

Université du Québec  
INRS-Institut Armand-Frappier  
Centre de recherche en santé humaine

**RÉGULATION DE L'EXPRESSION DE MMP-9 ET DES  
TIMPS  
CHEZ LE GLIOME**

Par

Pierre-Olivier Estève

Thèse présentée pour l'obtention  
du grade de Philosophiae doctor (Ph.D.)  
en virologie et immunologie

2002

## REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr. Yves Saint-Pierre, pour sa direction scientifique, sa compréhension, sa gentillesse, sa disponibilité et le support financier tout au long de mon doctorat. De plus, je le remercie de m'avoir donné la liberté d'explorer de nouvelles voies, ce qui m'a permis d'apprendre beaucoup de mes erreurs et d'améliorer mes connaissances scientifiques.

Je voudrais aussi exprimer ma sincère gratitude au Dr. Rosemonde Mandeville, qui a été ma directrice de recherche durant ma maîtrise à l'Institut Armand-Frappier, et qui m'a fait confiance dès mon arrivée au Québec. Je la remercie de son encouragement, son enthousiasme et ses qualités de direction scientifique, qui m'ont encouragé à continuer en thèse.

Je remercie également le Dr. Albert Descoteaux, pour sa précieuse collaboration, sa disponibilité, son enthousiasme et sans lequel de nombreuses expériences n'auraient pu être réalisées.

De plus, je remercie le Dr. Edouard Potworowski pour son apport d'idées, de critiques constructives et de sa précieuse collaboration, notamment pour la rédaction d'articles et de présentations orales.

Je voudrais aussi témoigner ma gratitude au Dr. Olivier Robledo, autant pour ses discussions scientifiques, que pour son amitié et ses précieux conseils.

Je remercie également les autres étudiants au doctorat qui m'ont encouragé durant mes années passées à l'Institut Armand-Frappier, tels que Anna-Karine, Benoit, Annik, Monica et Mikhail.

Je remercie aussi tout les membres, présents ou passés, du laboratoire du Dr. Yves Saint-Pierre, dont notamment le Dr. Fawzi Aoudjit pour ses compétences scientifiques, son encouragement et son amitié, ainsi que les nombreux étudiants de maîtrise, et Doris Legault, la technicienne du laboratoire.

Merci au programme de Ph.D. de l'Institut Armand-Frappier de m'avoir permis d'acquérir une culture scientifique à travers les cours et les séminaires.

Enfin, un grand merci à mes parents et ma famille en France, qui m'ont toujours encouragé tout au long de mes études.

# TABLE DES MATIÈRES

Remerciements.....	v
Table des matières.....	vi
Liste des figures et tableaux.....	ix
Listes des abbréviations.....	xi
Contribution des auteurs .....	xii
Résumé général.....	1

## Revue de littérature

### 1. *Les gliomes*

Caractéristiques générales.....	3
Les stades d'évolution.....	3
Gliomes et facteurs de croissance.....	4
Gliomes et cytokines.....	6
Les thérapies.....	9
Les modèles d'études.....	10

### 2. *Les enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire : MMPs*

Classification et structure des MMPs.....	12
L'activation des MMPs.....	18
Les inhibiteurs de MMPs : TIMPs.....	19
MMPs et cancer.....	20
Régulation de l'expression et de la sécrétion de MMP-9.....	27

### 3. *Les protéines kinase C : PKCs*

Classification et structure des PKCs.....	33
L'activation des PKCs.....	34
La spécificité de substrat.....	36
Rôles des PKCs.....	38

4. <i>La famille des IP 3-kinases</i>	
Le phosphatidylinositol et ses dérivés.....	41
La classe I des IP 3-kinases.....	42
La classe II des IP 3-kinases.....	48
La classe III des IP 3-kinases.....	49
IP 3-kinases et cancer.....	50
IP 3-kinases et MMPs.....	52

5. <i>La méthylation de l'ADN</i>	
Définitions.....	53
Les méthyltransférases.....	53
Méthylation et cancer.....	56
Méthylation et invasion tumorale.....	58

**Chapitre 1 : La régulation de l'expression de MMP-9 chez le gliome par les cytokines**

Résumé.....	71
Introduction.....	72
Matériel et méthodes.....	73
Résultats .....	74
Discussion.....	80
Références.....	82
Conclusion.....	83

**Chapitre 2 : Rôle de PKC- $\zeta$  dans la régulation de l'expression de MMP-9**

Résumé.....	86
Introduction.....	89
Matériel et méthodes.....	91
Résultats.....	97

Discussion.....	101
Références.....	104
Conclusion.....	122

**Chapitre 3 : Rôle de IP 3-kinase dans la régulation de l’expression de MMP-9**

Résumé.....	124
Introduction.....	128
Matériel et méthodes.....	130
Résultats.....	135
Discussion.....	138
Références.....	141
Conclusion.....	156

**Discussion générale**

La régulation positive de l’expression de MMP-9.....	158
La régulation négative de l’expression de MMP-9.....	160
La méthylation et l’expression des TIMPs.....	161

<b>Conclusions.....</b>	<b>162</b>
-------------------------	------------

<b>Annexes.....</b>	<b>166</b>
---------------------	------------

<b>Références.....</b>	<b>173</b>
------------------------	------------

Appendice A : Liste des articles et communications.....	244
---	-----

Appendice B : Copie des articles.....	245
---------------------------------------	-----

# LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

## 1. FIGURES

### Revue de littérature

Figure 1 Le développement du gliome.....	60
Figure 2 Structures générales des MMPs.....	61
Figure 3 Structures des différents isoformes de PKC.....	62
Figure 4 Mécanisme d'activation des PKCs.....	63
Figure 5 Fonction de l'IP 3-kinase.....	64
Figure 6 Recrutement de l'IP 3-kinase.....	65
Figure 7 Les classes d'IP 3-kinase.....	66
Figure 8 Structures générales des DNMTs.....	67
Figure 9 Etude de la régulation de l'expression de MMP-9 chez le gliome... ..	69

### Chapitre 1

Figure 1 Induction of MMP-9 activity by IL-1 and TNF- $\alpha$ in glioma cells.....	74
Figure 2 Dose-dependent and additive effects of IL-1 and TNF- $\alpha$ on MMP-9 secretion.....	75
Figure 3 Induction of MMP-9 mRNA expression by IL-1 and TNF- $\alpha$ .....	76
Figure 4 Inhibition of MMP-9 secretion by TGF $\beta$ 2.....	77
Figure 5 Reversion of TGF $\beta$ 2 effect on MMP-9 secretion by PMA.....	78
Figure 6 Inhibition of MMP-9 gene expression by TGF $\beta$ 2.....	79
Figure 10 Régulation de l'expression de MMP-9 par les cytokines.....	83

### Chapitre 2

Figure 1A Inhibition of MMP-9 activity by PKC- $\zeta$ pseudosubstrate.....	113
---	-----

Figure 1B Inhibition of MMP-9 gene expression by PKC- $\zeta$ pseudosubstrate.....	114
Figure 2 Induction of PKC- $\zeta$ activity by IL-1 and TNF- $\alpha$ .....	115
Figure 3A-B Overexpression of PKC- $\zeta$ induces MMP-9 activity.....	116
Figure 3C Overexpression of PKC- $\zeta$ induces MMP-9 gene expression.....	117
Figure 3D-E Overexpression of PKC- $\epsilon$ has no effect on MMP-9 activity.....	118
Figure 4 Inhibition of MMP-9 activity by the SN50 NF- $\kappa$ B blocking peptide.....	119
Figure 5 Mutation in NF- $\kappa$ B binding site abolishes MMP-9 promoter activity....	120
Figure 1C No effect on MMP-9 activity by PKA pseudosubstrate.....	121
Figure 11 Rôle de PKC- $\zeta$ dans l'induction de l'expression de MMP-9.....	122

### Chapitre 3

Figure 1A Effect of wortmannin on MMP-9 activity.....	149
Figure 1B Effect of wortmannin on MMP-9 gene expression.....	150
Figure 1C Effect of wortmannin on MMP-9 promoter activity.....	151
Figure 2A-B Inhibition of MMP-9 activity by PDGF.....	152
Figure 3 Reversion of the PDGF effect on MMP-9 expression by wortmannin...	154
Figure 4 Potentiation of MMP-9 induction by cytokines in mutant p85 $\alpha$ clones..	155
Figure 12 Rôle de l'IP 3-kinase dans l'expression de MMP-9.....	156

### Conclusions

Figure 13 Rôle de PKC- $\zeta$ dans l'équilibre de l'expression de MMP-9/TIMPs.....	172
---	-----

## 2. TABLEAUX

### Revue de littérature

Tableau 1 La famille des MMPs.....	68
------------------------------------	----

## LISTE DES ABBRÉVIATIONS

- AP-1** : Activating protein-1  
**BHE** : Barrière hémato-encéphalique  
**DNA** : Deoxyribonucleic acid  
**DNMT** : DNA méthyltransferase  
**EGF** : Epidermal growth factor  
**FBS** : Fetal bovine serum  
**h** : heures  
**IL-1** : Interleukin-1  
**kDa** : Kilodalton  
**MAPK** : Mitogen-activated protein kinase  
**min** : minute(s)  
**ml** : millilitres  
**mM** : millimolaire  
**MMPs** : Matrix metalloproteinases  
**MT-MMPs** : Membrane-type matrix metalloproteinases  
**NF- $\kappa$ B** : Nuclear factor- $\kappa$ B  
**PBS** : Phosphate saline buffer  
**PDGF** : Platelet-derived growth factor  
**PI 3-kinase** : Phosphatidylinositol 3-kinase  
**PKC** : Protein kinase C  
**PKC- $\zeta$  PS** : PKC- $\zeta$  pseudosubstrate  
**PMA** : Phorbol 12-myristate 13-acetate  
**PMSF** : Phenylmethylsulfonyl fluoride  
**TGF $\beta$**  : Transforming growth factor beta  
**TIMPs** : Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases  
**TNF- $\alpha$**  : Tumor necrosis factor-alpha  
 **$\mu$ g** : microgrammes  
 **$\mu$ l** : microlitres  
 **$\mu$ M** : micromolaire

## CONTRIBUTION DES AUTEURS

J'ai effectué tous mes travaux de thèse sous la direction du professeur Yves Saint-Pierre et réalisé toutes les expériences décrites dans les trois chapitres et différents annexes de ma thèse, en plus de la rédaction de trois articles correspondant aux trois chapitres..

Pour le premier article traitant de la régulation de MMP-9 par les cytokines dans le gliome, certaines des expériences ont été réalisées dans le laboratoire du professeure Rosemonde Mandeville, sous la supervision des docteurs Michel Houde et Pierre Tremblay.

Dans le second article abordant le rôle de PKC $\zeta$  dans l'expression de MMP-9, la construction du plasmide pGLIII contenant le promoteur MMP-9 pour l'activité luciférase a été effectuée par Eric Chicoine, étudiant à la maîtrise. Les plasmides codant pour les différentes PKCs proviennent du laboratoire du professeur Albert Descoteaux. La génération des clones surexprimant les PKCs a été supervisée par le docteur Fawzi Aoudjit et l'introduction de la mutation du site NF- $\kappa$ B dans le promoteur de MMP-9 selon la supervision du docteur Olivier Robledo. Les professeurs Albert Descoteaux et Edouard F. Potworowski ont également activement participé à la rédaction de l'article.

Pour le troisième article concernant la régulation de l'expression de MMP-9 par IP 3-kinase, la génération des dominant-négatifs de IP 3-kinase a été supervisée par le docteur Olivier Robledo. Le professeur Edouard F. Potworowski a également participé à la rédaction de cet article.

## RÉSUMÉ GÉNÉRAL

Les gliomes représentent la majorité des cancers du cerveau et envahissent les tissus environnant grâce à la sécrétion d'enzymes digérant la matrice extracellulaire, comme les métalloprotéinases de la matrice ou MMPs. Une de ces MMPs, MMP-9, semble essentielle au développement du gliome, mais la régulation de son expression chez le gliome demeure inconnue. Dans cette thèse, nous avons déterminé que l'expression de MMP-9 peut être induite par les cytokines pro-inflammatoires IL-1 et TNF- $\alpha$  chez des cellules cancéreuses gliale humaines et de rat. De plus, cette induction de l'expression de MMP-9 est réprimée par une cytokine immuno-suppressive, TGF- $\beta$ , suggérant une régulation stricte de l'expression de cette MMP par les cytokines chez le gliome.

Dans un deuxième temps, nous avons démontré que l'induction de l'expression de MMP-9 par les cytokines IL-1 et TNF- $\alpha$  est dépendante d'un isoforme PKC atypique, PKC- $\zeta$ . Cet isoforme est activé par IL-1 et TNF- $\alpha$ , ce qui conduit à l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B, nécessaire à l'induction de l'expression de MMP-9 chez le gliome.

Troisièmement, nous avons défini que l'expression de MMP-9 peut être inhibée par l'activation d'une kinase capable de phosphoryler les lipides inositol, l'IP 3-kinase. De plus, la répression de l'induction de MMP-9 par l'IP 3-kinase est indépendante de l'activation de NF- $\kappa$ B, ce qui suggère un nouveau mécanisme de régulation de l'expression de MMP-9.

Finalement, nous avons démontré que la surexpression de l'isoforme PKC- $\zeta$  induit l'inhibition de l'expression de TIMP-1 et TIMP-3 chez le gliome. Cette inhibition, réversée par un inhibiteur de l'activité méthyltransférase, suggère une hyperméthylation des promoteurs de TIMP-1 et TIMP-3. Cette hyperméthylation provient de l'augmentation de l'activité méthyltransférase induite par la surexpression de PKC- $\zeta$ . Cet isoforme pourrait affecter l'activité méthyltransférase en phosphorylant directement la méthyltransférase DNMT1. Ainsi, l'isoforme PKC- $\zeta$  peut contribuer à l'invasion du gliome, non seulement en induisant l'expression de MMP-9, mais aussi en inhibant l'expression de TIMP-1 et TIMP-3, les deux inhibiteurs préférentiels de l'activité MMP-9.

## **Revue de littérature**

# 1. LES GLIOMES

## 1.1 Caractéristiques générales

Les gliomes représentent la majorité des cancers du cerveau et affectent les cellules d'origine gliale, principalement les astrocytes. Leur fréquence est en constante augmentation et les thérapies actuelles demeurent inefficaces. Aussi, après diagnostic par tomographie axiale, la durée de vie des patients n'excède pas 12 mois, en raison du stade déjà avancé de la maladie. Les symptômes commencent généralement par des maux de tête, suivis de pertes progressives des fonctions motrices aboutissant à la paralysie et le décès du patient.

Au niveau morphologique, ce sont des tumeurs solides, localement invasives, qui développent rarement des métastases en dehors du cerveau. De plus, ces cancers sont hautement angiogéniques. Cette capacité de former de nouveaux vaisseaux sanguins favorise la croissance de la tumeur. Le développement du gliome s'accompagne également de processus démyélinisants, d'astrogliose (hyperactivation des cellules gliales), d'apoptose neuronale, de nécrose des tissus et d'inflammation. Cette dernière est due à l'infiltration des leucocytes dans le cerveau généralement associée à la dégradation de la barrière hémato-encéphalique (BHE), ainsi qu'à l'activation des astrocytes.

## 1.2 Les stades d'évolution

Les gliomes ont la capacité d'évoluer vers un phénotype de plus en plus malin, jusqu'à l'apparition de leur forme la plus agressive : le glioblastome. Différents stades d'évolution du gliome sont actuellement connus et classés selon leurs profils moléculaires pathogénétiques impliquant la perte de gènes suppresseurs de tumeur ainsi que l'activation d'oncogènes (Fig.1; classification selon l'Organisation Mondiale de la Santé : OMS). Au moins deux voies moléculaires ont été proposées pour les glioblastomes (Louis et Gusella, 1995):

- les glioblastomes secondaires progressant d'un stade précoce à avancé (I à IV)
- les glioblastomes primaires correspondant à un développement *de novo* du gliome.

Ces deux types de glioblastomes, qui sont pathologiquement indistincts, présentent une perte de la protéine tyrosine phosphatase PTEN/MMAC1 ("phosphatase tensin homologue/mutated in multiple advanced cancers-1"), due à des délétions présentes au niveau du bras q du chromosome 10 (Li *et al.*, 1997; Steck *et al.*, 1997). PTEN/MMAC1 est considéré comme un gène suppresseur de tumeur car il inhibe la voie de signalisation IP3-kinase ("Inositol phosphate-3' kinase") et PKB/Akt ("Protein Kinase B"), deux molécules impliquées dans la survie du gliome (Davies *et al.*, 1998). Les glioblastomes secondaires se caractérisent également par la perte d'autres anti-oncogènes, tels que p53, Rb (protéine du rétinoblastome) et p16 (un inhibiteur des cyclines, protéines du cycle cellulaire). Ces trois gènes contrôlent la régulation du cycle cellulaire (Sidransky *et al.*, 1992; Mercer *et al.*, 1990; Venter et Thomas, 1991; Arap *et al.*, 1995; Jen *et al.*, 1994). A ces pertes d'anti-oncogènes s'associe souvent l'amplification de certains loci génétiques au niveau des chromosomes 7, contenant le gène codant pour le récepteur de l'EGF ("Epidermal Growth Factor"), ainsi qu'au niveau du chromosome 12q, contenant les gènes codant pour des protéines nécessaires au cycle cellulaire comme CDK4 ("Cyclin Dependent Kinase 4"), MDM2 ("murine double minute-2") et une protéine-G "ras-like": Rap1b (Libermann *et al.*, 1985; Reifenberger *et al.*, 1994; Gutmann *et al.*, 1997). Les surexpressions de récepteurs de facteurs de croissance comme EGF, ou PDGF ("Platelet-derived Growth Factor") pour les glioblastomes primaires, concourent à l'augmentation de l'activation de p21-ras, une protéine-G importante pour la prolifération du gliome (Guha *et al.*, 1997). De ces aberrations génétiques résulte un dérèglement des signaux de transduction de la cellule conduisant à la prolifération et la différenciation des cellules tumorales, nécessaires au développement néoplasique (Aaronson, 1991).

### **1.3 Gliomes et facteurs de croissance**

En plus de ces dérèglements intracellulaires, le gliome peut induire l'expression de facteurs de croissance, tels que le bFGF ("basic Fibroblast Growth Factor") et l'IGF ("Insulin Growth Factor"), impliqués dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation des cellules d'origine gliale (Ferrara *et al.*, 1988; Shemer *et al.*, 1987). En outre, la sécrétion du facteur VEGF ("Vascular Endothelial Growth Factor") et du bFGF par les gliomes (Plate *et al.*, 1994; Lichtor *et al.*, 1990), facilite le développement des

processus angiogéniques en favorisant la prolifération des cellules endothéliales (Plate *et al.*, 1992). De plus, le PDGF semble être un facteur important dans le développement du gliome, car il est impliqué dans la transformation des cellules gliales en gliomes.

### **Le facteur de croissance dérivé des plaquettes ou PDGF**

La famille du PDGF est constituée d'homo- et d'hétéro-dimères cationiques, composés par une chaîne A et B polypeptidique, liés entre elles par un pont disulfure. Il existe donc trois isoformes de PDGF : PDGF-AA, PDGF-AB et PDGF-BB. Huit résidus cystéine sont conservés dans les deux chaînes, et forment, chez PDGF-BB, une structure en nœud ou "cystein knot". Cette structure est également commune au "Transforming Growth Factor- $\beta$ " TGF- $\beta$  et au "Nerve Growth Factor" NGF (Murray-Rust *et al.*, 1993). Les chaînes A et B sont synthétisées sous forme de précurseurs, nécessitant un clivage protéolytique dans la région N-terminale pour constituer la forme mature native de 30 kDa (Ostman *et al.*, 1991). Les isoformes PDGF exercent leur effet via leur récepteurs  $\alpha$  et  $\beta$ . Chacun des récepteurs possède cinq domaines extracellulaires homologues aux immunoglobulines, et une partie intracellulaire comprenant un domaine tyrosine kinase (Claesson-Welsh *et al.*, 1989; Matsui *et al.*, 1989; Yarden *et al.*, 1986). Les isoformes PDGF étant des dimères, ils peuvent se lier simultanément à deux récepteurs et ainsi, induire une dimérisation des récepteurs (Bishayee *et al.*, 1989; Heldin *et al.*, 1989; Seifert *et al.*, 1989). Le récepteur  $\alpha$  lie les chaînes A et B du PDGF à haute affinité, tandis que le récepteur  $\beta$  ne lie que la chaîne B à haute affinité. Ainsi, PDGF-AA induit des récepteurs homo-dimères aa, PDGF-AB des récepteurs homo-dimères  $\alpha\alpha$  et hétéro-dimères  $\alpha\beta$ , et PDGF-BB les trois combinaisons dimériques  $\alpha$  et  $\beta$  (Kanakaraj *et al.*, 1991; Hammacher *et al.*, 1989; Seifert *et al.*, 1989). Les 3 récepteurs dimériques peuvent induire des signaux de transduction qui se recoupent, mais qui ne sont pas forcément identiques. Par exemple, bien que la liaison du PDGF aux récepteurs  $\alpha$  et  $\beta$  peut induire l'activation de la molécule IP-3 kinase (phosphatidylinositol-3 kinase), ainsi que celle des membres de la famille de l'oncogène *src* à fonction tyrosine kinase (Heldin *et al.*, 1998; Erpel et Courtneidge, 1995), son effet sur la réorganisation de l'actine et le chimiotactisme peut différer selon le type de récepteur engagé (Eriksson *et al.*, 1992; Siebahn *et al.*, 1990).

Au niveau du cancer, le PDGF est le produit de l'oncogène *sis*, qui peut causer la transformation des cellules en culture, à l'aide d'un mécanisme autocrine (Beckmann *et*

*al.*, 1988; Leal *et al.*, 1985). Ainsi, des mutants dominant-négatifs du PDGF, réversent le phénotype transformé des cellules d'astrocytomes humains (Shamah *et al.*, 1993). De plus, l'injection intramusculaire ou intracérébrale du rétrovirus SSV ("simian sarcoma virus"), produisant *v-sis*, qui est identique à la chaîne B du PDGF (Robbins *et al.*, 1983), induit, respectivement, des fibrosarcomes et des gliomes chez la marmotte (Deinhardt, 1980). PDGF est également un puissant mitogène chez les gliomes *in vitro* (Strawn *et al.*, 1994). *In vivo*, l'expression des chaînes A et B, ainsi que celle du récepteur  $\alpha$  du PDGF, augmentent de façon significative chez les glioblastomes *vs* les gliomes de stades moins avancés (Hermanson *et al.*, 1992). Cette observation suggère que PDGF joue un rôle dans la progression du gliome.

Le gliome peut donc ainsi contrôler son environnement par les facteurs de croissance. Mais il le peut également par la sécrétion de différentes cytokines à fonction pléiotropique.

#### **1.4 Gliomes et cytokines**

Les gliomes peuvent sécréter deux types de cytokines :

- des cytokines pro-inflammatoires : l'Interleukine-1 (IL-1) et le facteur de nécrose des tumeurs- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )
- des cytokines immunosuppressives : notamment le TGF- $\beta$  ("Transforming Growth Factor - $\beta$ ").

Ces cytokines sont généralement produites par les cellules du système immunitaire, dont notamment les macrophages lors de processus inflammatoires.

##### **1.4.1 Les cytokines pro-inflammatoires**

###### **a) L'Interleukine-1 : IL-1**

L'Interleukine-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) et l'Interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) sont synthétisées sous forme d'un précurseur de 31 kDa (Beuscher *et al.*, 1990). Tandis que l'IL-1 $\alpha$  représente l'isoforme associée à la membrane cellulaire, l'IL-1 $\beta$  est la forme relarguée par la cellule (Kurt-Jones *et al.*, 1985). Ces pro-formes nécessitent un clivage par des protéases, conduisant à l'apparition de protéines actives de 17.3 kDa (Black *et al.*, 1989). La protéase principalement responsable du clivage de l'IL-1 $\beta$  est une cystéine protéase appelée ICE

(IL-1 $\beta$ -converting enzyme) ou caspase-1 (Kuida *et al.*, 1995). En effet, les souris déficientes pour le gène caspase-1 se sont avérées incapables de produire de l'IL-1 $\beta$  (Li *et al.*, 1995). Cependant, il existe d'autres voies d'activation de l'IL-1 $\beta$ , indépendantes de la caspase-1 et impliquant notamment les métalloprotéinases de la matrice ou MMPs (Schonbeck *et al.*, 1998). Les deux types de récepteurs I et II de l'IL-1 peuvent lier les deux isoformes, mais avec différentes affinités: le récepteur I se lie préférentiellement à l'IL-1 $\alpha$  et le récepteur II à l'IL-1 $\beta$  (Bomszyk *et al.*, 1989). Seul le récepteur I est connu pour transmettre des signaux intracellulaires. Le récepteur II possède un segment intracellulaire de 29 acides aminés et pourrait agir comme un régulateur négatif de l'IL-1 (Chizzonite *et al.*, 1989). En effet, des formes solubles du récepteur II ont été décrites comme étant des inhibiteurs circulants de l'IL-1 $\beta$  (Symons *et al.*, 1991).

L'expression de l'IL-1 a été démontrée dans les gliomes *in vivo* par RT-PCR et immunohistochimie (Merlo *et al.*, 1993; Gauthier *et al.*, 1993). Elle peut être induite *in vitro* chez des lignées cellulaires de gliomes suite à leur stimulation par le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) ou du lipopolysaccharide (LPS) (Lee *et al.*, 1989; Velasco *et al.*, 1991). De plus, les ARN messagers des deux récepteurs de l'IL-1 ont été détectés par RT-PCR dans la plupart des lignées de glioblastomes, suggérant une régulation autocrine potentielle par l'IL-1 (Tada *et al.*, 1994). Conformément aux études utilisant des cultures d'astrocytes primaires, l'IL-1 peut stimuler la prolifération des gliomes *in vitro* (Kasahara *et al.*, 1990; Lachman *et al.*, 1987).

La production de l'IL-1 par les tumeurs d'origine gliale pourrait jouer un rôle essentiel dans l'initiation d'une cascade d'évènements similaires à ceux observés au cours des processus inflammatoires. En effet, l'IL-1 augmente l'expression de cytokines telles que le TNF- $\alpha$  et l'IL-6, de chimioattractants (IL-8) et de molécules d'adhésion (ICAM-1 : "Intercellular cell adhesion molecule-1") au niveau des cellules tumorales et des cellules vasculaires, promouvant ainsi le chimiotactisme et l'extravasation des lymphocytes et des macrophages (Bethea *et al.*, 1992; Frei *et al.*, 1989; Kasahara *et al.*, 1991; Frohman *et al.*, 1989; Dustin *et al.*, 1986).

#### **b) Le facteur de nécrose des tumeurs- $\alpha$ : TNF- $\alpha$**

TNF- $\alpha$  est une protéine de 17 kDa, pouvant former des dimères et des trimères. Cette forme de 17 kDa provient du clivage protéolytique de son précurseur de 233 acides

aminés qui est associé à la membrane cellulaire. Ce clivage permet la libération de la forme mature du TNF- $\alpha$  au niveau extracellulaire, bien que le TNF- $\alpha$  soit déjà actif sous sa forme transmembranaire (Aggarwal et Vilcek, 1992). Deux récepteurs médiant les signaux induits par TNF- $\alpha$  ont été décrits : le type I (TNF-R55), présent chez de nombreux types de cellules; et le type II (TNF-R75), prédominant chez les monocytes et les lymphocytes (Gatanaga *et al.*, 1990). Le récepteur I induit des signaux cytotoxiques, antiviraux et est impliqué dans la prolifération des fibroblastes, alors que les signaux médiés par le récepteur II conduisent à la prolifération des thymocytes et des lymphocytes cytotoxiques (Tartaglia *et al.*, 1991). Les deux types de récepteurs peuvent être clivés par des protéases, générant ainsi des peptides solubles antagonistes pouvant lier le TNF- $\alpha$  (Nophar *et al.*, 1990). Ces peptides pourraient atténuer la libération du TNF- $\alpha$  aux sites de l'inflammation ou constituer des réservoirs pour le relargage lent du TNF- $\alpha$  bioactif.

L'expression de TNF- $\alpha$  a été détectée *in vivo* par RT-PCR et immunohistochimie chez les gliomes mais également chez les macrophages activés (Merlo *et al.*, 1993; Schneider *et al.*, 1992). De plus, comme l'IL-1, le TNF- $\alpha$  peut être produit par les cellules d'origine gliale sous stimulation au PMA ou au LPS (Bethea *et al.*, 1992; Nitta *et al.*, 1994). Les gliomes expriment également les récepteurs du TNF- $\alpha$  (Tada *et al.*, 1994). Chez la plupart des lignées cellulaires de gliomes, le TNF- $\alpha$  ne semble pas induire d'effets cytotoxiques (Rutka *et al.*, 1988), mais plutôt des effets mitogéniques, tels qu'observés chez les astrocytes (Bethea *et al.*, 1990; Lachman *et al.*, 1987; Selmaj *et al.*, 1990). Ceci pourrait conduire à l'astrogliose associée au gliome, ainsi qu'à différentes maladies neurodégénératives.

Le TNF- $\alpha$  est impliqué dans le chimiotactisme et l'extravasation des lymphocytes et des macrophages contribuant ainsi aux processus inflammatoires observés durant le développement du gliome. Son action se ferait selon les mêmes mécanismes induits par l'IL-1, étant donné que le TNF- $\alpha$  induit des activités biologiques et des signaux de transduction recoupant souvent ceux médiés par l'IL-1 (Schutze *et al.*, 1995; Last-Barney *et al.*, 1988). De plus, ces deux cytokines agissent souvent en synergie et sont capables de déclencher des processus de démyélinisation *in vivo* et *in vitro* (Giulian *et al.*, 1988; Selmaj et Raines, 1988; Robbins *et al.*, 1987). Ainsi, l'IL-1 et le TNF- $\alpha$  sont des facteurs

participant au développement du gliome, notamment en modulant l'expression de molécules impliquées dans la progression de la tumeur.

#### **1.4.2 Les cytokines immunosuppressives**

Les études portant sur les patients atteints de gliomes ont montré une suppression générale de l'immunité humorale et cellulaire, incluant des anergies cutanées et une diminution du nombre des lymphocytes T dans le sang, partiellement dues à la production de TGF- $\beta$  (Roszman *et al.*, 1991).

##### **Le "Transforming Growth Factor- $\beta$ " : TGF- $\beta$**

Des cinq isoformes décrits (TGF- $\beta_1$  à TGF- $\beta_5$ ), TGF- $\beta_1$  représente la forme ubiquitaire la plus abondante. Ce sont des polypeptides de 25 kDa, sécrétés sous forme de précurseurs de 400 acides aminés, qui deviennent actifs par clivage protéolytique (Schultz-Cherry et Murphy-Ullrich, 1993). TGF- $\beta$  peut se lier à au moins 10 récepteurs ou protéines membranaires différents. Les plus connus sont les récepteurs I, II, III, exprimés chez la plupart des types cellulaires. La transmission des signaux de transduction par TGF- $\beta$  nécessite une interaction entre les récepteurs I et II (Attisano *et al.*, 1993). Le récepteur III ("Betaglycan") ne peut induire de signaux en raison de l'absence de motifs dans son court domaine intracytoplasmique; par contre, il facilite l'accès de TGF- $\beta$  aux récepteurs I et II (Lopez-Casillas *et al.*, 1993).

La majorité des gliomes expriment *in vivo* et *in vitro* les isoformes TGF- $\beta_1$  et TGF- $\beta_2$ , ainsi que le micro-environnement du gliome, et particulièrement les cellules endothéliales en prolifération (Constam *et al.*, 1992; Bodmer *et al.*, 1989; Horst *et al.*, 1992). TGF- $\beta$  peut moduler directement, de façon autocrine, la prolifération du gliome (Jennings *et al.*, 1991). De plus, TGF- $\beta$  faciliterait indirectement le développement du gliome en inhibant la prolifération et l'activation des cellules du système immunitaire, telles que les lymphocytes T, NK et macrophages (Hannon et Beach, 1994; Tsunawaki *et al.*, 1988); et également en favorisant le dépôt des composants de la matrix extracellulaire (collagène, fibronectine), nécessaire à la néovascularisation (Merwin *et al.*, 1990; Roberts *et al.*, 1986). En outre, le traitement des gliomes avec des oligonucléotides antisens de TGF- $\beta_2$  réduit leur activité immunosuppressive, suggérant une utilisation en thérapie (Jachimczak

*et al.*, 1993). Ainsi, les différents isoformes de TGF- $\beta$  sont souvent antagonistes aux effets pro-inflammatoires médiés par l'IL-1 ou le TNF- $\alpha$ .

### **1.5 Les thérapies**

Les thérapies actuelles conventionnelles concernant le gliome consistent en la résection chirurgicale de la tumeur suivie d'un traitement en radiothérapie et/ou chimiothérapie. Malheureusement, ces traitements ont une efficacité limitée. En effet, les gliomes deviennent rapidement résistants aux agents chimiothérapeutiques, notamment en exprimant des protéines transmembranaires ayant pour fonction d'expulser les drogues anti-cancéreuses hors de la cellule tumorale (Abe *et al.*, 1994; Bradley *et al.*, 1988). Aussi, d'autres voies thérapeutiques, comme l'immunothérapie, ont été développées. L'utilisation de cytokines, telles que l'IL-2 et de l'IFN- $\gamma$  visant à stimuler le système immunitaire, a permis une atténuation de la croissance du gliome lorsqu'elles sont produites localement à l'aide de vecteurs rétroviraux. Malgré cet effet bénéfique, ces cytokines induisent des effets secondaires importants, notamment des oedèmes cérébraux (Tjuvajev *et al.*, 1995). Récemment, la découverte de la surexpression de récepteurs du PDGF et de l'IL-13 par les gliomes a permis de nouvelles approches thérapeutiques. Ainsi, l'administration de nouvelles molécules antagonistes du PDGF chez la souris *nude* ont induit un retard dans la prolifération de 50% des gliomes, injectés sous-cutané (Blaskovich *et al.*, 2000; Laird *et al.*, 2000). De plus, des tumeurs d'origine gliale, injectées sous-cutané chez des souris athymiques, régressent dans 50% des cas, lorsque celles-ci sont traitées avec de l'IL-13 chimérique, couplée à une toxine (Hussain *et al.*, 2001; Debinski *et al.*, 1998). Malgré ces nouveaux développements, il demeure important de mieux comprendre le développement du gliome afin de déterminer de nouvelles cibles thérapeutiques et d'envisager des bi- ou tri-thérapies.

### **1.6 Les modèles d'études**

Le modèle le plus utilisé, concernant l'étude des gliomes, est la lignée cellulaire de rat C6. Cette lignée a été établie à partir de glioblastomes induits par traitement au N-nitrosylmethylurée chez les rats Wistar (Benda *et al.*, 1968). La neurobiologie de ces cellules d'origine astrocytaire, bien caractérisée par les marqueurs S-100 et GFAP ("Glial

Fibrillary Acidic Protein") (Herschman *et al.*, 1978), a été largement étudiée. L'implantation des cellules C6 dans le cerveau de rat ou de souris immuno-déficientes permet le développement de glioblastomes, histologiquement similaires à ceux retrouvés chez l'homme (San Galli *et al.*, 1989; Kaye *et al.*, 1986). D'autres modèles *in vivo* sont maintenant disponibles dont notamment des souris transgéniques surexprimant les oncogènes *v-src* et *p21ras* sous le contrôle du promoteur GFAP, qui développent spontanément des gliomes d'origine astrocytaire (Ding *et al.*, 2001; Weissenberger *et al.*, 1997). Les cellules C6 ont également la capacité d'envahir les tissus du système nerveux central dans des modèles *in vitro*, par sécrétion de métalloprotéinases (MMPs) capables de dégrader la matrice extracellulaire (Paganetti *et al.*, 1988). Elles constituent donc un bon modèle d'étude du développement du gliome.

## **2 .LES ENZYMES DE DÉGRADATION DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE : MMPs**

Les MMPs ("matrix metalloproteinases") sont des endopeptidases, dépendantes du zinc et du calcium, capables de dégrader les différents composants de la matrice extracellulaire comme le collagène, la fibronectine et la vitronectine (Krane *et al.*, 1996; Homandberg et Hui, 1996; Imai *et al.*, 1995). Elles participent au remodelage de la matrice extracellulaire nécessaire à certains processus physiologiques, tels que l'involution utérine, la résorption des os et la guérison de blessures (Tryggvason *et al.*, 1993). Les MMPs sont également impliquées dans plusieurs maladies dégénératives et sont associées au développement de nombreux cancers (Lombardi *et al.*, 1993; Declerck et Imren, 1994). En effet, la surexpression de ces enzymes par les cellules cancéreuses permet leur migration à travers la matrice facilitant ainsi l'invasion tumorale et le développement de métastases (Kahari et Saarialho-Kere, 1999; Chambers et Matrisian, 1997).

### **2.1 Classification et structure des MMPs**

La famille des MMPs est constituée d'au moins 24 membres, classés en 4 catégories selon leur structure primaire et leur spécificité de substrat (Tableau 1) :

- les collagénases (MMP-1, MMP-8, MMP-13 et MMP-18)
- les stromélysines (MMP-3, MMP-7, MMP-10, MMP-11, MMP-12 et MMP-26)
- les gélatinases (MMP-2 et MMP-9)
- les MMP membranaires (MT-MMPs) (MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP, MT4-MMP, MT5-MMP et MT6-MMP)
- MMPs non classées (MMP-19/MMP-21, MMP-22, MMP-20, MMP-23 et MMP-28)

La structure générale des MMPs comporte un peptide signal, un domaine pro-peptide, un domaine catalytique comprenant un site hautement conservé de liaison au zinc HEXXHXXGXXH et un domaine homologue à l'hémopexine (Fig.2) (Cockett *et al.*, 1994). Le domaine pro-peptide, situé dans la portion N-terminale des MMPs, est formé de 77 à 87 résidus et comprend une séquence conservée PRCG(V/N)PD. Cette séquence

maintient l'enzyme sous sa forme latente inactive, puisqu'elle bloque l'entrée du site catalytique (Sanchez-Lopez *et al.*, 1988), mais est absente chez les MT-MMPs et la stromélysine-3 (MMP-11) (Nagase et Woessner, 1999). Le site catalytique, chez les gélatinases MMP-2 et MMP-9, contient trois insertions homologues à la fibronectine de type II (Wilhelm *et al.*, 1989). Ces insertions facilitent la liaison des gélatinases aux protéines de la matrice extracellulaire (Steffensen *et al.*, 1995). Le domaine C-terminal homologue à l'hémopéxine est également requis lors des interactions de l'enzyme avec ses substrats de la matrice (Wallon et Overall, 1997). Cette portion C-terminale peut également contenir un domaine transmembranaire hydrophobique servant à ancrer certaines MMPs (MT-MMPs : "Membrane-Type MMPs") présentes à la surface cellulaire (Seiki, 1999).

### **2.1.1 Les collagénases**

La famille des collagénases regroupe chez les eucaryotes, MMP-1 (collagénase 1; E.C. 3.4.24.7), MMP-8 (collagénase 2; E.C. 3.4.24.34), MMP-13 (collagénase 3; E.C. non déterminée) et MMP-18 (collagénase 4; E.C. non déterminée). Les collagénases se distinguent des autres MMPs par leur capacité à dégrader des régions à structure hélicoïdale triple présentes chez divers types de collagène. La collagénase interstitielle (MMP-1) fut la première à être identifiée lors de la résorption tissulaire se produisant durant la métamorphose de la queue du têtard (Nagai *et al.*, 1966). Alors que MMP-1 est synthétisée par plusieurs types cellulaires, MMP-8 se retrouve presque exclusivement chez les neutrophiles. En effet, MMP-8 s'accumule au niveau des granules cytoplasmiques durant la différenciation des cellules myéloïdes (Murphy *et al.*, 1977; Bainton *et al.*, 1971). MMP-8 est également exprimée par les chondrocytes du cartilage et pourrait jouer un rôle dans le développement de l'arthrite au niveau des os (Cole *et al.*, 1996).

MMP-13 a été plus récemment isolée à partir d'un carcinome mammaire et montre une hydrolyse préférentielle pour le collagène de type II (Freije *et al.*, 1994). La dégradation efficace de la gélatine par MMP-13, comparativement à MMP-1 et MMP-8, est probablement due aux similarités de séquences entre les sites catalytiques de MMP-13 et des gélatinases MMP-9 et MMP-2 (Knauper *et al.*, 1996).

La séquence de MMP-18 a été identifiée par recherche d'homologie de séquences EST ("expressed sequence tags") (Cossins *et al.*, 1996), mais son implication dans les processus physiologiques et pathophysiologiques demeure inconnue.

Ainsi, la capacité des collagénases de dégrader des régions à structure hélicoïdale triple de collagène suggère une participation précoce de ces enzymes dans les processus de dégradation de la matrice extracellulaire, avant l'hydrolyse complète du collagène par les gélatinases.

### 2.1.2 Les gélatinases

Les gélatinases comprennent MMP-2 (72 kDa; E.C. 3.4.24.24) et MMP-9 (92 kDa; E.C. 3.4.24.35), reconnues pour leur capacité à dégrader le collagène dénaturé (gélatine), laissant supposer que ces 2 enzymes sont impliquées dans les dernières étapes du processus de dégénération de la matrice extracellulaire. Les gélatinases peuvent également cliver le collagène de type IV et ce sont les seules MMPs capables de digérer le collagène de type V (Nagase *et al.*, 1991). Cette dernière activité provient d'insertions de type fibronectine situées dans le site catalytique des gélatinases (O'Farrell et Pourmotabbed, 2000). Bien que ces 2 enzymes ont des structures similaires, elles possèdent certaines différences :

- le mode d'activation est membranaire pour MMP-2; extracellulaire pour MMP-9
- l'expression est constitutive pour MMP-2 mais inductible pour MMP-9
- un domaine collagène de type V existe chez MMP-9, mais pas chez MMP-2.

Les gélatinases ont un rôle physiologique important au cours de l'embryogénèse. En effet, l'expression de MMP-9 par les cellules trophoblastes géantes est critique durant la croissance du blastocyste murin et durant les étapes précoces de son implantation *in vivo* (Alexander *et al.*, 1996; Das *et al.*, 1997). De plus, bien que les souris déficientes en MMP-9 n'ont pas démontré de phénotype particulier, elles ont montré un retard de la croissance des os longs et un épaissement de l'ossification (Vu *et al.*, 1998). Ces souris sont aussi résistantes à une maladie auto-immune de l'épiderme, déclenchée expérimentalement. Cette protection provient probablement de la perte de l'expression de MMP-9 chez les neutrophiles (Liu *et al.*, 1998).

### 2.1.3 Les stromélysines

Les stromélysines furent originellement décrites comme dérivant des cellules stromales. En effet, la stromélysine-1 (MMP-3; E.C. 2.4.24.17) fut isolée à partir de surnageants de culture cellulaire de fibroblastes stimulés au PMA, grâce à sa capacité à dégrader la caséine (Chin *et al.*, 1985). La distribution tissulaire de MMP-3 est très restreinte, et l'enzyme est surtout produite par les cellules stromales, telles que les cellules endothéliales, musculaires et fibroblastiques, mais elle peut être aussi sécrétée par les macrophages (Chin *et al.*, 1985). MMP-3 pourrait agir comme un promoteur de tumeurs mammaires, étant donné que des souris transgéniques surexprimant MMP-3 développent spontanément des lésions malignes au niveau des glandes mammaires (Sternlicht *et al.*, 1999). Elle est également capable de convertir les pro-MMPs, telle que pro-MMP-9 en MMPs actives (Ogata *et al.*, 1992).

La présence d'une bande supplémentaire lors d'analyses de type Southern du gène de MMP-3 a permis d'isoler et de cloner la stromélysine-2 (MMP-10; E.C. 3.4.24.22) (Breathnach *et al.*, 1987). La différence la plus significative entre MMP-3 et MMP-10 se situe au niveau de leur distribution tissulaire et la régulation de leur expression. Effectivement, l'expression de MMP-10 se retrouve en grande quantité chez les cellules épithéliales du petit intestin (Madlener et Werner, 1997) ainsi que chez certaines populations cellulaires, comme les lymphocytes T et les kératinocytes (Conca et Willmroth, 1994; Windsor *et al.*, 1993). De plus, l'expression de MMP-10 semble peu sensible aux agents inflammatoires, tels que l'IL-1 ou le TNF- $\alpha$ , contrairement à MMP-3 (Brinckerhoff *et al.*, 1992).

La matrilysine (MMP-7; E.C. 3.4.24.23) représente la plus petite des MMPs car elle ne possède pas le domaine hémapexine commun aux autres MMPs (Gaire *et al.*, 1994). Son expression est élevée chez les cellules épithéliales ainsi que chez les tumeurs d'origine épithéliale (Rodgers *et al.*, 1993). MMP-7 est impliquée dans le développement des cancers de l'intestin (Wilson *et al.*, 1997) et également dans la défense anti-microbienne au niveau du petit intestin (Wilson *et al.*, 1999). De plus, MMP-7 possède une large gamme de substrats en dehors des protéines de la matrice extracellulaire. Par exemple, elle peut cliver plusieurs protéines membranaires, telles que le pro-TNF- $\alpha$  et le pro-uPA ("Urokinase-type Plasminogen Activator") (Gearing *et al.*, 1994; Wilson et Matrisian,

1996). Récemment, il a été démontré que MMP-7 pouvait cliver FasL (Powell *et al.*, 1999), et que ce clivage protège les cellules tumorales de l'effet cytotoxique des agents chimiothérapeutiques (Mitsiades *et al.*, 2001).

La stromélysine-3 (MMP-11; E.C. non déterminée) fut quant à elle identifiée par clonage différentiel d'ARN messagers isolés de tumeurs mammaires bénignes et malignes (Basset *et al.*, 1990). Contrairement à MMP-3 et MMP-10, la spécificité de cette enzyme est peu connue, étant donné qu'elle est incapable de dégrader les protéines de la matrice extracellulaire. Cependant l'IGFBP-1 ("Insulin-like growth factor binding protein") pourrait représenter un des substrats physiologiques de MMP-11 (Manes *et al.*, 1997). De plus, il a été récemment démontré que MMP-11 est impliquée dans la survie des cellules cancéreuses. En effet, des tumeurs syngéniques implantées chez des souris déficientes en MMP-11 démontrent un taux de mortalité élevé en cellules cancéreuses (Boulay *et al.*, 2001), suggérant un rôle antagoniste de MMP-11 dans l'apoptose (Wu *et al.*, 2001).

MMP-12 est une MMP uniquement produite par les macrophages qui dégrade, non seulement l'élastine, mais aussi le collagène de type IV, la fibronectine et la laminine (Chandler *et al.*, 1996). Le rôle fonctionnel de MMP-12 a été démontré chez des souris déficientes en MMP-12 où les macrophages péritonéaux ne peuvent pénétrer la matrice extracellulaire (Shipley *et al.*, 1996). De plus, MMP-12 est impliquée dans les lésions athérosclérotiques et l'emphysème (Curci *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2000).

La matrilysine-2 (MMP-26) est, comme la matrilysine, principalement exprimée chez les cellules d'origine épithéliales et ne possède pas de domaine hémapéxine, mais elle se distingue des autres MMPs par un motif "cysteine switch" inhabituel : PHCGVPD (Uria et Lopez-Otin, 2000). La surexpression de cette enzyme par des tumeurs malignes d'origine épithéliale, ainsi que son large spectre de substrats, suggèrent que la matrilysine-2 pourrait jouer un rôle dans le remodelage de tissus associé à la progression de la tumeur (Marchenko *et al.*, 2001).

Les stromélysines, en possédant une large gamme de substrats, sont donc probablement impliquées dans de nombreux processus physiologiques. Elles jouent également un rôle important lors de l'invasion tumorale, non seulement en dégradant les protéines de matrice extracellulaire, mais aussi en activant d'autres MMPs, dont notamment les gélatinases.

#### **2.1.4 Les MT-MMPs**

Les membres de ce sous-groupe ont été récemment clonés à l'aide de stratégies basées sur l'étude d'homologies de séquence nucléotidiques entre les différentes MMPs. Les MT-MMPs se distinguent par la présence d'un domaine transmembranaire en C-terminal leur permettant ainsi de s'ancrer au niveau de la membrane cytoplasmique (Seiki, 1999; Will et Hinzmann, 1995). Il existe six membres distincts, MT1-MMP à MT4-MMP (MMP-14 à -17, respectivement), MT5-MMP (MMP-24) et MT6-MMP (MMP-25). MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-24 et MMP-25 sont capables de recruter et d'activer pro-MMP-2 au niveau de la membrane cellulaire, suggérant un rôle important dans le potentiel invasif des cellules tumorales (Sato *et al.*, 1994; Hotary *et al.*, 2000; Pei, 1999; Velasco *et al.*, 2000). De plus, elles sont également capables de dégrader les composants de la matrice extracellulaire, tels que le collagène de type I et IV, la fibronectine et les protéoglycans (d'Ortho *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1999; English *et al.*, 2001). Bien que le rôle physiologique de MMP-14 soit bien caractérisé dans le développement des tissus osseux (Holmbeck *et al.*, 1999), celui de MMP-17 demeure peu documenté. En effet, cette MT-MMP est incapable d'activer pro-MMP-2 et possède peu d'activité de dégradation des protéines de la matrice extracellulaire; par contre, elle hydrolyse de façon efficace le pro-TNF- $\alpha$  pour le convertir en TNF- $\alpha$  actif, ce qui suggère la participation de MMP-17 dans l'inflammation (English *et al.*, 2000).

La plupart des MT-MMPs sont donc capables d'activer pro-MMP-2 au niveau membranaire, favorisant ainsi l'invasion tumorale.

#### **2.1.5 Les MMPs non classées**

Ce sont des MMPs nouvellement identifiées qui possèdent des particularités structurales et fonctionnelles distincts des sous-groupes déjà caractérisés. Par exemple, MMP-19 et son homologue chez la grenouille *Xenopus* (MMP-21 ou XMMP) représentent, avec MMP-28, les membres d'un nouveau sous-groupe de MMPs qui contiennent dans leur pro-domaine un motif "cysteine switch" inhabituel et des insertions uniques de résidus glutamine et cystéine proches du site catalytique (Stracke *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 1997; Marchenko et Strongin, 2001). Comme MMP-19 et XMMP, CMMP (MMP-22), clonée chez le poulet, possède également un résidu cystéine unique conservé dans son site

catalytique, bien que sa séquence protéique ressemble plus à la famille des collagénases (Yang et Kurkinen, 1998). MMP-20 est une MMP dont l'expression est restreinte aux tissus dentaires et joue probablement un rôle central dans les processus de formation de l'émail des dents, grâce à sa capacité de dégrader l'amélogénine, la protéine majeure de la matrice de l'émail (Llano *et al.*, 1997). CA-MMP ("Cystein-Array"-MMP; MMP-23) est la seule MMP possédant un domaine riche en cystéine et un domaine homologue aux immunoglobulines en C-terminal (Velasco *et al.*, 1999). De plus, le pro-domaine de MMP-23 ne contient pas de cystéine, ce qui suggère un mécanisme d'activation différent des autres MMPs (Pei *et al.*, 2000).

*N.B.* : La nomenclature des MMPs comprend quelques incohérences, notamment en ce qui a trait à MMP-4 (Overall et Sodek, 1987) et MMP-6 (Wilhelm *et al.*, 1993), reconnues ultérieurement comme étant identiques à MMP-3.

## **2.2 L'activation des MMPs**

Sauf exception de la stromélysine-3 et des MT-MMPs, les MMPs sont sécrétées sous forme de précurseurs latents (zymogènes) et nécessitent une activation par protéolyse de type "cysteine switch" au niveau extracellulaire. Le clivage protéolytique partiel du pro-peptide, lié au site catalytique par l'intermédiaire d'une cystéine, dissocie le lien covalent entre ce résidu et le site actif. Cette dissociation permet l'exposition du substrat au site catalytique de l'enzyme. Les MMPs sont activées de façon ordonnée dans le milieu extracellulaire, soit par un autre membre des MMPs ou soit par le système d'activation du plasminogène; ce qui aboutit à l'activation de tout un réseau de protéases extracellulaires (Murphy *et al.*, 1999). Par exemple, une des voies d'activation les mieux caractérisées concerne l'interaction entre les MT-MMPs et pro-MMP-2 : contrairement aux autres MMPs qui sont activées à l'extérieur de la cellule, les MT-MMPs (et également la stromélysine-3) sont activées au niveau intracellulaire; cette activation est due au clivage de la séquence conservée RXKR, située entre le pro-domaine et le domaine catalytique, par des protéases "furin-like" associées à l'appareil de Golgi (Pei et Weiss, 1995). Les MT-MMPs s'ancrent ensuite à la membrane extracellulaire où elles vont lier et activer MMP-2. Cette activation de MMP-2 par MT-MMP permet de diriger une activité protéolytique dans des régions ciblées de l'espace extracellulaire (Sato *et al.*, 1997;

Murphy *et al.*, 1999). De plus, l'activation de MMP-2 peut induire l'activation d'autres MMPs, comme MMP-9 (Fridman *et al.*, 1995). L'activation des MMPs est donc un phénomène complexe, nécessitant une cascade d'activation d'enzymes protéolytiques.

En plus de l'interaction des MMPs entre elles nécessaire à l'activation de ces enzymes, leurs processus d'activation sont étroitement contrôlés par les inhibiteurs naturels des MMPs : les TIMPs ("Tissue Inhibitor of MMPs").

### **2.3 Les inhibiteurs de MMPs : TIMPs**

L'activité protéolytique des MMPs peut être inhibée par des inhibiteurs non-spécifiques de protéases, tels que l' $\alpha$ 2-macroglobuline et l' $\alpha$ 1-antitrypsine, et par des inhibiteurs spécifiques des MMPs (TIMPs) (Kahari et Saarialho-Kere, 1999). D'une façon générale, les TIMPs sont sécrétés en même temps que les MMPs. La famille des TIMPs est constituée de quatre protéines reliées structurellement (TIMP-1, -2, -3 et -4), possédant 12 cystéines conservées qui forment six ponts disulfure (Williamson *et al.*, 1990). Les TIMPs inhibent l'activité enzymatique de toutes les MMPs (sauf MT1-MMP, qui est inhibée par TIMP-2 et TIMP-3 mais pas TIMP-1) en formant des complexes stoechiométriques non covalents avec le site de liaison du zinc, présent dans le site catalytique et nécessaire à l'activité des MMPs (Gomez *et al.*, 1997; Will *et al.*, 1996). De plus, les TIMPs peuvent inhiber l'activation catalytique des pro-MMPs, les différents TIMPs ayant des capacités inhibitrices préférentielles envers différentes pro-MMPs. Par exemple, TIMP-1 et TIMP-3 forment des complexes préférentiels avec pro-MMP-9, tandis que TIMP-2 et TIMP-4 montrent une meilleure affinité pour pro-MMP-2 (Goldberg *et al.*, 1989; Goldberg *et al.*, 1992). Paradoxalement, TIMP-2 est impliqué dans l'activation de pro-MMP-2 en agissant comme protéine adaptatrice entre pro-MMP-2 et MT1-MMP pour former un complexe ternaire (Seiki, 1999). Généralement, l'expression de TIMP-1 et TIMP-3 est inductible par des cytokines ou facteurs de croissance, tandis que l'expression de TIMP-2 et TIMP-4 est constitutive (Curran et Murray, 2000). L'activité protéolytique nette des MMPs dépend donc de l'équilibre du rapport MMPs/TIMPs.

En plus d'inhiber l'activité des MMPs, les TIMPs induisent des activités cellulaires variées, indépendantes de leur capacité à contrecarrer l'action des MMPs (Brew *et al.*,

2000). En effet, lorsque TIMP-1 a été cloné pour la première fois (Docherty *et al.*, 1985), il a été montré comme étant identique à un facteur potentialisant l'activité érythroïde (Gasson *et al.*, 1985). De plus, TIMP-1 possède une activité mitogénique envers les kératinocytes, ainsi que d'autres types cellulaires (Bertaux *et al.*, 1991; Hayakawa *et al.*, 1992), et a été récemment localisé au niveau du noyau cellulaire des fibroblastes comme s'accumulant en phase S (Zhao *et al.*, 1998). TIMP-2 a été également identifié comme un facteur favorisant la croissance de nombreuses lignées cellulaires (Stetler-Stevenson *et al.*, 1992; Hayakawa *et al.*, 1994). D'un autre côté, la surexpression de TIMP-1, TIMP-2 et TIMP-3 peut réduire la croissance des cellules tumorales (Edwards *et al.*, 1996; Baker *et al.*, 1999; Valente *et al.*, 1998). De plus, TIMP-2, mais pas TIMP-1, inhibe la croissance des cellules endothéliales humaines, induite par bFGF (Murphy *et al.*, 1993). Parmi les quatre TIMPs, TIMP-3 est unique car on le retrouve étroitement associé à la matrice extracellulaire (Pavloff *et al.*, 1992). Cette interaction se fait par le domaine C-terminal de l'inhibiteur. Une simple mutation dans ce domaine induit la dystrophie de Sorsby, maladie entraînant une perte irréversible de la vision (Langton *et al.*, 1998). De plus, TIMP-3 est le seul membre des TIMPs pouvant inhiber l'activité des enzymes TACE ("TNF- $\alpha$  converting enzyme"), impliquées dans l'activation membranaire de TNF- $\alpha$  (Amour *et al.*, 1998). Des études récentes ont également montré que la surexpression de TIMP-3 induit l'apoptose de plusieurs lignées cellulaires cancéreuses, ainsi que des cellules vasculaires du muscle lisse (Smith *et al.*, 1997; Baker *et al.*, 1998). TIMP-4, quant à lui, est uniquement exprimé au niveau du tissu cardiaque chez l'homme (Greene *et al.*, 1996) et peut bloquer l'activation de pro-MMP-2 par MT1-MMP (Hernandez-Barrantes *et al.*, 2001).

Toutes ces observations indiquent que les TIMPs sont des protéines multi-fonctionnelles. Malgré les effets secondaires des TIMPs, ces derniers semblent réduire l'invasion tumorale chez différents modèles *in vivo*, probablement grâce à leur inhibition de l'activité MMP (Gomez *et al.*, 1997). Malheureusement, ils ne peuvent être utilisés en thérapie à cause de leur court temps de demi-vie (DeClerck et Imren, 1994).

## 2.4 MMPs et cancer

La progression d'une tumeur maligne dépend de l'acquisition de plusieurs capacités, telles qu'une croissance continue et autonome des cellules tumorales, la possibilité d'échapper à l'apoptose, de développer une réponse angiogénique et d'envahir les tissus environnants la tumeur ou d'autres organes (métastase) (Hanahan et Weinberg, 2000). L'invasion tumorale et la formation de métastases sont les facteurs principaux contribuant à la morbidité et la mortalité du cancer. Il est intéressant de noter que l'angiogénèse est un processus qui partage un nombre de similarités fonctionnelles avec l'invasion tumorale. Ainsi, ces deux processus apparaissent être le résultat de l'équilibre local entre des régulateurs positifs et négatifs, tels que les MMPs vs les TIMPs (Liotta *et al.*, 1991).

#### **2.4.1 MMPs et invasion tumorale**

La protéolyse de la matrice extracellulaire est une étape cruciale dans le mécanisme de l'invasion tumorale. Pour que les cellules puissent envahir et se disséminer, elles doivent être capables de pénétrer les barrières du tissu connectif, telles que la membrane basale, la matrice provisoire ou le stroma interstitiel, qui entourent les tumeurs et existent dans les vaisseaux sanguins. Au cours de la fin des années 1970, des chercheurs ont noté l'association entre différentes activités protéolytiques, incluant des protéases à activité neutres et lysosomales, et le comportement invasif des cellules tumorales (Drewa *et al.*, 1978; Poole *et al.*, 1978). Ces protéases sont maintenant connues pour dégrader un large spectre de protéines composant la matrice extracellulaire et appartiennent en majorité à la famille des MMPs. La matrice extracellulaire est une structure dynamique constamment remodelée (Werb, 1997) qui consiste en un réseau dense de collagènes, laminines et protéoglycans, séparés par d'autres composants mineurs. Par exemple, les membranes basales sont composées de feuillets de collagène de type IV et de laminine qui séparent les tissus en différents compartiments. Durant la transition d'une tumeur bénigne à invasive, des changements apparaissent dans l'intégrité de la membrane basale sous-épithéliale. En effet, les carcinomes invasifs se caractérisent par la perte de cette membrane autour des cellules tumorales invasives (Stetler-Stevenson *et al.*, 1993). Plusieurs études se sont concentrées sur les interactions entre les cellules tumorales et la matrice extracellulaire, en particulier la membrane basale sous-épithéliale. De ces études, un modèle de processus d'invasion cellulaire a été proposé et il consiste en trois étapes :

- l'attachement de la cellule à la membrane basale
- création d'imperfections par protéolyse de la membrane basale
- migration de la cellule à travers ces imperfections (Liotta *et al.*, 1991).

Il est maintenant reconnu que ces trois étapes décrivent les interactions des cellules invasives avec tous les types de matrice extracellulaire, et non pas uniquement avec la membrane basale.

Il existe de nombreuses études montrant l'augmentation de l'expression des MMPs dans les tissus cancéreux comparativement aux tissus correspondants normaux ou adjacents à la tumeur. Les premières indications de l'importance des MMPs dans la biologie des tumeurs proviennent d'une étude concernant une métalloprotéinase sécrétée par une lignée cellulaire de mélanome, et pouvant dégrader le collagène de la membrane basale (Liotta *et al.*, 1979). De nombreuses expériences ont, par la suite, démontré une corrélation positive entre l'expression des MMPs et le pouvoir invasif et métastatique des cellules tumorales (Stetler-Stevenson *et al.*, 1993). Ainsi, dans de nombreux types de cancers, il existe une expression différentielle des MMPs par les cellules tumorales et également par les cellules du stroma entourant la tumeur. Bien qu'une forte expression des gélatinases soient généralement associées au phénotype malin de différents cancers, aucun profils d'expressions de MMPs correspondants à certains types de cancers humains n'ont pu être définis (Nelson *et al.*, 2000).

L'hypothèse selon laquelle l'augmentation de l'expression des MMPs est responsable de l'invasion cellulaire a été testée dans différents modèles expérimentaux. Par exemple, l'invasion des cellules de fibrosarcomes HT-1080 à travers une membrane basale reconstituée (Matrigel) augmente en ajoutant MMP-2 active, et est inhibée par l'addition de TIMP-2 ou des chélateurs de zinc (Albini *et al.*, 1991). Les résultats *in vitro* sont supportés par les expériences *in vivo*, qui utilisent des cellules transfectées. En effet, la transfection de l'ADNc de MMP-9 de lignées cellulaires immortalisées embryonnaires non-métastatiques leur confère la capacité de développer des métastases (Bernhard *et al.*, 1994). De la même façon, des cellules de carcinome de la vessie, MYU3L, transfectées avec MMP-2, possèdent un potentiel métastatique élevé; alors que la transfection de TIMP-2 dans la lignée cellulaire hautement métastatique LMC19 réduit son pouvoir invasif (Kawamata *et al.*, 1995). De plus, l'inhibition de l'expression de TIMP-1 à l'aide

d'antisens chez la lignée fibroblastique NIH 3T3 rend ces cellules plus tumorigéniques, invasives et métastatiques (Khokha *et al.*, 1989), lorsque injectées chez la souris *nude*. Bien que l'implication des MMPs soit maintenant établie lors de l'invasion tumorale, leur action ne semble pas se limiter à ce processus. En effet, de récentes études ont montré qu'elles pouvaient jouer un rôle au niveau de l'initiation, de la prolifération, de la migration et de l'angiogénèse tumorale.

