

INRS-Institut Armand-Frappier

Rôle d'EGR-1 dans la croissance du lymphome

Par Frédéric Bouchard

Mémoire

Présenté pour l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.) en virologie-immunologie

Président du Jury et examinateur interne : Dr. Claude Daniel

Examinateur externe : Dr. Benoit Barbeau

Directeur de recherche : Dr. Yves St-Pierre

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier mon directeur de recherche le Dr. Yves St-Pierre pour son expertise, sa générosité et surtout sa patience. Ce projet de maîtrise n'aurait pas pu être ce qu'il est sans son support et sa bonne humeur lors de moments plus ardus.

Merci également à toutes les filles du laboratoire, Andrée-Anne, Carole, Geneviève, Katherine et Nathalie pour l'ambiance et les discussions amicales. Un merci tout spécial à Julie qui m'a épaulée durant la mise au point et l'optimisation des protocoles et lors de mes nombreuses interrogations personnelles. J'aimerais aussi remercier le Dr. Benoit Ochietti pour ses conseils fort précieux.

Je souhaite aussi souligner la générosité de Diane Tremblay pour son expertise dans la culture cellulaire et dans la manipulation animale. Merci à la Fondation Armand-Frappier et au Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada pour le soutien financier.

Finalement, je tiens à remercier ma famille et mon entourage immédiat, mais tout particulièrement Janik Thibodeau, pour son écoute en temps de lassitude et surtout pour la belle amitié qui nous lie.

Table des matières

REMERCIEMENTS.....	II
TABLE DES MATIÈRES	III
LISTE DES FIGURES	V
LISTES DES TABLEAUX	VI
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	VII
SOMMAIRE	X
INTRODUCTION.....	XI
CHAPITRE I	
REVUE DE LITTÉRATURE	1
1. <i>Interactions des cellules tumorales : molécules d'adhésion et microenvironnement</i>	2
1.1. Lymphomes : modèles d'études	2
1.1.1. Lymphomes non hodgkinien	2
1.1.2. Stade d'évolution.....	3
1.1.3. Traitements.....	4
1.2. Modèle murin de lymphome T.....	5
1.3. Molécules d'adhésion.....	5
1.3.1. Interaction lymphocyte-endothélium	6
1.3.2. Molécules d'adhésion et dissémination du lymphome	7
1.4. Concept du microenvironnement tumoral.....	8
1.4.1. Implication du microenvironnement tumoral.....	9
1.4.2. Cible thérapeutique	10
2. <i>EGR-1 : facteur de transcription à réponse précoce pour les signaux extracellulaires.</i>	14
2.1. Gènes à réponse précoce/immédiate	14
2.1.1. Facteurs de transcriptions à réponse précoce/immédiate	14
2.2. Famille EGR.....	15
2.2.1. EGR-1: le prototype de la famille EGR	15
2.2.2. Structure	15
2.2.3. Inducteurs d'EGR-1	16
2.2.4. Cascades de transduction	17
2.2.5. Éléments transcriptionnels impliqués dans l'expression d'Egr-1	18
2.2.6. Régulation d'EGR-1	19
2.2.7. Adhésion cellulaire et contrôle transcriptionnel d'EGR-1	20
2.3. Fonctions d'EGR-1	21
2.3.1.Prolifération.....	21
2.3.2. Différenciation	22
2.3.3. Apoptose.....	22
2.3.4. Réponse immunitaire.....	23

2.4. EGR-1 et cancer	24
2.4.1. EGR-1 : facteur pro-tumorigénique	24
2.4.2. <i>Egr-1</i> : gène suppresseur de tumeur	25
2.4.3. Inhibition de la croissance et de la survie des cellules tumorales	25
2.4.4. Inhibition de l'angiogenèse tumorale	26
2.5. EGR-1 dans les tumeurs hématopoïétiques	27
2.6. EGR-1 et le microenvironnement tumoral	28
 CHAPITRE II	
EGR-1 ACTIVATION BY EGF INHIBITS MMP-9 EXPRESSION AND LYMPHOMA GROWTH	30
 CONTRIBUTION DES AUTEURS	31
SOMMAIRE DU TRAVAIL EXPÉRIMENTAL	32
ACCEPTATION DE L'ARTICLE POUR PUBLICATION	33
 1. Abstract	35
2. Introduction	36
3. Materials and methods	38
4. Results	44
5. Discussion	48
6. References	52
7. Figure legends	57
8. Supplementary materials	59
 CHAPITRE III	
DISCUSSION GÉNÉRALE	71
 1. Rappel des objectifs de recherche	72
2. Identification de l'induction de l'expression d'EGR-1 dans les cellules stromales.....	72
3. Rôle d'EGF dans l'induction de l'expression d'EGR-1	73
4. Inhibition de la croissance du lymphome thymique : implication d'EGR-1	74
5. Souris déficiente en EGR-1 et lymphome	75
6. Relation fonctionnelle entre EGR-1 et MMP-9	76
7. Utilisation d'un modèle <i>in vivo</i> de bioluminescence	77
8. Mécanisme d'action d'EGR-1 dans l'inhibition de la croissance du lymphome.....	78
9. Avenue thérapeutique	79
10. Conclusion.....	80
 BIBLIOGRAPHIE	82

Liste des figures

CHAPITRE I REVUE DE LITTÉRATURE

Figure 1.1: Interaction du lymphocyte avec l'endothélium	7
Figure 1.2: Le microenvironnement tumoral	12
Figure 1.3: Structure du facteur de transcription EGR-1	16
Figure 1.4: Région régulatrice du promoteur humain d'EGR-1	19

CHAPITRE II EGR-1 ACTIVATION BY EGF INHIBITS MMP-9 EXPRESSION AND LYMPHOMA GROWTH

Figure 1: Identification of differentially expressed genes in bEnd.3 endothelial cell line following contact with 164T2 T lymphoma	61
Figure 2: EGR-1-induced expression in endothelial cell lines following contact with T lymphoma cells.....	62
Figure 3: EGF activates transcription of EGR-1 expression in endothelial cell lines.....	63
Figure 4: EGR-1-induced expression in epithelial cell lines following contact with EGF transfectants	64
Figure 5: EGF expression decrease thymic lymphoma growth	65
Figure 6: Inhibition of MMP-9 mRNA expression by EGR-1	66
Figure 7: EGF expression decrease MMP-9 promoter activity in vivo	66
Supplementary Figure 1: EGF expression in T lymphoma	68
Supplementary Figure 2: EGF activates transcription of EGR-1 expression.....	69
Supplementary Figure 3: Expression of EGF transfectants	70

CHAPITRE III DISCUSSION GÉNÉRALE

Figure 3.1: Modèle d'étude	81
---	----

Listes des tableaux

CHAPITRE I REVUE DE LITTÉRATURE

Tableau I: Classification WHO/EORTC des néoplasies de phénotype T	3
Tableau II: Quelques cibles thérapeutiques du microenvironnement tumoral	13
Tableau III: Inducteurs de l'expression d'EGR-1.....	17
Tableau IV: Interactions de quelques facteurs de transcription avec EGR-1	20
Tableau V: Régulation de gènes suppresseurs/modulateurs de la croissance par EGR-1	27

CHAPITRE II EGR-1 ACTIVATION BY EGF INHIBITS MMP-9 EXPRESSION AND LYMPHOMA GROWTH

Table 1: <i>Genes differentially expressed in endothelial cells following contact with thymocytes or T lymphoma cells</i>	56
--	----

Liste des abréviations

- ADN** : acide désoxyribonucléique
ADNr : acide désoxyribonucléique complémentaire
AGC1 : *aggrecan 1*
AP1 : *activator protein-1*
ARNm : acide ribonucléique messager
ATP : Adénosine triphosphate
Bax : *BCL2-associated X protein*
Bcl-2 : *B-cell lymphoma/leukemia-2*
BCR : *B-cell Receptor*
CBP : *CREB binding protein*
CD : *cluster of differentiation*
CDDO : *2-Cyano-3,12-dioxooleana-1,9(11)-dien-28-oylimidazole*
COL2A1 : *collagen, type II, alpha 1*
cpm : compte par minute
CRE : *cyclic AMP response element*
CREB : *cAMP responsive element binding protein 1*
CTRL : *control*
DEDD2 : *death effector domain containing 2*
DMSO : diméthylsulfoxyde
DUSP2 : *dual specificity phosphatase 2*
E2F-1 : *E2F transcription factor 1*
EBS : *EGR-1 binding site*
EBV : *Epstein Barr Virus*
ELISA : *enzyme-linked immunosorbent assay*
ELK : *Eph-like kinase*
EC : *endothelial cell*
EGF : *epidermal growth factor*
EGFR : *epidermal growth factor receptor*
EGR-1 : *early growth response-1*
ENU : N-nitroso-N-éthylurée
ERK : *extracellular signal-regulated kinases*
Ets-1 : *v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1*
FAK : *focal adhesion kinase*
FBS : *Fetal bovine serum*
Fe²⁺ : ion de fer
FGF : *fibroblast growth factor*
FRA-2 : *fos-related antigen-2*
FRET : transfert d'énergie par résonance de type Förster
GADD45B : *growth arrest and DNA-damage-inducible, beta*
GAPDH : *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*
GMCSF : *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*
HB-EGF : *heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor*
HGF : *hepatocyte growth factor*

HIF1 α : *hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit inhibitor*
HSPG : protéoglycane héparane sulfate
HTLV-1 : *human T-cell lymphotropic virus-1*
HUVEC : *human umbilical vein endothelial cell*
ICAM-1 : *intercellular adhesion molecule-1*
IL : interleukine
i.p. : intra-péritonéale
IRM : imagerie par résonance magnétique nucléaire
i.t. : intra-thymique
i.v. : intra-veineux
JAK : Janus kinases
JNK : *JUN NH₂-terminal kinase*
kDa : kilodalton
Kg : kilogramme
Krox24 : EGR-1
LFA-1 : *lymphocyte function-associated antigen-1*
LNH : lymphome non hodgkinien
LPS : lipopolysaccharide
mAb : *monoclonal antibody*
MadCAM-1 : *mucosal addressin cell adhesion molecule-1*
MAPK : *mitogen-activated protein kinases*
MAPKK : *mitogen-activated protein kinase kinases*
mg : milligramme
ml : millilitre
 mM : millimolaire
MMP : métalloprotéase de la matrice (*matrix metalloproteinase*)
Mn²⁺ : ion de manganèse
MT-MMP : métalloprotéase de la matrice de type membranaire
mV : millivolt
NAB : *NGFI-A binding protein*
NFAT : *Nuclear factor of activated T-cells*
NF-κB : *nuclear factor-κB*
ng : nanogramme
NGFI-A : *nerve growth factor-induced gene (EGR-1)*
NK : *natural killer*
p.b. : paire de base
PBS : *Phosphate buffered saline*
PCR : *polymerase chain reaction*
PDGF : *platelet-derived growth factor*
PDGFR : *platelet-derived growth factor receptor*
PECAM-1 : *platelet/endothelial cell adhesion molecule-1*
PI3K : *phosphoinositide-3kinase*
PKC : protéine kinase C
PMA : *phorbol 12-myristate 13-acetate*
PNMT : *phenylethanolamine N-methyltransferase*
PTEN : *phosphatase and tensin homolog*
Rb : *retinoblastoma protein*

