisselbrecht C, Cahn JY, Harousseau JL. Autologous bone marrow transplantation as compared with salvage chemotherapy in relapses of chemotherapy-sensitive non-Hodgkin's lymphoma. N Engl J Med. 1995; 333(23): 1540-5.

26. Ratanatharathorn V, Uberti J, Karanes C, Abella E, Lum LG, Momin F, Cummings G, Sensenbrenner LL. Prospective comparative trial of autologous versus allogeneic bone marrow transplantation in patients with non-Hodgkin's lymphoma. Blood. 1994; 84(4): 1050-5.

27. Khouri IF, Keating M, Korbling M, Przepiorka D, Anderlini P, O'Brien S, Giralt S, Ippoliti C, von Wolff B, Gajewski J, Donato M, Claxton D, Ueno N, Andersson B, Gee A, Champlin R. Tranplant-lite: induction of graft-versus-malignancy using fludarabine-based nonablative chemotherapy and allogeneic blood progenitor-cell transplantation as tratment for lymphid malignancies. J Clin Oncol. 1998; 16(8): 2817-24.

28. Reff ME, Carner K, Chambers KS, Chinn PC, Leonard JE, Raab R, Newman RA, Hanna N, Anderson DR. Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. Blood. 1994; 83(2): 435-45.

29. Maloney DG, Smith BJ, Appelbaum FR. The anti-tumor effect of monoclonal anti-CD20 antibody (mAb) includes direct anti-proliferative antibody and induction of apoptosis in CD20 positive non-Hodgkin's lymphoma (NHL) cell lines. Blood. 1996; 84(abstract): 2535a.

30. Rodolfo M, Melani C, Zilocchi C, Capetti B, Luison E, Arioli I, Parenza M, Canevari S, Colombo MP. IgG2a induced by interleukin (IL) 12-producing tumor cell vaccines but not IgG1 induced by IL-4 vaccine is associated with the eradication of experimental metastases. Cancer Res. 1998; 58(24): 5812-7.

31. Wooldridge JE, Ballas Z, Krieg AM, Weiner GJ. Immunostimulatory oligodeoxynucleodides containing CpG motifs enhance the efficacy of monoclonal antibody therapy of lymphoma. Blood. 1997; 89(8): 2994-8.

32. Greimers R, Rongy AM, Defresnes MP, Boniver J, Hooghe R. Phenotype of thymic lymphomas in the mouse. Leuk Res. 1986; 10(7): 777-82.

33. Rongy AM, Humblet C, Lelièvre R, Greimers R, Defresnes MP, Boniver J. Abnormal thymocyte subpopulations in split dose irradiated C57BL/Ka mice before the onset of lymphomas. Effects of bone marrow grafting. Thymus. 1990; 16(1): 7-27.

34. Lieberman M, Kaplan HS. Leukemogenic activity of filtrates from radiation-induced lymphoid tumors of mice. Science. 1959; 130(3372): 387-8.

35. Kaplan HS. On the natural history of murine leukemias: presidential address. Cancer Res. 1967; 27(8): 1325-40.

36. Ihle JN, Joseph DR, Pazmino NH. Radiation leukemia in C57BL/6 mice. II. Lack of ecotropic virus expression in the majority of lymphomas. J Exp Med. 1976; 144(6): 1406-23.

37. Kaplan HS, Brown MB. A quantitative dose-response study of lymphoid tumor development in irradiated C57 black mice. J Natl Cancer Inst. 1952; 13(1): 185-208.

38. Kaplan HS. Leukemia and lymphoma in experimental and domestic animals. Ser Haematol. 1974; 7(2): 94-163.

39. Boniver J, Declève A, Lieberman M, Honsik C, Travis M, Kaplan HS. Marrow-thymus interactions during radiation leukemogenesis in C57BL/Ka mice. Cancer Res. 1981; 41(2): 390-2.

40. Muto M, Kubo E, Sado TJ. Cellular events during radiation-induced leukemogenesis in mice: abnormal T-cell differentiationin the thymus and defect of thymocyte precursors in the bone marrow after split-dose irradiation. J Immunol. 1985; 134(3): 2026-31.

41. Defresnes MP, Greimers R, Lenaerts P, Boniver J. Effects of bone marrow grafting on preleukemias cells and thymic nurse cells in C57BL/Ka mice after a leukemogenic split-dose irradiation. J Natl Cancer Inst. 1986; 77(5): 1079-85.

42. Houben-Defresnes MP, Boniver J. Thymic nurse cells account for thymus dependency of preleukemic cells after inoculation of radiation leukemia virus. Leuk Res. 1983; 7(5): 575-80.

43. Defresnes MP, Rongy AM, Boniver J. Cellular aspects of radiation leukemogenesis. II. Thymic microenvironment and nurse cells. Leuk Res. 1986; 10(7): 783-9.

44. Houben-Defresnes MP, Varlet A, Boniver J. Thymic nurse cells and repopulation after whole body sublethal irradiation in mice. Thymus. 1984; 6(5): 324-33.

45. Boniver J, Declève A, Honsik C, Lieberman M, Kaplan HS. Phenotypic characterization in mice of thymus target cells susceptible to productive infection by the radiation leukemia virus. J Natl Cancer Inst. 1981; 67(5): 1139-51.

46. Kaplan HS, Moses LE, Brown MB, Nagareda S, Hirsh BB. The time factor in inhibition of lymphoid tumor development by injection of bone marrow cell suspension into irradiated C57BL mice. J Natl Cancer Inst. 1955; 15(4): 975-9.

47. Humblet C, Defresnes MP, Greimers R, Rongy AM, Boniver J. Further studies on the mechanism of radiation-induced thymic lymphoma prevention by bone marrow transplantation in C57BL mice. Leukemia. 1989; 3(11): 813-8.

48. Haran-Ghera N. Spontaneous and induced preleukemia cells in C57BL/Ka mice: brief communications. J Natl Cancer Inst. 1978; 60(3): 707-10.

49. Baylac-Kalabokias H, Astier-Gin T, Borremans B, Legrand E, Hooghe R, Houben-Defresnes MP, Janowski M, Duplan JF, Guillemain B. Evidence of recombinant ecotropic provirus integration in thymic lymphomas induced by direct or indirect radiation effects. Leuk Res. 1989; 13(2): 131-43.

50. Lieberman M, Hansteen GA, JM Mc Cune, Scott ML, White JJ, Weissman IL. Indirect induction of radiation lymphomas in mice. Evidence for a novel transmissible leukemogen. J Exp Med. 1987; 166(6): 1883-93.

51. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. Cancer Metastasis Rev. 1989; 8(2): 98-101.

52. Fidler IJ. Seed and soil revisited. Contribution of the organ microenvironment to cancer metastasis. Surg Oncol Clin N Amer. 2001; 10(2): 257-68.

53. Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClannahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verastegui E, Zlotnik A. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. Nature. 2001; 410(6824): 50-6.

54. Vanderkerken K, De Greef C, Asosingh K, Arteta B, De Veerman M, Vande Broek I, Van Riet I, Kobayashi M, Smedsrod B, Van Camp B. Selective initial in vivo homing pattern of 5T2 multiple myeloma cells in the C57/BL/KalwRij mouse. Br J Cancer. 2000; 82(4): 953-9.

55. Lieberman M, Declève A, Ricciardi-Castagnoli P, Boniver J, Finn OJ, Kaplan HS. Establishment, characterization and virus expresion of cell lines derived from radiation- and virus-induced lymphomas of C57BL/Ka mice. Int J Cancer. 1979; 24(2): 168-77.

56. 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(2): 623-9.

57. Bode W, Gomis-Rüth F-X, Stöcker W. Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGHHX and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the "metzincins". FEBS Lett. 1993; 331(1-2): 134-40.

58. Lepage T, Gache C. Early expression of collagenase-like hatching enzyme gene in the sea urchin embryo. EMBO J. 1990; 9(9): 3003-12.

59. Wada K, Sato H, Kinoh H, Kajita M, Yamamoto H, Seiki M. Cloning of three Caenorhabditis elegans genes potentially encoding novel matrix metalloproteinases. Gene. 1998; 211(1): 57-62.

60. Pak JH, Liu CY, Huangpu J, Graham JS. Construction and characterization of the soybean leaf metalloproteinase cDNA. FEBS Lett. 1997; 404(2-3): 283-8.

61. Basset P, Bellocq JP, Wolf C, Stoll I, Hutin P, Limacher JM, Chenard MP, Rio MC, Chambon P. A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. Nature. 1990; 348(6303): 699-704.

62. Park HI, Ni J, Gerkema FE, Liu D, Belozerov VE, Sang QX. Identification and characterization of human endometase (matrix metalloproteinase-26) from endometrial tumor. J Biol Chem. 2000; 275(27): 20540-4.

63. Shapiro SD, Kobayashi DK, Ley TJ. Cloning and characterization of a unique elastolytic metalloproteinase produced by human alveolar macrophages. J Biol Chem. 1993; 268(32): 23824-9.

64. Shipley JM, Wesselschmidt RL, Kobayashi DK, Ley TJ, Shapiro SD. Metalloelastase is required for macrophage-mediated proteolysis and matrix invasion in mice. Proc Natl Acad Sci USA. 1996; 93(9): 3942-6.

65. Pendas AM, Knäuper V, Puente XS, Llano E, Mattei MG, Apte S, Murphy G, Lopez-Otin C. Identification and characterization of a novel human matrix metalloproteinase with unique structural characteristics, chromosomal location, and tissue distribution. J Biol Chem. 1997; 272(7): 4281-6.

66. Kolb C, Mauch S, Peter HH, Krawinkel U, Sedlacek R. The matrix metalloproteinase RASI-1 is expressed in synovial blood vessels of a rheumatoid arthritis patient. Immunol Lett. 1997; 57(1-3): 83-8.

67. Bartlett JD, Simmer JJP, Xue J, Margolis HC, Moreno EC. Molecular and mRNA distribution of a novel matrix metalloproteinase isolated from the porcine enamel organ. Gene. 1996; 183(1-2): 123-8.

68. Yang M, Kurkinen M. Cloning and characterization of a novel matrix metalloproteinase (MMP), CMMP, from chicken embryo fibroblasts: CMMP, Xenopus XMMP and human MMP19 have a conserved unique cysteine in the catalytic domain. J Biol Chem. 1998; 273(28): 17893-900.

69. Velasco G, Pendas AM, Fueyo A, Knäuper V, Murphy G, Lopez-Otin C. Cloning and characterization of MMP-23, a new matrix metalloproteinase predominantly expressed in reproductive tissues and lacking conserved domains in other family members. J Biol Chem. 1999; 274(8): 4570-6.

70. Marchenko GN, Strongin AY. MMP-28, a new human matrix metalloproteinase with a unusual cysteine-switch sequence is widely expressed in tumors. Gene. 2001; 265(1-2): 87-93.

71. Lohi J, Wilson CL , Roby JD, Parks WC. Epilysin, a novel human matrix metalloproteinase (MMP-28) expressed in testis and keratinocytes in response to injury. J Biol Chem. 2001; 276(13): 10134-44.

72. Brinckerhoff CE, Sirum-Connelly KL, Karmilowicz MJ, Auble DT. Expression of stromelysin and stromelysin-2 in rabbit and human fibroblasts. Matrix. 1992; 1(Suppl.): 165-75.

73. Templeton NS, Brown PD, Levy AT, Margulies IM, Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. Cloning and characterization of human tumor cell interstitial collagenase. Cancer Res. 1990; 50(17): 5431-7.

74. Devarajan P, Johnston JJ, Ginsberg SS, Van Wart HE, Berliner N. Structure and expression of neutrophil gelatinase cDNA. Identity with type IV collagenase from HT1080 cells. J Biol Chem. 1992; 267(35): 25228-32.

75. Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. Anal Biochem. 1994; 218(2): 325-9.

76. Zucker S, Mancuso P, Dimassimo P, Lysik RM, Conner C, Wu CL. Comparison of techniques for measurement of gelatinases/type IV collagenases: enzyme-linked immunoassays versus substrate degradation assays. Clin Exp Metastasis. 1994; 12(1): 13-23.

77. Van Wart HE, Birkedal-Hanson H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. Proc Natl Acad Sci USA. 1990; 87(14): 5578-82.

78. Pei D, Kang T, Qi H. Cysteine array matrix metalloproteinase (CA-MMP)/MMP-23 is a type II transmembrane matrix metalloproteinase regulated by a single cleavage for both secretion and activation. J Biol Chem. 2000; 275(43): 33988-97.

79. Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, Seiki M. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells. Nature. 1994; 370(6484): 61-5.

80. Pei D, Weiss SJ. Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. Nature. 1995; 375(6528): 244-7.

81. Murphy G, Knäuper V. Relating matrix metalloproteinase structure to function: why the "hemopexin" domain? Matrix Biol. 1997; 15(8-9): 511-8.

82. Bode W. A helping hand for collagenases: the haemopexin-like domain. Structure. 1995; 3(6): 527-30.

83. Clark IM, Cawston TE. Fragments of human fibroblast collagenase. Purification and characterization. Biochem J. 1989; 263(1): 201-6.

84. Gururajan R, Grenet J, Lahti JM, Kidd VJ. Isolation and characterization of the two novel metalloproteinase genes linked to the Cdc2L locus on human chromosome 1p36.3. Genomics. 1998; 52(1): 101-6.

85. Itoh Y, Kajita M, Kinoh H, Mori N, Okada A, Seiki M. Membrane-type 4 matrix metalloproteinase (MT4-MMP, MMP-17) is a glycosylphosphatidylinositol-anchored proteinase. J Biol Chem. 1999; 274(48): 34260-6.

86. Lovejoy B, Cleansby A, Hassell AM, Longley K, Luther MA, Weigl D, McGeehan G, McElroy AB, Drewry D, Lambert MH, Jordan SR. Structure of the catalytic domain of fibroblast collagenase complexed with an inhibitor. Science. 1994; 263(5145): 375-7.

87. Bode W, Reinemer P, Huber R, Kleine T, Schnierer S, Tschesche H. The X-ray crystal structure of the catalytic domain of human neutrophil collagenase inhibited by a substrate analogue reveals the essentials of catalysis and specificity. EMBO J. 1994; 13(6): 1263-9.

88. Gooley PR, O'Connell JF, Marcy AI, Cuca GC, Salowe SP, Bush BL, Hermes JD, Esser CK, Hagmann WK, Springer JP, Johnson BA. NMR structure of inhibited catalytic domain of human stromelysin-1. Nature Struct Biol. 1994; 1(2): 111-8.

89. Wu YI, Munshi HG, Sen R, Snipas SJ, Salvesen GS, Fridman R, Stack MS. Glycosylation broadens the substrate profile of membrane type 1 matrix metalloproteinase. J Biol Chem. 2004; 279(9): 8278-89.

90. Kotra LP, Zhang L, Fridman R, Orlando R, Mobashery S. N-Glycosylation pattern of the zymogenic form of human matrix metalloproteinase-9. Bioorg Chem. 2002; 30(5): 356-70.

91. Saarinen J, Welgus HG, Flizar CA, Kalkkinen N, Helin J. N-glycan structures of matrix metalloproteinase-1 derived from human fibroblasts and from HT-1080 fibrosarcoma cells. Eur J Biochem. 1999; 259(3): 829-40.

92. Giambernardi TA, Grant GM, Taylor GP. Overview of matrix metalloproteinase expression in cultured human cells. Matrix Biol. 1998; 16(8): 483-96.

93. Werner E, Kheradmand F, Isberg RR, Werb Z. Phagocytosis mediated by Yersinia invasin induces collagenase-1 expression in rabbit synovial fibroblasts through a proinflammatory cascade. J Cell Sci. 2001; 114(Pt 18): 3333-43.

94. van den Berg WB, Joosten LA, Kollias G, van De Loo FA. Role of tumour necrosis alpha in experimental arthritis: sepaate activity of interleukin 1 beta in chronicity and cartilage destruction. Ann Rheum Dis. 1999; 58(Suppl. 1): 140-8.

95. McCawley LJ, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression. Mol Med Today. 2000; 6(4): 149-56.

96. Llano E, Pendas AM, Freije JP, Nakano A, Knäuper V, Murphy G, Lopez-Otin C. Identification and characterization of human MT5-MMP, a new membrane-bound activator of progelatinase A overexpressed in brain tumors. Cancer Res. 1999; 59(11): 2570-6.

97. Stetler-Stevenson WG. Dynamics of matrix turnover during pathologic remodeling of the extracellular matrix. Am J Pathol. 1996; 148(5): 1345-50.

98. Hofmann UB, Westphal JR, Waas ET, Zendman AJW, Cornelissen IMHA, Ruiter DJ, van Muijen GNP. Matrix metalloproteinases in human melanoma cell lines and xenografts: increased expression of activated matrix metalloproteinase -2 (MMP-2) correlates with melanoma progression. Br J Cancer. 1999; 81(5): 774-82.

99. Stetler-Stevenson WG, Hewitt R, Corcoran M. Matrix metalloproteinases and tumor invasion: from correlation and causality to the clinic. Semin Cancer Biol. 1996; 7(3): 147-54.

100. Pyke C, Ralfkiaer E, Huhtala P, Hurskainen T, Dan0 K, Tryggvason K. Localization of messenger RNA for Mr 72000 and 92000 type IV collagenases in human skin cancers by in situ hybridization. Cancer Res. 1992; 52(5): 1336-41.

101. Basset P, Okada A, Chenard MP, Kannan R, Stoll I, Anglard P, Bellocq JP, Rio MC. Matrix metalloproteinases as stromal effectors of human carcinoma progression: therapeutic implications. Matrix Biol. 1997; 15(8-9): 535-41.

102. Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. J Clin Oncol. 2000; 18(5): 1135-49.

103. Opdenakker G, Paemen L, Norga K, Masure S. Proteinase inhibition in invasive cancer therapy: four control levels of matrix degradation. Int J Cancer. 1997; 70(5): 628-30.

104. Mauviel A. Cytokine regulation of metalloproteinase gene expression. J Cell Biochem. 1993; 53(4): 288-95.

105. Opdenakker G, Van Damme J. Cytokine-regulated proteases in autoimmune diseases. Immunol Today. 1994; 15(3): 103-7.

106. Madri JA, Graesser D, Haas T. The role of adhesion molecules and proteinases in lymphocyte transendothelial migration. Biochem Cell Biol. 1996; 74(6): 749-57.

107. Colige AC, Lambert CA, Nusgens BV, Lapierre CM. Effect of cell-cell and cell-matrix interactions on the response of fibroblasts to epidermal growth factor in vitro. Expression of collagen type IV, collagenase, stromelysin and tissue inhibitor of metalloproteinases. Biochem J. 1992; 285(Part 1): 215-21.

108. Hanzawa M, Shindoh M, Higashino F, Yasuda M, Inoue N, Hida K, Ono M, Kohgo T, Nakamura M, Notani K-i, Fukuda H, Totsuka Y, Yoshida K, Fujinaga K. Hepatocyte growth factor upregulates E1AF that induces oral squamous cell carcinoma cell invasion by activating matrix metalloproteinase genes. Carcinogenesis. 2000; 21(6): 1079-85.

109. Wahl LM, Corcoran M, Mergenhagen SE, Finbloom DS. Inhibition of phospholipase activity in human monocytes by IFN-gamma blocks endogenous prostaglandin E2-dependent collagenase production. J Immunol. 1990; 144(9): 3518-22.

110. Corcoran ML, Stetler-Stevenson WG, Brown PD, Wahl LM. Interleukin 4 inhibition of prostaglandin E2 synthesis blocks interstitial collagenase and 92-kDa type IV collagenase/gelatinase production by human monocytes. J Biol Chem. 1992; 267(1): 515-9.

111. Lacraz S, Nicod L, Galve-de Rochemonteix B, Baumberger C, Dayer JM, Welgus HG. Supression of metalloproteinase biosynthesis in human alveolar macrophages by interleukin-4. J Clin Invest. 1992; 90(2): 382-8.

112. Zhang Y, McCluskey K, Fujii K, Wahl LM. Differential regulation of monocyte matrix metalloproteinase and TIMP-1 production by TNF-alpha, granulocyte-macrophage CSF, and IL-1 beta through prostaglandin-dependent and -independent mechanisms. J Immunol. 1998; 161(6): 3071-6.

113. Esteve P-O, Tremblay P, Houde M, St-Pierre Y, Mandeville R. In vitro expression of MMP-2 and MMP-9 in glioma cells following exposure to inflammatory mediators. Biochim Biophys Acta. 1998; 1403(1): 85-96.

114. Esteve P-O, Robledo O, Potworowski EF, ST-Pierre Y. Induced expression of MMP-9 in C6 glioma cells is inhibited by PDGF via a PI 3-kinase-dependent pathway. Biochem Biophys Res Commun. 2002; 296(4): 864-9.

115. Graesser D, Moahooti S, Haas T, Davis S, Clark RB, Madri JA. The interrelationship of alpha4 integrin and matrix metalloproteinase-2 in the pathogenesis of experimental autoimmunoe encephalomyelitis. Lab Invest. 1998; 78(111): 1445-58.

116. Weeks BS, Schnaper HW, Handy M, Holloway E, Kleinman HK. Human T lymphocytes synthesize the 92 kDa type IV collagenase (gelatinase B). J Cell Physiol. 1993; 157(3): 644-9.

117. Xia M, Leppert D, Hauser SL, Sreedharan SP, Nelson PJ, Krensky AM, Gowtzl EJ. Stimulus specificity of matrix metalloproteinase dependence of human T cell migration through a model basement membrane. J Immunol. 1996; 156(1): 160-7.

118. St-Pierre Y, Van Themsche C. Proteases in tissue remodeling of lung and heart, Chapter 2: Matrix metalloproteinases in inflammation of the lung. Kluwer Academic/Plenum publishers. 2003; 35-56.

119. Schwartz MA, Schaller MD, Ginsberg MH. Integrins: emerging paradigms of signal transduction. Annu Rev Cell Dev Biol. 1995; 11(1): 549-99.

120. Kheradmand F, Werner E, Tremble P, Symonds M, Werb Z. Role of Rac1 and oxygen radicals in collagenase-1 gene expression iduced by cell shape change. Science. 1998; 280(5365): 898-902.

121. Heino J. Biology of tumor cell invasion: interplay of cell adhesion and matrix degradation. Int J Cancer. 1996; 65(6): 717-22.

122. Aoudjit F, Potworowski EF, St-Pierre Y. Bi-directional induction of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 during T lymphoma/endothelial cell contact: implication of ICAM-1. J Immunol. 1998; 160(6): 2967-73.

123. Gilles C, Polette M, Seiki M, Birembault P, Thompson EW. Implication of collagen type-1-induced membrane-type 1-matrix metalloproteinase expression and matrix metalloproteinase activation in the metastatic progression of breast carcinoma. Lab Invest. 1997; 76(5): 651-60.

124. Seltzer JL, Lee AY, Akers KT, Sudbeck B, Southon EA, Wayner EA, Eisen AZ. Activation of 72-kDa type IV collagenase/gelatinase by normal fibroblasts in collagen lattices is mediated by integrin receptors but is not related to lattice contraction. Exp Cell Res. 1994; 213(2): 365-74.

125. Morini M, Mottolese M, Ferrari N, Ghiorzo F, Buglioni S, Mortarini R, Noona, DM, Natali PG, Albini A. The alpha 3 beta 1 integrin is associated with mammary carcinoma cell metastasis, invasion, and gelatinase b (MMP-9) activity. Int J Cancer. 2000; 87(3): 336-42.

126. Tzinia AK, Kitsiou PV, Talamagas AA, Georgopoulos A, Tsilihary EC. Effects of collagen IV on neuroblastoma cell matrix-related functions. Exp Cell Res. 2002; 274(2): 169-77.

127. Tsuji T, Kawada Y, Kai-Murozono M, Komatsu S, Han SA, Takeuchi K, Mizushima H, Miyazaki K, Irimura T. Regulation of melanoma cell migration and invasion by laminin-5 and alpha3beta1 integrin (VLA-3). Clin Exp Metastasis. 2002; 19(2): 127-34.

128. Tsang K, Crowe DL. Retinoic acid and extracellular matrix inhibition of matrix metalloproteinase 9 expressionis mediated by the mitogen activated protein kinase pathway. Int J Oncol. 2001; 18(2): 369-74.

129. Guo H, Zucker S, Gordon MK, Toole BP, Biswas C. Stimulation of matrix metalloproteinase production by recombinant etracellular matrix metalloproteinase induced from transfected Chinese Hamster Ovary cells. J Biol Chem. 1997; 272(1): 24-7.