#### **2.4.2 MMPs : enzymes pléiotropiques**

La première étude suggérant le rôle des MMPs dans l'initiation tumorale a démontré que l'expression de MMP-3 sous sa forme active au niveau de l'épithélium des glandes mammaires, était suffisante pour induire le développement de tumeurs invasives "mesenchymal-like", et que cette transition était bloquée par l'expression de TIMP-1 (Sternlicht *et al.*, 1999). Ceci implique donc que MMP-3 agit comme un promoteur naturel de tumeurs mammaires (Sternlicht *et al.*, 2000). De plus, la tumorigénèse intestinale, induite par l'altération de l'allèle *Apc* ("Adenomatous polyposis coli"), est supprimée chez des souris déficientes en MMP-7 (Wilson *et al.*, 1997). La perte de la fonction *Apc* induit une augmentation du taux de  $\beta$ -caténine, une protéine induisant l'activation transcriptionnelle de gènes associée à la progression de la tumeur. Des études subséquentes ont montré que la  $\beta$ -caténine induit une augmentation de l'expression de MMP-7 au niveau de la muqueuse colorectale (Crawford *et al.*, 1999). L'utilisation de la vidéomicroscopie intravitale a également suggéré que les MMPs sont importantes dans la création et le maintien de l'environnement qui soutient l'initiation et la croissance des tumeurs primaires et métastatiques. Ces mécanismes pourraient être dus au relarguage, par les MMPs, des facteurs de croissance séquestrés dans la matrice extracellulaire (Chambers *et al.*, 1995). Une étude récente sur le récepteur RAGE ("receptor for advanced glycation end products") supporte cette hypothèse (Taguchi *et al.*, 2000). En effet, le blocage de RAGE induit une diminution de la croissance et des métastases de tumeurs implantées ou se développant spontanément chez la souris. L'inhibition de l'interaction de RAGE a entraîné une suppression de l'activation de signaux de transduction impliqués dans la croissance, l'invasion de la tumeur et également dans l'expression des MMPs. De plus, l'utilisation d'animaux transgéniques a démontré que

l'altération de l'équilibre MMP/TIMP *in vivo*, en faveur de l'activité de TIMP-1, peut bloquer la prolifération néoplasique des carcinomes hépato-cellulaires, induits par l'antigène T du virus SV40 (Martin *et al.*, 1999). Cet effet de TIMP-1 est du à l'inhibition directe du clivage de IGFBP-3 par les MMPs, ce qui empêche la libération de IGF II ("Insulin Growth Factor II"), un facteur de croissance important pour le développement de ces carcinomes. Bien qu'ils puissent aussi avoir des effets directs sur la prolifération cellulaire de façon MMP-indépendante (*cf* 2.3), les TIMPs peuvent donc inhiber la croissance de la tumeur par blocage de l'activité MMP. A ce titre, ils agissent donc comme des gènes suppresseurs de tumeurs.

L'activité des MMPs peut également influencer la migration des cellules. Ainsi, les MMPs peuvent se lier aux intégrines, molécules d'adhésion importantes dans les interactions cellule-protéines de la matrice extracellulaire et requises lors de la migration des cellules (Sheetz *et al.*, 1998). Par exemple, MMP-2 se lie à l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  par son domaine hémopexine (Brooks *et al.*, 1996), ce qui modifie l'attachement de la cellule à la matrice extracellulaire. Ces interactions MMP-intégrine auraient pour but de localiser les MMPs à des sites proches d'importants ligands de la matrice extracellulaire qui faciliteraient la migration et l'invasion cellulaire. Une influence plus directe des MMPs sur la migration cellulaire a été démontré en utilisant un modèle de cellules épithéliales mammaires. En effet, MMP-2, mais pas MMP-9, clive la chaîne  $\gamma_2$  de la laminine-5 et révèle un site cryptique présent sur la chaîne  $\alpha_3$ , site qui possède des propriétés chimiotactiques et qui stimule la migration des cellules (Giannelli *et al.*, 1997). De l'activité des MMPs peut donc découler la génération de néo-épitopes ou de sites cryptiques dans la matrice extracellulaire, ce qui peut profondément influencer le comportement de la cellule. Ce concept de sites cryptiques semble également s'appliquer aux processus angiogéniques.

Le développement de nouveaux vaisseaux sanguins est un processus qui requiert la prolifération et la migration des cellules endothéliales, ainsi qu'un remodelage de la matrice extracellulaire. Les MMPs font donc partie intégrante de l'angiogénèse. En effet, l'induction des développements vasculaires par des tumeurs est considérablement réduite chez les souris déficientes en MMP-2 (Itoh *et al.*, 1998). Paradoxalement, l'activité MMP est actuellement considérée comme l'activité protéolytique principalement responsable de

la génération de puissants inhibiteurs de l'angiogénèse, tels que l'angiostatine. On sait maintenant que l'angiostatine provient du clivage du plasminogène par les MMPs, incluant MMP-3, MMP-7, MMP-9 et MMP-12 (Cornelius *et al.*, 1998; Patterson et Sang, 1997). La génération de l'angiostatine par MMP-12 entraîne une inhibition de la prolifération des cellules endothéliales *in vitro* (Dong *et al.*, 1997). L'angiogénèse peut donc être modulée de façon positive et négative par les MMPs.

Les rôles des MMPs dans la progression de la tumeur et l'angiogénèse semblent plus complexes que le premier concept où la fonction primaire des MMPs était la destruction des barrières de la matrice extracellulaire. Il est maintenant évident que les MMPs peuvent être impliquées dans les premières étapes de la tumorigénèse. De plus, la modulation de l'adhésion, de la migration cellulaire et de la révélation de sites cryptiques dans la matrice extracellulaire par les MMPs, ont de profonds effets sur le comportement de la cellule, dans des conditions normales et pathologiques. Ces nouveaux rôles des MMPs pourraient être responsables des effets secondaires obtenus lors de thérapies anti-cancéreuses utilisant des inhibiteurs synthétiques des MMPs. Ces molécules inhibent l'activité d'un large spectre de MMP (Hidalgo et Eckhardt, 2001). Il est probable que, dans le futur, des inhibiteurs synthétiques plus sélectifs pour des signaux de transduction distincts impliqués dans l'expression des différentes MMPs par les tumeurs ou les cellules endothéliales, émergeront comme nouveaux agents anti-cancéreux. Cependant, il est nécessaire d'identifier des MMPs spécifiques, ainsi que leurs fonctions pour les désigner comme cibles thérapeutiques potentielles. Par exemple, MMP-9 semble jouer un rôle important dans le développement du gliome.

### **2.4.3 MMP-9 et le gliome**

Au développement du gliome s'associe un déséquilibre de l'expression MMPs/TIMPs en faveur des MMPs. En effet, les tissus du cerveau provenant des stades les plus avancés du gliome (stades III-IV), démontrent une activité gélatinolytique supérieure en zymographie par rapport aux stades I-II et aux tissus du cerveau normal (Nakagawa *et al.*, 1994). Bien que MMP-2 soit présente, cette activité gélatinolytique semble plutôt corrélée avec l'expression de MMP-9 au niveau des glioblastomes multiformes (Rao *et al.*, 1993). Des études d'immunohistochimie ont également révélé la présence de MMP-9 au niveau

des cellules tumorales, ainsi que chez les cellules endothéliales en prolifération (Rao *et al.*, 1996). En plus de l'augmentation de l'expression de MMP-9, les tissus de gliomes du stade avancé présentent un faible niveau d'expression de TIMP-1 et TIMP-2, au niveau de l'ARN messager et au niveau protéique, comparé aux stades précoces et au cerveau normal (Mohanam *et al.*, 1995). D'autres MMPs sont également surexprimées lors du développement du gliome *in vivo*, telles que MT1-MMP et MT2-MMP, mais celles-ci semblent être plutôt exprimées par les astrocytes activés et non par les cellules tumorales (Nakada *et al.*, 1999). Récemment, une étude a démontré que l'expression de MMP-9 est essentielle à l'invasion du gliome. En effet, une lignée cellulaire de glioblastome transfectée avec un plasmide codant pour un transcript antisens de MMP-9, inhibe drastiquement l'invasion *in vitro* et *in vivo* de ces cellules (Kondraganti *et al.*, 2000). MMP-9 pourrait également participer aux processus de démyélinisation, fréquemment observés lors du développement du gliome, grâce à sa capacité à dégrader la protéine basique de la myéline (Gijbels *et al.*, 1993). La génération de souris déficientes pour le gène codant pour MMP-9 (ou souris "knock-out") a permis de révéler de nouveaux rôles biologiques médiés par cette enzyme. En effet, ces souris sont résistantes à plusieurs pathologies inflammatoires ou auto-immunes induites, suggérant une participation de MMP-9 dans les mécanismes inflammatoires. Cette implication pourrait être due à sa capacité de générer la forme active de l'IL-1 $\beta$ , en clivant le pro-IL-1 $\beta$  inactif, et également en potentialisant l'effet chimiotactique de l'IL-8 sur les neutrophiles, par troncation de sa partie N-terminale (Opdenakker *et al.*, 2001). D'un autre côté, MMP-9 pourrait jouer un rôle dans l'immunosuppression associée au cancer, en inhibant la prolifération des lymphocytes T qui rencontrent des cellules tumorales. Cette inhibition provient du clivage du récepteur de l'IL-2 des cellules T par MMP-9 (Sheu *et al.*, 2001). MMP-9 semble aussi être impliquée dans une des caractéristiques du gliome : la dégradation de la BHE. Ce processus de dégradation, induit par ischémie chez la souris, est réduit chez les souris déficientes en MMP-9 (Asahi *et al.*, 2001). De plus, MMP-9 peut contribuer à la carcinogénèse. En effet, la transplantation de cellules de la moelle osseuse exprimant MMP-9 suffit à reconstituer la tumorigénicité des cancers de la peau, induite par les oncogènes HPV16, qui était réduite chez les souris déficientes en MMP-9 (Coussens *et al.*, 2000). De plus, MMP-9, mais pas MMP-2, est une composante de

l'induction de l'angiogénèse durant la carcinogénèse des îlots du pancréas, induite par l'antigène T du virus SV40, par clivage et libération du VEGF ("vascular endothelial growth factor") membranaire de la cellule (Bergers *et al.*, 2000).

Ainsi, MMP-9 peut être impliquée dans l'invasion tumorale, l'inflammation, la dégradation de la barrière hémato-encéphalique (BHE), ainsi que dans la carcinogénèse. Cette MMP est donc une cible thérapeutique particulièrement intéressante dans le cadre du gliome. D'où la nécessité de comprendre la régulation de l'expression et de la sécrétion de cette enzyme.

## **2.5 Régulation de l'expression et de la sécrétion de MMP-9**

En plus de la régulation post-traductionnelle de MMP-9 par les TIMPs, l'expression de MMP-9 peut être modulée par de nombreux facteurs physiologiques, tels que les cytokines, chemokines, les facteurs de croissance et les molécules d'adhésion. MMP-9 peut être sécrétée par de nombreux types cellulaires et son expression est généralement inductible. De plus, plusieurs mécanismes de régulation de l'expression de MMP-9 au niveau transcriptionnel sont maintenant connus et sont sous le contrôle d'oncogènes cellulaires ou d'origine virale.

### **2.5.1 MMP-9 et cytokines-chemokines**

MMP-9 est la MMP prépondérante exprimée chez les lymphocytes T et les macrophages. L'induction de son expression chez ces cellules du système immunitaire se fait par les cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-1 et le TNF- $\alpha$ , mais également par l'IL-2 chez les cellules T et les cellules NK ("Natural Killer") (Johnatty *et al.*, 1997; Sarén *et al.*, 1996; Kitson *et al.*, 1998). Ce mécanisme participe à l'extravasation des cellules du système immunitaire durant les réactions inflammatoires. De plus, la sécrétion de chemokines, telle que RANTES, molécule ayant un pouvoir chimioattractif, induit l'expression de MMP-9 chez les lymphocytes et vient ainsi faciliter le passage de ces cellules à travers la barrière endothéliale et la matrice extracellulaire (Johnatty *et al.*, 1997). En sécrétant des cytokines (IL-1 et TNF- $\alpha$ ), les cellules T et les macrophages peuvent induire l'expression de MMP-9 par les cellules stromales, comme les fibroblastes et les kératinocytes, favorisant ainsi la réparation des tissus de l'épiderme en cas de

blessures (Han *et al.*, 2001; Lyons *et al.*, 1993). Mais ces mêmes processus peuvent participer au développement de maladies auto-immunitaires. Par exemple, l'expression de MMP-9, induite par l'IL-1 et le TNF- $\alpha$  chez les fibroblastes synoviaux, contribue à la dégradation du cartilage entourant les os, dans le cadre de l'arthrite rhumatoïde (Unemori *et al.*, 1991). De plus, au niveau du cancer, les cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF- $\alpha$  et l'IL-6, pourraient jouer un rôle dans la capacité des cellules tumorales à développer des métastases, via, respectivement, l'induction de l'expression de MMP-9 chez les ostéosarcomes et les lymphomes non-Hodgkiniens (Kawashima *et al.*, 1994; Kossakowska *et al.*, 1999).

Une fois les monocytes/macrophages activés, l'induction de l'expression de MMP-9 peut être réprimée par des cytokines immunosuppressives, telles que l'IL-4 et l'IL-10 (Lacraz *et al.*, 1992; Corcoran *et al.*, 1992; Mertz *et al.*, 1994); ce qui suggère une régulation stricte de l'expression de MMP-9 chez ces cellules du système immunitaire. De plus, une autre cytokine immunosuppressive, TGF- $\beta$ , induit l'expression de MMP-9, mais inhibe également l'induction de cette MMP par LPS chez les macrophages (Xie *et al.*, 1994). Ces effets contraires du TGF- $\beta$  a également été observé chez des lignées métastatiques issues de tumeurs secondaires versus des lignées dérivées de la tumeur primaire du cancer de la prostate. Effectivement, les lignées métastatiques ont acquis la propriété d'induire l'expression de MMP-9 en présence de TGF- $\beta$  *in vitro*, contrairement aux cellules issues de la tumeur primaire (Sehgal *et al.*, 1996). Ce résultat suggère que la régulation de la production de MMP-9 par les cytokines, dépend du phénotype métastatique d'une cellule.

L'expression de MMP-9 peut donc être modulée de façon positive ou négative par les cytokines.

### **2.5.2 MMP-9 et facteurs de croissance**

Les facteurs de croissance, surexprimés durant l'embryogénèse, facilitent la migration des cellules souches, via l'induction de l'expression des MMPs. En effet, le trafic des cellules souches hématopoïétiques de la moëlle osseuse vers le sang semble dépendre de l'expression de MMP-9 chez ces cellules, qui peut être induite par les facteurs de croissance GM-CSF ("Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor") et M-CSF

("Macrophage colony-stimulating factor") (Janowska-Wieczorek *et al.*, 1999). De tels mécanismes participent également à la dissémination des cellules tumorales. Ainsi, l'EGF ("Epidermal growth factor"), l'IGF ("Insulin growth factor") et le NGF ("Nerve growth factor") sont des facteurs de croissance respectivement impliqués dans la migration et l'invasion des cellules cancéreuses de l'ovaire, du sein et des mélanomes, via l'expression de MMP-9 (Ellerbroek *et al.*, 1998; Mira *et al.*, 1999; Herrmann *et al.*, 1993). De plus, MMP-9 peut moduler la réponse des cellules tumorales à certains facteurs de croissance. Par exemple, le clivage de IGFBP par MMP-9, protéine de liaison de l'IGF qui empêche la liaison de ce facteur de croissance à son récepteur, favorise la prolifération des carcinomes de la prostate DU-145 (Manes *et al.*, 1999). D'autres facteurs de croissance, comme le PDGF, n'induisent pas l'expression de MMP-9, mais semblent agir en synergie avec l'IL-1 ou le TNF- $\alpha$  chez des fibroblastes ou des cellules musculaires (Bond *et al.*, 1998; Fabunmi *et al.*, 1996).

Les facteurs de croissance sont donc plutôt perçus comme des régulateurs positifs de l'expression de MMP-9.

### **2.5.3 MMP-9 et molécules d'adhésion**

Les molécules d'adhésion, impliquées dans la reconnaissance intercellulaire et l'ancrage des cellules à la matrice extracellulaire, peuvent aussi moduler l'expression de MMP-9. Ainsi, le contact direct de lymphomes T avec des cellules endothéliales induit une expression bi-directionnelle de MMP-9, via l'interaction ICAM-1/LFA-1 ("Intercellular adhesion molecule-1/Lymphocyte function-associated molecule-1"), suggérant que l'adhésion du lymphome aux cellules vasculaires favorise son potentiel invasif (Aoudjit *et al.*, 1998). Plusieurs études ont également montré que certaines protéines de la matrice extracellulaire induisent l'expression de MMP-9 chez la cellule, par interaction avec la classe de molécules d'adhésion appelées intégrines, glycoprotéines transmembranaires formées de l'association non-covalente de deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ . Par exemple, la production de MMP-9 chez les kératinocytes, immortalisés par l'antigène T, est dépendante de l'intégrine  $\alpha_3\beta_1$  (DiPersio *et al.*, 2000). De plus, la transfection de  $\alpha_6\beta_6$  augmente le pouvoir invasif MMP-9-dépendant des kératinocytes malins *in vitro* (Thomas *et al.*, 2001). La surexpression d'une kinase liée aux intégrines (LIK) induisant

un phénotype invasif, associé à une augmentation du niveau transcriptionnel de MMP-9 chez plusieurs lignées cellulaires continues, confirme la participation des intégrines aux processus invasifs, via l'expression des MMPs (Troussard *et al.*, 2000).

#### 2.5.4 MMP-9 et facteurs de transcription

Le gène codant pour MMP-9 comprend 13 exons et a une longueur de 7,7 Kb (Huhtala *et al.*, 1991). La transcription de ce gène, qui génère un ARN messager de 2,5 Kb, est modulée par une séquence régulatrice de 670 bp, incluant les sites de liaison pour les facteurs de transcription AP-1, NF- $\kappa$ B, AP-2 et Sp-1 (Sato et Seiki, 1993). Ces sites de liaison sont hautement conservés chez l'homme, la souris et le rat (Eberhardt *et al.*, 2000). Les mutations ou délétions des motifs NF- $\kappa$ B, AP-1 et Sp-1, respectivement localisés à 600, 79 et 558 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription, réduit ou abolit la capacité du TNF- $\alpha$  de stimuler l'activité du promoteur de MMP-9 chez les cellules OST (ostéosarcomes) et HepG2 (hépatomes) (Sato et Seiki, 1993). De plus, l'activation du promoteur de MMP-9 par l'oncogène *v-src* chez les cellules HT1080 (fibrosarcomes) est attribuée aux sites de liaison pour AP-1 (-79) et Sp-1 (boîte GT à -52) (Sato *et al.*, 1993). L'oncogène *Ha-ras* peut également activer le promoteur de MMP-9, via les sites de liaison pour l'oncogène *PEA3/ets*, adjacent à AP-1, et AP-1; mais bien que ces deux sites semblent travailler en coopération, ils ne sont pas suffisant pour une induction optimale de l'expression de MMP-9 par *ras*, étant donné que des mutations ou délétions des sites de liaison pour Sp-1 (-558 et -52) et NF- $\kappa$ B (-600) inhibent partiellement l'activité du promoteur de MMP-9 (Gum *et al.*, 1996). Ces résultats ont été confirmés par d'autres études montrant que la surexpression par transfection de *c-jun*, une composante du facteur de transcription AP-1, et de *ets*, induisent l'expression de MMP-9 chez les cellules du cancer du sein (Smith *et al.*, 1999; Kaya *et al.*, 1996). Des embryons murins déficients en protéine *junB*, un autre membre du facteur AP-1, ont également démontré une inhibition de l'expression de MMP-9 (Schorpp-Kistner *et al.*, 1999).

MMP-9 a un profil d'expression spécifique du type cellulaire. Par exemple, elle est exprimée uniquement par les ostéoclastes aux sites de formation des os durant le développement de l'embryon de souris (Reponen *et al.*, 1994). Les éléments participant au contrôle cette régulation spécifique sont localisés dans la région -7745 à -2722 bp en

amont du site d'initiation de la transcription (Munaut *et al.*, 1999). Récemment, un nouvel élément du promoteur de MMP-9, appelé KRE-M9 (-66 à -57), proche du site de liaison pour AP-1, a été identifié comme étant responsable de la transcription de MMP-9, chez des kératinocytes en différenciation (Kobayashi *et al.*, 2001). De plus, l'instabilité des régions de répétition des bases CA contenus dans le promoteur de MMP-9 rajoute un niveau de régulation complexe de la transcription de cette enzyme (Shimajiri *et al.*, 1999).

L'induction de l'expression de MMP-9 par les cytokines, tels que TNF- $\alpha$ , dépend donc des sites de liaison AP-1, NF- $\kappa$ B et Sp-1.

### **2.5.5 MMP-9 et signaux de transduction**

Les signaux de transduction conduisant à l'expression de MMP-9 les plus étudiés sont ceux médiés par l'oncogène *ras*, un gène impliqué dans le développement du gliome (Holland *et al.*, 2000). Le gène *ras* code pour une protéine G, localisée à la membrane cytoplasmique et qui possède une activité GTPase. Elle sert d'aiguillage moléculaire liant l'activation tyrosine kinase des récepteurs et non-récepteurs aux événements ultérieurs cytoplasmiques et nucléaires. La protéine *ras* est couplée aux récepteurs de facteurs de croissance, tels que l'EGF ou le PDGF, et favorise la prolifération, la différenciation, ainsi que la survie des cellules (Buday et Downward, 1993; McGuire *et al.*, 1996; Adjei, 2001). A la suite de l'activation des récepteurs de facteurs de croissance, *ras*, sous sa forme activée, liée au GTP, utilise plusieurs effecteurs dont un des mieux caractérisés est l'IP-3 kinase. En effet, en se liant directement à cette kinase, *ras* augmente son activité, permettant ainsi l'activation des protéines sérine/thréonine kinase B (PKB/Akt), effecteurs de l'IP-3 kinase (Rodriguez-Viciano *et al.*, 1997; Kauffmann-Zeh *et al.*, 1997). Les PKB/Akt sont capables d'induire l'expression de MMP-9, via l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Kim *et al.*, 2001). De la même façon, l'activité IP-3 kinase est impliquée dans la production de MMP-9 chez des cellules tumorales ovariennes, stimulées à l'EGF (Ellerbroek *et al.*, 2001). De plus, *ras* peut activer d'autres effecteurs, tels que les MAPK ("Mitogen-activated protein kinase"), aboutissant ainsi à la phosphorylation et l'activation de *c-fos* et de *c-jun*, protéines nécessaires à la formation du complexe hétérodimère AP-1 (Khosravi-Far *et al.*, 1998). Bien que les MAPK,

comme ERK ("Extracellular signal-regulated kinase"), JNK ("c-jun N-terminal kinase") et p38, semblent être nécessaires à l'expression de MMP-9 (Gum *et al.*, 1997; Simon *et al.*, 1998), d'autres voies de transduction *ras*-indépendantes, impliquant ces MAPK, pourraient également jouer un rôle dans la production de cette enzyme (Genersch *et al.*, 2000).

L'expression de MMP-9 peut aussi être inhibée. En effet, la transfection du gène KiSS dans les cellules HT1080 réprime l'activation de l'expression de MMP-9 par les phorbol-esters, par blocage de la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B (Yan *et al.*, 2001).

D'autres types de régulation non-transcriptionnelle de MMP-9 ont été mis en évidence, tels que des mécanismes augmentant la stabilité de l'ARN messenger (Sehgal et Thompson, 1999) ou réprimant la sécrétion de MMP-9, via l'expression de la glycoprotéine membranaire RECK ("Reversion-inducing-cysteine-rich protein with Kazal motifs") (Takahashi *et al.*, 1998).

L'expression de MMP-9 semble donc être soumise à une régulation stricte, impliquant différents mécanismes intracellulaires, ainsi que différents signaux de transduction. En plus des mécanismes décrits ci-dessus, plusieurs études ont suggéré l'implication des protéines kinase C (PKC) dans la régulation de la production de MMP-9.

### 3. LES PROTÉINES KINASE C

Les protéines kinase C (PKCs) ont été identifiées pour la première fois en 1977 (Inoue *et al.*) comme des sérine/thréonine kinases cytoplasmiques phospholipide-dépendantes, présentes dans des cellules de cerveau de rat. Ces molécules agissent en tant que seconds messagers lorsque les cellules sont stimulées par des facteurs de croissance, des hormones ou des neurotransmetteurs (Nishizuha, 1984). Au moins 10 membres (isoformes) composent la famille des PKCs, dont chacun possède des distinctions dans leur profil d'expression tissulaire, leur localisation intracellulaire, ainsi que dans leur fonction spécifique dans les signaux de transduction (Kiley *et al.*, 1995; Misra-Press *et al.*, 1992; Nishizuha, 1988).

#### 3.1 Classification et structure des PKCs

Les isoformes PKC sont regroupés en trois sous-classes, selon leur propriétés régulatrices qui leur sont conférées par leur domaines protéiques spécifiques (Fig.3). Les PKCs conventionnelles (cPKCs) ou classiques sont constituées des isoformes  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II et  $\gamma$ . Ces isoformes peuvent être activés par le  $\text{Ca}^{2+}$  et/ou par le diacylglycérol (DAG) et les phorbol esters. Les nouvelles PKCs (nPKCs)  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$  et  $\eta$  peuvent également être activées par le DAG et les phorbol esters mais leur activité est indépendante du  $\text{Ca}^{2+}$ . Finalement, les PKCs atypiques (aPKCs), incluant PKC $\zeta$  et PKC $\iota$  (ou son homologue murin PKC $\lambda$ ), ne répondent pas au DAG/phorbol esters et au  $\text{Ca}^{2+}$ . Chaque isoforme de PKC est le produit d'un gène séparé, sauf l'exception des PKC $\beta$ I et  $\beta$ II, produits de l'épissage alternatif d'un même gène.

Chaque isoforme consiste en une simple chaîne polypeptidique comprenant deux domaines structuraux bien définis : le domaine régulateur dans la portion N-terminale et le domaine catalytique situé dans la portion C-terminale (Fig.3). La région régulatrice possède des motifs impliqués dans la liaison des co-facteurs phospholipidiques et du  $\text{Ca}^{2+}$ . Elle participe également aux interactions protéine-protéine qui modulent l'activité et la localisation des PKCs. La région C-terminale représente le domaine kinase qui possède les motifs de liaison à l'ATP (adénosine tri-phosphate) et du substrat de l'enzyme. Les domaines régulateurs et catalytiques se connectent par l'intermédiaire d'une région charnière hautement sensible aux clivages protéolytiques par des protéases cellulaires.

Les enzymes possèdent des régions hautement conservées entre les différents isoformes de PKC (régions C1 à C4) et des régions variables (V1 à V5). La région C1 est présente chez tous les isoformes. Elle contient un domaine auto-inhibiteur ou pseudosubstrat qui se lie au site de liaison du substrat dans le domaine catalytique et garde l'enzyme dans un état inactif en l'absence de co-facteurs et d'activateurs (Orr *et al.*, 1992). La séquence d'acides aminés du pseudosubstrat ressemble aux motifs de phosphorylation des substrats de la PKC, mais possède un acide aminé non-phosphorylé (l'alanine) au lieu d'une sérine ou thréonine (House et Kemp, 1987).

La région C1 se caractérise par la présence de domaines riches en cystéine, impliqués dans la liaison du second messager DAG et des phorbol esters chez les cPKCs et les nPKCs (Burns et Bell, 1991; Ono *et al.*, 1989). Tandis que les cPKCs et nPKCs possèdent deux copies de ces motifs en tandem, une seule copie est présente chez les aPKCs.

La liaison du  $\text{Ca}^{2+}$  chez les cPKCs implique la région C2, adjacente aux domaines riches en cystéine. Une région C2 homologue est également présente chez les nPKCs, mais elle s'est avérée incapable de lier le  $\text{Ca}^{2+}$  (Sossin et Schwartz, 1993).

### **3.2 L'activation des PKCs**

Les PKCs sont modulées par deux mécanismes indépendants : 1) par des co-facteurs, promoteurs de l'association des PKCs à la membrane et 2) par phosphorylation, mécanisme régulateur du site actif et de la localisation intracellulaire des PKCs.

#### **3.2.1 Régulation par les co-facteurs**

L'activation des PKCs se fait par des co-facteurs, tels que les phospholipides acides et le  $\text{Ca}^{2+}$ . Le modèle accepté de l'activation des PKCs par les lipides est que la liaison du DAG (ou phorbol esters), en présence du co-facteur phospholipidique, induit un changement de conformation de la PKC, aboutissant au détachement du pseudosubstrat de son site de liaison et donc à la libération du site catalytique de l'enzyme (Newton, 1995). Les domaines C2 et riches en cystéine ne sont pas les seules régions impliquées dans la liaison du phospholipide : le pseudosubstrat, une fois libéré de son site de liaison, pourrait aussi contribuer à la liaison de la PKC à la membrane, par l'intermédiaire de ses

résidus basiques (Orr et Newton, 1992 -a et -b). Cette association membranaire se reflète comme un déplacement de la localisation intracellulaire, appelé translocation, de la PKC cytoplasmique vers les compartiments membranaires des systèmes cellulaires (Fig.4).

De plus, la réquisition de lipides différents pour des isoformes individuels de PKC représente un mécanisme potentiel de contrôle de fonctions spécifiques dans les cellules. Par exemple, le lipide phosphatidylglycérol stimule l'activité de PKC $\beta$ II au niveau nucléaire et induit la phosphorylation des substrats nucléaires de cet isoforme. L'identification du site de liaison du phosphatidylglycérol au niveau du site catalytique de PKC $\beta$ II a rajouté un degré de complexité dans la régulation de l'activité PKC par les lipides (Murray et Fields, 1998).

Le Ca<sup>2+</sup>, quant à lui, augmente l'affinité des cPKCs aux phospholipides anioniques (Bazzi et Nelsestuen, 1990). De plus, il induit, à forte concentration, un changement de conformation des cPKCs, entraînant la libération de leur site actif du pseudosubstrat et conduit ainsi à l'activation de l'enzyme (Keranen et Newton, 1997).

Les phospholipides et le Ca<sup>2+</sup> sont donc des co-facteurs importants dans l'activation des PKCs.

### 3.2.2 Régulation par la phosphorylation

Les PKCs peuvent s'autophosphoryler sur les résidus sérine/thréonine et peuvent également être transphosphorylées sur des résidus tyrosine et sérine/thréonine par d'autres kinases. La phosphorylation de la PKC est un événement qui contrôle la maturation de l'enzyme, en plus de son activation ou inactivation.

Des expériences "pulse-chase" ont permis de démontrer que les PKCs sont phosphorylées *in vivo*. En effet, la PKC est tout d'abord synthétisée sous forme de précurseur inactif déphosphorylé. Une forme phosphorylée transitoire apparaît ensuite, suivie d'une forme mature (Borner *et al.*, 1989). Cette forme mature cytoplasmique possède trois sites de phosphorylation. La première phosphorylation résulte d'une transphosphorylation d'une thréonine dans la boucle d'activation, rendant ainsi la kinase catalytiquement compétente (Keranen *et al.*, 1995) et permet également de contrôler la durée de l'activation de la PKC et son taux de déphosphorylation (Bornancin et Parker, 1996). La deuxième phosphorylation est une autophosphorylation sur une thréonine, importante pour la

stabilité de la conformation catalytiquement compétente de la PKC (Edwards et Newton, 1997) et la résistance aux phosphatases (Bornancin et Parker, 1997). La troisième phosphorylation provient d'une deuxième autophosphorylation sur une sérine et est responsable de la dissociation de la PKC de la membrane cytoplasmique, permettant ainsi son retour dans le cytoplasme après son activation (Feng et Hannun, 1998). La forme mature est inactive et reste cytoplasmique jusqu'à la génération de DAG, permettant la translocation de la PKC à la membrane, et ainsi, la libération du pseudosubstrat du site catalytique (Fig.4).

Les PKCs peuvent être également phosphorylées sur leur résidus tyrosine mais leur rôle dans l'activation des PKCs demeure controversé. En effet, alors que des études ont montré l'absence d'effet de cette phosphorylation sur l'activité des PKCs (Li *et al.*, 1996), d'autres ont démontré une augmentation (Li *et al.*, 1994) ou une inhibition (Denning *et al.*, 1996). Récemment, Konishi *et al.* (1997) ont rapporté que la phosphorylation des tyrosine de plusieurs isoformes de PKCs, induite par un stress, est suffisante pour prolonger l'activation des PKCs.

La phosphorylation des PKCs est donc essentielle à la régulation de leur activation, ainsi que de leur activité.

### **3.3 La spécificité de substrat**

Un grand nombre de protéine peut être phosphorylé par les PKC *in vitro* ou *in vivo*. Ces données, ainsi que celles provenant d'études utilisant des peptides synthétiques, ont permis de déterminer un motif de phosphorylation consensus par les PKCs, soit : RXXS/TXRX. Ces études soulignent l'importance des résidus basiques en N- et C-terminale du résidu accepteur de phosphate. De cette façon, plusieurs substrats artificiels des PKCs, tels que les histones, la protamine et protamine sulfate, ont été identifiés et utilisés dans des mesures d'activité (Toker, 1998). De plus, l'utilisation de bibliothèques peptidiques a permis de définir une sélectivité optimale pour des substrats de différents isoformes PKC (Nishikawa *et al.*, 1997). Ces résultats confirment l'importance de résidus basiques entourant les Ser ou Thr, et indiquent que, bien que la phosphorylation optimale pour chaque PKC soit similaire, il existe des différences subtiles entre les différents membres de la famille des PKCs, particulièrement entre les cPKCs, les nPKCs

et les aPKCs. Toutes les PKCs préfèrent des résidus basiques aux positions -6, -4 et -2 aux Ser et Thr. Les cPKCs préfèrent aussi les résidus basiques en position +2, +3 et +4, tandis que les nPKCs et les aPKCs privilégient les résidus hydrophobiques à ces positions. Cette approche a permis l'établissement de recherche de données pour des substrats potentiels de PKCs, ainsi qu'une explication de la sélectivité de substrat de certaines PKCs par rapport à d'autres membres de la famille. Par exemple, les protéines MARCKS ("Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate"), sont phosphorylées par toutes les PKCs, sauf PKC $\zeta$  (Uberall *et al.*, 1997); la ribonucléo-protéine hétérogène A1 (hnRNP A1) est efficacement phosphorylée par PKC $\zeta$  (Municio *et al.*, 1995), mais pas par les autres isoformes, tandis que le facteur d'élongation eEF-1 $\alpha$  représente un bon substrat pour PKC $\delta$  (Kielbassa *et al.*, 1995). Malgré ces différences, il est clair que toutes les PKCs préfèrent généralement phosphoryler des séquences très similaires, suggérant l'existence d'autres mécanismes pour discriminer la participation d'un isoforme particulier dans le signal de transduction. Ces processus incluent la régulation par les co-facteurs, décrits ci-dessus, et également une localisation cellulaire convenable de la PKC. Cette localisation se réalise à l'aide de protéines d'ancrage, spécifiques aux PKCs activées, nommées RACKs ("Receptor for activated C-kinase") (Mochly-Rosen *et al.*, 1991(a); Mochly-Rosen *et al.*, 1991(b)). La liaison des PKCs aux RACKs assure un accès approprié à leur substrats. De plus, d'autres protéines d'ancrage, AKAPs ("A-kinase anchoring protein"), peuvent également se lier aux PKCs, ainsi qu'à d'autres kinases (Faux et Scott, 1997). Finalement, une protéine interagissant directement avec le domaine régulateur de PKC $\zeta$ , mais pas des autres PKCs, a été décrite et nommée ZIP ("Zeta-interacting protein"). Elle serait importante pour la formation de complexes de PKC $\zeta$  avec d'autres protéines qui assureraient leur liaison aux récepteurs des cytokines ou facteurs de croissance (Puls *et al.*, 1997).

La spécificité de substrat d'un isoforme PKC ne dépend pas uniquement de l'affinité de cet isoforme pour le substrat, mais aussi de son état d'activation et de sa localisation intracellulaire.

### 3.4 Rôle des PKCs

Les signaux de transduction médiés par les PKCs sont très hétérogènes. En effet, les différents isoformes PKC sont impliqués dans divers mécanismes cellulaires, tels que la prolifération, la différenciation et l'apoptose (Dempsey *et al.*, 2000). Au niveau du cancer, les PKCs participent au contrôle de la croissance et du potentiel invasif des tumeurs.

#### 3.4.1 PKCs et croissance tumorale

Le rôle potentiel des PKCs dans la carcinogénèse provient originellement de l'observation que ces molécules représentent des récepteurs cellulaires pour des agents promoteurs de tumeurs, les phorbol esters (Kikkawa *et al.*, 1982; Niedel *et al.*, 1983). L'activation des PKCs par les phorbol esters conduit à un phénotype transformé chez plusieurs types cellulaires *in vitro* (Driedger et Blumberg, 1977; Colburn *et al.*, 1979). De plus, la surexpression constitutive des PKCs, induite par transfection, amène à une transformation cellulaire (Housey *et al.*, 1988; Persons *et al.*, 1988).

Il a été démontré que l'activité des PKCs peut exercer des effets régulateurs positifs et négatifs sur la prolifération cellulaire, dépendamment du type cellulaire. De plus, les isoformes individuels des PKCs peuvent jouer des rôles distincts dans les processus de transformation, ainsi que dans la croissance cellulaire, à l'intérieur du même type de cellule. Par exemple, la surexpression de PKC $\beta$ I et  $\gamma$  cause une transformation maligne chez des fibroblastes de rat et augmente la tumorigénicité des fibroblastes transformés NIH3T3 chez la souris *nude* (Housey *et al.*, 1988; Persons *et al.*, 1988), alors qu'une activité élevée de PKC $\beta$  est associée à une baisse de la prolifération des mélanocytes et des carcinomes du colon (Yamanishi *et al.*, 1991; Choi *et al.*, 1990). L'expression excessive de l'isoforme PKC $\alpha$  induit une augmentation du taux de prolifération des fibroblastes Swiss 3T3 (Eldar *et al.*, 1990), mais conduit également à une inhibition de la croissance des mélanocytes (Yamanishi *et al.*, 1991). Chez les fibroblastes de rat, PKC $\epsilon$  joue le rôle d'oncogène lorsqu'il est surexprimé (Cacace *et al.*, 1993), tandis que PKC $\delta$  exerce des effets opposés sur la tumorigénicité et la croissance de ces cellules (Mischak *et al.*, 1993).

L'état d'activation des PKCs varie aussi de façon significative chez différents types de tumeur. En effet, les mesures d'activité PKC sont généralement élevées dans les cellules

tumorales, comme les carcinomes du sein ou adénomes de l'hypophyse, comparativement au tissu normal entourant la tumeur (O'Brian *et al.*, 1989; Alvaro *et al.*, 1992). Par contre, d'autres groupes ont montré une diminution de l'activité PKC chez les carcinomes du colon (Kopp *et al.*, 1991; Guillem *et al.*, 1987).

Au niveau du gliome, les lignées cellulaires possèdent une activité PKC très élevée, par rapport aux astrocytes normaux, et cette activité corrèle avec le taux de croissance de ces cellules tumorales (Couldwell *et al.*, 1992; Yong, 1992). De plus, une surexpression de certains isoformes PKCs, telles que PKC $\alpha$ , a été démontré par immunohistochimie et immunobuvardage de type Western chez des astrocytes néoplasiques versus des astrocytes normaux (Benzil *et al.*, 1992). Cette surexpression est due à une augmentation du taux d'ARN messagers de PKC $\alpha$ , détectée chez les gliomes, et notamment chez la lignée cellulaire C6 (Baltuch *et al.*, 1995; Chen, 1993). L'inhibition de l'expression de cette PKC, à l'aide d'oligonucléotides antisens, réduit considérablement la prolifération des cellules C6 et des glioblastomes U-87, confirmant le rôle prépondérant de PKC $\alpha$  dans la croissance du gliome (Dooley *et al.*, 1998; Yazaki *et al.*, 1996).

Le fait que l'expression des isoformes PKCs, ainsi que les profils de réponses cellulaires médiées par les PKCs sont distincts chez plusieurs cancers d'origine différente, suggère des fonctions spécifiques pour ces isoformes dans les cellules néoplasiques. Ce qui est en adéquation avec l'observation que chaque isoforme PKC possède une spécificité de substrat différente et que l'expression de ces isoformes est associée à la disponibilité du substrat dans la cellule (Dekker et Parker, 1994).

### **3.4.2 PKCs et invasion tumorale**

Il existe une corrélation entre le potentiel métastatique et l'activité PKC de plusieurs types de tumeurs, incluant les cellules leucémiques et les mélanomes (Aflalo *et al.*, 1992; Gopalakrishna et Barsky, 1988). De plus, l'utilisation d'inhibiteurs PKC, non-spécifiques d'isoformes, réduit l'invasion *in vitro* des cancers ovariens et rénaux (Kobayashi *et al.*, 2001; Engers *et al.*, 2000), ainsi que celle des lignées de gliomes humains (Park *et al.*, 2000; Uhm *et al.*, 1996). Plusieurs études ont mis en évidence le rôle des cPKCs dans l'invasion tumorale. En effet, l'augmentation de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire, induite par déplétion génétique de la mitochondrie, active les cPKCs, qui contribuent aux processus invasifs *in*

*vivo* et *in vitro* des myoblastes C2C12, par induction de l'expression de la cathepsine L, une protéase capable de dégrader la matrice extracellulaire (Amuthan *et al.*, 2001). De plus, la surexpression de PKC $\alpha$  dans les cellules intestinales HT-29 M6, favorise la motilité et l'invasion de ces cellules dans des extraits de cœur embryonnaire de poulet (Batlle *et al.*, 1998). Tandis que PKC $\beta$  semble contrôler le pouvoir invasif *in vitro* des mélanomes dépendent de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  (Khatib *et al.*, 2001), PKC $\delta$  induit le relargage de TGF $\beta$  et augmente ainsi le potentiel métastatique des mélanomes (LaPorta et Comolli, 2000). Ce qui suggère l'implication de classes de PKCs, autres que les cPKCs, dans le contrôle de l'invasion tumorale.

Ce contrôle par les PKCs pourrait se faire au niveau de la régulation de l'expression de MMP-9. En effet, bien que de nombreuses études ont montré l'implication des PKCs dans la régulation de l'expression de MMP-9, en utilisant des inhibiteurs non-spécifiques d'isoformes PKC (Segain *et al.*, 1996; Fabunmi *et al.*, 1996; Tremblay *et al.*, 1995), peu se sont attardées sur le rôle spécifique de ces différents isoformes. Ainsi, les cPKCs, PKC $\beta$  et  $\alpha$ , sont respectivement impliquées dans le contrôle de la régulation positive de l'expression de MMP-9 chez les macrophages activés au PMA (Xie *et al.*, 1998), et négative, lorsque ceux-ci sont stimulés au LPS (St-Denis *et al.*, 1998). De plus, l'expression de MMP-9, chez le gliome, semble dépendante des PKCs, étant donné que la Calphostine C, un inhibiteur non-spécifique d'isoformes PKC, bloque l'induction de l'expression de MMP-9 par le PMA chez les glioblastomes humains SNB19 (Chintala *et al.*, 1998). Ainsi, des molécules impliquées dans l'activation des PKCs, telles que les phosphoinositide kinases, pourraient également moduler l'expression de MMP-9.

## 4. LA FAMILLE DES IP-3 KINASES

### 4.1 Le phosphatidylinositol et ses dérivés

Le phosphatidylinositol, un composant de la membrane des cellules eucaryotes, est unique parmi les phospholipides car il peut être phosphorylé à de multiples groupements hydroxyls libres, présents au niveau de la tête du phospholipide. Plusieurs dérivés phosphorylés du phosphatidylinositol, appelés phosphoinositides, ont été identifiés chez les cellules eucaryotiques, de la levure aux mammifères. Les phosphoinositides sont impliqués dans divers processus cellulaires, tels que la prolifération, la survie, l'organisation du cytosquelette et le transport de glucose. Les enzymes qui phosphorylent le phosphatidylinositol et ses dérivés, sont les phosphoinositide kinases. Bien que le phosphatidylinositol (PtdIns) représente un faible pourcentage du total des phospholipides cellulaires, il joue un rôle crucial dans les signaux de transduction, en tant que précurseur de plusieurs second messagers moléculaires. Son groupement inositol contient cinq hydroxyls libres qui peuvent être potentiellement phosphorylés (Fig.5). Ainsi, plusieurs dérivés de PtdIns peuvent exister dans la cellule, chacun ayant une fonction unique (Divecha et Irvine, 1995). Jusqu'à présent, les phosphoinositides cellulaires suivants ont été identifiés : PdtIns-3-phosphate (PdtIns-3-P), PdtIns-4-phosphate (PdtIns-4-P), PdtIns-5-phosphate (PdtIns-5-P), PdtIns-3-4-*bis*phosphate (PdtIns-3-4-P<sub>2</sub>), PdtIns-4-5-*bis*phosphate (PdtIns-4-5-P<sub>2</sub>) et PdtIns-3-4-5-*tris*phosphate (PdtIns-3-4-5-P<sub>3</sub>). PdtIns-4-P et PdtIns-4-5-P<sub>2</sub> représentent respectivement 60% et 30% du total des phosphoinositides dans la cellule (Fruman *et al.*, 2001). Deux fonctions générales ont été associées aux dérivés du PdtIns : 1) de servir de substrats aux phospholipases pour la génération de second messagers, soit l'inositol phosphate soluble (et membranaire, associée au DAG); 2) d'interagir directement avec des protéines intracellulaires, affectant leur localisation et/ou leur activité. Ainsi, plusieurs fonctions cellulaires spécifiques ont été associées à des phosphoinositides individuels (Toker et Cantley, 1997; Vanhaesebroeck *et al.*, 1997; Rittenhouse, 1996).

Parmi les phosphoinositide kinases, la famille des IP-3 kinases a été largement étudiée, depuis la découverte de l'association de son activité à certaines protéines virales oncogéniques (Cantley *et al.*, 1991). La famille des IP-3 kinases comprend trois classes,

définies selon l'homologie de structure de chaque membre et dont la nomenclature est due à Domin et Waterfield (1997).

## 4.2 La classe I des IP-3 kinases

### 4.2.1 Structure

Les IP-3 kinases de la classe I sont des protéines hétérodimériques, comprenant une sous-unité catalytique de 110-120 kDa associée à une sous-unité régulatrice. Trois IP-3 kinases partageant 42-58% d'identité au niveau de leur séquence amino-acide ont été clonées chez les mammifères et désignées p110 $\alpha$ , p110 $\beta$  et p110 $\delta$  (Vanhaesebroeck *et al.*, 1997; Hu *et al.*, 1993). Chacune de ces protéines contient une région N-terminale qui interagit avec les sous-unités régulatrices, un domaine se liant aux protéines G *ras*, un domaine PIK homologue à une région présente chez d'autres phosphoinositide kinases, et un domaine C-terminal catalytique (Fig.7). Des gènes reliés à p110 ont été clonés chez d'autres organismes eucaryotes, tels que *C. elegans*, *Drosophila melanogaster* et *Dictyostelium discoideum* (Morris *et al.*, 1996; Leever *et al.*, 1996; Zhou *et al.*, 1995). L'ensemble des produits de ces gènes constitue la classe Ia.

Les sous-unités régulatrices qui s'associent à la classe Ia des IP-3 kinases, sont souvent appelées p85, ce qui correspond au poids moléculaire des deux premiers isoformes purifiés (Carpenter *et al.*, 1990) et clonés : p85 $\alpha$  et p85 $\beta$  (Escobedo *et al.*, 1991; Otsu *et al.*, 1991; Skolnik *et al.*, 1991). Les protéines p85 ne possèdent pas d'activité enzymatique connue mais sont composées de plusieurs domaines homologues à ceux trouvés chez d'autres protéines impliquées dans les signaux de transduction. Ces domaines se définissent en tant que modules car ils peuvent fonctionner séparément du reste de la protéine. p85 $\alpha$  et p85 $\beta$  contiennent un domaine 3 homologue à *src* (SH3) en N-terminal, deux ou trois segments riches en proline, une région homologue aux protéines GTPase-activatrices des protéines G *rho* (*rho*-GAPs), et deux domaines 2 homologues à *src* (SH2) (Fig.7). La région située entre les deux domaines SH2 est nécessaire et suffisante pour l'interaction de la région N-terminale des sous-unités p110. Le gène p85 $\alpha$  peut subir un épissage qui génère deux protéines plus petites, p50 $\alpha$  et p55 $\alpha$  (Antonetti *et al.*, 1996; Inukai *et al.*, 1996). Ces protéines ont une région N-terminale

unique de 6 et 35 acides aminés, respectivement. Leur partie C-terminale est commune à p85 $\alpha$ , incluant le second motif riche en proline, les domaines SH2 et le domaine inter-SH2 (Fig.7). Un troisième gène, p55 $\gamma$ , code pour une protéine dont la structure est homologue à p55 $\alpha$  (Pons *et al.*, 1995). Pour l'instant, il n'existe aucune preuve que les différents isoformes des sous-unités régulatrices s'associent préférentiellement à différents isoformes p110 (Vanhaesebroeck *et al.*, 1997). Mais quelques données suggèrent que différentes sous-unités p85 pourraient s'associer à différents sous-types de protéines intracellulaires, telle que l'un des substrats du récepteur de l'insuline (Shepherd *et al.*, 1997; Baltensperger *et al.*, 1994; Reif *et al.*, 1993).

Une protéine, ayant 36% d'homologie en acides aminés à p110 $\alpha$ , a été également clonée et nommée p110 $\gamma$  (Stoyanov *et al.*, 1995; Stephens *et al.*, 1994). p110 $\gamma$  contient le domaine PIK, un domaine kinase, et un domaine de liaison à *ras*, mais diffère des IP-3 kinases de classe Ia dans la région N-terminale et n'interagit pas avec p85 (Fig.7). Cette caractéristique a permis de déterminer la classe Ib des IP-3 kinases. p101, la possible sous-unité régulatrice pour p110 $\gamma$ , ne possède aucune homologie reconnaissable à d'autres protéines (Stephens *et al.*, 1997). Les régions d'interactions entre p101 et p110 $\gamma$  n'ont pas été cartographiées.

## 4.2.2 Activité et régulation

### 4.2.2.1 Activité

*In vitro*, toutes les PI-3 kinases de la classe I sont capables de phosphoryler PdtIns, PdtIns-4-P ou PdtIns-4-5-P<sub>2</sub> sur la position hydroxy libre en 3' (Fig.5). La classe Ia est aussi capable de phosphoryler PdtIns-5-P *in vitro* (Rameh *et al.*, 1997). Mais, *in vivo*, les agonistes qui stimulent ces enzymes, causent principalement une augmentation des niveaux cellulaires de PdtIns-3-4-P<sub>2</sub> et de PdtIns-3-4-5-P<sub>3</sub>. De plus, des études cinétiques, utilisant des cellules marquées au <sup>32</sup>P, suggèrent que PdtIns-3-4-P<sub>2</sub> pourrait être produit en partie grâce à l'action de 5-phosphatases sur PdtIns-3-4-5-P<sub>3</sub> (Stephens *et al.*, 1991). Ainsi, la classe I pourrait être plutôt spécifique pour PdtIns-4-5-P<sub>2</sub> *in vivo*. Également, le domaine inter-SH2 de p85 $\alpha$  se lie à PdtIns-4-P et PdtIns-4-5-P<sub>2</sub> *in vitro* (End *et al.*,

1993); cette propriété pourrait permettre la présentation de ces substrats aux sous-unités catalytiques ou de concentrer l'enzyme dans les membranes riches en ces lipides.

Les IP-3 kinases possèdent une activité protéine kinase intrinsèque qui est inséparable de leur activité lipide kinase (Stoyanova *et al.*, 1997; Carpenter *et al.*, 1993). En fait, toutes les phosphoinositides kinases contiennent plusieurs résidus clé conservés dans le domaine catalytique des protéines kinases classiques. Les substrats majeurs de l'activité protéine kinase des IP-3 kinases de classe I sont les résidus sérine situés à l'intérieur de la sous-unité catalytique elle-même et/ou de la sous-unité régulatrice associée. Ainsi, p110 $\alpha$  phosphoryle p85 $\alpha$  au niveau de la sérine 608; de cette phosphorylation découle une inhibition de l'activité lipide kinase (Carpenter *et al.*, 1993). p110 $\delta$  préfère l'auto-phosphorylation à la phosphorylation inter-unité, et son auto-phosphorylation inhibe également son activité enzymatique (Vanhaesebroeck *et al.*, 1997). Par contre, p110 $\gamma$  peut s'auto-phosphoryler sans affecter son activité (Stoyanova *et al.*, 1997). Les complexes p85/p110 peuvent phosphoryler le substrat-1 du récepteur de l'insuline (IRS-1) *in vitro* et possiblement *in vivo* (Lam *et al.*, 1994). Les autres substrats protéiques pour la classe I des IP-3 kinases n'ont pas été identifiés *in vivo*.

L'activité protéine kinase de IP-3 kinase peut donc moduler l'activité lipide kinase.

Cette activité kinase (lipide et protéique) des IP-3 kinases de classe I peut être inhibée par un métabolite provenant d'algues, la wortmannin. La concentration inhibitrice à 50% (IC<sub>50</sub>) varie entre 1 et 10 nM sur les enzymes isolées. Des concentrations similaires sont requises pour inhiber p85/p110 *in vivo*, à en juger les effets sur l'activité de l'enzyme immunoprécipitée à partir de cellules traitées avec la drogue. La wortmannin inhibe de façon irréversible p110 $\alpha$  par liaison covalente à la lysine 802 (Wymann *et al.*, 1996), un résidu requis pour l'activité catalytique qui est conservé chez toutes les phosphoinositides kinases (et les protéines kinases). Un second inhibiteur pharmacologique, Ly294002, a été décrit comme étant un inhibiteur réversible de la classe I, avec une IC<sub>50</sub> d'approximativement 1 $\mu$ M (Vlahos *et al.*, 1994). La wortmannin et le Ly294002 ont été largement utilisés pour étudier le rôle physiologique des IP-3 kinases de classe I dans plusieurs réponses cellulaires. Malheureusement, certaines de ces études doivent être réinterprétées, étant donné l'émergence de nouvelles preuves montrant que de hautes concentrations de ces composés peuvent également inhiber d'autres enzymes, telles que

la PdtIns4K $\beta$  (Meyers et Cantley, 1997), ainsi que les protéines kinases TOR (Brunn *et al.*, 1996) et DNA-PK (Hartley *et al.*, 1995).

#### 4.2.2.2 Régulation

L'activité de la classe Ia des IP-3 kinases est modulée via leur interaction avec les protéines G *ras* (Fig.6). De nombreux signaux extracellulaires activent *ras* en augmentant le ratio GTP lié/GDP. Ainsi, *ras*-GTP interagit avec plusieurs effecteurs, dont p110 $\alpha$ . Son activité est augmentée *in vitro* et *in vivo* par *ras*-GTP (Rodriguez-Viciana *et al.*, 1994). De plus, l'expression de dominant-négatifs de *ras* peut interférer dans la production de phosphoinositides phosphorylés en 3' (Rodriguez-Viciana *et al.*, 1996). Egalement, des mutants du domaine effecteur de *ras* n'interagissent plus avec IP-3 kinase chez certaines réponses cellulaires dépendantes de *ras* (Khwaja *et al.*, 1997; Rodriguez-Viciana *et al.*, 1997).

L'activité et la localisation cellulaire des sous-unités catalytiques des IP-3 kinases de classe I sont aussi modulées par les protéines p85. p85 et ses protéines reliées sont souvent considérées comme des protéines adaptatrices, car elles possèdent plusieurs domaines agissant en tant que modules et ayant la capacité d'interagir avec d'autres protéines de signalisation. Par exemple, le domaine SH2 se lie sélectivement à des résidus phosphotyrosyl (pTyr) de séquences spécifiques. Chez toutes les protéines p85 connues, les régions N-terminale SH2 (N-SH2) et C-terminale SH2 (C-SH2) se lient préférentiellement à des polypeptides contenant le motif p-Tyr-X1-X2-Met (Zhou *et al.*, 1993). Une seconde méthionine ou valine en position X1 augmente l'affinité de liaison, notamment pour le domaine N-SH2 (Zhou *et al.*, 1993). Des peptides synthétiques contenant les motifs tandem pTyr-Met-X-Met (pYMXM) se lient à haute affinité aux protéines p85 et augmentent l'activité catalytique de 2 à 3 fois *in vitro* des sous-unités p110 associées (Carpenter *et al.*, 1993; Backer *et al.*, 1992).

De nombreux stimuli induisent la phosphorylation des motifs YMXM, qui recrutent les complexes p85/p110 et ainsi augmentent l'activité IP-3 kinase (Duckworth et Cantley, 1996). La plupart des agonistes qui activent p110 via les interactions p85/pYMXM, activent également *ras*, lui-même un activateur de p110 (*cf* ci-dessus). Par exemple, le polyome mT possède une séquence YMXM pour interagir avec IP-3 kinase et d'autres

résidus tyrosine qui médient les interactions aboutissant à l'activation de *ras*. Des mutants du polyome mT sont incapables d'activer *ras*, ainsi que la production des phosphoinositides phosphorylés en 3', même lorsque le motif YMXM est intact (Ling *et al.*, 1992; Druker *et al.*, 1990). De nombreuses protéines contenant le motif YMXM sont associées à la membrane, tel que *ras*. Ainsi, le recrutement des complexes p85/p110, non seulement augmente son activité catalytique IP-3 kinase, mais aussi induit sa translocation du cytoplasme à la membrane, où résident ses substrats et potentiels activateurs.

Le domaine SH2 de p85 se lie aussi aux phosphoinositides, notamment au PdtIns-3-4-5P<sub>3</sub>, *in vitro* (Rameh *et al.*, 1995). Il existe une compétition entre la liaison du lipide aux domaines SH2 et des peptides contenant des résidus pTyr, ce qui suggère que la production de PdtIns-3-4-5P<sub>3</sub> par IP-3 kinase activée, induit une dissociation du complexe p85/phosphopeptide de son site d'ancrage pYMXM. Ce modèle est supporté par le fait que le traitement à la wortmannin stabilise les interactions p85/pTyr dans la cellule (Rameh *et al.*, 1995). Il est aussi possible que la liaison du lipide module allostériquement l'activité enzymatique ou influence son attachement à la membrane.

Les domaines SH3 sont connus pour interagir avec les séquences riches en proline, ayant un motif consensus  $\phi$ -P-p- $\phi$ -P, où P est une proline invariante, p une proline faiblement conservée et  $\phi$  un acide aminé aliphatique (Sparks *et al.*, 1996). Ce motif forme une hélice de polyproline de type II, qui pénètre à l'intérieur de la plate-forme hydrophobique du domaine SH3 (Feng *et al.*, 1994). Des protéines de fusion p85 $\alpha$  SH3 ont sélectionnées plusieurs partenaires protéiques possibles provenant d'extraits de cerveau de bœuf, incluant la GTPase dynamine (Booker *et al.*, 1993). De plus, le domaine SH3 de p85 $\alpha$  peut interagir avec les motifs riches en proline de p85 (Kapeller *et al.*, 1994). Les associations intramoléculaires entre ces 2 modules pourraient empêcher la liaison d'autres partenaires de haute affinité dans les cellules non-stimulées.

Les motifs riches en proline de p85 $\alpha$  sont impliqués dans la liaison des domaines SH3 de la famille des *src* kinases, incluant *src* lui-même, *lck*, *lyn* et *fyn* (Kapeller *et al.*, 1994; Karnitz *et al.*, 1994; Pleiman *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1993; Vogel et Fujita, 1993). Le domaine SH3 des tyrosine kinases cytoplasmiques *abl* peut aussi s'associer à p85 $\alpha$  (Kapeller *et al.*, 1994). La liaison de *lyn* et *fyn* se fait de façon plus efficace par le motif

N-terminal de p85 $\alpha$  que par celui du C-terminal (Pleiman *et al.*, 1994). La séquence de la région riche en proline de p85 $\beta$  diffère considérablement de celle des régions analogues de p85 $\alpha$ . De plus, p85 $\beta$  possède un troisième motif PPXP entre le domaine C-SH2 et C-terminal. Ainsi, p85 $\beta$  pourrait sélectionner un autre type de protéines contenant le domaine SH3 *in vivo*. Les sous-unités régulatrices p50 $\alpha$ , p55 $\alpha$  et p55 $\gamma$  possèdent un seul motif polyproline et n'ont pas le motif N-terminal, impliqué dans la liaison de *src*.

La liaison des protéines kinase de la famille *src* via leur domaine SH3 aux motifs riches en proline de p85 ne dépend pas de modifications post-traductionnelles. Les structures cristallographiques de *src* et *hck* dans leur état inactif montre que le domaine SH3 endogène fait un contact intramoléculaire avec l'hélice polyproline (Sicheri *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 1997). L'association intermoléculaire entre la famille des *src* et p85 doit donc requérir la libération des contacts intramoléculaires à l'intérieur de chaque protéine. Ce mécanisme est supporté par le modèle d'association entre la phosphoprotéine *cbl* et p85 $\alpha$ . En effet, la liaison des résidus pTyr de *cbl* aux domaines SH2 de p85 $\alpha$  induit l'exposition du domaine SH3 pour permettre ses interactions de haute affinité aux motifs riches en proline de *cbl* (Soltoff *et al.*, 1996).