RT-PCR : *reverse transcriptase polymerase chain reaction*
SAPK : *stress-activated protein kinase-2*
SDS : dodécylsulfate de sodium
SF-1 : *splicing factor-1*
SP1 : *stimulatory protein-1*
SRE : *serum response element*
SRF : *serum response factor*
TEMP : tomographie d'émission monophotonique
STAT : *signal-transducer and activator of transcription protein*
TEP : tomographie par émission de positons
TCR : *T-cell receptor*
TfR : *transferin receptor*
TGF β 1 : *transforming growth factor, beta-1*
TIMP : *tissue inhibitor of metalloproteinase*
TIS8 : EGR-1
TNF α : *tumor necrosis factor alpha*
 μ g: microgramme
 μ L: microlitre
 μ M: micromolaire
UV : ultraviolet
VCAM-1 : *vascular cell adhesion molecule-1*
VEGF : *vascular endothelial growth factor*
VEGFR : *vascular endothelial growth factor receptor*
WK : *week*
WHO/EORTC : *World Health Organization/European Organization for Research and Treatment of Cancer*
WT1 : *Wilms tumor 1*
YAP-1 : *Yes-associated protein 1*
Zif268 : *zinc finger-268 (EGR-1)*
Zn $^{2+}$: ion de zinc

Sommaire

Le lymphome non hodgkinien représente le 5^{ième} type de cancer le plus fréquemment rencontré chez les Canadiens. Le principal obstacle au diagnostic et au traitement du lymphome non hodgkinien est relié à la dissémination des cellules cancéreuses vers les organes périphériques et à la formation de métastases. La métastasie est un processus séquentiel se déroulant en plusieurs étapes où les interactions cellulaires entre les cellules tumorales et stromales jouent un rôle important. Ces interactions influencent la modulation de l'expression de certains gènes pouvant être impliqués dans la migration, la prolifération cellulaire, les interactions cellule-cellule ou cellule-matrice extracellulaire, l'angiogénèse ou encore dans les mécanismes d'évasion permettant d'échapper au système immunitaire.

Afin d'identifier les gènes ainsi modulés, notre laboratoire a utilisé une approche génomique pour déterminer des gènes induits lors des contacts lympho-stromaux entre les cellules de lymphome et les cellules endothéliales. Cette approche a permis de démontrer que l'expression du gène *Egr-1* (*Early growth response-1*) est induite dans les cellules endothéliales en contact avec les cellules de lymphome. EGR-1 est un facteur de transcription connu pour contrôler l'expression d'un éventail de gènes. Bien que la modulation de l'expression d'EGR-1 était plus importante lors d'un contact direct, la sécrétion de molécules solubles par les cellules de lymphome pouvait être suffisante pour amener cette modulation. À partir de ces résultats, **le but premier de notre étude était de déterminer les signaux responsables de l'induction d'EGR-1 lors des contacts lympho-stromaux dans la croissance du lymphome de même que les conséquences sur le processus tumoral.**

Ces travaux ont permis d'établir que le facteur de croissance épidermique (EGF), exprimé de façon constitutive par les cellules de lymphome, représente un des facteurs pour l'induction de l'expression d'EGR-1 lors des contacts intercellulaires. À l'aide d'un modèle murin, nous avons observé que la surexpression d'EGF par les cellules de lymphome inhibe de façon significative la croissance du lymphome thymique. Afin de déterminer le mécanisme impliqué dans cette inhibition, nous avons étudié la relation entre EGF, EGR-1, et MMP-9, ce dernier étant impliqué dans la croissance tumorale, dont le lymphome thymique. Les expériences subséquentes entreprises pour identifier le mécanisme, nous ont en effet permis de démontrer qu'EGR-1 module négativement la croissance du lymphome thymique en contrôlant l'expression de MMP-9.

En résumé, nos résultats mettent en évidence un rôle de gène suppresseur de tumeur pour *Egr-1* et ce, via possiblement un contrôle sur l'activité transcriptionnelle du promoteur *MMP-9*.

Signature du directeur de recherche : _____

Signature de l'étudiant : _____

Introduction

Je vous présente ici mon projet de maîtrise qui a vu le jour en septembre 2007 dans le laboratoire du Dr. Yves St-Pierre. Ce projet mis sur pied dans le laboratoire lors des études doctorales de Simon Bélanger avait montré que lors d'un contact entre les cellules de lymphome et les cellules stromales, l'expression du gène *Egr-1* était induite dans les cellules stromales. Mon projet de maîtrise visait à déterminer la nature de cette induction et le rôle d'EGR-1 dans le lymphome. Ce projet a été rendu possible grâce à l'utilisation d'un modèle murin et de lignées de cellules de lymphome T où le rôle d'EGR-1 a été évalué au niveau de la croissance du lymphome thymique.

Ce mémoire est constitué en trois chapitres, dont le premier est consacré à la revue de littérature retracant les grands concepts et les connaissances actuelles liés à ce projet : le lymphome, les interactions intercellulaires, le microenvironnement tumoral, les fonctions d'EGR-1 et son rôle dans le cancer. Le chapitre II présente les résultats obtenus dans le cadre de mes analyses en laboratoire. Ce dernier est rédigé sous la forme d'un article scientifique publié dans la revue *Blood*, dont je suis co-auteur principal. Le troisième chapitre fait état d'une discussion sur les principales conclusions tirées de ces recherches.

Chapitre I

Revue de littérature

1. Interactions des cellules tumorales : molécules d'adhésion et microenvironnement

1.1. Lymphomes : modèles d'études

Les lymphomes sont des cancers provenant du système lymphatique. Ils résultent de la transformation maligne des lymphocytes. Son développement débute généralement dans les nœuds lymphatiques ou autres parties du système immunitaire et peut se propager d'un organe à l'autre. Plusieurs types de cellules leucocytaires peuvent donner naissance aux lymphomes. En fait, les lymphomes sont divisés en deux catégories majeures soit les lymphomes hodgkiniens et les lymphomes non hodgkiniens (LNH).

Les lymphomes hodgkiniens sont caractérisés par la présence de cellules Reed-Sternberg, des cellules B immatures néoplasiques possédant une morphologie particulière qui facilite le diagnostic. Actuellement, les chances de rémission et de survie suite aux traitements sont excellentes. Au contraire, les LNH sont caractérisés par une croissance anarchique et démesurée provoquant une dissémination systémique précoce aux organes lymphoïdes, tels que les ganglions et la rate, de même que vers les organes non lymphoïdes. L'apparition du lymphome peut être attribuable à plusieurs causes distinctes. L'infection par certains virus spécifiques comme l'EBV (*Epstein Barr Virus*) et le HTLV-1 (*human T-cell lymphotropic virus-I*) (1, 2), l'exposition à divers agents (dioxines, radiation) (3, 4), ainsi que les immunodéficiences héréditaires et acquises, tout comme les maladies auto-immunes (5-7) peuvent être impliquées dans l'apparition du lymphome. Les LNH représentent environ 12% de l'ensemble des lymphomes et leur fréquence varie de façon importante dans le monde, passant de 18,3% à Hong Kong à 1,5% à Vancouver. Cette variation est principalement due à l'exposition des communautés asiatiques à certains facteurs pathogéniques comme le HTLV-1 et l'EBV (8).

1.1.1. Lymphomes non hodgkinien

Le LNH représente le 5^{ième} type de cancer le plus fréquemment rencontré chez les Canadiens. Il a été estimé qu'environ 7200 cas de LNH ont été diagnostiqués et 3200 individus en sont décédés en 2009. Il est notamment responsable de 8% des décès reliés au cancer chez les jeunes adultes (Société Canadienne du Cancer : www.cancer.ca). Le principal obstacle au diagnostic et au traitement du LNH est relié à la dissémination des cellules cancéreuses vers les organes périphériques et la formation de métastases. Les LNH regroupent plusieurs entités distinctes de maladies provenant de différents types cellulaires. Les analyses

immunophénotypiques, cytogénétiques et moléculaires ont amélioré le diagnostic et permis une meilleure classification des LNH (9). Aujourd’hui, la classification la plus récente pour les néoplasies de phénotype T est celle de la World Health Organization/European Organization for Research and Treatment of Cancer (WHO/EORTC) (**Tableau I**) (10). Ces néoplasies présentent des caractéristiques particulières, notamment au point de vue de leur épidémiologie, étiologie, leurs particularités cliniques, réponses aux traitements et valeurs pronostiques (9).

Tableau I

Classification WHO/EORTC des néoplasies de phénotype T

Leucémique/disséminé

Leucémie/lymphome des cellules T matures

Nodal

Lymphome T périphérique, non spécifié

Lymphome T angioimmunoblastique

Lymphome à large cellule anaplasique/cellule anergique, type systémique primaire

Extranodal

Lymphome T sous-cutané à panniculite

Lymphome T $\gamma\delta$ cutané

Lymphome T $\gamma\delta$ hépato-plénique

Lymphome T/NK extraganglionnaire nasal et type nasal

Lymphome T type entéropathique

Adapté de Rizvi *et al.* 2006 (9)

1.1.2. Stade d'évolution

Selon le stade de progression de la maladie, les patients présenteront différentes atteintes telles que présentées selon la classification d'Ann Arbor (11). Le stade I implique l'atteinte d'une seule région ganglionnaire; le stade II se réfère à l'atteinte de plus d'une région ganglionnaire du même côté du diaphragme; le stade III est caractérisé par l'atteinte de régions ganglionnaires des deux côtés du diaphragme alors que le stade IV représente une dissémination à des sites extra-ganglionnaires, incluant toutes atteintes du foie, de la moelle osseuse et des ganglions pulmonaires (11).