130. Malik N, Greenfield BW, Wahl AF, Kiener PA. Activation of human monocytes through CD40 induces matrix metalloproteinases. J Immunol. 1996; 156(10): 3952-60.

131. Mach F, Schonbeck U, Fabunmi RP, Murphy C, Atkinson E, Bonnefoy J-Y, Graber P, Libby P. T lymphocytes induce endothelial cell matrix metalloproteinase expression by a CD40L-dependent mechanism. Implications for tubule formation. Am J Pathol. 1999; 154(1): 229-38.

132. Spiegel S, Foster D, Kolesnick R. Signal transduction through lipid second messengers. Curr Opin Cell Biol. 1996; 8(2): 159-67.

133. Missé D, Esteve P-O, Renneboog B, Vidal M, Cerutti M, ST-Pierre Y, Yssel H, Parmentier M, Veas F. 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. 2001; 98(3): 541-7.

134. Simon C, Simon M, Vucelic G, Hicks MJ, Plinkert PK, Koitschev A, Zenner HP. The p38SAPK pathway regulates the expression of the MMP-9 collagenase via aP-1-dependent promoter activation. Exp Cell Res. 2001; 271(2): 344-55.

135. Brown K, Gerstberger S, Carlson L, Franzoso G, Siebenlist U. Control of I kappa B alpha proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. Science. 1995; 267(5203): 1485-8.

136. Chen ZJ, Parent L, Maniatis T. Site-specific phosphorylation of I kappa B alpha by a novel ubiquitination-dependent proteinkinase activity. Cell. 1996; 84(6): 853-62.

137. Derijard B, Hibi M, Wu IH, Barrett T, Su B, Deng T, Karin M, Davis RJ. JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. Cell. 1994; 76(6): 1025-37.

138. Chomarat P, Banchereau J. Interleukin-4 and interleukin-13: their similarities and discrepancies. Int Rev Immunol. 1998; 17(1-4): 1-52.

139. Nelms K, Keegan AD, Zamorano J, Ryan JJ, Paul WE. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. Ann Rev Immunol. 1999; 17(1): 701-38.

140. O'Shea JJ, Gadina M, Schreiber RD. Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. Cell. 2002; 109(S02): S121-S31.

141. Abu-Amer Y. IL-4 abrogates osteoclastogenesis through STAT6-dependent inhibition of NF-kappaB. J Clin Invest. 2001; 107(11): 1375-85.

142. Wery-Zennaro S, Zuguza JL, Letourneur M, Bertoglio J, Pierre J. IL-4 regulation of IL-6 production involves Rac/Cdc42- and p38MAPK-dependent pathways in keratinocytes. Oncogene. 2000; 19(12): 1596-604.

143. Pesu M, Aittomaki S, Takaluoma K, Lagerstedt A, Silvennoinen O. p38 mitogen-activated protein kinase regulates interleukin-4-induced gene expression by stimulating STAT6-mediated transcription. J Biol Chem. 2002; 277(41): 38254-61.

144. Wicks KR, Berton MR. IL-4 induces serine phosphorylation of the STAT6 transactivation domain in B lymphocytes. Mol Immunol. 2000; 37(11): 641-52.

145. Gingras S, Coté S, Simard J. Multiple signaling pathways mediate interleukin-4-induced 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase type I gene expression in human breast cancer cells. Mol Endocrinol. 2000; 14(2): 229-40.

146. Takeda K, Kainauaka M, Tanaka T, Kishimoto T, Akira S. Impaired IL-13-mediated functions of macrophages in STAT6-deficient mice. J Immunol. 1996; 157(8): 3220-2.

147. Kaplan MH, Schindler U, Smiley ST, Grusby MJ. STAT6 is required for mediating responses to IL-1 and for development of Th2 cells. Immunity. 1996; 4(3): 313-9.

148. Xu B, Bhattacharjee A, Roy B, Xu HM, Anthony D, Frank DA, Feldman GM, Cathcart MK. Interleukin-13 induction of 15-lipoxygense gene expresion requires p38 mitogen-activated protein kinase-mediated serine 727 phophorylation of STAT1 and STAT3. Mol Cell Biol. 2003; 23(11): 3918-28.

149. Buday L, Downward J. Epidermal growth factor regulates p21 ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adaptor protein and SOS nucleotide exchange factor. Cell. 1993; 73(3): 611-20.

150. McGuire TF, Qian Y, Vogt A, Hamilton AD, Sebti SM. Platelet-derived growth factor receptor tyrosine phosphorylation requires protein geranylgeranylation but not farnesylation. J Biol Chem. 1996; 271(44): 27402-7.

151. Rodriguez-Viciana P, Warne PH, Khwaja a, Marte BM, Pappin D, Das P, Waterfield MD, Ridley A, Downward J. Role of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras. Cell. 1997; 89(3): 457-67.

152. Kauffmann-Zeh A, Rodriguez-Viciana P, Ulrich E, Gilbert C, Coffer P, Downward J, Evan G. Suppression of c-myc-induced apoptosis by Ras signaling through PI(3)K and PKB. Nature. 1997; 385(6616): 544-8.

153. Jaken S. Protein kinase C isozymes and substrates. Curr Opin Cell Biol. 1996; 8(2): 168-73.

154. McDonnell S, Kerr LD, Matrisian LM. Epidermal growth factor stimulation of stromelysin mRNA in rat fibroblasts requires induction of proto-oncogenes c-fos and c-jun and activation of protein kinase C. Mol Cell Biol. 1990; 10(8): 4284-93.

155. Aoudjit F, Estève P-O, 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(1): 71-8.

156. Houde M, Tremblay P, Masure S, Opdenakker G, Oth D, Mandeville R. Synergistic and selective stimulation of gelatinase B production in macrophages by lipopolysaccharide, *trans*-retinoic acid and CGP 41251, a protein kinase C regulator. Biochim Biophys Acta. 1996; 1310(2): 193-200.

157. Diaz-Meco MT, Dominguez I, Sanz L, Dent P, Lozano J, Municio MM, Berra E, Hay RT, Sturgill TW, Moscat J. Zeta PKC induces phosphorylation and inactivation of IkappaB-alpha in vitro. EMBO J. 1994; 13(12): 2842-8.

158. Dominguez I, Sanz L, Arenzana-Seisdedos F, Diaz-Meco MT, Virelizier JL, Moscat J. Inhibition of protein kinase Czeta subspecies blocks the activation of an NFkappaB-like activity in Xenopus laevis oocytes. Mol Cell Biol. 1993; 13(2): 1290-5.

159. Wooten MW. Function for NFkappaB in neuronal survival: regulation by atypical protein kinase C. J Neurosci Res. 1999; 58(5): 607-11.

160. Niu J, Ahmed N, Andrews S, Turton J, Bates R, Agrez M. The alphaVbeta6 integrin regulates its own expression with cell crowding: implications for tumor progression. Int J Cancer. 2001; 92(1): 40-8.

161. Hannigan GE, Leung-Hagesteijn C, Fitz-Gibbon L, Coppolino M, Radeva G, Filmus J, Bell JC, Dedhar S. Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. Nature. 1996; 379(6560): 91-6.

162. Delcommenne M, Tan C, Gray V, Rue L, Woodget J, Dedhar S. Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/Akt by the integrin-linked kinase. Proc Natl Acad Sci USA. 1998; 95(19): 11211-6.

163. Troussard A, Tan C, Yoganathan N, Dedhar S. Cell-extracellular matrix interactions stimulated the AP-1 transcription factor in an integrin-linked kinase and glycogen synthase kinase 3-dependent manner. Mol Cell Biol. 1999; 19(11): 7420-7.

164. Troussard A, Costello P, Yoganathan N, Kumagai S, Roskelley C, Dedhar S. The integrin-linked kinase (ILK) induces an invasive phenotype via AP-1 transcription factor-dependent upregulation of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9). Oncogene. 2000; 19(48): 5444-52.

165. Kim D, Kim S, Koh H, Yoon S-O, Chung A-S, Cho K, Chung J. Akt/PKB promotes cancer cell invasion via increased motility and metalloproteinase production. FASEB J. 2001; 15(11): 1953-62.

166. Auble DT, Brinckerhoff CE. The AP-1 sequence is necessary but not sufficient for phorbol induction of collagenase in fibroblasts. Biochemistry. 1991; 30(18): 4629-35.

167. Buttice G, Quinones S, Kurkinen M. The AP-1 site is required for basal expression but is not necessary for TPA-response of the human stromelysin gene. Nucleic Acids Res. 1991; 19(13): 3723-31.

168. Gaire M, Magbanua Z, McDonnell S, McNeil L, Lovett DH, Matrisian LM. Structure and expression of the human gene for the matrix metalloproteinase matrilysin. J Biol Chem. 1994; 269(3): 2032-40.

169. Sato H, Seiki M. Regulatory mechanism of 92 kDa type IV collagenase gene expression which is associated with invasiveness of tumor cells. Oncogene. 1993; 8(2): 395-405.

170. Angel P, Baumann I, Stein B, Delius H, Rahmsdorf HJ, Herlich P. 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate induction of the human collagenase gene is mediated by an inducible enhancer element located in the 5'-flanking region. Mol Cell Biol. 1987; 7(6): 2256-66.

171. Angel P, Imagawa M, Chiu R, Stein B, Imbra RJ, Rahmsdorf HJ, Jonat C, Herlich P, Karin M. Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA modulated trans-acting factor. Cell. 1987; 49(6): 729-39.

172. White LA, Brinckerhoff CE. Two AP-1 elements in the collagenase (MMP-1) promoter have differential effects on transcription and bind JunD, d-fos, and Fra-2. Matrix Biol. 1995; 14(9): 715-25.

173. Sharrocks AD, Brown AL, Ling Y, Yates PR. The ETS-domain transcription factor family. Int J Biochem Cell Biol. 1997; 29(12): 1371-87.

174. Wasylyk C, Gutman A, Nicholson R, Wasylyk B. The c-Ets oncoprotein activates the stromelysin promoter through the same elements as several non-nuclear oncoproteins. EMBO J. 1991; 10(5): 1127-34.

175. Watson DK, McWilliams MJ, Lapis P, Lautenberger JA, Schweinfest CW, Papas TS. Mammalian ets-1 and ets-2 genes encode highly conserved proteins. Proc Natl Acad Sci USA. 1988; 85(21): 7862-6.

176. Carrere S, Verger A, Flourens A, Stehelin D, Duterque-Coquillaud M. Erg proteins, transcription factors of the Ets family form homo, heterodimers and ternery complexes via two distinct domains. Oncogene. 1998; 16(25): 3261-8.

177. Wasylyk B, Wasylyk C, Flores P, Begue A, Leprince D, Stehelin D. The c-ets proto-oncogene encode transcription factors that cooperate with c-Fos and c-Jun for transcriptional activation. Nature. 1990; 346(6280): 191-3.

178. Westermarck J, Kahari V-M. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. FASEB J. 1999; 13(8): 781-92.

179. Sato H, Kita M, Seiki M. v-Src activates the expression of 92-kDa type IV collagenase gene through the AP-1 site and the GT box homologous to retinoblastoma control elements. A mechanism regulating gene expression independent of that by inflammatory cytokines. J Biol Chem. 1993; 268(31): 23460-8.

180. Gum R, Lengyel E, Juarez J, Chen JH, Sato H, Seiki M, Boyd D. Stimulation of 92-kDa gelatinase B promoter activity by ras is mitogen-activated protein kinase kinase 1-independent and requires multiple transcription factor binding sites including closely spaced PEA3/ets and AP-1 sequences. J Biol Chem. 1996; 271(18): 10672-80.

181. Frisch SM, Morisaki JH. Positive and negative transcriptional elements of the human type IV collagenase gene. Mol Cell Biol. 1990; 10(12): 6524-32.

182. Huhtala P, Chow LT, Tryggvason K. Structure of the human type IV collagenase gene. J Biol Chem. 1990; 265(19): 11077-82.

183. Salo T, Lyons JG, Rahemtulla F, Birkedal-Hanson H, Larjava H. Transforming growth factor beta1 upregulates type IV collagenase expression in cultured human keratinocytes. J Biol Chem. 1991; 266(18): 11436-41.

184. Overall CM, Wrana JL, Sodek J. Transcriptional and post-transcriptional regulation of 72 kDa gelatinase/type IV collagenase by transforming growth factor beta1 in human fibroblasts. J Biol Chem. 1991; 266(21): 14064-71.