La région homologue à *rho*-GAP de p85 $\alpha$  n'a aucune activité promotrice GTPase *in vitro* envers les protéines G *rho*, *rac* et *cdc42*. La structure cristallographique du domaine *rho*-GAP de p85 $\alpha$  est similaire aux *rho*-GAPs, mais ne possède pas 5 résidus conservés, importants pour la catalyse (Barrett *et al.*, 1997; Rittinger *et al.*, 1997; Musacchio *et al.*, 1996). Malgré tout, le domaine *rho*-GAP de p85 $\alpha$  se lie de façon GTP-dépendante à *rac* et *cdc42 in vitro* (Tolias *et al.*, 1995; Zheng *et al.*, 1994). Ainsi, il est possible que *rac* et/ou *cdc42* modulent les complexes p85/p110 comme *ras*, ou aident à la localisation de ces complexes dans des régions spécifiques de la cellule. Etant donné que la région homologue à *rho*-GAP de p85 $\alpha$  se situe entre le domaine SH3 et son second motif polyproline, dans la structure primaire, la liaison des protéines G pourrait empêcher ou augmenter les interactions intramoléculaires décrites ci-dessus. La région *rho*-GAP de p85 $\beta$  est 42% identique à celle de p85 $\alpha$ , et manque également les résidus importants pour l'activité promotrice GTPase (Musacchio *et al.*, 1996; Otsu *et al.*, 1991).

p110 $\gamma$  diffère des autres enzymes de classe I car elle peut être directement activée par les sous-unités  $\alpha$  et  $\gamma$  des protéines G hétérotrimériques (Lopez-Illasaca *et al.*, 1997; Tang et

Downes, 1997; Stoyanov *et al.*, 1995; Stephens *et al.*, 1994). Par exemple, la liaison du ligand des récepteurs serpentine, couplés aux protéines G, augmente le niveau des PtdIns phosphorylés en 3' via p110 $\gamma$  (Lopez-Illasaca *et al.*, 1997). p101 peut se lier aux sous-unités  $\alpha$  et  $\gamma$  des protéines G et, ainsi, être directement activée (Stephens *et al.*, 1997). Les complexes p85/p110 peuvent également être activés par les sous-unités  $\alpha$  et  $\gamma$ , mais seulement en présence de peptides pTyr, qui se lient aux domaines SH2 de p85 (Tang et Downes, 1997; Okada *et al.*, 1996). Par contre, l'activité de p110 $\gamma$ /p101 n'est pas affectée par ces peptides phosphotyrosyl. p110 $\gamma$  contient aussi un domaine de liaison à *ras*. Bien que p110 $\gamma$  s'associe à ce dernier *in vitro*, aucun rôle de *ras* n'a pu être démontré dans l'activation de p110 $\gamma$  (Rubio *et al.*, 1997).

La régulation de l'activité IP-3 kinase peut donc se faire par les petites protéines G, tels que *ras* qui s'associe à p110, ou *rho* et *rac* qui s'associent à p85 $\alpha$ . p85 $\alpha$  peut également s'associer aux molécules de la famille de *src* via ses domaines SH2/SH3. Le but de ces interactions permet d'augmenter l'activité IP-3 kinase, et également de faciliter sa localisation intracellulaire.

### 4.3 La classe II des IP-3 kinases

#### 4.3.1 Structure

Les IP-3 kinases sont des protéines de haut poids moléculaires (170-210 kDa), contenant un domaine PIK et un domaine catalytique, similaire à 45-50% à celui de la classe I (Fig.7). Les gènes de classe II ont été clonés chez l'homme, la souris, *D. melanogaster*, *D. discoideum* et *C. elegans* (Domin *et al.*, 1997; Molz *et al.*, 1996; Virbasius *et al.*, 1996; MacDougall *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 1995). Chacune de ces protéines possède une région C-terminale, homologue aux domaines C2; ainsi, la classe II a été nommée cpk ("C2 containing phosphoinositide kinase"). Les domaines C2 se retrouvent également chez certains isoformes PKCs Ca<sup>2+</sup>-dépendants (*cf* chapitre 3). Mais chez les IP-3 kinases de classe II, certains résidus Asp, importants pour la liaison du Ca<sup>2+</sup>, sont absents. Ainsi, l'IP-3 kinase de classe II de drosophile se lie aux phospholipides acides, mais de façon indépendante du Ca<sup>2+</sup> (MacDougall *et al.*, 1995). De plus, les cpk $\alpha$  et  $\beta$  de mammifères ont un motif additionnel nommé PX, retrouvé chez les protéines phox-40 et phox-47, qui

sont associées à la NADPH oxidase (Fig.7). La fonction des domaines PX est, pour l'instant, inconnue.

#### 4.3.2 Activité et régulation

*In vitro*, les IP-3 kinases de classe II phosphorylent préférentiellement PdtIns et PdtIns-4-P, alors que la *cpkα* humaine phosphoryle PdtIns-4-5-P<sub>2</sub> en présence de phosphatidylsérine (Domin *et al.*, 1997). Les enzymes de drosophile, de souris et d'origine humaine, diffèrent significativement dans leur sensibilité à l'inhibition par la wortmannin (les valeurs d'IC<sub>50</sub> sont 5, 50 et 450 nM, respectivement) (Domin *et al.*, 1997; Virbasius *et al.*, 1996; MacDougall *et al.*, 1995). La régulation de l'activité des enzymes de classe II ainsi que les lipides produits *in vivo* n'a pas encore été définie.

#### 4.4 La classe III des IP-3 kinases

##### 4.4.1 Structure

Le prototype des IP-3 kinases de la classe III a été d'abord identifié chez des mutants ayant un déficit dans le transport des protéines de la vacuole chez la levure (Herman et Emr, 1990). Le gène correspondant, VPS34, a été cloné et est essentiel au transport des protéines nouvellement synthétisées du Golgi à la vacuole, un organelle similaire au lysosome chez les eucaryotes supérieurs. Cette protéine de levure a une activité lipide kinase et possède de nombreuses homologues de séquence avec p110, dont notamment le domaine PIK (Fig.7; Schu *et al.*, 1993).

##### 4.4.2 Activité et régulation

Les IP-3 kinases de classe III phosphorylent uniquement PdtIns, ce qui les différencie des autres classes, qui ont un plus large spectre de substrats. Bien que VPS34 de levure est relativement insensible à la wortmannin (IC<sub>50</sub> de 2.5 μM), ses homologues chez l'homme et la drosophile sont inhibées à des valeurs d'IC<sub>50</sub> de 2-10 nM. De plus, le traitement à la wortmannin diminue le taux de PdtIns-3-P dans les plaquettes sanguines (Kovacsovics *et al.*, 1995; Toker *et al.*, 1995).

La protéine de levure VPS34 s'associe à une autre protéine, VPS15, aussi requise pour la sortie des vésicules (Stack *et al.*, 1993). VPS15 est une sérine/thréonine kinase qui recrute VPS34 aux membranes et augmente son activité lipide kinase. Chez l'homme, le gène codant pour une protéine identique à 30% en acide aminés à VPS15 a été clonée. Cette protéine joue le rôle de protéine adaptatrice pour les IP-3 kinases de classe III (Panaretou *et al.*, 1997). Le rôle et la régulation des enzymes de classe III restent à déterminer.

#### 4.5 IP-3 kinases et cancer

L'intérêt initial de l'étude des IP-3 kinases provient du fait que ces kinases sont capables de s'associer à des oncoprotéines virales, telles que *src*, *abl* et l'antigène T; ce qui suggère l'implication des IP-3 kinases dans la transformation maligne des cellules. En effet, des formes mutantes de ces protéines virales perdent la capacité de former les complexes avec IP-3 kinase, d'où une diminution de l'activité transformante de ces oncogènes (Varticovski *et al.*, 1991; Fukui *et al.*, 1989; Courtneidge *et al.*, 1987; Whitman *et al.*, 1985). La formation de complexes IP-3 kinase/oncoprotéines induit l'activation de IP-3 kinase et donc une augmentation des taux de PdtIns phosphorylés. Ainsi, il existe une corrélation entre le taux intracellulaire de phosphoinositides et l'efficacité de transformation (Cantley *et al.*, 1991; Fukui *et al.*, 1991; Varticovski *et al.*, 1991).

La question d'une activité indépendante oncogénique de IP-3 kinase est restée sans réponse jusqu'en 1997, où un gène viral analogue à la sous-unité catalytique p110 a été découvert dans le génome de ASV 16 ("avian sarcoma virus 16") (Chang *et al.*, 1997). Les études portant sur le potentiel transformant de ce gène, nommé *p3k*, ont montré qu'il pouvait induire une transformation morphologique des fibroblastes embryonnaires de poulet *in vitro* (Chang *et al.*, 1997). La transformation des cellules par le gène *p3k* s'accompagne d'une augmentation drastique de l'activité des protéines kinases B (PKB), codées par le proto-oncogène *Akt* (Chang *et al.*, 1997). En effet, les PKB/Akt sont directement activées par les produits de IP-3 kinase (Klippel *et al.*, 1997; Burgering et Coffer, 1995), ou par les phosphoinositide kinases, nommées PKD, effecteurs directs de IP-3 kinase (Le Good *et al.*, 1998). L'activation des PKB/Akt permet un blocage partiel

des processus apoptotiques et est impliquée dans la survie cellulaire (Kulik *et al.*, 1997; Khawja *et al.*, 1997; Kauffmann-Zeh *et al.*, 1997). En plus de l'activation du signal dépendant des PKB, l'activation de plusieurs proto-oncogènes, tels que *ras*, aboutissant à l'augmentation de l'activité du facteur de transcription AP-1, joue possiblement un rôle dans l'effet transformant médié par IP-3 kinase (Huang *et al.*, 1997).

A la transformation cellulaire s'associe une réorganisation du cytosquelette d'actine (Rodriguez-Viciano *et al.*, 1997; Janmey, 1994; Bar Sagi et Feramisco, 1986). IP-3 kinase semble jouer un rôle essentiel dans la réorganisation des filaments d'actine de la cellule, via les protéines G *rac*, possibles effecteurs de IP-3 kinase (Coso *et al.*, 1995; Hawkins *et al.*, 1995; Hill *et al.*, 1995; Minden *et al.*, 1995; Zheng *et al.*, 1994), ou via PdtIns-4-5-P<sub>2</sub>, substrat de IP-3 kinase, qui interagit avec les protéines se liant à l'actine, et stimule ainsi sa polymérisation (Hartwig *et al.*, 1995; Tolias *et al.*, 1995; Chong *et al.*, 1994; Janmey, 1994). L'activation de IP-3 kinase par des facteurs mitogéniques induit une diminution du taux de PdtIns-4-5-P<sub>2</sub> lié à l'actine, et donc, une dépolymérisation (Fukami *et al.*, 1994; Fukami *et al.*, 1992).

La découverte d'une activité oncogénique de IP-3 kinase est la preuve du rôle important de cette enzyme dans la carcinogénèse et la croissance tumorale. En fait, quelques données ont montré un changement du taux des phosphoinositides durant la progression de tumeurs malignes (Bordoni *et al.*, 1992). De plus, une activation significative de IP-3 kinase a été observée chez 79% des tumeurs du sein, par rapport aux tissus adjacents normaux (Gershtein *et al.*, 1999). Il a été également démontré que l'inhibition de IP-3 kinase pouvait activer certains gènes suppresseurs de tumeurs, tels que PTEN/MMCA1, qui code pour une phosphatase qui déphosphoryle PdtIns-3-4-5-P<sub>3</sub> (Wu *et al.*, 1998). D plus, les inhibiteurs spécifiques de IP-3 kinase (wortmannin et LY294002) induisent un retard significatif de la croissance cellulaire et empêchent les cellules d'être transformées *in vitro* (Huang *et al.*, 1997; Vlahos *et al.*, 1994; Yano *et al.*, 1993). Au niveau du gliome, une augmentation de l'activité IP 3-kinase a également été détectée, probablement due à la perte de l'expression de son antagoniste naturel PTEN/MMCA1 (Li *et al.*, 1997).

En plus de son potentiel transformant, IP-3 kinase semble aussi contrôler l'invasion des cellules cancéreuses, via l'expression des MMPs.

#### 4.6 IP-3 kinase et MMPs

Plusieurs études ont montré l'implication de IP-3 kinase dans l'expression des MMPs, et notamment de MMP-9. En effet, l'expression de MMP-9, induite par EGF, est inhibée chez des cellules cancéreuses ovariennes ou mammaires, traitées à la wortmannin ou au LY294002 (Ellerbroeck *et al.*, 2001; Reddy *et al.*, 1999). De plus, les PKB/Akt, effecteurs de IP-3 kinase, agissent en tant que promoteurs de l'invasion des fibrosarcomes HT1080, *in vitro*, via l'induction de l'expression de MMP-9 (Kim *et al.*, 2001). IP-3 kinase semble également contrôler l'expression de TIMP-1, induite par l'érythropoïétine, chez les cellules érythroïdes (Kadri *et al.*, 2000). Le rôle de IP-3 kinase dans le contrôle de l'équilibre de l'expression MMPs/TIMPs permet à cette kinase d'être également impliquée dans les processus angiogéniques, induits par transfection de *H-ras*, chez les cellules endothéliales (Arbiser *et al.*, 1997). Elle jouerait donc un rôle central dans le développement tumoral.

Bien que les voies de signalisation associées aux récepteurs membranaires contrôlant l'expression des MMPs et TIMPs commencent à être mieux connues, il est important de compléter ces études au niveau transcriptionnel, notamment en ce qui a trait aux mécanismes épigénétiques, tel que la méthylation de l'ADN. Ces mécanismes semblent jouer un rôle important dans la régulation transcriptionnelle des gènes durant l'évolution des cancers vers un phénotype malin.

## 5. LA MÉTHYLATION DE L'ADN

### 5.1 Définitions

La méthylation de l'ADN chez les mammifères concerne environ 3 à 4% des cytosines. La plupart ou la totalité de ces 5-méthylcytosines se trouve dans la séquence dinucléotidique CpG (Bird, 1992). La majorité des séquences CpG (plus de 70%) sont méthylées chez le génome humain (Bird, 1987). Certaines régions de l'ADN, de 500 à 2000 bp de longueur, ont une fréquence élevée en CpG et sont appelées "îlots CpG" ou "CpG islands". Ces îlots se retrouvent fréquemment au niveau des promoteurs et des sites d'initiation de transcription d'approximativement la moitié des gènes humains (Bird, 1992). Pour vraisemblablement la totalité de ces gènes, les CpG ne sont pas méthylées chez différents types de cellules normales. Cette hypométhylation permettrait la maintenance d'une transcription active de ces gènes (Antequera et Bird, 1993). En effet, la méthylation des îlots CpG, présents dans le promoteur d'un gène, est souvent corrélée à une baisse ou à une suppression de la transcription de ce gène (Baylin *et al.*, 1998). Cet état d'hyperméthylation des promoteurs a souvent été observé chez différents types de cancers.

Deux types de méthylation peuvent arriver dans une cellule : la méthylation *de novo* et la méthylation de maintenance (Hendrich et Bird, 2000). Quand un site qui était préalablement non méthylé devient méthylé, on dit que ce site a été méthylé *de novo*. Quand un ADN contenant un CpG méthylé symétrique se réplique, le résultat est deux molécules double brin d'ADN, chacune contenant un CpG dinucléotidique méthylé sur le brin parental mais comprenant un CpG non méthylé sur le brin nouvellement synthétisé. L'état de méthylation du site de la molécule parentale est maintenu dans les molécules filles quand la méthyltransférase de maintenance reconnaît le site hémiméthylé et méthyle la cytosine non méthylée, restaurant ainsi la symétrie des paires CpG dinucléotidiques méthylés. Ces mécanismes de méthylation semblent mettre en jeu différentes enzymes, appelées méthyltransférases.

## 5.2 Les Méthyltransferases

La méthylation des cytosines au niveau des séquences dinucléotidiques CpG se fait grâce à des enzymes capables de transférer en 5' des cytosines un groupement méthyle, provenant d'un donneur (le S-adenosyl-L-méthionine ou "SAM"). Ces enzymes nucléaires sont communément appelées DNMTs pour "DNA methyltransferases". Actuellement, il existe 3 DNMTs connues chez les mammifères : DNMT1, DNMT2 et DNMT3.

### 5.2.1 DNMT1

DNMT1 a été la première méthyltransferase identifiée chez les mammifères (Bestor *et al.*, 1988). Cette protéine de 190 kDa comprend un domaine catalytique dans sa région C-terminale et un domaine N-terminal d'environ 1000 acides aminés (Fig.10). Ce domaine N-terminal confère à l'enzyme une préférence pour l'ADN hémiméthylé, bien qu'elle possède aussi une activité méthylase *de novo* (Pradhan *et al.*, 1997; Leonhardt et Bestor, 1993). La région N-terminale permet également le ciblage de la protéine au site de réplication de l'ADN (Chuang *et al.*, 1997; Leonhardt *et al.*, 1992). DNMT1 est une enzyme ubiquitaire, responsable de la maintenance de la méthylation, notamment durant la réplication des cellules somatiques. Ainsi, une délétion homozygote du gène DNMT1 chez la souris produit une létalité embryonnaire (Li *et al.*, 1992) et une incapacité des cellules souches embryonnaires de se différencier (Beard *et al.*, 1995).

Au niveau du cancer, plusieurs études ont suggéré que l'augmentation de l'activité de DNMT1 pourrait jouer un rôle dans la transformation cellulaire. En effet, la surexpression du gène DNMT1 par transfection des cellules NIH 3T3, induisant le même niveau d'expression que celui observé chez les cellules tumorales, peut entraîner une transformation cellulaire (Wu *et al.*, 1993). De plus, DNMT1 semble être également impliquée dans la transformation cellulaire induite par l'oncogène *c-fos* (Bakin et Curran, 1999). Les cellules transfectées avec le gène codant pour DNMT1 ont montré une augmentation de la méthylation globale du génome (Bakin et Curran, 1999; Wu *et al.*, 1993) et, chez les fibroblastes humains, l'hyperméthylation d'ilôts CpG au niveau de certains promoteurs (Vertino *et al.*, 1996). Ainsi, grâce à son activité méthylase, DNMT1 pourrait donc réprimer l'expression de certains gènes. Bien que le rôle de DNMT1 soit

bien documenté, la régulation de son expression et de son activité dans la cellule demeure peu connue.

Il est intéressant de noter que, malgré la délétion du gène DNMT1 chez les cellules souches embryonnaires, il subsiste une activité méthylase *de novo*, suggérant la présence d'autres méthyltransférases (Okano *et al.*, 1998a).

### 5.2.2 DNMT2

DNMT2 a été identifiée dans les banques de données EST ("expressed sequence tag") en recherchant des gènes ayant le potentiel de coder pour des motifs communs aux cytosine méthyltransférases (Posfai *et al.*, 1989). Le gène découvert a été nommé DNMT2 (Yoder et Bestor, 1998). DNMT2 ne contient que le domaine catalytique C-terminal (Fig.10), mais ne possède aucune activité méthylase *in vitro* (Okano *et al.*, 1998a; Yoder et Bestor, 1998). De plus, la délétion de ce gène chez des cellules souches embryonnaires n'affecte pas l'activité méthylase *de novo* (Okano *et al.*, 1998a). Le rôle de DNMT2 est donc pour l'instant inconnu.

### 5.2.3 DNMT3 $\alpha$ et DNMT3 $\beta$

Deux autres candidats pour l'activité méthylase *de novo* ont été identifiés, de la même façon que DNMT2. DNMT3 $\alpha$  et DNMT3 $\beta$  sont des protéines très similaires (Fig.10) mais sont codées par des gènes différents (Okano *et al.*, 1998b). Elles possèdent une activité méthylase *de novo*, et sont fortement exprimées chez des cellules souches embryonnaires non différenciées (Okano *et al.*, 1998b). Elles pourraient donc jouer un rôle majeur dans le développement précoce de l'embryon. Les deux isoformes sont également surexprimés chez certains types de cancers (Kanai *et al.*, 2001).

Ainsi, il apparaît que les différentes méthylases ont des rôles distincts dans la cellule :

- DNMT1 pour la méthylation de maintenance
- DNMT3 $\alpha$  et  $\beta$  pour la méthylation *de novo*

De plus, ces méthylases, et notamment DNMT1, semblent être également impliquées dans le développement des tumeurs.

### 5.3 Méthylation et cancer

#### 5.3.1 Méthylation et gènes suppresseurs de tumeurs

Durant les cinq dernières années, plusieurs études ont montré que les promoteurs de gènes, contenant des îlots CpG, qui ne sont pas méthylés dans les cellules normales, deviennent méthylés, à différents degrés, chez de multiples cancers humains (Jones et Laird, 1999; Baylin *et al.*, 1998; Jones, 1996). Cette méthylation aberrante ou hyperméthylation est souvent associée à une expression réduite ou supprimée du gène dans les cellules tumorales, comparativement au tissu normal d'où provient la tumeur. Ces gènes hyperméthylés au niveau de leurs CpG présents dans leurs promoteurs, sont souvent des gènes suppresseurs de tumeurs. Ainsi, p16, un des gènes les plus fréquemment hyperméthylés, perd sa fonction chez les néoplasmes humains (Gonzalez-Zulueta *et al.*, 1995; Herman *et al.*, 1995; Merlo *et al.*, 1995). Le gène p16 code pour une kinase inhibitrice des cyclines, molécules impliquées dans la croissance cellulaire. La perte de son expression favorise donc une croissance incontrôlée des cellules. L'hyperméthylation de son promoteur, détectée chez des polypes pré-malins, précurseurs de cancers du colon, suggère que la méthylation serait une étape précoce dans l'immortalisation des cellules (Herman *et al.*, 1995; Silverman *et al.*, 1989). D'autres gènes, tels que hMLH1 ("human mut-L homologue 1") et MGMT ("Méthylguanosine méthyltransferase"), qui sont impliqués dans les processus de réparation de l'ADN, peuvent également être hyperméthylés chez différents types de cancers et perdent leur expression (Kane *et al.*, 1997; Esteller *et al.*, 1999). La perte de ces enzymes, et notamment celle de MGMT, serait déterminante pour la fréquence de mutations observées chez *ras* au niveau du cancer du colon (Esteller *et al.*, 2000).

La méthylation de l'ADN peut donc favoriser le développement des tumeurs en agissant sur l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs.

### 5.3.2 Les mécanismes de répression

Deux modes de répression peuvent être envisagés, et il est vraisemblable que les deux soient biologiquement pertinents. Le premier mécanisme implique l'interférence directe d'un groupe méthyle dans la liaison d'une protéine à la séquence d'ADN qu'elle reconnaît. Plusieurs facteurs de transcription sont connus pour lier des séquences contenant des CpG, et certains ne peuvent plus se lier lorsque le CpG est méthylé (Tate et Bird, 1993; Iguchi-Arigo et Schaffner, 1989; Watt et Molloy, 1988). C'est le cas du facteur de transcription AP-2, qui contrôle l'expression du gène de la pro-enképhaline (Comb et Goodman, 1990). Par contre, ces gènes dépendants de l'activité de facteurs de transcription sensibles à la méthylation, ne sont pas nécessairement contrôlés par la méthylation de l'ADN. Il existe également des facteurs de transcription insensibles à la méthylation, bien que leurs séquences cibles contiennent des CpG (Ben-Hattar *et al.*, 1989; Harrington *et al.*, 1988; Holler *et al.*, 1988). Ce modèle ne peut donc expliquer tous les exemples de répression par méthylation.

Le second mécanisme de répression est opposé au premier, car il implique des protéines qui sont attirées, et non pas repoussées, par les CpG méthylées. Une famille de cinq protéines se liant aux CpG méthylées par l'intermédiaire de leur domaine MBD ("Methyl binding domain") a été caractérisée. Quatre de ces protéines (MBD1, MBD2, MBD3 et MeCP2) sont impliquées dans la répression de la transcription médiée par la méthylation (Bird et Wolffe, 1999). En effet, ces protéines recrutent l'activité deacétylase des histones dans l'ADN méthylé, ce qui induit la deacétylation des queues d'histone autour de la chromatine et établit ainsi un domaine chromatine répresseur, incapable d'être transcriptionnellement actif (Jones *et al.*, 1998; Nan *et al.*, 1998; Kass *et al.*, 1997; Pazin et Kadonaga, 1997).

Il existe donc 2 mécanismes : - un direct, impliquant l'impossibilité de liaison des facteurs de transcription à leurs séquences cibles méthylées

- un indirect, faisant intervenir un complexe de protéines se liant aux cytosines méthylées, capables de changer la conformation de l'ADN et ainsi d'induire une répression transcriptionnelle.

Ces mécanismes pourraient être impliqués dans la régulation de l'invasion des cellules cancéreuses.

#### **5.4 Méthylation et invasion tumorale**

Plusieurs types de tumeurs solides ont montré une hyperméthylation du promoteur de TIMP-3, associée à la baisse de son expression dans ces tumeurs (Bachman *et al.*, 1999), favorisant ainsi l'activité MMP et donc l'invasion tumorale. L'expression de certaines molécules d'adhésion, telle la cadhérine-E, qui pourrait avoir un effet protecteur contre le comportement invasif des cellules cancéreuses, peut également être réprimée par la méthylation (Graff *et al.*, 1998; Yoshiura *et al.*, 1995).

Etant donné l'importance grandissante de l'activité méthyltransférase dans le développement des tumeurs, plusieurs essais cliniques ont été essayés, utilisant l'azacytidine, un inhibiteur de l'activité méthyltransférase, afin de réactiver l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs. Malheureusement, la liaison covalente de cette molécule à l'ADN induit des dommages cellulaires et donc de la cytotoxicité (Ferguson *et al.*, 1997; Juttermann *et al.*, 1994).

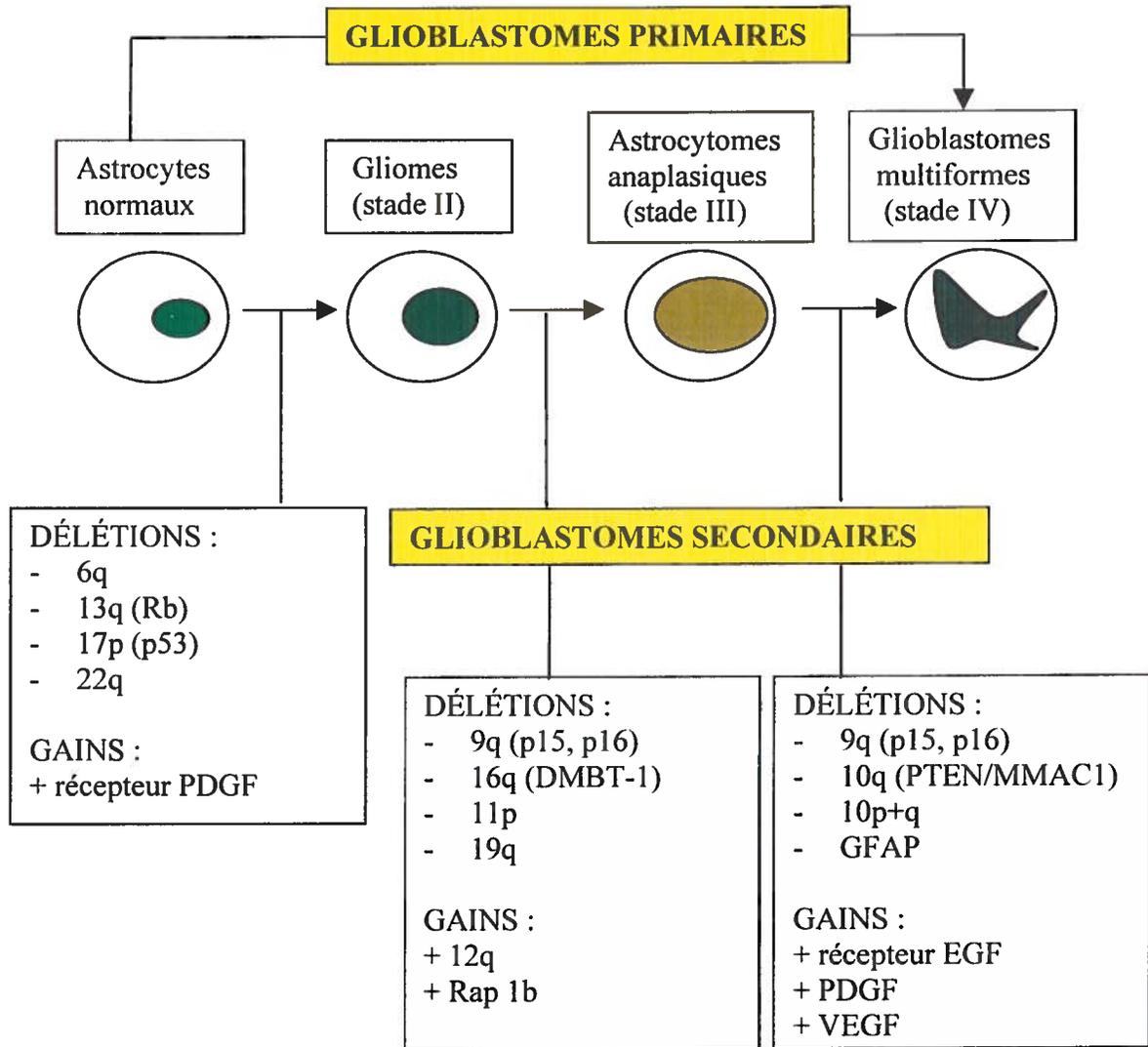
Dans le premier chapitre, nous avons abordé la question de la régulation de l'expression de MMP-9 par des facteurs physiologiques chez le gliome (Fig.9). Jusqu'ici l'induction de l'activité MMP-9 *in vitro* chez le gliome se faisait à l'aide de composés pharmacologiques, tels les phorbol esters (Apodaca *et al.*, 1989). Etant donné que certaines cytokines, comme l'IL-1, le TNF- $\alpha$  ou le TGF- $\beta$ , ont la capacité d'induire l'expression de MMP-9 dans d'autres types cellulaires, nous avons émis l'hypothèse que ces cytokines, sécrétées par le gliome, sont capables de moduler l'expression de cette MMP dans les cellules cancéreuses d'origine gliale.

Dans un deuxième temps, nous avons établi l'implication des isoformes PKCs, comme seconds messagers, dans l'induction de l'expression de MMP-9 par les cytokines chez le gliome de rat C6. Etant donné que le PMA, un activateur des isoformes PKC classiques, s'est révélé incapable d'induire l'expression de MMP-9 dans le modèle C6, nous avons suggéré l'implication d'autres isoformes, les PKC atypiques, non activés par le PMA, dans la régulation de l'expression de MMP-9 par les cytokines IL-1 et TNF- $\alpha$ . L'isoforme PKC- $\zeta$  a retenu notre attention, ces cytokines pouvant induire l'activité de cet isoforme dans d'autres types de cancers.

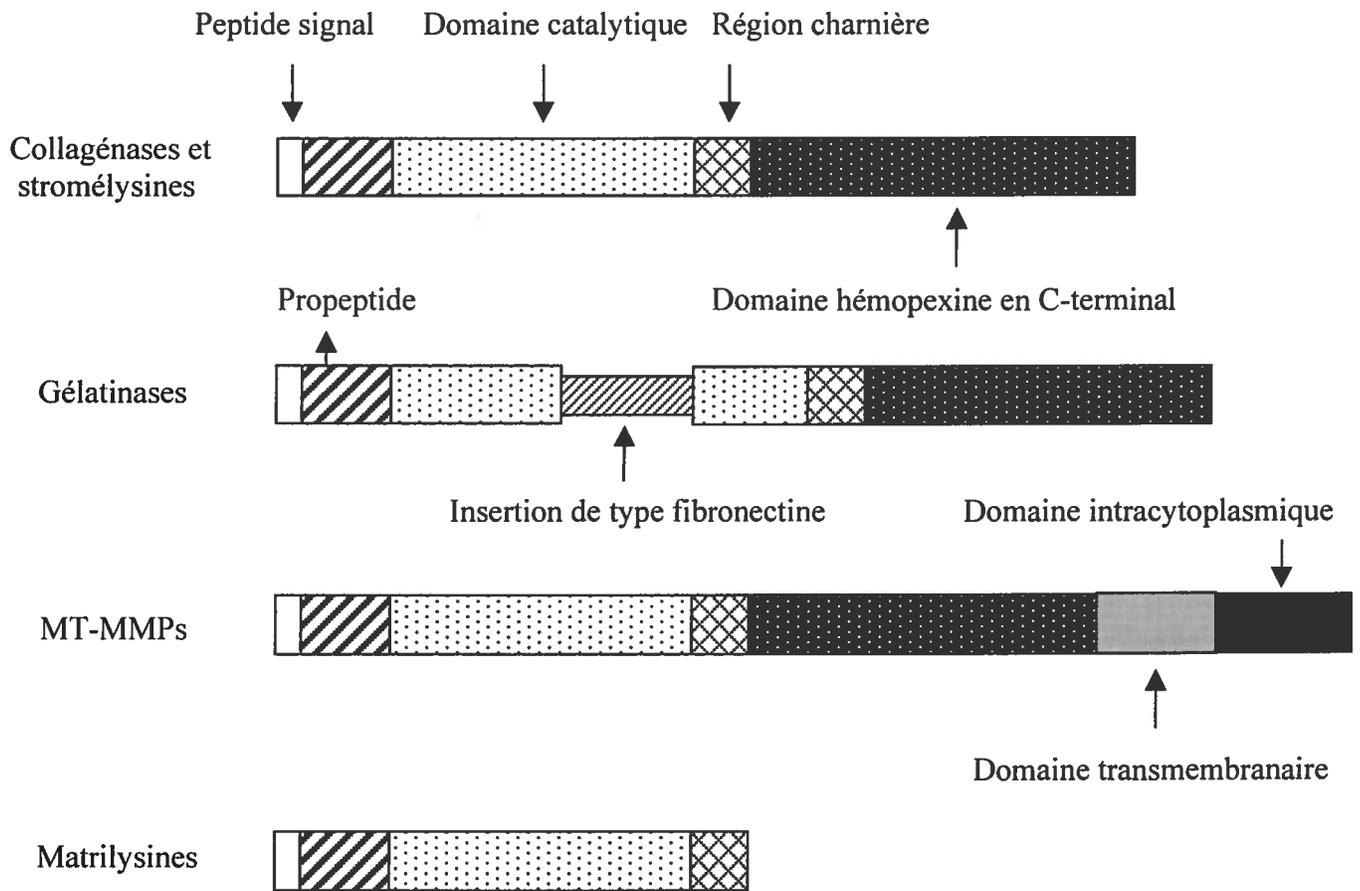
Dans le troisième chapitre, nous avons déterminé le rôle d'une autre molécule intracellulaire, l'IP 3-kinase, dans la régulation de l'expression de MMP-9 chez le gliome, étant donné que cette enzyme est impliquée dans la régulation de l'activation de l'isoforme PKC- $\zeta$ .

Enfin, nous avons obtenu des résultats préliminaires, présentés en annexe, démontrant que l'isoforme PKC- $\zeta$  peut favoriser l'invasion du gliome, non seulement par induction de l'expression de MMP-9, mais aussi, par inhibition de l'expression des TIMPs chez le gliome. Cette observation, obtenue par RT-PCR, reste à être confirmée par immunobuvardage. Le mécanisme transcriptionnel des TIMPs étant sous le contrôle de l'état de méthylation des cytosines de leurs promoteurs, nous avons émis l'hypothèse que l'isoforme PKC- $\zeta$  peut agir sur l'activité méthyltransférase, responsable des niveaux d'expression des TIMPs.

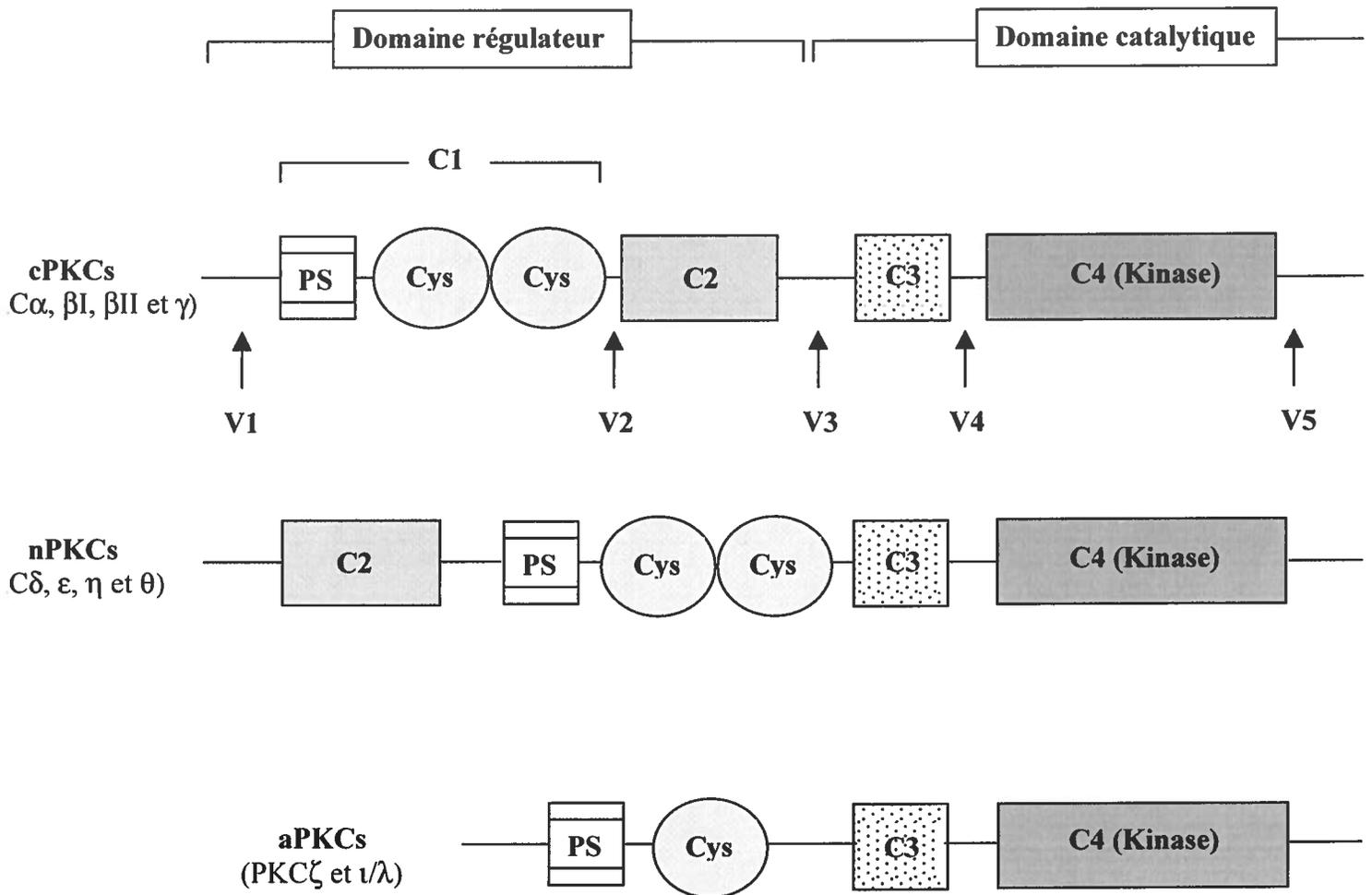
**Figure 1 : Le développement du gliome**



**Figure 2 : Structures générales des MMPs**

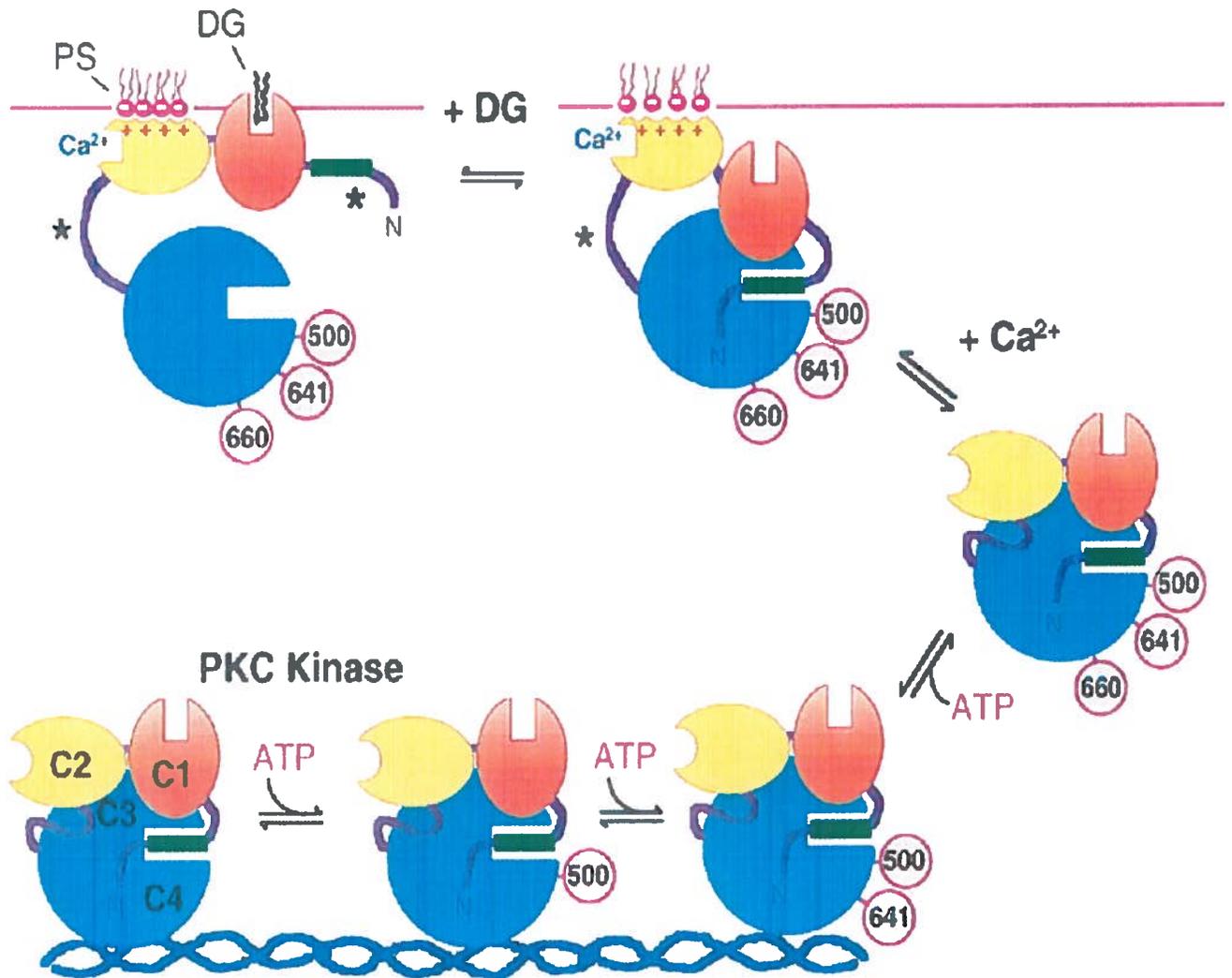


**Figure 3 : Structure des différents isoformes de PKC**



PS : pseudosubstrat  
 Cys : région riche en cystéine  
 C1-4 : régions conservées  
 V1-5 : régions variables

**Figure 4 : Mécanisme d'activation des PKCs**

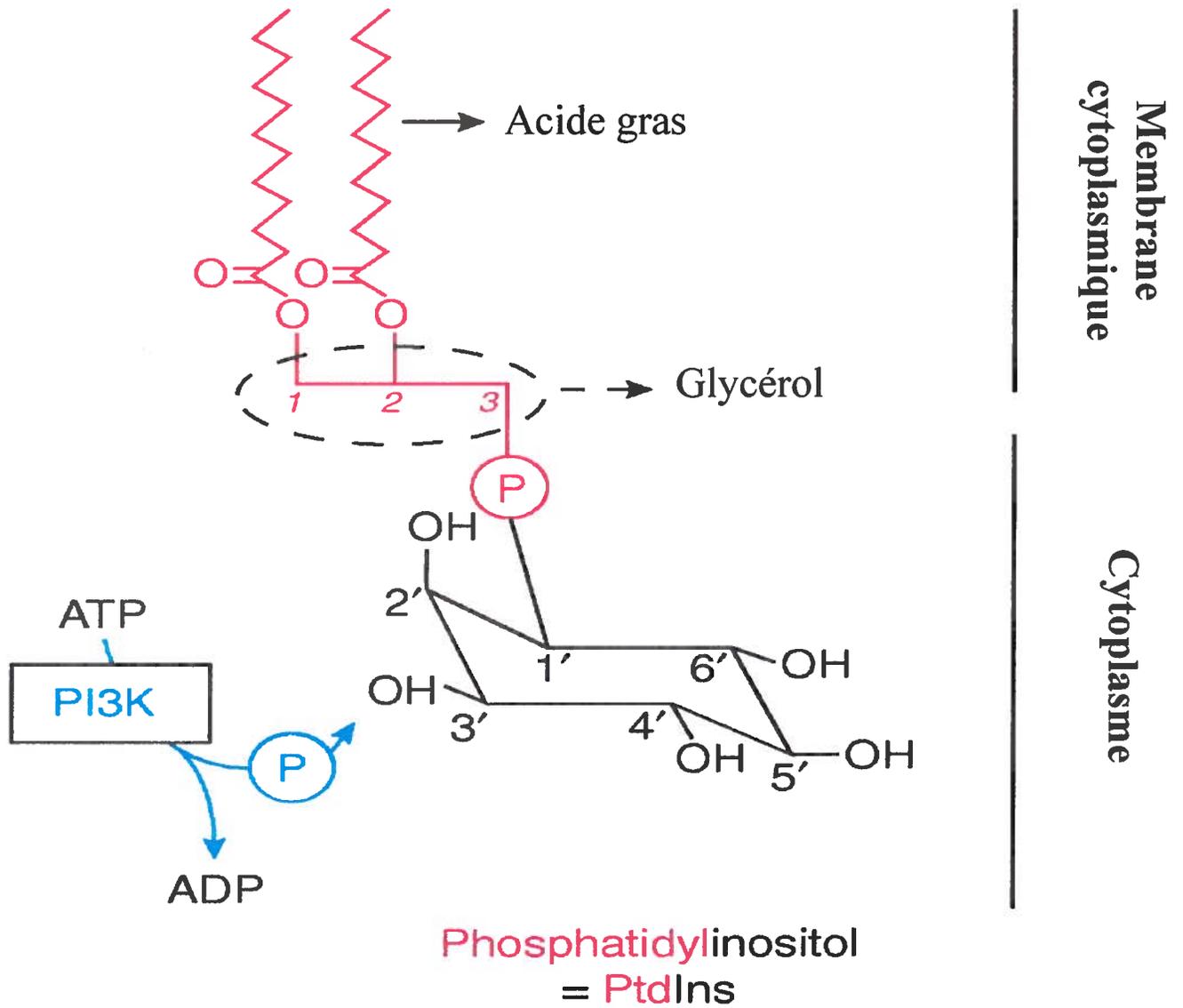


PS : phosphatidylsérine  
 DG : diacylglycérol  
 C1-4 : régions conservées de la PKC  
 500-641 et 660 : amino-acides phosphorylés

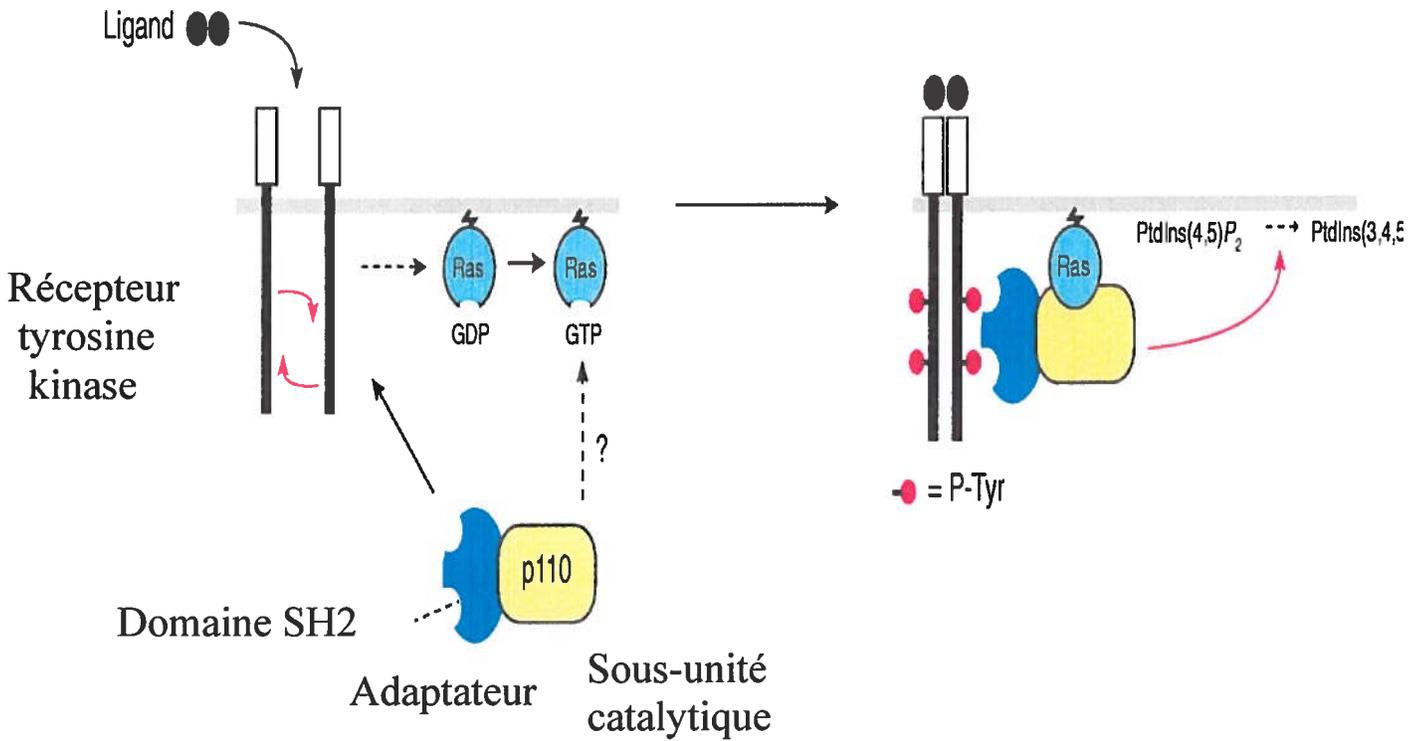
**Légende :** Schéma représentant la régulation de l'activation des PKCs par la phosphorylation de leur amino-acides 500, 641 et 660.

(Newton A.C., 1995)

Figure 5 : Fonction de l'IP 3-kinase

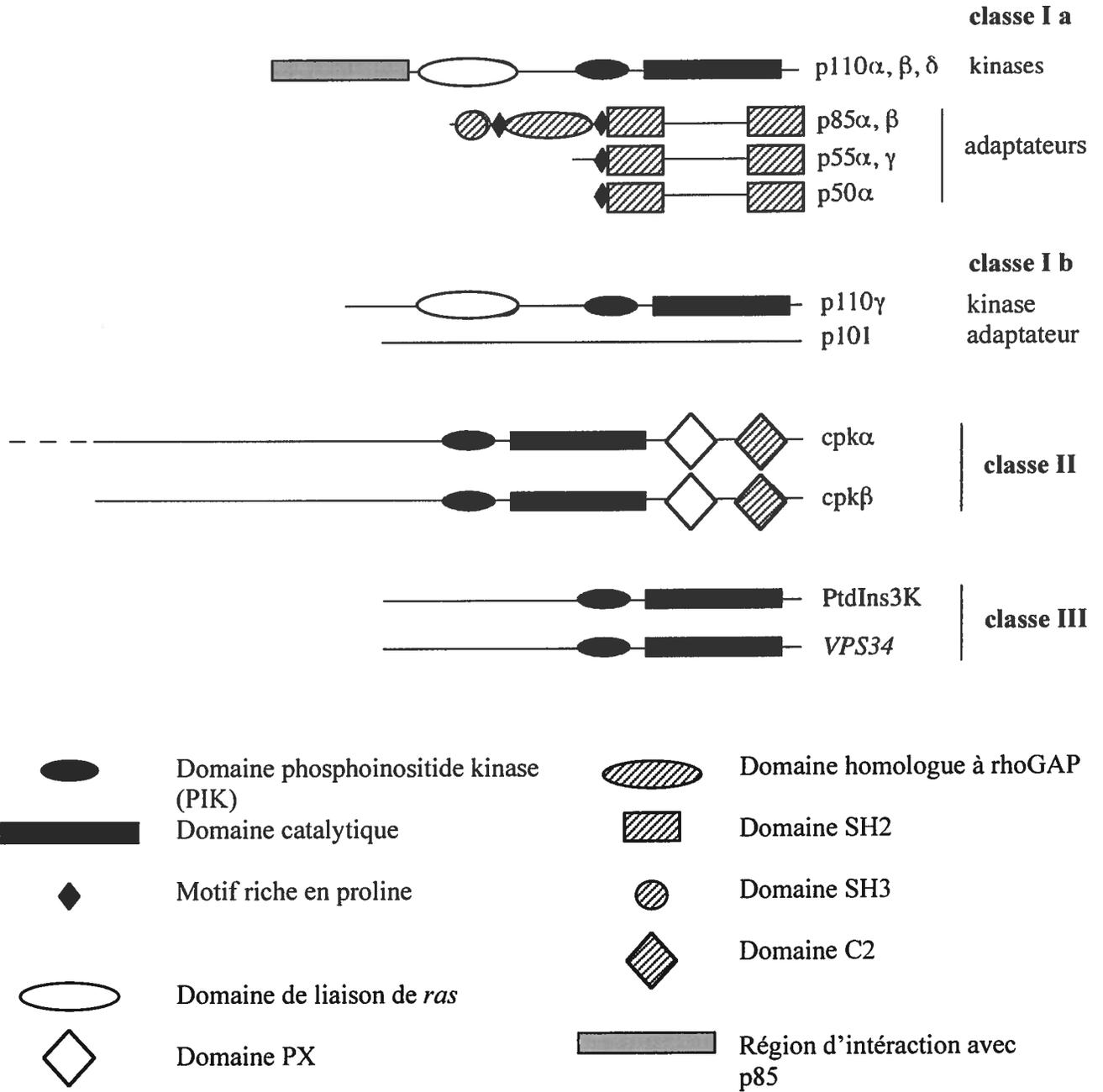


**Figure 6 : Recrutement de l'IP 3-kinase**

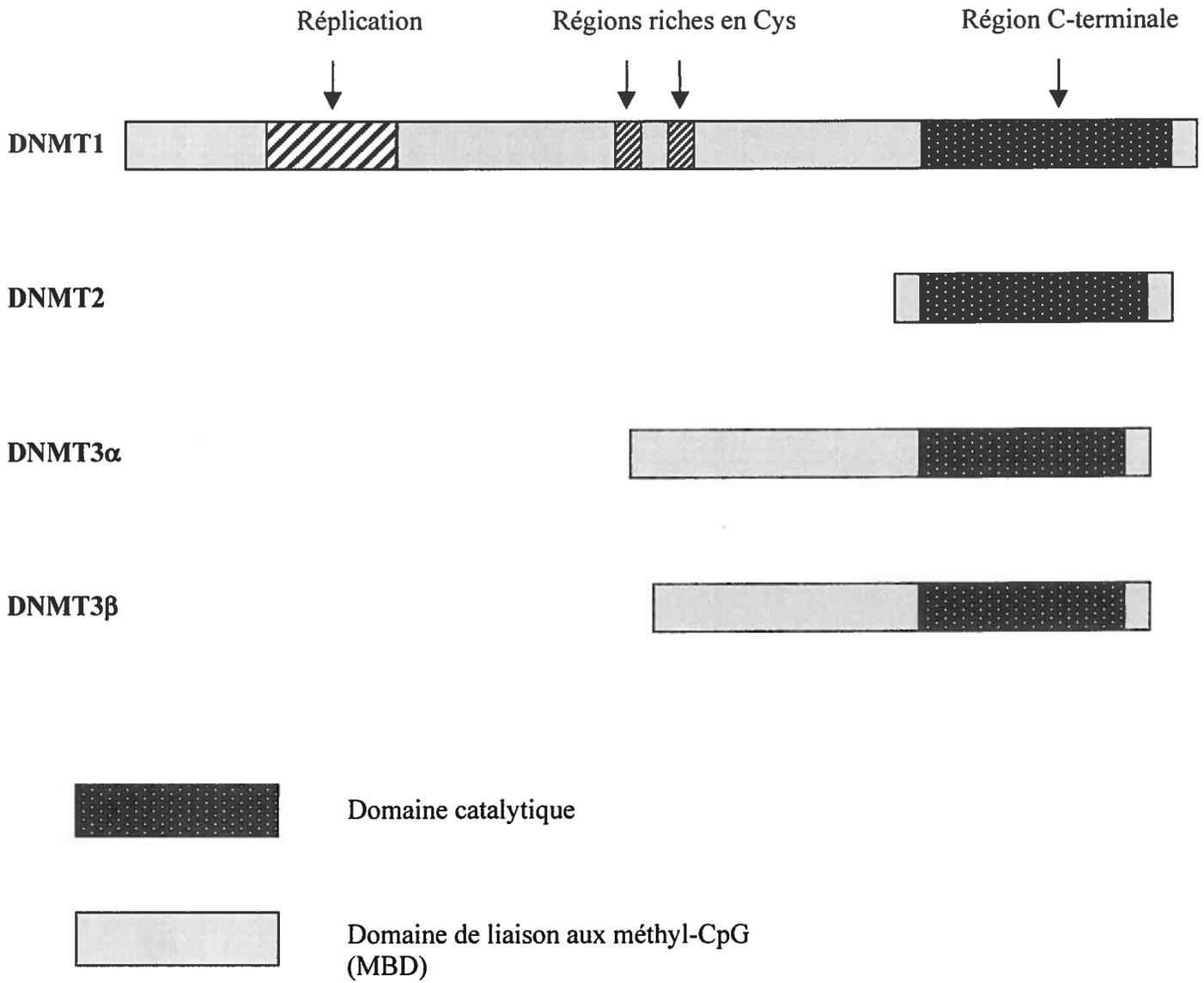


**Légende :** Schéma représentant le recrutement de l'IP 3-kinase. Suite à la dimérisation des récepteurs tyrosine kinase, induite par la liaison de leur ligand, le domaine SH2 de l'IP 3-kinase vient interagir avec les tyrosine phosphorylées (pTyr), en coopérant avec la molécule *ras*, déclenchant ainsi l'activation de l'IP 3-kinase.

**Figure 7 : Les classes d'IP 3-kinase**



**Figure 8 : Structures générales des DNMTs**



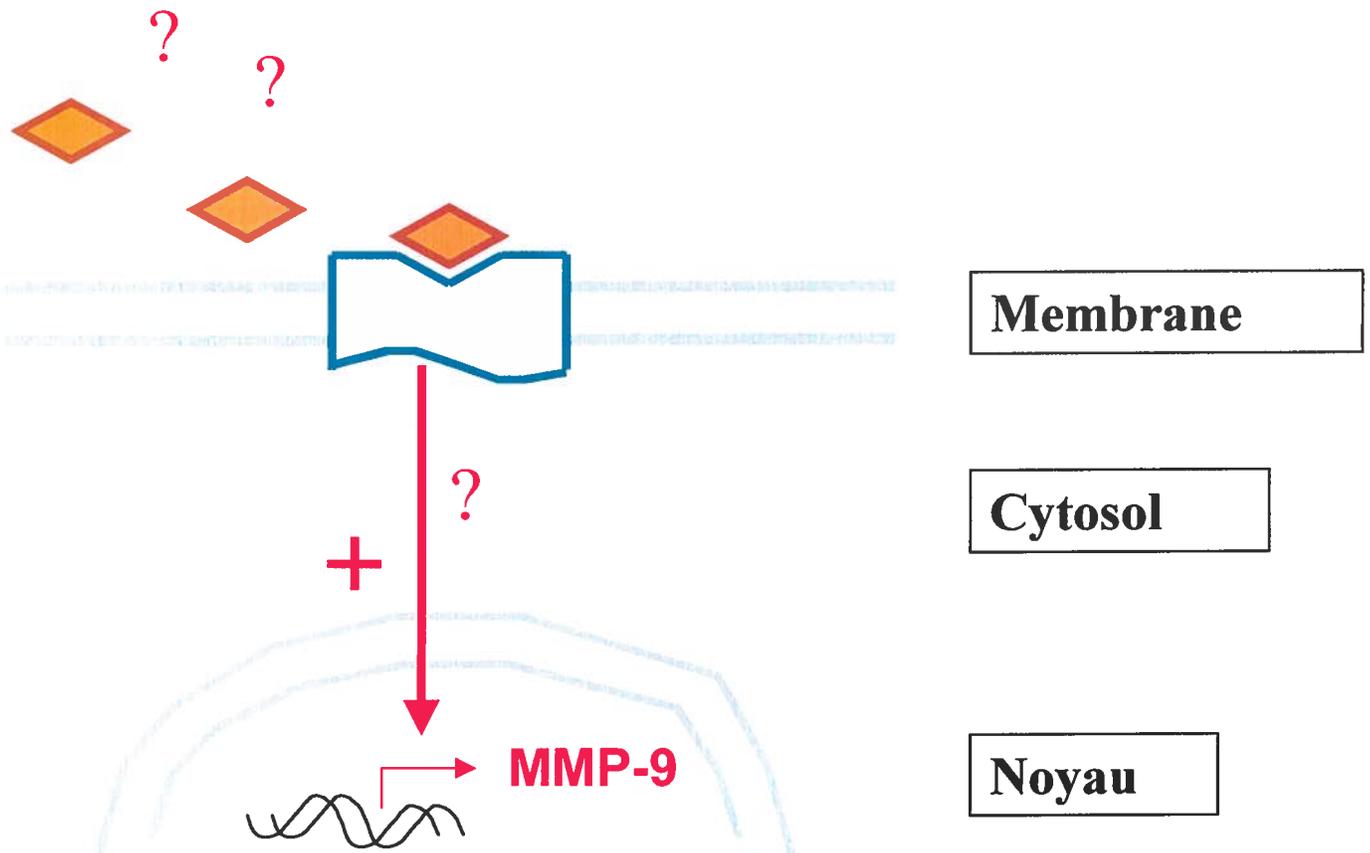
*(Hendrich et Bird, 2000)*

**Tableau 1 : La famille des MMPs**

<b>Collagénases</b>		
Collagénase interstitielle	MMP-1	Collagène type I, II, III, VII et X
Collagénase de neutrophiles	MMP-8	Collagène type I, II, III, VII et X
Collagénase-3	MMP-13	Collagène type I, II, III, VII et X
Collagénase-4	MMP-18	Collagène type I, II, III, VII et X
<b>Gélatinases</b>		
Gélatinase A	MMP-2	Gélatine type I, IV, V et X; laminine V
Gélatinase B	MMP-9	Gélatine type I, IV, V et X; laminine V
<b>Stromélysines</b>		
Stromélysine-1	MMP-3	Collagène type III, IV, IX et X; gélatine; pro-MMP-1; laminine; protéoglycans
Matrilysine	MMP-7	Gélatine; fibronectine; pro-MMP-1
Stromélysine-2	MMP-10	Collagène type III, IV, IX et X; gélatine; pro-MMP-1; laminine; protéoglycans
Stromélysine-3	MMP-11	$\alpha$ -1 antitrypsine, IGFBP-1
Métalloélastase	MMP-12	Elastine
Matrilysine-2	MMP-26	Gélatine; fibronectine; pro-MMP-9
<b>MMP membranaires</b>		
MT1-MMP	MMP-14	Pro-MMP-2; gélatine; collagènes
MT2-MMP	MMP-15	Pro-MMP-2
MT3-MMP	MMP-16	Pro-MMP-2
MT4-MMP	MMP-17	Pro-MMP-2
MT5-MMP	MMP-24	Pro-TNF- $\alpha$
MT6-MMP (Leukolysine)	MMP-25	Pro-MMP-2
<b>MMP non classées</b>		
RASI-1/XMMP (Xenopus)	MMP-19/MMP-21	Collagène type IV; gélatine; fibronectine; laminine
CMMP (Poulet)		gélatine; caséine
Enamélysine	MMP-20	Amélogénine
CA-MMP	MMP-23	Gélatine
Epilysine	MMP-28	Caséine

**Figure 9** : Etude de la régulation de l'expression de MMP-9  
chez le gliome

**Activateurs physiologiques**



**Légende** : Schéma représentant la question de la régulation de l'expression de MMP-9 chez le gliome, dont les activateurs physiologiques, ainsi que la signalisation intracellulaire conduisant à l'expression de cette enzyme ne sont pas identifiés.