1.1.3. Traitements

Les LNH peuvent être divisés en deux groupes pronostics. D'une part, on retrouve les lymphomes indolents, avec un pronostic relativement bon, qui peuvent être traités avec la radiothérapie. D'autre part, pour les lymphomes de type agressif, l'administration d'agents chimiothérapeutiques est fréquemment employée. Le traitement le plus utilisé comprend quatre agents chimiothérapeutiques, soit la cyclophosphamide, la doxorubicine, la vincristine et la prednisone (9). En général, avec les traitements actuels, la survie moyenne des patients avec un LNH après 5 ans est approximativement de 50 à 60 %. La vaste majorité des rechutes se produisent dans les deux premières années suivant la thérapie (12). De nouveaux traitements alternatifs sont présentement à l'étude ou dans certains cas déjà disponibles aux patients afin de pallier au problème des cellules néoplasiques résistantes à la radiothérapie et à la chimiothérapie (13). Par exemple, les proto-oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs impliqués dans la pathogenèse des LNH représentent des candidats potentiels pour ces nouvelles thérapies. Le transfert d'un gène p53 sauvage par vecteur adénoviral est présentement à l'étude et pourrait trouver application dans le traitement du LNH (14). Plus récemment, la production d'un anticorps monoclonal anti-CD30 couplé à une forme mutante de l'exotoxine de *Pseudomonas* pourrait être utilisé dans le traitement des LNH (15). Un anticorps monoclonal dirigé contre TfR (*transferin receptor*) des cellules infectées par HTLV-1 (mAb A24) est actuellement en développement et pourrait s'avérer efficace contre le lymphome T de l'adulte (16). Des agents induisant une différenciation, une réduction de la prolifération et la mort cellulaire, tels qu'un modulateur de protéine kinase C (PKC) (enzastaurin) (17) et un inhibiteur de l'histone déacétylase (depsipeptide) (18) sont présentement utilisés chez des patients atteints d'un LNH. Des oligonucléotides anti-sens pouvant bloquer l'expression de différents gènes, comme des anti-bcl2 (*B-cell lymphoma/leukemia-2*) sont maintenant en études cliniques et pourraient se révéler un moyen efficace pour induire l'apoptose des cellules cancéreuses (13). La combinaison de ces différentes thérapies avec la radiothérapie et la chimiothérapie peut s'avérer très efficace (9). Par exemple, l'utilisation d'un anti-CD20 contre les cellules du lymphome B (rituximab) en combinaison avec la chimiothérapie standard a amélioré de façon significative la survie des patients (19). Les études en cours sont donc une source de thérapies nouvelles et complémentaires aux traitements conventionnels.

1.2. Modèle murin de lymphome T

Le développement de modèles expérimentaux reproduisant la progression tumorale en contexte physiologique sont des outils très efficaces pour élucider non seulement les mécanismes moléculaires de la maladie, mais aussi l'identification de nouvelles cibles et marqueurs thérapeutiques. La lymphomagenèse des cellules T est un processus à plusieurs étapes débutant par le développement des cellules prélymphomateuses dans la moelle osseuse et le thymus, et se terminant avec la dissémination systémique des cellules de lymphome vers les organes comme le foie, la rate, les reins, les ganglions lymphatiques et les ovaires. Expérimentalement, le lymphome T peut être induit en irradiant des souris avec de faibles doses de rayons X où l'on observe le développement d'un lymphome thymique en quelques semaines. Ce modèle de lymphome thymique radio-induit chez la souris a été développé par Henry S. Kaplan dans les années 1950 (20). Cette radiation ne permet que le développement des cellules prélymphomateuses à partir de cellules souches hématopoïétiques précoces dans la moelle osseuse. Pour compléter la transformation néoplasique, les cellules prélymphomateuses doivent passer par le thymus où le contact intercellulaire avec le stroma thymique et la présence des cytokines locales induit la transformation en cellules de lymphome T (21, 22). Dans le but d'établir des lignées cellulaires expérimentales, les cellules de lymphome peuvent être récupérées et maintenues en culture. Une fois réinjectées dans le thymus de souris syngéniques, ces cellules donneront naissance à des lymphomes thymiques habituellement sans métastases en d'autres organes, alors qu'injectées par voie intraveineuse, ces mêmes cellules de lymphome vont mener au développement de métastases au foie, à la rate et aux reins (23). Dans le laboratoire du Dr. St-Pierre, les lignées cellulaires 164T2 et 267 ont ainsi été générées suite à la culture *in vitro* d'un lymphome thymique induit par l'irradiation de souris C57BL/6 (24). Le modèle murin et les lignées cellulaires de lymphome permettent d'étudier le rôle de diverses molécules, dont des molécules d'adhésion, dans le développement du lymphome et lors des étapes successives passant par la croissance localisée au thymus jusqu'à la formation de métastases.

1.3. Molécules d'adhésion

Les interactions entre les lymphocytes et l'endothélium jouent un rôle crucial dans le système immunitaire en contrôlant l'accès de sous-types spécialisés de lymphocytes dans les tissus particuliers, influençant de cette façon la nature des réponses immunitaires et

inflammatoires locales. Au niveau moléculaire, ce processus d’interactions intercellulaires est régulé par les molécules d’adhésion à la surface des lymphocytes et leurs ligands à la surface des cellules endothéliales en concert avec des chimiokines. Les lymphocytes tout comme les cellules endothéliales programment spécifiquement l’expression des molécules d’adhésion et des chimiokines/récepteurs de chimiokines afin de permettre aux lymphocytes un tropisme sélectif dans les tissus de l’organisme (25, 26). Les molécules d’adhésion impliquées dans la dissémination du lymphocyte constituent un groupe structurellement varié de récepteurs membranaires reposant sur plusieurs familles de molécules: les sélectines (27), les intégrines (28) et la grande famille des immunoglobulines (29). Ces différentes familles de molécules d’adhésion révèlent des propriétés spécifiques de liaison aux ligands essentielles pour le processus de dissémination lymphocytaire et pour la mise en place des réponses immunitaires adéquates (26).

1.3.1. Interaction lymphocyte-endothélium

Basée sur des observations *in vitro* et *in vivo*, l’interaction du lymphocyte avec l’endothélium peut être décrit comme un processus séquentiel (**Figure 1**). L’étape initiale consiste à l’attachement transitoire et au roulement du lymphocyte sur l’endothélium vasculaire. Ce roulement est modulé par les molécules d’adhésion de la famille des sélectines localisées à la surface du lymphocyte et de l’endothélium (30). Cette étape est transitoire et réversible jusqu’à l’activation des intégrines induite par l’expression des chimiokines. Les protéoglycans héparane sulfates exprimées sur l’endothélium contribuent à l’activation des intégrines via une concentration et une présentation des chimiokines à leurs récepteurs. Par exemple, la liaison des chimiokines CXCL12, CXCL13, CCL21, CXL10 et CCL17 (31) aux récepteurs couplés aux protéines G induit plusieurs voies de signalisations (32, 33) qui vont activer les intégrines LFA-1 (*leukocyte function-associated antigen-1*) (α L β 2), α 4 β 1 et α 4 β 7 chez les lymphocytes. Les intégrines vont permettre l’adhésion ferme des lymphocytes à la surface de l’endothélium, où elles reconnaîtront leurs ligands spécifiques de la grande famille des immunoglobulines soit ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*), VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) et MadCAM-1 (*mucosal addressin cell adhesion molecule-1*). Par la suite, l’adhésion ferme et l’expression de PECA-1 (*platelet/endothelial cell adhesion molecule-1*) à la fois sur la surface des lymphocytes et des cellules endothéliales mèneront à la transmigration du lymphocyte (34). Le tropisme lymphocytaire dans le modèle d’interaction lymphocyte-endothélium est donc

déterminé par la combinaison unique de molécules d'adhésion et de récepteurs de chimiokines sur les membranes cellulaires.

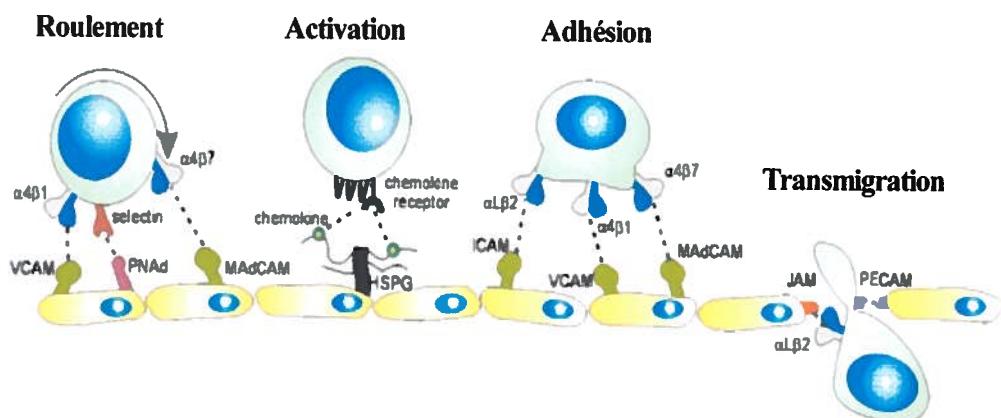


Figure 1.1: Interaction du lymphocyte avec l'endothélium. Les interactions des sélectines avec leurs ligands présentant des groupements carbohydrate sialylés initient le roulement des lymphocytes sur l'endothélium. Les chimiokines, présentées par les protéoglycanes héparanes-sulfates (HSPG) exprimées sur l'endothélium, lient les récepteurs des chimiokines, des récepteurs couplés aux protéines G, pour activer les intégrines à la surface des lymphocytes. L'interaction des intégrines avec leurs ligands spécifiques de la grande famille des immunoglobulines mène à l'adhésion ferme des lymphocytes sur l'endothélium et à la transmigration qui implique également PECAM-1. Adapté de Pals *et al.* 2007 (26).

1.3.2. Molécules d'adhésion et dissémination du lymphome

Plusieurs études ont montré l'implication des molécules d'adhésion dans la dissémination du lymphome (25, 35). Afin de vérifier si l'absence de molécules d'adhésion peut réduire la dissémination des lymphomes, l'équipe du Dr. St-Pierre combina l'utilisation de souris déficiente en ICAM-1 et les lignées de cellules de lymphome générées par irradiation selon le modèle de Kaplan décrit préalablement. Lorsque les cellules de lymphome 164T2 sont injectées à des souris normales, on observe le développement de métastases au foie, à la rate et aux reins. Par contre, lorsque injectées aux souris déficientes en ICAM-1, aucune tumeur ne se développe, démontrant que les souris déficientes en ICAM-1 sont résistantes à la dissémination des cellules de lymphome 164T2 (36). Puisque l'on observe aucune métastase chez les souris déficientes en ICAM-1, on vérifia par la suite la capacité des cellules de lymphome à se rendre dans les organes cibles de ces souris. Pour ce faire, les cellules 164T2 furent marquées à l'indium et les cinétiques de migration comparées chez les souris normales et déficientes en ICAM-1. Ils ont observé que les cellules de lymphome migraient avec les mêmes cinétiques dans les souris normales et

déficientes en ICAM-1 (36). Cette observation a également été observée avec des souris déficientes en sélectines (37). Ces résultats démontrent l'importance des molécules d'adhésion dans la dissémination du lymphome, mais à des étapes subséquentes à la migration vers les organes cibles. Les molécules d'adhésion joueraient un rôle dans la métastasie du lymphome principalement en tant qu'inducteurs de signaux intracellulaires.