185. Templeton NS, Stetler-Stevenson WG. Identification of a basal promoter for the human Mr 72,000 type IV collagenase gene and enhanced expression in a highly metastatic cell line. Cancer Res. 1991; 51(22): 6190-3.

186. Singal R, Ginder GD. DNA methylation. Blood. 1999; 93(12): 4059-70.

187. Robertson KD, Wolffe AP. DNA methylation in health and disease. Nature Rev Genet. 2000; 1(1): 11-9.

188. Pradhan S, Bacolla A, Wells RD, Roberts RJ. Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation. J Biol Chem. 1999; 274(46): 33002-10.

189. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases DNMT3A and DNMT3B are essential for de novo methylation and mammalian development. Cell. 1999; 99(3): 247-57.

190. Li E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. Nature Rev Genet. 2002; 3(9): 662-73.

191. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. Nat Genet. 2003; 33(Suppl.): 245-54.

192. Bird AP. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. Nature. 1986; 321(6067): 209-13.

193. Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genome. J Mol Biol. 1987; 196(2): 261-82.

194. Cross SH, Bird AP. CpG islands and genes. Current Opin Genet Dev. 1995; 5(3): 309-14.

195. Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal couterparts. Nature. 1983; 301(5895): 89-92.

196. Costello JF, Fruhwald MC, Smiraglia DJ, Rush LJ, Robertson GP, Gao X, Wright FA, feramisco JD, Peltomaki P, Lang JC, Schuller DE, Yu L, Bloomfield CD, Caligiuri MA, Yates A, Nishikawa R, Su Huang H, Petrelli NJ, Zhang X, O'Dorisio MS, Held WA, Cavenee WK, Plass C. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. Nat Genet. 2000; 24(2): 132-8.

197. Pfeifer GP, Steigerwald S, Boehm TLJ, Drahovsky D. DNA methylation levels in acute human leukemia. Cancer Lett. 1988; 39(2): 185-92.

198. Wahlfors J, Hiltunen H, Heinonen E, Hämäläinen E, Alhoionen L, Jänne J. Genomic hypomethylation in human chronic lymphocytic leukemia. Blood. 1992; 80(8): 2074-80.

199. Ehrlich M, Jiang G, Fiala E, Dome JS, Yu MC, Long TI, Youn B, Sohn OS, Widschwendter M, Tomlinson GE, Chintagumpala M, Champagne M, Parham D, Liang G, Malik K, Laird PW. Hypomethylation and hypermethylation of DNA in Wilms tumors. Oncogene. 2002; 21(43): 6694-702.

200. Esteller M. CpG island hypermethylation and tumor suppresor genes: a booming present, a brighter future. Oncogene. 2002; 21(35): 5427-40.

201. Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. Nat Reviews Cancer. 2004; 4(2): 143-53.

202. Dodge JE, List AF, Futscher BW. Selective variegated methylation of the p15 CpG island in acute myeloid leukemia. Int J Cancer. 1998; 78(5): 561-7.

203. Guo SX, Taki T, Ohnishi H, Piao HY, Tabuchi K, Bessho F, Hanada R, Yanagisawa M, Hayashi Y. Hypermethylation of p16 and p15 genes and RB protein expression in acute leukemia. Leuk Res. 2000; 24(1): 39-46.

204. Roman-Gomez J, Castillejo JA, Jimenez A, Barrios M, Heiniger A, Torres A. The role of DNA hypermethylation in the pathogenesis and prognosis of acute lymphoblastic leukemia. Leuk Lymphoma. 2003; 44(11): 1855-64.

205. Drexler HG. Review of alterations of the cyclin-dependent kinase inhibitor Ink4 family genes p15, p16, p18 and p19 in leukemia-lymphoma cells. Leukemia. 1998; 12(6): 845-59.

206. Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation of ras oncogenes in primary human cancers. Biochem Biophys Res Commun. 1983; 111(1): 47-54.

207. Xing RH, Rabbani SA. Transcriptional regulation of urokinase (uPA) gene expression in breast cancer cells: role of DNA methylation. Int J Cancer. 1999; 81(3): 443-50.

208. Nakamura N, Takenaga K. Hypomethylation of the metastasis-associated S100A4 gene correlated with gene activation in human colon adenocarcinoma cell lines. Clin Exp Metastasis. 1998; 16(5): 471-9.

209. Iacobuzio-Donahue CA, Maitra A, Olsen M, Lowe AW, van Heek NT, Rosty C, Walker K, Sato N, Parker A, Ashtaq R, Jaffe E, Ryu B, Jones JL, Eshleman JR, Yeo CJ, Cameron JL, Kern SE, Hruban RH, Brown PD, Goggins M. Exploration of global gene expression patterns in pancreatic adenocarcinoma using cDNA microarrays. Am J Pathol. 2003; 162(4): 1151-62.

210. Adorjan P. Tumour class prediction and discovery by microarray-based DNA methylation analysis. Nucleic Acids Res. 2002; 30(5): e21.

211. Piyathilake CJ, Henao O, Frost AR, Macaluso M, Bell WC, Johanning GL, Heimburger DC, Niveleau A, Grizzlew E. Race- and age-dependent alterations in global methylation of DNA in squamous cell carcinoma of the lung (United States). Cancer Causes Control. 2003; 14(1): 37-42.

212. Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. Adv Cancer Res. 1998; 72(1): 141-96.

213. Ordway JM, Curran T. Methylation matters: modeling a manageable genome. Cell Growth Differ. 2002; 13(4): 149-62.

214. Tsou JA, Hagen JA, Carpenter CL, Laird-Offringa IA. DNA methylation analysis: a powerful new tool for lung cancer diagnosis. Oncogene. 2002; 21(35): 5450-61.

215. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. Nature Rev Genet. 2002; 3(6): 415-28.

216. Strichman-Almashanu LZ. A genome-wide screen for normally methylated human CpG islands that can identify novel imprinted genes. Genome Res. 2002; 12(4): 543-54.

217. De Smet C, De Backer O, Faraoni I, Lurquin C, Brasseur F, Boon T. The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation. Proc Natl Acad Sci USA. 1996; 93(14): 7149-53.

218. Cho B, Lee H, Jeong S, Bang YJ, Lee HJ, Hwang KS, Kim HY, Lee YS, Kang GH, Jeoung DI. Promoter hypomethylation of a novel cancer/testis antigen gene CAGE is correlated with its aberrant epression and is seen in premalignant stage of gastric carcinoma. Biochem Biophys Res Commun. 2003; 307(1): 52-63.

219. Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass Su, Landsberger N, Strouboulis J, Wolffe AP. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. Nat Genet. 1998; 19(2): 187-91.

220. Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. Nature. 1998; 393(6683): 386-9.

221. Jones PL. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. Nat Genet. 1998; 19(187-91.

222. Bird AP, Wolffe AP. Methylation-induced repression: belts, braces, chromatin. Cell. 1999; 99(5): 451-4.

223. Cameron EE, Bachman KE, Myohanen S, Herman JG, Baylin SB. Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. Nat Genet. 1999; 21(1): 103-7.

224. Gagnon J, Shaker S, Primeau M, Hurtubise A, Momparler RL. Interaction of 5-aza-2'deoxycytidine and depsipeptide on antineoplastic activity and activation of 14-3-3 sigma, E-cadherin and tissue inhibitor of metalloproteinase 3 expression in human breast carcinoma cells. Anticancer Drugs. 2003; 14(3): 193-202.

225. Primeau M, Gagnon J, Momparler RL. Synergistic antineoplastic action of DNA methylation inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine and histone deacetylase inhibitor depsipeptide on human breast carcinoma cells. Int J Cancer. 2003; 103(2): 177-84.

226. MacDougall JR, Bani MR, Lin Y, Muschel RJ, Kerbel RS. Proteolytic switching: opposite patterns of regulation of gelatinase B and its inhibitor Timp-1 during human melanoma progression and consequences of gelatinase B overexpression. Br J Cancer. 1999; 80(3-4): 504-12.

227. Chicoine E, Estève P-O, Robledo O, Van Themsche C, Potworowski EF, St-Pierre Y. Evidence for the role of promoter methylation in the regulation of MMP-9 gene expression. Biochem Biophys Res Commun. 2002; 297(4): 765-72.

228. Cappabianca L, Farina AR, Tacconelli A, Mantovani R, Gulino A, Mackay AR. Reconstitution of TIMP-2 expression in SH-SY5Y neuroblastoma cells by 5-azacytidine is mediated transcriptionally by NF-Y through an inverted CCAAT site. Exp Cell Res. 2003; 286(2): 209-18.

229. Sato N, Maehara N, Su GH, Goggins M. Effects of 5-aza-2'-deoxycytidine of matrix metalloproteinase expression and pancreatic cancer cell invasiveness. J Natl Cancer Inst. 2003; 95(4): 327-30.

230. Delany AM, Brinckerhoff CE. Post-transcriptional regulation of collagenase and stromelysin gene expression by epidermal growth factor and dexamethasone in cultured human fibroblasts. J Cell Biochem. 1992; 50(4): 400-10.

231. Murphy K. A., Villano C. M., Dorn R., White L. A. Interaction between the aryl hydrocarbon receptor and retinoic acid pathways increases matrix metalloproteinase-1 expression in keratinocytes. J Biol Chem. 2004; 279(24): 25284-93.

232. Huwiler A., Akool el S., Aschrafi A., Hamada F. M., Pfeilschifter J., Eberhardt W. ATP potentiates interleukin-1 beta-induced MMP-9 expression in mesangial cells via recruitment of the ELAV protein HuR. J Biol Chem. 2003; 278(51): 51758-69.

233. Akool el S., Kleinert H., Hamada F. M., Abdelwahab M. H., Forstermann U., Pfeilschifter J., Eberhardt W. Nitric oxide increases the decay of matrix metalloproteinase 9 mRNA by inhibiting the expression of mRNA-stabilizing factor HuR. Mol Cell Biol. 2003; 23(14): 4901-16.

234. Saarialho-Kere U, Kovacs SO, Pentland AP, Olerud J, Welgus HG, Parks WC. Cell-matrix interaction modulates interstitial collagenase expression by human keratinocytes actively involved in wound healing. J Clin Invest. 1993; 92(6): 2858-66.

235. Brooks PC, Stromblad S, Sandors LC, von Schalscha TL, Aimes RT, Stetler-Stevenson WG, Quigley JP, Cheresh DA. Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. Cell. 1996; 85(5): 683-93.

236. Kang T, Nagase H, Pei D. Activation of membrane-type matrix metalloproteinase 3 zymogen by the proprotein convertase furin in the trans-Golgi network. Cancer Res. 2002; 62(3): 675-81.

237. Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. Biol Chem. 1997; 378(3-4): 151-60.

238. Suzuki K, Enghild JJ, Morodomi T, Salvesen G, Nagase H. Mechanisms of activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin). Biochemistry. 1990; 29(44): 10261-70.

239. Nagase H, Enghild JJ, Suzuki K, Salvesen G. Stepwise activation mechanisms of the precursor of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) by proteinases and (4-aminophenyl)mercuric acid. Biochemistry. 1990; 29(24): 5783-9.

240. Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI. Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase: isolation of the activated form of the membrane metallloprotease. J Biol Chem. 1995; 270(10): 5331-8.

241. Wang Z, Juttermann R, Soloway PD. TIMP-2 is required for efficient activation of proMMP-2. J Biol Chem. 2000; 275(34): 26411-5.

242. Itoh Y, Takamura A, Ito N, Maru Y, Sato H, Suenaga N, Aoki T, Seiki M. Homophilic complex formation of MT1-MMP facilitates proMMP-2 activation on the cell surface and promotes tumor cell invasion. EMBO J. 2001; 20(17): 4782-93.

243. Docherty AJ, Lyons A, Smith BJ, Wright EM, Stephens PE, Harris TJ, Murphy G, Reynolds JJ. Sequence of human tissue inhibitor of metalloproteinases and its identity to erythroid-potentiating activity. Nature. 1985; 318(6041): 66-9.

244. Stetler-Stevenson WG, Brown PD, Onisto M, Levy AT, Liotta LA. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) mRNA expression in tumor cell lines and human tumor tissues. J Biol Chem. 1990; 265(23): 13933-8.

245. Hammani K, Henriet P, Silbiger SM, DeClerck YA. Cloning and partial structure of the gene encoding human tissue inhibitor of metalloproteinase-3. Gene. 1996; 170(2): 287-8.

246. Greene J, Wang M, Liu YE, Raymond LA, Rosen C, Shi YE. Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4. J Biol Chem. 1996; 271(48): 30375-80.