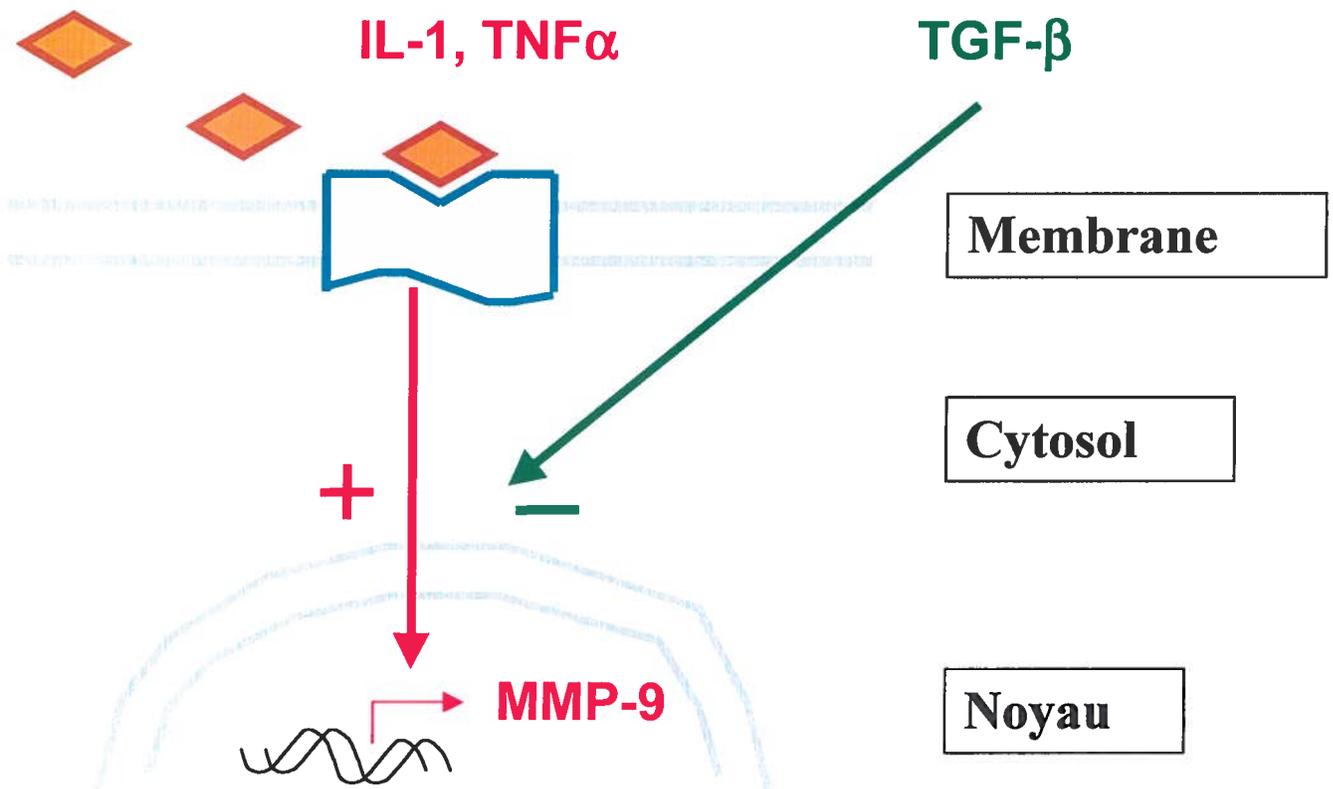
# Chapitre 1

## RÉSUMÉ

La progression du gliome est associée à des processus dégénératifs locaux qui sont souvent attribués à l'activité des gélatinases. Étant donné que les gliomes sont des cellules candidates à la sécrétion de ces enzymes, nous avons étudié, *in vitro*, le potentiel de cytokines, telles que l'interleukine-1 (IL-1), le facteur de nécrose des tumeurs-alpha (TNF- $\alpha$ ) et le facteur de croissance transformant-2 (TGF- $\beta$ 2), de moduler l'expression des gélatinases A et B (Gel A et B, respectivement) chez deux lignées cellulaires de gliome humain (A172) et de rat (C6). Nous avons montré que l'IL-1 et le TNF- $\alpha$  sont tous deux capables d'induire l'expression et la sécrétion de la Gel B, par RT-PCR et zymographie. TNF- $\alpha$  n'a pas d'effet sur l'expression constitutive de Gel A, tandis que l'IL-1 augmente légèrement sa production, mais seulement à hautes concentrations. Nous avons aussi démontré que le TGF- $\beta$ 2 inhibe l'expression et la sécrétion de Gel B induite par IL-1 et le TNF- $\alpha$  de façon dose-dépendante, mais n'a aucun effet sur la sécrétion de Gel A. De plus, l'effet du TGF- $\beta$ 2 peut être partiellement renversé par le phorbol myristate acétate (PMA). L'ensemble de ces données suggèrent que l'IL-1, le TNF- $\alpha$  et le TGF- $\beta$ 2 contrôlent étroitement l'expression de la Gel B chez les gliomes, une enzyme importante dans l'invasion des tissus cérébraux par les cellules cancéreuses.

## CONCLUSION DU CHAPITRE 1

**Figure 10** : Régulation de l'expression de MMP-9 par les cytokines



**Légende** : Schéma représentant la régulation de l'expression de MMP-9 chez le gliome par les cytokines. IL-1 et TNF- $\alpha$  induisent l'expression de MMP-9, tandis que TGF- $\beta$  inhibe cette induction.

## **Chapitre 2**

De : [jbc@asbmb.faseb.org](mailto:jbc@asbmb.faseb.org) [mailto:[jbc@asbmb.faseb.org](mailto:jbc@asbmb.faseb.org)]

Envoyé : 7 septembre, 2001 02:02 À : St-Pierre, Yves (IAF)(LAVAL)

Objet : From the JBC re: Manuscript M1:08600 M1:08600

Dear Dr. St-Pierre: We have received your manuscript entitled: "Protein kinase c-zeta regulates transcription of the matrix metalloproteinase-9 gene induced by IL-1 and TNF-alpha in glioma cells via NF-kB". It has been given the number M1:08600 and has been assigned to:

Dr. Ralph A. Bradshaw Department of Physiology and Biophysics University of California, Irvine Journal of Biological Chemistry 346-D Medical Science I Irvine, CA 92697-4560 Tel: 949-824-7173 Fax: 949-824-1861 E-mail: [rablab@uci.edu](mailto:rablab@uci.edu)

Manuscripts submitted under multiple authorship are reviewed on the assumption that all listed authors concur in the submission and that the final version of the manuscript has been seen and approved by all authors. Papers are published with the implicit understanding that you will pay charges at a rate of \$65.00 per page for all typeset pages.

## RÉSUMÉ

La régulation de l'expression de la métalloprotéinase de la matrice-9 (MMP-9) chez les gliomes est un des processus clé dans l'invasion tumorale à travers la matrice extracellulaire du cerveau. Bien que quelques études ont démontré l'implication de certains isoformes de protéines kinase C (PKC) de type classique dans la régulation de la production de MMP-9 par les phorbol esters ou le lipopolysaccharide, l'implication d'isoformes PKC spécifiques dans les signaux de transduction conduisant à l'expression de MMP-9 par les cytokines inflammatoires demeure inconnue. Dans ce travail, nous rapportons que l'isoforme atypique PKC- $\zeta$  participe à l'induction de MMP-9 par l'IL-1 et le TNF- $\alpha$  chez les gliomes de rat C6. Ainsi, les analyses en zymographie et RT-PCR semi-quantitatif ont montré que le prétraitement des cellules C6 avec le pseudosubstrat de PKC- $\zeta$  (PKC- $\zeta$  PS) abolit l'activité et l'expression du gène MMP-9 induite par l'IL-1 ou le TNF- $\alpha$ . Également, IL-1 et le TNF- $\alpha$  ont été capables d'induire l'activité PKC- $\zeta$ , telle que démontrée par immunoprécipitation suivie d'un essai kinase *in vitro*. De plus, des clones stables surexprimant PKC- $\zeta$ , contrairement aux clones surexprimant PKC- $\epsilon$ , ont démontré une augmentation constitutive de l'expression de MMP-9, ainsi qu'une augmentation de l'activité du promoteur MMP-9. Ces processus ont été inhibés par un peptide bloquant l'activation de NF- $\kappa$ B et également abolis par une mutation du site de liaison de NF- $\kappa$ B dans le promoteur MMP-9. L'ensemble de ces données suggèrent que PKC- $\zeta$  joue un rôle clé dans la régulation de l'expression de MMP-9 chez les gliomes C6 via l'activation de NF- $\kappa$ B.

**Protein kinase C- $\zeta$  regulates, via NF- $\kappa$ B, the IL-1 and TNF- $\alpha$  induced transcription of the matrix metalloproteinase-9 gene in glioma cells.**

**Pierre Olivier Estève, Éric Chicoine, Olivier Robledo, Fawzi Aoudjit#, Albert Descoteaux, Edouard F. Potworowski, and Yves St-Pierre\*<sup>+</sup>**

*\* INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec,  
531 Boul. des-Prairies, Laval, Québec, Canada H7V 1B7*

*# Centre de recherches en Immunologie et Rhumatologie,  
CHUQ pavillon CHUL, Université Laval,  
2705 Boul. Laurier, Ste-Foy, Québec, Canada G1V 4G2*

**<sup>+</sup>To whom correspondence should be addressed :**

INRS-Institut Armand-Frappier  
531 Boul. des-Prairies  
Laval, Québec, Canada H7V 1B7  
Phone: 514-686-5354  
Fax: 514-686-5501  
E-mail: [yves.st-pierre@inrs-iaf.quebec.ca](mailto:yves.st-pierre@inrs-iaf.quebec.ca)

## Summary

The regulation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expression in glioma cells is one of the key processes in tumor invasion through the brain extracellular matrix. While some studies have demonstrated the implication of classical protein kinase C (PKC) isoforms in the regulation of MMP-9 production by phorbol esters or lipopolysaccharide, the involvement of specific PKC isoforms in the signaling pathways leading to MMP-9 expression by inflammatory cytokines remains unclear. Here, we report that the atypical PKC- $\zeta$  isoform participates in the induction of MMP-9 expression by interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in rat C6 glioma cells. Indeed, zymography and semi-quantitative RT-PCR analysis showed that pretreatment of C6 cells with PKC- $\zeta$  pseudosubstrate (PKC- $\zeta$  PS) abolished MMP-9 activity and gene expression induced by IL-1 or TNF- $\alpha$ . Accordingly, IL-1 and TNF- $\alpha$  were able to induce PKC- $\zeta$  activity, as demonstrated by in vitro kinase assay using immunoprecipitated PKC- $\zeta$ . Furthermore, stable C6 clones overexpressing PKC- $\zeta$ , but not PKC- $\epsilon$ , displayed an up-regulation of MMP-9 constitutive expression as well as an increase of MMP-9 promoter activity. These processes were inhibited by an NF- $\kappa$ B blocking peptide and completely prevented by NF- $\kappa$ B binding site mutation in MMP-9 promoter. Taken together, these results indicate that PKC- $\zeta$  plays a key role in the regulation of MMP-9 expression in C6 glioma cells through NF- $\kappa$ B.

## Introduction

Glioma cells have the ability to invade brain tissues by secreting matrix metalloproteinases (MMPs), a family of proteases able to degrade different components of the extracellular matrix including collagen, fibronectin and proteoglycans. One of these MMPs, MMP-9, has received much attention as its expression correlates with the progression of glioma (1). Furthermore, MMP-9 seems to be essential for the invasiveness of glioma cells as it was recently reported that the inhibition of MMP-9 expression by antisense gene transfer strongly reduced the invasion of glioblastoma cells in vitro and in vivo (2). Therefore, understanding the role of the molecules implicated in the signaling pathways leading to MMP-9 gene expression in glioma cells is important in order to identify new therapeutic targets.

Several studies have focused on the implication of protein kinase C (PKCs) in the regulation of MMP-9 gene expression, most notably by testing the effect of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) on different types of cells, including human glioma cells (3-5). Members of the PKC family are divided into three groups of isoenzymes : the conventional PKC isoforms, which are activated by calcium and diacylglycerol ( $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II and  $\gamma$ ); the novel PKCs, which are activated by diacylglycerol but are calcium-insensitive ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  and  $\theta$ ); and the atypical PKCs, which are calcium- and diacylglycerol-insensitive ( $\zeta$  and  $\iota/\lambda$ ). Despite the fact that a large number of studies have established a link between PKCs and MMP-9 expression using PKC inhibitors (5-7), very few studies have addressed the implication of specific PKC isoenzymes in the regulation of MMP-9. While our group has shown that a dominant-negative form of PKC- $\alpha$  potentiated the

secretion of MMP-9 induced by lipopolysaccharide in the mouse macrophage cell line RAW 264.7 (8), others have shown that PKC- $\beta$  isoform is implicated in PMA-induced MMP-9 gene expression in human HL-60 myeloid leukemia cells (9). However, the involvement of specific PKC isoforms in the signaling pathways leading to MMP-9 expression by inflammatory cytokines remains unclear. In a previous study, however, we reported that the inflammatory cytokines, interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), but not PMA, were both able to induce MMP-9 expression in the rat C6 glioma cells (10), raising the possibility that atypical, PMA-independent PKC isoenzymes could be involved. Among the atypical PKC isoforms, PKC- $\zeta$  was of potential interest as its activation could be induced by IL-1 and TNF- $\alpha$  (11,12). Moreover, PKC- $\zeta$  plays a critical role in the regulation of gene transcription via nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (13), a transcriptional factor required for MMP-9 gene expression (14).

In this work, we show that induction of MMP-9 expression by IL-1 or TNF- $\alpha$  in C6 glioma cells is inhibited by pretreatment with a PKC- $\zeta$ -specific inhibitory peptide (PKC- $\zeta$  PS), and that both IL-1 and TNF- $\alpha$  induce the activation of PKC- $\zeta$  in C6 cells. Furthermore, stable C6 transfectants overexpressing PKC- $\zeta$  isoenzyme, but not clones overexpressing the PKC- $\epsilon$  isoenzyme, display a constitutive expression of MMP-9 at the mRNA and protein levels. Transient transfection experiments using MMP-9 promoter constructs not only confirmed that PKC- $\zeta$  exerts its effect by increasing its transcriptional activity but also implicated NF- $\kappa$ B as a key regulator of MMP-9 expression by PKC- $\zeta$ .

## Experimental procedures

### Reagents and antibodies

Reagents used were obtained from Sigma unless otherwise indicated. SN50 peptide inhibitor of NF- $\kappa$ B translocation and SN50M control peptide were obtained from Calbiochem. The myristoylated PKC- $\zeta$  pseudosubstrate peptide was obtained from Quality Controlled Biochemicals. Mouse recombinant IL-1 and TNF- $\alpha$  were purchased from Genzyme Corporation. The rabbit polyclonal anti-PKC- $\zeta$  antibody (Santa Cruz Biotechnology) or a mouse monoclonal anti-PKC- $\epsilon$  antibody (Transduction Laboratories) were used for Western Blot analysis as well as sheep anti-rabbit or anti-mouse antibody conjugated to horseradish peroxidase (ICN Pharmaceuticals).

### Cell lines

The rat C6 glioma cell line was obtained from the American type Culture Collection (ATCC). The cells and stable transfectants were grown in Ham's F10 medium supplemented with 15% (v/v) horse serum, 2.5% fetal bovine serum and 10 mM HEPES buffer (complete medium). All tissue culture reagents were purchased from Life Technologies. Routine testing showed the cells to be free of mycoplasma. For stimulation assays with mouse recombinant IL-1 $\alpha$  or TNF- $\alpha$ , cells were trypsinized with a solution of 1 mM EDTA/0.25% (w/v) trypsin, seeded at a density of  $10^6$  cells/ml in 12 well cluster plates, and incubated for 18 h at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Monolayers were then washed three times with PBS and fresh serum-free medium containing the appropriate cytokine added at the indicated concentration. In some experiments, C6 cells or transfectants

overexpressing PKC- $\zeta$  were pre-incubated for 1 h with a myristoylated PKC- $\zeta$  pseudosubstrate or the NF- $\kappa$ B inhibitory peptide before IL-1 or TNF- $\alpha$  treatment. MTT assays were performed to ensure that treatments with these peptides had no effect on cell viability. Unless otherwise indicated, supernatants were harvested after 18 h of stimulation and stored at -20°C until assayed.

### **cDNAs and expression vectors**

Wild type human PKC- $\epsilon$  (15) and wild type mouse PKC- $\zeta$  cDNAs (16) were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). Both cDNAs were cloned into the EcoRI site of the expression vector pCIN-4 (17) and the resulting constructs were designated pCIN-PKC- $\epsilon$  and pCIN-PKC- $\zeta$ , respectively.

### **Transfection**

To obtain C6 stable transfectants constitutively overexpressing PKC- $\epsilon$  or PKC- $\zeta$  isoforms, transfection was carried out by electroporation with pCIN-PKC- $\epsilon$  or pCIN-PKC- $\zeta$  plasmids. Controls were generated using C6 cells transfected with the empty pCIN-4 vector alone. Electroporation was performed using the following parameters : 10  $\mu$ g of linearized DNA per  $4 \times 10^6$  cells in Ham's F10 on ice; 960  $\mu$ F; 300V/0.4 cm. After 48 h of culture in complete medium, transfected cells were allowed to grow in complete medium containing 400  $\mu$ g/ml of geneticin (Life Technologies) before individual colonies were picked and expanded into cell lines. Individual clones were then tested for expression of PKC- $\epsilon$  or PKC- $\zeta$  by Western Blot analysis using antibodies as described below.

### **Western Blot analysis**

Adherent cells were washed once with PBS and homogenized in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1mM EGTA, 150 mM NaCl, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1mM NaF, 1% NP-40, 0.25% sodium deoxycholate, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> and 10% glycerol) containing a cocktail of protease inhibitors (Complete™ tablets from Roche). Protein concentrations were determined using the Bradford assay. Total protein (50 µg) were electrophoresed through a 10% SDS-poly-acrylamide gel and were electrotransferred onto a nitrocellulose membrane (Amersham Pharmacia Biotech) and blots were incubated with a rabbit polyclonal anti-PKC-ζ antibody or with a mouse monoclonal anti-PKC-ε antibody. Sheep anti-rabbit or anti-mouse antibody conjugated to horseradish peroxidase were used as secondary antibodies. The bands were visualized by ECL system (Amersham Pharmacia Biotech).

### **Zymography**

Zymography was performed in 10% polyacrylamide gels that had been cast in the presence of gelatin as previously described (10). Briefly, samples (100 µl) were lyophilized, resuspended in loading buffer and, without prior denaturation, were run on a SDS-polyacrylamide gel containing 0.5 mg/ml of gelatin. After electrophoresis, gels were washed to remove SDS and incubated for 18 h at 37°C in a renaturing buffer (50 mM Tris, 5mM CaCl<sub>2</sub>, 0.02% NaN<sub>3</sub>, 1% Triton X-100). Gels were subsequently stained with Coomassie brilliant blue G-250 and destained in 30% methanol/ 10% acetic acid (v/v) to detect gelatinase secretion. Gelatinase activity was measured in arbitrary units by

quantitative analysis of negatively stained bands through computerized image analysis (Biorad, model GS-670 Densitometer).

### **RNA isolation and RT-PCR analysis**

Isolation of total cellular RNA was performed using the Trizol reagent (GIBCO-BRL) according to the manufacturer's instructions. Aliquots of 2 µg of total cellular RNA were used for first strand cDNA synthesis in 20 µl of reaction volume using 100 U of Superscript<sup>TM</sup> II reverse transcriptase (Life Technologies). Primers pairs for rat MMP-9, mouse β-actin and GAPDH specific amplification of cDNA (PCR Core Kit, Boehringer Mannheim) were as follows : (5') primer 5'-TCCCTCTGAATAAAGTCGACA-3' and (3') primer 5'-AGGTGAACAAGGTGGACCATG-3' for MMP-9; (5') primer 5'-CATGGATGACGATATCGCTGCGC-3' and (3') primer 5'-GCTGTCGCCACGCTCGGTCAGGATC-3' for mouse β-actin; (5') primer 5'-CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT-3' and (3') primer 5'-AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3' for GAPDH. The length of the MMP-9, β-actin and GAPDH amplicons were respectively 848, 575 and 306 bp. PCR amplifications were performed on a MJ Research Thermal Cycler (Model PTC-100<sup>TM</sup>) using the following program: step 1, 94°C for 1 min; step 2, 58°C for 2 min; step 3, 72°C for 3 min. Thirty cycles were performed for the amplification of MMP-9 and 20 cycles for β-actin or GAPDH. The amplification for each gene was in the linear curve. PCR products were visualized on 1.5% agarose gels stained by ethidium bromide and UV transillumination. Semiquantitative analysis was conducted using a computerized densitometric imager to obtain MMP-9/GAPDH or MMP-9/β-actin ratios.

### Measure of PKC- $\zeta$ activity

Measurement of PKC- $\zeta$  activity was performed essentially as previously described (18). Briefly, after stimulation of C6 cells by IL-1 or TNF- $\alpha$  for 10 min, cells were incubated for 30 min at 4°C in lysis buffer containing 20 mM Tris/HCl (pH 7.5), 0.25 M sucrose, 1.2 mM EGTA, 20 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 1 mM PMSF, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1 mM  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , 1 mM NaF, protease inhibitors (Roche), 1 % Triton X-100, 0.5 % NP-40 and 150 mM NaCl. Aliquots of 500  $\mu\text{g}$  of proteins were then incubated overnight at 4°C with a PKC- $\zeta/\lambda$ -specific rabbit polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology) and immunoprecipitates were collected on Protein G-Sepharose beads (Amersham Pharmacia Biotech). The beads were washed three times by low speed centrifugation with the kinase buffer (50 mM Tris/HCl (pH 7.5), 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 100  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 100  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , 1 mM NaF and 100  $\mu\text{M}$  PMSF). The immunoprecipitated PKC- $\zeta$  was resuspended in 50  $\mu\text{l}$  of kinase buffer and kinase assay was performed by adding 4  $\mu\text{g}$  of phosphatidylserine, 50  $\mu\text{M}$  ATP, 3  $\mu\text{Ci}$  of [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ] ATP (ICN Pharmaceuticals) and 40  $\mu\text{M}$  of  $\epsilon$ -peptide (Calbiochem-Novabiochem) for 10 min at 30°C. Blank values were determined from incubations conducted in the presence of 100  $\mu\text{M}$  PKC- $\zeta$  pseudosubstrate and were subtracted from total kinase activity to determine PKC- $\zeta$ -specific activity. The reaction was stopped by adding 100  $\mu\text{l}$  of SDS buffer. Samples were boiled for 5 min and separated by SDS-PAGE electrophoresis using an 18 % polyacrylamide gel. Dried gels were exposed to X-ray films (Konica Medical Film) at -80°C. Quantitative measurements of phosphorylation of the  $\epsilon$ -peptide was obtained by densitometry through computerized image analysis.

### **Cloning of MMP-9 promoter and transient transfections**

A 737 bp fragment of the 5'-flanking region of the MMP-9 gene (-681 to +63), containing two Sp1, one AP-1 and NF- $\kappa$ B binding sites (all elements necessary for MMP-9 promoter activity) (14), was obtained by PCR amplification using stringent conditions on a genomic DNA isolated from 164T2 murine lymphoma cells (19), using the following primers : (5') primer 5'-AGGAAGGATAGTGCTAGCCTGAGAAGGATG-3' and (3') primer 5'-CCGAAACTCGAG GAGAGCCAGGAGCAGGG-3'. After sequencing (accession no. AF 403768), this fragment was cut by NheI and XhoI and subsequently subcloned into pGL-III Basic vector encoding for firefly luciferase (Promega) to generate pGL-MMP-9wt (wt, wild type). Creation of a double-point mutation into the NF- $\kappa$ B binding site (GGAATTCCCCC to GGAATTGGCCC) to generate pGL-MMP-9  $\Delta$ NF- $\kappa$ B was performed, using the following (forward) primer: 5'-GGGTTGCCCCGTGGAATTGGCCCAAATCCTGC-3'. The mutant was generated using the Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). Transient transfections were performed using Lipofectamine 2000 (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. Transfection efficiency was monitored by co-transfection with 0.5  $\mu$ g of the pSV/ $\beta$ -gal plasmid encoding for  $\beta$ -galactosidase (Promega). Forty-eight hours post-transfection, luciferase activity was measured using the Luciferase Assay System protocol (Promega) and a luminometer (Lumat LB 9507, Berthold). The  $\beta$ -galactosidase activity detected by a colorimetric enzyme assay using o-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside as a substrate. The ratio of luciferase activity to  $\beta$ -gal activity in each sample served as a measure of normalized luciferase activity.

## Results

### **The induction of MMP-9 activity and mRNA expression by IL-1 or TNF- $\alpha$ is inhibited by the PKC- $\zeta$ pseudosubstrate in C6 glioma cells**

We induced the secretion the 94 kDa precursor form of MMP-9 by IL-1 and TNF- $\alpha$  in the culture supernatant of C6 glioma cells, and detected it by zymography (Fig.1A) (10). To determine whether the induction of MMP-9 via these cytokines involved PKC- $\zeta$ , we attempted such an induction using a PKC- $\zeta$ -specific inhibitory peptide. This peptide, corresponding to the pseudosubstrate (PS) motif of atypical PKCs, suppresses PKC- $\zeta$  activity (20) by interacting with the substrate-binding pocket in the catalytic domain (21). Moreover, PKC pseudosubstrates, such as PKC- $\zeta$ -PS, specifically block PKC activation by inhibiting their phosphorylation (22,23). Our results showed that pre-incubation of C6 cells with increasing doses of the peptide strongly inhibited the induction of MMP-9 by both IL-1 and TNF- $\alpha$  (Fig.1A). The same PKC- $\zeta$  inhibitory peptide also reduced constitutive levels of MMP-9. Such a marked dose-dependent inhibition of secretion was specific to MMP-9, as the secretion of MMP-2 was not significantly altered by the incubation with the inhibitory peptide. The level of secretion of an unknown 97 kDa band, occasionally detected in C6 cell supernatants, was not affected by cell treatment with cytokines, or upon treatment with the PKC- $\zeta$  pseudosubstrate.

To determine if indeed PKC- $\zeta$  was involved in the regulation of MMP-9 at the mRNA level, we next carried out a semi-quantitative RT-PCR. As expected, we found that, while the constitutive levels of MMP-9 mRNA in C6 cells were very low, both IL-1 and TNF- $\alpha$  induced a strong upregulation of the levels of the same mRNA in these cells.

Preincubation with the PKC- $\zeta$ -specific inhibitory peptide, however, strongly inhibited, in a dose-dependent manner, the induction of MMP-9 mRNA by these cytokines, while GAPDH mRNA levels remained unchanged (Fig. 1B). Taken together, these data indicate that PKC- $\zeta$  may be involved in the induction, by IL-1 and TNF- $\alpha$ , of MMP-9 gene expression.

#### **IL-1 and TNF- $\alpha$ induces PKC- $\zeta$ activity in C6 glioma cells**

The above results were consistent with the idea that IL-1 and TNF- $\alpha$  are functionally linked with the activation of PKC- $\zeta$ . To test for this hypothesis, we investigated whether stimulation of C6 cells via these cytokines induced PKC- $\zeta$  enzymatic activity. Using in vitro kinase assays on PKC- $\zeta$  immunoprecipitates obtained from resting or cytokine-stimulated cells, we first found that stimulation of C6 cells with both cytokines increased the kinase activity associated with the PKC- $\zeta$  immunoprecipitates (Fig. 2A and 2B). Most importantly, incubation with the PKC- $\zeta$  pseudosubstrate inhibited both TNF- $\alpha$  and IL-1-induced kinase activity by 2 and 2.5 fold respectively, while it had no effect on the constitutive levels of unstimulated cells, supporting the hypothesis that IL-1 and TNF- $\alpha$  can both induce PKC- $\zeta$  activity.

#### **Overexpression of PKC- $\zeta$ , but not PKC- $\epsilon$ , upregulates MMP-9 expression**

As another approach to test the implication of PKC- $\zeta$  in the regulation of MMP-9 expression, we transfected C6 cells with a plasmid encoding PKC- $\zeta$  and selected three independent stable clones ( $\zeta$ 1,  $\zeta$ 2 and  $\zeta$ 3) expressing high levels of this isoform (Fig. 3A). Gelatin zymography of conditioned media isolated from clones  $\zeta$ 1,  $\zeta$ 2 and  $\zeta$ 3 showed that

overexpression of PKC- $\zeta$  in all three clones induced an up-regulation of MMP-9 activity in C6 cells (Fig.3B). No such effect was observed with C6 cells transfected with the empty vector. Overexpression of MMP-9 upon transfection of PKC- $\zeta$  was concomitant to the generation of an unidentified 58 kDa gelatinolytic band, corresponding to the activation of the 62 kDa form of MMP-2. MMP-2 is not, however, expressed at the mRNA level in C6 cells or its transfectants (data not shown). Furthermore, the fact that the levels of mRNA in the PKC- $\zeta$  transfectants were higher than those found in the control transfectants (Fig.3C) confirmed the idea that the constitutive levels of MMP-9 observed in PKC- $\zeta$  transfectants were indeed regulated at the mRNA level .

To determine if the effect of PKC- $\zeta$  on the regulation of MMP-9 was specific, we selected three stable transfectants ( $\epsilon$ 1,  $\epsilon$ 2 and  $\epsilon$ 3) overexpressing PKC- $\epsilon$  (Fig.3D). Two stable clones (V1 and V2) transfected with the empty vector (no cDNA insert) were used as controls. We found that overexpression of PKC- $\epsilon$  had no effect on expression of MMP-9 (Fig.3E), suggesting that the regulation of MMP-9 by PKC- $\zeta$  is isoform-specific.

### **MMP-9 induction in C6 cells or in clones overexpressing PKC- $\zeta$ is NF- $\kappa$ B-dependent**

Upregulation of MMP-9 gene expression upon exposure to inflammatory cytokines critically depends on the activation of NF- $\kappa$ B (24,25). To evaluate the possible implication of this transcription factor in the regulation of MMP-9 by PKC- $\zeta$ , we tested the effect of an NF- $\kappa$ B-specific inhibitory peptide, SN50, that blocks its translocation to the nucleus (26). Our results showed that this peptide strongly inhibited, in a dose-dependent manner, the secretion of MMP-9 induced by IL-1 or TNF- $\alpha$  in C6 cells

(Fig.4). In a control experiment, the mutant peptide (SN50M) failed to inhibit the secretion of MMP-9. Furthermore, addition of SN50, but not of the control peptide, decreased the constitutive level of MMP-9 activity in both  $\zeta$ 1 and  $\zeta$ 2 clones (Fig.4B). These results were confirmed by semi-quantitative RT-PCR analysis (data not shown). These data therefore indicate that NF- $\kappa$ B participates to the induction of MMP-9 expression mediated by PKC- $\zeta$ .

#### **MMP-9 promoter activity is up-regulated by PKC- $\zeta$ through NF- $\kappa$ B**

Finally, to further establish that the up-regulation of MMP-9 expression in  $\zeta$ 1 and  $\zeta$ 2 clones depended on its promoter activity through a NF- $\kappa$ B-dependent mechanism, we used reporter gene constructs containing the MMP-9 promoter harboring a double mutation into the NF- $\kappa$ B binding site. Transient transfections with pGL-MMP-9wt in V1,  $\zeta$ 1 and  $\zeta$ 2 clones demonstrated a 1.5- and 2-fold increase in MMP-9 transcriptional promoter activity in  $\zeta$ 1 and  $\zeta$ 2 clones, respectively when compared to the V1 clone (Fig.5). This induction was completely prevented by the double mutation C  $\rightarrow$  G into the NF- $\kappa$ B binding site of MMP-9 promoter. In addition, treatment of V1 clone with IL-1 or TNF- $\alpha$  also induced a 2-fold increase of MMP-9 promoter activity, which was consistent with the results of Eberhardt et al. (24), and was abolished by the mutation into the NF- $\kappa$ B binding site. Taken together, these data indicate that NF- $\kappa$ B is essential for the up-regulation of MMP-9 promoter activity by either PKC- $\zeta$  or cytokines, IL-1 and TNF- $\alpha$ .

## Discussion

In the present study, we have shown that the atypical PKC isoenzyme PKC- $\zeta$  plays a critical role in mediating the IL-1 and TNF- $\alpha$ -dependent production of MMP-9 in C6 glioma cells through the downstream activation of NF- $\kappa$ B. Specifically, we showed that: 1) upregulation of MMP-9 expression at the mRNA and protein levels by IL-1 and TNF- $\alpha$  is inhibited by a PKC- $\zeta$ -specific blocking peptide, 2) both cytokines activates PKC- $\zeta$ , 3) overexpression of PKC- $\zeta$ , but not of PKC- $\epsilon$ , induces expression of the MMP-9 at the mRNA and protein levels, 4) addition of a NF- $\kappa$ B blocking peptide, but not of a control peptide, inhibits MMP-9-induced expression in C6 cells or PKC- $\zeta$  transfectants, and 5) transient transfection experiments established that the up-regulation of the MMP-9 promoter activity in cells overexpressing PKC- $\zeta$  was completely abolished by mutation in NF- $\kappa$ B binding site.

In a previous publication, we had reported that IL-1 and TNF- $\alpha$ , but not PMA, were able to induce expression of MMP-9 in the rat C6 glioma cells (10). In the present work, we now identify PKC- $\zeta$ , a PMA-insensitive isoenzyme, as a key regulator of MMP-9 gene expression in C6 cells. Moreover, our data further establish a functional link between PKC- $\zeta$ , IL-1, TNF- $\alpha$ , and the activation of NF- $\kappa$ B, a transcription factor necessary for up-regulation of MMP-9 expression (12). This implication of NF- $\kappa$ B and PKC- $\zeta$  in the induction of MMP-9 by IL-1 and TNF- $\alpha$  likely results from the activation of I $\kappa$ B kinase by PKC- $\zeta$  (27), which in turn induces, upon phosphorylation, the dissociation of the negative regulator I $\kappa$ B- $\alpha$  from NF- $\kappa$ B (28). In addition, PKC- $\zeta$  can be involved in the phosphorylation of RelA, a subunit of NF- $\kappa$ B, which leads to an increase

of its transcriptional activity (29). In fact, our observation that the induction of MMP-9 by IL-1 or TNF- $\alpha$  was completely abolished by pretreatment with an NF- $\kappa$ B-specific inhibitory peptide, which acts by blocking translocation of NF- $\kappa$ B to the nucleus, strongly supports the idea that MMP-9 induction by these cytokines is mainly NF- $\kappa$ B-dependent. However, this peptide failed to achieve the same level of inhibition with the clones overexpressing PKC- $\zeta$ . This could be attributed to the high levels of the activated forms of the isoenzymes. In addition to NF- $\kappa$ B which is necessary but not sufficient to up-regulate MMP-9, the previous demonstration that the Activating Protein-1 (AP-1) plays an essential role in the transcription of MMP-9 gene (12), further support an association between PKC- $\zeta$  and AP-1. Such an increase in the AP-1-binding activity could be the result of an increase of c-jun protooncogene mRNA levels, a mechanism previously observed in transfected U937 cells stably overexpressing PKC- $\zeta$  (30). Since both AP-1 and NF- $\kappa$ B can be regulated by mitogen-activated protein kinases (MAPK) (31,32) which can be activated by PKC- $\zeta$  (33,34), it will be of interest to investigate the implication of these molecules in the signaling cascade leading to the upregulation of MMP-9 in C6 clones overexpressing PKC- $\zeta$ . A case in point would be p38, a MAPK recently identified as being involved in the regulation of MMP-9 upon stimulation by IL-1 and TNF- $\alpha$  in C6 cells (35).

We found that IL-1 and TNF- $\alpha$  were able to stimulate PKC- $\zeta$  activity in C6 glioma cells. Such an activation of PKC- $\zeta$  by these cytokines has been previously reported in other cell types, most notably in U937, rhabdomyosarcoma, and bladder-derived carcinoma cells (11,12). Among the putative second messengers that could mediate the activation of PKC- $\zeta$  upon stimulation with IL-1 and TNF- $\alpha$  are ras or

ceramide (36,37), both of which having been shown to be potent activator of PKC- $\zeta$ . The implication phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase), another activator of PKC- $\zeta$  (38), however, is unlikely as treatment of IL-1 or TNF- $\alpha$ -stimulated C6 cells with wortmannin, a PI 3-kinase inhibitor, has been shown to potentiate the induction of MMP-9 (Estève *et al.*, unpublished observations), suggesting that PI 3-kinase may rather act as a negative regulator of MMP-9. A similar role for this kinase has recently been assigned in the case of the nitric oxide synthase gene following induction by IL-1 in C6 cells (39), suggesting that both genes are regulated through a common signaling pathway. In support of this notion, C<sub>6</sub>-ceramide and p21ras have been shown to be involved in the induction of nitric-oxide synthase expression by IL-1 or TNF- $\alpha$  through NF- $\kappa$ B in C6 cells and in rat primary astrocytes (40,41). Further investigations on the early events in the signaling cascade leading to the activation of PKC- $\zeta$  by IL-1 and TNF- $\alpha$  should clarify this issue.

It is noteworthy that we observed a low but reproducible decrease of MMP-2 activation upon addition of the SN50 peptide but not the control peptide. Other investigators (42) have also reported SN50 can block activation of MMP-2, most notably in dermal fibroblasts, and attributed its effect to its ability to block the NF- $\kappa$ B signaling pathway that leads to the induction of MT1-MMP. Whether MT1-MMP is implicated in the activation of MMP-2 in glioma cells is under investigation.

In conclusion, we showed that PKC- $\zeta$  is directly involved in the signaling cascade that controls the transcription of the MMP-9 gene via the NF- $\kappa$ B-dependent pathway in the C6 glioma cells. Accumulating evidence indicate that MMP-9 contributes not only to tumor invasion, but also to the degradation of the blood-brain barrier, to neurodegenerative processes, and to angiogenesis (43-45), three common features

associated with glial tumors. *In vivo* studies, using C6 cells and PKC- $\zeta$ -blocking agent, need to be done in order to validate the *in vitro* finding and establish whether PKC antagonists can be envisaged in the therapy of glioma-derived tumors.

## References

1. Rao, J.S., Steck, P.A., Mohanam, S., Stetler-Stevenson, W.G., Liotta, L.A., and Sawaya, R. (1993) *Cancer Res.* **53 (Suppl)**, 2208-2211
2. 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., and Rao, J.S. (2000) *Cancer Res.* **60**, 6851-6855
3. Juarez, J., Clayman, G., Nakajima, M., Tanakabe, K.K., Saya, H., Nicolson, G.L., and Boyd, D. (1993) *Int. J. Cancer* **55**, 10-18
4. Fabunmi, R.P., Baker, A.H., Murray, E.J., Booth, R.F., and Newby, A.C. (1996) *Biochem. J.* **315**, 335-342
5. Chintala, S.K., Sawaya, R., Aggarwal, B.B., Majumder, S., Giri, D.K., Kyritsis, A.P., Gokaslan, Z.L., and Rao, J.S. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 13545-13551
6. Segain, J.P., Harb, J., Gregoire, M., Meflah, K., and Menanteau, J. (1996) *Cancer Res.* **56**, 5506-5512
7. Xie, B., Dong, Z., and Fidler, I.J. (1994) *J. Immunol.* **152**, 3637-3644
8. St-Denis, A., Chano, F., Tremblay, P., St-Pierre, Y., and Descoteaux, A. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 32787-32792
9. Xie, B., Laouar, A., and Huberman, E. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 11576-11582

10. Esteve, P.O., Tremblay, P., Houde, M., St-Pierre, Y., and Mandeville, R. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1403**, 85-96
11. Muller, G., Ayoub, M., Storz, P., Rennecke, J., Fabbro, D., and Pfizenmaier, K. (1995) *EMBO J.* **14**, 1961-1969
12. Limatola, C., Barabino, B., Nista, A., and Santoni, A. (1997) *Biochem. J.* **321**, 497-501
13. Diaz-Meco, M.T., Berra, E., Municio, M.M., Sanz, L., Lozano, J., Dominguez, I., Diaz-Golpe, V., Lain de Lera, M.T., Alcami, J., Paya, C.V., Arenzana-Seisdedos, F., Virelizier, J.-L., and Moscat, J. (1993) *Mol. Cell. Biol.* **13**, 4770-4775
14. Sato, H. and Seiki, M. (1993) *Oncogene* **8**, 395-405
15. Basta, P., Strickland, M.B., Holmes, W., Loomis, C.R., Ballas, L.M., and Burns, D.J. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1132**, 154-160
16. Goodnight, J., Kazanietz, M.G., Blumberg, P.M., Mushinski, J.F., and Mischak, H. (1992) *Gene* **122**, 305-311
17. Rees, S., Coote, J., Stables, J., Goodson, S., Harris, S., and Lee, M.G. (1996) *Biotechniques* **20**, 102-104
18. Bandyopadhyay, G., Standaert, M.L., Zhao, L., Yu, B., Avignon, A.M., Galloway, L., Karnam, P., Moscat, J., and Farese, R.V. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 2551-2558
19. Aoudjit, F., Potworowski, E.F., and St-Pierre, Y. (1998) *Blood* **91**, 623-629
20. Zhou, G., Lamar Seibenhener, M., and Wooten, M.W. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 31130-31137

21. House, C., and Kemp, B.E. (1987) *Science* **238**, 1726-1728
22. Standaert, M.L., Galloway, L., Karnam, P., Bandyopadhyay, G., Moscat, J., and Farese, R.V. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 30075-30082
23. Dutil, E.M., and Newton, A.C. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 10697-10701
24. Eberhardt, W., Huwiler, A., Beck, K.F., Walpen, S., and Pfeilschifter, J. (2000) *J. Immunol.* **165**, 5788-5797
25. Yokoo, T., and Kitamura, M. (1996) *Am. J. Physiol.* **270**, F123-130
26. Lin, Y.Z., Yao, S.Y., Veach, R.A., Torgerson, T.R., and Hawiger, J. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 14255-14258
27. Diaz-Meco, M.T., Dominguez, I., Sanz, L., Dent, P., Lozano, J., Municio, M.M., Berra, E., Hay, R.T., Sturgill, T.W., and Moscat, J. (1994) *EMBO J.* **13**, 2842-2848
28. DiDonato, J.A., Hayakawa, M., Rothwarf, D.M., Zandi, E., and Karin, M. (1997) *Nature* **388**, 548-554
29. Anrather, J., Csizmadia, V., Soares, M.P., and Winkler, H. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 13594-13603
30. Ways, D.K., Posekany, K., deVente, J., Garris, T., Chen, J., Hooker, J., Qin, W., Cook, P., Fletcher D., and Parker, P. (1994) *Cell Growth Differ.* **5**, 1195-1203
31. Karin, M. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 16483-16486
32. Beyaert, R., Cuenda, A., Vanden, B.W., Plaisance, S., Lee, J.C., Haegeman, G., Cohen, P., and Fiers, W. (1996) *EMBO J.* **15**, 1914-1923

33. Berra, E., Diaz-Meco, M.T., Lozano, J., Frutos, S., Municio, M.M., Sanchez, P. Sanz, L., and Moscat, J. (1995) *EMBO J.* **14**, 6157-6163
34. Takeda, H., Matozaki, T., Takada, T., Noguchi, T., Yamao, T., Tsuda, M., Ochi, F., Fukunaga, K., Inagaki, K., and Kasuga, M. (1999) *EMBO J.* **18**, 386-395
35. Missé, D., Esteve, P.O., Rennenboog, B., Vidal, M. Cerutti, M., St-Pierre, Y., Yssel, H., Parmentier, M., and Veas, F. (2001) *Blood* (in press)
36. Diaz-Meco, M.T. Lozano, J., Municio, M.M., Berra, E., Trutos, S., Sanz, L., and Moscat, J. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 31706-31710
37. Bourbon, N.A., Yun, J., and Kester, M. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 35617-35623
38. Nakanishi, H., Brewer, K.A., and Exton, J.H. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 13-16
39. Pahan, K., Raymond, J.R., and Singh, I. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 7528-7536
40. Pahan, K., Sheikh, F.G. Khan, M., Namboodiri, A.M.S., and Singh, I. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 2591-2600
41. Pahan, K., Liu, X., McKinney, M.J., Wood, C., Sheikh, F.G., and Raymond, J.R. (2000) *J. Neurochem.* **74**, 2288-2295
42. Han, Y.P., Tuan, T.L., Wu, H., Hughes, M., and Garner, W.L. (2001) *J. Cell Sci.* **114**, 131-139.
43. Rosenberg, G.A., Estrada, E.Y., Dencoff, J.E., and Stetler-Stevenson, W.G. (1995) *Brain Res.* **703**, 151-155

44. Proost, P., Van Damme, J., and Opdenakker, G. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **192**, 1175-1181
45. Bergers, G., Brekken, R., McMahon, G., Vu, T.H., Itoh, T., Kazuhiko, T., Tanzawa, K., Thorpe, P., Itohara, S., Werb, Z., and Hanahan, D. (2000) *Nature Cell Biol.* **2**, 737-744

## Footnotes

This work was supported by the National Cancer Institute of Canada (Y.S.P. and E.F.P.). AD and Y.S.P are scholars of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. O.R. is supported by a post-doctoral fellowship from la Fondation Armand-Frappier.

*Acknowledgements* – We thank Anna-Karine Bélizaire and Benoit Ochiatti for help in preparing this manuscript.

*Abbreviations* : MMPs, matrix metalloproteinases; PKC, protein kinase C; IL-1, interleukin-1; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ ; PKC- $\zeta$  PS, PKC- $\zeta$  pseudosubstrate; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; NF- $\kappa$ B, nuclear factor- $\kappa$ B; PBS, phosphate saline buffer; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; AP-1, activating protein-1; MAPK, mitogen-activated protein kinase; PI 3- kinase, phosphatidylinositol 3-kinase; MT-MMPs, membrane-type matrix metalloproteinases; TIMPs, tissue inhibitor of matrix metalloproteinases

## Figure Legends

**Figure 1.** Effect of a PKC- $\zeta$  pseudosubstrate on the induction of MMP-9 activity and mRNA expression by IL-1 or TNF- $\alpha$  in C6 cells. Rat C6 cells were treated with the PKC- $\zeta$  pseudosubstrate (PKC- $\zeta$  PS) at the indicated doses for 1h and either stimulated or not stimulated (NS) with murine IL-1 (100 U/ml) or murine TNF- $\alpha$  (100 U/ml). After 18h, supernatants were collected, lyophilized and assayed for their gelatinase content by zymography (A). Molecular weights (kDa) appear on the left. At 10h, total RNA was extracted and RT-PCR analysis using MMP-9 and GAPDH specific primers, was performed as described in "Experimental Procedures" (B). Molecular weight markers are 100 bp ladder. Results are representative of three independent experiments.

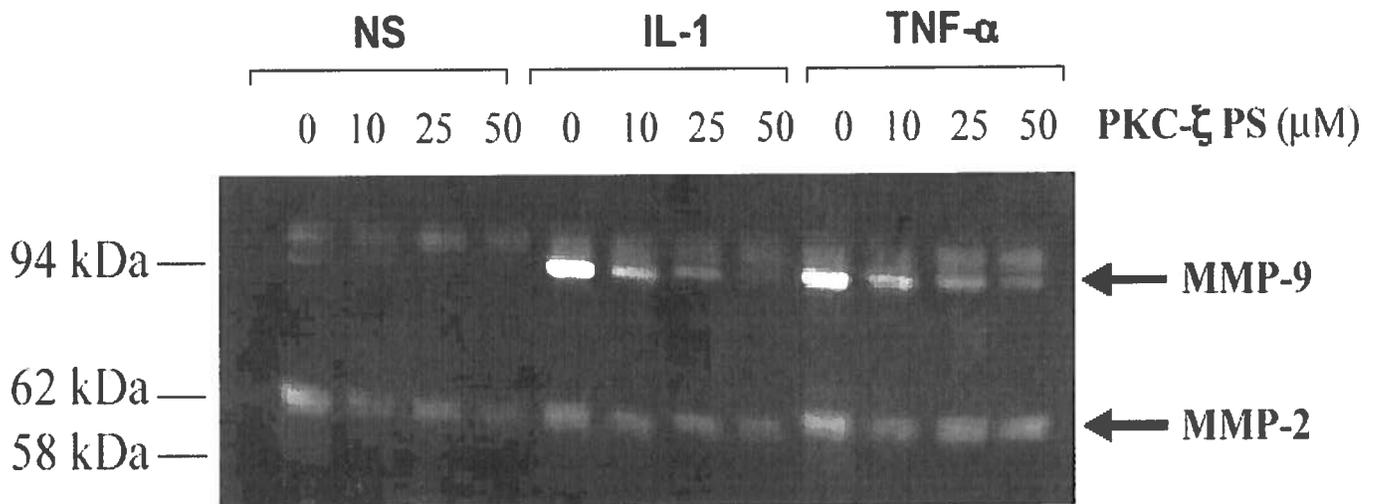
**Figure 2.** Induction of PKC- $\zeta$  activity by IL-1 and TNF- $\alpha$ . A, Rat C6 cells were either stimulated for 10 min or not stimulated (NS) with murine IL-1 (100 U/ml) or murine TNF- $\alpha$  (100 U/ml). After immunoprecipitation of total cell lysates with a PKC- $\zeta/\lambda$  antibody, an *in vitro* kinase assay was performed in the absence (-) or in presence (+) of PKC- $\zeta$  PS (100  $\mu$ M) as indicated in "Experimental Procedures". Phosphorylation of  $\epsilon$ -peptide was detected by autoradiography. B, Quantitative analysis of  $\epsilon$ -peptide phosphorylation were performed by imaging densitometry. Results are representative of three independent experiments.

**Figure 3.** Overexpression of PKC- $\zeta$ , but not of PKC- $\epsilon$ , induces MMP-9 activity and gene expression. Stable clones ( $\zeta$ 1,  $\zeta$ 2 and  $\zeta$ 3) overexpressing PKC- $\zeta$  (A) and PKC- $\epsilon$  ( $\epsilon$ 1,  $\epsilon$ 2 and  $\epsilon$ 3; D) were characterized by Western blot analysis compared to C6 cells transfected with the vector alone (V1 for PKC- $\zeta$  and V1, V2 for PKC- $\epsilon$ , respectively). Clones  $\zeta$ 1,  $\zeta$ 2,  $\zeta$ 3 and V1, V2,  $\epsilon$ 1,  $\epsilon$ 2 and  $\epsilon$ 3 were either stimulated or not stimulated (NS) with murine IL-1 (100 U/ml) or with murine TNF- $\alpha$  (100 U/ml). After 18h, supernatants were collected, lyophilized and assayed for their gelatinase content by zymography (B and E, respectively). Total RNA isolated from V1, V2,  $\zeta$ 1 and  $\zeta$ 2 clones was assayed for RT-PCR analysis by using MMP-9 and  $\beta$ -actin specific primers (C). Results are representative of three independent experiments.

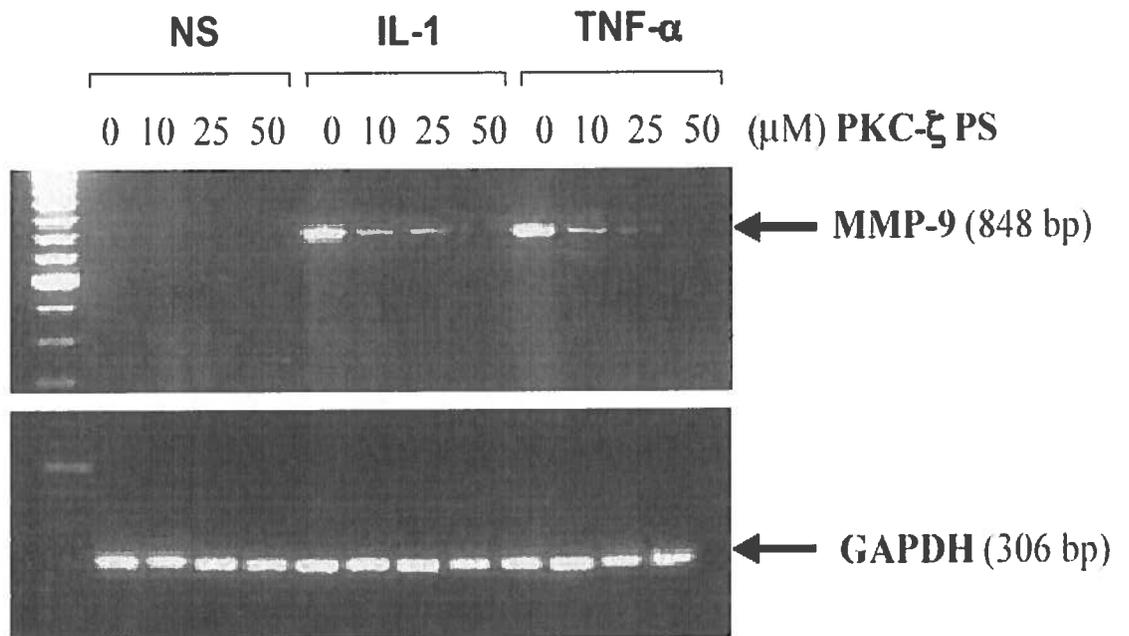
**Figure 4.** MMP-9 induction, either by cytokines or in PKC- $\zeta$  clones, is inhibited by the SN50 NF- $\kappa$ B blocking peptide. A, Rat C6 cells were treated with or without (-), 50 (+) or 100 (++)  $\mu$ g/ml of the SN50 or SN50M peptide for 1h before being stimulated or not (NS), by murine IL-1 (100 U/ml) or by murine TNF- $\alpha$  (100 U/ml). After 18h, supernatants were collected, lyophilized and assayed for their gelatinase content by zymography. B, V1,  $\zeta$ 1 and  $\zeta$ 2 clones were incubated with or without (-) 100  $\mu$ g/ml of SN50 or of SN50M (+) peptide and after 18h, their supernatants were collected, lyophilized and assayed for their gelatinase content by zymography. Results are representative of three independent experiments.

**Figure 5.** Increase of MMP-9 promoter activity, either by cytokines or in PKC- $\zeta$  clones, is inhibited by mutation into the NF- $\kappa$ B binding site. V1,  $\zeta$ 1 and  $\zeta$ 2 clones cultured in six-well plates were cotransfected with 4  $\mu$ g of pGL-Basic, pGL-MMP-9wt or pGL-MMP-9  $\Delta$  NF- $\kappa$ B and 0.5  $\mu$ g of pSV/ $\beta$ -gal. Six hours after transfection, cells were treated with (+) or without (-) 100 U/ml of IL-1 or TNF- $\alpha$  for 48 h. Values of luciferase activities were corrected for transfection efficiencies by assaying for  $\beta$ -galactosidase activity. This experiment was performed in duplicates and was repeated twice with similar results.