Les propriétés de signalisation des molécules d'adhésion en font de bons candidats pour la propagation d'une cascade de signalisation menant à la production de gènes impliqués dans la migration, la prolifération, la survie, les interactions cellule-cellule ou cellule-matrice extracellulaire, l'angiogenèse ou encore dans les mécanismes d'évasion du système immunitaire (24, 38). En effet, lors de l'adhésion des cellules de lymphome à l'endothélium, il a été démontré que la liaison LFA-1/ICAM-1 participe à l'induction de l'expression de métalloprotéases de la matrice (MMPs) dans les cellules de lymphome (24, 39, 40). La surexpression des MMPs dans les tumeurs primaires et/ou les métastases est connue pour être associée à des processus tumorigéniques (41). Pour ce qui est des gènes modulés dans les cellules endothéliales lors des contacts entre les cellules de lymphome et endothéliales, ils demeurent encore peu connus. En plus de l'implication des molécules d'adhésion exprimées à la fois sur les cellules cancéreuses et les cellules endothéliales et des propriétés intrinsèques des cellules cancéreuses, le processus tumoral est également influencé par l'interaction des cellules cancéreuses avec le microenvironnement tumoral.

1.4. Concept du microenvironnement tumoral

Selon l'hypothèse du *Seed and soil*, l'habileté d'une cellule tumorale à croître en un organe spécifique est influencée par les facteurs environnementaux (42). Cependant, au cours des dernières décennies, la recherche s'est plutôt penchée dans l'identification d'oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeurs dans les cellules tumorales. Récemment, des études ont démontré l'importance du microenvironnement dans la croissance maligne et les mécanismes moléculaires régissant la tumorigénèse (43). Il est maintenant établi que les tumeurs sont composées de plusieurs cellules stromales en plus des cellules cancéreuses. Parmi les cellules stromales impliquées dans la promotion tumorale, on retrouve les cellules endothéliales qui composent les systèmes de vaisseaux sanguins et lymphatiques, des péricytes, des fibroblastes et une variété de cellules dérivées de la moelle osseuse, incluant des macrophages, des neutrophiles, des

mastocytes, des cellules suppresseurs myéloïdes et des cellules souches mésenchymateuses (**Figure 2**). Ces dernières sont connues pour être recrutées à la tumeur afin de favoriser la métastasie. Le microenvironnement tumoral est également composé de la matrice extracellulaire et des molécules sécrétées par l'ensemble de ces cellules (44). La matrice extracellulaire est une structure dynamique, en relation directe avec les cellules. Elle sert de support pour les tissus, de substrat pour la migration cellulaire, mais aussi de ligand pour les facteurs de croissance et cytokines (41).

1.4.1. Implication du microenvironnement tumoral

Plusieurs études supportent l'hypothèse que le microenvironnement tumoral n'est pas seulement un spectateur passif, mais plutôt un participant actif de la transformation cellulaire. Premièrement, les altérations génétiques et épigénétiques dans les cellules cancéreuses ne peuvent délimiter complètement leur phénotype tumoral et leur particularité clinique. Par exemple, des analyses de matrices différentielles d'ADN complémentaire ont été employées pour classer des sous-types de cancer du sein et prédire les résultats cliniques. Ces études de profils génétiques pour comparer des carcinomes mammaires *in situ*, invasifs et métastatiques n'ont pas réussi à identifier des signatures géniques spécifiques pour chacun des stades tumoraux (45-48). Ainsi, au-delà des propriétés malignes intrinsèques des cellules cancéreuses, d'autres facteurs comme le microenvironnement tumoral peuvent réguler la progression, l'invasion et la métastasie. Deuxièmement, le microenvironnement cellulaire normal peut inhiber la prolifération tumorale et la formation d'un cancer. En effet, des études ont démontré que des cellules myoépithéliales et des fibroblastes normaux pouvaient supprimer la croissance, l'invasion, et l'angiogenèse dans plusieurs types de cancers du sein (49, 50). Troisièmement, le stroma tumoral peut créer un environnement permissif pour la tumorigénèse, notamment via les fibroblastes associés à la tumeur connus pour favoriser l'angiogenèse, la prolifération et l'invasion de cellules cancéreuses (51). Une autre étude a démontré que des cellules dérivées de la moelle osseuse colonisaient des sites spécifiques bien avant l'arrivée des cellules tumorales, établissant ainsi une niche pré-métastatique qui facilite la croissance tumorale vers les organes périphériques (52). Finalement, le microenvironnement tumoral est de plus en plus considéré comme une cible thérapeutique potentielle. À l'inverse des cellules cancéreuses, les cellules stromales du microenvironnement, génétiquement plus stables, n'acquièrent guère de résistance aux

traitements, et peuvent être des cibles thérapeutiques. Par exemple, des traitements anti-angiogéniques ont été développés pour cibler les cellules endothéliales (53). Dans des modèles murins de cancer du sein, du côlon et pulmonaire non à petites cellules, la suppression des macrophages associés à la tumeur diminue l'angiogenèse, la croissance et la métastasie (54). De façon similaire, une approche vaccinale ciblant les fibroblastes associés à la tumeur inhibe la croissance tumorale d'un modèle murin du cancer du côlon résistant à plusieurs traitements (55). À ce jour, il existe une foule d'informations sur des cibles thérapeutiques potentiels du microenvironnement tumoral passant des récepteurs cellulaires aux molécules solubles sécrétées par l'ensemble de ces cellules (56).

1.4.2. Cible thérapeutique

Le tableau II présente une liste non exhaustive de molécules du microenvironnement tumoral ciblées à des fins thérapeutiques et les agents spécifiques interagissant avec ces cibles. Par exemple, l'agent anti-angiogénique neovastat est connu pour inhiber des composantes du processus angiogénique, notamment des MMPs (MMP-2, MMP-9 et MMP-12) (57). Les MMPs peuvent promouvoir la progression tumorale en agissant sur plusieurs processus inflammatoires dans les néoplasies. Elles peuvent recruter les cellules inflammatoires en libérant des chimiokines de la matrice extracellulaire ou en générant des facteurs de croissance et ainsi augmenter la prolifération cellulaire. Les MMPs activent également l'angiogenèse en plus de posséder des fonctions anti-apoptotiques (58). Des études ont également souligné l'importance de la protéine STAT3 (*signal-transducer and activator of transcription protein*) dans le cancer du poumon. Ce facteur de transcription induit l'expression des gènes de fibrinogènes connus pour stimuler la croissance tumorale et la métastasie via le contrôle de l'adhésion cellulaire, de l'invasion et de l'angiogenèse (59). Certains composés comme un triterpénoïde synthétique agissent au niveau de la régulation de la phosphorylation de STAT3 afin de prévenir des adénocarcinomes pulmonaires (60). Dans les cellules endothéliales, les effets anti-angiogéniques du sulphoraphane (61) ont été reliés à l'inhibition de l'activité NF- κ B (*nuclear factor- κ B*) (62) et de VEGF (*vascular endothelial growth factor*) (61). Il a également été démontré que le sulphoraphane contrôle la fonction du facteur de transcription HIF1 α (*hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit inhibitor*) dans les cellules endothéliales en inhibant l'expression de gènes cibles d'HIF1 α (61). De plus, en tant qu'inhibiteur de déacétylase d'histone, le sulphoraphane induit l'acétylation et la dégradation

d'HIF1 α (63). L'interaction du tamoxifène avec les récepteurs estrogéniques, quant à elle, inhibe l'angiogenèse par la suppression de la synthèse de VEGF (64). L'altération de la principale voie de transduction de TGF β (*transforming growth factor, beta-1*), la voie Smad, dans les lymphocytes T stromaux mène au développement de cancers épithéliaux spontanés dans le tractus gastro-intestinal de souris (65). De nouveaux composés synthétiques, comme le CDDO (2-Cyano-3,12-dioxooleana-1,9(11)-dien-28-oylimidazole), dérivé de l'acide oléanolique et l'imidazolide, ont été identifiés comme des activateurs de la voie de signalisation Smad et de TGF β (66). L'utilisation d'anticorps neutralisants envers l'intégrine $\beta 1$ du microenvironnement a permis de sensibiliser les cellules cancéreuses à la chimiothérapie (67). On constate ainsi que la plus grande percée thérapeutique viendra d'une meilleure compréhension du microenvironnement tumoral. D'autant plus que des approches thérapeutiques ciblant les cellules cancéreuses et le microenvironnement tumoral semblent de plus en plus prometteuses. Enfin, les facteurs de transcription, par leur action pléiotropique sur plusieurs gènes, demeurent des cibles indéniables.