247. Henriet P, Blavier L, DeClerck YA. Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) in invasion and proliferation. APMIS. 1999; 107(1): 111-9.

248. Greene J., Wang M., Liu Y. E., Raymond L. A., Rosen C., Shi Y. E. Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4. J Biol Chem. 1996; 271(48): 30375-80.

249. Yu WH, Yu S, Meng Q, Brew K, Woessner JF Jr. TIMP-3 binds to sulphated glycosaminoglycans of the extracellular matrix. J Biol Chem. 2000; 275(40): 31226-32.

250. Ritter LM, Garfield SH, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) binds to the cell surface and translocates to the nucleus of human MCF-7 breast carcinoma cells. Biochem Biophys Res Commun. 1999; 257(2): 494-9.

251. Corcoran ML, Stetler-Stevenson WG. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) stimulates fibroblast proliferation via a cyclic adenosine 3',5'monophosphate (cAMP)-dependent mechanism. J Biol Chem. 1995; 270(22): 13453-9.

252. Reynolds JJ, Hembry RM, Meikle MC. Connective tissue degradation in health and periodontal disease and the roles of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors. Adv Dent Res. 1994; 8(2): 312-9.

253. Clark SD, Kobayashi DK, Welgus HG. Regulation of the expression of tissue inhibitor of metalloproteinases and collagenase by retinoids and glucocorticoids in human fibroblasts. J Clin Invest. 1987; 80(5): 1280-8.

254. Jones JL, Glynn P, Walker RA. Expression of MMP-2 and MMP-9, their inhibitors, and the activator MT1-MMP in primary breast carcinomas. J Pathol. 1999; 189(2): 161-8.

255. Powe DG, Brough JL, Carter GI, Bailey EM, Stetler-Stevenson WG, Turner DR, Hewitt RE. TIMP-3 mRNA expression is regionally increased in moderately and poorly differentiated colorectal adenocarcinoma. Br J Cancer. 1997; 75(11): 1678-83.

256. Joo YE, Seo KS, IKim HS, Rew JS, Park CS, Kim SJ. Expression of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in gastric cancer. Dig Dis Sci. 2000; 45(1): 114-21.

257. Michael M, Babic B, Khokha R, Tsao M, Ho J, Pintilie M, Leco K, Chamberlin D, Shepherd FA. Expression and prognostic significance of metalloproteinases and tissue inhibitors in patients with samll-cell lung cencer. J Clin Oncol. 1999; 17(6): 1802-8.

258. Kossakowska AE, Urbanski SJ, Edwards DR. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) RNA is expressed at elevated levels in malignant non-Hodgkin's lymphomas. Blood. 1991; 77(11): 2475-81.

259. Wang M, Liu YE, Greene J, Sheng S, Fuchs A, Rosen EM, Shi YE. Inhibition of tumor growth and metastasis of human breast cancer cells transfected with tissue inhibitor of metalloproteinase 4. Oncogene. 1997; 14(23): 2767-74.

260. Khokha R. Suppression of the tumorigenic and metastatic abilities of murine B16F10 melanoma cells in vitro by the overexpression of the tissue inhibitor of the metalloproteinases-1. J Natl Cancer Inst. 1994; 86(4): 299-304.

261. Brand K, Baker AH, Perez-Canto A, Possling A, Sacharjat M, Geheeb M, Arnold W. Treatment of colorectal liver metastases by adenoviral transfer of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 into the liver tissue. Cancer Res. 2000; 60(20): 5723-30.

262. Golde D, Bersch N, Quan S, Lusis A. Production of erythroid-potentiating activity by a human T-lymphoblast cell line. Proc Natl Acad Sci USA. 1980; 77(1): 593-6.

263. Avalos BR, Kaufman SE, Tomonaga M, Williams RE, Golde DW, Gasson JC. K562 cells produce and respond to human erythroid-potentiating activity. Blood. 1988; 71(6): 1720-5.

264. Hayakawa T, Yamashita K, Ohuchi E, Shinagawa A. Cell growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2). Cell Sci. 1994; 107(Part 9): 2373-9.

265. Chesler L, Golde DW, Bersch N, Johnson MD. Metalloproteinase inhibition and erythroid potentiation are independent activities of tissue inhibitor od metalloproteinases-1. Blood. 1995; 86(12): 4506-15.

266. Porter JF, Shen S, Denhardt DT. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 stimulates proliferation of human cancer cells by inhibiting a metalloproteinase. Br J Cancer. 2004; 90(2): 463-70.

267. Guedez L, Stetler-Stevenson WG, Wolff L, Wang J, Fukushima P, Mansoor A, Stetler-Stevenson M. In vitro suppression of programmed cell death of B cells by tissue inhibitor of metalloproteinases-1. J Clin Invest. 1998; 102(11): 2002-10.

268. Valente P, Fassina G, Melchiori A, Masiello L, Cilli M, Vacca A, Onisto M, Santi L, Stetler-Stevenson WG, Albini A. TIMP-2 over-expression reduces invasion and angiogenesis and protects B16F10 melanoma cells from apoptosis. Int J Cancer. 1998; 75(2): 246-53.

269. Ahonen M, Baker AH, Kahari V-M. Adenovirus-mediated gene delivery of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 inhibits invasion and induces apoptosis in melanoma cells. Cancer Res. 1998; 58(11): 2310-5.

270. Baker AH, Georges SJ, Zaltsman AB, Murphy G, Newby A. Inhibition of invasion and induction of apoptotic cell death of cancer cell lines by overexpression of TIMP-3. Br J Cancer. 1999; 79(9-10): 1347-55.

271. Bian J, Wang Y, Smith MR, Kim H, Jacobs C, Jackman J, Kung H, Colburn NH, Sun Y. Suppression of in vivo tumor growth and induction of suspension cell death by tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-3. Carcinogenesis. 1996; 17(9): 1805-11.

272. Schultz RM, Silberman S, Persky B, Bajkowski AS, Carmichael DD. Inhibition of human recombinant tissue inhibitor of metalloproteinases o human amnion invasion and lung colonization by murine B16-F10 melanoma cells. Cancer Res. 1988; 48(19): 5539-45.

273. Alvarez OA, Carmichael DF, DeClerck YA. Inhibition of collagenolytic activity and metastasis of tumor cells by a recombinant human tissue inhibitor of metalloproteinases. J Natl Cancer Inst. 1990; 82(7): 589-95.

274. Watanabe M, Takahashi Y, Ohta T, Mai M, Sasaki T, Seiki M. Inhibition of metastasis in human gastric cancer cells transfected with tissue inhibitor of metalloproteinase 1 gene in nude mice. Cancer. 1996; 77(Suppl 8): 1676-80.

275. Nii M, Kayada Y, Yoshiga K, Takada K, Okamoto T, Yanagihara K. Suppression of metastasis by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in a newly established human oral squamous cell carcinoma cell line. Int J Oncol. 2000; 16(1): 119-24.

276. Herman M, Sukhova G, Kisiel W, Foster D, Kehry M, Libby P, Schonbeck U. Tissue factor pathway inhibitor-2 is a novel inhibitor of matrix metalloproteinases with implications for atherosclerosis. J Clin Invest. 2001; 107(9): 1117-26.

277. Yang Z, Kyriakides TR, Bornstein P. Matricellular proteins as modulators of cell-matrix interactions: adhesive defect in thrombospondin 2-null fibroblasts is a consequence of increased levels of matrix metalloproteinase-2. Mol Cell Biol. 2000; 11(10): 3353-64.

278. Barrett AJ, Starkey PM. The interaction of alpha2-macroglobulin with proteinases. Characteristics and specificity of the reaction and hypothesis concerning its molecular mechanism. Biochem J. 1973; 133(4): 709-24.

279. Sottrup-Jenson L, Birkedal-Hansen H. Human fibroblast collagenase-alpha-macroglobulin interactions: localization of cleavage sites in the bait regions fo five mammalian alpha-macroglobulins. J Biol Chem. 1989; 264(1): 393-401.

280. Takahashi C, Sheng Z, Horan T, Kitayama H, Maki M, Hitomi K, Kitaura Y, Takai S, Sasahara R, Horimoto A, Ikawa Y, Ratzkin BJ, Arakawa T, Noda M. Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK. Proc Natl Acad Sci USA. 1998; 95(22): 13221-6.

281. Oh J, Takahashi R, Kondo S, Mizoguchi A, Adachi E, Sasahara R, Nishimura S, Imamura Y, Kitayama H, Alexander D, Ide C, Horan TP, Arakawa T, Yoshida H, Nishikawa R, Itoh Y, Seiki M, Itohara S, Takahashi C, Noda M. The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. Cell. 2001; 107(6): 789-800.

282. Nagase H, Fields GB. Human matrix metalloproteinase specificity studies using collagen sequence-based synthetic peptides. Biopolymers. 1996; 40(4): 399-416.

283. Shapiro SD. Elastolytic metalloproteinases produced by human nomonuclear phagocytes. Potential roles in destructive lung disease. Am J Respir Crit Care Med. 1994; 150(6 Pt 2): S160-S4.

284. Mackay AR, Hartzler JL, Pelina MD, Thorgeirsson UP. Studies on the ability of65-kDa and 92-kDa tumor cell gelatinases to degrade type IV collagen. J Biol Chem. 1990; 265(35): 21929-34.

285. Boudreau N, Sympson CJ, Werb Z, Bissell MJ. Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. Science. 1995; 267(5199): 891-3.

286. Schedin P, Strange R, Mitrenga T, Wolfe P, Kaeck M. Fibronectin fragments induce MMP activity in mouse mammary epithelial cells: evidence for a role in mammary tissue remodeling. J Cell Sci. 2000; 113(Pt 5): 795-806.

287. Powell WC, Fingleton B, Wilson CL, Boothby M, Matrisian LM. The metalloproteinase matrilysin porteolytically generates active soluble Fas ligand and potentiates epithelial cell apoptosis. Curr Biol. 1999; 9(24): 1441-7.

288. Fingleton B, Bargo-Gogola T, Crawford HC, Matrisian LM. Matrilysin (MMP-7) expression selects for cells with reduced sensitivity to apoptosis. Neoplasia. 2001; 3(6): 459-68.

289. Yu WH, Woessner JF Jr, McNeish JD, Stamenkovic I. CD44 anchors the assembly of matrilysin/MMP-7 with heparin-binding epidermal growth factor precursor and ErbB4 and regulates female reproductive organ remodeling. Genes Dev. 2002; 16(3): 307-23.

290. Pilcher BK, Dumin JA, Sudbeck BD, Krane SM, Welgus GH, Parks WC. The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on a type I collagen matrix. J Cell Biol. 1997; 137(6): 1445-57.

291. Fisher C, Gilbertson-Beadling S, Powers EA, Petzold G, Poorman R, Mitchell MA. Interstitial collagenase is required for angiogenesis in vitro. Develop Biol. 1994; 162(2): 499-510.

292. Hiraoka N, Allen E, Apel IJ, Gyetko MR, Weiss SJ. Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins. Cell. 1998; 95(3): 365-77.

293. Lund LR, Romer J, Bugge TH, Nielson BS, Frandsen TL, Degen JL, Stephens RW, Dano K. Functional overlap between two classes of matrix-degrading proteases in wound healing. EMBO J. 1999; 18(17): 4645-56.

294. Bullard KM, Lund LR, Mudgett JS, Mellin TN, Hunt TK, Murphy B, Ronan J, Werb Z, Banda MJ. Impaired wound contraction in stromelysin-1-deficient mice. Ann Sur. 1999; 230(2): 260-5.

295. Behrendtsen O, Werb Z. Metalloproteinases regulate parietal endoderm differentiating and migrating in cultured mouse embryos. Develop Dyn. 1997; 208(2): 255-65.

296. Oh LY, Larsen PH, Krekoski CA, Edwards DR, Donovan F, Werb Z, Yong VW. Matrix metalloproteinase-9/gelatinase B is required for process outgrowth by oligodendrocytes. J Neurosci. 1999; 19(19): 8464-75.

297. Zuo J, Ferguson TA, Hernandez YJ, Stetler-Stevenson WG, Muir D. Neuronal matrix metalloproteinase-2 degrades and inactivates a neurite-inhibiting chondroitin sulfate proteoglycan. J Neurosci. 1998; 18(14): 5203-11.

298. Whitelock JM, Murdoch AD, Iozzo RV, Underwood PA. The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin and heparanases. J Biol Chem. 1996; 271(17): 10079-86.