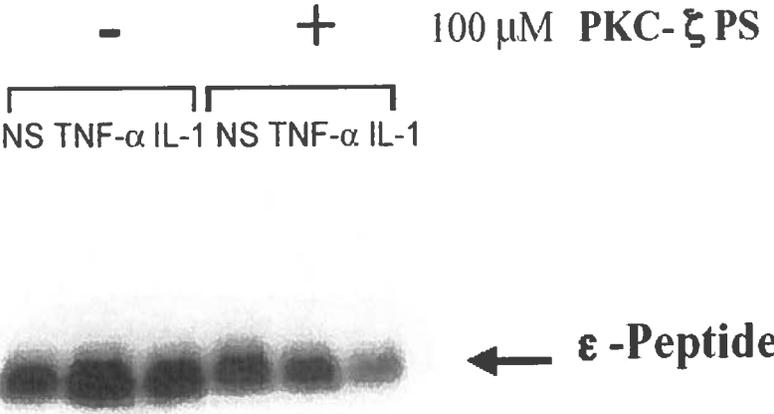
**Figure 1 A**



**Figure 1 B**



**Figure 2 A**



**B**

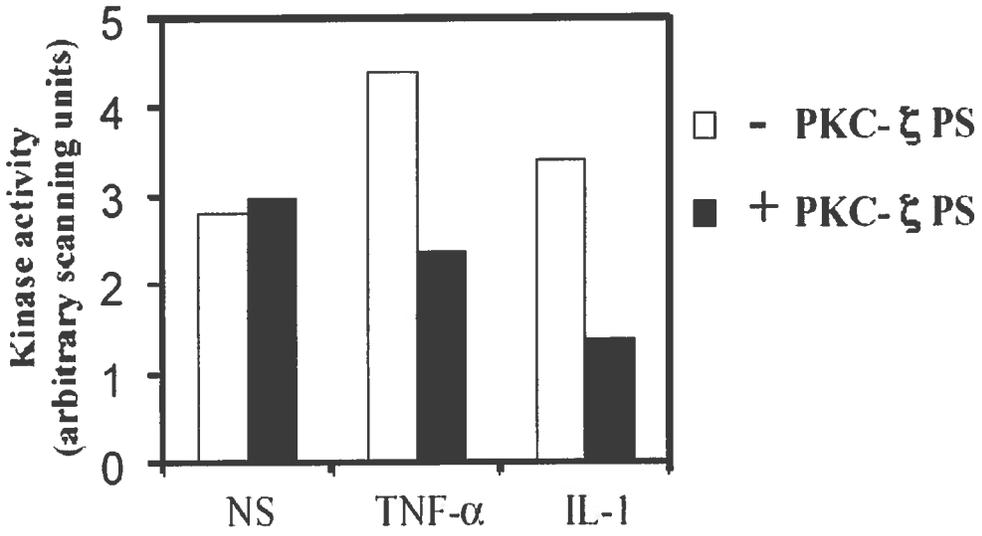
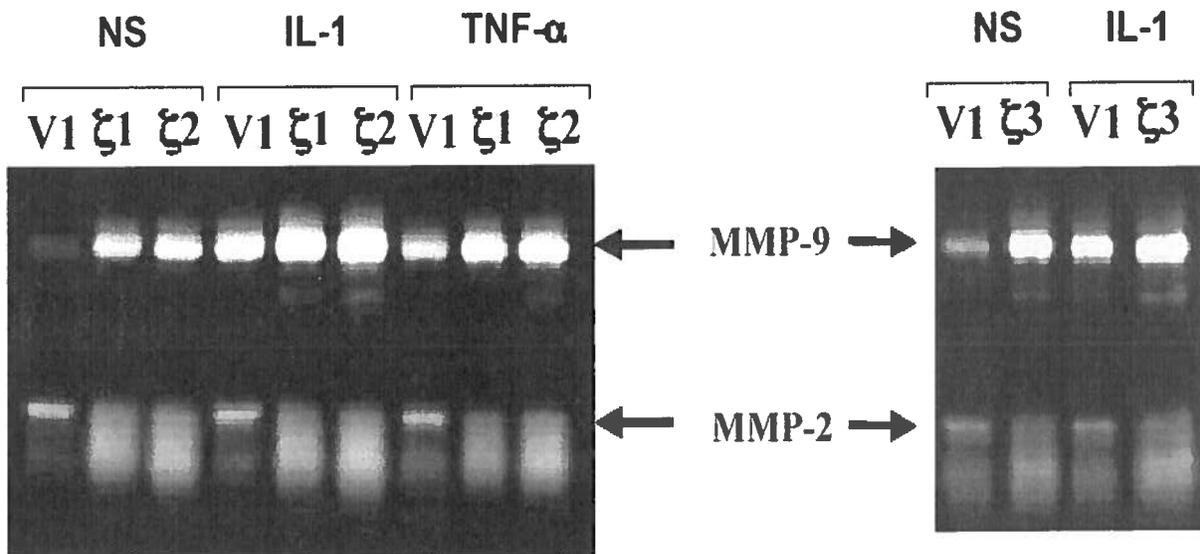


Figure 3 A

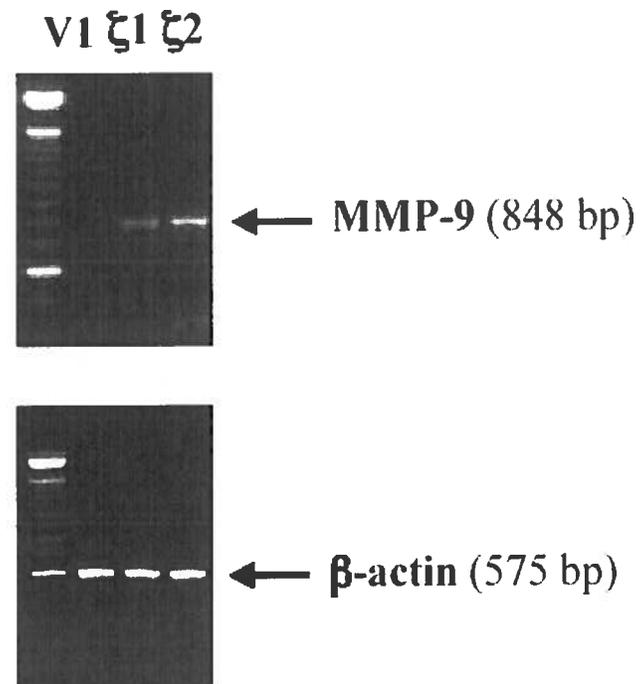


B

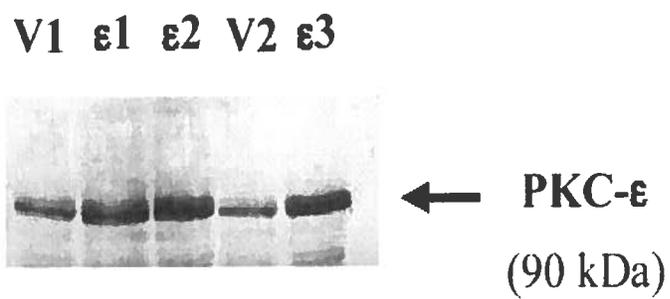


**Figure 3**

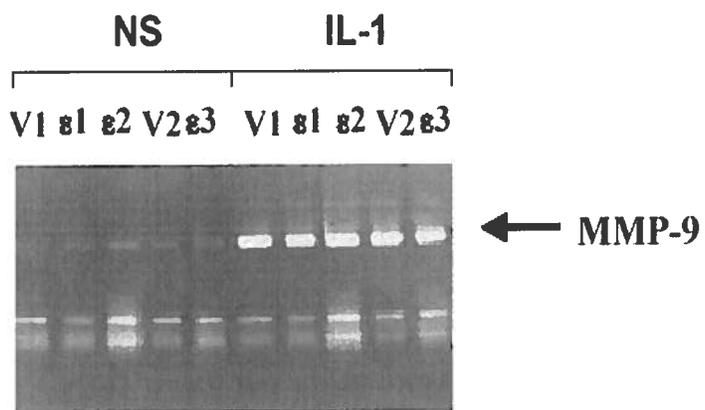
**C**



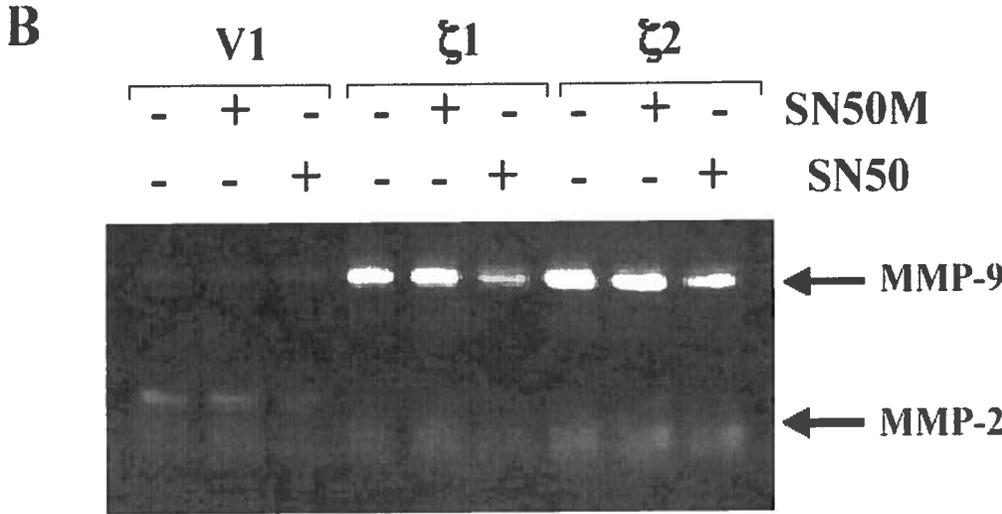
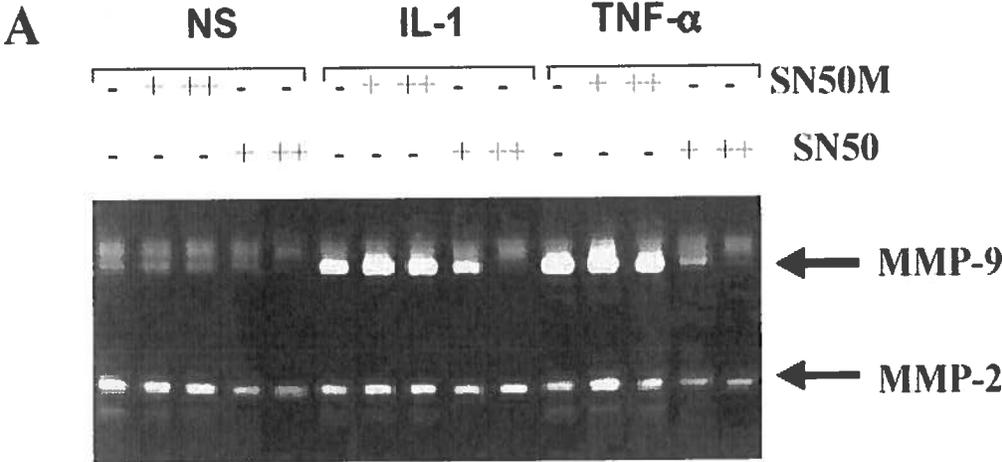
**Figure 3 D**



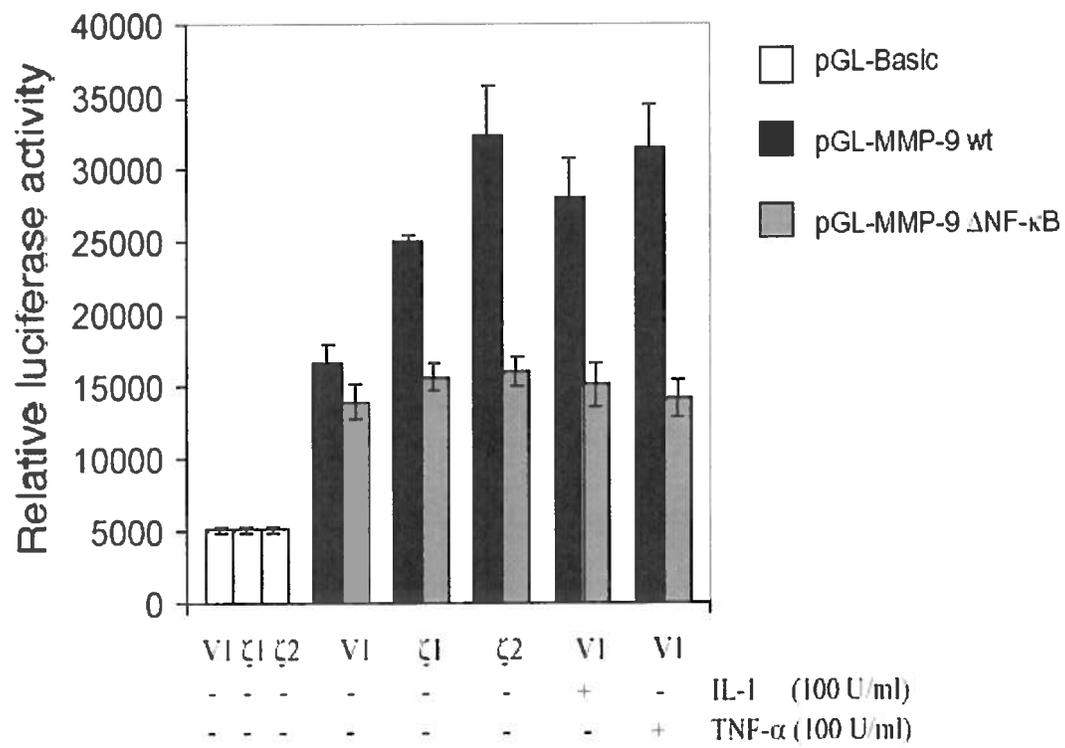
**E**



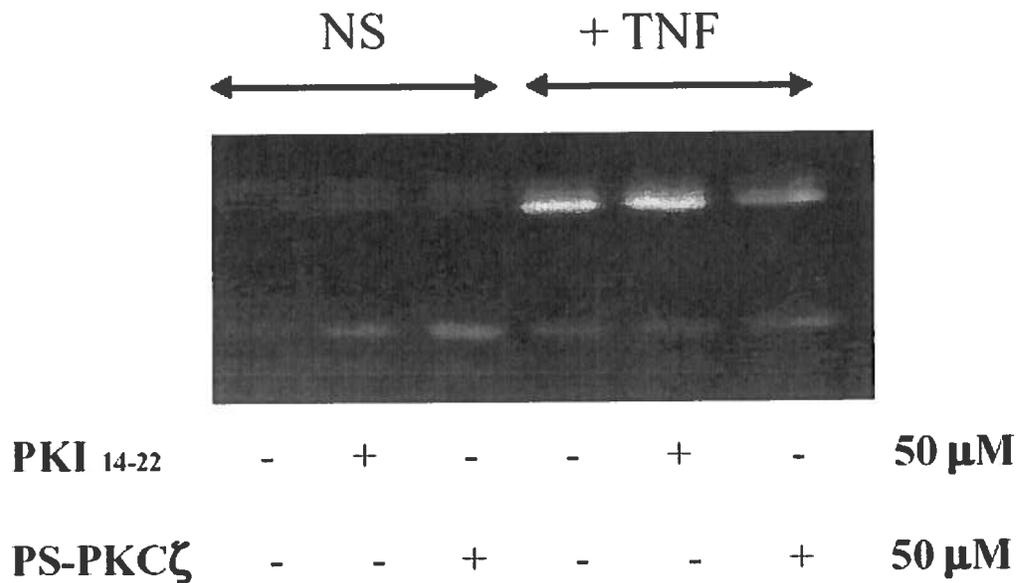
**Figure 4**



**Figure 5**



**Fig. 1C**

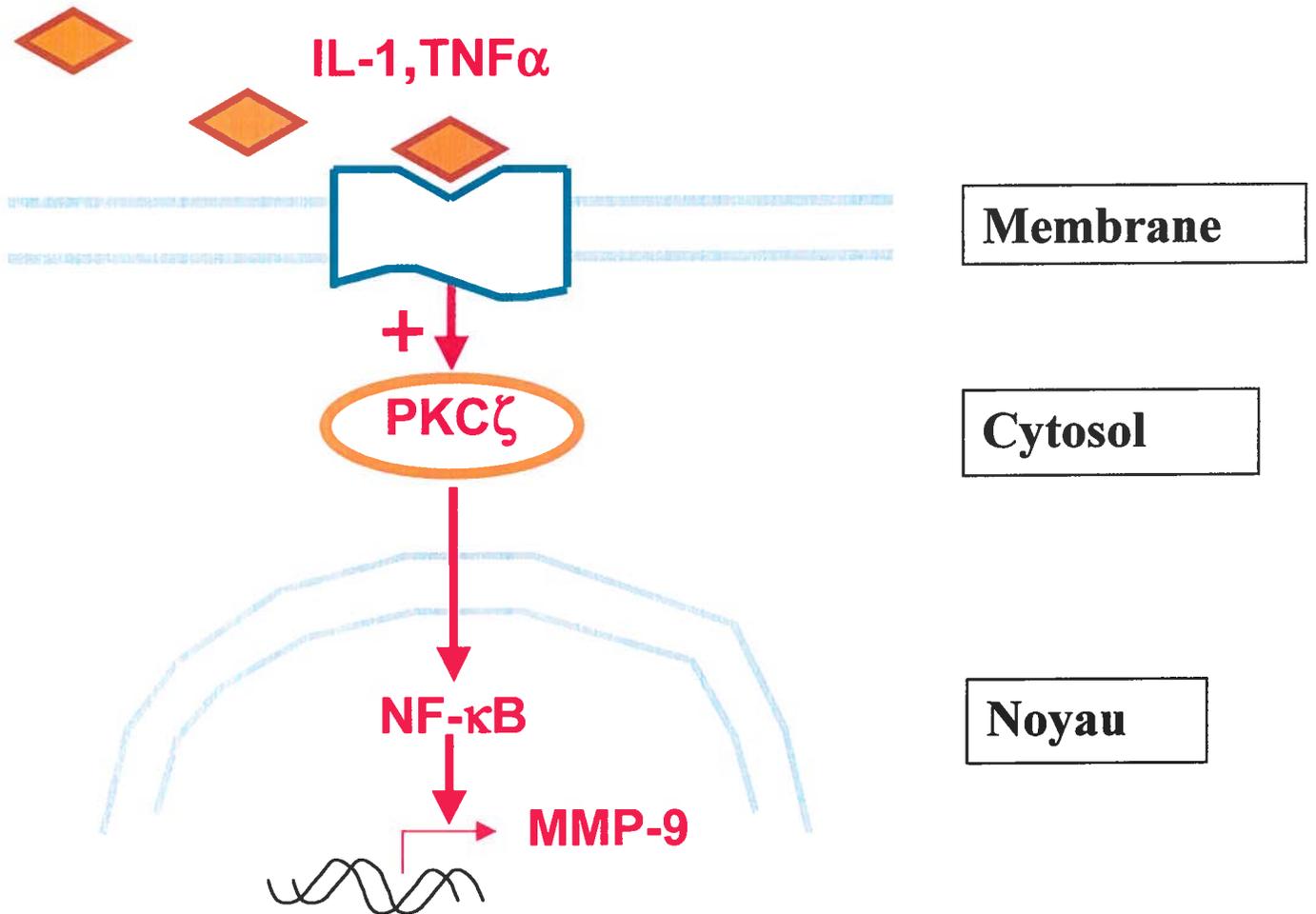


Rat C6 cells were treated at the indicated dose of PKC- $\zeta$  pseudosubstrate (PKC- $\zeta$  PS) or the control peptide (PKI 14-22) for 1h before the stimulation with or without (NS), murine murine TNF- $\alpha$  (100 U/ml). After 18h, supernatants were collected, lyophilized and assayed for their gelatinase content by zymography.

*N.B.* : Figure rajoutée lors du processus de révision de l'article soumis à JBC.

## CONCLUSION DU CHAPITRE 2

**Figure 11** : Rôle de PKC- $\zeta$  dans la régulation de l'expression de MMP-9



**Légende** : Schéma représentant la régulation de l'expression de MMP-9 chez le gliome par PKC $\zeta$ . IL-1 et TNF- $\alpha$  induisent l'expression de MMP-9, par activation de PKC $\zeta$ , qui à son tour, vient activer le facteur de transcription NF- $\kappa$ B, nécessaire à l'induction de MMP-9.

## **Chapitre 3**

## RÉSUMÉ

La régulation de l'expression de la métalloprotéinase-9 (MMP-9) chez les gliomes est un des processus clé de l'invasion tumorale à travers la matrice extracellulaire du cerveau. Bien que certaines études ont démontré que la phosphatidylinositol-3 kinase (IP-3 kinase) était impliquée dans l'initiation de la production de MMP-9 par les facteurs de croissance chez d'autres types cellulaires, son implication dans les signaux de transduction médiés par les cytokines inflammatoires conduisant à l'expression de MMP-9 chez les gliomes demeure inconnue. Dans ce travail, nous rapportons que l'IP-3 kinase inhibe l'expression de MMP-9 induite par les deux cytokines interleukin-1 (IL-1) ou le facteur de nécrose des tumeurs- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) chez les gliomes de rat C6. Ainsi, en utilisant les méthodes de zymographie et de RT-PCR semi-quantitatif, nous avons montré que le prétraitement des cellules C6 avec la wortmannin, un inhibiteur de l'activité IP-3 kinase, potentialisait l'activité et l'expression du gène de MMP-9, induite par l'IL-1 ou le TNF- $\alpha$ . De plus, le prétraitement des cellules C6 avec le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), un inducteur de l'activité IP-3 kinase, inhibait la production de MMP-9 induite par IL-1 ou le TNF- $\alpha$ . Cette inhibition a été abolie par la wortmannin. Également, des clones stables surexprimant la forme mutante de p85 $\alpha$ , la sous-unité régulatrice de l'IP-3 kinase, ont montré une légère augmentation de l'expression constitutive de MMP-9 et une potentialisation de l'expression de MMP-9 induite par l'IL-1 ou le TNF- $\alpha$ . Malgré cela, le traitement des cellules C6 à la wortmannin n'a pas affecté pas l'activité du promoteur de MMP-9 contenant les sites de liaison des trois facteurs de transcription nécessaires à l'induction de MMP-9 par l'IL-1 ou le TNF- $\alpha$ , suggérant que l'IP-3 kinase n'affecte pas l'activation des facteurs de transcription conduisant à l'expression du gène MMP-9. L'ensemble de ces résultats indique que l'IP-3 kinase peut agir en tant que régulateur négatif de l'expression de MMP-9 chez les gliomes de rat C6.

**Induced expression of matrix metalloproteinase-9 in C6 glioma cells is inhibited by PDGF via a phosphatidylinositol-3-kinase-dependent pathway.**

**Pierre Olivier Estève, Olivier Robledo, Edouard F. Potworowski,  
and Yves St-Pierre\*<sup>+</sup>**

*\* INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec,  
531 Boul. des-Prairies, Laval, Québec, Canada H7V 1B7*

**<sup>+</sup>To whom correspondence should be addressed :**

INRS-Institut Armand-Frappier  
531 Boul. des-Prairies  
Laval, Québec, Canada H7V 1B7  
Phone: 514-686-5354  
Fax: 514-686-5501  
E-mail: [yves.st-pierre@inrs-iaf.quebec.ca](mailto:yves.st-pierre@inrs-iaf.quebec.ca)

## Summary

The involvement of phosphatidylinositol 3 (PI 3)-kinase in the signalling pathways of leading to MMP-9 expression in glioma cells remains unclear. Here, we report that PI 3-kinase inhibits MMP-9 expression induced by either interleukin-1 (IL-1) or tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in rat C6 glioma cells. Using zymography and semi-quantitative RT-PCR analysis, we showed that treatment of C6 cells with wortmannin, an inhibitor of PI 3-kinase activity, potentiated the activity and gene expression of MMP-9 induced by both cytokines. In contrast, platelet derived growth factor (PDGF), an inducer of PI 3-kinase activity in C6 cells, inhibited the IL-1- or TNF- $\alpha$ -induced MMP-9 production. Accordingly, this inhibition by PDGF was prevented by wortmannin. Furthermore, stable C6 clones over-expressing the dominant-negative form of p85 $\alpha$ , the regulatory subunit of PI 3-kinase, potentiated the expression of MMP-9 induced by IL-1 or TNF- $\alpha$ . Taken together, these results indicate that PI 3-kinase can act as a negative regulator of MMP-9 expression in C6 glioma cells.

## Introduction

Glioma represent the majority of brain tumors and always have a fatal outcome (1). Malignant glioma cells infiltrate surrounding brain tissues by secreting proteases, including matrix metalloproteinases (MMPs), a family of enzymes which lyses different components of the extracellular matrix, such as collagen, fibronectin and proteoglycans (2,3). One of these MMPs, MMP-9, has received considerable attention as its expression correlates with the progression of glioma (4). In addition, a recent report showing that the inhibition of MMP-9 expression by antisense gene transfer strongly reduced the invasion of glioma cells *in vitro and in vivo*, indicates that MMP -9 seems to be critical for the invasiveness of glioma cells (5). Accumulating evidence also indicates that MMP-9 contributes not only to tumor invasion, but also to the degradation of the blood-brain barrier, to neuro-degenerative processes, and to angiogenesis (6-8), three features commonly associated with glial tumors. Therefore, understanding the role of the molecules involved in the signalling pathways regulating MMP-9 gene expression in glioma cells is important in order to identify new therapeutic targets.

Among intracellular kinases, lipid phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase) seems to play a key role in glioma development as it participates both in the oncogenesis and in the survival pathways of glioma cells (9-11). A high activity of PI 3-kinase is often detected in glioma cells, probably due to the loss of the protein tyrosine phosphatase and tensin homologue, PTEN, a PI 3-kinase negative regulator (12,13). PI 3-kinase is an heterodimeric protein composed of a regulatory subunit p85 $\alpha$  and a catalytic subunit p110, and can be activated by growth factors, most notably the platelet-derived growth

factor (PDGF) (14). Binding of PDGF induces autophosphorylation of tyrosine residues located within the intracellular portion of its receptor, which serves as a binding site for the src homology 2 domain (SH2) of the p85 $\alpha$  regulatory subunit (15), thereby increasing PI 3-kinase activity by allosteric regulation of p110 activity (16). PI 3-kinase has many substrates, and can activate others kinases, including the atypical protein kinase C-zeta (PKC- $\zeta$ ) (17). Since we previously reported that the inflammatory cytokines interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) both induced MMP-9 expression in the rat C6 glioma cells via PKC- $\zeta$ , through the activation of the nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (18), we postulate that PI 3-kinase could be involved in the induction of MMP-9 gene expression in glioma cells.

In this the present work, we show that inhibiting the PI 3-kinase activity of C6 glioma cells with wortmannin, potentiates the induction of MMP-9 expression at both mRNA and protein levels. Accordingly, inducing PI 3-kinase activity in C6 cells with the platelet derived growth factor (PDGF) inhibited MMP-9 production. This inhibition by PDGF was in turn prevented by wortmannin. Furthermore, we show that stable C6 clones over-expressing the dominant-negative p85 $\alpha$  regulatory subunit of PI 3-kinase increased MMP-9 expression induced by IL-1 or TNF- $\alpha$ . We therefore identify PI 3-kinase as an important mediator of MMP-9 expression in C6 glioma cells.

## Experimental procedures

### Reagents and antibodies

Reagents used were obtained from Sigma unless otherwise indicated. Wortmannin was obtained from Calbiochem. Mouse recombinant IL-1 and TNF- $\alpha$  were purchased from Genzyme (Cambridge, MA) and PDGF from R&D Systems (Minneapolis, MN).

### Cell lines

The rat C6 glioma cell line was obtained from the American type Culture Collection (Rockville, MD). The cells and stable transfectants were grown in Ham's F10 medium supplemented with 15% (v/v) horse serum, 2.5% fetal bovine serum and 10 mM HEPES buffer (complete medium). All tissue culture reagents were purchased from Life Technologies (Mississauga, ON). Routine testing showed the cells to be free of mycoplasma. For stimulation assays with mouse recombinant IL-1 $\alpha$  or TNF- $\alpha$ , cells were trypsinized with a solution of 1 mM EDTA/0.25% (w/v) trypsin, seeded at a density of  $10^6$  cells/ml in 12 well cluster plates, and incubated for 18h at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Monolayers were then washed three times with PBS and fresh serum-free medium containing the appropriate cytokine added at the indicated concentration. In some experiments, C6 cells or transfectants over-expressing the wt-p85 $\alpha$  or the  $\Delta$ p85 $\alpha$  form were pre-incubated for 1 h with wortmannin or PDGF before IL-1 or TNF- $\alpha$  treatment. MTT assays were performed to ensure that these treatments had no effect on cell viability. Unless otherwise indicated, supernatants were harvested after 18h of stimulation and stored at -20°C until assayed.

## **Zymography**

Zymography was performed in 10% polyacrylamide gels that had been cast in the presence of gelatin as previously described (20). Briefly, samples (100µl) were lyophilized, resuspended in loading buffer and, without prior denaturation, were run on a 7.5% SDS-polyacrylamide gel containing 0.5 mg/ml of denatured collagen (gelatin; Sigma, St.Louis, MO). After electrophoresis, gels were washed to remove SDS and incubated for 18 h at 37°C in a renaturing buffer (50mM Tris, 5mM CaCl<sub>2</sub>, 0.02% NaN<sub>3</sub>, 1% Triton X-100). Gels were subsequently stained with Coomassie brilliant blue G-250 and destained in 30% methanol/ 10% acetic acid (v/v) to detect gelatinase secretion. Gelatinase activity was measured in arbitrary units by quantitative analysis of negatively stained bands through computerized image analysis (Biorad, model GS-670 Densitometer).

## **RNA isolation and RT-PCR analysis**

Isolation of total cellular RNA was performed using the Trizol reagent (GIBCO-BRL) according to the manufacturer's instructions. Aliquots of 2mg of total cellular RNA were used for first strand cDNA synthesis in 20ml of reaction volume using 100 U of Superscript<sup>TM</sup> II reverse transcriptase (Life Technologies). After determining the linear range of RT-PCR for each of the target genes, amplification of the gene under investigation was carried out using the following primers: MMP-9 sense 5'-TCCCTCTGAATAAAGTCGACA-3'; MMP-9 antisense 5'-AGGTGACAAGGTG GACCATG-3'; GAPDH sense primer 5'-CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT-3'; GAPDH antisense 5'-AGCCTTCTCCAT GGTGGTGAAGAC-3'. The length of the

MMP-9 and GAPDH amplicons were respectively 848 and 306 bp. Sequences of the primers for amplification of the wild-type and mutant bovine p85 $\alpha$  subunit of PI-3 kinase were: (sense) 5'-TCGAGACACAGCTGACGGCA-3' and (antisense) 5'-CCGCCTGCTTCTTCAA GTCC-3', generating a 620 bp fragment in the case of the wild-type form of the gene, and a 520 bp fragment in the case of mutant form p85 $\alpha$ . PCR amplifications were performed on a MJ Research Thermal Cycler (Model PTC-100<sup>TM</sup>, Watertown, MA) using the following program: step 1, 94<sup>0</sup>C for 1 min; step 2, 60<sup>0</sup>C for 1 min; step 3, 72<sup>0</sup>C for 1 min. Thirty cycles were performed for the amplification of MMP-9, p85 $\alpha$  and 20 cycles for GAPDH. The amplification for each gene was in the linear curve. PCR products were visualized on 1.5% agarose gels stained by ethidium bromide and UV transillumination. Semiquantitative analysis was done with a computerized densitometric imager to obtain MMP-9/GAPDH ratios.

### **Cloning of MMP-9 promoter and transient transfections**

A 737 bp fragment of the 5'-flanking region of the murine MMP-9 gene (Genbank Accession no. AF 403768), containing Sp1, AP-1 and NF- $\kappa$ B binding sites (i.e. all elements necessary for MMP-9 promoter activity) (22), was obtained by PCR amplification using stringent conditions on a genomic DNA using the following primers : (5') primer 5'-AGGAAGGATAGTGCTAGCCTGAGAAGGATG-3' and (3') primer 5'-CCGAAACTCGAG GAGAGCCAGGAGCAGGG-3'. Integrity of the DNA sequence was confirmed by DNA automated sequencing. The fragment was digested by NheI and XhoI and subsequently ligated into pGL-III Basic vector encoding the Firefly luciferase gene (Promega, Madison, WI) to generate pGL-MMP-9wt (wt, wild type). Transient

transfections were performed using Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's instructions (Life Technologies). Transfection efficiency was monitored by co-transfection with 0.5  $\mu\text{g}$  of the pSV/ $\beta$ -gal plasmid encoding  $\beta$ -galactosidase (Promega). Cell lysis and luciferase assays were performed 48h post-transfection using the Luciferase Assay System (Promega) in a luminometer (Berthold Lumat LB 9507) and values were converted to relative light units (RLU).  $\beta$ -galactosidase activity was measured assay using o-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside as a substrate according to the  $\beta$ -galactosidase Assay System (Promega).

**Generation of stable transfectants expressing dominant-negative mutant of p85 $\alpha$  subunit of PI-3-kinase.**

The wild type (wt-p85 $\alpha$ ) and dominant-negative ( $\Delta$ p85 $\alpha$ ) encoding cDNAs were kindly provided by Dr W. Ogawa (Kobe University School of Medicine, Japan). In the dominant-negative form, 35 amino acids, involved in the binding with the p110 catalytic subunit of PI 3-kinase, are deleted in the inter-SH2 region from residues 479 to 513, and two other amino acids (Ser-Arg) are inserted in this deletion (19). To obtain C6 stable transfectants constitutively over-expressing the wild-type or the deleted form of p85 $\alpha$ , co-transfection was carried out by using Lipofectamine 2000 (Life Technologies), following the manufacturer's instructions, with 4  $\mu\text{g}$  of SR $\alpha$ -p85 $\alpha$  or SR $\alpha$ - $\Delta$ p85 $\alpha$  plasmids and 500 ng of the SR $\alpha$  plasmid encoding for puromycin resistance (SR $\alpha$ -puro, kindly provided by Dr. François Denis, INRS-Institut Armand-Frappier). Controls were generated using C6 cells co-transfected with 4  $\mu\text{g}$  of the empty vector SR $\alpha$  and 500 ng of SR $\alpha$ -puro. After 6 h of transfection in serum free medium, transfected cells were allowed to grow in complete medium containing 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$  of puromycin (Life Technologies) before

individual colonies were picked and expanded into cell lines. Individual clones were then tested for expression of p85 $\alpha$  by RT-PCR as described above.

## Results

### **Induction of MMP-9 activity and mRNA expression by IL-1 or TNF- $\alpha$ is enhanced by wortmannin C6 glioma cells**

To determine whether PI 3-kinase participated in the IL-1- and TNF- $\alpha$ -mediated induction of MMP-9 secretion by C6 cells, we used the specific PI 3-kinase inhibitor wortmannin, a fungal protein. The cells were incubated at varying concentrations of the inhibitor, stimulated for 16 h with IL-1 and TNF- $\alpha$ , and MMP-9 secretion in serum-free supernatant was measured by gelatin zymography, as previously described (20). Our results showed that wortmannin strongly increased, in a dose-dependent manner, the levels of MMP-9 induced by both IL-1 and TNF- $\alpha$  (Fig.1A). Constitutive levels of MMP-9 secretion were also increased by wortmannin treatment, most likely due to the fact that C6 cells constitutively express low levels of both IL-1 and TNF- $\alpha$  (21). The effect of wortmannin on IL-1- and TNF- $\alpha$ -induced MMP-9 secretion in C6 cells was also observed at the mRNA level (Fig. 1B). In contrast, GAPDH mRNA levels remained unchanged following treatment with the PI 3-kinase inhibitor in presence of the inflammatory cytokines.

To further characterize the effect of the PI 3-kinase inhibitor on MMP-9 transcriptional activity, we transfected C6 cells with a vector encoding a reporter gene construct (pGL-MMP-9wt) containing the MMP-9 promoter with the proximal transcriptional DNA binding motifs specific for the transcription factors (AP-1, NF- $\kappa$ B and Sp1) and shown to be sufficient to induce MMP-9 promoter activity in a transient transfection assay (22). Transient transfections of C6 cells with pGL-MMP-9wt resulted a 2.8- and 2-fold

increase in MMP-9 transcriptional promoter activity induced by IL-1 or TNF- $\alpha$ , respectively (Fig.1C). Treatment with wortmannin had no effect on either the basal- or cytokine induced-transcriptional promoter activity of MMP-9. This indicates that PI 3-kinase regulates an upstream inhibitory element in the MMP-9 promoter.

### **PDGF inhibits the IL-1- or TNF- $\alpha$ -induced MMP-9 expression in C6 glioma cells**

The above results were consistent with the idea that PI 3-kinase negatively regulates the induction of MMP-9 by IL-1 and TNF- $\alpha$ . To test this hypothesis, we used a second approach, which consisted of determining whether stimulation of C6 cells via PDGF, a growth factor known to activate PI 3-kinase activity in these cells (23), could inhibit the IL-1 or TNF- $\alpha$ -induced MMP-9 expression. Gelatin zymography showed that PDGF was in fact able to downregulate MMP-9 activity induced by TNF- $\alpha$  in a dose-dependent manner (Fig.2A), while it had no effect on MMP-9 and MMP-2 constitutive expression. Furthermore, PDGF inhibited the MMP-9 secretion induced by IL-1 (Fig.2B), thus supporting the hypothesis that PI 3-kinase negatively regulates MMP-9 expression induced by inflammatory cytokines.

### **Inhibition of MMP-9 expression by PDGF is reversed by wortmannin**

To confirm that the inhibition of MMP-9 expression by PDGF is related to its ability to activate PI 3-kinase, we pre-treated C6 cells with the wortmannin before adding PDGF and IL-1 or TNF- $\alpha$ . A low concentration of wortmannin was used to ensure that this inhibitor was present in a non-saturable concentration. Indeed, the wortmannin slightly increased MMP-9 activity induced by TNF- $\alpha$ , and was also able to completely reverse

the inhibitory effect of PDGF (Fig.3). The same result was obtained when MMP-9 expression was induced by IL-1 (data not shown). These observations suggest that PDGF inhibits MMP-9 expression via PI 3-kinase.

### **Over-expression of a dominant-negative form of p85 $\alpha$ upregulates MMP-9 expression**

To further confirm that the PI 3-kinase pathway was involved in the regulation of MMP-9 expression, we transfected C6 cells with a vector encoding a dominant-negative mutant of p85 $\alpha$  ( $\Delta$ p85 $\alpha$ ). Expression of a dominant-negative mutant of p85 $\alpha$ , in which the inter-SH2 region required for binding the p110 subunit is disrupted, has been shown to inhibit PI 3-kinase activity in different cell types, including C6 cells (24). As a control, C6 cells were stably transfected with the empty SR $\alpha$  vector. We found that over-expression of  $\Delta$ p85 $\alpha$  resulted in enhanced MMP-9 secretion in response to both inflammatory cytokines compared to C6 cells expressing the empty vector (Fig.4). This increase of MMP-9 secretion was concomitant with an increase in the 58 kDa-associated gelatinolytic activity previously observed in C6 cells treated with wortmannin (Fig.1), confirming the inhibitory effects of the  $\Delta$ p85 $\alpha$  constructs in the PI 3-kinase pathway in C6 cells, and further establishing a physiological link between this pathway and the conversion of MMP-2 from a 62 kDa into a 58 kDa form.

## Discussion

In the present work, we have shown that: 1) inhibition of PI 3-kinase with wortmannin, a specific inhibitor of PI 3-kinase, increased IL-1 and TNF- $\alpha$  induced MMP-9 expression both at the mRNA and at the protein levels, 2) an activator of PI 3-kinase, PDGF, inhibited the MMP-9 expression induced by IL-1 or TNF- $\alpha$ , and this inhibition is reversed by wortmannin, and 3) the over-expression of a mutant form of p85 $\alpha$ , increases basal- and cytokine-induced-MMP-9 expression.

In a recent work, we have shown that IL-1 and TNF- $\alpha$  induced expression of MMP-9 in the rat C6 glioma cells via the activation of PKC- $\zeta$  and the transcription factor NF- $\kappa$ B (18). Our results now identify PI 3-kinase as a negative regulator of MMP-9 gene expression in C6 cells. Our results with the reporter vector encoding the promoter of MMP-9 the NF- $\kappa$ B transcriptional element, previously shown to be essential for the MMP-9 transcriptional promoter activity (18), suggest further that the inhibitory effect of PI 3-kinase is not acting directly on the NF- $\kappa$ B pathway. This hypothesis is corroborated by previous studies in C6 cells, most notably those aimed at characterizing the intracellular pathways required to transduce the signal from the cell surface to the nucleus for the induction of the nitric oxide synthase gene (iNOS) in C6 glioma cells. These studies specifically showed : 1) that stimulation of C6 cells by IL-1 does not modulate PI 3-kinase activity, and 2) that treatment of C6 cells with PI 3-kinase inhibitors does not affect the DNA binding and transcriptional activity of NF- $\kappa$ B (24). Thus, the PI 3-kinase pathway could modulate the access of transcriptional factors to their binding site located in the distal region of the MMP-9 promoter. Such yet unidentified upstream cis-acting

regulatory elements (-7745 to -2722 bp) have indeed been transcriptional elements of the MMP-9 promoter and to be responsible for the cell-specific MMP-9 expression (25).

We initially postulated that PI 3-kinase could be implicated in the upregulation of MMP-9 induced by inflammatory cytokines, as it is observed in many other cell types. PI 3-kinase can activate PKC- $\zeta$ , which plays a key role in the regulation of MMP-9 expression in C6 glioma cells through NF- $\kappa$ B (18). The ability of PI 3-kinase pathway to provide inhibitory signals for MMP-9 expression is not in fact unique for glioma cells. Others have reported such an observation for other cell types, most notably for T cells in the case of MMP-2 and MMP-9 (26). Most likely, molecules such as C<sub>6</sub>-ceramide and p21ras are acting as intermediate messengers between IL-1/TNF- $\alpha$  and PKC- $\zeta$  as they have been shown to be potent activators of PKC- $\zeta$  (27,28) and to be involved in the activation of NF- $\kappa$ B in C6 cells and in rat primary astrocytes (29). Further studies on the early events in the signaling cascade leading the activation of PKC- $\zeta$  by IL-1 and TNF- $\alpha$  should clarify this issue.

Our data suggest that there is a functional link between PI 3-kinase, PDGF and MMP-9 in glioma cells. Numerous studies have shown that PDGF was an inducer of PI 3-kinase activity, most notably via the *src* tyrosine kinase family proteins, including pp60-*src* (30,31). However, as C6 cells over-expressing a dominant negative of pp60-*src* still displayed an inhibition of MMP-9 activity induced by PDGF (data not shown), the possibility that this protein is involved in the signaling pathway activated by PDGF is unlikely. This is consistent with the results of Kronfeld et al. (32) who showed that PDGF receptors are able to recruit two other proteins, *fyn* and *lyn*, but not *pp60-src*, upon

ligation with its natural ligand in C6 cells. It would thus be of interest to investigate the role of these two tyrosine kinases in the regulation of MMP-9 expression.

In conclusion, we showed that PI 3-kinase and PDGF are likely involved in the signaling cascade that inhibits the transcription of the MMP-9 gene, without affecting the activation of NF- $\kappa$ B in the C6 glioma cells. Further studies are needed to shed more light on the mechanism regulating the expression of MMP-9 by PI 3-kinase in order to find new specific therapeutic targets.

## References

1. Lesser, G.J. (1994) *Semin. Oncol.* **21**, 220-235
2. Rooprai, H.K., and McCormick, D. (1997) *Anticancer Res.* **17**, 4151-4162
3. Rutka, J.T., Giblin, J.R., Apodaca, G., DeArmond, S., Stern, R., and Rosenblum, M.L. (1987) *Cancer Res.* **47**, 3515-3522
4. Rao, J.S., Steck, P.A., Mohanam, S., Stetler-Stevenson, W.G., Liotta, L.A., and Sawaya, R. (1993) *Cancer Res.* **53 (Suppl)**, 2208-2211
5. 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., and Rao, J.S. (2000) *Cancer Res.* **60**, 6851-6855
6. Rosenberg, G.A., Estrada, E.Y., Dencoff, J.E., and Stetler-Stevenson, W.G. (1995) *Brain Res.* **703**, 151-155
7. Proost, P., Van Damme, J., and Opdenakker, G. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **192**, 1175-1181
8. Bergers, G., Brekken, R., McMahon, G., Vu, T.H., Itoh, T., Kazuhiko, T., Tanzawa, K., Thorpe, P., Itohara, S., Werb, Z., and Hanahan, D. (2000) *Nature Cell Biol.* **2**, 737-744
9. Huang, C., Ma, W-Y., and Dong, Z. (1996) *Mol. Cell. Biol.* **16**, 6427-6435
10. Strawn, L.M., Mann, E., Elliger, S.S., Chu, L.M., Germain, L.L., Niederfellner, G., Ullrich, A., Shawver, L.K. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 21215-21222

11. Bowers, D.C., Fan, S., Walter, K.A., Abounader, R., Williams, J.A., Rosen, E.M., and Latterra, J. (2000) *Cancer Res.* **60**, 4277-4283
12. Chakravarti, A., Loeffler, J.S., and Dyson, N.J. (2002) *Cancer Res.* **62**, 200-207
13. Wang, S.I., Puc, J., Li, J., Bruce, J.N., Cairns, P., Sidranski, D., and Parsons, R. (1997) *Cancer Res.* **57**, 4183-4186
14. Heldin, C.H., Ostman, A., and Ronnstrand, L. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1378**, 79-113
15. Klippel, A., Escobedo, J.A., Fantl, W.J., and Williams, L.T. (1992) *Mol. Cell Biol.* **12**, 1451-1459
16. Carpenter, C.L., and Cantley, L.C. (1996) *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 153-158
17. Nakanishi, H., Brewer, K.A., and Exton, J.H. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 13-16
18. Estève, P.O., Chicoine, E., Robledo, O., Aoudjit, F., Descoteaux, A., Potworowski, E.F., and St-Pierre, Y. (submitted)
19. Hara, K., Yonezawa, K., Sakaue, H., Ando, A., Kotani, K., Kitamura, T., Kitamura, Y., Ueda, H., Stephens, L., Jackson, R., Hawkin, P.T., Dhand, R., Clark, A.E., Holman, G.D., Waterfield, M.D., and Kasuga, M. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 7415-7419
20. Estève, P.O., Tremblay, P., Houde, M., St-Pierre, Y., and Mandeville, R. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1403**, 85-96
21. Gayle, D., Ilyin, S.E., Miele, M.E., and Plata-Salaman, C.R. (1998) *Brain Res. Bull.* **47**, 231-5

22. Sato, H. and Seiki, M. (1993) *Oncogene* **8**, 395-405
23. Sims, K., Straff, D., and Robinson, M.B. (2000) *J. Biol. Chem.* **274**, 5228-5237
24. Pahan, K., Raymond, J.R., and Singh, I. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 7528-7536
25. Munaut, C., Salonurmi, T., Kontusaari, S., Reponen, P., Morita, T., Foidart, J-M., and Tryggvason, K. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 5588-5596
26. Esparza J., Vilardell, C., Calvo, J., Juan, M., Vives, J., Urbano-Marquez, A., Yague, J., and Cid, MC. (1999) *Blood* **94**, 2754-2766.
27. Diaz-Meco, M.T. Lozano, J., Municio, M.M., Berra, E., Trutos, S., Sanz, L., and Moscat, J. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 31706-31710
28. Bourbon, N.A., Yun, J., and Kester, M. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 35617-35623
29. Pahan, K., Sheikh, F.G. Khan, M., Namboodiri, A.M.S., and Singh, I. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 2591-2600
30. Pahan, K., Liu, X., McKinney, M.J., Wood, C., Sheikh, F.G., and Raymond, J.R. (2000) *J. Neurochem.* **74**, 2288-2295
31. Basta, P., Strickland, M.B., Holmes, W., Loomis, C.R., Ballas, L.M., and Burns, D.J. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1132**, 154-160
32. Blake, R.A., Garcia-Paramio, P., Parker, P.J., and Courtneidge, S.A. (1999) *Cell Growth Differ.* **10**, 231-241
33. Kronfeld, I., Kazimirsky, G., Lorenzo, P.S., Garfield, S.H., Blumberg, P.M., and Brodie, C. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 35491-35498

## Footnotes

This work was supported by the National Cancer Institute of Canada (Y.S.P. and E.F.P.). Y.S.P is a scholar of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. O.R. is supported by a post-doctoral fellowship from la Fondation Armand-Frappier.

*Abbreviations* : MMPs, matrix metalloproteinases; PI 3-kinase, phosphatidylinositol 3-kinase C; IL-1, interleukin-1; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ ; PDGF, platelet-derived growth factor; PKC- $\zeta$ , protein kinase C-zeta; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; NF- $\kappa$ B, nuclear factor- $\kappa$ B; PBS, phosphate saline buffer; AP-1, activating protein-1; iNOS, inducible nitric oxide synthase.

## Figure Legends

**Figure 1.** Effect of wortmannin on MMP-9 expression and on promoter activity. **(A)** Effect of wortmannin on MMP-9 secretion by glioma cells. C6 glioma cells were pre-treated with the indicated doses of wortmannin for 1h, and either stimulated with murine IL-1 (100 U/ml) or murine TNF- $\alpha$  (100 U/ml). After 18h, supernatants were collected, lyophilized and assayed for their gelatinase content by zymography. Controls included not stimulated cells (NS) and cells without wortmannin. Molecular weight markers (kDa) are shown on the left of the gel. Results are representative of three independent experiments. **(B)** Effect of wortmannin on MMP-9 mRNA levels in glioma cells. At 10h post-stimulation with IL-1 and TNF- $\alpha$ , above, total RNA was extracted and RT-PCR analysis using MMP-9 and GAPDH specific primers, was performed as described in "Experimental Procedures". Molecular weight markers are 100 bp ladder. Results are representative of three independent experiments. **(C)** Increase of MMP-9 promoter activity by cytokines is not affected by wortmannin. C6 glioma cells were cultured in six-well plates and cotransfected with 4 $\mu$ g of pGL-Basic (control vector) or pGL-MMP-9wt and 0.5 $\mu$ g of pSV/ $\beta$ -gal. Twenty hours after transfection, cells were either not pre-treated (-) or pre-treated (+) for 1h with 100 nM of wortmannin and either not stimulated (NS) or stimulated with 100 U/ml of IL-1 or TNF- $\alpha$  for 48 h. Values of luciferase activities were corrected for transfection efficiencies by

assaying for  $\beta$ -galactosidase activity. This experiment was performed in duplicates and was repeated twice with similar results.

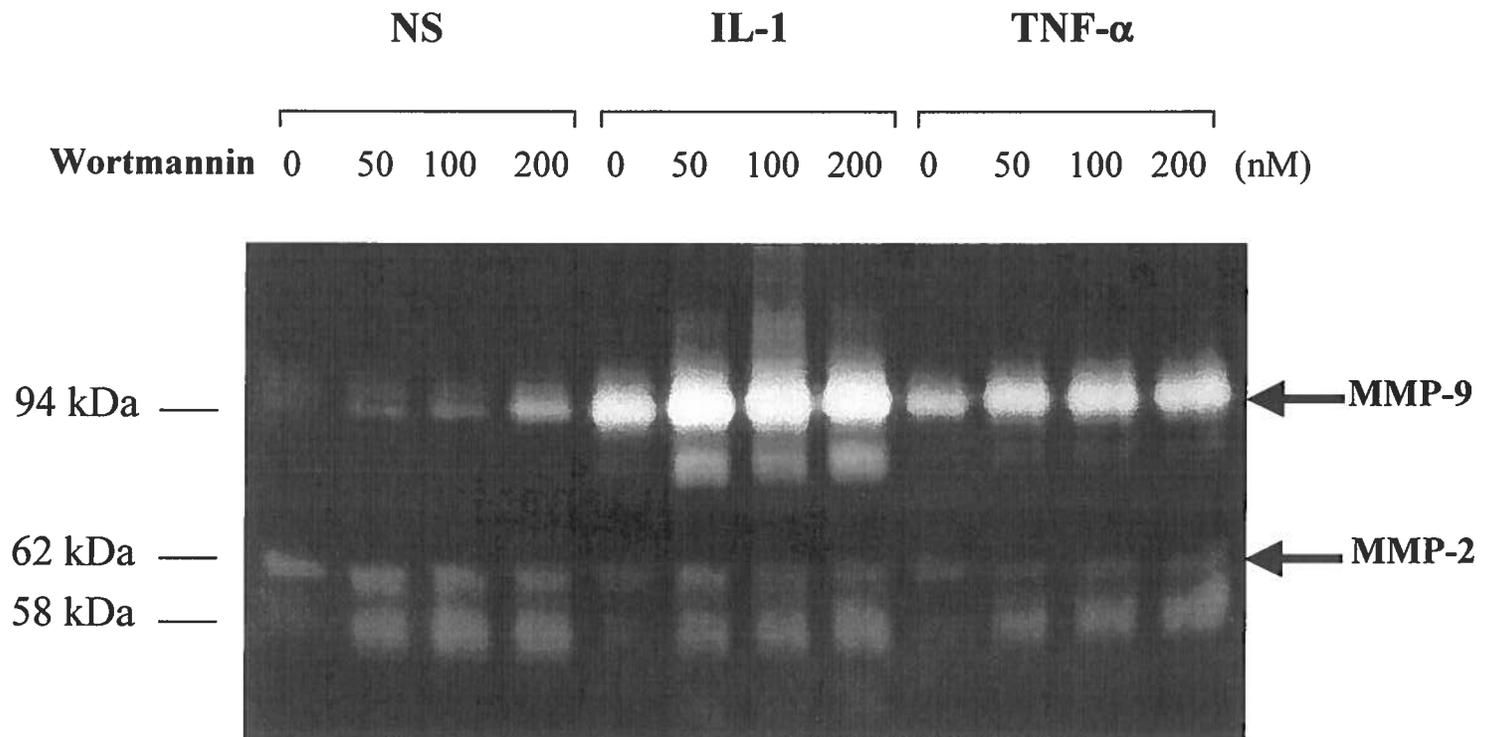
**Figure 2.** Inhibition of MMP-9 activity by PDGF. C6 cells were pre-treated without (-) or with (+) the PDGF-BB at the indicated doses for 1h, and either not stimulated (NS) or stimulated with murine (A) TNF- $\alpha$  (100 U/ml) or (B) IL-1 (100 U/ml). After 18h, supernatants were collected, lyophilized and assayed for their gelatinase content by zymography. Results are representative of three independent experiments.

**Figure 3.** Reversion of the PDGF effect on MMP-9 expression by wortmannin. C6 glioma cells were not treated (-) or treated (+) with wortmannin at the indicated dose for 30 min, and with PDGF-BB (20ng/ml) for 1h, and either not stimulated (NS) or stimulated with murine TNF- $\alpha$  (100 U/ml). After 18h, supernatants were collected, lyophilized and assayed for their gelatinase content by zymography. Results are representative of three independent experiments.

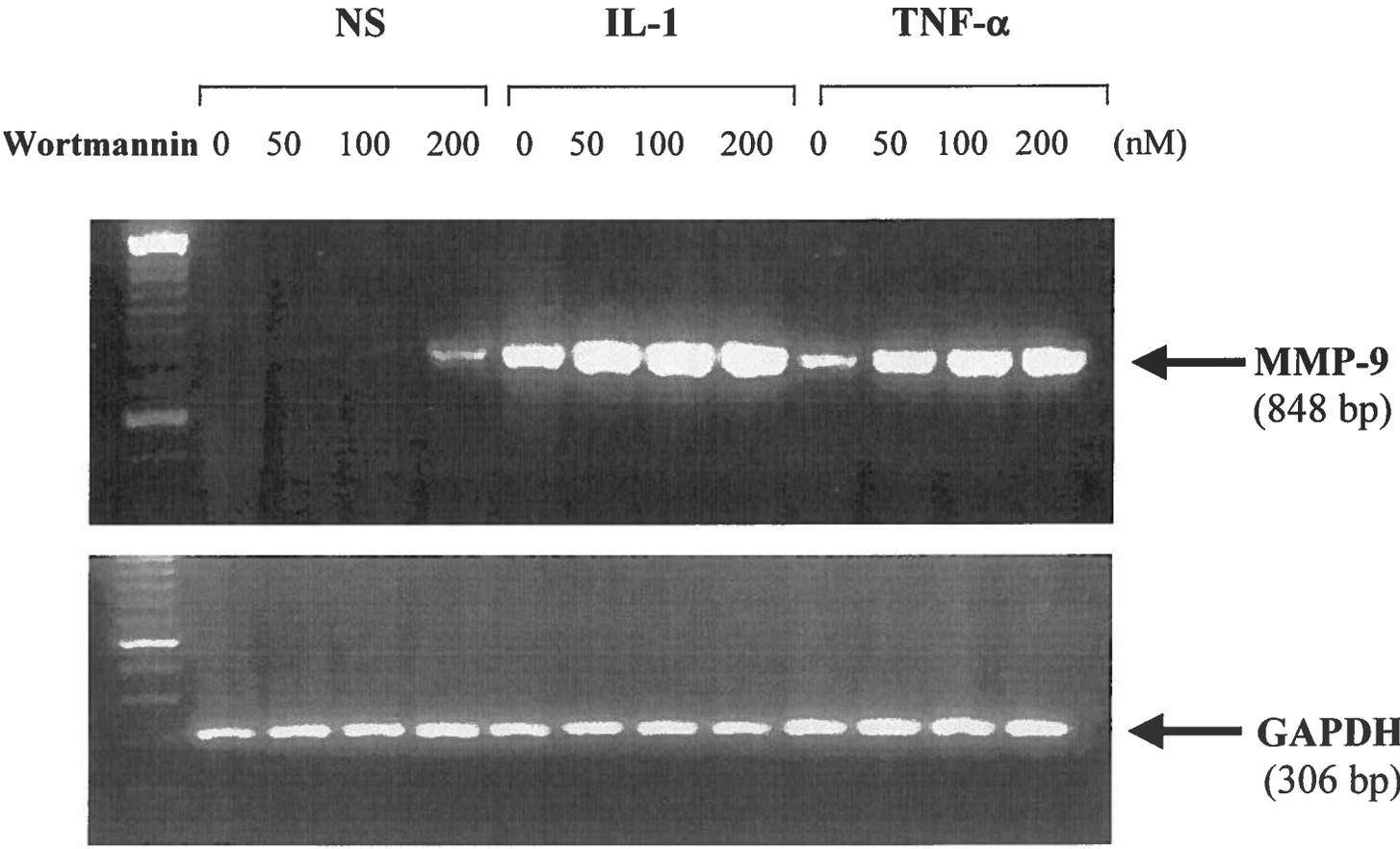
**Figure 4.** MMP-9 induction by cytokines in mutant p85 $\alpha$  clones, is potentiated. V,  $\Delta$ p85 $\alpha$ -1 and  $\Delta$ p85 $\alpha$ -2 clones were either not stimulated (NS) or stimulated with murine IL-1 (100 U/ml) or TNF- $\alpha$  (100 U/ml). After 18h, their supernatants were collected, lyophilized and assayed for their gelatinase

content by zymography. Results are representative of three independent experiments.