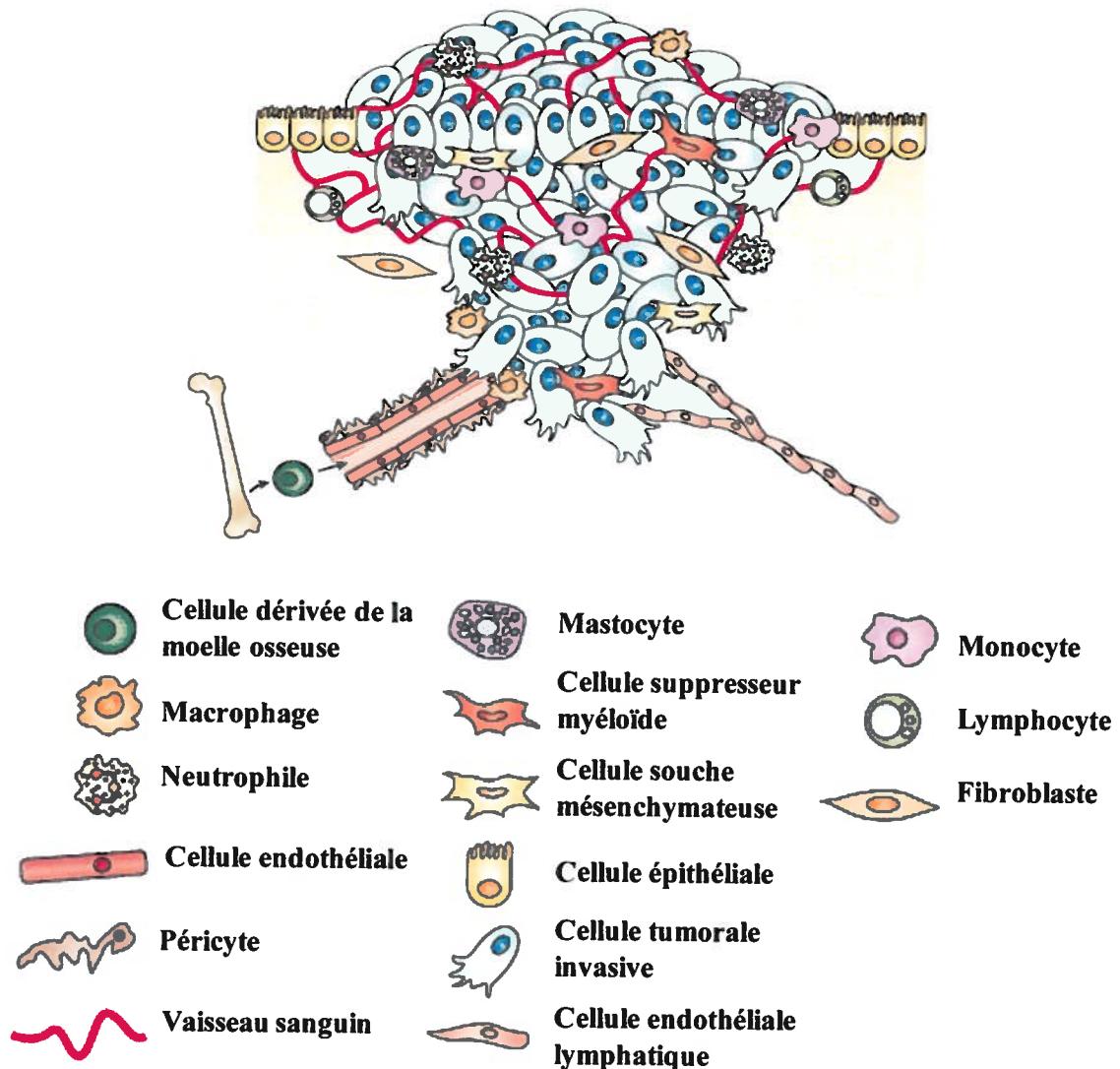


Figure 1.2: Le microenvironnement tumoral. Les cellules cancéreuses dans les tumeurs sont entourées d'un microenvironnement complexe composé de nombreuses cellules incluant des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et lymphatiques, des fibroblastes stromaux et d'une variété de cellules dérivées de la moelle osseuse incluant des macrophages, des cellules suppresseurs myéloïdes, des monocytes et des cellules souches mésenchymateuses. Adapté de Joyce et Pollard. 2009 (44).

Tableau II
Quelques cibles thérapeutiques du microenvironnement tumoral

Molécules ciblées	Traitement	Référence
Déacétylase d'histone	Sulphoraphane	(63)
HIF1 α	Sulphoraphane	(61)
Intégrine $\alpha 5\beta 1$	Volociximab	(67)
MMP-2	Neovastat	(57)
MMP-9	Neovastat	(57)
MMP-12	Neovastat	(57)
Nf- κ B	Sulphoraphane	(62)
PDGFR	Imatinib Mesylate	(68)
PKC β	Enzastaurin	(69)
Récepteurs aux estrogènes	Tamoxifen	(64)
STATs	CDDO-Imidazolidide	(60)
TGF β 1	CDDO-Imidazolidide	(66)
VEGF	Sulphoraphane	(61)
VEGFR	Vatalanib	(70)

2. EGR-1 : facteur de transcription à réponse précoce pour les signaux extracellulaires

2.1. Gènes à réponse précoce/immédiate

Les altérations phénotypiques se produisant dans les cellules sont déterminées par la manière qu'une cellule répond aux signaux extracellulaires. Ces signaux peuvent prendre la forme de facteurs de croissance, d'hormones, de neurotransmetteurs, et de protéines de la matrice extracellulaire. Pour relier ces signaux se déroulant à la surface cellulaire à des modifications à long terme dans l'expression génique, des mécanismes doivent exister pour dicter les changements physiologiques nécessaires à la cellule (71). Les gènes à réponse précoce/immédiate (*immediate early response genes*) sont les premiers gènes ciblés par les divers systèmes de messagers intracellulaires reliant les événements membranaires aux noyaux. Ces gènes sont définis par une induction transcriptionnelle rapide et transitoire indépendamment de la synthèse protéique *de novo*.

2.1.1. Facteurs de transcriptions à réponse précoce/immédiate

Une classe de gènes à réponse précoce/immédiate code pour des facteurs de transcription inductibles (72). L'importance de ces facteurs de transcription repose sur le fait qu'ils modulent l'expression des gènes à réponse retardée/tardive qui nécessite une synthèse de facteurs de transcription pour leur expression. De cette façon, les facteurs de transcription à réponse précoce/immédiate initient une cascade d'interaction gène-protéine qui, ultimement, mène à un changement physiologique dépendant de l'état de différenciation de la cellule stimulée et de la nature du stimulus initial. En plus d'être induit par des facteurs de croissance dans un contexte de prolifération cellulaire, les gènes des facteurs de croissance précoce/immédiats sont également induits par une variété de signaux qui vont générer une multitude de réponses biologiques pour la cellule. Les facteurs de transcription les mieux caractérisés dans le groupe des précoce/immédiats sont AP-1 (*activator protein-1*), qui se compose des membres des familles fos et jun, et EGR (*early growth response*) (73). AP-1 et EGR possèdent toutefois des propriétés structurales différentes et sont sujets à des mécanismes de régulation distincts sans compter, qu'ils sont impliqués dans différents programmes d'expression des gènes à réponse retardée/tardive.

2.2. Famille EGR

Les facteurs de transcription de la famille EGR sont définis par deux critères : ils reconnaissent une séquence d'ADN riche en GC (la séquence consensus EGR) et se lient à cette séquence via trois motifs à doigt de zinc très conservés de la classe Cys₂His₂ (74), où chacun des doigts chevauche 3 nucléotides (75). Le motif tire son nom de la boucle d'acides aminés qui dépasse du site de liaison de l'ion zinc. Les doigts sont généralement organisés comme une série de répétitions en tandem de 28-30 acides aminés comprenant deux cystéines et deux histidines à des positions invariables avec la séquence consensus CX₂₋₄CX₃FX₅LX₂HX₂₋₄H où X représente des acides aminés moins conservés. Les résidus invariants de cystéines et d'histidines dirigent le repliement autour de l'ion de zinc qui stabilise le motif à doigt de zinc (76). La famille EGR, très conservée parmi les espèces (77), est constituée des membres EGR-1 (78), EGR-2 (79), EGR-3 (80), EGR-4 (81) et du produit du gène de la tumeur de Wilm, WT1 (*Wilms tumor 1*) (82). EGR-1 est exprimé ubiquitairement par plusieurs types cellulaires alors que les autres membres sont plutôt restreints dans leur expression (73).

2.2.1. EGR-1: le prototype de la famille EGR

Le facteur de transcription à doigt de zinc EGR-1, aussi connu sous le nom de zif268 (*zinc finger-268*) (83), NGFI-A (*nerve growth factor-induced gene*) (84), Krox24 (85), et TIS8 (86), a été découvert indépendamment par plusieurs laboratoires recherchant des gènes essentiels pour la croissance, la prolifération ou la différenciation cellulaire. Suivant une stimulation avec divers signaux, EGR-1 est rapidement induit afin d'initier la transmission d'information dans les fibroblastes, les cellules épithéliales et endothéliales (87).

2.2.2. Structure

Le gène *Egr-1*, localisé sur le chromosome 5q23-q31 codant pour deux exons (78), produit une protéine nucléaire de 533 acides aminés avec une masse moléculaire de 82 kDa composée de trois motifs à doigt de zinc de la classe Cys₂His₂ (88) (Figure 3). Le domaine de liaison à l'ADN d'EGR-1 est constitué des motifs à doigt de zinc, alors qu'aux extrémités N- et C-terminale, on retrouve des domaines d'activation (89, 90). Dépendamment du type cellulaire, EGR-1 peut se comporter comme un régulateur positif ou négatif de la transcription (91, 92) en reconnaissant préférentiellement les séquences consensus spécifiques, 5'-GCGT/GGGGCG-3' ou

5'-TCCT/ACCTCCTCC-3' (93-97). Entre les domaines d'activation en N-terminale et le domaine de liaison à l'ADN, un domaine de répression a été identifié (98). Ce domaine de répression sert de site de liaison pour deux co-répresseurs, NABI et NAB2 (*NGFI-A binding protein*), qui inhibent l'activité biologique d'EGR-1 (98-100). EGR-1 étant connu pour induire l'expression du gène *Nab2* (101), ce dernier peut contrôler son activité biologique via un feedback négatif passant par la synthèse de NAB2.

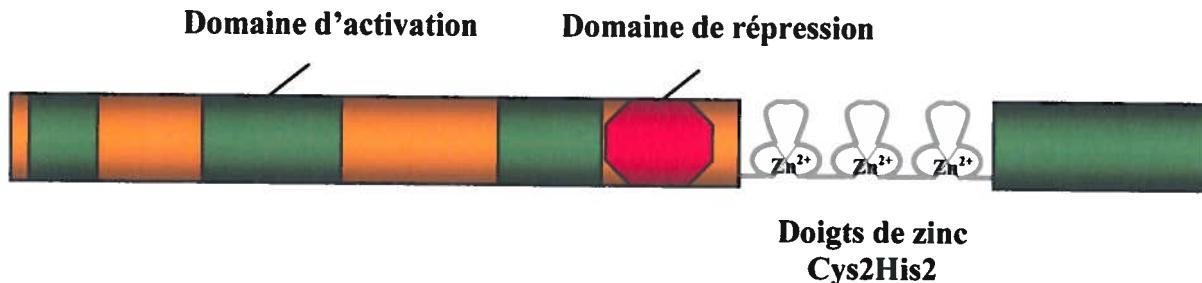


Figure 1.3: Structure du facteur de transcription EGR-1. Les différents membres de la famille EGR possèdent une structure similaire à EGR-1: des domaines d'activation aux extrémités N- et C-terminale, un domaine de liaison à l'ADN composé de trois motifs à doigt de zinc et un domaine de répression qui est un site de liaison pour les co-répresseurs NAB1 et NAB2.

2.2.3. Inducteurs d'EGR-1

L'expression d'EGR-1 est rapidement et transitoirement induite par une panoplie d'inducteurs pour les différents types cellulaires (Tableau III), montrant ainsi le nombre impressionnant de modulateurs pour ce facteur de transcription. Les principaux inducteurs d'EGR-1 sont les facteurs de croissance EGF (*epidermal growth factor*) (102), PDGF (*platelet-derived growth factor*) (103), FGF (*fibroblast growth factor*) (104), HGF (*hepatocyte growth factor*) (105), VEGF (*vascular endothelial growth factor*) (106) et GMCSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) (107), les cytokines IL-1 (108), IL-3 (107) et TNF α (*tumor necrosis factor alpha*) (109) et les esters de phorbol, comme la PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*) (110). Egr-1 peut également être induit suivant une exposition à la thrombine (111), aux LPS (*lipopolysaccharide*) (112) ou durant l'hypoxie (113). Enfin, l'expression d'EGR-1 a aussi été rapportée pour être induite par les UV (ultraviolet) (114), la radiation ionisante (115) et par l'insuline (116).

2.2.4. Cascades de transduction

Bien qu'EGR-1 comprend une multitude d'inducteurs différents, son induction passe principalement par la voie de transduction des MAPK (*mitogen-activated protein kinases*). Les MAPK sont activées par des cytokines, des facteurs de croissance, des agents mitogènes, des hormones, le stress ou encore l'inflammation. Elles contribuent au contrôle de la croissance, de la différenciation et de la survie cellulaire (117). L'activation des MAPK requiert la phosphorylation de résidus tyrosine et thréonine par les MAPK kinases (MAPKK) spécifiques, permettant leur translocation au noyau où elles activent les facteurs de transcription par phosphorylation. Il existe trois voies distinctes pour les MAPK qui peuvent activer EGR-1.