299. Levi E, Fridman R, Miao HQ, Ma YS, Yayon A, Vlodavsky I. Matrix metalloproteinase 2 releases active soluble ectodomain of fibroblast growth factor receptor 1. Proc Natl Acad Sci USA. 1996; 93(14): 7069-74.

300. Koolwijk P, Sidenius N, Peters E, Sier CF, Hanemmaijer R, Blasi F, van Hinsbergh VW. Proteolysis of the urokinase-type plasminogen activator receptor by metalloproteinase-12: implication for angiogenesis in fibrin matrices. Blood. 2001; 97(10): 3123-31.

301. Dong Z, Kumar R, Yang X, Fidler IJ. Macrophage-derived metalloelastase is responsible for the generation of angiostatin in Lewis lung carcinoma. Cell. 1997; 88(6): 801-10.

302. Patterson BC, Sang QA. Angiostatin-converting enzyme activities of human matrilysin (MMP-7) and gelatinase B/type IV collagenase (MMP-9). J Biol Chem. 1997; 272(46): 28823-5.

303. Cornelius LA, Nehring LC, Harding E, Bolanowski M, Welgus HG, Kobayashi DK, Pierce RA, Shapiro SD. Matrix metalloproteinases generate angiostatin: effects on neovascularization. J Immunol. 1998; 161(12): 6845-52.

304. Lijnen HR, Ugwu F, Bini A, Collen D. Generation of an angiostatin-like fragment from plasminogen by stromelysin-1 (MMP-3). Biochemistry. 1998; 37(14): 4699-702.

305. Vu TH, Shipley JM, Bergers G, Berger JE, Helms JA, Hanahan D, Shapiro SD, Senior RM, Werb Z. MMP-9/Gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenensis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. Cell. 1998; 93(3): 411-22.

306. Van den Steen PE, Wuyts A, Husson SJ, Proost P, Van Damme J, Opdenakker G. Gelatine 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 physological activities. Eur J Biochem. 2003; 270(18): 3739-49.

307. Gearing AJ, Beckett P, Christodoulou M, Churchill M, Clements J, Davidson AH, Drummond AH, Galloway WA, Gilbert R, Gordon JL, Leber TM, Mangan M, MIller K, Nayee P, Owen K, Patel S, Thomas W, Wells G, Wood LM, Wooley K. Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases. Nature. 1994; 370(6490): 555-7.

308. Schönbeck Y, Mach F, Libby P. Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway for IL-1 beta processing. J Immunol. 1998; 161(7): 3340-6.

309. Ito A, Mukaiyama A, Itoh Y, Nagase H, Thogersen IB, Enghild JJ, Sasaguri Y, Mori Y. Degradation of interleukin-1 beta by matrix metalloproteinases. J Biol Chem. 1996; 271(25): 14657-60.

310. Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. Genes Dev. 2000; 14(2): 163-76.

311. Karsdal MA, Larsen L, Engsig MT, Lou H, Ferreras M, Lochter A, Delaisse JM, Foged NT. Matrix-metalloproteinase-dependent activation of latent transforming growth factor beta controls the conversion of osteoblasts into osteocytes by blocking osteoblasts apoptosis. J Biol Chem. 2002; 277(46): 44061-7.

312. Cawston TE. Metalloproteinase inhibitors and the prevention of connective tissue breakdown. Pharmacol Ther. 1996; 70(3): 163-82.

313. Konttinen YT, Ainola M, Valleala H, Ma J, Ida H, Mandelin J, Kinne RW, Santavirta S, Sorsa T, Lopez-Otin C, Takagi M. Analysis of 16 different matrix metalloproteinases (MMP-1 to MMP-20) in the synovial membrane: different profiles in trauma and rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis. 1999; 58(11): 691-7.

314. Chandler S, Coates R, Gearing A, Lury J, Wells G, Bone E. Matrix metalloproteinases degrade myelin basic protein. Neuros Lett. 1995; 201(3): 223-6.

315. Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases in brain injury. J Neurotrauma. 1995; 12(5): 833-42.

316. Maisi P, Prikk K, Sepper R, Pirila E, Salo T, Hietanan J, Sorsa T. Soluble membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) and gelatinase A (MMP-2) in induced sputum and bronchoalveolar lavage fluid of human bronchial asthma and bronchiectasis. APMIS. 2002; 110(11): 771-82.

317. Ohnishi K, Takagi M, Kurokawa Y, Satomi S, Konttinen YT. Matrix metalloproteinases-mediated extracellular matrix protein degradation in human pulmonary emphysema. Lab Invest. 1998; 78(9): 1077-87.

318. McQuibban GA, Gong JH, Wong JP, Wallace JL, Clark-Lewis I, Overall CM. Matrix metalloproteinase activity inactivates the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1. J Biol Chem. 2001; 276(47): 43503-8.

319. Gonzalo JA, Lloyd CM, Peled A, Delaney T, Coyle AJ, Guttierez-Ramos JC. Critical involvement of the chemotactic axis CXCR4/stromal cell-derived factor-1 alpha in the inflammatory component of allergic airway disease. J Immunol. 2000; 165(1): 499-508.

320. McQuibban GA, Gong JH, Tam EM, McCulloch CA, Clark-Lewis I, Overall CM. Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3. Science. 2000; 289(5482): 1202-6.

321. McQuibban GA, Gong JH, Wong JP, Wallace JL, Clark-Lewis I, Overall CM. Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vitro. Blood. 2002; 100(4): 1160-7.

322. Stafford S, Li H, Forsythe PA, Ryan M, Bravo R, Alam R. Monocyte chemotactic protein-3 (MCP-3)/fibroblast-induced cytokine (FIC) in eosinophilic inflammation of the airways and the inhibitory effects of an anti-MCP-3/FIC antibody. J Immunol. 1997; 158(10): 4953-60.

323. Masson R, Lefebvre O, Noel A, Fahime ME, Chenard M-P, Wendling C, Kebers F, Lemeur M, Dierich A, Foidard JM, Basset P, Rio MC. In vivo evidence that the stromelysin-3 metalloproteinase contributes in a paracrine manner to epithelial cell malignancy. J Cell Biol. 1998; 140(6): 1535-41.

324. Lochter A, Galosy S, Muschler J, Freedman N, Werb Z, Bissell MJ. Matrix metalloproteinase stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that leads to stable epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells. J Cell Biol. 1997; 139(7): 1861-72.

325. Sternlicht MD, Lochter A, Sympson CJ, Huey B, Rougier J-P, Gray JW, Pinkel D, Bissell MJ, Werb Z. The stromal proteinase MMP3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis. Cell. 1999; 98(2): 137-46.

326. Coussens LM, Tinkle CL, Hanahan D, Werb Z. MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. Cell. 2000; 103(3): 481-90.

327. Fowlkes J, Serra D, Nagase H, Thrailkill K. MMPs are IGFBP-degrading proteinases: implications for cell proliferation and tissue growth. Ann NY Acad Sci. 1999; 878(1): 696-9.

328. Suzuki M, Raab G, Moses M, Fernandez C, Klagsbrun M. Matrix metalloproteinase-3 releases active heparin-binding EGF-like growth factor by cleavage at a specific juxtamembrane site. J Biol Chem. 1997; 272(50): 31730-7.

329. Peoples G, Blotnick S, Takahashi K, Freeman M, Klagsbrun M, Eberlain T. T lymphocytes that infiltrate tumors and atherosclerotic plaques produce heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and basic fibroblast growth factor: a potential pathological role. Proc Natl Acad Sci USA. 1995; 92(14): 6547-51.

330. Hallermalm K., De Geer A., Kiessling R., Levitsky V., Levitskaya J. Autocrine secretion of Fas ligand shields tumor cells from Fas-mediated killing by cytotoxic lymphocytes. Cancer Res. 2004; 64(18): 6775-82.

331. Strand S., Vollmer P., van den Abeelen L., Gottfried D., Alla V., Heid H., Kuball J., Theobald M., Galle P. R., Strand D. Cleavage of CD95 by matrix metalloproteinase-7 induces apoptosis resistance in tumour cells. Oncogene. 2004; 23(20): 3732-6.

332. Mitsiades N., Yu W. H., Poulaki V., Tsokos M., Stamenkovic I. Matrix metalloproteinase-7-mediated cleavage of Fas ligand protects tumor cells from chemotherapeutic drug cytotoxicity. Cancer Res. 2001; 61(2): 577-81.

333. Witty JP, McDonnell S, Newell KJ, Cannon P, Navre M, Tressler RJ, Matrisian LM. Modulation of matrilysin levels in colon carcinoma cell lines affects tumorigenicity in vivo. Cancer Res. 1994; 54(17): 4805-12.

334. 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(5): 43-7.

335. Shalinsky DR, Brekken J, Zou H, McDermott CD, Forsyth P, Edwards D, Margosiak S, Bender S, Truitt G, Wood A, Varki NM, Appelt K. Broad antitumor and antiangiogenic activities of AG3340, a potent and selective MMP inhibiteur undergoing advanced oncology clinical trials. Ann NY Acad Sci. 1999; 878(1): 236-70.

336. Lokeshwar BL, Escatel E, Zhu B. Cytotoxic activity and inhibition of tumour cell invasion by derivatives of a chemically modified tetracycline CMT-3 (COL-3). Curr Med Chem. 2001; 8(3): 271-9.

337. Itoh T, Tanioka M, Yoshida H, Yoshioka T, Nishimoto H, Itohara S. Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. Cancer Res. 1998; 58(5): 1048-51.

338. Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, Tanzawa K, Thorpe P, Itohara S, Werb Z, Hanahan D. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. Nat Cell Biol. 2000; 2(10): 737-44.

339. Ikebe T, Shinohara M, Takeuchi H, Beppu M, Kurahara S, Nakamura S, Shirasuna K. Gelatinolytic activity of matrix metalloproteinase in tumour tissues correlates with invasiveness of oral cancer. Clin Exp Metastasis. 1999; 17(4): 315-23.

340. Kurahara S, Shinohara M, Ikebe T, Nakamura S, Beppu M, Hiraki A, Takeuchi H, Shirasuna K. Expression of MMPs, MT-MMP and TIMPs in squamous cell carcinoma ot the oral cavity: correlations with tumours invasion and metastasis. Head Neck. 1999; 21(7): 627-38.

341. Ohashi K, Nemoto T, Nakamura K, Nemori R. Increased expression of matrix metalloproteinase 7 and 9 and membrane type 1-matrix nmetalloproteinase in eosophageal squamous cell carcinomas. Cancer. 2000; 88(10): 2201-9.

342. Albini A, Melchiori A, Santi L, Liotta LA, Brown PD, Stetler-Stevenson WG. Tumor cell invasion inhibited by TIMP-2. J Natl Cancer Inst. 1991; 83(11): 775-9.

343. Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, Seiki M. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells. Nature. 1994; 370(61-5.

344. Bernhard EJ, Gruber SB, Muschel RJ. Direct evidence linking expression of matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/collagenase) to the metastatic phenoype in transformed rat embryo cells. Proc Natl Acad Sci USA. 1994; 91(10): 4293-7.

345. Tsunezuka Y, Konoh H, Takino T, Watanabe Y, Okada Y, Shinagawa A, Sato H, Seiki M. Expression of membrane-type matix metalloproteinase 1 (MT1-MMP) in tumor cells enhances pulmonary metastasis in an experimental metastasis assay. Cancer Res. 1996; 56(24): 5678-83.

346. Kruger A, Fata JE, Khokha R. Altered tumor growth and metastasis of a T-cell lymphoma in TIMP-1 transgenic mice. Blood. 1997; 90(5): 1993-2000.

347. Kruger A, Sanchez-Sweatman OH, Martin DC, Fata JE, Ho AT, Orr FW, Ruther U, Khokha R. Host TIMP-1 overexpression confers resistance to experimental brain metastasis of a fibrosarcoma cell line. Oncogene. 1998; 16(18): 2419-23.

348. Itoh T, Tanioka M, Matsuda H, Nishimoto H, Yoshioka T, Suzuki R, Uehira M. Experimental metastasis is suppressed in MMP-9-deficient mice. Clin Exp Metastasis. 1999; 17(2): 177-81.

349. Duivenvoorden WC, Popovic SV, Lhotak S, Seidlitz E, Hirte HW, Tozer RG, Singh G. Doxycycline decreases tumor burden in a bone metastasis model of human breast cancer. Cancer Res. 2002; 62(6): 1588-91.