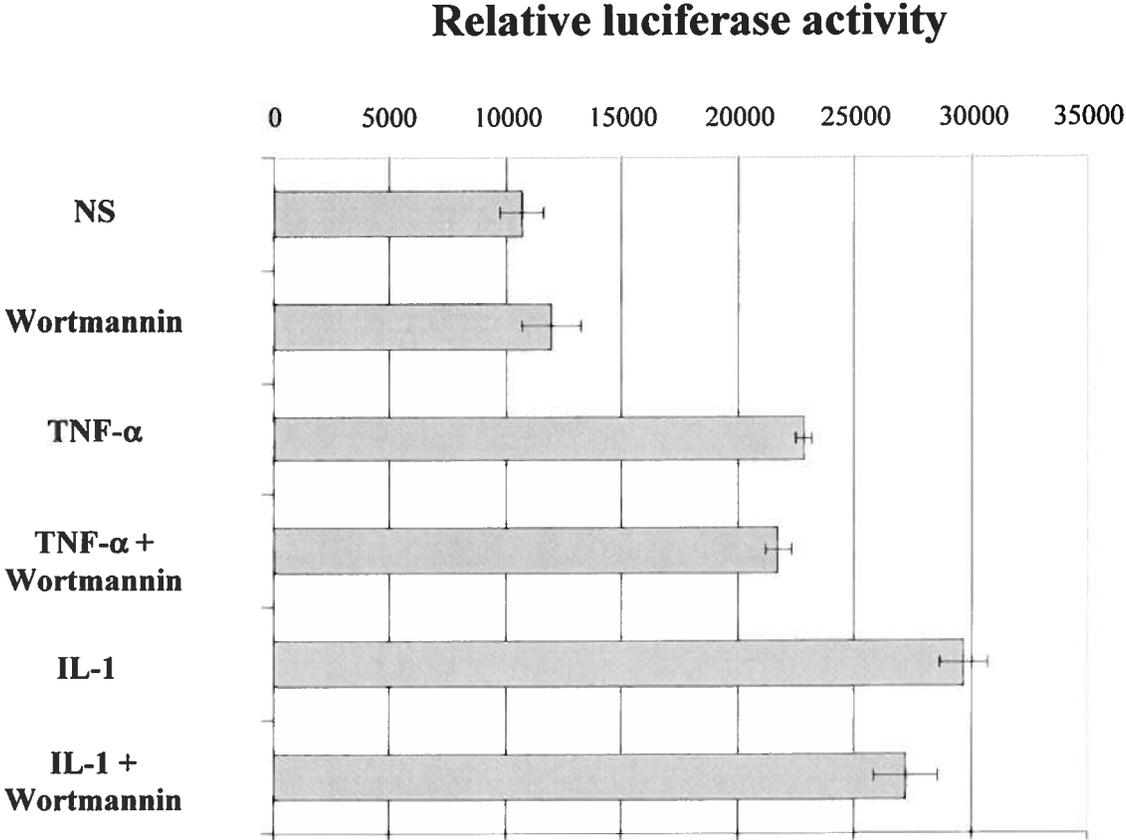
**Figure.1A**



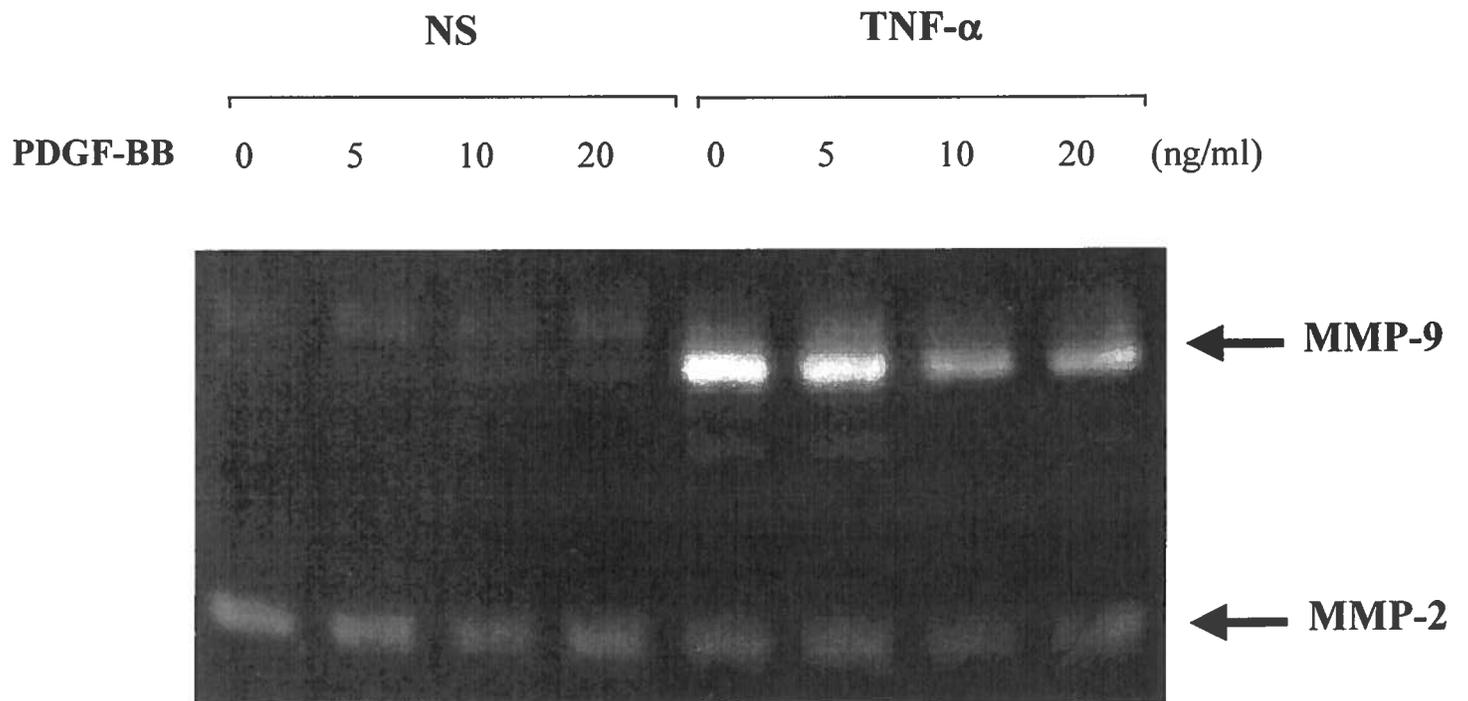
**Figure.1B**



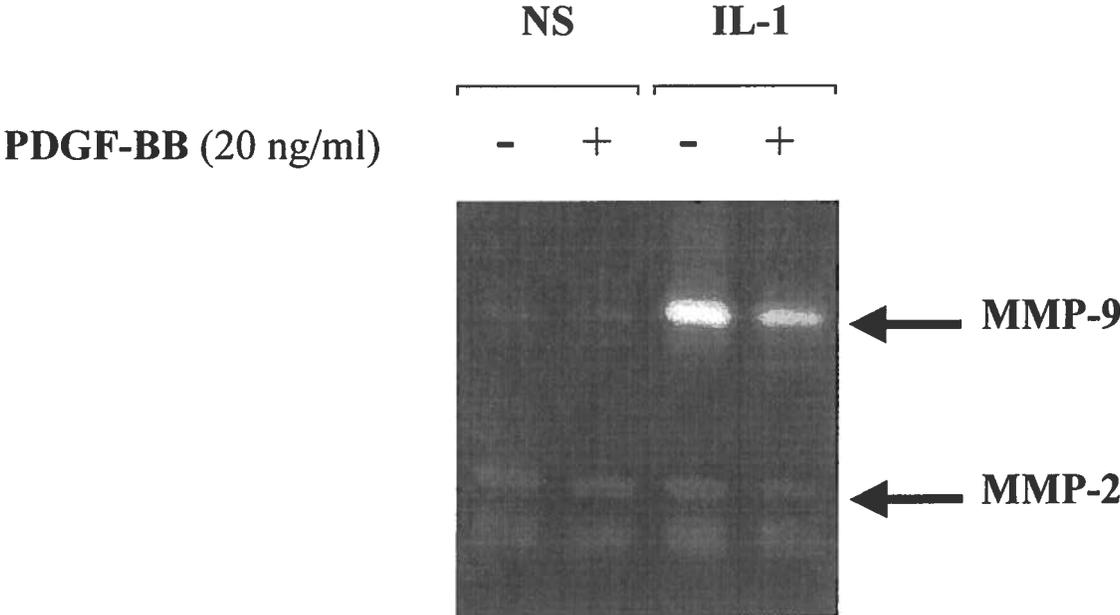
**Figure.1C**



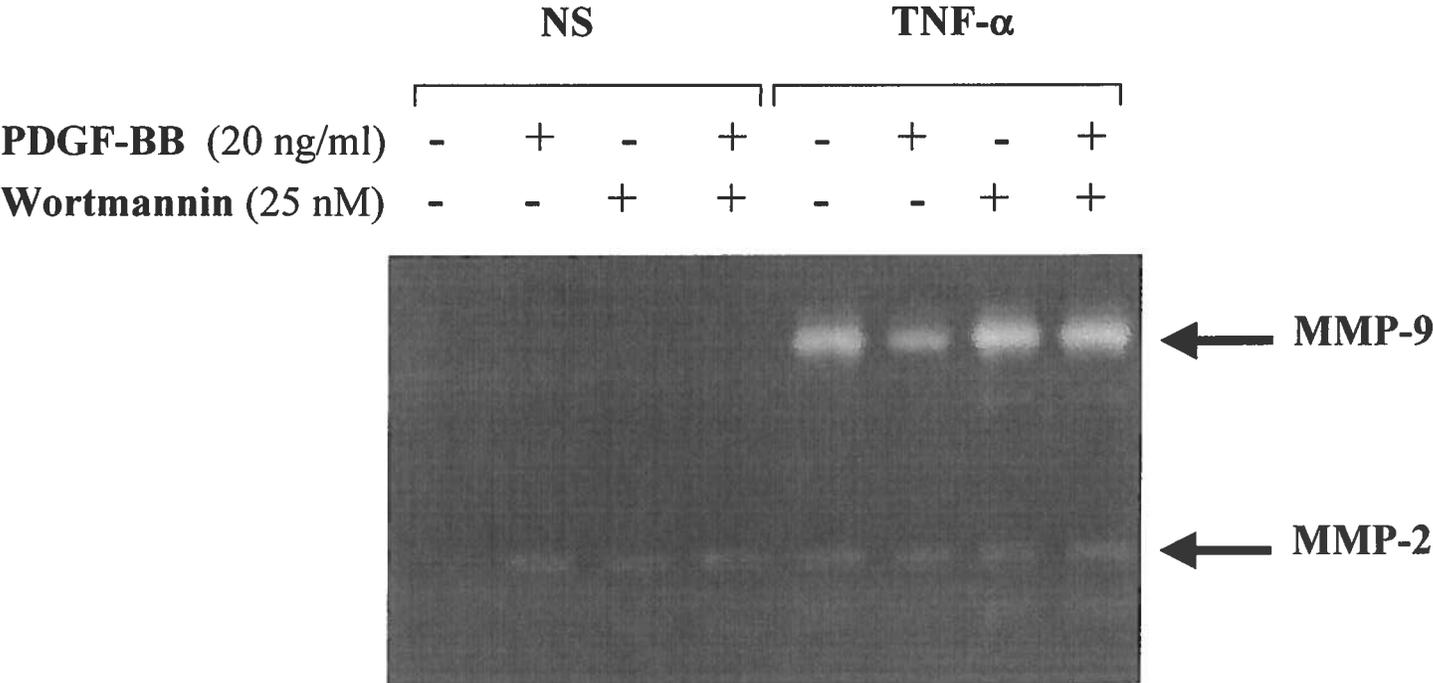
**Figure.2A**



**Figure.2B**

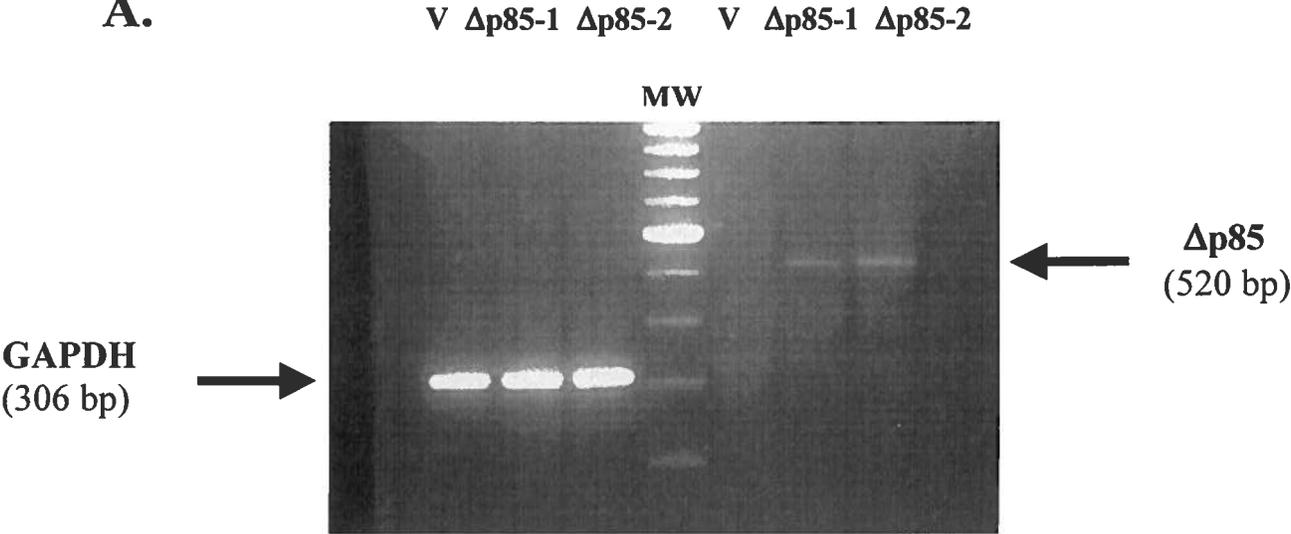


**Figure 3**

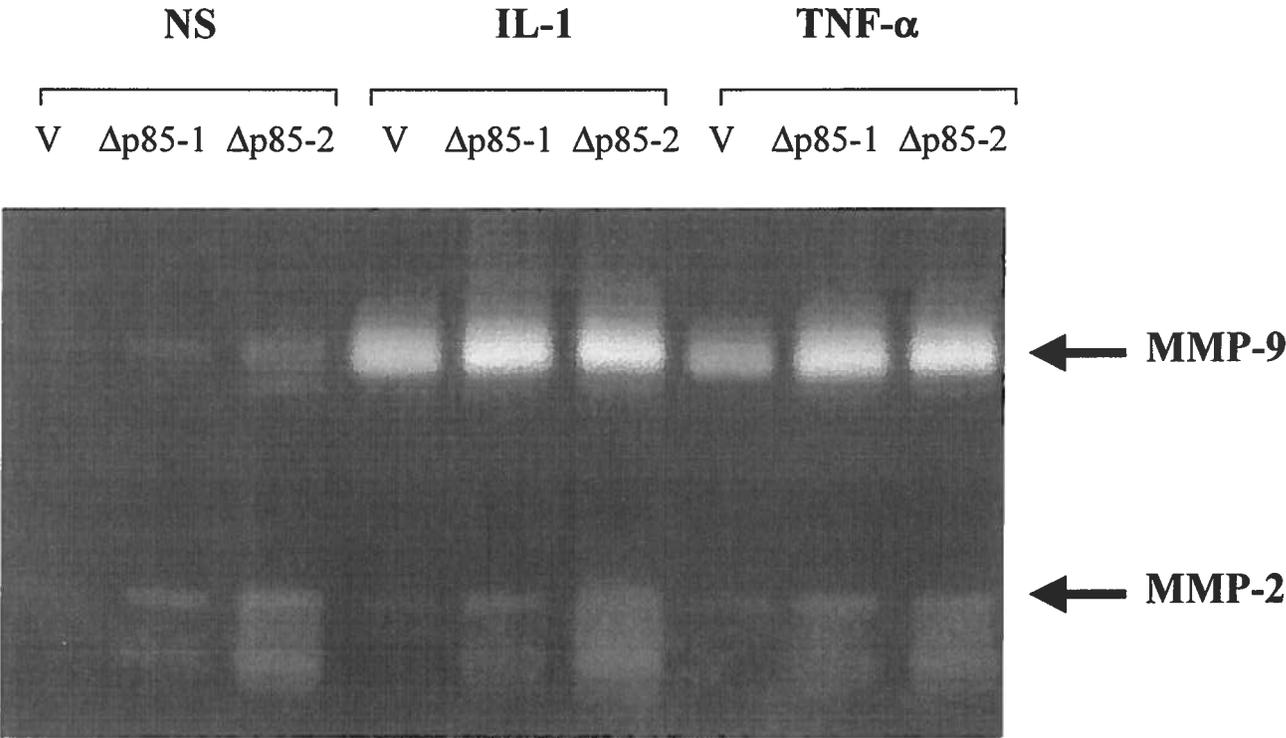


**Figure 4**

**A.**

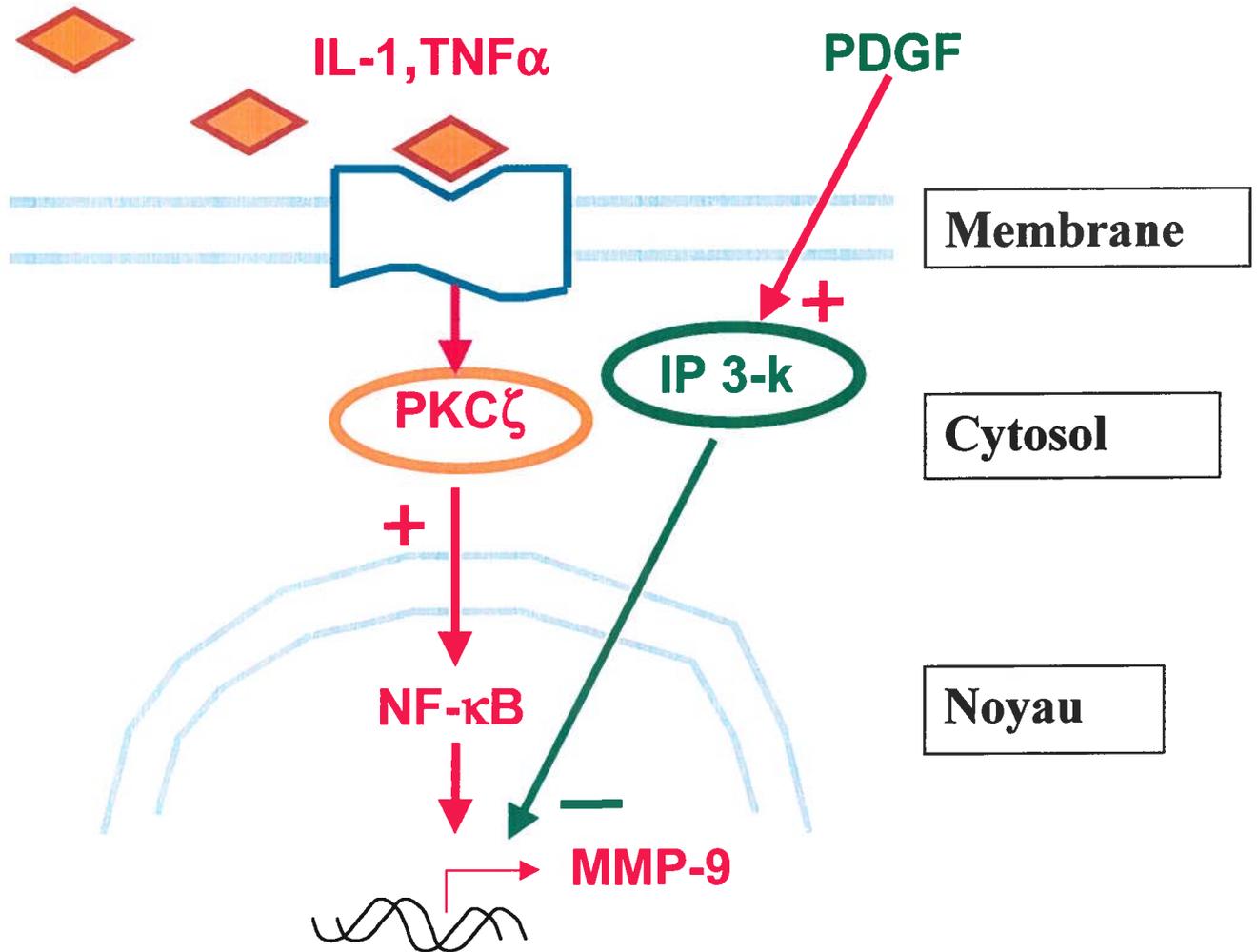


**B.**



### CONCLUSION DU CHAPITRE 3

**Figure 12** : IP 3-kinase dans la régulation de l'expression de MMP-9



**Légende** : Schéma représentant la régulation de l'expression de MMP-9 chez le gliome par IP 3-kinase. IL-1 et TNF- $\alpha$  induisent l'expression de MMP-9, par activation de PKC $\zeta$ , qui à son tour, vient activer le facteur de transcription NF- $\kappa$ B, nécessaire à l'induction de MMP-9. PDGF inhibe cette induction par activation de la molécule IP 3-kinase.

## **Discussion générale**

## LA RÉGULATION POSITIVE DE L'EXPRESSION DE MMP-9

Dans le premier chapitre, nous avons montré que les cytokines pro-inflammatoires, IL-1 et TNF- $\alpha$ , possèdent la capacité d'induire l'expression de MMP-9 chez des lignées cellulaires continues de gliomes de rat (C6) et d'origine humaine (A172). Ce mécanisme a également été observé chez les macrophages (Zhang *et al.*, 1998), rajoutant ainsi une autre propriété à celles déjà communes aux gliomes et aux macrophages (Leenstra *et al.*, 1995). Etant donné que les macrophages infiltrants sont activés en périphérie de la zone d'invasion du gliome et qu'ils peuvent produire de l'IL-1 et du TNF- $\alpha$  (Schneider *et al.*, 1992), il est possible que ces cellules du système immunitaire participent à l'invasion du gliome en jouant sur la production de MMP-9. Cependant, il semblerait que l'activation du système immunitaire joue un rôle déterminant sur la croissance du gliome. En effet, chez des patients atteints de gliome, il existe une corrélation entre l'expression de l'IL-1, associée à une baisse de l'expression de TGF- $\beta$ , une cytokine immunosuppressive, et un meilleur taux de survie (Cuny *et al.*, 2002). De plus, l'IL-1 peut induire une baisse de la croissance des gliomes *in vitro* (Oelmann *et al.*, 1997) et même, dans certains cas, induire l'apoptose (Castigli *et al.*, 2002).

Bien que l'IL-1 et le TNF- $\alpha$  induisent *de novo* l'expression de MMP-9 chez le gliome, ils n'affectent pas la production de MMP-2, suggérant que l'expression de MMP-9 et de MMP-2 sont régulées par des signaux distincts. Cette différence se signale notamment au niveau des régions des promoteurs des gènes MMP-9 et MMP-2, ce dernier manquant les éléments TATA et le site de liaison du facteur de transcription AP-1, essentiels à la transcription du gène MMP-9 (Sato et Seiki, 1993). De plus, dans les deux lignées de gliomes testées, MMP-2 est présente constitutivement sous sa forme activée, alors que MMP-9 est principalement sécrétée sous sa forme pro-enzymatique, ce qui suggère que ces deux gélatinases ont une régulation post-transcriptionnelle différente. La présence de la forme activée dans les surnageants des cellules C6 et A172 pourrait refléter la présence des MT-MMPs à leur surface, étant donné qu'il existe une corrélation entre l'activation de MMP-2 et l'expression des MT-MMPs durant la progression du gliome (Yamamoto *et al.*, 1996). Cette activation de MMP-2 pourrait être responsable de la génération de formes mineures actives de MMP-9, détectées dans les surnageants des cellules C6, car MMP-2 possède la capacité d'activer pro-MMP-9 (Fridman *et al.*, 1995).

Dans le deuxième chapitre, nous avons mis en évidence le rôle clé d'un isoforme atypique PKC, PKC- $\zeta$ , dans le signal intracellulaire d'induction de l'expression de MMP-9 par IL-1 et TNF- $\alpha$ , dans les cellules C6. En effet, la surexpression de cet isoforme induit une expression constitutive de MMP-9, ainsi que l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de son promoteur. De plus, l'ajout d'un peptide inhibiteur de l'activation de PKC- $\zeta$ , diminue fortement l'induction de MMP-9 par IL-1 ou TNF- $\alpha$ . Malgré cela, nous ne pouvons exclure une participation similaire d'une autre PKC atypique, étant donné que ce peptide peut également inhiber PKC- $\iota$ , un autre isoforme exprimé chez C6 (Anthonsen *et al.*, 2001). De plus, il est probable que d'autres classes d'isoformes PKC jouent le rôle de régulateurs de l'expression de MMP-9. Ainsi, en pré-traitant les cellules C6 à l'aide d'un inhibiteur pharmacologique, le RO 31-8220, spécifique des PKCs, mais non-spécifique des différents isoformes, nous avons généré une potentialisation de l'expression de MMP-9, induite par l'IL-1 ou le TNF- $\alpha$ . Ce résultat suggère l'implication d'autres isoformes PKC, qui pourraient agir en tant que régulateurs négatifs de l'expression de MMP-9. Un tel rôle a été mis en évidence chez les macrophages, où des dominant-négatifs de l'isoforme classique PKC- $\alpha$  de la lignée RAW 264.7 ont montré une augmentation de la production de MMP-9, induite par le LPS (St-Denis *et al.*, 1998). La régulation de l'expression de MMP-9 par les PKCs semble donc être complexe, faisant intervenir différents isoformes, et est probablement la résultante de leur niveau d'expression et de l'activation de différents isoformes. De plus, il est possible que certains isoformes PKC activables par le PMA agissent en coopération avec PKC- $\zeta$ , étant donné que le PMA induit une potentialisation de l'expression de MMP-9 en présence de l'IL-1 ou du TNF- $\alpha$ , suggérant ainsi deux voies de signalisation indépendantes dans la régulation de l'expression de MMP-9. Ainsi le PMA peut activer le facteur de transcription AP-1 par les PKCs dans les cellules C6 (Lee *et al.*, 2001), facteur connu pour opérer en synergie avec NF- $\kappa$ B, et augmenter l'expression de MMP-9 (Sato et Seiki, 1993).

De plus, nos données établissent un lien fonctionnel entre PKC- $\zeta$ , IL-1, TNF- $\alpha$ , et l'activation de NF- $\kappa$ B, un facteur de transcription nécessaire à l'induction de l'expression de MMP-9 (Sato et Seiki, 1993). L'implication de NF- $\kappa$ B et de PKC- $\zeta$  dans l'induction de la production de MMP-9 par IL-1 et TNF- $\alpha$  résulte probablement de l'activation de la

kinase I $\kappa$ B par PKC- $\zeta$  (Diaz-Meco *et al.*, 1994), ce qui induit la dissociation du régulateur négatif I $\kappa$ B de NF- $\kappa$ B, et permet la translocation nucléaire de ce facteur de transcription (DiDonato *et al.*, 1997). Cependant, l'activation de NF- $\kappa$ B induite par IL-1 dans les cellules C6 ne semble pas dépendre de la phosphorylation de I $\kappa$ B, mais plutôt de l'activité du protéasome nécessaire à la dégradation de I $\kappa$ B (Uehara *et al.*, 1999). Comme PKC- $\zeta$  peut également être impliquée dans la phosphorylation de Rel A (p65), une sous-unité de NF- $\kappa$ B, entraînant ainsi une augmentation de son activité transcriptionnelle, il est possible que ce mécanisme soit prépondérant dans les cellules C6 (Anrather *et al.*, 1999). Ainsi, des cellules provenant de souris déficientes pour le gène PKC- $\zeta$  ont montré une inhibition de l'activation de NF- $\kappa$ B par les cytokines IL-1 et TNF- $\alpha$ , provenant de la baisse de phosphorylation de p65 par PKC- $\zeta$  (Leitges *et al.*, 2001).

Le fait que la surexpression de PKC- $\zeta$  soit suffisante pour induire l'expression de MMP-9, suggère l'activation d'un autre facteur de transcription nécessaire à l'expression de MMP-9, AP-1 (Sato et Seiki, 1993), et suggère une association entre PKC- $\zeta$  et AP-1. L'augmentation de la liaison d'AP-1 à son site dans le promoteur de MMP-9 pourrait être due à une augmentation de l'expression des taux d'ARNm du proto-oncogène *c-jun*, une protéine faisant partie de AP-1, tel qu'observé chez des cellules U937 surexprimant PKC- $\zeta$  de façon stable (Ways *et al.*, 1994). L'activation d'AP-1 et NF- $\kappa$ B étant modulée par les MAPK (Beyaert *et al.*, 1996; Karin, 1995), et pouvant être activées par PKC- $\zeta$  (Takeda *et al.*, 1999; Berra *et al.*, 1995), il serait intéressant d'étudier l'implication de ces molécules dans la cascade d'activation menant à l'augmentation de l'expression de MMP-9 dans les transfectants stables C6 surexprimant PKC- $\zeta$ . Une des cibles potentielles serait p38, une MAPK que nous avons récemment identifiée comme étant impliquée dans l'induction de l'expression de MMP-9 par IL-1 et TNF- $\alpha$  chez les cellules C6 (Missé *et al.*, 2001). Cependant, il est également possible que PKC- $\zeta$  induise ou augmente l'expression de cytokines pouvant induire l'expression de MMP-9. Ainsi, il a été décrit que les PKCs sont impliquées dans l'augmentation de l'expression de TNF- $\alpha$  chez les macrophages (d'Addario *et al.*, 2000).

Nous avons également déterminé que l'IL-1 et le TNF- $\alpha$  sont des cytokines capables d'induire l'activation de PKC- $\zeta$ . Bien que ce mécanisme ait été décrit dans d'autres types

cellulaires, tels que les monocytes U937 et chez des cellules cancéreuses de la vessie (Muller *et al.*, 1995; Limatola *et al.*, 1997), les messagers secondaires impliqués dans l'activation de PKC- $\zeta$ , sous l'effet stimulateur de l'IL-1 ou du TNF- $\alpha$ , demeurent peu connus. Parmi ces messagers, l'oncogène *ras* ou les dérivés de la céramide pourraient jouer un rôle dans l'activation de PKC- $\zeta$ , étant donné qu'ils peuvent interagir directement avec PKC- $\zeta$ , et, ainsi, augmenter son activité (Diaz-Meco *et al.*, 1994; Muller *et al.*, 1995). De plus, ces 2 molécules ont été décrites comme étant impliquées dans l'activation de NF- $\kappa$ B par l'IL-1 et le TNF- $\alpha$ , chez des astrocytes primaires de rat et les cellules C6 (Pahan *et al.*, 1998 et 2000). Ainsi, *ras* et les dérivés de céramide pourraient faire partie des signaux de transduction conduisant à l'expression de MMP-9 chez le gliome.

PKC- $\zeta$  peut donc jouer un rôle important dans l'invasion et la dissémination du gliome, par induction de l'expression de MMP-9. Étant donné l'importance de MMP-9 dans les processus d'angiogénèse, de démyélinisation, et de la dégradation de la BHE (Bergers *et al.*, 2000; Rosenberg *et al.*, 1995; Proost *et al.*, 1993), trois caractéristiques associées au gliome, l'emploi d'agents inhibiteurs de l'activité ou de l'expression de PKC- $\zeta$ , visant à bloquer l'expression de MMP-9, pourrait être bénéfique en thérapie. De plus, PKC- $\zeta$  étant impliquée dans la survie cellulaire (Wooten *et al.*, 1999), de tels agents pourraient inhiber les voies anti-apoptotiques et donc augmenter l'effet des drogues chimiothérapeutiques, actuellement utilisées dans les traitements du gliome. Ainsi, il a été récemment suggéré que l'inhibition de PKC- $\zeta$  pourrait conférer une chimiosensibilité aux cellules tumorales (Filomenko *et al.*, 2002).

## **LA RÉGULATION NÉGATIVE DE L'EXPRESSION DE MMP-9**

Au mécanisme menant à l'induction de l'expression de MMP-9 s'ajoute un processus de régulation. Cette régulation négative semble être contrôlée par l'enzyme IP 3-kinase, étant donné que les dominant-négatifs C6 de la sous-unité régulatrice (p85 $\alpha$ ) de cette kinase démontrent une potentialisation de l'expression de MMP-9 lorsque ces cellules sont stimulées à l'IL-1 ou au TNF- $\alpha$ . De plus, ces clones stables augmentent leur activité gélatinolytique, en générant une forme supplémentaire à 58 kDa, qui correspond à une forme active de MMP-2 (Knauper *et al.*, 1996). Cette observation corrobore l'effet de la wortmannin, qui est également capable d'augmenter la génération de cette forme de 58

kDa. Ces résultats suggèrent un rôle de l'IP 3-kinase dans l'activation de MMP-2 chez le gliome. Aussi, il serait intéressant d'étudier la régulation des MT-MMPs par IP 3-kinase, étant donné que ces protéases membranaires sont impliquées dans les processus d'activation de MMP-2, et dont l'expression corrèle avec l'activation de MMP-2 chez le gliome *in vivo* (Yamamoto *et al.*, 1996). Cette génération d'une forme supplémentaire de MMP-2 est également présente chez les clones qui surexpriment PKC- $\zeta$ , ce qui corrobore la corrélation entre l'activité MMP-2 et l'activité PKC observée chez d'autres lignées de gliomes (Uhm *et al.*, 1996).et suggère ainsi une inhibition de l'activité IP 3-kinase par PKC- $\zeta$  dans ces transfectants. En effet, un tel mécanisme est envisageable car PKC- $\zeta$  a été démontrée comme étant un régulateur négatif de l'activité kinase PKB/Akt, molécules responsables de l'activation de l'IP 3-kinase (Doornbos *et al.*, 1999). Ainsi, il est possible que les voies de signalisation entre PKC- $\zeta$  et IP 3-kinase soient interactives plutôt que parallèles. En effet, Romanelli *et al.* (1999) ont montré que PKC- $\zeta$  est un régulateur de l'activation de la kinase p70 S6, une molécule impliquée dans la prolifération cellulaire qui est également contrôlée par IP 3-kinase. De plus, PDK1, un effecteur de IP 3-kinase, peut aussi phosphoryler et activer PKC- $\zeta$  (Le Good *et al.*, 1998).

Bien que les dominant-négatifs de p85 $\alpha$  montrent une potentialisation de la production de MMP-9 par les cytokines, il est étonnant de constater que la surexpression de la forme p85 $\alpha$  sauvage induit le même phénotype, suggérant une inhibition de l'activité IP 3-kinase par surexpression de sa forme régulatrice. En effet, il a récemment été démontré que l'activité IP 3-kinase est contrôlée par l'équilibre moléculaire entre la sous-unité catalytique et régulatrice; ainsi, une surexpression de p85 $\alpha$  peut conduire à une inhibition de l'activité IP 3-kinase, par compétition entre le monomère p85 $\alpha$  et le dimère p85 $\alpha$ -p110 (Ueki *et al.*, 2002).

L'inhibition de l'expression de MMP-9 exercée par IP 3-kinase est un mécanisme qui ne semble pas interférer au niveau de l'activité transcriptionnelle de son promoteur, tel que démontré par les expériences de luciférase. Ce qui suggère un contrôle par IP 3-kinase indépendant de l'activation des facteurs de transcription, nécessaires à l'induction de MMP-9, comme AP-1 et NF- $\kappa$ B, contenus dans le promoteur cloné. Ces résultats corroborent le fait que le traitement des cellules C6 avec la wortmannin n'affecte le potentiel de liaison de NF- $\kappa$ B à son site (Pahan *et al.*, 1999). Par contre, il est possible

qu'il existe des éléments régulateurs, présents en amont dans le promoteur de MMP-9, contrôlés par IP 3-kinase, et qui pourraient affecter l'activité transcriptionnelle de facteurs tels que AP-1 ou NF- $\kappa$ B. Aussi, la présence d'éléments régulateurs, contrôlant l'expression tissulaire de MMP-9, situés entre -7745 et -2722 bp, a été rapportée, mais ces mécanismes moléculaires demeurent peu connus (Munaut *et al.*, 1999).

Comme nous l'avons décrit dans le troisième chapitre, le facteur de croissance PDGF, inhibe l'expression de MMP-9, induite par l'IL-1 ou le TNF- $\alpha$ , via l'activation de IP 3-kinase, dans le gliome C6. Cette activation de IP 3-kinase par PDGF ne fait pas intervenir p60-*src* comme intermédiaire, étant donné que des dominant-négatifs C6 de p60-*src* ne bloquent pas l'effet inhibiteur du PDGF sur l'expression de MMP-9. En effet, la stimulation des cellules C6 au PDGF n'induit pas le recrutement de p60-*src* au niveau de ses récepteurs, contrairement à d'autres molécules appartenant à la famille *src*, telle que *fyn* et *lyn* (Kronfeld *et al.*, 2000). Ces deux molécules, capables d'activer directement IP 3-kinase (Pleiman *et al.*, 1994), sont probablement impliquées dans la voie de transduction menant à l'inhibition de l'expression de MMP-9.

Un autre facteur de croissance, TGF- $\beta$ , est capable d'inhiber l'expression de MMP-9 induite par l'IL-1 ou le TNF- $\alpha$ . Aussi, bien que les signaux induits par TGF- $\beta$  soient généralement différents de ceux induits par le PDGF, il est possible que TGF- $\beta$  soit capable d'activer IP 3-kinase chez les cellules C6. En effet, un tel mécanisme a récemment été rapporté chez les cellules épithéliales mammaires (Bakin *et al.*, 2000). De plus, l'effet de TGF- $\beta$  sur l'expression de MMP-9 peut résulter de l'induction de l'expression de PDGF selon une boucle autocrine (Battegay *et al.*, 1990; Press *et al.*, 1989). Ce mécanisme pourrait expliquer le fait que TGF- $\beta$  agisse de façon paradoxale chez les gliomes, dans le sens où la cytokine stimule la prolifération cellulaire chez les glioblastomes multiforme hyperdiploïdiens mais fonctionne comme un inhibiteur chez les gliomes quasi-diploïdiens de stade moins avancé (Jennings et Pietenpol, 1998).

Un autre mécanisme menant à l'inhibition de l'expression des MMPs par TGF- $\beta$  a été décrit. Ainsi, il est connu que TGF- $\beta$  inhibe l'expression de MMP-3 via une séquence se liant à l'oncogène *fos*, nommée TIE (TGF- $\beta$  inhibitory element), empêchant ainsi l'activité transcriptionnelle de AP-1, nécessaire à l'expression de MMP-3 (Kerr *et al.*, 1990). Étant donné que cette séquence est présente dans le promoteur de MMP-9

(Huhtala *et al.*, 1991), il est possible que la régulation de l'expression de MMP-9 par TGF- $\beta$  dans les cellules C6 se fasse selon ce mécanisme. Il a été également démontré que la voie de signalisation induite par TGF- $\beta$  peut interférer avec l'activation de NF- $\kappa$ B. En effet, TGF- $\beta$  peut inhiber l'activité NF- $\kappa$ B/Rel en induisant la transcription de I $\kappa$ B dans les lymphomes de type B (Arsura *et al.*, 1996). De plus, les protéines smad, composantes essentielles des voies de signalisation intracellulaires de TGF- $\beta$ , sont capables d'interagir avec la protéine CBP/P300, un co-activateur transcriptionnel se liant à NF- $\kappa$ B activé par les cytokines pro-inflammatoires. Les protéines smad peuvent ainsi induire une compétition avec NF- $\kappa$ B pour la liaison à CBP/P300. De cette compétition résulte une inhibition de l'activité transcriptionnelle de NF- $\kappa$ B (DiChiara *et al.*, 2000). Les protéines smad peuvent également jouer un rôle de répresseurs transcriptionnels en recrutant les histones déacetylases, molécules qui causent une condensation de la chromatine entourant l'ADN et ainsi réduisent l'accessibilité aux facteurs de transcription (Wotton *et al.*, 1999). De plus, le fait que PMA potentialise l'expression de MMP-9 induite par l'IL-1 et le TNF- $\alpha$  et que cette augmentation demeure conservée en présence de TGF- $\beta$  suggère que l'effet du PMA est indépendant de celui du TGF- $\beta$ .

Ainsi, PDGF et TGF- $\beta$ , deux facteurs mitogéniques des cellules C6 (Strawn *et al.*, 1994; Ryken *et al.*, 1992), inhibent l'induction de l'expression de MMP-9 par les cytokines pro-inflammatoires. Il semblerait donc que lorsque le gliome stimule sa prolifération à l'aide de facteurs de croissance, tels que PDGF et TGF- $\beta$ , il réduit son potentiel invasif. Cependant, il est étonnant de constater que deux facteurs favorisant l'angiogénèse du gliome, comme le PDGF et TGF- $\beta$  (Dunn *et al.*, 2000) réduisent l'expression de MMP-9, une enzyme participant également à ce processus. Nos résultats suggèrent donc que la MMP-9 sécrétée par le gliome participerait peu aux mécanismes angiogéniques. Cependant, il semblerait que la contribution de MMP-9 à l'angiogénèse provienne plutôt des cellules stromales, telles que les cellules endothéliales, que des cellules tumorales (Huang *et al.*, 2002). Ainsi l'expression de MMP-9 chez les gliomes humains a été localisée non seulement au niveau des cellules cancéreuses, mais également dans les structures vasculaires entourant le gliome (Raithatha *et al.*, 2000).

## LA MÉTHYLATION ET L'EXPRESSION DES TIMPS

Nous avons ensuite déterminé si l'équilibre MMP-9/TIMPs pouvait être affecté suite à l'induction de l'expression de MMP-9 par les cytokines. Bien que l'IL-1 et le TNF- $\alpha$  ne semblent pas affecter l'expression constitutive des inhibiteurs préférentiels de l'activité MMP-9, TIMP-1 et TIMP-3, ceux-ci démontrent un taux d'expression réduit dans les cellules surexprimant PKC- $\zeta$  (annexe 1). Cette diminution est partiellement bloquée lors d'un traitement des cellules avec un inhibiteur de l'activité méthyltransférase, l'azacytidine (annexe 2), suggérant ainsi que la baisse d'expression des TIMPs serait contrôlée par la méthylation de l'ADN au niveau de leur promoteur. Ainsi, l'hyperméthylation du promoteur de TIMP-3 a été rapportée dans plusieurs types de cancers (Kang *et al.*, 2001; Zochbauer-Muller *et al.*, 2001) et semble induire la répression de l'expression de ce gène (Backman *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 1995). L'expression de TIMP-1 semble être aussi dépendante du taux de méthylation de son promoteur (Anderson et Brown, 2002). En effet, il est possible que la méthylation des CpG des promoteurs affectent la liaison de certains facteurs de transcription à leur site. Ainsi, le facteur de transcription Sp1, important dans l'expression de TIMP-1 et TIMP-3 (Verrecchia *et al.*, 2001; Wick *et al.*, 1995), ne peut se lier à son site CCGCCC lorsque les cytosines sont méthylées (Clark *et al.*, 1997). De plus, les méthyltransférases sont capables de recruter les histones déacetylases qui condensent la chromatine et ainsi empêchent l'accessibilité des facteurs de transcription à l'ADN (Fuks *et al.*, 2001; Robertson *et al.*, 2000; Rountree *et al.*, 2000). Les histones déacetylases peuvent également être recrutées par des protéines se liant spécifiquement aux séquences méthylées, formant ainsi des complexes répresseurs (Ballestar et Wolffe, 2001).

L'augmentation de la méthylation de l'ADN dans les transfectants PKC- $\zeta$  est due à l'augmentation de l'activité méthyltransférase (annexe 3), démontrant ainsi un lien fonctionnel entre les DNMTs responsables de la méthylation de l'ADN et PKC- $\zeta$ . Ainsi, l'activité PKC- $\zeta$  détectée au niveau nucléaire (annexe 4), pourrait être responsable de l'augmentation de l'activité méthyltransférase globale, principalement due à l'enzyme DNMT1 (Pradhan *et al.*, 1997). Cependant, nous ne pouvons pas écarter l'implication des méthyltransférases *de novo*, étant donné que ces enzymes peuvent coopérer avec DNMT1 pour induire la répression transcriptionnelle des gènes (Rhee *et al.*, 2002).

Nous avons ensuite établi un lien direct *in vitro* entre PKC- $\zeta$  et DNMT1, démontrant que PKC- $\zeta$  est capable de phosphoryler l'enzyme recombinante DNMT1 (annexe 5). Il reste à déterminer l'effet de la phosphorylation sur l'activité méthyltransférase de DNMT1, et également de confirmer si la phosphorylation de DNMT1 observée dans les cellules (Glickman *et al.*, 1997) est due spécifiquement à PKC- $\zeta$ . La phosphorylation de DNMT1 par PKC- $\zeta$  pourrait faciliter l'activité méthyltransférase en augmentant l'affinité de liaison de DNMT1 pour son substrat. En effet, certaines protéines, telles que p53, ont démontré une activation de leur capacité de liaison à l'ADN, suite à leur phosphorylation (Blaydes *et al.*, 2001). Il est également possible que la phosphorylation de DNMT1 induite par PKC- $\zeta$  affecte l'association de la méthyltransférase à d'autres protéines, telle que l'oncogène *Rb*, dont l'association à DNMT1 induit une inhibition de l'activité méthyltransférase (Pradhan et Kim, 2002).

Ce nouveau contrôle de la méthylation de l'ADN par un isoforme PKC permettrait aux PKCs de moduler l'expression des gènes, tels que les TIMPs, via DNMT1. Ce mécanisme pourrait expliquer la réduction de l'expression des TIMPs observée chez les gliomes de stade avancé (Kachra *et al.*, 1999; Mohanam *et al.*, 1995).

## **Conclusions**

Nous avons déterminé que l'expression de MMP-9 peut être induite par les cytokines pro-inflammatoires IL-1 et TNF- $\alpha$  chez des cellules cancéreuses gliale humaines ou de rat. De plus, cette induction de l'expression de MMP-9 est réprimée par une cytokine immuno-suppressive, TGF- $\beta$ , suggérant une régulation stricte de l'expression de cette MMP par les cytokines chez le gliome.

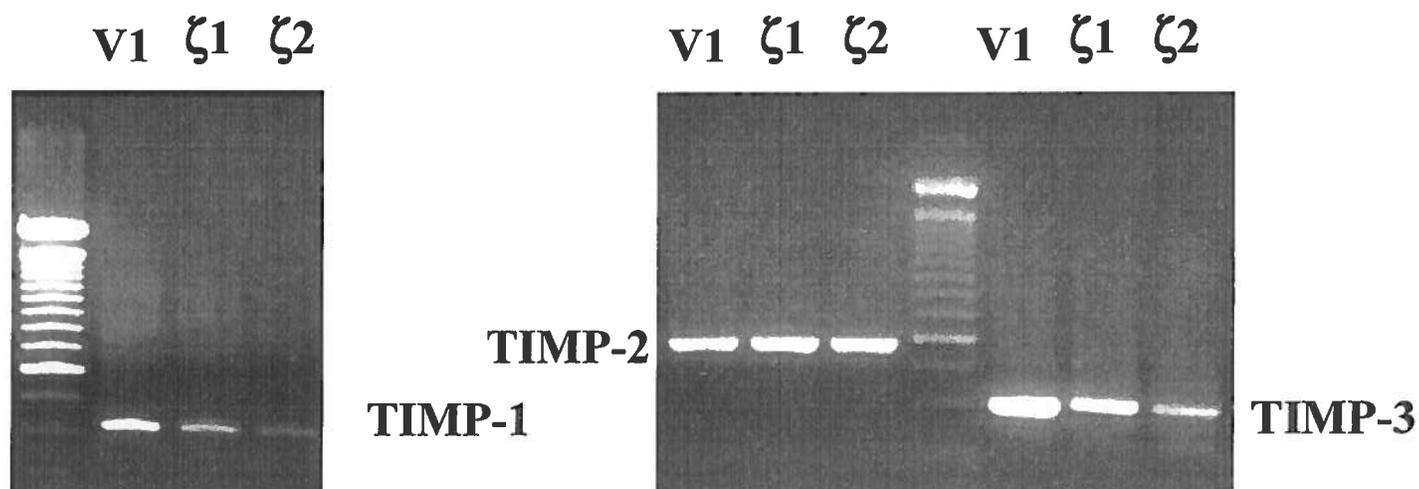
Dans un deuxième temps, nous avons démontré que l'induction de l'expression de MMP-9 par les cytokines IL-1 et TNF- $\alpha$  est dépendante d'un isoforme PKC atypique, PKC- $\zeta$ . Cet isoforme est activé par IL-1 et TNF- $\alpha$ , ce qui conduit à l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B, nécessaire à l'induction de l'expression de MMP-9 chez le gliome.

Troisièmement, nous avons défini que l'expression de MMP-9 peut être inhibée par l'activation d'une kinase capable de phosphoryler les lipides inositol, l'IP 3-kinase. De plus, la répression de l'induction de MMP-9 par l'IP 3-kinase est indépendante de l'activation de NF- $\kappa$ B, ce qui suggère un nouveau mécanisme de régulation de l'expression de MMP-9.

Finalement, nous avons démontré que la surexpression de l'isoforme PKC- $\zeta$  induit l'inhibition de l'expression de TIMP-1 et TIMP-3 chez le gliome. Cette inhibition, réversée par un inhibiteur de l'activité méthyltransférase, suggère une hyperméthylation des promoteurs de TIMP-1 et TIMP-3. Cette hyperméthylation provient de l'augmentation de l'activité méthyltransférase induite par la surexpression de PKC- $\zeta$ . Cet isoforme pourrait affecter l'activité méthyltransférase en phosphorylant directement la méthyltransférase DNMT1. Ainsi, l'isoforme PKC- $\zeta$  peut contribuer à l'invasion du gliome, non seulement en induisant l'expression de MMP-9, mais aussi en inhibant l'expression de TIMP-1 et TIMP-3, les deux inhibiteurs préférentiels de l'activité MMP-9.

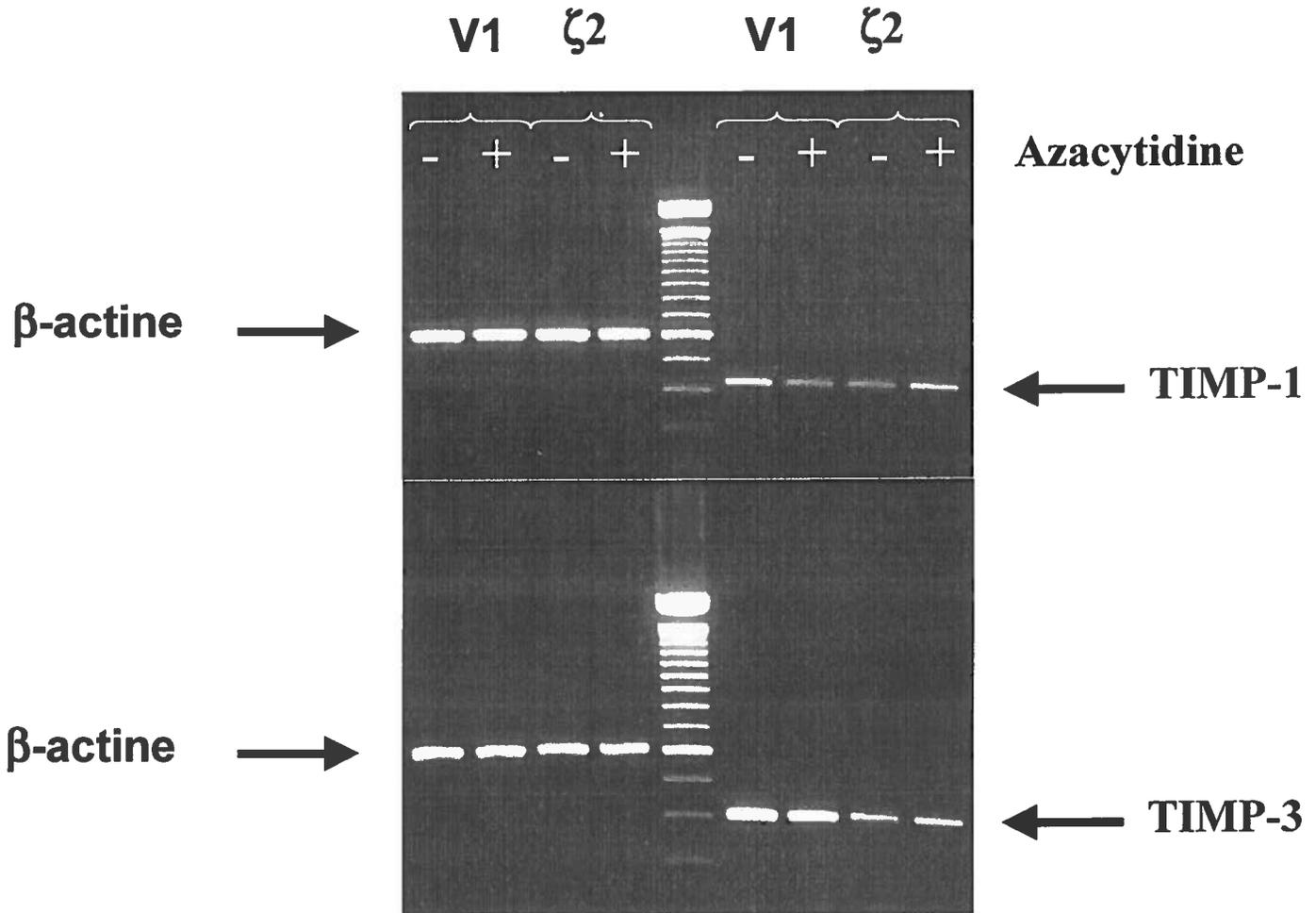
## **Annexes**

**Annexe 1 : Surexpression de PKC- $\zeta$  et analyse de l'expression des TIMPs par RT-PCR.**



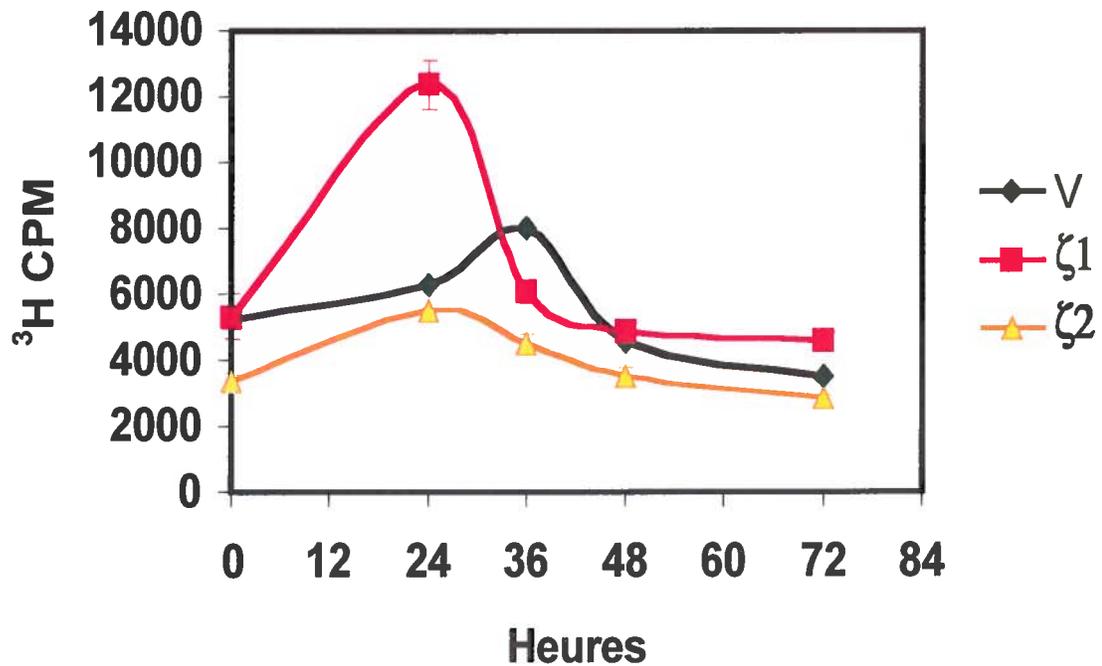
**Légende :** RT-PCR représentant l'expression constitutive de TIMP-1, TIMP-2 et TIMP-3 dans les clones surexprimant PKC $\zeta$ . Les clones PKC $\zeta 1$  et  $\zeta 2$  démontrent une inhibition de l'expression de TIMP-1 et TIMP-3 par rapport au clone V1 transfecté avec le vecteur sans insert, tandis que celle de TIMP-2 reste constante.

## Annexe 2 : Effet de l'azacytidine sur l'expression de TIMP-1 et TIMP-3



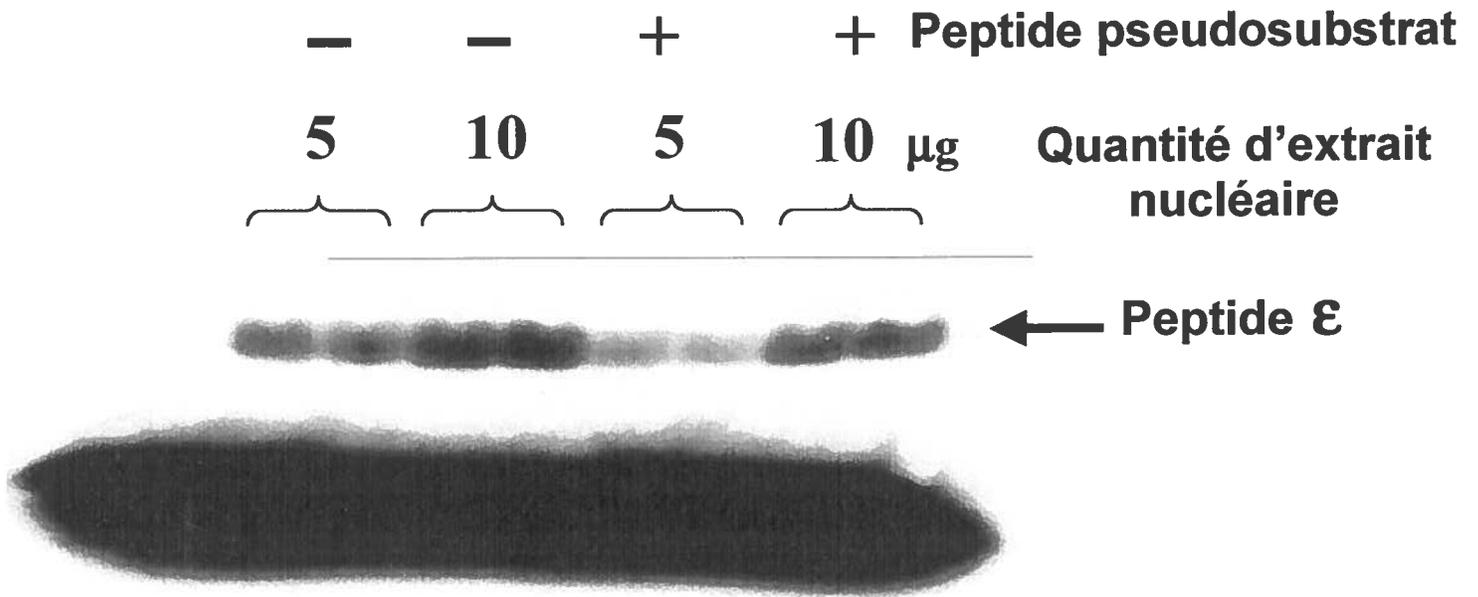
**Légende :** RT-PCR représentant l'effet de l'azacytidine sur l'expression constitutive de TIMP-1 et TIMP-3 dans le clone  $\zeta 2$  surexprimant PKC $\zeta$ . L'inhibition de l'expression de TIMP-1 et TIMP-3 chez le clone  $\zeta$  est partiellement réversée par l'azacytidine. L'expression de la  $\beta$ -actine (à gauche) demeure inchangée.

### Annexe 3 : Activité méthyltransférase dans les clones PKC- $\zeta$



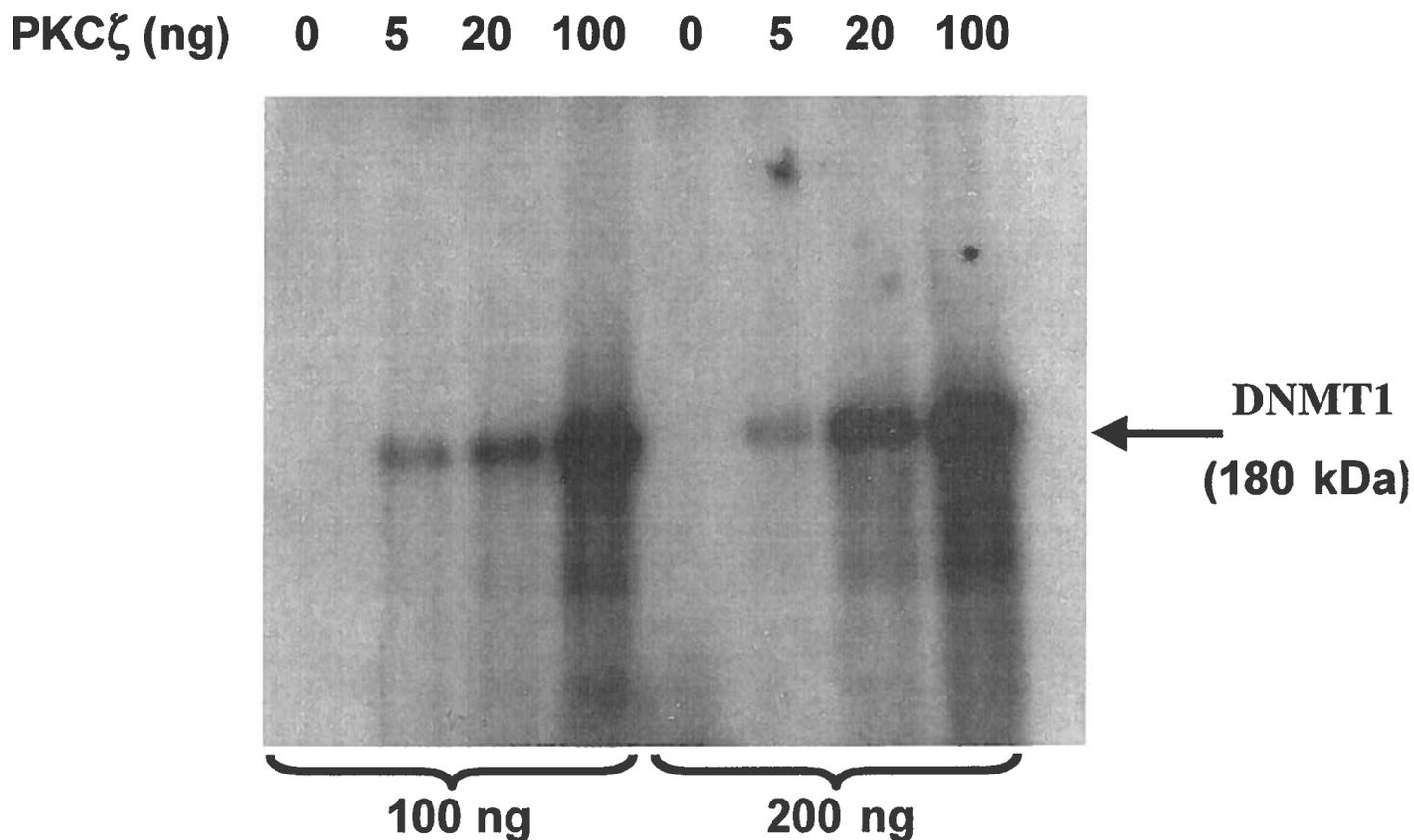
**Légende :** Cinétique de l'activité méthyltransférase dans les clones surexprimant PKC $\zeta$ . Après synchronisation des cellules (48 heures sans sérum), le sérum est ajouté à 0 h. L'activité méthyltransférase apparaît plus rapidement chez les clones, par rapport au clone contrôle V1. L'activité méthyltransférase est définie par la capacité des extraits nucléaires cellulaires d'incorporer des groupes méthyles marqués au tritium dans un substrat synthétique (polydI.dC).

## Annexe 4 : Activité PKC- $\zeta$ au niveau nucléaire



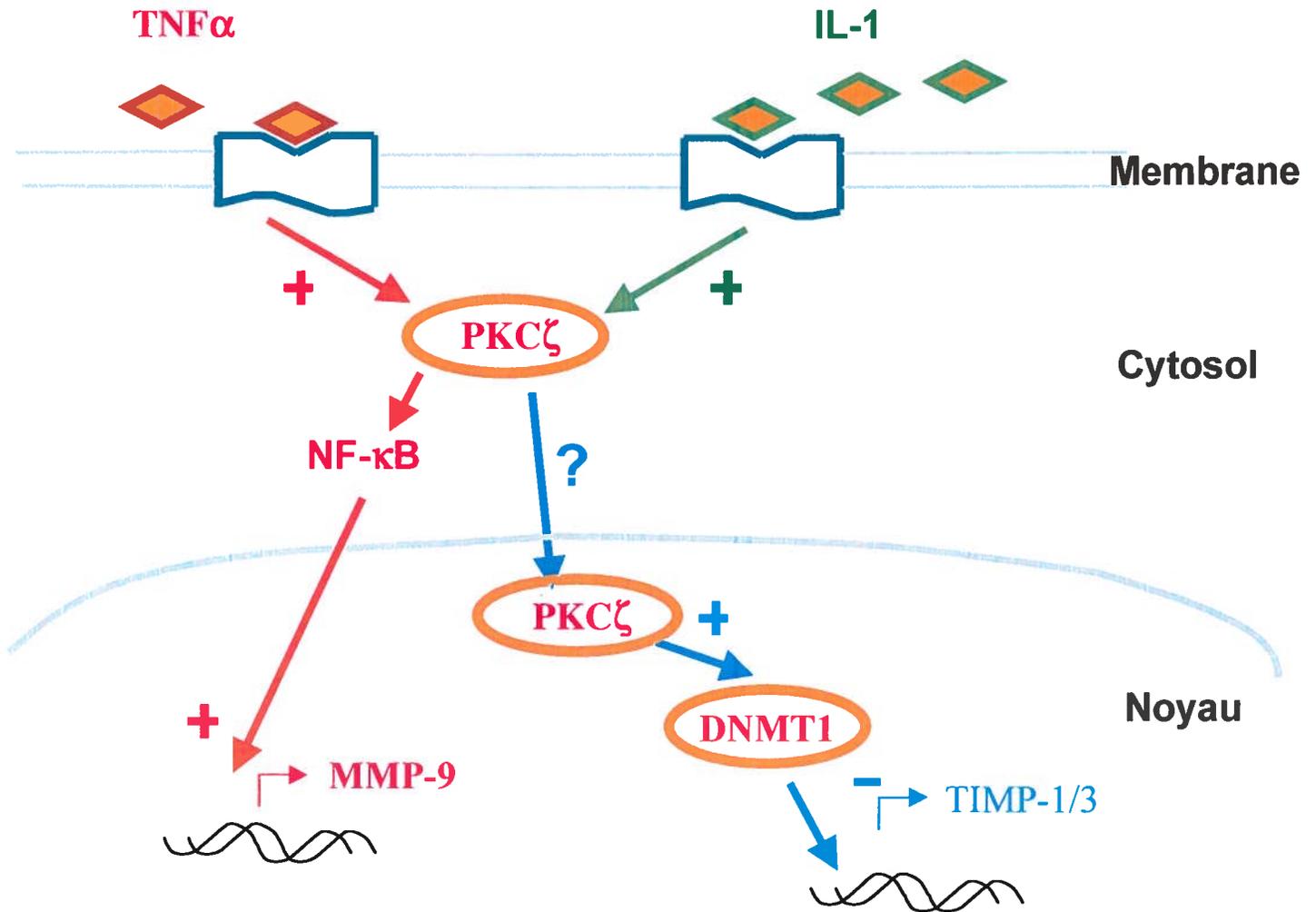
**Légende :** Autoradiographie représentant différentes quantités d'extrait nucléaire des cellules C6, incubées avec ou sans le pseudosubstrat de PKC $\zeta$ , en présence d'ATP radioactif. L'activité kinase PKC $\zeta$  est définie par la capacité des extraits nucléaires cellulaires d'incorporer des groupes phosphates marqués au  $^{32}\text{P}$  dans le peptide  $\epsilon$ , substrat de PKC $\zeta$ . Cette incorporation est bloquée en présence du peptide pseudosubstrat  $\zeta$ , inhibiteur de l'activité kinase PKC $\zeta$ .

## Annexe 5 : Phosphorylation de DNMT1 par PKC- $\zeta$



**Légende :** Autoradiographie représentant différentes quantités de PKC $\zeta$  recombinante, incubées en présence de 100 ou 200 ng de DNMT1 recombinante et d'ATP radioactif. L'activité kinase PKC $\zeta$  permet l'incorporation de groupes phosphates marqués au  $^{32}\text{P}$  chez DNMT1 de façon dose-dépendante.

**Figure 13 : PKC- $\zeta$  dans l'équilibre MMP-9/TIMPs**



**Légende :** Schéma représentant la régulation de l'expression de MMP-9 et des TIMPs chez le gliome par PKC $\zeta$ . IL-1 et TNF- $\alpha$  induisent l'expression de MMP-9, par activation de PKC $\zeta$ , qui à son tour, vient activer le facteur de transcription NF- $\kappa$ B, nécessaire à l'induction de MMP-9. Parallèlement, la surexpression de PKC $\zeta$  induit une inhibition de l'expression constitutive de TIMP-1 et TIMP-3. Cette inhibition semble liée à l'augmentation de l'activité méthyltransferase, peut être résultante de la phosphorylation de

DNMT1 par PKC $\zeta$ , pouvant ainsi induire une hyperméthylation des promoteurs, et donc une répression de l'expression de TIMP-1 et TIMP-3.

## **Références**

Aaronson SA. Growth factors and cancer. *Science*. 1991 Nov 22;254(5035):1146-53.

Abe T, Hasegawa S, Taniguchi K, Yokomizo A, Kuwano T, Ono M, Mori T, Hori S, Kohno K, Kuwano M. Possible involvement of multidrug-resistance-associated protein (MRP) gene expression in spontaneous drug resistance to vincristine, etoposide and adriamycin in human glioma cells. *Int J Cancer*. 1994 Sep 15;58(6):860-4.

Adjei AA. Ras signaling pathway proteins as therapeutic targets. *Curr Pharm Des*. 2001 Nov;7(16):1581-94.

Aflalo E, Wolfson M, Ofir R, Weinstein Y. Elevated activities of protein kinase C and tyrosine kinase correlate to leukemic cell aggressiveness. *Int J Cancer*. 1992 Jan 2;50(1):136-41.

Aggarwal BB and Vilcek J. (eds) *Tumor necrosis factor: structure, function, and mechanism of action*. Marcel Dekker Inc. 1992.

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 Jun 5;83(11):775-9.

Alexander CM, Hansell EJ, Behrendtsen O, Flannery ML, Kishnani NS, Hawkes SP, Werb Z. Expression and function of matrix metalloproteinases and their inhibitors at the maternal-embryonic boundary during mouse embryo implantation. *Development*. 1996 Jun;122(6):1723-36.

Alvaro V, Touraine P, Raisman Vozari R, Bai-Grenier F, Birman P, Joubert D. Protein kinase C activity and expression in normal and adenomatous human pituitaries. *Int J Cancer*. 1992 Mar 12;50(5):724-30.

Amour A, Slocombe PM, Webster A, Butler M, Knight CG, Smith BJ, Stephens PE, Shelley C, Hutton M, Knauper V, Docherty AJ, Murphy G. TNF-alpha converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3. *FEBS Lett.* 1998 Sep 11;435(1):39-44.

Amuthan G, Biswas G, Zhang SY, Klein-Szanto A, Vijayasarathy C, Avadhani NG. Mitochondria-to-nucleus stress signaling induces phenotypic changes, tumor progression and cell invasion. *EMBO J.* 2001 Apr 17;20(8):1910-20.

Anderson CL, Brown CJ. Variability of X chromosome inactivation: effect on levels of TIMP1 RNA and role of DNA methylation. *Hum Genet.* 2002 Mar;110(3):271-8.

Anrather J, Csizmadia V, Soares MP, Winkler H. Regulation of NF-kappaB RelA phosphorylation and transcriptional activity by p21(ras) and protein kinase Czeta in primary endothelial cells. *J Biol Chem.* 1999 May 7;274(19):13594-603.

Antequera F, Bird A. CpG islands. In: DNA methylation: molecular biology and biological significance. Jost JP, Saluz HP (eds) (Basel: Birkhauser Verlag), pp 169-185.

Antonetti DA, Algenstaedt P, Kahn CR. Insulin receptor substrate 1 binds two novel splice variants of the regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in muscle and brain. *Mol Cell Biol.* 1996 May;16(5):2195-203.

Anthonsen MW, Andersen S, Solhaug A, Johansen B. Atypical lambda/iota PKC conveys 5-lipoxygenase/leukotriene B4-mediated cross-talk between phospholipase A2s regulating NF-kappa B activation in response to tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta. *J Biol Chem.* 2001 Sep 21;276(38):35344-51.

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 Mar 15;160(6):2967-73.

Arap W, Nishikawa R, Furnari FB, Cavenee WK, Huang HJ. Replacement of the p16/CDKN2 gene suppresses human glioma cell growth. *Cancer Res.* 1995 Mar 15;55(6):1351-4.

Arbiser JL, Moses MA, Fernandez CA, Ghiso N, Cao Y, Klauber N, Frank D, Brownlee M, Flynn E, Parangi S, Byers HR, Folkman J. Oncogenic H-ras stimulates tumor angiogenesis by two distinct pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Feb 4;94(3):861-6.

Arsura M, Wu M, Sonenshein GE. TGF beta 1 inhibits NF-kappa B/Rel activity inducing apoptosis of B cells: transcriptional activation of I kappa B alpha. *Immunity.* 1996 Jul;5(1):31-40.