Tableau III
Inducteurs de l'expression d'EGR-1

Inducteurs	Type de cellules	Références
EGF	Endothéliale	(102)
PDGF	Gliale	(103)
FGF	Gliale	(104)
HGF	Mélanocyte	(105)
VEGF	Endothéliale	(106)
GMCSF	Fibroblaste	(107)
IL-1	Épithéliale	(108)
IL-3	Fibroblaste	(107)
TNF α	Fibroblaste	(109)
PMA	Monocyte	(110)
Thrombine	Kératinocyte	(111)
LPS	Monocyte	(112)
Hypoxie	Ostéoblaste	(113)

La voie classique est régulée par les signaux extracellulaires et passe par ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinases*). Cette voie est fortement activée par les stimulations provenant de facteurs de croissance et des esters de phorbol et de façon plus modérée par divers mécanismes cellulaires tels la différenciation et la migration. Il a été démontré qu'une expression constitutive de MAKK, la kinase responsable de la phosphorylation et de l'activation d'ERK, mène à la stimulation de l'activité transcriptionnelle du promoteur EGR-1 (103). Cette synthèse d'EGR-1 passant par la voie Ras-Raf-MEK-ERK1/2 est supportée par de nombreuses études

(112, 118, 119). La voie JNK (*JUN NH₂-terminal kinase*) est plutôt induite par le stress métabolique et fait intervenir la protéine SAPK (*stress-activated protein kinase-2*). Les cytokines pro-inflammatoires, comme IL-1, et les facteurs de croissance, comme FGF, ont la particularité d'induire de façon importante EGR-1 par la voie JNK (104, 108). Finalement, la troisième voie des MAPK est nommée la voie p38. L'anisomycine induit EGR-1 via p38, menant à la liaison du facteur de transcription CREB (*cAMP responsive element binding protein*) (120). Les différentes voies des MAPKs convergent ainsi vers l'induction de l'expression d'EGR-1.

Parallèlement, certaines études ont démontré que la voie de transduction JAK/STAT agit sur l'induction d'EGR-1. Cette voie joue un rôle proéminent dans les processus inflammatoires, incluant la prolifération cellulaire, l'apoptose, et la différenciation (121). L'induction d'EGR-1 par GMCSF chez les granulocytes passerait principalement par l'activation de la voie STAT5 (122). STAT6 jouerait plutôt un rôle clé dans l'induction d'EGR-1 par IL-13 dans des fibroblastes pulmonaires, alors que STAT1 exercerait le rôle opposé (123).

2.2.5. Éléments transcriptionnels impliqués dans l'expression d'Egr-1

La séquence régulatrice du promoteur *Egr-1* comprend un éventail de sites de liaison pour les facteurs de transcription, principalement situés dans les 600 p.b. en amont du site d'initiation de la transcription (Figure 4). Cette séquence inclut cinq sites de reconnaissance pour les éléments SRE (*serum response element*), un site de reconnaissance pour les éléments CRE (*cyclic AMP response element*), deux sites SP-1, un site NF-kB, ainsi qu'un site de liaison EBS (*EGR-1 binding site*) (119, 124). Au cours des dernières années, plusieurs études ont précisé le rôle de ces différents sites de liaison de facteurs de transcription dans l'expression d'EGR-1 par la cellule.

Les sites SREs représentent les principaux sites responsables de l'induction transcriptionnelle d'EGR-1 par les facteurs de croissance et les cytokines, une délétion de ces sites inhibant l'induction d'EGR-1 (119). Dans plusieurs types cellulaires, l'activation des MAPKs ERK, JNK ou p38 mène à une augmentation de l'activation d'Elk1 (*Eph-like kinase*) (125). Ce dernier est un membre de la famille des facteurs de transcription Ets et joue un rôle crucial dans l'induction d'EGR-1 par les facteurs de croissance (126). La phosphorylation et l'activation d'Elk1 permet la formation d'un complexe avec le facteur SRF (*serum response factor*) et les protéines accessoires de SRF (Sap) sur les sites SREs pour activer la transcription (127). Le site CRE du promoteur *Egr-1* ne fonctionnerait pas comme un élément d'induction

(128, 129) car un activateur de l'adénylate cyclase, la forskoline, ne stimule pas l'activité du promoteur (130). Toutefois, une étude récente a démontré que CRE serait nécessaire pour l'expression d'EGR-1 induit par l'acide lysophosphatidique (131). Pour les sites AP-1 et NF- κ B, aucune fonction majeure a été identifiée au niveau de la régulation du promoteur EGR-1. Le site EBS est quant à lui associé à une régulation transcriptionnelle à la baisse par la liaison d'EGR-1 (95). Ce mode de régulation constitue un autre mécanisme de régulation négatif.

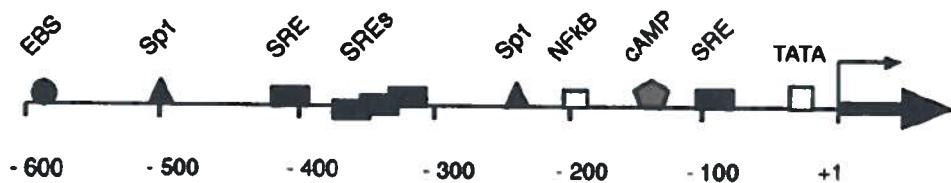


Figure 1.4: Région régulatrice du promoteur humain d'EGR-1. Le site d'initiation de la transcription est indiqué par une flèche. La région régulatrice 5' contient une boîte TATA, plusieurs sites de reconnaissance pour les éléments SRE, un site de reconnaissance pour les éléments CRE et des sites de liaison pour les facteurs de transcription SP-1 et NF- κ B. EGR-1 peut également lier son propre promoteur via le site EBS (132).

2.2.6. Régulation d'EGR-1

L'expression et la fonction d'EGR-1 dans les cellules est régulée à plusieurs niveaux différents. Le gène *Egr-1* possède dans la région 3' une séquence de dégradation de l'ARN contrôlant la demi-vie de l'ARNm d'EGR-1 (133). Au niveau protéique, EGR-1 contient un site consensus de phosphorylation (84), plus spécifiquement un résidu sérine (133), et cette phosphorylation d'EGR-1 accentue l'activité de liaison à l'ADN (134, 135). Parallèlement, la phosphorylation peut perturber l'interaction d'EGR-1 avec un facteur inhibiteur cellulaire connu pour diminuer l'habileté de transactivation d'EGR-1 (90). Plusieurs sites potentiels de *N*-glycosylation sont présents dans la protéine EGR-1, notamment dans le second motif à doigt de zinc. La glycosylation d'EGR-1 pourrait avoir comme principal effet la régulation de l'activité de liaison à l'ADN (136). Cette activité de liaison est également dépendante de la présence de Zn^{2+} , de Fe^{2+} ou de Mn^{2+} (88).

Au niveau de l'activité transcriptionnelle d'EGR-1, de plus en plus de facteurs de transcription et de régulation sont connus pour co-opérer positivement ou négativement avec EGR-1 (**Tableau IV**). Par la spécificité du site de liaison sur l'ADN ou par des interactions physiques avec d'autres facteurs de transcription, EGR-1 peut induire ou inhiber la transcription

génique. Par exemple, comme les sites consensus de SP-1 et d'EGR-1 se chevauchent fréquemment (91, 137), il a été démontré que la liaison d'EGR-1 peut être en compétition avec celle de SP-1 (138) ou encore, EGR-1 peut s'associer avec SP-1 afin de réguler l'expression de certains gènes (139-142).

Tableau IV

Interactions de quelques facteurs de transcription avec EGR-1

Facteur de transcription	Mécanisme	Effet	Références
NFAT	Interaction physique	↑ expression IL-2 et TNF α	(143)
SF-1	Synergie transcriptionnelle	↑ expression hormone lutéinisante	(144)
AP2	Synergie transcriptionnelle	↑ expression PNMT	(145)
p300	Coordonne la synergie	↑ expression hormone lutéinisante	(144)
p65	Interaction physique	Séquestre NF- κ B des promoteurs ciblés	(140)
p53	Interaction physique	nd	(146)
SP1	Interaction physique	↓ expression GMCSF	(142)
NAB1	Interaction physique	co-répresseur d'EGR-1	(98)

2.2.7. Adhésion cellulaire et contrôle transcriptionnel d'EGR-1

Les mécanismes qui régulent les gènes à réponse précoce/immédiate lors de l'adhésion cellulaire demeurent encore très peu connus. Nous savons que *c-fos* est régulé lors de l'adhésion cellulaire dans les cellules endothéliales et les fibroblastes (147). Récemment, il a été rapporté qu'EGR-1 est induit lors d'une adhésion dépendante des intégrines par une activation du récepteur EGF (EGFR) en absence d'un ligand (148). Plus spécifiquement, lors de l'adhésion cellule-matrice extracellulaire, l'association entre l'intégrine β I et EGFR à la surface cellulaire résulte en l'activation de la voie PI3K/Akt qui abolie la répression transcriptionnelle exercée par le facteur de transcription FoxO1 sur le promoteur *Egr-1*. Dans l'ensemble, l'adhésion n'est pas

seulement suffisante pour induire l'expression d'EGR-1, mais elle est nécessaire lors d'une stimulation EGF. En effet, EGF n'est pas en mesure d'induire EGR-1 en absence de l'adhésion cellulaire avec la matrice extracellulaire (102), indiquant que les voies de signalisation activées par les intégrines sont essentielles pour la régulation transcriptionnelle d'EGR-1.

2.3. Fonctions d'EGR-1

EGR-1 est un régulateur transcriptionnel très influent puisqu'il contrôle l'expression d'une grande variété de gènes. Des analyses de matrices différentielles d'ADN complémentaire ont donné un aperçu du spectre de gènes dépendant d'EGR-1. L'expression de plus de 300 gènes était altérée après l'infection des cellules HUVEC (*human umbilical vein endothelial cell*) avec un adénovirus exprimant une forme d'EGR-1 résistante à la répression transcriptionnelle de l'inhibiteur NAB1 et par la transfection de fibroblastes humains avec un vecteur d'expression EGR-1 (149, 150). Les résultats obtenus permettent de réaliser qu'EGR-1 régule presque toutes les catégories de gènes. On peut grouper les gènes où l'expression est altérée par EGR-1 en facteurs de transcription et de signalisation, en cytokines et facteurs de croissance, en régulateurs du cycle cellulaire et des canaux ioniques. Il n'est donc pas surprenant qu'EGR-1 est reconnu pour exercer un rôle dans plusieurs processus cellulaires dont la prolifération, la différenciation, l'apoptose et le système immunitaire.