350. Boissier S, Ferreras M, Peyruchaud O, Magnetto S, Ebetino FH, Colombel M, Delmas P, Delaisse JM, Clezardin P. Biphosphonates inhibit breast and prostate carcinoma cell invasion, an early event in the formation of bone metastases. Cancer Res. 2000; 60(11): 2949-54.

351. Reich R, Thompson EW, Iwamoto Y, Martin GR, Deason JR, Fuller GC, Miskin R. Effects of inhibitors of plasminogen activator, serine proteinases, and collagenase IV on the invasion of basement membranes by metastatic cells. Cancer Res. 1988; 48(12): 3307-12.

352. Sledge GW Jr, Qulali M, Goulet R, Bone EA, Fife R. Effect of matrix metalloproteinase inhibitor batimastat on breast cancer regrowth and metastasis in athymic mice. J Natl Cancer Inst. 1995; 87(20): 1546-50.

353. Hidalgo M, Eckhardt SG. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. J Natl Cancer Inst. 2001; 93(3): 178-93.

354. Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. Science. 2002; 295(5564): 2387-92.

355. Kruger A, Soeltl R, Sopov I, Kopitz C, Arlt M, Magdolen V, Harbeck N, Gansbacher B, Schmitt M. Hydroxamate-type matrix metalloproteinase inhibitor promotes liver metastasis. Cancer Res. 2001; 61(4): 1272-5.

356. Maquoi E, Munaut C, Colige AC, Lambert CA, Frankenne F, Noel A, Grams F, Krell HW, Foidard JM. Stimulation of matrix metalloproteinase-9 expression in human fibrosarcoma cells by synthetic matrix metalloproteinase inhibitors. Exp Cell Res. 2002; 275(1): 110-21.

357. Bramhall SR, Rosemurgy A, Brown PD, Bowry C, Buckels JA. Marimastat as first-line therapy for patients with unresectable pancreatic cancer: a randomized trial. J Clin Oncol. 2001; 19(15): 3447-55.

358. Bramhall SR, Hallissey MT, Whiting J, Scholefield J, Tierney G, Stuart RC, Hawkins RE, McCulloch P, Maughan T, Brown PD, Baillet M, Fielding JW. Marimastat as maintenance therapy for patients with advanced gastric cancer: a randomised trial. Br J Cancer. 2002; 86(12): 1864-70.

359. Groves MD, Puduvalli VK, Hess KR, Jaeckle KA, Peterson P, Yung WK, Levin VA. Phase II trials of temozolomide plus the matrix metalloproteinse inhibitor, Marimastat, in recurrent and progressive glioblastoma multiforme. J Clin Oncol. 2002; 20(5): 1383-8.

360. Kossakowska AE, Urbanski SJ, Watson A, Hayden LJ, Edwards DR. Patterns of expression of metalloproteinases and their inhibitors in human malignant lymphomas. Oncol Res. 1993; 5(1): 19-28.

361. Kossakowska AE, Huchcroft SA, Urbanski SJ, Edwards DR. Comparative analysis of the expression patterns of metalloproteinases and their inhibitors in breast neoplasia, sporadic colorectal neoplasia, pulmonary carcinomas and malignant non-Hodgkin's lymphomas in humans. Br J Cancer. 1996; 73(11): 1401-8.

362. Vacca A, Ribatti D, Pellegrino A, Bruno M, Merchionne F, Dammaco F. Proteolytic activity of human lymphoid tumor cells. Correlation with tumor progression. Dev Immunol. 2000; 7(2-4): 77-88.

363. Arlt M, Kopitz C, Pennington C, Watson KLM, Krell HW, Bode W, Gansbacher B, Khokha R, Edwards DR, Krüger A. Increase in gelatinase-specificity of matrix metalloproteinase inhibitors correlates with anti-metastatic efficacy in a T-cell lymphoma model. Cancer Res. 2002; 62(19): 5543-50.

364. Kossakowska AE, Urbanski SJ, Janowska-Wieczorek A. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors: expression, role and regulation in human malignant non-Hodgkin's lymphomas. Leuk Lymphoma. 2000; 39(5-6): 485-93.

365. Kossakowska AE, Hinek A, Edwards DR, Lim MS, Zhang CL, Breitman DR, Prusinkiweicz C, Stabbler AL, Urbanski LS, Urbanski SJ. Proteolytic activity of human non-Hodgkin's lymphomas. Am J Pathol. 1998; 152(2): 565-76.

366. Kossakowska AE, Edwards DR, Prusinkiweicz C, Zhang MC, Guo D, Urbanski SJ, Grogan T, Marquez LA, Janowska-Wieczorek A. 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(6): 2080-9.

367. De Noncourt P, Robledo O, Alain T, Kossakowska AE, Urbanski SJ, Potworowski EF, St-Pierre Y. Leukocyte elastase in murine and human non-Hodgkin's lymphomas. J Leukoc Biol. 2001; 70(4): 585-91.

368. Di Girolamo ND, Tedla N, Lloyd A, Wakefield D. Expression of matrix metalloproteinases by human plasma cells and B lymphocytes. Eur J Immunol. 1998; 28(6): 1773-84.

369. Rechardt O, Elomaa O, Vaalamo M, Pääkkönen K, Jahkola T, Höök-Nikanne J, Hembry RM, Häkkinen L, Kere J, Saarialho-Kere U. Stromelysin-2 is upregulated during normal wound repair and is induced by cytokines. J Invest Dermatol. 2000; 115(5): 778-87.

370. Saarialho-Kere U, Pentland AP, Birkedal-Hansen H, Parks WC, Welgus GH. Distinct populations of basal keratinocytes express stromelysin-1 and stromelysin-2 in chronic wounds. J Clin Invest. 1994; 94(1): 79-88.

371. Muller D, Wolf C, Abecassis J, Millon R, Engelmann A, Bronner G, Rouyer N, Rio M.C., Eber M, Methlin G, Chambon P, Basset P. Increased stromelysin-3 expression is associated with increased local invasiveness in head and neck squamous cell carcinomas. Cancer Res. 1993; 53(1): 165-9.

372. Gress TM, Muller-Pillasch F, Lerch MM, Friess H, Buchler M, Adler G. Expression and in situ localization of genes coding for extracellular matrix proteins and extracellular matrix degrading proteases in pancreatic cancer. Int J Cancer. 1995; 62(4): 407-13.

373. McDonnell S, Navre M, Coffey RJ Jr, Matrisian LM. Expression and localization of the matrix metalloproteinase pump-1 inhuman gastric and colon carcinomas. Mol Carcinog. 1991; 4(6): 527-33.

374. Pajouh MS, Nagle RB, Breathnach R, Finch JS, Brawer MK, Boyden GT. Expression of metalloproteinase genes in human prostate cancer. J Cancer Res Clin Oncol. 1991; 117(2): 144-50.

375. Wolf C, Chenard M-P, Durand de Grossouvre P, Bellocq J-P, Chambon P, Basset P. Breast-cancer-associated stromelysin-3 gene is expressed inbasal cell carcinoma and during cutaneous wound healing. J Invest Dermatol. 1992; 99(870-2.

376. Newell KJ, Witty JP, Rodgers WH, Matrisian LM. Expression and localization of matrix-degradation metalloproteinases during colorectal tumorigenesis. Mol Carcinog. 1994; 10(4): 199-206.

377. Polette M, Clavel C, Muller D, Abecassis J, Binninger I, Birembault P. Detection of mRNAs encoding collagenase I and stromelysin-2 in carcinomas of the head and neck by in situ hybridization. Invasion Metastasis. 1991; 11(2): 76-83.

378. Muller D, Breathnach R, Engelmann A, Millon R, Brenner G, Flesch H, Dumont P, Eber M, Abecassis J. Expression of collagenase-related metalloproteinase genes in human lung or head and neck tumours. Int J Cancer. 1991; 48(4): 550-6.

379. Kerkelä E, Ala-aho R, Jeskanen L, Lohi J, Kahari V-M, Saarialho-Kere U. Differential patterns of stromelysin-2 (MMP-10) and MT1-MMP (MMP-14)expression in epithelial skin cancers. Br J Cancer. 2001; 84(5): 659-69.

380. Liu Z, Ivanoff A, Klominek J. Expression and activity of matrix metalloproteases in human malignant mesothelioma cell lines. Int J Cancer. 2001; 91(5): 638-43.

381. Polette M, Clavel C, Cockett MI, de Bentzmann SG, Murphy G, Birembault P. Detection and localization of mRNAs encoding matrix metalloproteinases and their tissue inhibitor in human breast pathology. Invasion Metastasis. 1995; 13(1): 31-7.

382. Matrisian LM, Bowden GT, Krieg P, Furstenberger G, Briand JP, Leroy P, Breathnach R. The mRNA coding for the secreted protease transin is expressed more abundantly in malignant than in benign tumors. Proc Natl Acad Sci USA. 1986; 83(24): 9413-7.

383. Sreenath T, Matrisian LM, Stetler-Stevenson WG, Gattoni-Celli S, Pozzatti RO. Expression of matrix metalloproteinase genes in transformed rat cell lines of high and low metastatic potential. Cancer Res. 1992; 52(18): 4942-7.

384. Mathew R, Khanna R, Kumar R, Mathur M, Shukla NK, Ralhan R. Stromelysin-2 overexpression inhuman esophageal squamous cell carcinoma: potential clinical implications. Cancer Detect Prev. 2002; 26(3): 222-8.

385. Sirum KL, Brinckerhoff CE. Cloning of the genes for human stromelysin and stromelysin 2: differential expression in rheumatoid synovial fibroblasts. Biochemistry. 1989; 28(22): 8691-8.

386. Conca W, Wilmroth F. Human T lymphocytes express a member of the matrix metalloproteinase gene family. Arthritis Rheum. 1994; 37(6): 951-6.

387. Monvoisin A, Bisson C, Si-Tayeb K, Balabaud C, Desmoulière A, Rosenbaum J. Involvement of matrix metalloproteinase type-3 in hepatocyte growth factor-induced invasion of human hepatocellular carcinoma cells. Int J Cancer. 2002; 97(2): 157-62.

388. Lochter A, Navre M, Werb Z, Bissell MJ. α1 and α2 integrins mediate invasive activity of mouse mammary carcinoma cells through regulation of stromelysin-1 expression. Mol Biol Cell. 1999; 10(2): 271-82.

389. Ito A, Nakajima H, Sasaguri Y, Nagase H, Mori Y. Co-culture of human breast adenocarcinoma MCF-7 cells and human dermal fibroblasts enhances the production of matrix metalloproteinases 1,2 and 3 in fibroblasts. Br J Cancer. 1995; 71(5): 1039-45.

390. Sternlicht MD, Bissell MJ, Werb Z. The matrix metalloproteinse stromelysin-1 acts as a natural mammary tumor promoter. Oncogene. 2000; 19(8): 1102-13.

391. Fowlkes J, Enghild JJ, Suzuki K, Nagase H. Matrix metalloproteinases degrade insulin-like growth factor-binding protein-3 in dermal fibroblast cultures. J Biol Chem. 1994; 269(41): 25742-6.

392. Ogata Y, Enghild JJ, Nagase H. Matrix metalloproteinase-3 (stromelysin) activates the precursor form for the human matrix metalloproteinase 9. J Biol Chem. 1992; 267(6): 3581-4.

393. Nakamura H, Fujii Y, Ohuchi E, Yamamoto E, Okada Y. Activation of the precursor of human stromelysin 2 and its interactions with other matrix metalloproteinases. Eur J Biochem. 1998; 253(1): 67-75.

394. De Angelis T, Noe A, Chatterjee M, Mulholland J. Stromelysin-1 activation correlates with invasiveness in squamous cell carcinoma. J Invest Dermatol. 2002; 118(5): 759-66.

395. Mercapide J, Lopez De Cicco R, Castresana SS, Klein-Szanto AJP. Stromelysin-1/matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) expression accounts for invasive properties of human astrocytoma cell lines. Int J Cancer. 2003; 106(5): 676-82.

396. Noë V, Fingleton B, Jacobs K, Crawford HC, Vermeulen S, Steelant W, Bruyneel E, Matrisian LM, Mareel M. Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. J Cell Sci. 2000; 114(Pt 1): 111-8.

397. Pirilä E, Sharabi A, Salo T, Quaranta V, Tu H, Heljasvaara R, Koshikawa N, Sorsa T, Maisi P. Matrix metalloproteinases process the laminin-5 gamma2-chain and regulate epithelial cell migration. Biochem Biophys Res Commun. 2003; 303(4): 1012-7.