Asahi M, Wang X, Mori T, Sumii T, Jung JC, Moskowitz MA, Fini ME, Lo EH. Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood-brain barrier and white matter components after cerebral ischemia. *J Neurosci.* 2001 Oct 1;21(19):7724-32.

Attisano L, Carcamo J, Ventura F, Weis FM, Massague J, Wrana JL. Identification of human activin and TGF beta type I receptors that form heteromeric kinase complexes with type II receptors. *Cell.* 1993 Nov 19;75(4):671-80.

Bachman KE, Herman JG, Corn PG, Merlo A, Costello JF, Cavenee WK, Baylin SB, Graff JR. Methylation-associated silencing of the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 gene suggest a suppressor role in kidney, brain, and other human cancers. *Cancer Res.* 1999 Feb 15;59(4):798-802.

Backer JM, Myers MG Jr, Shoelson SE, Chin DJ, Sun XJ, Miralpeix M, Hu P, Margolis B, Skolnik EY, Schlessinger J, et al. Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. *EMBO J.* 1992 Sep;11(9):3469-79.

Bainton DF, Ulliyot JL, Farquhar MG. The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. *J Exp Med*. 1971 Oct 1;134(4):907-34.

Ballestar E, Wolffe AP. Methyl-CpG-binding proteins. Targeting specific gene repression. *Eur J Biochem*. 2001 Jan;268(1):1-6.

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

Baker AH, Zaltsman AB, George SJ, Newby AC. Divergent effects of tissue inhibitor of metalloproteinase-1, -2, or -3 overexpression on rat vascular smooth muscle cell invasion, proliferation, and death in vitro. TIMP-3 promotes apoptosis. *J Clin Invest*. 1998 Mar 15;101(6):1478-87.

Bakin AV, Curran T. Role of DNA 5-methylcytosine transferase in cell transformation by fos. *Science*. 1999 Jan 15;283(5400):387-90.

Bakin AV, Tomlinson AK, Bhowmick NA, Moses HL, Arteaga CL. Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration. *J Biol Chem*. 2000 Nov 24;275(47):36803-10.

Baltensperger K, Kozma LM, Jaspers SR, Czech MP. Regulation by insulin of phosphatidylinositol 3'-kinase bound to alpha- and beta-isoforms of p85 regulatory subunit. *J Biol Chem*. 1994 Nov 18;269(46):28937-46.

Baltuch GH, Dooley NP, Rostworowski KM, Villemure JG, Yong VW. Protein kinase C isoform alpha overexpression in C6 glioma cells and its role in cell proliferation. *J Neurooncol.* 1995;24(3):241-50.

Barrett T, Xiao B, Dodson EJ, Dodson G, Ludbrook SB, Nurmahomed K, Gamblin SJ, Musacchio A, Smerdon SJ, Eccleston JF. The structure of the GTPase-activating domain from p50rhoGAP. *Nature.* 1997 Jan 30;385(6615):458-61.

Bar-Sagi D, Feramisco JR. Induction of membrane ruffling and fluid-phase pinocytosis in quiescent fibroblasts by ras proteins. *Science.* 1986 Sep 5;233(4768):1061-8.

Basset P, Bellocq JP, Wolf C, Stoll I, Hutin P, Limacher JM, Podhajcer OL, Chenard MP, Rio MC, Chambon P. A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature.* 1990 Dec 20-27;348(6303):699-704.

Batlle E, Verdu J, Dominguez D, del Mont Llosas M, Diaz V, Loukili N, Paciucci R, Alameda F, de Herreros AG. Protein kinase C-alpha activity inversely modulates invasion and growth of intestinal cells. *J Biol Chem.* 1998 Jun 12;273(24):15091-8.

Battagay EJ, Raines EW, Seifert RA, Bowen-Pope DF, Ross R. TGF-beta induces bimodal proliferation of connective tissue cells via complex control of an autocrine PDGF loop. *Cell.* 1990 Nov 2;63(3):515-24.

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

Bazzi MD, Nelsestuen GL. Protein kinase C interaction with calcium: a phospholipid-dependent process. *Biochemistry.* 1990 Aug 21;29(33):7624-30.

Beard C, Li E, Jaenisch R. Loss of methylation activates Xist in somatic but not in embryonic cells. *Genes Dev.* 1995 Oct 1;9(19):2325-34.

Beckmann MP, Betsholtz C, Heldin CH, Westermark B, Di Marco E, Di Fiore PP, Robbins KC, Aaronson SA. Comparison of biological properties and transforming potential of human PDGF-A and PDGF-B chains. *Science*. 1988 Sep 9;241(4871):1346-9.

Benda P, Lightbody J, Sato G, Levine L, Sweet W. Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science*. 1968 Jul 26;161(839):370-1.

Ben-Hattar J, Beard P, Jiricny J. Cytosine methylation in CTF and Sp1 recognition sites of an HSV tk promoter: effects on transcription in vivo and on factor binding in vitro. *Nucleic Acids Res*. 1989 Dec 25;17(24):10179-90.

Benzil DL, Finkelstein SD, Epstein MH, Finch PW. Expression pattern of alpha-protein kinase C in human astrocytomas indicates a role in malignant progression. *Cancer Res*. 1992 May 15;52(10):2951-6.

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 Oct;2(10):737-44.

Bernhard EJ, Gruber SB, Muschel RJ. 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 U S A*. 1994 May 10;91(10):4293-7.

Berra E, Diaz-Meco MT, Lozano J, Frutos S, Municio MM, Sanchez P, Sanz L, Moscat J. Evidence for a role of MEK and MAPK during signal transduction by protein kinase C zeta. *EMBO J*. 1995 Dec 15;14(24):6157-63.

Bertaux B, Hornebeck W, Eisen AZ, Dubertret L. Growth stimulation of human keratinocytes by tissue inhibitor of metalloproteinases. *J Invest Dermatol.* 1991 Oct;97(4):679-85.

Bestor T, Laudano A, Mattaliano R, Ingram V. Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases. *J Mol Biol.* 1988 Oct 20;203(4):971-83.

Bethea JR, Chung IY, Sparacio SM, Gillespie GY, Benveniste EN. Interleukin-1 beta induction of tumor necrosis factor-alpha gene expression in human astrogloma cells. *J Neuroimmunol.* 1992 Feb;36(2-3):179-91.

Bethea JR, Gillespie GY, Chung IY, Benveniste EN. Tumor necrosis factor production and receptor expression by a human malignant glioma cell line, D54-MG. *J Neuroimmunol.* 1990 Nov;30(1):1-13.

Beuscher HU, Gunther C, Rollinghoff M. IL-1 beta is secreted by activated murine macrophages as biologically inactive precursor. *J Immunol.* 1990 Mar 15;144(6):2179-83.

Beyaert R, Cuenda A, Vanden Berghe W, Plaisance S, Lee JC, Haegeman G, Cohen P, Fiers W. The p38/RK mitogen-activated protein kinase pathway regulates interleukin-6 synthesis response to tumor necrosis factor. *EMBO J.* 1996 Apr 15;15(8):1914-23.

Bird A. The essentials of DNA methylation. *Cell.* 1992 Jul 10;70(1):5-8.

Bird AP. CpG islands as gene markers in the vertebrate nucleus. *Trends Genet.* 1987; 3.

Bird AP, Wolffe AP. Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin. *Cell.* 1999 Nov 24;99(5):451-4.

Bishayee S, Majumdar S, Khire J, Das M. Ligand-induced dimerization of the platelet-derived growth factor receptor. Monomer-dimer interconversion occurs independent of receptor phosphorylation. *J Biol Chem.* 1989 Jul 15;264(20):11699-705.

Black RA, Kronheim SR, Sleath PR. Activation of interleukin-1 beta by a co-induced protease. *FEBS Lett.* 1989 Apr 24;247(2):386-90.

Blaskovich MA, Lin Q, Delarue FL, Sun J, Park HS, Coppola D, Hamilton AD, Sefti SM. Design of GFB-111, a platelet-derived growth factor binding molecule with antiangiogenic and anticancer activity against human tumors in mice. *Nat Biotechnol.* 2000 Oct;18(10):1065-70.

Blaydes JP, Luciani MG, Pospisilova S, Ball HM, Vojtesek B, Hupp TR. Stoichiometric phosphorylation of human p53 at Ser315 stimulates p53-dependent transcription. *J Biol Chem.* 2001 Feb 16;276(7):4699-708.

Bodmer S, Strommer K, Frei K, Siepl C, de Tribolet N, Heid I, Fontana A. Immunosuppression and transforming growth factor-beta in glioblastoma. Preferential production of transforming growth factor-beta 2. *J Immunol.* 1989 Nov 15;143(10):3222-9.

Bomszyk K, Sims JE, Stanton TH, Slack J, McMahan CJ, Valentine MA, Dower SK. Evidence for different interleukin 1 receptors in murine B- and T-cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Oct;86(20):8034-8.

Bond M, Fabunmi RP, Baker AH, Newby AC. Synergistic upregulation of metalloproteinase-9 by growth factors and inflammatory cytokines: an absolute requirement for transcription factor NF-kappa B. *FEBS Lett.* 1998 Sep 11;435(1):29-34.

Booker GW, Gout I, Downing AK, Driscoll PC, Boyd J, Waterfield MD, Campbell ID. Solution structure and ligand-binding site of the SH3 domain of the p85 alpha subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell*. 1993 May 21;73(4):813-22.

Bordoni A, Hrelia S, Biagi PL, Berra B. Different fatty-acid profiles in phosphoinositides from human fibroblastic meningiomas with or without chromosome 22 monosomy. *Int J Cancer*. 1992 Feb 1;50(3):402-4.

Bornancin F, Parker PJ. Phosphorylation of protein kinase C-alpha on serine 657 controls the accumulation of active enzyme and contributes to its phosphatase-resistant state. *J Biol Chem*. 1997 Feb 7;272(6):3544-9.

Bornancin F, Parker PJ. Phosphorylation of threonine 638 critically controls the dephosphorylation and inactivation of protein kinase Calpha. *Curr Biol*. 1996 Sep 1;6(9):1114-23.

Borner C, Filipuzzi I, Wartmann M, Eppenberger U, Fabbro D. Biosynthesis and posttranslational modifications of protein kinase C in human breast cancer cells. *J Biol Chem*. 1989 Aug 15;264(23):13902-9.

Boulay A, Masson R, Chenard MP, El Fahime M, Cassard L, Bellocq JP, Sautes-Fridman C, Basset P, Rio MC. High cancer cell death in syngeneic tumors developed in host mice deficient for the stromelysin-3 matrix metalloproteinase. *Cancer Res*. 2001 Mar 1;61(5):2189-93.

Bradley G, Juranka PF, Ling V. Mechanism of multidrug resistance. *Biochim Biophys Acta*. 1988 Aug 3;948(1):87-128.

Breathnach R, Matrisian LM, Gesnel MC, Staub A, Leroy P. Sequences coding for part of oncogene-induced transin are highly conserved in a related rat gene. *Nucleic Acids Res*. 1987 Feb 11;15(3):1139-51.

Brew K, Dinakarandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta*. 2000 Mar 7;1477(1-2):267-83.

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

Brooks PC, Stromblad S, Sanders LC, von Schalscha TL, Aimes RT, Stetler-Stevenson WG, Quigley JP, Cheresch DA. Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell*. 1996 May 31;85(5):683-93.

Brunn GJ, Williams J, Sabers C, Wiederrecht G, Lawrence JC Jr, Abraham RT. Direct inhibition of the signaling functions of the mammalian target of rapamycin by the phosphoinositide 3-kinase inhibitors, wortmannin and LY294002. *EMBO J*. 1996 Oct 1;15(19):5256-67.

Buday L, Downward J. Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor. *Cell*. 1993 May 7;73(3):611-20.

Burgering BM, Coffey PJ. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature*. 1995 Aug 17;376(6541):599-602.

Burns DJ, Bell RM. Protein kinase C contains two phorbol ester binding domains. *J Biol Chem*. 1991 Sep 25;266(27):18330-8.

Cacace AM, Guadagno SN, Krauss RS, Fabbro D, Weinstein IB. The epsilon isoform of protein kinase C is an oncogene when overexpressed in rat fibroblasts. *Oncogene*. 1993 Aug;8(8):2095-104.

Cantley LC, Auger KR, Carpenter C, Duckworth B, Graziani A, Kapeller R, Soltoff S. Oncogenes and signal transduction. *Cell*. 1991 Jan 25;64(2):281-302.

Carpenter CL, Auger KR, Chanudhuri M, Yoakim M, Schaffhausen B, Shoelson S, Cantley LC. Phosphoinositide 3-kinase is activated by phosphopeptides that bind to the SH2 domains of the 85-kDa subunit. *J Biol Chem*. 1993 May 5;268(13):9478-83.

Carpenter CL, Auger KR, Duckworth BC, Hou WM, Schaffhausen B, Cantley LC. A tightly associated serine/threonine protein kinase regulates phosphoinositide 3-kinase activity. *Mol Cell Biol*. 1993 Mar;13(3):1657-65.

Carpenter CL, Duckworth BC, Auger KR, Cohen B, Schaffhausen BS, Cantley LC. Purification and characterization of phosphoinositide 3-kinase from rat liver. *J Biol Chem*. 1990 Nov 15;265(32):19704-11.

Castigli E, Arcuri C, Giovagnoli L, Luciani R, Giovagnoli L, Secca T, Gianfranceschi GL, Bocchini V. Interleukin-1beta induces apoptosis in GL15 glioblastoma-derived human cell line. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000 Dec;279(6):C2043-9.

Chambers AF, MacDonald IC, Schmidt EE, Koop S, Morris VL, Khokha R, Groom AC. Steps in tumor metastasis: new concepts from intravital videomicroscopy. *Cancer Metastasis Rev*. 1995 Dec;14(4):279-301.

Chambers AF, Matrisian LM. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst*. 1997 Sep 3;89(17):1260-70.

Chandler S, Cossins J, Lury J, Wells G. Macrophage metalloelastase degrades matrix and myelin proteins and processes a tumour necrosis factor-alpha fusion protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996 Nov 12;228(2):421-9.

Chang HW, Aoki M, Fruman D, Auger KR, Bellacosa A, Tsichlis PN, Cantley LC, Roberts TM, Vogt PK. Transformation of chicken cells by the gene encoding the catalytic subunit of PI 3-kinase. *Science*. 1997 Jun 20;276(5320):1848-50.

Chen CC. Protein kinase C alpha, delta, epsilon and zeta in C6 glioma cells. TPA induces translocation and down-regulation of conventional and new PKC isoforms but not atypical PKC zeta. *FEBS Lett*. 1993 Oct 11;332(1-2):169-73.

Chin JR, Murphy G, Werb Z. Stromelysin, a connective tissue-degrading metalloendopeptidase secreted by stimulated rabbit synovial fibroblasts in parallel with collagenase. Biosynthesis, isolation, characterization, and substrates. *J Biol Chem*. 1985 Oct 5;260(22):12367-76.

Chintala SK, Sawaya R, Aggarwal BB, Majumder S, Giri DK, Kyritsis AP, Gokaslan ZL, Rao JS. Induction of matrix metalloproteinase-9 requires a polymerized actin cytoskeleton in human malignant glioma cells. *J Biol Chem*. 1998 May 29;273(22):13545-51.

Chizzonite R, Truitt T, Kilian PL, Stern AS, Nunes P, Parker KP, Kaffka KL, Chua AO, Lugg DK, Gubler U. Two high-affinity interleukin 1 receptors represent separate gene products. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Oct;86(20):8029-33.

Choi PM, Tchou-Wong KM, Weinstein IB. Overexpression of protein kinase C in HT29 colon cancer cells causes growth inhibition and tumor suppression. *Mol Cell Biol*. 1990 Sep;10(9):4650-7.

Chong LD, Traynor-Kaplan A, Bokoch GM, Schwartz MA. The small GTP-binding protein Rho regulates a phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in mammalian cells. *Cell*. 1994 Nov 4;79(3):507-13.

Chuang LS, Ian HI, Koh TW, Ng HH, Xu G, Li BF. Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1. *Science*. 1997 Sep 26;277(5334):1996-2000.

Claesson-Welsh L, Eriksson A, Westermark B, Heldin CH. cDNA cloning and expression of the human A-type platelet-derived growth factor (PDGF) receptor establishes structural similarity to the B-type PDGF receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Jul;86(13):4917-21.

Cockett MI, Birch ML, Murphy G, Hart IR, Docherty AJ. Metalloproteinase domain structure, cellular invasion and metastasis. *Biochem Soc Trans*. 1994 Feb;22(1):55-7.

Colburn NH, Former BF, Nelson KA, Yuspa SH. Tumour promoter induces anchorage independence irreversibly. *Nature*. 1979 Oct 18;281(5732):589-91.

Cole AA, Chubinskaya S, Schumacher B, Huch K, Szabo G, Yao J, Mikecz K, Hasty KA, Kuettner KE. Chondrocyte matrix metalloproteinase-8. Human articular chondrocytes express neutrophil collagenase. *J Biol Chem*. 1996 May 3;271(18):11023-6.

Conca W, Willmroth F. Human T lymphocytes express a member of the Matrix Metalloproteinase gene family. *Arthritis Rheum*. 1994 Jun;37(6):951-6.

Comb M, Goodman HM. CpG methylation inhibits proenkephalin gene expression and binding of the transcription factor AP-2. *Nucleic Acids Res*. 1990 Jul 11;18(13):3975-82.

Constam DB, Philipp J, Malipiero UV, ten Dijke P, Schachner M, Fontana A. Differential expression of transforming growth factor-beta 1, -beta 2, and -beta 3 by glioblastoma cells, astrocytes, and microglia. *J Immunol*. 1992 Mar 1;148(5):1404-10.

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 Jan 5;267(1):515-9.

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 Dec 15;161(12):6845-52.

Coso OA, Chiariello M, Yu JC, Teramoto H, Crespo P, Xu N, Miki T, Gutkind JS. The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell.* 1995 Jun 30;81(7):1137-46.

Cossins J, Dudgeon TJ, Catlin G, Gearing AJ, Clements JM. Identification of MMP-18, a putative novel human matrix metalloproteinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996 Nov 12;228(2):494-8.

Couldwell WT, Antel JP, Yong VW. Protein kinase C activity correlates with the growth rate of malignant gliomas: Part II. Effects of glioma mitogens and modulators of protein kinase C. *Neurosurgery.* 1992 Oct;31(4):717-24.

Courtneidge SA, Heber A. An 81 kd protein complexed with middle T antigen and pp60c-src: a possible phosphatidylinositol kinase. *Cell.* 1987 Sep 25;50(7):1031-7.

Coussens LM, Tinkle CL, Hanahan D, Werb Z. MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell.* 2000 Oct 27;103(3):481-90.

Crawford HC, Fingleton BM, Rudolph-Owen LA, Goss KJ, Rubinfeld B, Polakis P, Matrisian LM. The metalloproteinase matrilysin is a target of beta-catenin transactivation in intestinal tumors. *Oncogene.* 1999 May 6;18(18):2883-91.

Cuny E, Loiseau H, Penchet G, Ellie E, Arsaut J, Vital A, Vincendeau P, Demotes-Mainard J. Association of elevated glial expression of interleukin-1beta with improved

survival in patients with glioblastomas multiforme. *J Neurosurg.* 2002 Feb;96(2):294-301.

Curci JA, Liao S, Huffman MD, Shapiro SD, Thompson RW. Expression and localization of macrophage elastase (matrix metalloproteinase-12) in abdominal aortic aneurysms. *J Clin Invest.* 1998 Dec 1;102(11):1900-10.

Curran S, Murray GI. Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. *Eur J Cancer.* 2000 Aug;36(13 Spec No):1621-30.

D'Addario M, Ahmad A, Morgan A, Menezes J. Binding of the Epstein-Barr virus major envelope glycoprotein gp350 results in the upregulation of the TNF-alpha gene expression in monocytic cells via NF-kappaB involving PKC, PI3-K and tyrosine kinases. *J Mol Biol.* 2000 May 19;298(5):765-78.

Das SK, Yano S, Wang J, Edwards DR, Nagase H, Dey SK. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in the mouse uterus during the peri-implantation period. *Dev Genet.* 1997;21(1):44-54.

Davies MA, Lu Y, Sano T, Fang X, Tang P, LaPushin R, Koul D, Bookstein R, Stokoe D, Yung WK, Mills GB, Steck PA. Adenoviral transgene expression of MMAC/PTEN in human glioma cells inhibits Akt activation and induces anoikis. *Cancer Res.* 1998 Dec 1;58(23):5285-90.

Debinski W, Gibo DM, Obiri NI, Kealiher A, Puri RK. Novel anti-brain tumor cytotoxins specific for cancer cells. *Nat Biotechnol.* 1998 May;16(5):449-53.

DeClerck YA, Imren S. Protease inhibitors: role and potential therapeutic use in human cancer. *Eur J Cancer.* 1994;30A(14):2170-80.

Deinhardt F. The biology of primate retrovirus, edited by G. Klein. New York: Raven, 1980, 359-398.

Dekker LV, Parker PJ. Protein kinase C--a question of specificity. Trends Biochem Sci. 1994 Feb;19(2):73-7.

Dempsey EC, Newton AC, Mochly-Rosen D, Fields AP, Reyland ME, Insel PA, Messing RO. Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2000 Sep;279(3):L429-38.

Denning MF, Dlugosz AA, Threadgill DW, Magnuson T, Yuspa SH. Activation of the epidermal growth factor receptor signal transduction pathway stimulates tyrosine phosphorylation of protein kinase C delta. J Biol Chem. 1996 Mar 8;271(10):5325-31.

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 I kappa B-alpha in vitro. EMBO J. 1994 Jun 15;13(12):2842-8.

Diaz-Meco MT, Lozano J, Municio MM, Berra E, Frutos S, Sanz L, Moscat J. Evidence for the in vitro and in vivo interaction of Ras with protein kinase C zeta. J Biol Chem. 1994 Dec 16;269(50):31706-10.

DiChiara MR, Kiely JM, Gimbrone MA Jr, Lee ME, Perrella MA, Topper JN. Inhibition of E-selectin gene expression by transforming growth factor beta in endothelial cells involves coactivator integration of Smad and nuclear factor kappaB-mediated signals. J Exp Med. 2000 Sep 4;192(5):695-704.

DiDonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM, Zandi E, Karin M. A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB. Nature. 1997 Aug 7;388(6642):548-54.

Ding H, Roncari L, Shannon P, Wu X, Lau N, Karaskova J, Gutmann DH, Squire JA, Nagy A, Guha A. Astrocyte-specific expression of activated p21-ras results in malignant astrocytoma formation in a transgenic mouse model of human gliomas. *Cancer Res.* 2001 May 1;61(9):3826-36.

DiPersio CM, Shao M, Di Costanzo L, Kreidberg JA, Hynes RO. Mouse keratinocytes immortalized with large T antigen acquire alpha3beta1 integrin-dependent secretion of MMP-9/gelatinase B. *J Cell Sci.* 2000 Aug;113 ( Pt 16):2909-21.

Divecha N, Irvine RF. Phospholipid signaling. *Cell.* 1995 Jan 27;80(2):269-78.

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 Nov 7-13;318(6041):66-9.

Domin J, Pages F, Volinia S, Rittenhouse SE, Zvelebil MJ, Stein RC, Waterfield MD. Cloning of a human phosphoinositide 3-kinase with a C2 domain that displays reduced sensitivity to the inhibitor wortmannin. *Biochem J.* 1997 Aug 15;326 ( Pt 1):139-47.

Domin J, Waterfield MD. Using structure to define the function of phosphoinositide 3-kinase family members. *FEBS Lett.* 1997 Jun 23;410(1):91-5.

Dong Z, Kumar R, Yang X, Fidler IJ. Macrophage-derived metalloelastase is responsible for the generation of angiostatin in Lewis lung carcinoma. *Cell.* 1997 Mar 21;88(6):801-10.

Dooley NP, Baltuch GH, Groome N, Villemure JG, Yong VW. Apoptosis is induced in glioma cells by antisense oligonucleotides to protein kinase C alpha and is enhanced by cycloheximide. *Neuroreport.* 1998 Jun 1;9(8):1727-33.

Doornbos RP, Theelen M, van der Hoeven PC, van Blitterswijk WJ, Verkleij AJ, van Bergen en Henegouwen PM. Protein kinase Czeta is a negative regulator of protein kinase B activity. *J Biol Chem.* 1999 Mar 26;274(13):8589-96.

d'Ortho MP, Will H, Atkinson S, Butler G, Messent A, Gavrilovic J, Smith B, Timpl R, Zardi L, Murphy G. Membrane-type matrix metalloproteinases 1 and 2 exhibit broad-spectrum proteolytic capacities comparable to many matrix metalloproteinases. *Eur J Biochem.* 1997 Dec 15;250(3):751-7.

Drewa G, Zbytniewski Z, Kanclerz A. Activity of some lysosomal hydrolases in the homogenates of transplantable melanotic and amelanotic melanoma in golden hamster (*Mesocricetus auratus*, Waterhouse). *Arch Geschwulstforsch.* 1978;48(3):198-201.

Driedger PE, Blumberg PM. The effect of phorbol diesters on chicken embryo fibroblasts. *Cancer Res.* 1977 Sep;37(9):3257-65.

Druker BJ, Ling LE, Cohen B, Roberts TM, Schaffhausen BS. A completely transformation-defective point mutant of polyomavirus middle T antigen which retains full associated phosphatidylinositol kinase activity. *J Virol.* 1990 Sep;64(9):4454-61.

Duckworth BC, Cantley LC. In *Handbook of lipid research: Lipid Second Messengers*, ed. RM Bell, JH Exton. 1996; 8:125-75. New York: Plenum

Dunn IF, Heese O, Black PM. Growth factors in glioma angiogenesis: FGFs, PDGF, EGF, and TGFs. *J Neurooncol.* 2000 Oct-Nov;50(1-2):121-37.

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 Jul 1;137(1):245-54.

Eberhardt W, Huwiler A, Beck KF, Walpen S, Pfeilschifter J. Amplification of IL-1 beta-induced matrix metalloproteinase-9 expression by superoxide in rat glomerular mesangial cells is mediated by increased activities of NF-kappa B and activating protein-1 and involves activation of the mitogen-activated protein kinase pathways. *J Immunol*. 2000 Nov 15;165(10):5788-97.

Edwards AS, Newton AC. Phosphorylation at conserved carboxyl-terminal hydrophobic motif regulates the catalytic and regulatory domains of protein kinase C. *J Biol Chem*. 1997 Jul 18;272(29):18382-90.

Edwards DR, Beaudry PP, Laing TD, Kowal V, Leco KJ, Leco PA, Lim MS. The roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in tissue remodelling and cell growth. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1996 Mar;20 Suppl 3:S9-15.

Eldar H, Zisman Y, Ullrich A, Livneh E. Overexpression of protein kinase C alpha-subtype in Swiss/3T3 fibroblasts causes loss of both high and low affinity receptor numbers for epidermal growth factor. *J Biol Chem*. 1990 Aug 5;265(22):13290-6.

Ellerbroek SM, Halbleib JM, Benavidez M, Warmka JK, Wattenberg EV, Stack MS, Hudson LG. Phosphatidylinositol 3-kinase activity in epidermal growth factor-stimulated matrix metalloproteinase-9 production and cell surface association. *Cancer Res*. 2001 Mar 1;61(5):1855-61.

Ellerbroek SM, Hudson LG, Stack MS. Proteinase requirements of epidermal growth factor-induced ovarian cancer cell invasion. *Int J Cancer*. 1998 Oct 29;78(3):331-7.

Engers R, Mrzyk S, Springer E, Fabbro D, Weissgerber G, Gernharz CD, Gabbert HE. Protein kinase C in human renal cell carcinomas: role in invasion and differential isoenzyme expression. *Br J Cancer*. 2000 Mar;82(5):1063-9.

English WR, Puente XS, Freije JM, Knauper V, Amour A, Merryweather A, Lopez-Otin C, Murphy G. Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MMP17) has tumor necrosis

factor-alpha convertase activity but does not activate pro-MMP2. *J Biol Chem.* 2000 May 12;275(19):14046-55.

English WR, Velasco G, Stracke JO, Knauper V, Murphy G. Catalytic activities of membrane-type 6 matrix metalloproteinase (MMP25). *FEBS Lett.* 2001 Feb 23;491(1-2):137-42.

Eriksson A, Siegbahn A, Westermark B, Heldin CH, Claesson-Welsh L. PDGF alpha- and beta-receptors activate unique and common signal transduction pathways. *EMBO J.* 1992 Feb;11(2):543-50.

Erpel T, Courtneidge SA. Src family protein tyrosine kinases and cellular signal transduction pathways. *Curr Opin Cell Biol.* 1995 Apr;7(2):176-82.

Escobedo JA, Navankasattusas S, Kavanaugh WM, Milfay D, Fried VA, Williams LT. cDNA cloning of a novel 85 kd protein that has SH2 domains and regulates binding of PI3-kinase to the PDGF beta-receptor. *Cell.* 1991 Apr 5;65(1):75-82.

Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res.* 1999 Feb 15;59(4):793-7.

Esteller M, Toyota M, Sanchez-Cespedes M, Capella G, Peinado MA, Watkins DN, Issa JP, Sidransky D, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is associated with G to A mutations in K-ras in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res.* 2000 May 1;60(9):2368-71.

Fabunmi RP, Baker AH, Murray EJ, Booth RF, Newby AC. Divergent regulation by growth factors and cytokines of 95 kDa and 72 kDa gelatinases and tissue inhibitors or

metalloproteinases-1, -2, and -3 in rabbit aortic smooth muscle cells. *Biochem J.* 1996 Apr 1;315 ( Pt 1):335-42.

Faux MC, Scott JD. Regulation of the AKAP79-protein kinase C interaction by Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin. *J Biol Chem.* 1997 Jul 4;272(27):17038-44.

Feng S, Chen JK, Yu H, Simon JA, Schreiber SL. Two binding orientations for peptides to the Src SH3 domain: development of a general model for SH3-ligand interactions. *Science.* 1994 Nov 18;266(5188):1241-7.

Feng X, Hannun YA. An essential role for autophosphorylation in the dissociation of activated protein kinase C from the plasma membrane. *J Biol Chem.* 1998 Oct 9;273(41):26870-4.

Ferguson AT, Vertino PM, Spitzner JR, Baylin SB, Muller MT, Davidson NE. Role of estrogen receptor gene demethylation and DNA methyltransferase.DNA adduct formation in 5-aza-2'deoxyctidine-induced cytotoxicity in human breast cancer cells. *J Biol Chem.* 1997 Dec 19;272(51):32260-6.

Ferrara N, Ousley F, Gospodarowicz D. Bovine brain astrocytes express basic fibroblast growth factor, a neurotropic and angiogenic mitogen. *Brain Res.* 1988 Oct 18;462(2):223-32.

Filomenko R, Poirson-Bichat F, Billerey C, Belon JP, Garrido C, Solary E, Bettaieb A. Atypical protein kinase C zeta as a target for chemosensitization of tumor cells. *Cancer Res.* 2002 Mar 15;62(6):1815-21.

Frei K, Malipiero UV, Leist TP, Zinkernagel RM, Schwab ME, Fontana A. On the cellular source and function of interleukin 6 produced in the central nervous system in viral diseases. *Eur J Immunol.* 1989 Apr;19(4):689-94.

Freije JM, Diez-Itza I, Balbin M, Sanchez LM, Blasco R, Tolivia J, Lopez-Otin C. Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. *J Biol Chem.* 1994 Jun 17;269(24):16766-73.

Fridman R, Toth M, Pena D, Mobashery S. Activation of progelatinase B (MMP-9) by gelatinase A (MMP-2). *Cancer Res.* 1995 Jun 15;55(12):2548-55.

Frohman EM, Frohman TC, Dustin ML, Vayuvegula B, Choi B, Gupta A, van den Noort S, Gupta S. The induction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) expression on human fetal astrocytes by interferon-gamma, tumor necrosis factor alpha, lymphotoxin, and interleukin-1: relevance to intracerebral antigen presentation. *J Neuroimmunol.* 1989 Jul;23(2):117-24.

Fukami K, Furuhashi K, Inagaki M, Endo T, Hatano S, Takenawa T. Requirement of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate for alpha-actinin function. *Nature.* 1992 Sep 10;359(6391):150-2.

Fukami K, Endo T, Imamura M, Takenawa T. alpha-Actinin and vinculin are PIP2-binding proteins involved in signaling by tyrosine kinase. *J Biol Chem.* 1994 Jan 14;269(2):1518-22.

Fuks F, Burgers WA, Godin N, Kasai M, Kouzarides T. Dnmt3a binds deacetylases and is recruited by a sequence-specific repressor to silence transcription. *EMBO J.* 2001 May 15;20(10):2536-44.

Fukui Y, Hanafusa H. Phosphatidylinositol kinase activity associates with viral p60src protein. *Mol Cell Biol.* 1989 Apr;9(4):1651-8.

Fukui Y, Saltiel AR, Hanafusa H. Phosphatidylinositol-3 kinase is activated in v-src, v-yes, and v-fps transformed chicken embryo fibroblasts. *Oncogene*. 1991 Mar;6(3):407-11.

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 Jan 21;269(3):2032-40.

Gasson JC, Golde DW, Kaufman SE, Westbrook CA, Hewick RM, Kaufman RJ, Wong GG, Temple PA, Leary AC, Brown EL. Molecular characterization and expression of the gene encoding human erythroid-potentiating activity. *Nature*. 1985 Jun 27-Jul 3;315(6022):768-71.

Gatanaga T, Hwang CD, Kohr W, Cappuccini F, Lucci JA 3rd, Jeffes EW, Lentz R, Tomich J, Yamamoto RS, Granger GA. Purification and characterization of an inhibitor (soluble tumor necrosis factor receptor) for tumor necrosis factor and lymphotoxin obtained from the serum ultrafiltrates of human cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Nov;87(22):8781-4.

Gauthier T, Hamou MF, Monod L, Gallay P, Carrel S, de Tribolet N. Expression and release of interleukin-1 by human glioblastoma cells in vitro and in vivo. *Acta Neurochir (Wien)*. 1993;121(3-4):199-205.

Gearing AJ, Beckett P, Christodoulou M, Churchill M, Clements J, Davidson AH, Drummond AH, Galloway WA, Gilbert R, Gordon JL. Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases. *Nature*. 1994 Aug 18;370(6490):555-7.

Genersch E, Hayess K, Neuenfeld Y, Haller H. Sustained ERK phosphorylation is necessary but not sufficient for MMP-9 regulation in endothelial cells: involvement of Ras-dependent and -independent pathways. *J Cell Sci*. 2000 Dec;113 Pt 23:4319-30.

Gershtein ES, Shatskaya VA, Ermilova VD, Kushlinsky NE, Krasil'nikov MA. Phosphatidylinositol 3-kinase expression in human breast cancer. *Clin Chim Acta*. 1999 Sep;287(1-2):59-67.

Giannelli G, Falk-Marzillier J, Schiraldi O, Stetler-Stevenson WG, Quaranta V. Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5. *Science*. 1997 Jul 11;277(5323):225-8.

Gijbels K, Proost P, Masure S, Carton H, Billiau A, Opdenakker G. Gelatinase B is present in the cerebrospinal fluid during experimental autoimmune encephalomyelitis and cleaves myelin basic protein. *J Neurosci Res*. 1993 Nov 1;36(4):432-40.

Giulian D, Woodward J, Young DG, Krebs JF, Lachman LB. Interleukin-1 injected into mammalian brain stimulates astrogliosis and neovascularization. *J Neurosci*. 1988 Jul;8(7):2485-90.

Glickman JF, Pavlovich JG, Reich NO. Peptide mapping of the murine DNA methyltransferase reveals a major phosphorylation site and the start of translation. *J Biol Chem*. 1997 Jul 11;272(28):17851-7.

Goldberg GI, Marmer BL, Grant GA, Eisen AZ, Wilhelm S, He CS. Human 72-kilodalton type IV collagenase forms a complex with a tissue inhibitor of metalloproteases designated TIMP-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Nov;86(21):8207-11.

Goldberg GI, Strongin A, Collier IE, Genrich LT, Marmer BL. Interaction of 92-kDa type IV collagenase with the tissue inhibitor of metalloproteinases prevents dimerization, complex formation with interstitial collagenase, and activation of the proenzyme with stromelysin. *J Biol Chem*. 1992 Mar 5;267(7):4583-91.

Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol.* 1997 Oct;74(2):111-22.

Gonzalez-Zulueta M, Bender CM, Yang AS, Nguyen T, Beart RW, Van Tornout JM, Jones PA. Methylation of the 5' CpG island of the p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing. *Cancer Res.* 1995 Oct 15;55(20):4531-5.

Goodsell DS. The molecular perspective: the SRC oncogene. *Stem Cells.* 2001;19(6):553-5.

Gopalakrishna R, Barsky SH. Tumor promoter-induced membrane-bound protein kinase C regulates hematogenous metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Jan;85(2):612-6.  
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 Nov 29;271(48):30375-80.

Graff JR, Greenberg VE, Herman JG, Westra WH, Boghaert ER, Ain KB, Saji M, Zeiger MA, Zimmer SG, Baylin SB. Distinct patterns of E-cadherin CpG island methylation in papillary, follicular, Hurthle's cell, and poorly differentiated human thyroid carcinoma. *Cancer Res.* 1998 May 15;58(10):2063-6.

Guha A, Feldkamp MM, Lau N, Boss G, Pawson A. Proliferation of human malignant astrocytomas is dependent on Ras activation. *Oncogene.* 1997 Dec 4;15(23):2755-65.

Guillem JG, O'Brian CA, Fitzer CJ, Forde KA, LoGerfo P, Treat M, Weinstein IB. Altered levels of protein kinase C and Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinases in human colon carcinomas. *Cancer Res.* 1987 Apr 15;47(8):2036-9.

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 May 3;271(18):10672-80.

Gum R, Wang H, Lengyel E, Juarez J, Boyd D. Regulation of 92 kDa type IV collagenase expression by the jun aminoterminal kinase- and the extracellular signal-regulated kinase-dependent signaling cascades. *Oncogene*. 1997 Mar 27;14(12):1481-93.

Gururajan R, Grenet J, Lahti JM, Kidd VJ. Isolation and characterization of two novel metalloproteinase genes linked to the Cdc2L locus on human chromosome 1p36.3. *Genomics*. 1998 Aug 15;52(1):101-6.

Gutmann DH, Saporito-Irwin S, DeClue JE, Wienecke R, Guha A. Alterations in the rap1 signaling pathway are common in human gliomas. *Oncogene*. 1997 Sep 25;15(13):1611-6.

Hammacher A, Mellstrom K, Heldin CH, Westermark B. Isoform-specific induction of actin reorganization by platelet-derived growth factor suggests that the functionally active receptor is a dimer. *EMBO J*. 1989 Sep;8(9):2489-95.

Han YP, Tuan TL, Hughes M, Wu H, Garner WL. Transforming growth factor-beta - and tumor necrosis factor-alpha -mediated induction and proteolytic activation of MMP-9 in human skin. *J Biol Chem*. 2001 Jun 22;276(25):22341-50.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57-70.

Hannon GJ, Beach D. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature*. 1994 Sep 15;371(6494):257-61.

Harrington MA, Jones PA, Imagawa M, Karin M. Cytosine methylation does not affect binding of transcription factor Sp1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Apr;85(7):2066-70.

Hartley KO, Gell D, Smith GC, Zhang H, Divecha N, Connelly MA, Admon A, Lees-Miller SP, Anderson CW, Jackson SP. DNA-dependent protein kinase catalytic subunit: a relative of phosphatidylinositol 3-kinase and the ataxia telangiectasia gene product. *Cell*. 1995 Sep 8;82(5):849-56.

Hartwig JH, Bokoch GM, Carpenter CL, Janmey PA, Taylor LA, Toker A, Stossel TP. Thrombin receptor ligation and activated Rac uncouple actin filament barbed ends through phosphoinositide synthesis in permeabilized human platelets. *Cell*. 1995 Aug 25;82(4):643-53.

Hawkins PT, Eguinoa A, Qiu RG, Stokoe D, Cooke FT, Walters R, Wennstrom S, Claesson-Welsh L, Evans T, Symons M, et al. PDGF stimulates an increase in GTP-Rac via activation of phosphoinositide 3-kinase. *Curr Biol*. 1995 Apr 1;5(4):393-403.

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

Hayakawa T, Yamashita K, Tanzawa K, Uchijima E, Iwata K. Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells. A possible new growth factor in serum. *FEBS Lett*. 1992 Feb 17;298(1):29-32.

Heldin CH, Ernlund A, Rorsman C, Ronnstrand L. Dimerization of B-type platelet-derived growth factor receptors occurs after ligand binding and is closely associated with receptor kinase activation. *J Biol Chem*. 1989 May 25;264(15):8905-12.

Heldin CH, Ostman A, Ronnstrand L. Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Aug 19;1378(1):F79-113.

Hendrich B., Bird A. Mammalian methyltransferases and methyl-CpG binding domains: protein involved in DNA methylation. In: DNA methylation and cancer. Jones PA, Vogt PK (eds) (Springer), pp 55-71.

Herman JG, Merlo A, Mao L, Lapidus RG, Issa JP, Davidson NE, Sidransky D, Baylin SB. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res.* 1995 Oct 15;55(20):4525-30.

Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, Markowitz S, Willson JK, Hamilton SR, Kinzler KW, Kane MF, Kolodner RD, Vogelstein B, Kunkel TA, Baylin SB. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Jun 9;95(12):6870-5.

Herman PK, Emr SD. Characterization of VPS34, a gene required for vacuolar protein sorting and vacuole segregation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 1990 Dec;10(12):6742-54.

Hermanson M, Funa K, Hartman M, Claesson-Welsh L, Heldin CH, Westermark B, Nister M. Platelet-derived growth factor and its receptors in human glioma tissue: expression of messenger RNA and protein suggests the presence of autocrine and paracrine loops. *Cancer Res.* 1992 Jun 1;52(11):3213-9.

Hernandez-Barrantes S, Shimura Y, Soloway PD, Sang QA, Fridman R. Differential roles of TIMP-4 and TIMP-2 in pro-MMP-2 activation by MT1-MMP. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Feb 16;281(1):126-30.

Herrmann JL, Menter DG, Hamada J, Marchetti D, Nakajima M, Nicolson GL. Mediation of NGF-stimulated extracellular matrix invasion by the human melanoma low-

affinity p75 neurotrophin receptor: melanoma p75 functions independently of trkA. *Mol Biol Cell*. 1993 Nov;4(11):1205-16.

Herschman HR, Seeger R, West G, Stahn R, Uki J. New neural cell lines derived from experimentally induced rat tumors and from human neuroblastomas. *Natl Cancer Inst Monogr*. 1978 May;(48):355-7.

Hidalgo M, Eckhardt SG. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *J Natl Cancer Inst*. 2001 Feb 7;93(3):178-93.

Hill CS, Wynne J, Treisman R. The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell*. 1995 Jun 30;81(7):1159-70.

Holland EC, Celestino J, Dai C, Schaefer L, Sawaya RE, Fuller GN. Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice. *Nat Genet*. 2000 May;25(1):55-7.

Holler M, Westin G, Jiricny J, Schaffner W. Sp1 transcription factor binds DNA and activates transcription even when the binding site is CpG methylated. *Genes Dev*. 1988 Sep;2(9):1127-35.

Holmbeck K, Bianco P, Caterina J, Yamada S, Kromer M, Kuznetsov SA, Mankani M, Robey PG, Poole AR, Pidoux I, Ward JM, Birkedal-Hansen H. MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell*. 1999 Oct 1;99(1):81-92.

Homandberg GA, Hui F. Association of proteoglycan degradation with catabolic cytokine and stromelysin release from cartilage cultured with fibronectin fragments. *Arch Biochem Biophys*. 1996 Oct 15;334(2):325-31.

Horst HA, Scheithauer BW, Kelly PJ, Kovach JS. Distribution of transforming growth factor-beta 1 in human astrocytomas. *Hum Pathol.* 1992 Nov;23(11):1284-8.

Hotary K, Allen E, Punturieri A, Yana I, Weiss SJ. Regulation of cell invasion and morphogenesis in a three-dimensional type I collagen matrix by membrane-type matrix metalloproteinases 1, 2, and 3. *J Cell Biol.* 2000 Jun 12;149(6):1309-23.

House C, Kemp BE. Protein kinase C contains a pseudosubstrate prototope in its regulatory domain. *Science.* 1987 Dec 18;238(4834):1726-8.

Housey GM, Johnson MD, Hsiao WL, O'Brian CA, Murphy JP, Kirschmeier P, Weinstein IB. Overproduction of protein kinase C causes disordered growth control in rat fibroblasts. *Cell.* 1988 Feb 12;52(3):343-54.

Hu P, Mondino A, Skolnik EY, Schlessinger J. Cloning of a novel, ubiquitously expressed human phosphatidylinositol 3-kinase and identification of its binding site on p85. *Mol Cell Biol.* 1993 Dec;13(12):7677-88.

Huang C, Schmid PC, Ma WY, Schmid HH, Dong Z. Phosphatidylinositol-3 kinase is necessary for 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced cell transformation and activated protein 1 activation. *J Biol Chem.* 1997 Feb 14;272(7):4187-94.

Huang S, Van Arsdall M, Tedjarati S, McCarty M, Wu W, Langley R, Fidler IJ. Contributions of stromal metalloproteinase-9 to angiogenesis and growth of human ovarian carcinoma in mice. *J Natl Cancer Inst.* 2002 Aug 7;94(15):1134-42.

Huhtala P, Tuuttila A, Chow LT, Lohi J, Keski-Oja J, Tryggvason K. Complete structure of the human gene for 92-kDa type IV collagenase. Divergent regulation of expression for the 92- and 72-kilodalton enzyme genes in HT-1080 cells. *J Biol Chem.* 1991 Sep 5;266(25):16485-90.

Husain SR, Joshi BH, Puri RK. Interleukin-13 receptor as a unique target for anti-glioblastoma therapy. *Int J Cancer*. 2001 Apr 15;92(2):168-75.

Iguchi-Aruga SM, Schaffner W. CpG methylation of the cAMP-responsive enhancer/promoter sequence TGACGTCA abolishes specific factor binding as well as transcriptional activation. *Genes Dev*. 1989 May;3(5):612-9.

Imai K, Shikata H, Okada Y. Degradation of vitronectin by matrix metalloproteinases-1, -2, -3, -7 and -9. *FEBS Lett*. 1995 Aug 7;369(2-3):249-51.

Inoue M, Kishimoto A, Takai Y, Nishizuka Y. Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. II. Proenzyme and its activation by calcium-dependent protease from rat brain. *J Biol Chem*. 1977 Nov 10;252(21):7610-6.

Inukai K, Anai M, Van Breda E, Hosaka T, Katagiri H, Funaki M, Fukushima Y, Ogihara T, Yazaki Y, Kikuchi, Oka Y, Asano T. A novel 55-kDa regulatory subunit for phosphatidylinositol 3-kinase structurally similar to p55PIK is generated by alternative splicing of the p85alpha gene. *J Biol Chem*. 1996 Mar 8;271(10):5317-20.

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 Mar 1;58(5):1048-51.

Jachimczak P, Bogdahn U, Schneider J, Behl C, Meixensberger J, Apfel R, Dorries R, Schlingensiepen KH, Brysch W. The effect of transforming growth factor-beta 2-specific phosphorothioate-anti-sense oligodeoxynucleotides in reversing cellular immunosuppression in malignant glioma. *J Neurosurg*. 1993 Jun;78(6):944-51.

Janmey PA. Phosphoinositides and calcium as regulators of cellular actin assembly and disassembly. *Annu Rev Physiol*. 1994;56:169-91.

Janowska-Wieczorek A, Marquez LA, Nabholtz JM, Cabuhat ML, Montano J, Chang H, Rozmus J, Russell JA, Edwards DR, Turner AR. Growth factors and cytokines upregulate gelatinase expression in bone marrow CD34(+) cells and their transmigration through reconstituted basement membrane. *Blood*. 1999 May 15;93(10):3379-90.

Jen J, Harper JW, Bigner SH, Bigner DD, Papadopoulos N, Markowitz S, Willson JK, Kinzler KW, Vogelstein B. Deletion of p16 and p15 genes in brain tumors. *Cancer Res*. 1994 Dec 15;54(24):6353-8.

Jennings MT, Maciunas RJ, Carver R, Bascom CC, Juneau P, Misulis K, Moses HL. TGF beta 1 and TGF beta 2 are potential growth regulators for low-grade and malignant gliomas in vitro: evidence in support of an autocrine hypothesis. *Int J Cancer*. 1991 Aug 19;49(1):129-39.

Jennings MT, Pietenpol JA. The role of transforming growth factor beta in glioma progression. *J Neurooncol*. 1998 Jan;36(2):123-40.

Johnatty RN, Taub DD, Reeder SP, Turcovski-Corrales SM, Cottam DW, Stephenson TJ, Rees RC. Cytokine and chemokine regulation of proMMP-9 and TIMP-1 production by human peripheral blood lymphocytes. *J Immunol*. 1997 Mar 1;158(5):2327-33.

Jones PA. DNA methylation errors and cancer. *Cancer Res*. 1996 Jun 1;56(11):2463-7.

Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet*. 1999 Feb;21(2):163-7.

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 Jun;19(2):187-91.

Juttermann R, Li E, Jaenisch R. Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Dec 6;91(25):11797-801.

Kachra Z, Beaulieu E, Delbecchi L, Mousseau N, Berthelet F, Moumdjian R, Del Maestro R, Beliveau R. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human brain tumors. *Clin Exp Metastasis*. 1999;17(7):555-66.

Kadri Z, Petitfrere E, Boudot C, Freyssinier JM, Fichelson S, Mayeux P, Emonard H, Hornebeck W, Haye B, Billat C. Erythropoietin induction of tissue inhibitors of metalloproteinase-1 expression and secretion is mediated by mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways. *Cell Growth Differ*. 2000 Nov;11(11):573-80.

Kahari VM, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumour growth and invasion. *Ann Med*. 1999 Feb;31(1):34-45.

Kanakaraj P, Raj S, Khan SA, Bishayee S. Ligand-induced interaction between alpha- and beta-type platelet-derived growth factor (PDGF) receptors: role of receptor heterodimers in kinase activation. *Biochemistry*. 1991 Feb 19;30(7):1761-7.

Kanai Y, Ushijima S, Kondo Y, Nakanishi Y, Hirohashi S. DNA methyltransferase expression and DNA methylation of CPG islands and peri-centromeric satellite regions in human colorectal and stomach cancers. *Int J Cancer*. 2001 Jan 15;91(2):205-12.

Kane MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H, Jessup JM, Kolodner R. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res*. 1997 Mar 1;57(5):808-11.

Kang GH, Shim YH, Jung HY, Kim WH, Ro JY, Rhyu MG. CpG island methylation in premalignant stages of gastric carcinoma. *Cancer Res.* 2001 Apr 1;61(7):2847-51.

Kapeller R, Prasad KV, Janssen O, Hou W, Schaffhausen BS, Rudd CE, Cantley LC. Identification of two SH3-binding motifs in the regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem.* 1994 Jan 21;269(3):1927-33.

Karin M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem.* 1995 Jul 14;270(28):16483-6.

Karnitz LM, Sutor SL, Abraham RT. The Src-family kinase, Fyn, regulates the activation of phosphatidylinositol 3-kinase in an interleukin 2-responsive T cell line. *J Exp Med.* 1994 Jun 1;179(6):1799-808.

Kasahara T, Mukaida N, Yamashita K, Yagisawa H, Akahoshi T, Matsushima K. IL-1 and TNF-alpha induction of IL-8 and monocyte chemotactic and activating factor (MCAF) mRNA expression in a human astrocytoma cell line. *Immunology.* 1991 Sep;74(1):60-7.

Kasahara T, Yagisawa H, Yamashita K, Yamaguchi Y, Akiyama Y. IL1 induces proliferation and IL6 mRNA expression in a human astrocytoma cell line: positive and negative modulation by chorela toxin and cAMP. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990 Mar 30;167(3):1242-8.

Kass SU, Landsberger N, Wolffe AP. DNA methylation directs a time-dependent repression of transcription initiation. *Curr Biol.* 1997 Mar 1;7(3):157-65.

Kauffmann-Zeh A, Rodriguez-Viciano P, Ulrich E, Gilbert C, Coffey P, Downward J, Evan G. Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB. *Nature.* 1997 Feb 6;385(6616):544-8.

Kawamata H, Kawai K, Kameyama S, Johnson MD, Stetler-Stevenson WG, Oyasu R. Over-expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMP1 and TIMP2) suppresses extravasation of pulmonary metastasis of a rat bladder carcinoma. *Int J Cancer*. 1995 Nov 27;63(5):680-7.

Kawashima A, Nakanishi I, Tsuchiya H, Roessner A, Obata K, Okada Y. Expression of matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/type IV collagenase) induced by tumour necrosis factor alpha correlates with metastatic ability in a human osteosarcoma cell line. *Virchows Arch*. 1994;424(5):547-52.

Kaya M, Yoshida K, Higashino F, Mitaka T, Ishii S, Fujinaga K. A single ets-related transcription factor, E1AF, confers invasive phenotype on human cancer cells. *Oncogene*. 1996 Jan 18;12(2):221-7.

Kaye AH, Morstyn G, Gardner I, Pyke K. Development of a xenograft glioma model in mouse brain. *Cancer Res*. 1986 Mar;46(3):1367-73.

Keranen LM, Dutil EM, Newton AC. Protein kinase C is regulated in vivo by three functionally distinct phosphorylations. *Curr Biol*. 1995 Dec 1;5(12):1394-1403.

Keranen LM, Newton AC. Ca<sup>2+</sup> differentially regulates conventional protein kinase Cs' membrane interaction and activation. *J Biol Chem*. 1997 Oct 10;272(41):25959-67.

Kerr LD, Miller DB, Matrisian LM. TGF-beta 1 inhibition of transin/stromelysin gene expression is mediated through a Fos binding sequence. *Cell*. 1990 Apr 20;61(2):267-78.

Khatib AM, Nip J, Fallavollita L, Lehmann M, Jensen G, Brodt P. Regulation of urokinase plasminogen activator/plasmin-mediated invasion of melanoma cells by the integrin vitronectin receptor alphaVbeta3. *Int J Cancer*. 2001 Feb 1;91(3):300-8.

Khokha R, Waterhouse P, Yagel S, Lala PK, Overall CM, Norton G, Denhardt DT. Antisense RNA-induced reduction in murine TIMP levels confers oncogenicity on Swiss 3T3 cells. *Science*. 1989 Feb 17;243(4893):947-50.

Khosravi-Far R, Campbell S, Rossman KL, Der CJ. Increasing complexity of Ras signal transduction: involvement of Rho family proteins. *Adv Cancer Res*. 1998;72:57-107.

Khwaja A, Rodriguez-Viciana P, Wennstrom S, Warne PH, Downward J. Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway. *EMBO J*. 1997 May 15;16(10):2783-93.

Kielbassa K, Muller HJ, Meyer HE, Marks F, Gschwendt M. Protein kinase C delta-specific phosphorylation of the elongation factor eEF-alpha and an eEF-1 alpha peptide at threonine 431. *J Biol Chem*. 1995 Mar 17;270(11):6156-62.

Kikkawa U, Takai Y, Minakuchi R, Inohara S, Nishizuka Y. Calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase from rat brain. Subcellular distribution, purification, and properties. *J Biol Chem*. 1982 Nov 25;257(22):13341-8.

Kiley SC, Jaken S, Whelan R, Parker PJ. Intracellular targeting of protein kinase C isoenzymes: functional implications. *Biochem Soc Trans*. 1995 Aug;23(3):601-5.

Kim D, Kim S, Koh H, Yoon SO, Chung AS, Cho KS, Chung J. Akt/PKB promotes cancer cell invasion via increased motility and metalloproteinase production. *FASEB J*. 2001 Sep;15(11):1953-62.

Kitson RP, Appasamy PM, Nannmark U, Albertsson P, Gabauer MK, Goldfarb RH. Matrix metalloproteinases produced by rat IL-2-activated NK cells. *J Immunol*. 1998 May 1;160(9):4248-53.

Klippel A, Kavanaugh WM, Pot D, Williams LT. A specific product of phosphatidylinositol 3-kinase directly activates the protein kinase Akt through its pleckstrin homology domain. *Mol Cell Biol.* 1997 Jan;17(1):338-44.

Knauper V, Lopez-Otin C, Smith B, Knight G, Murphy G. Biochemical characterization of human collagenase-3. *J Biol Chem.* 1996 Jan 19;271(3):1544-50.

Knauper V, Will H, Lopez-Otin C, Smith B, Atkinson SJ, Stanton H, Hembry RM, Murphy G. Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation. Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase a (MMP-2) are able to generate active enzyme. *J Biol Chem.* 1996 Jul 19;271(29):17124-31.

Kobayashi H, Suzuki M, Tanaka Y, Hirashima Y, Terao T. Suppression of urokinase expression and invasiveness by urinary trypsin inhibitor is mediated through inhibition of protein kinase C- and MEK/ERK/c-Jun-dependent signaling pathways. *J Biol Chem.* 2001 Jan 19;276(3):2015-22.

Kobayashi T, Kishimoto J, Ge Y, Jin W, Hudson DL, Ouahes N, Ehama R, Shinkai H, Burgeson RE. A novel mechanism of matrix metalloproteinase-9 gene expression implies a role for keratinization. *EMBO Rep.* 2001 Jul;2(7):604-8.

Kondraganti S, Mohanam S, Chintala SK, Kin Y, Jasti SL, Nirmala C, Lakka SS, Adachi Y, Kyritsis AP, Ali-Osman F, Sawaya R, Fuller GN, Rao JS. Selective suppression of matrix metalloproteinase-9 in human glioblastoma cells by antisense gene transfer impairs glioblastoma cell invasion. *Cancer Res.* 2000 Dec 15;60(24):6851-5.

Kopp R, Noelke B, Sauter G, Schildberg FW, Paumgartner G, Pfeiffer A. Altered protein kinase C activity in biopsies of human colonic adenomas and carcinomas. *Cancer Res.* 1991 Jan 1;51(1):205-10.

Kossakowska AE, Edwards DR, Prusinkiewicz 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 Sep 15;94(6):2080-9.

Kovacsovics TJ, Bachelot C, Toker A, Vlahos CJ, Duckworth B, Cantley LC, Hartwig JH. Phosphoinositide 3-kinase inhibition spares actin assembly in activating platelets but reverses platelet aggregation. *J Biol Chem*. 1995 May 12;270(19):11358-66.

Krane SM, Byrne MH, Lemaitre V, Henriot P, Jeffrey JJ, Witter JP, Liu X, Wu H, Jaenisch R, Eeckhout Y. Different collagenase gene products have different roles in degradation of type I collagen. *J Biol Chem*. 1996 Nov 8;271(45):28509-15.

Kronfeld I, Kazimirsky G, Lorenzo PS, Garfield SH, Blumberg PM, Brodie C. Phosphorylation of protein kinase Cdelta on distinct tyrosine residues regulates specific cellular functions. *J Biol Chem*. 2000 Nov 10;275(45):35491-8.

Kuida K, Lippke JA, Ku G, Harding MW, Livingston DJ, Su MS, Flavell RA. Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. *Science*. 1995 Mar 31;267(5206):2000-3.

Kulik G, Klippel A, Weber MJ. Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt. *Mol Cell Biol*. 1997 Mar;17(3):1595-606.

Kurt-Jones EA, Beller DI, Mizel SB, Unanue ER. Identification of a membrane-associated interleukin 1 in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985 Feb;82(4):1204-8.

La Porta CA, Comolli R. Overexpression of nPKCdelta in BL6 murine melanoma cells enhances TGFbeta1 release into the plasma of metastasized animals. *Melanoma Res.* 2000 Dec;10(6):527-34.

Lachman LB, Brown DC, Dinarello CA. Growth-promoting effect of recombinant interleukin 1 and tumor necrosis factor for a human astrocytoma cell line. *J Immunol.* 1987 May 1;138(9):2913-6.

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

Laird AD, Vajkoczy P, Shawver LK, Thurnher A, Liang C, Mohammadi M, Schlessinger J, Ullrich A, Hubbard SR, Blake RA, Fong TA, Strawn LM, Sun L, Tang C, Hawtin R, Tang F, Shenoy N, Hirth KP, McMahon G, Cherrington. SU6668 is a potent antiangiogenic and antitumor agent that induces regression of established tumors. *Cancer Res.* 2000 Aug 1;60(15):4152-60.

Lam K, Carpenter CL, Ruderman NB, Friel JC, Kelly KL. The phosphatidylinositol 3-kinase serine kinase phosphorylates IRS-1. Stimulation by insulin and inhibition by Wortmannin. *J Biol Chem.* 1994 Aug 12;269(32):20648-52.

Langton KP, McKie N, Curtis A, Goodship JA, Bond PM, Barker MD, Clarke M. A novel tissue inhibitor of metalloproteinases-3 mutation reveals a common molecular phenotype in Sorsby's fundus dystrophy. *J Biol Chem.* 2000 Sep 1;275(35):27027-31.

Last-Barney K, Homon CA, Faanes RB, Merluzzi VJ. Synergistic and overlapping activities of tumor necrosis factor-alpha and IL-1. *J Immunol.* 1988 Jul 15;141(2):527-30.

Leal F, Williams LT, Robbins KC, Aaronson SA. Evidence that the v-sis gene product transforms by interaction with the receptor for platelet-derived growth factor. *Science*. 1985 Oct 18;230(4723):327-30.

Lee JC, Simon PL, Young PR. Constitutive and PMA-induced interleukin-1 production by the human astrocytoma cell line T24. *Cell Immunol*. 1989 Feb;118(2):298-311.

Lee JK, Won JS, Choi MR, Kim YH, Suh HW. Differential effects of forskolin and phorbol 12-myristate-13-acetate on the c-fos and c-jun mRNA expression in rat C6 glioma cells. *Mol Cells*. 2001 Aug 31;12(1):11-6.

Leenstra S, Das PK, Troost D, de Boer OJ, Bosch DA. Human malignant astrocytes express macrophage phenotype. *J Neuroimmunol*. 1995 Jan;56(1):17-25.

Leevers SJ, Weinkove D, MacDougall LK, Hafen E, Waterfield MD. The Drosophila phosphoinositide 3-kinase Dp110 promotes cell growth. *EMBO J*. 1996 Dec 2;15(23):6584-94.

Le Good JA, Ziegler WH, Parekh DB, Alessi DR, Cohen P, Parker PJ. Protein kinase C isoforms controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science*. 1998 Sep 25;281(5385):2042-5.

Leitges M, Sanz L, Martin P, Duran A, Braun U, Garcia JF, Camacho F, Diaz-Meco MT, Rennert PD, Moscat J. Targeted disruption of the zetaPKC gene results in the impairment of the NF-kappaB pathway. *Mol Cell*. 2001 Oct;8(4):771-80.

Leonhardt H, Bestor TH. Structure, function and regulation of mammalian DNA methyltransferase. *EXS*. 1993;64:109-19.

Leonhardt H, Page AW, Weier HU, Bestor TH. A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell*. 1992 Nov 27;71(5):865-73.