2.3.1.Prolifération

Un facteur de transcription à réponse précoce comme EGR-1, induit par des stimuli mitogéniques en absence d'une synthèse protéique *de novo*, constitue la première étape dans l'expression des protéines régulatrices de la croissance cellulaire. Depuis la découverte du gène *Egr-1*, considérablement de recherches ont été dirigées envers la fonction d'EGR-1 dans la croissance et la prolifération. En effet, l'induction d'EGR-1 a été suivie dans plusieurs types cellulaires en réponse aux mitogènes (132) et un rôle direct dans le contrôle de la prolifération a été identifié pour les cellules T, les astrocytes, les cellules gliales et les kératinocytes (103, 111, 151, 152).

2.3.2. Différenciation

L'étude la plus compréhensive sur le rôle d'EGR-1 dans la différenciation a été réalisée par le groupe de Leibermann et Hofmann (153, 154), en utilisant la lignée cellulaire leucémique myéloblastiques humaine HL-60, qui peut se différencier en macrophage ou en granulocyte par un traitement avec la PMA ou le DMSO (diméthylsulfoxyde) respectivement. Les auteurs ont démontré que l'inhibition d'EGR-1 lors du traitement avec la PMA bloquait la différenciation des HL-60 en macrophages, tandis qu'une surexpression d'EGR-1 inhibait la différenciation en granulocytes induite par le DMSO. Ensemble, ces données montrent que *Egr-1* est un gène à réponse précoce pour la différenciation en macrophage qui restreint la différenciation de la voie granulocytaire. *In vivo*, la différenciation des macrophages n'est pas affectée chez les souris déficientes en EGR-1, suggérant que EGR-1 n'est pas requis pour cette différenciation (155). Comme les différents membres de la famille EGR partagent un haut degré d'homologie structurale et fonctionnelle (156), ces derniers peuvent compenser la perte d'EGR-1 pour le contrôle de la différenciation des macrophages. Ce phénomène de compensation est également observé au niveau de la prolifération cellulaire où des astrocytes dérivés d'une souris déficiente en EGR-1 prolifèrent toujours après une stimulation EGF, mais en présence d'un dominant négatif interférant avec la liaison à l'ADN pour toutes les protéines EGR, la prolifération est inhibée (157).

2.3.3. Apoptose

EGR-1 est reconnu pour déployer des activités pro-apoptotiques en modulant différents éléments de la cascade de signalisation apoptotique. Le gène suppresseur de tumeur *p53* est un médiateur central de la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose (158). EGR-1 est connu pour réguler *p53* via une transactivation de son promoteur (159) ou par une interaction physique entre EGR-1 et *p53* (146). Par exemple, dans le mélanome, EGR-1 induit directement l'activité transcriptionnelle de *p53* et l'apoptose (160). Une autre étude a démontré que des fibroblastes de souris déficientes en EGR-1 étaient résistants à l'apoptose induite par des radiations en comparaison avec des fibroblastes de souris normales où la fonction pro-apoptotique d'EGR-1 était reliée à la modulation du gène *p53* (159). Dans le neuroblastome, la synthèse rapide d'EGR-1 et de *p53* est associée à l'apoptose induite par l'oxyde nitrique (161, 162). Par contre, dans les fibrosarcomes HT1080, EGR-1 a un rôle anti-apoptotique en neutralisant l'apoptose dépendante

de p53 par la coordination de l'activation de TGF β 1, de la fibronectine, de p21 et de la focal adhésion kinase (FAK) menant à l'augmentation de l'attachement cellulaire et à la diminution de l'activité caspase (163). Enfin, la nature des modifications post-transcriptionnelles peut déterminer un rôle pro- ou anti-apoptotique pour EGR-1 (164). Par exemple, l'induction d'EGR-1 par le sérum mène à l'expression de p300/CBP, à l'acétylation d'EGR-1, et à l'induction de gènes de survie et de croissance, alors que les UV induisent la phosphorylation d'EGR-1 et une réponse pro-apoptotique dans des cellules du cancer de la prostate (164).

2.3.4. Réponse immunitaire

EGR-1 est un facteur de transcription impliqué dans la modulation de la réponse immunitaire par l'activation des cellules T et B. Les études ont démontré qu'EGR-1 fonctionne comme un régulateur positif en modulant l'expression de cytokines et de molécules co-stimulatrices (165), et en interagissant avec le facteur NFAT (*Nuclear factor of activated T-cells*) (143). Dans les cellules B, l'expression d'EGR-1 est induite par une stimulation du BCR (*B-cell Receptor*) et implique les voies des protéines kinases C et de la calcineurine. Tout dépendant de l'état cellulaire, EGR-1 va activer les cellules B matures ou induire l'apoptose des cellules B immatures (166). De plus, dans les lymphocytes B, des sites de liaison pour EGR-1 ont été identifiés dans les régions régulatrices des gènes *ICAM-1* (167) et *CD44* (168), des gènes connus pour réguler le patron de migration lymphocytaire et les contacts intracellulaires. Ces sites sont liés par EGR-1 suivant la liaison de l'antigène au BCR.

L'activation et les fonctions effectrices des lymphocytes T sont également contrôlées par EGR-1 connu pour réguler la transcription d'IL-2 et de TNF α après une stimulation du TCR (*T-cell receptor*). Une région de liaison pour les protéines à doigt de zinc (ZIP) sur le promoteur de l'IL-2 a été déterminée comme un élément clé de la régulation transcriptionnelle. Ainsi, lorsque la cellule T est à l'état de repos, SP-1 exprimé de façon constitutive est lié à la région ZIP du promoteur de l'IL-2, et lors d'une stimulation, le facteur inducible EGR-1 va se lier à cette région pour induire l'expression de l'IL-2 (169). Il a également été démontré que des hétérodimères formés par les facteurs de transcription EGR-1 et NFAT, de même que SP-1, sont responsables de l'expression de l'IL-2 et de TNF α (143, 170). La surexpression d'EGR-1 et l'utilisation d'ARN interférant ont démontré qu'EGR-1 est requis pour la transcription de la molécule co-stimulatrice CD40 ligand dans les cellules T CD4 $^+$ (171). Enfin, les souris

déficientes en EGR-1 présentent un défaut dans la sélection positive résultant en une réduction du pourcentage de cellules T CD4⁺ et CD8⁺ dans le thymus (172).

2.4. EGR-1 et cancer

Les fonctions associées à EGR-1 lui confèrent des rôles qui peuvent être avantageux pour la cellule, mais aussi défavorables. EGR-1 est connu pour contrôler la prolifération, mais peut aussi entraîner la mort cellulaire en induisant l'apoptose. Dans le cas du cancer, le même phénomène est observé. Pour certains types de tumeurs, EGR-1 semble avoir un rôle anti-tumoral alors que dans d'autres types elle semble favoriser le développement du cancer.

2.4.1. EGR-1 : facteur pro-tumorigénique

Il est bien connu que la croissance des tumeurs primaires, mais également des métastases, est dépendante de l'angiogenèse (173). Pour étudier le rôle d'EGR-1 dans l'angiogenèse, Fahmy *et al.* (174) ont utilisé des DNAzymes pour en inhiber l'expression. Les DNAzymes sont des enzymes dépendantes de cations composées entièrement d'ADN et construites pour cliver l'ARN messager de gènes spécifiques. Ces DNAzymes ont permis d'inhiber l'expression protéique d'EGR-1, la réPLICATION et la migration de cellules endothéliales vasculaires et la formation de microtubules dans des matrices formées de membrane basale. De plus, l'utilisation de ces DNAzymes a permis de supprimer la croissance *in vivo* de carcinome mammaire humain MCF-7 chez des souris nues. Ces agents ont également permis d'observer une diminution de l'expression de FGF-2, un facteur proangiogénique en aval d'EGR-1. Une autre étude a démontré l'implication de HGF à réguler l'expression des facteurs angiogéniques PDGF et VEGF en induisant l'expression d'EGR-1 (175).

Dans le cancer de la prostate, plusieurs évidences supportent la notion qu'EGR-1 favorise la progression tumorale. Le croisement des souris déficientes en EGR-1 avec un modèle transgénique qui développe de façon spontanée une néoplasie invasive de la prostate a retardé la tumorigénèse (176). L'utilisation d'antisens EGR-1 a renversé le phénotype transformé *in vitro* (177) et a retardé le développement tumoral *in vivo* (177, 178). Une surexpression d'EGR-1 a également été observée dans un adénocarcinome de la prostate humaine en comparaison avec des tissus normaux (179, 180). Dernièrement, il a été démontré que, dans différentes lignées cellulaires du cancer de la prostate, p53 mutant induit l'expression d'EGR-1. En retour, EGR-1

régule l'expression et la sécrétion de cytokines qui induisent une boucle d'activation constitutive du récepteur EGF et de la voie de transduction ERK, qui mène éventuellement à la progression tumorale (181).

2.4.2. *Egr-1* : gène suppresseur de tumeur

Les diverses fonctions associées à EGR-1 lui confèrent un certain potentiel dans l'altération du développement tumoral en contribuant à la suppression tumorale par plusieurs mécanismes. Les recherches effectuées jusqu'à maintenant indiquent qu'EGR-1 est impliqué dans l'inhibition de la croissance, de la survie de la cellule tumorale et de l'angiogenèse. De plus, de faibles niveaux d'expression d'EGR-1 ont été associés à plusieurs types de cellules tumorales humaines en comparaison avec leur contrepartie normale (182). En somme, un nombre croissant de publications suggèrent un rôle pour EGR-1 dans la suppression tumorale.

2.4.3. Inhibition de la croissance et de la survie des cellules tumorales

L'initiation du développement du cancer se produit lorsqu'une cellule normale subit une transformation néoplasique, résultat d'une altération dans les mécanismes de régulation du cycle cellulaire et d'apoptose. Des études ont démontré l'implication d'EGR-1 dans l'inhibition de ce phénomène où EGR-1 régule directement plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs incluant *TGF β 1* (*transforming growth factor, beta-1*), la *fibronectine*, *PTEN* (*phosphatase and tensin homolog*) et *p53* (183) (Tableau V). Par exemple, l'expression d'EGR-1 dans les fibrosarcomes HT1080 a été associée à la synthèse et à la sécrétion de TGF β 1 qui agit de manière autocrine pour supprimer la croissance (184). D'autres études ont également démontré une corrélation entre l'expression de TGF β 1 et d'EGR-1 (185, 186). Dans plusieurs lignées cellulaires de glioblastome, l'expression d'EGR-1 induit l'expression de la fibronectine. Une fois sécrétée dans le milieu extracellulaire, la fibronectine augmente l'attachement cellulaire et diminue la croissance (187). Dans les cellules HT1080, EGR-1 coordonne l'expression de TGF β 1 et de la fibronectine pour restaurer un phénotype normal dans ces cellules (188). Il a aussi été rapporté que la transcription du gène pro-apoptotique *PTEN* est régulée par EGR-1 après irradiation des souris sauvages et non dans les souris déficientes en EGR-1, ce dernier étant un des premiers facteur de transcription identifié pour réguler directement l'expression de *PTEN* via un site de liaison fonctionnel (189). En ce qui concerne le contrôle de l'expression du gène *p53*, Krones-

Herzig *et al.* ont démontré à l'aide d'un modèle murin qu'EGR-1 agit en tant que *gatekeeper* en aval de la voie p53 afin d'induire l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose (190).