398. Farina AR, Tacconelli A, Cappabianca L, Gulino A, Mackay AR. Inhibition of human MDA-MB-231 breast cancer cell invasion by matrix metalloproteinase 3 involves degradation of plasminogen. Eur J Biochem. 2002; 269(18): 4476-83.

399. Marlin SD, Springer TA. Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). Cell. 1987; 51(5): 813-9.

400. Terol MJ, Lopez-Guillermo A, Bosch F, Villamor N, Cid MC, Rozman C, Campo E, Montserrat E. Expression of the adhesion molecule ICAM-1 in non-Hodgkin's lymphoma: relationship with tumor dissemination and prognostic importance. J Clin Oncol. 1998; 16(1): 35-40.

401. Wolowiec D, Frydecka I, Kapelko-Slowik K, Potoczek S, Urbaniak-Kujda D, Kuliczkowski K. Blood serum levels of soluble forms of adhesion molecules ICAM-1 (sICAM-1) and selectin E (s-selectin E) in patients with various phases of non-Hodgkin's lymphomas. Med Sci Monit. 2002; 8(5): BR175-8.

402. Perez-Encinas M, Quintas A, Bendana A, Rabunal MJ, Bello JL. Correlation and prognostic value of serum soluble ICAM-1, beta-2 microglobulin, and IL-2alphaR levels in non-Hodgkin's lymphoma. Leuk Lymphoma. 1999; 33(5-6): 551-8.

403. Christiansen I, Gidlof C, Kalkner KM, Hagberg H, Bennmarker H, Totterman T. Elevated serum levels of soluble ICAM-1 in non-Hodgkin's lymphomas correlate with tumour burden, disease activity and other prognostic markers. Br J Haematol. 1996; 92(3): 639-46.

404. Ozer G, Altinel M, Kocak B, Balci M, Altan A, Gonenc F. Potential value of soluble intercellular adhesion molecule-1 in the serum of patients with bladder cancer. Urol Int. 2003; 70(3): 167-71.

405. Chirathaworn C, Kohlmeier JE, Tibbetts SA, Rumsey LM, Chan MA, Benedict SH. Stimulation through intercellular adhesion molecule-1 provides a second signal for T cell activation. J Immunol. 2002; 168(11): 5530-7.

406. Gaglia JL, Greenfield EA, Mattoo A, Sharpe AH, Freeman GJ, Kuchroo VK. Intercellular adhesion molecule 1 is critical for activation of CD28-deficient T cells. J Immunol. 2000; 165(11): 6091-8.

407. Van Seventer GA, Shimizu Y, Horgan KJ, Shaw S. The LFA-1 ligand ICAM-1 provides an important costimulatory signal for T cell receptor-mediated activation of resting T cells. J Immunol. 1990; 144(12): 4579-86.

408. Hauzenberger D, Klominek J, Holgersson J, Bergstrom SE, Sundqvist KG. Triggering of motile behavior in T lymphocytes via cross-linking of alpha 4 beta 1 and alpha L beta 2. J Immunol. 1997; 158(1): 76-84.

409. Bevilacqua MP. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. Annu Rev Immunol. 1993; 11(767-804.

410. Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA, Springer TA. Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). J Immunol. 1986; 137(1): 245-54.

411. Voraberger G, Schafer R, Stratowa C. Cloning of the human gene for intercellular adhesion molecule 1 and analysis of its 5'-regulatory region. Induction by cytokines and phorbol ester. J Immunol. 1991; 147(8): 2777-86.

412. Hutchins D, Steel CM. Regulation of ICAM-1 (CD54) expression in human breast cancer cell lines by interleukin 6 and fibroblast-derived factors. Int J Cancer. 1994; 58(1): 80-4.

413. Lawson C, Ainsworth ME, McCormack AM, Yacoub M, Rose ML. Effects of cross-linking ICAM-1 on the surface of human vascular smooth muscle cells: induction of VCAM-1 but no proliferation. Cardiovasc Res. 2001; 50(3): 547-55.

414. Blaber R, Stylianou E, Clayton A, Steadman R. Selective regulation of ICAM-1 and RANTES gene expression after ICAM-1 ligation on human renal fibroblasts. J Am Soc Nephrol. 2003; 14(1): 116-27.

415. Lukacs NW, Strieter RM, Elner VM, Evanoff HL, Burdick M, Kunkel SL. Intercellular adhesion molecule-1 mediates the expression of monocyte-derived MIP-1 alpha during monocyte-endothelial cell interactions. Blood. 1994; 83(5): 1174-8.

416. Ho JW, Liang RH, Srivastava G. Differential cytokine expression in EBV positive peripheral T cell lymphomas. Mol Pathol. 1999; 52(5): 269-74.

417. Louie SW, Ramirez LM, Krieg AM, Maliszewski CR, Bishop GA. Endogenous secretion of IL-4 maintains growth and Thy-1 expression of a transformed B cell clone. J Immunol. 1993; 150(2): 399-406.

418. Ohnishi K, Ichikawa A, Kagami Y, Nagasaka T, Niwa T, Hotta T, Saito H. Interleukin 4 and gamma-interferon may play a role in the histopathogenesis of peripheral T-cell lymphoma. Cancer Res. 1990; 50(24): 8028-33.

419. Billard C, Caput D, Vita N, Ferrara P, Orrico M, Gaulard P, Boumsell L, Bensussan A, Farcet JP. Interleukin-13 responsiveness and interleukin-13 receptor expression in non-Hodgkin's lymphoma and reactive lymph node B cells. Modulation by CD40 activation. Eur Cytokine Netw. 1997; 8(1): 19-27.

420. Voorzanger N, Touitou R, Garcia E, Delecluse HJ, Rousset F, Joab I, Favrot MC, Blay JY. Interleukin (IL)-10 and IL-6 are produced in vivo by non-Hodgkin's lymphoma cells and act as cooperative growth factors. Cancer Res. 1996; 56(23): 5499-505.

421. Ruco LP, Pomponi D, Pigott R, Stoppacciaro A, Monardo F, Uccini S, Boraschi D, Tagliabue A, Santoni A, Dejana E. Cytokine production (IL-1 alpha, IL-1 beta, and TNF alpha) and endothelial cell activation (ELAM-1 and HLA-DR) in reactive lymphadenitis, Hodgkin's disease, and in non-Hodgkin's lymphomas. An immunocytochemical study. Am J Pathol. 1990; 137(5): 1163-71.

422. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. Nature. 2002; 420(6917): 860-7.

423. Daniel D, Meyer-Morse N, Bergsland EK, Dehne K, Coussens LM, Hanahan D. Immune enhancement of skin carcinogenesis by CD4+ T cells. J Exp Med. 2003; 197(8): 1017-28.

424. Ganss R, Ryschich E, Klar E, Arnold B, Hammerling GJ. Combination of T-cell therapy and trigger of inflammation induces remodeling of the vasculature and tumor eradication. Cancer Res. 2002; 62(5): 1462-70.

425. Van Themsche C, Potworowski EF, St-Pierre Y. Stromelysin-1 (MMP-3) is inducible in T lymphoma cells and accelerates the growth of lymphoid tumors in vivo. Biochem Biophys Res Commun. 2004; 315(4): 884-91.

426. Kooijman R, Scholtens LE, Rijkers GT, Zegers BJ. Type I insulin-like growth factor receptor expression in different developmental stages of human thymocytes. J Endocrinol. 1995; 147(2): 203-9.

427. Van Themsche C, Alain T, Kossakowska AE, Urbanski SJ, Potworowski EF, St-Pierre Y. Stromelysin-2 (MMP-10) is inducible in lymphoma cells and accelerates the growth of lymphoid tumors in vivo. J Immunol. 2004; 173(6): 3605-11.

428. Stetler-Stevenson M, Mansoor A, Lim M, Fukushima P, Kehrl J, Marti G, Ptaszynski K, Wang J, Stetler-Stevenson WG. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in reactive and neoplastic lymphoid cells. Blood. 1997; 89(5): 1708-15.

429. Owen JL, Iragavarapu-Charyulu V, Gunja-Smith Z, Herbert LM, Grosso JF, Lopez DM. Up-regulation of matrix metalloproteinase-9 in T lymphocytes of mammary tumor bearers: role of vascular endothelial growth factor. J Immunol. 2003; 171(8): 4340-51.

430. van Bilsen JH, Wagenaar-Hilbers JP, van der Cammen MJ, van Dijk ME, van Eden W, Wauben MH. Successful immunotherapy with matrix metalloproteinase-derived peptides in adjuvant arthritis depends on the timing of peptide administration. Arthritis Res. 2002; 4(4): R2.

431. ter Steege J, Vianen M, van Bilsen J, Bijlsma J, Lafeber F, Wauben M. Identification of self-epitopes recognized by T cells in rheumatoid arthritis demonstrates matrix metalloproteinases as a novel T cell target. J Rheumatol. 2003; 30(6): 1147-56.

432. Su JM, Wei YQ, Tian L, Zhao X, Yang L, He QM, Wang Y, Lu Y, Wu Y, Liu F, Liu JY, Yang JL, Lou Y.Y, Hu B, Niu T, Wen YJ, Xiao F, Deng HX, Li J, Kan B. Active immunogene therapy of cancer with vaccine on the basis of chicken homologous matrix metalloproteinase-2. Cancer Res. 2003; 63(3): 600-7.

433. Rotteveel FT, Kokkelink I, van Lier RA, Kuenen B, Meager A, Miedema F, Lucas CJ. Clonal analysis of functionally distinct human CD4+ T cell subsets. J Exp Med. 1988; 168(5): 1659-73.

434. Goetzl EJ, Banda MJ, Leppert D. Matrix metalloproteinases in immunity. J Immunol. 1996; 156(1): 1-4.

435. Mauceri HJ, Seetharam S, Beckett MA, Lee JY, Gupta VK, Gately S, Stack MS, Brown CK, Swedberg K, Kufe DW, Weichselbaum RR. Tumor production of angiostatin is enhanced after exposure to TNF-alpha. Int J Cancer. 2002; 97(4): 410-5.

436. Brandes M. E., Mai U. E., Ohura K., Wahl S. M. Type I transforming growth factor-beta receptors on neutrophils mediate chemotaxis to transforming growth factor-beta. J Immunol. 1991; 147(5): 1600-6.

437. Adams D. H., Hathaway M., Shaw J., Burnett D., Elias E., Strain A. J. Transforming growth factor-beta induces human T lymphocyte migration in vitro. J Immunol. 1991; 147(2): 609-12.

438. Schiott A., Johansson A. C., Widegren B., Sjogren H. O., Lindvall M. Effects of transforming growth factor beta1 expression in a rat colon carcinoma: growth inhibition, leukocyte infiltration and production of interleukin-10 and tumor necrosis factor alpha. Cancer Immunol Immunother. 2000; 48(10): 579-87.

439. Yu Q., Stamenkovic I. Transforming growth factor-beta facilitates breast carcinoma metastasis by promoting tumor cell survival. Clin Exp Metastasis. 2004; 21(3): 235-42.

440. Huber S., Schramm C., Lehr H. A., Mann A., Schmitt S., Becker C., Protschka M., Galle P. R., Neurath M. F., Blessing M. Cutting edge: TGF-beta signaling is required for the in vivo expansion and immunosuppressive capacity of regulatory CD4+CD25+ T cells. J Immunol. 2004; 173(11): 6526-31.

441. Pozzi A, LeVine WF, Gardner HA. Low plasma levels of matrix metalloproteinase 9 permit increased tumor angiogenesis. Oncogene. 2002; 21(2): 272-81.

442. Schoppmann SF, Birner P, Stockl J, Kalt R, Ullrich R, Caucig C, Kriehuber E, Nagy K, Alitalo K, Kerjaschki D. Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. Am J Pathol. 2002; 161(3): 947-56.

443. Sun X, Kanwar JR, Leung E, Lehnert K, Wang D, Krissansen GW. Angiostatin enhances B7.1-mediated cancer immunotherapy independently of effects on vascular endothelial growth factor expression. Cancer Gene Ther. 2001; 8(10): 719-27.

444. Brown PD. Ongoing trials with matrix metalloproteinase inhibitors. Expert Opin Investig Drugs. 2000; 9(9): 2167-77.

445. Zucker S. Experimental models to identify antimetastatic drugs: are we there yet? A position paper. Ann NY Acad Sci. 1999; 878(1): 208-11.