Li E, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*. 1992 Jun 12;69(6):915-26.

Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliareis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*. 1997 Mar 28;275(5308):1943-7.

Li P, Allen H, Banerjee S, Franklin S, Herzog L, Johnston C, McDowell J, Paskind M, Rodman L, Salfeld J, et al. Mice deficient in IL-1 beta-converting enzyme are defective in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxic shock. *Cell*. 1995 Feb 10;80(3):401-11.

Li W, Chen XH, Kelley CA, Alimandi M, Zhang J, Chen Q, Bottaro DP, Pierce JH. Identification of tyrosine 187 as a protein kinase C-delta phosphorylation site. *J Biol Chem*. 1996 Oct 18;271(42):26404-9.

Li W, Mischak H, Yu JC, Wang LM, Mushinski JF, Heidarani MA, Pierce JH. Tyrosine phosphorylation of protein kinase C-delta in response to its activation. *J Biol Chem*. 1994 Jan 28;269(4):2349-52.

Liebermann TA, Nusbaum HR, Razon N, Kris R, Lax I, Soreq H, Whittle N, Waterfield MD, Ullrich A, Schlessinger J. Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumours of glial origin. *Nature*. 1985 Jan 10-18;313(5998):144-7.

Lichter T, Dohrmann GJ, Gurney ME. Cytokine gene expression by human gliomas. *Neurosurgery*. 1990 May;26(5):788-92.

Limatola C, Barabino B, Nista A, Santoni A. Interleukin 1-beta-induced protein kinase C-zeta activation is mimicked by exogenous phospholipase D. *Biochem J*. 1997 Jan 15;321 ( Pt 2):497-501.

Ling LE, Druker BJ, Cantley LC, Roberts TM. Transformation-defective mutants of polyomavirus middle T antigen associate with phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase) but are unable to maintain wild-type levels of PI 3-kinase products in intact cells. *J Virol*. 1992 Mar;66(3):1702-8.

Liotta LA, Abe S, Robey PG, Martin GR. Preferential digestion of basement membrane collagen by an enzyme derived from a metastatic murine tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979 May;76(5):2268-72.

Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell*. 1991 Jan 25;64(2):327-36.

Liu X, Marengere LE, Koch CA, Pawson T. The v-Src SH3 domain binds phosphatidylinositol 3'-kinase. *Mol Cell Biol*. 1993 Sep;13(9):5225-32.

Liu Z, Shipley JM, Vu TH, Zhou X, Diaz LA, Werb Z, Senior RM. Gelatinase B-deficient mice are resistant to experimental bullous pemphigoid. *J Exp Med*. 1998 Aug 3;188(3):475-82.

Llano E, Pendas AM, Knauper V, Sorsa T, Salo T, Salido E, Murphy G, Simmer JP, Bartlett JD, Lopez-Otin C. Identification and structural and functional characterization of human enamelysin (MMP-20). *Biochemistry*. 1997 Dec 9;36(49):15101-8.

Lombardi A, Pignone A, Perfetto F, Tarquini R, Partsch G, Matucci-Cerinic M. [The enzymatic mechanisms involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and arthrosis. The role of metalloproteases and serine proteases in the breakdown of articular cartilage]. *Recenti Prog Med.* 1993 Sep;84(9):634-41.

Lopez-Casillas F, Wrana JL, Massague J. Betaglycan presents ligand to the TGF beta signaling receptor. *Cell.* 1993 Jul 2;73(7):1435-44.

Lopez-Illasaca M, Crespo P, Pellici PG, Gutkind JS, Wetzker R. Linkage of G protein-coupled receptors to the MAPK signaling pathway through PI 3-kinase gamma. *Science.* 1997 Jan 17;275(5298):394-7.

Louis DN, Gusella JF. A tiger behind many doors: multiple genetic pathways to malignant glioma. *Trends Genet.* 1995 Oct;11(10):412-5.

Lyons JG, Birkedal-Hansen B, Pierson MC, Whitelock JM, Birkedal-Hansen H. Interleukin-1 beta and transforming growth factor-alpha/epidermal growth factor induce expression of M(r) 95,000 type IV collagenase/gelatinase and interstitial fibroblast-type collagenase by rat mucosal keratinocytes. *J Biol Chem.* 1993 Sep 5;268(25):19143-51.

MacDougall LK, Domin J, Waterfield MD. A family of phosphoinositide 3-kinases in *Drosophila* identifies a new mediator of signal transduction. *Curr Biol.* 1995 Dec 1;5(12):1404-15.

Madlener M, Werner S. cDNA cloning and expression of the gene encoding murine stromelysin-2 (MMP-10). *Gene.* 1997 Nov 20;202(1-2):75-81.

Manes S, Llorente M, Lacalle RA, Gomez-Mouton C, Kremer L, Mira E, Martinez-A C. The matrix metalloproteinase-9 regulates the insulin-like growth factor-triggered autocrine response in DU-145 carcinoma cells. *J Biol Chem.* 1999 Mar 12;274(11):6935-45.

Manes S, Mira E, Barbacid MM, Cipres A, Fernandez-Resa P, Buesa JM, Merida I, Aracil M, Marquez G, Martinez-A C. Identification of insulin-like growth factor-binding protein-1 as a potential physiological substrate for human stromelysin-3. *J Biol Chem.* 1997 Oct 10;272(41):25706-12.

Marchenko GN, Ratnikov BI, Rozanov DV, Godzik A, Deryugina EI, Strongin AY. Characterization of matrix metalloproteinase-26, a novel metalloproteinase widely expressed in cancer cells of epithelial origin. *Biochem J.* 2001 Jun 15;356(Pt 3):705-18.

Marchenko GN, Strongin AY. MMP-28, a new human matrix metalloproteinase with an unusual cysteine-switch sequence is widely expressed in tumors. *Gene.* 2001 Mar 7;265(1-2):87-93.

Martin DC, Fowlkes JL, Babic B, Khokha R. Insulin-like growth factor II signaling in neoplastic proliferation is blocked by transgenic expression of the metalloproteinase inhibitor TIMP-1. *J Cell Biol.* 1999 Aug 23;146(4):881-92.

Matsui T, Heidaran M, Miki T, Popescu N, La Rochelle W, Kraus M, Pierce J, Aaronson S. Isolation of a novel receptor cDNA establishes the existence of two PDGF receptor genes. *Science.* 1989 Feb 10;243(4892):800-4.

McGuire TF, Qian Y, Vogt A, Hamilton AD, Sebt SM. Platelet-derived growth factor receptor tyrosine phosphorylation requires protein geranylgeranylation but not farnesylation. *J Biol Chem.* 1996 Nov 1;271(44):27402-7.

Mercer WE, Shields MT, Amin M, Sauve GJ, Appella E, Romano JW, Ullrich SJ. Negative growth regulation in a glioblastoma tumor cell line that conditionally expresses human wild-type p53. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Aug;87(16):6166-70.

Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, Baylin SB, Sidransky D. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med.* 1995 Jul;1(7):686-92.

Merlo A, Juretic A, Zuber M, Filgueira L, Luscher U, Caetano V, Ulrich J, Gratzl O, Heberer M, Spagnoli GC. Cytokine gene expression in primary brain tumours, metastases and meningiomas suggests specific transcription patterns. *Eur J Cancer.* 1993;29A(15):2118-25.

Mertz PM, DeWitt DL, Stetler-Stevenson WG, Wahl LM. Interleukin 10 suppression of monocyte prostaglandin H synthase-2. Mechanism of inhibition of prostaglandin-dependent matrix metalloproteinase production. *J Biol Chem.* 1994 Aug 19;269(33):21322-9.

Merwin JR, Anderson JM, Kocher O, Van Itallie CM, Madri JA. Transforming growth factor beta 1 modulates extracellular matrix organization and cell-cell junctional complex formation during in vitro angiogenesis. *J Cell Physiol.* 1990 Jan;142(1):117-28.

Meyers R, Cantley LC. Cloning and characterization of a wortmannin-sensitive human phosphatidylinositol 4-kinase. *J Biol Chem.* 1997 Feb 14;272(7):4384-90.

Minden A, Lin A, Claret FX, Abo A, Karin M. Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell.* 1995 Jun 30;81(7):1147-57.

Mira E, Manes S, Lacalle RA, Marquez G, Martinez-A C. Insulin-like growth factor I-triggered cell migration and invasion are mediated by matrix metalloproteinase-9. *Endocrinology.* 1999 Apr;140(4):1657-64.

Mischak H, Goodnight JA, Kolch W, Martiny-Baron G, Schaehtle C, Kazanietz MG, Blumberg PM, Pierce JH, Mushinski JF. Overexpression of protein kinase C-delta and -

epsilon in NIH 3T3 cells induces opposite effects on growth, morphology, anchorage dependence, and tumorigenicity. *J Biol Chem.* 1993 Mar 25;268(9):6090-6.

Misra-Press A, Fields AP, Samols D, Goldthwait DA. Protein kinase C isoforms in human glioblastoma cells. *Glia.* 1992;6(3):188-97.

Misse D, Esteve PO, 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 Aug 1;98(3):541-7.

Mitsiades N, Yu WH, Poulaki V, Tsokos M, Stamenkovic I. Related Matrix metalloproteinase-7-mediated cleavage of Fas ligand protects tumor cells from chemotherapeutic drug cytotoxicity. *Cancer Res.* 2001 Jan 15;61(2):577-81.

Mochly-Rosen D, Khaner H, Lopez J, Smith BL. Intracellular receptors for activated protein kinase C. Identification of a binding site for the enzyme. *J Biol Chem.* 1991 Aug 15;266(23):14866-8.

Mochly-Rosen D, Khaner H, Lopez J. Identification of intracellular receptor proteins for activated protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 May 1;88(9):3997-4000.

Mohanam S, Wang SW, Rayford A, Yamamoto M, Sawaya R, Nakajima M, Liotta LA, Nicolson GL, Stetler-Stevenson WG, Rao JS. Expression of tissue inhibitors of metalloproteinases: negative regulators of human glioblastoma invasion in vivo. *Clin Exp Metastasis.* 1995 Jan;13(1):57-62.

Molz L, Chen YW, Hirano M, Williams LT. Cpk is a novel class of *Drosophila* PtdIns 3-kinase containing a C2 domain. *J Biol Chem.* 1996 Jun 7;271(23):13892-9.

Morris JZ, Tissenbaum HA, Ruvkun G. A phosphatidylinositol-3-OH kinase family member regulating longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1996 Aug 8;382(6591):536-9.

Muller G, Ayoub M, Storz P, Rennecke J, Fabbro D, Pfizenmaier K. PKC zeta is a molecular switch in signal transduction of TNF-alpha, bifunctionally regulated by ceramide and arachidonic acid. *EMBO J*. 1995 May 1;14(9):1961-9.

Munaut C, Salonurmi T, Kontusaari S, Reponen P, Morita T, Foidart JM, Tryggvason K. Murine matrix metalloproteinase 9 gene. 5'-upstream region contains cis-acting elements for expression in osteoclasts and migrating keratinocytes in transgenic mice. *J Biol Chem*. 1999 Feb 26;274(9):5588-96.

Municio MM, Lozano J, Sanchez P, Moscat J, Diaz-Meco MT. Identification of heterogeneous ribonucleoprotein A1 as a novel substrate for protein kinase C zeta. *J Biol Chem*. 1995 Jun 30;270(26):15884-91.

Murphy AN, Unsworth EJ, Stetler-Stevenson WG. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 inhibits bFGF-induced human microvascular endothelial cell proliferation. *J Cell Physiol*. 1993 Nov;157(2):351-8.

Murphy G, Reynolds JJ, Bretz U, Baggiolini M. Collagenase is a component of the specific granules of human neutrophil leucocytes. *Biochem J*. 1977 Jan 15;162(1):195-7.

Murphy G, Stanton H, Cowell S, Butler G, Knauper V, Atkinson S, Gavrilovic J. Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation. *APMIS*. 1999 Jan;107(1):38-44.

Murray NR, Fields AP. Phosphatidylglycerol is a physiologic activator of nuclear protein kinase C. *J Biol Chem*. 1998 May 8;273(19):11514-20.

Murray-Rust J, McDonald NQ, Blundell TL, Hosang M, Oefner C, Winkler F, Bradshaw RA. Topological similarities in TGF-beta 2, PDGF-BB and NGF define a superfamily of polypeptide growth factors. *Structure*. 1993 Oct 15;1(2):153-9.

Musacchio A, Cantley LC, Harrison SC. Crystal structure of the breakpoint cluster region-homology domain from phosphoinositide 3-kinase p85 alpha subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Dec 10;93(25):14373-8.

Nagai Y, Lapiere CM, Gross J. Tadpole collagenase. Preparation and purification. *Biochemistry*. 1966 Oct;5(10):3123-30

Nagase H, Ogata Y, Suzuki K, Enghild JJ, Salvesen G. Substrate specificities and activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biochem Soc Trans*. 1991 Aug;19(3):715-8.

Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*. 1999 Jul 30;274(31):21491-4.

Nakada M, Nakamura H, Ikeda E, Fujimoto N, Yamashita J, Sato H, Seiki M, Okada Y. Expression and tissue localization of membrane-type 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases in human astrocytic tumors. *Am J Pathol*. 1999 Feb;154(2):417-28.

Nakagawa T, Kubota T, Kabuto M, Sato K, Kawano H, Hayakawa T, Okada Y. Production of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 by human brain tumors. *J Neurosurg*. 1994 Jul;81(1):69-77.

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 May 28;393(6683):386-9.

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

Newton AC. Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J Biol Chem.* 1995 Dec 1;270(48):28495-8.

Niedel JE, Kuhn LJ, Vandenberg GR. Phorbol diester receptor copurifies with protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983 Jan;80(1):36-40.

Nishikawa K, Toker A, Johannes FJ, Songyang Z, Cantley LC. Determination of the specific substrate sequence motifs of protein kinase C isozymes. *J Biol Chem.* 1997 Jan 10;272(2):952-60.

Nishizuka Y. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature.* 1988 Aug 25;334(6184):661-5.

Nishizuka Y. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature.* 1984 Apr 19-25;308(5961):693-8.

Nitta T, Ebato M, Sato K, Okumura K. Expression of tumour necrosis factor-alpha, -beta and interferon-gamma genes within human neuroglial tumour cells and brain specimens. *Cytokine.* 1994 Mar;6(2):171-80.

Nophar Y, Kemper O, Brakebusch C, Englemann H, Zwang R, Aderka D, Holtmann H, Wallach D. Soluble forms of tumor necrosis factor receptors (TNF-Rs). The cDNA for the type I TNF-R, cloned using amino acid sequence data of its soluble form, encodes both the cell surface and a soluble form of the receptor. *EMBO J.* 1990 Oct;9(10):3269-78.

O'Brian C, Vogel VG, Singletary SE, Ward NE. Elevated protein kinase C expression in human breast tumor biopsies relative to normal breast tissue. *Cancer Res.* 1989 Jun 15;49(12):3215-7.

Oelmann E, Kraemer A, Serve H, Reufi B, Oberberg D, Patt S, Herbst H, Stein H, Thiel E, Berdel WE. Autocrine interleukin-1 receptor antagonist can support malignant growth of glioblastoma by blocking growth-inhibiting autocrine loop of interleukin-1. *Int J Cancer.* 1997 Jun 11;71(6):1066-76.

O'Farrell TJ, Pourmotabbed T. Identification of structural elements important for matrix metalloproteinase type V collagenolytic activity as revealed by chimeric enzymes. Role of fibronectin-like domain and active site of gelatinase B. *J Biol Chem.* 2000 Sep 8;275(36):27964-72.

Ogata Y, Enghild JJ, Nagase H. Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) activates the precursor for the human matrix metalloproteinase 9. *J Biol Chem.* 1992 Feb 25;267(6):3581-4.

Okada T, Hazeki O, Ui M, Katada T. Synergistic activation of PtdIns 3-kinase by tyrosine-phosphorylated peptide and beta gamma-subunits of GTP-binding proteins. *Biochem J.* 1996 Jul 15;317 ( Pt 2):475-80.

Okano M, Xie S, Li E. Dnmt2 is not required for de novo and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res.* 1998a Jun 1;26(11):2536-40.

Okano M, Xie S, Li E. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet.* 1998b Jul;19(3):219-20.

Ono Y, Fujii T, Igarashi K, Kuno T, Tanaka C, Kikkawa U, Nishizuka Y. Phorbol ester binding to protein kinase C requires a cysteine-rich zinc-finger-like sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Jul;86(13):4868-71.

Opdenakker G, Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Van Coillie E, Masure S, Proost P, Van Damme J. Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *J Leukoc Biol.* 2001 Jun;69(6):851-9.

Orr JW, Keranen LM, Newton AC. Reversible exposure of the pseudosubstrate domain of protein kinase C by phosphatidylserine and diacylglycerol. *J Biol Chem.* 1992 Aug 5;267(22):15263-6.

Orr JW, Newton AC. Interaction of protein kinase C with phosphatidylserine. 1. Cooperativity in lipid binding. *Biochemistry.* 1992 May 19;31(19):4661-7. Orr JW, Newton AC. Interaction of protein kinase C with phosphatidylserine. 2. Specificity and regulation. *Biochemistry.* 1992 May 19;31(19):4667-73.

Ostman A, Andersson M, Hellman U, Heldin CH. Identification of three amino acids in the platelet-derived growth factor (PDGF) B-chain that are important for binding to the PDGF beta-receptor. *J Biol Chem.* 1991 Jun 5;266(16):10073-7.

Otsu M, Hiles I, Gout I, Fry MJ, Ruiz-Larrea F, Panayotou G, Thompson A, Dhand R, Hsuan J, Totty N, et al. Characterization of two 85 kd proteins that associate with receptor tyrosine kinases, middle-T/pp60c-src complexes, and PI3-kinase. *Cell.* 1991 Apr 5;65(1):91-104.

Overall CM, Sodek J. Initial characterization of a neutral metalloproteinase, active on native 3/4-collagen fragments, synthesized by ROS 17/2.8 osteoblastic cells, periodontal fibroblasts, and identified in gingival crevicular fluid. *J Dent Res.* 1987 Jul;66(7):1271-82.

Paganetti PA, Caroni P, Schwab ME. Glioblastoma infiltration into central nervous system tissue in vitro: involvement of a metalloprotease. *J Cell Biol.* 1988 Dec;107(6 Pt 1):2281-91.

Pahan K, Liu X, McKinney MJ, Wood C, Sheikh FG, Raymond JR. Expression of a dominant-negative mutant of p21(ras) inhibits induction of nitric oxide synthase and activation of nuclear factor-kappaB in primary astrocytes. *J Neurochem.* 2000 Jun;74(6):2288-95.

Pahan K, Raymond JR, Singh I. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase induces nitric-oxide synthase in lipopolysaccharide- or cytokine-stimulated C6 glial cells. *J Biol Chem.* 1999 Mar 12;274(11):7528-36.

Pahan K, Sheikh FG, Khan M, Namboodiri AM, Singh I. Sphingomyelinase and ceramide stimulate the expression of inducible nitric-oxide synthase in rat primary astrocytes. *J Biol Chem.* 1998 Jan 30;273(5):2591-600.

Panaretou C, Domin J, Cockcroft S, Waterfield MD. Characterization of p150, an adaptor protein for the human phosphatidylinositol (PtdIns) 3-kinase. Substrate presentation by phosphatidylinositol transfer protein to the p150.Ptdins 3-kinase complex. *J Biol Chem.* 1997 Jan 24;272(4):2477-85.

Park MJ, Park IC, Hur JH, Rhee CH, Choe TB, Yi DH, Hong SI, Lee SH. Protein kinase C activation by phorbol ester increases in vitro invasion through regulation of matrix metalloproteinases/tissue inhibitors of metalloproteinases system in D54 human glioblastoma cells. *Neurosci Lett.* 2000 Sep 1;290(3):201-4.

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 Nov 14;272(46):28823-5.

Pavloff N, Staskus PW, Kishnani NS, Hawkes SP. A new inhibitor of metalloproteinases from chicken: ChIMP-3. A third member of the TIMP family. *J Biol Chem.* 1992 Aug 25;267(24):17321-6.

Pazin MJ, Kadonaga JT. What's up and down with histone deacetylation and transcription? *Cell*. 1997 May 2;89(3):325-8.

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 Oct 27;275(43):33988-97.

Pei D, Weiss SJ. Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature*. 1995 May 18;375(6528):244-7.

Pei D. Identification and characterization of the fifth membrane-type matrix metalloproteinase MT5-MMP. *J Biol Chem*. 1999 Mar 26;274(13):8925-32.

Persons DA, Wilkison WO, Bell RM, Finn OJ. Altered growth regulation and enhanced tumorigenicity of NIH 3T3 fibroblasts transfected with protein kinase C-I cDNA. *Cell*. 1988 Feb 12;52(3):447-58.

Plate KH, Breier G, Risau W. Molecular mechanisms of developmental and tumor angiogenesis. *Brain Pathol*. 1994 Jul;4(3):207-18.

Plate KH, Breier G, Weich HA, Risau W. Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature*. 1992 Oct 29;359(6398):845-8.

Pleiman CM, Hertz WM, Cambier JC. Activation of phosphatidylinositol-3' kinase by Src-family kinase SH3 binding to the p85 subunit. *Science*. 1994 Mar 18;263(5153):1609-12.

Pons S, Asano T, Glasheen E, Miralpeix M, Zhang Y, Fisher TL, Myers MG Jr, Sun XJ, White MF. The structure and function of p55PIK reveal a new regulatory subunit for phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Cell Biol.* 1995 Aug;15(8):4453-65.

Poole AR, Tiltman KJ, Recklies AD, Stoker TA. Differences in secretion of the proteinase cathepsin B at the edges of human breast carcinomas and fibroadenomas. *Nature.* 1978 Jun 15;273(5663):545-7.

Posfai J, Bhagwat AS, Posfai G, Roberts RJ. Predictive motifs derived from cytosine methyltransferases. *Nucleic Acids Res.* 1989 Apr 11;17(7):2421-35.

Powell WC, Fingleton B, Wilson CL, Boothby M, Matrisian LM. The metalloproteinase matrilysin proteolytically generates active soluble Fas ligand and potentiates epithelial cell apoptosis. *Curr Biol.* 1999 Dec 16-30;9(24):1441-7.

Pradhan S, Talbot D, Sha M, Benner J, Hornstra L, Li E, Jaenisch R, Roberts RJ. Baculovirus-mediated expression and characterization of the full-length murine DNA methyltransferase. *Nucleic Acids Res.* 1997 Nov 15;25(22):4666-73.

Prasad KV, Janssen O, Kapeller R, Raab M, Cantley LC, Rudd CE. Src-homology 3 domain of protein kinase p59fyn mediates binding to phosphatidylinositol 3-kinase in T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Aug 1;90(15):7366-70.

Press RD, Misra A, Gillaspay G, Samols D, Goldthwait DA. Control of the expression of c-sis mRNA in human glioblastoma cells by phorbol ester and transforming growth factor beta 1. *Cancer Res.* 1989 Jun 1;49(11):2914-20.

Proost P, Van Damme J, Opdenakker G. Leukocyte gelatinase B cleavage releases encephalitogens from human myelin basic protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993 May 14;192(3):1175-81.

Puls A, Schmidt S, Grawe F, Stabel S. Interaction of protein kinase C zeta with ZIP, a novel protein kinase C-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Jun 10;94(12):6191-6.

Raithatha SA, Muzik H, Muzik H, Rewcastle NB, Johnston RN, Edwards DR, Forsyth PA. Localization of gelatinase-A and gelatinase-B mRNA and protein in human gliomas. *Neuro-oncol*. 2000 Jul;2(3):145-50.

Rameh LE, Chen CS, Cantley LC. Phosphatidylinositol (3,4,5)P3 interacts with SH2 domains and modulates PI 3-kinase association with tyrosine-phosphorylated proteins. *Cell*. 1995 Dec 1;83(5):821-30.

Rameh LE, Tolias KF, Duckworth BC, Cantley LC. A new pathway for synthesis of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature*. 1997 Nov 13;390(6656):192-6.

Rao JS, Steck PA, Mohanam S, Stetler-Stevenson WG, Liotta LA, Sawaya R. Elevated levels of M(r) 92,000 type IV collagenase in human brain tumors. *Cancer Res*. 1993 May 15;53(10 Suppl):2208-11.

Rao JS, Yamamoto M, Mohaman S, Gokaslan ZL, Fuller GN, Stetler-Stevenson WG, Rao VH, Liotta LA, Nicolson GL, Sawaya RE. Expression and localization of 92 kDa type IV collagenase/gelatinase B (MMP-9) in human gliomas. *Clin Exp Metastasis*. 1996 Jan;14(1):12-8.

Reddy KB, Krueger JS, Kondapaka SB, Diglio CA. Mitogen-activated protein kinase (MAPK) regulates the expression of progelatinase B (MMP-9) in breast epithelial cells. *Int J Cancer*. 1999 Jul 19;82(2):268-73.

Reif K, Gout I, Waterfield MD, Cantrell DA. Divergent regulation of phosphatidylinositol 3-kinase P85 alpha and P85 beta isoforms upon T cell activation. *J Biol Chem*. 1993 May 25;268(15):10780-8.

Reifenberger G, Reifenberger J, Ichimura K, Meltzer PS, Collins VP. Amplification of multiple genes from chromosomal region 12q13-14 in human malignant gliomas: preliminary mapping of the amplicons shows preferential involvement of CDK4, SAS, and MDM2. *Cancer Res.* 1994 Aug 15;54(16):4299-303.

Reponen P, Sahlberg C, Munaut C, Thesleff I, Tryggvason K. High expression of 92-kD type IV collagenase (gelatinase B) in the osteoclast lineage during mouse development. *J Cell Biol.* 1994 Mar;124(6):1091-1102.

Rhee I, Bachman KE, Park BH, Jair KW, Yen RW, Schuebel KE, Cui H, Feinberg AP, Lengauer C, Kinzler KW, Baylin SB, Vogelstein B. DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature.* 2002 Apr 4;416(6880):552-6.

Rittenhouse SE. Phosphoinositide 3-kinase activation and platelet function. *Blood.* 1996 Dec 15;88(12):4401-14.

Rittinger K, Walker PA, Eccleston JF, Nurmahomed K, Owen D, Laue E, Gamblin SJ, Smerdon SJ. Crystal structure of a small G protein in complex with the GTPase-activating protein rhoGAP. *Nature.* 1997 Aug 14;388(6643):693-7.

Robbins DS, Shirazi Y, Drysdale BE, Lieberman A, Shin HS, Shin ML. Production of cytotoxic factor for oligodendrocytes by stimulated astrocytes. *J Immunol.* 1987 Oct 15;139(8):2593-7.

Robbins KC, Antoniades HN, Devare SG, Hunkapiller MW, Aaronson SA. Structural and immunological similarities between simian sarcoma virus gene product(s) and human platelet-derived growth factor. *Nature.* 1983 Oct 13-19;305(5935):605-8.

Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, Heine UI, Liotta LA, Falanga V, Kehrl JH. Transforming growth factor type beta: rapid induction of

fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Jun;83(12):4167-71.

Robertson KD, Ait-Si-Ali S, Yokochi T, Wade PA, Jones PL, Wolffe AP. DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nat Genet*. 2000 Jul;25(3):338-42.

Rodgers WH, Osteen KG, Matrisian LM, Navre M, Giudice LC, Gorstein F. Expression and localization of matrilysin, a matrix metalloproteinase, in human endometrium during the reproductive cycle. *Am J Obstet Gynecol*. 1993 Jan;168(1 Pt 1):253-60.

Rodriguez-Viciano P, Warne PH, Dhand R, Vanhaesebroeck B, Gout I, Fry MJ, Waterfield MD, Downward J. Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature*. 1994 Aug 18;370(6490):527-32.

Rodriguez-Viciano 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 May 2;89(3):457-67.

Rodriguez-Viciano P, Warne PH, Vanhaesebroeck B, Waterfield MD, Downward J. Activation of phosphoinositide 3-kinase by interaction with Ras and by point mutation. *EMBO J*. 1996 May 15;15(10):2442-51.

Romanelli A, Martin KA, Toker A, Blenis J. p70 S6 kinase is regulated by protein kinase Czeta and participates in a phosphoinositide 3-kinase-regulated signalling complex. *Mol Cell Biol*. 1999 Apr;19(4):2921-8.

Rosenberg GA, Estrada EY, Dencoff JE, Stetler-Stevenson WG. Tumor necrosis factor-alpha-induced gelatinase B causes delayed opening of the blood-brain barrier: an expanded therapeutic window. *Brain Res*. 1995 Dec 12;703(1-2):151-5.

Roszman T, Elliott L, Brooks W. Modulation of T-cell function by gliomas. *Immunol Today*. 1991 Oct;12(10):370-4.

Rountree MR, Bachman KE, Baylin SB. DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat Genet*. 2000 Jul;25(3):269-77.

Rubio I, Rodriguez-Viciana P, Downward J, Wetzker R. Interaction of Ras with phosphoinositide 3-kinase gamma. *Biochem J*. 1997 Sep 15;326 ( Pt 3):891-5.

Rutka JT, Giblin JR, Berens ME, Bar-Shiva E, Tokuda K, McCulloch JR, Rosenblum ML, Eessalu TE, Aggarwal BB, Bodell WJ. The effects of human recombinant tumor necrosis factor on glioma-derived cell lines: cellular proliferation, cytotoxicity, morphological and radioreceptor studies. *Int J Cancer*. 1988 Apr 15;41(4):573-82.

Ryken TC, Traynelis VC, Lim R. Interaction of acidic fibroblast growth factor and transforming growth factor-beta in normal and transformed glia in vitro. *J Neurosurg*. 1992 May;76(5):850-5.

Sanchez-Lopez R, Nicholson R, Gesnel MC, Matrisian LM, Breathnach R. Structure-function relationships in the collagenase family member transin. *J Biol Chem*. 1988 Aug 25;263(24):11892-9.

San-Galli F, Vrignaud P, Robert J, Coindre JM, Cohadon F. Assessment of the experimental model of transplanted C6 glioblastoma in Wistar rats. *J Neurooncol*. 1989 Sep;7(3):299-304.

Saren P, Welgus HG, Kovanen PT. TNF-alpha and IL-1beta selectively induce expression of 92-kDa gelatinase by human macrophages. *J Immunol*. 1996 Nov 1;157(9):4159-65.

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 Nov 5;268(31):23460-8.

Sato H, Okada Y, Seiki M. Membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs) in cell invasion. *Thromb Haemost.* 1997 Jul;78(1):497-500.

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

Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, Seiki M. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature.* 1994 Jul 7;370(6484):61-5.

Schneider J, Hofman FM, Apuzzo ML, Hinton DR. Cytokines and immunoregulatory molecules in malignant glial neoplasms. *J Neurosurg.* 1992 Aug;77(2):265-73.

Schonbeck U, Mach F, Libby P. Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing. *J Immunol.* 1998 Oct 1;161(7):3340-6.

Schorpp-Kistner M, Wang ZQ, Angel P, Wagner EF. JunB is essential for mammalian placentation. *EMBO J.* 1999 Feb 15;18(4):934-48.

Schu PV, Takegawa K, Fry MJ, Stack JH, Waterfield MD, Emr SD. Phosphatidylinositol 3-kinase encoded by yeast VPS34 gene essential for protein sorting. *Science.* 1993 Apr 2;260(5104):88-91.

Schultz-Cherry S, Murphy-Ullrich JE. Thrombospondin causes activation of latent transforming growth factor-beta secreted by endothelial cells by a novel mechanism. *J Cell Biol.* 1993 Aug;122(4):923-32.

Schutze S, Wiegmann K, Machleidt T, Kronke M. TNF-induced activation of NF-kappa B. *Immunobiology.* 1995 Jul;193(2-4):193-203.

Segain JP, Harb J, Gregoire M, Meflah K, Menanteau J. Induction of fibroblast gelatinase B expression by direct contact with cell lines derived from primary tumor but not from metastases. *Cancer Res.* 1996 Dec 1;56(23):5506-12.

Sehgal I, Baley PA, Thompson TC. Transforming growth factor beta1 stimulates contrasting responses in metastatic versus primary mouse prostate cancer-derived cell lines in vitro. *Cancer Res.* 1996 Jul 15;56(14):3359-65.

Sehgal I, Thompson TC. Novel regulation of type IV collagenase (matrix metalloproteinase-9 and -2) activities by transforming growth factor-beta1 in human prostate cancer cell lines. *Mol Biol Cell.* 1999 Feb;10(2):407-16.

Seifert RA, Hart CE, Phillips PE, Forstrom JW, Ross R, Murray MJ, Bowen-Pope DF. Two different subunits associate to create isoform-specific platelet-derived growth factor receptors. *J Biol Chem.* 1989 May 25;264(15):8771-8.

Seiki M. Membrane-type matrix metalloproteinases. *APMIS.* 1999 Jan;107(1):137-43.

Selmaj KW, Farooq M, Norton WT, Raine CS, Brosnan CF. Proliferation of astrocytes in vitro in response to cytokines. A primary role for tumor necrosis factor. *J Immunol.* 1990 Jan 1;144(1):129-35.

Selmaj KW, Raine CS. Tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocyte damage in vitro. *Ann Neurol.* 1988 Apr;23(4):339-46.

Shamah SM, Stiles CD, Guha A. Dominant-negative mutants of platelet-derived growth factor revert the transformed phenotype of human astrocytoma cells. *Mol Cell Biol.* 1993 Dec;13(12):7203-12.

Sheetz MP, Felsenfeld DP, Galbraith CG. Cell migration: regulation of force on extracellular-matrix-integrin complexes. *Trends Cell Biol.* 1998 Feb;8(2):51-4.

Shemer J, Raizada MK, Masters BA, Ota A, LeRoith D. Insulin-like growth factor I receptors in neuronal and glial cells. Characterization and biological effects in primary culture. *J Biol Chem.* 1987 Jun 5;262(16):7693-9.

Shepherd PR, Nave BT, Rincon J, Nolte LA, Bevan AP, Siddle K, Zierath JR, Wallberg-Henriksson H. Differential regulation of phosphoinositide 3-kinase adapter subunit variants by insulin in human skeletal muscle. *J Biol Chem.* 1997 Jul 25;272(30):19000-7.

Sheu BC, Hsu SM, Ho HN, Lien HC, Huang SC, Lin RH. A novel role of metalloproteinase in cancer-mediated immunosuppression. *Cancer Res.* 2001 Jan 1;61(1):237-42.

Shimajiri S, Arima N, Tanimoto A, Murata Y, Hamada T, Wang KY, Sasaguri Y. Shortened microsatellite d(CA)<sub>21</sub> sequence down-regulates promoter activity of matrix metalloproteinase 9 gene. *FEBS Lett.* 1999 Jul 16;455(1-2):70-4.

Shiple J, Wesselschmidt RL, Kobayashi DK, Ley TJ, Shapiro SD. Metalloelastase is required for macrophage-mediated proteolysis and matrix invasion in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Apr 30;93(9):3942-6.

Sicheri F, Moarefi I, Kuriyan J. Crystal structure of the Src family tyrosine kinase Hck. *Nature.* 1997 Feb 13;385(6617):602-9.

Sidransky D, Mikkelsen T, Schwechheimer K, Rosenblum ML, Cavanaugh W, Vogelstein B. Clonal expansion of p53 mutant cells is associated with brain tumour progression. *Nature*. 1992 Feb 27;355(6363):846-7.

Siegbahn A, Hammacher A, Westermark B, Heldin CH. Differential effects of the various isoforms of platelet-derived growth factor on chemotaxis of fibroblasts, monocytes, and granulocytes. *J Clin Invest*. 1990 Mar;85(3):916-20.

Silverman AL, Park JG, Hamilton SR, Gazdar AF, Luk GD, Baylin SB. Abnormal methylation of the calcitonin gene in human colonic neoplasms. *Cancer Res*. 1989 Jul 1;49(13):3468-73.

Simon C, Goepfert H, Boyd D. Inhibition of the p38 mitogen-activated protein kinase by SB 203580 blocks PMA-induced Mr 92,000 type IV collagenase secretion and in vitro invasion. *Cancer Res*. 1998 Mar 15;58(6):1135-9.

Skolnik EY, Margolis B, Mohammadi M, Lowenstein E, Fischer R, Drepps A, Ullrich A, Schlessinger J. Cloning of PI3 kinase-associated p85 utilizing a novel method for expression/cloning of target proteins for receptor tyrosine kinases. *Cell*. 1991 Apr 5;65(1):83-90.

Smith LM, Wise SC, Hendricks DT, Sabichi AL, Bos T, Reddy P, Brown PH, Birrer MJ. cJun overexpression in MCF-7 breast cancer cells produces a tumorigenic, invasive and hormone resistant phenotype. *Oncogene*. 1999 Oct 28;18(44):6063-70.

Smith MR, Kung H, Durum SK, Colburn NH, Sun Y. TIMP-3 induces cell death by stabilizing TNF-alpha receptors on the surface of human colon carcinoma cells. *Cytokine*. 1997 Oct;9(10):770-80.

Soltoff SP, Cantley LC. p120cbl is a cytosolic adapter protein that associates with phosphoinositide 3-kinase in response to epidermal growth factor in PC12 and other cells. *J Biol Chem.* 1996 Jan 5;271(1):563-7.

Songyang Z, Shoelson SE, Chaudhuri M, Gish G, Pawson T, Haser WG, King F, Roberts T, Ratnofsky S, Lechleider RJ, et al. SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell.* 1993 Mar 12;72(5):767-78.

Sossin WS, Schwartz JH. Ca(2+)-independent protein kinase Cs contain an amino-terminal domain similar to the C2 consensus sequence. *Trends Biochem Sci.* 1993 Jun;18(6):207-8.

Sparks AB, Rider JE, Hoffman NG, Fowlkes DM, Quillam LA, Kay BK. Distinct ligand preferences of Src homology 3 domains from Src, Yes, Abl, Cortactin, p53bp2, PLCgamma, Crk, and Grb2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Feb 20;93(4):1540-4.

St-Denis A, Chano F, Tremblay P, St-Pierre Y, Descoteaux A. Protein kinase C-alpha modulates lipopolysaccharide-induced functions in a murine macrophage cell line. *J Biol Chem.* 1998 Dec 4;273(49):32787-92.

Stack JH, Herman PK, Schu PV, Emr SD. A membrane-associated complex containing the Vps15 protein kinase and the Vps34 PI 3-kinase is essential for protein sorting to the yeast lysosome-like vacuole. *EMBO J.* 1993 May;12(5):2195-204.

Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon AH, Langford LA, Baumgard ML, Hattier T, Davis T, Frye C, Hu R, Swedlund B, Teng DH, Tavtigian SV. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet.* 1997 Apr;15(4):356-62.

Steffensen B, Wallon UM, Overall CM. Extracellular matrix binding properties of recombinant fibronectin type II-like modules of human 72-kDa gelatinase/type IV

collagenase. High affinity binding to native type I collagen but not native type IV collagen. *J Biol Chem.* 1995 May 12;270(19):11555-66.

Stephens L, Smrcka A, Cooke FT, Jackson TR, Sternweis PC, Hawkins PT. A novel phosphoinositide 3 kinase activity in myeloid-derived cells is activated by G protein beta gamma subunits. *Cell.* 1994 Apr 8;77(1):83-93.

Stephens LR, Eguinoa A, Erdjument-Bromage H, Lui M, Cooke F, Coadwell J, Smrcka AS, Thelen M, Cadwallader K, Tempst P, Hawkins PT. The G beta gamma sensitivity of a PI3K is dependent upon a tightly associated adaptor, p101. *Cell.* 1997 Apr 4;89(1):105-14.

Stephens LR, Hughes KT, Irvine RF. Pathway of phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphate synthesis in activated neutrophils. *Nature.* 1991 May 2;351(6321):33-9.

Sternlicht MD, Bissell MJ, Werb Z. The matrix metalloproteinase stromelysin-1 acts as a natural mammary tumor promoter. *Oncogene.* 2000 Feb 21;19(8):1102-13.

Sternlicht MD, Lochter A, Symson CJ, Huey B, Rougier JP, Gray JW, Pinkel D, Bissell MJ, Werb Z. The stromal proteinase MMP3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis. *Cell.* 1999 Jul 23;98(2):137-46.

Stetler-Stevenson WG, Aznavoorian S, Liotta LA. Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu Rev Cell Biol.* 1993;9:541-73.

Stetler-Stevenson WG, Bersch N, Golde DW. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) has erythroid-potentiating activity. *FEBS Lett.* 1992 Jan 20;296(2):231-4.

Stoyanov B, Volinia S, Hanck T, Rubio I, Loubtchenkov M, Malek D, Stoyanova S, Vanhaesebroeck B, Dhand R, Nurnberg B, et al. Cloning and characterization of a G

protein-activated human phosphoinositide-3 kinase. *Science*. 1995 Aug 4;269(5224):690-3.

Stoyanova S, Bulgarelli-Leva G, Kirsch C, Hanck T, Klinger R, Wetzker R, Wymann MP. Lipid kinase and protein kinase activities of G-protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma: structure-activity analysis and interactions with wortmannin. *Biochem J*. 1997 Jun 1;324 ( Pt 2):489-95.

Stracke JO, Hutton M, Stewart M, Pendas AM, Smith B, Lopez-Otin C, Murphy G, Knauper V. Biochemical characterization of the catalytic domain of human matrix metalloproteinase 19. Evidence for a role as a potent basement membrane degrading enzyme. *J Biol Chem*. 2000 May 19;275(20):14809-16.

Strawn LM, Mann E, Elliger SS, Chu LM, Germain LL, Niederfellner G, Ullrich A, Shawver LK. Inhibition of glioma cell growth by a truncated platelet-derived growth factor-beta receptor. *J Biol Chem*. 1994 Aug 19;269(33):21215-22.

Sun Y, Hegamyer G, Kim H, Sithanandam K, Li H, Watts R, Colburn NH. Molecular cloning of mouse tissue inhibitor of metalloproteinases-3 and its promoter. Specific lack of expression in neoplastic JB6 cells may reflect altered gene methylation. *J Biol Chem*. 1995 Aug 18;270(33):19312-9.

Symons JA, Eastgate JA, Duff GW. Purification and characterization of a novel soluble receptor for interleukin 1. *J Exp Med*. 1991 Nov 1;174(5):1251-4.

Tada M, Diserens AC, Desbaillets I, de Tribolet N. Analysis of cytokine receptor messenger RNA expression in human glioblastoma cells and normal astrocytes by reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Neurosurg*. 1994 Jun;80(6):1063-73.

Taguchi A, Blood DC, del Toro G, Canet A, Lee DC, Qu W, Tanji N, Lu Y, Lalla E, Fu C, Hofmann MA, Kislinger T, Ingram M, Lu A, Tanaka H, Hori O, Ogawa S, Stern DM,

Schmidt AM. Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases. *Nature*. 2000 May 18;405(6784):354-60.

Takahashi C, Sheng Z, Horan TP, Kitayama H, Maki M, Hitomi K, Kitaura Y, Takai S, Sasahara RM, 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 U S A*. 1998 Oct 27;95(22):13221-6.

Takeda H, Matozaki T, Takada T, Noguchi T, Yamao T, Tsuda M, Ochi F, Fukunaga K, Inagaki K, Kasuga M. PI 3-kinase gamma and protein kinase C-zeta mediate RAS-independent activation of MAP kinase by a Gi protein-coupled receptor. *EMBO J*. 1999 Jan 15;18(2):386-95.

Tang X, Downes CP. Purification and characterization of Gbetagamma-responsive phosphoinositide 3-kinases from pig platelet cytosol. *J Biol Chem*. 1997 May 30;272(22):14193-9.

Tartaglia LA, Weber RF, Figari IS, Reynolds C, Palladino MA Jr, Goeddel DV. The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Oct 15;88(20):9292-6.

Tate PH, Bird AP. Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev*. 1993 Apr;3(2):226-31.

Thomas GJ, Lewis MP, Hart IR, Marshall JF, Speight PM. AlphaVbeta6 integrin promotes invasion of squamous carcinoma cells through up-regulation of matrix metalloproteinase-9. *Int J Cancer*. 2001 Jun 1;92(5):641-50.

Tjuvajev J, Gansbacher B, Desai R, Beattie B, Kaplitt M, Matei C, Koutcher J, Gilboa E, Blasberg R. RG-2 glioma growth attenuation and severe brain edema caused by local

production of interleukin-2 and interferon-gamma. *Cancer Res.* 1995 May 1;55(9):1902-10.

Tolias KF, Cantley LC, Carpenter CL. Rho family GTPases bind to phosphoinositide kinases. *J Biol Chem.* 1995 Jul 28;270(30):17656-9.

Toker A. Signaling through protein kinase C. *Front Biosci.* 1998 Nov 1;3:D1134-47.

Toker A, Bachelot C, Chen CS, Falck JR, Hartwig JH, Cantley LC, Kovacsics TJ. Phosphorylation of the platelet p47 phosphoprotein is mediated by the lipid products of phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem.* 1995 Dec 8;270(49):29525-31.

Toker A, Cantley LC. Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature.* 1997 Jun 12;387(6634):673-6.

Tremblay P, Houde M, Arbour N, Rochefort D, Masure S, Mandeville R, Opdenakker G, Oth D. Differential effects of PKC inhibitors on gelatinase B and interleukin 6 production in the mouse macrophage. *Cytokine.* 1995 Feb;7(2):130-6.

Troussard AA, Costello P, Yoganathan TN, Kumagai S, Roskelley CD, 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 Nov 16;19(48):5444-52.

Tryggvason K, Hoyhtya M, Pyke C. Type IV collagenases in invasive tumors. *Breast Cancer Res Treat.* 1993;24(3):209-18.

Tsunawaki S, Sporn M, Ding A, Nathan C. Deactivation of macrophages by transforming growth factor-beta. *Nature.* 1988 Jul 21;334(6179):260-2.

Uberall F, Giselbrecht S, Hellbert K, Fresser F, Bauer B, Gschwendt M, Grunicke HH, Baier G. Conventional PKC-alpha, novel PKC-epsilon and PKC-theta, but not atypical PKC-lambda are MARCKS kinases in intact NIH 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem.* 1997 Feb 14;272(7):4072-8.

Uehara T, Matsuno J, Kaneko M, Nishiya T, Fujimuro M, Yokosawa H, Nomura Y. Transient nuclear factor kappaB (NF-kappaB) activation stimulated by interleukin-1beta may be partly dependent on proteasome activity, but not phosphorylation and ubiquitination of the IkappaBalpha molecule, in C6 glioma cells. Regulation of NF-kappaB linked to chemokine production. *J Biol Chem.* 1999 May 28;274(22):15875-82.

Ueki K, Fruman DA, Brachmann SM, Tseng YH, Cantley LC, Kahn CR. Molecular balance between the regulatory and catalytic subunits of phosphoinositide 3-kinase regulates cell signaling and survival. *Mol Cell Biol.* 2002 Feb;22(3):965-77.

Uhm JH, Dooley NP, Villemure JG, Yong VW. Glioma invasion in vitro: regulation by matrix metalloproteinase-2 and protein kinase C. *Clin Exp Metastasis.* 1996 Oct;14(5):421-33.

Unemori EN, Hibbs MS, Amento EP. Constitutive expression of a 92-kD gelatinase (type V collagenase) by rheumatoid synovial fibroblasts and its induction in normal human fibroblasts by inflammatory cytokines. *J Clin Invest.* 1991 Nov;88(5):1656-62.

Uria JA, Lopez-Otin C. Matrilysin-2, a new matrix metalloproteinase expressed in human tumors and showing the minimal domain organization required for secretion, latency, and activity. *Cancer Res.* 2000 Sep 1;60(17):4745-51.

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 Jan 19;75(2):246-53.

Vanhaesebroeck B, Leevers SJ, Panayotou G, Waterfield MD. Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem Sci.* 1997 Jul;22(7):267-72.

Vanhaesebroeck B, Welham MJ, Kotani K, Stein R, Warne PH, Zvelebil MJ, Higashi K, Volinia S, Downward J, Waterfield MD. P110delta, a novel phosphoinositide 3-kinase in leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Apr 29;94(9):4330-5.

Varticovski L, Daley GQ, Jackson P, Baltimore D, Cantley LC. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase in cells expressing abl oncogene variants. *Mol Cell Biol.* 1991 Feb;11(2):1107-13.

Velasco G, Cal S, Merlos-Suarez A, Ferrando AA, Alvarez S, Nakano A, Arribas J, Lopez-Otin C. Human MT6-matrix metalloproteinase: identification, progelatinase A activation, and expression in brain tumors. *Cancer Res.* 2000 Feb 15;60(4):877-82.

Velasco G, Pendas AM, Fueyo A, Knauper V, Murphy G, Lopez-Otin C. Cloning and characterization of human MMP-23, a new matrix metalloproteinase predominantly expressed in reproductive tissues and lacking conserved domains in other family members. *J Biol Chem.* 1999 Feb 19;274(8):4570-6.

Velasco S, Tarlow M, Olsen K, Shay JW, McCracken GH Jr, Nisen PD. Temperature-dependent modulation of lipopolysaccharide-induced interleukin-1 beta and tumor necrosis factor alpha expression in cultured human astroglial cells by dexamethasone and indomethacin. *J Clin Invest.* 1991 May;87(5):1674-80.

Venter DJ, Thomas DG. Multiple sequential molecular abnormalities in the evolution of human gliomas. *Br J Cancer.* 1991 May;63(5):753-7.

Verrecchia F, Rossert J, Mauviel A. Blocking sp1 transcription factor broadly inhibits extracellular matrix gene expression in vitro and in vivo: implications for the treatment of tissue fibrosis. *J Invest Dermatol.* 2001 May;116(5):755-63.

Vertino PM, Yen RW, Gao J, Baylin SB. De novo methylation of CpG island sequences in human fibroblasts overexpressing DNA (cytosine-5-)-methyltransferase. *Mol Cell Biol.* 1996 Aug;16(8):4555-65.

Virbasius JV, Guilherme A, Czech MP. Mouse p170 is a novel phosphatidylinositol 3-kinase containing a C2 domain. *J Biol Chem.* 1996 Jun 7;271(23):13304-7.

Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem.* 1994 Feb 18;269(7):5241-8.

Vogel LB, Fujita DJ. The SH3 domain of p56lck is involved in binding to phosphatidylinositol 3'-kinase from T lymphocytes. *Mol Cell Biol.* 1993 Dec;13(12):7408-17.

von Deimling A, Louis DN, Wiestler OD. Molecular pathways in the formation of gliomas. *Glia.* 1995 Nov;15(3):328-38.

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 angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell.* 1998 May 1;93(3):411-22.

Wallon UM, Overall CM. The hemopexin-like domain (C domain) of human gelatinase A (matrix metalloproteinase-2) requires Ca<sup>2+</sup> for fibronectin and heparin binding. Binding properties of recombinant gelatinase A C domain to extracellular matrix and basement membrane components. *J Biol Chem.* 1997 Mar 14;272(11):7473-81.

Wang X, Yi J, Lei J, Pei D. Expression, purification and characterization of recombinant mouse MT5-MMP protein products. *FEBS Lett.* 1999 Dec 3;462(3):261-6.

Wang Z, Zheng T, Zhu Z, Homer RJ, Riese RJ, Chapman HA Jr, Shapiro SD, Elias JA. Interferon gamma induction of pulmonary emphysema in the adult murine lung. *J Exp Med.* 2000 Dec 4;192(11):1587-600.

Watt F, Molloy PL. Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes Dev.* 1988 Sep;2(9):1136-43.

Ways DK, Posekany K, deVente J, Garris T, Chen J, Hooker J, Qin W, Cook P, Fletcher D, Parker P. Overexpression of protein kinase C-zeta stimulates leukemic cell differentiation. *Cell Growth Differ.* 1994 Nov;5(11):1195-203.

Weissenberger J, Steinbach JP, Malin G, Spada S, Rulicke T, Aguzzi A. Development and malignant progression of astrocytomas in GFAP-v-src transgenic mice. *Oncogene.* 1997 May 1;14(17):2005-13.

Werb Z. ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell.* 1997 Nov 14;91(4):439-42.

Whitman M, Kaplan DR, Schaffhausen B, Cantley L, Roberts TM. Association of phosphatidylinositol kinase activity with polyoma middle-T competent for transformation. *Nature.* 1985 May 16-22;315(6016):239-42.

Wick M, Haronen R, Mumberg D, Burger C, Olsen BR, Budarf ML, Apte SS, Muller R. Structure of the human TIMP-3 gene and its cell cycle-regulated promoter. *Biochem J.* 1995 Oct 15;311 ( Pt 2):549-54.

Wilhelm SM, Collier IE, Marmer BL, Eisen AZ, Grant GA, Goldberg GI. SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. *J Biol Chem.* 1989 Oct 15;264(29):17213-21.

Wilhelm SM, Shao ZH, Housley TJ, Seperack PK, Baumann AP, Gunja-Smith Z, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinase-3 (stromelysin-1). Identification as the cartilage acid metalloprotease and effect of pH on catalytic properties and calcium affinity. *J Biol Chem.* 1993 Oct 15;268(29):21906-13.

Will H, Atkinson SJ, Butler GS, Smith B, Murphy G. The soluble catalytic domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase cleaves the propeptide of progelatinase A and initiates autoproteolytic activation. Regulation by TIMP-2 and TIMP-3. *J Biol Chem.* 1996 Jul 19;271(29):17119-23.

Will H, Hinzmann B. cDNA sequence and mRNA tissue distribution of a novel human matrix metalloproteinase with a potential transmembrane segment. *Eur J Biochem.* 1995 Aug 1;231(3):602-8.

Williamson RA, Marston FA, Angal S, Koklitis P, Panico M, Morris HR, Carne AF, Smith BJ, Harris TJ, Freedman RB. Disulphide bond assignment in human tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP). *Biochem J.* 1990 Jun 1;268(2):267-74.

Wilson CL, Heppner KJ, Labosky PA, Hogan BL, Matrisian LM. Intestinal tumorigenesis is suppressed in mice lacking the metalloproteinase matrilysin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Feb 18;94(4):1402-7.

Wilson CL, Matrisian LM. Matrilysin: an epithelial matrix metalloproteinase with potentially novel functions. *Int J Biochem Cell Biol.* 1996 Feb;28(2):123-36.

Wilson CL, Ouellette AJ, Satchell DP, Ayabe T, Lopez-Boado YS, Stratman JL, Hultgren SJ, Matrisian LM, Parks WC. Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense. *Science*. 1999 Oct 1;286(5437):113-7.

Windsor LJ, Grenett H, Birkedal-Hansen B, Bodden MK, Engler JA, Birkedal-Hansen H. Cell type-specific regulation of SL-1 and SL-2 genes. Induction of the SL-2 gene but not the SL-1 gene by human keratinocytes in response to cytokines and phorbol esters. *J Biol Chem*. 1993 Aug 15;268(23):17341-7.

Wooten MW, Seibenhener ML, Zhou G, Vandenplas ML, Tan TH. Overexpression of atypical PKC in PC12 cells enhances NGF-responsiveness and survival through an NF-kappaB dependent pathway. *Cell Death Differ*. 1999 Aug;6(8):753-64.

Wotton D, Lo RS, Lee S, Massague J. A Smad transcriptional corepressor. *Cell*. 1999 Apr 2;97(1):29-39.

Wu E, Mari BP, Wang F, Anderson IC, Sunday ME, Shipp MA. Stromelysin-3 suppresses tumor cell apoptosis in a murine model. *J Cell Biochem*. 2001;82(4):549-55.

Wu J, Issa JP, Herman J, Bassett DE Jr, Nelkin BD, Baylin SB. Expression of an exogenous eukaryotic DNA methyltransferase gene induces transformation of NIH 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Oct 1;90(19):8891-5.

Wu X, Senechal K, Neshat MS, Whang YE, Sawyers CL. The PTEN/MMAC1 tumor suppressor phosphatase functions as a negative regulator of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Dec 22;95(26):15587-91.

Wymann MP, Bulgarelli-Leva G, Zvelebil MJ, Pirola L, Vanhaesebroeck B, Waterfield MD, Panayotou G. Wortmannin inactivates phosphoinositide 3-kinase by covalent

modification of Lys-802, a residue involved in the phosphate transfer reaction. *Mol Cell Biol.* 1996 Apr;16(4):1722-33.

Xie B, Dong Z, Fidler IJ. Regulatory mechanisms for the expression of type IV collagenases/gelatinases in murine macrophages. *J Immunol.* 1994 Apr 1;152(7):3637-44.

Xie B, Laouar A, Huberman E. Fibronectin-mediated cell adhesion is required for induction of 92-kDa type IV collagenase/gelatinase (MMP-9) gene expression during macrophage differentiation. The signaling role of protein kinase C-beta. *J Biol Chem.* 1998 May 8;273(19):11576-82.

Xu W, Harrison SC, Eck MJ. Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature.* 1997 Feb 13;385(6617):595-602.

Yamamoto M, Mohanam S, Sawaya R, Fuller GN, Seiki M, Sato H, Gokaslan ZL, Liotta LA, Nicolson GL, Rao JS. Differential expression of membrane-type matrix metalloproteinase and its correlation with gelatinase A activation in human malignant brain tumors in vivo and in vitro. *Cancer Res.* 1996 Jan 15;56(2):384-92.

Yamanishi DT, Graham M, Buckmeier JA, Meyskens FL Jr. The differential expression of protein kinase C genes in normal human neonatal melanocytes and metastatic melanomas. *Carcinogenesis.* 1991 Jan;12(1):105-9.

Yan C, Wang H, Boyd DD. KiSS-1 represses 92-kDa type IV collagenase expression by down-regulating NF-kappa B binding to the promoter as a consequence of Ikappa Balpha-induced block of p65/p50 nuclear translocation. *J Biol Chem.* 2001 Jan 12;276(2):1164-72.

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 Jul 10;273(28):17893-900.

Yang M, Murray MT, Kurkinen M. A novel matrix metalloproteinase gene (XMMP) encoding vitronectin-like motifs is transiently expressed in *Xenopus laevis* early embryo development. *J Biol Chem.* 1997 May 23;272(21):13527-33.

Yano H, Nakanishi S, Kimura K, Hanai N, Saitoh Y, Fukui Y, Nonomura Y, Matsuda Y. Inhibition of histamine secretion by wortmannin through the blockade of phosphatidylinositol 3-kinase in RBL-2H3 cells. *J Biol Chem.* 1993 Dec 5;268(34):25846-56.

Yarden Y, Escobedo JA, Kuang WJ, Yang-Feng TL, Daniel TO, Tremble PM, Chen EY, Ando ME, Harkins RN, Francke U, et al. Structure of the receptor for platelet-derived growth factor helps define a family of closely related growth factor receptors. *Nature.* 1986 Sep 18-24;323(6085):226-32.

Yazaki T, Ahmad S, Chahlavi A, Zylber-Katz E, Dean NM, Rabkin SD, Martuza RL, Glazer RI. Treatment of glioblastoma U-87 by systemic administration of an antisense protein kinase C-alpha phosphorothioate oligodeoxynucleotide. *Mol Pharmacol.* 1996 Aug;50(2):236-42.

Yoder JA, Bestor TH. A candidate mammalian DNA methyltransferase related to pmt1p of fission yeast. *Hum Mol Genet.* 1998 Feb;7(2):279-84.

Yong VW. Proliferation of human and mouse astrocytes in vitro: signalling through the protein kinase C pathway. *J Neurol Sci.* 1992 Aug;111(1):92-103.

Yoshiura K, Kanai Y, Ochiai A, Shimoyama Y, Sugimura T, Hirohashi S. Silencing of the E-cadherin invasion-suppressor gene by CpG methylation in human carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Aug 1;92(16):7416-9.

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 Sep 15;161(6):3071-6.

Zhao WQ, Li H, Yamashita K, Guo XK, Hoshino T, Yoshida S, Shinya T, Hayakawa T. Cell cycle-associated accumulation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in the nuclei of human gingival fibroblasts. *J Cell Sci.* 1998 May;111 ( Pt 9):1147-53.

Zheng Y, Bagrodia S, Cerione RA. Activation of phosphoinositide 3-kinase activity by Cdc42Hs binding to p85. *J Biol Chem.* 1994 Jul 22;269(29):18727-30.

Zhou K, Takegawa K, Emr SD, Firtel RA. A phosphatidylinositol (PI) kinase gene family in *Dictyostelium discoideum*: biological roles of putative mammalian p110 and yeast Vps34p PI 3-kinase homologs during growth and development. *Mol Cell Biol.* 1995 Oct;15(10):5645-56.

Zochbauer-Muller S, Fong KM, Virmani AK, Geradts J, Gazdar AF, Minna JD. Aberrant promoter methylation of multiple genes in non-small cell lung cancers. *Cancer Res.* 2001 Jan 1;61(1):249-55.

## LISTE DES ARTICLES

Estève, PO, Robledo, O, Potworowski EF, and St-Pierre, Y. Induced expression of matrix metalloproteinase-9 in C6 glioma cells is inhibited by a phosphatidylinositol-3-kinase-dependent pathway. (sous presse).

Estève, PO., Chicoine, E, Robledo, O, Aoudjit, F, Descoteaux, A, Potworowski EF and St-Pierre, Y. Protein kinase c-zeta regulates transcription of the matrix metalloproteinase-9 gene induced by IL-1 and TNF-alpha in glioma cells via NF-KB". (sous presse).

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

Misse D, Estève PO, 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 Aug 1;98(3):541-7.

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

Estève PO, 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 May 27;1403(1):85-96.

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

Popkov M, Lussier I, Medvedkine V, Estève PO, Alakhov V, Mandeville R. Multidrug-resistance drug-binding peptides generated by using a phage display library. Eur J Biochem. 1998 Jan 15;251(1-2):155-63.

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

Aoudjit F, Estève PO, Desrosiers M, Potworowski EF, St-Pierre Y. Gelatinase B (MMP-9) production and expression by stromal cells in the normal and adult thymus and experimental thymic lymphoma. Int J Cancer. 1997 Mar 28;71(1):71-8.

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

St-Pierre Y, Desrosiers M, Tremblay P, Estève PO, Opdenakker G. Flow cytometric analysis of gelatinase B (MMP-9) activity using immobilized fluorescent substrate on microspheres. Cytometry. 1996 Dec 1;25(4):374-80.

## LISTE DES COMMUNICATIONS

Estève, PO., Aoudjit, F., St-Denis, A., Descoteaux, A., and St-Pierre, Y. PKC zeta is required for MMP-9 expression in C6 glioma cells., International Conference on Metalloproteinases and their inhibitors in the nervous system : Physiology and Disease. Banff, Alberta, Canada, February 27<sup>th</sup>-March 3<sup>rd</sup>, 1999.

Estève, PO., Tremblay, P., Mandeville, R. and St-Pierre, Y. Evidence of net proteolytic activity in glioma cells. CSI, Spring Meeting, Saint-Adèle, Québec, Canada, March, 1998.

Estève, PO., Tremblay, P., Mandeville, R., and St-Pierre, Y. Gelatinase B regulation by cytokines in the C6 rat glioma cell line. CSI, Spring Meeting, Saint-Adèle, Québec, Canada, March, 1996.