Egr-1 est également un gène clé induit lors des radiation ionisantes pour induire l'arrêt de la croissance ou la mort cellulaire des cellules tumorales. Les gènes ciblés par EGR-1 en réponse au radiation ionisante, incluent *TNF α* , *p53*, *Rb* (*retinoblastoma protein*) et *Bax* (*BCL2-associated X protein*), ces derniers étant connus pour induire l'apoptose (191). Une étude a montré que l'inhibition de la fonction de transactivation d'EGR-1 par un dominant négatif lors d'une radiation ionisante inhibait l'induction de *TNF α* et de l'apoptose (192). Le même groupe démontra aussi qu'EGR-1 était responsable de l'activation transcriptionnelle du promoteur *TNF α* via un site consensus EGR-1 (192). Dans le cas de p53, l'expression d'EGR-1 lors de l'apoptose induite par les radiations ionisantes accroît l'expression et régule la stabilité de p53 via la transactivation de Rb. En absence d'EGR-1, Rb n'est pas transactivé et ne peut se lier sur MDM2 (*Mdm2 p53 binding protein homolog*) pour empêcher la dégradation de p53 par MDM2 (191). Finalement, dans une lignée cellulaire du cancer de la prostate déficiente en p53, l'apoptose était directement régulée par une interaction du co-activateur YAP-1 (*Yes-associated protein 1*) avec EGR-1 où ce complexe induit l'expression de Bax, et par le fait même, altère le ratio Bcl-2/Bax (193).

2.4.4. Inhibition de l'angiogenèse tumorale

Lors de l'induction transitoire d'EGR-1, ce dernier joue un rôle central dans la réponse transcriptionnelle des cellules endothéliales pour l'expression de facteurs de croissance angiogéniques VEGF et bFGF, produits dans plusieurs tumeurs (174). Une étude utilisant la surexpression d'EGR-1 par transfection d'adénovirus exprimant EGR-1 a plutôt démontré une inhibition de l'angiogenèse (194). C'est ainsi que Lucerna *et al.* ont démontré que l'expression soutenue d'EGR-1 dans les cellules endothéliales HUVEC menait à un état anti-angiogénique caractérisé par une réponse altérée en VEGF et bFGF, et par une inhibition de la fonction des microtubules *in vitro*. L'utilisation d'adénovirus exprimant EGR-1 inhibait également l'invasion cellulaire et la formation de vaisseaux dans un modèle de Matrigel murin. Ils démontrent aussi qu'EGR-1 interfère avec des processus spécifiques essentiels à l'angiogenèse. BRAK/CXCL14, un ligand de chémokine connu pour bloquer la chémotaxie endothéliale et l'angiogenèse, de même que TIMP-3, connu pour bloquer la liaison de VEGF à VEGFR-2, étaient régulés à la

hausse par une expression soutenue d'EGR-1 (194). Ainsi, le rôle d'EGR-1 dans l'angiogenèse semble, du moins en partie, relié à la nature de l'induction : pro-angiogénique après une expression transitoire et anti-angiogénique après une expression constitutive.

Tableau V
Régulation de gènes suppresseurs/modulateurs de la croissance par EGR-1

Gènes	Types cellulaires	Mécanisme	Références
<i>TGFβ1</i>	Fibrosarcome	Direct	(186, 188)
	Carcinome pulmonaire non à petites cellules	Indirect	(185)
<i>Fibronectine</i>	Fibrosarcome	Direct/indirect	(163, 188)
	Glioblastome	Direct/indirect	(187, 195)
<i>PTEN</i>	Fibroblaste	Direct	(189)
	Carcinome squameux	Indirect	(196)
	Carcinome de la prostate	Indirect	(197)
<i>p53</i>	Fibroblaste	Direct/indirect	(190, 198)
	Lymphome B	Indirect	(199)
	Mélanome	Directe	(200)

Mécanisme direct : évidence qu'EGR-1 se lie au promoteur en question pour réguler la transcription; indirect : rôle de régulation pour EGR-1 sans démonstration d'un mécanisme spécifique.

2.5. EGR-1 dans les tumeurs hématopoïétiques

L'implication d'EGR-1 dans les cancers hématopoïétiques a d'abord été mise en évidence dans la lignée cellulaire leucémique myéloblastique M1 où l'expression ectopique d'EGR-1 retarde la leucémogénèse *in vivo* (201). Pour définir le mécanisme par lequel *Egr-1* agit comme un gène suppresseur de tumeur dans les cellules myéloïdes, le groupe de Liebermann et Hoffman ont évalué l'impact d'EGR-1 sur l'inhibition du programme de différenciation induit par l'expression déréglée des oncogènes c-Myc et E2F-1. Ils démontrent que l'expression constitutive du régulateur positif de la différenciation EGR-1 abolie l'inhibition de la différenciation myéloïde induite par l'expression déréglée de c-Myc et d'E2F-1 et diminue

l'agressivité de ces lignées leucémiques dans des souris nues (202, 203). Consistent avec un rôle de suppresseur de tumeur, une délétion du gène *Egr-1* sur le chromosome 5 a été associée à la leucémie aiguë myéloïde (204) et au lymphome du Syndrome de Bloom (205). Dans des essais *in vitro*, l'inhibition de l'expression d'EGR-1, par ARN interférence dans les cellules leucémiques myéloblastiques HL-60, supprime les effets inhibitoires des traitements avec l'inhibiteur pharmacologique LY29 et avec la thalidomide (206, 207). À ce jour, le rôle d'EGR-1 dans le lymphome demeure très peu connu. Avec des modèles murins, Joslin *et al.* (208) ont démontré qu'en réponse à l'agent mutagène N-nitroso-N-éthylurée (ENU), les souris déficientes en EGR-1 développent des lymphomes T immatures ou des désordres myéloprolifératifs à des taux et fréquences plus élevés en comparaison avec les souris sauvages. Cette étude à d'ailleurs permis d'établir que la perte d'une seule allèle d'*Egr-1* est suffisante pour la progression néoplasique en coopération avec des mutations secondaires (208). Par contre, dans le lymphome B, l'expression constitutive d'EGR-1 dépendante des voies ERK et JNK est nécessaire pour la survie et la croissance tumorale (166, 209).

2.6. EGR-1 et le microenvironnement tumoral

Moins de données sont disponibles quant à la relation entre le microenvironnement tumoral et EGR-1, mais une étude récente démontre que ce microenvironnement peut moduler l'expression d'EGR-1 (210). En effet, une co-culture entre des cellules de myélomes multiples et des ostéoclastes induit une diminution des niveaux d'expression de JUN et d'EGR-1 dans les cellules cancéreuses contribuant à la survie et à la prolifération des myélomes multiples, de même qu'à la résistance au traitement avec le bortezomib. L'inhibition de l'expression d'EGR1 dans les myélomes multiples abroge l'inhibition de la croissance et l'apoptose induite par la surexpression de JUN. En fait, EGR-1 agit en aval de JUN pour induire l'apoptose via l'inhibition de la survivine et l'activation de la voie des caspases (210). Il est cependant évident que les mécanismes précis par lesquels EGR-1 peut engendrer des effets anti-tumoraux par le biais du microenvironnement tumoral sont encore mal connus et pourraient varier selon le type de tumeurs.

On constate, à la lumière de ces différents travaux de recherche qu'*Egr-1* joue principalement un rôle de gène suppresseur de tumeur et ce, dans plusieurs types de cancer. De plus, comme le site de liaison d'EGR-1 est présent dans les promoteurs d'une panoplie de gènes, un rôle original au niveau du microenvironnement tumoral pourrait lui être attribué lors de l'interaction des cellules de lymphome avec l'endothélium via la modulation de gènes connus pour inhiber le processus tumoral.

Chapitre II

EGR-1 activation by EGF inhibits MMP-9 expression and lymphoma growth

Contribution des auteurs

J'ai effectué tous mes travaux de mémoire sous la direction du Dr. Yves St-Pierre, élaboré et réalisé la majorité des expériences présentées dans l'article, de même que participé à l'analyse et à l'interprétation des résultats. J'ai également rédigé le manuscrit en collaboration avec Simon D. Bélanger et le Dr. Yves St-Pierre.

Simon D. Bélanger a initié, avant mon arrivé au laboratoire, le projet de recherche et a réalisé les figures 1 et 2 ainsi que le tableau I.

Katherine Biron-Pain a participé à la mise au point des souris transgéniques pour le promoteur *MMP-9* fusionné au gène de la *luciférase* et des protocoles pour l'imagerie bioluminescence (Xenogen).

Sommaire du travail expérimental

La progression de plusieurs types de cancers d'origine hématopoïétique, incluant les lymphomes non hodgkinien, est dépendante de l'interaction avec les cellules stromales du microenvironnement tumoral, notamment des cellules endothéliales et des fibroblastes. Bien que le laboratoire a démontré que les cellules stromales peuvent activer les cellules de lymphome, l'inverse, soit l'habileté des cellules de lymphome à activer les cellules stromales est très peu connu. Une approche génomique a permis d'identifier que l'expression du gène *Egr-1* est induite dans les cellules stromales lors des contacts avec les cellules de lymphome. EGR-1 est un facteur de transcription connu pour son implication dans la régulation transcriptionnelle de nombreux gènes dont certains sont reliés au processus tumoral.

L'objectif principal du travail présenté dans l'article était de déterminer le rôle du facteur de transcription EGR-1, exprimé par les cellules stromales du microenvironnement, dans la croissance du lymphome thymique. Les études *in vitro* effectuées ont démontré que lors du contact intercellulaire, le facteur de croissance EGF sécrété de façon constitutive par les cellules de lymphome est le facteur responsable de l'induction de l'expression d'EGR-1 dans les cellules stromales. *In vivo*, l'injection de cellules de lymphome surexprimant EGF par voie intrathymique mène à l'inhibition significative de la croissance du lymphome thymique. Comme MMP-9 joue divers rôles dans le développement des lymphomes non hodgkinien, la relation entre EGF, EGR-1 et MMP-9 a été étudiée. À l'aide d'un modèle de souris transgénique qui permet de détecter l'activation de MMP-9 dans les cellules de l'hôte, l'activité transcriptionnelle du promoteur MMP-9 dans les thymus est diminuée par les cellules de lymphome surexprimant EGF. L'ajout d'EGF recombinant a induit l'expression d'EGR-1 et a diminué celle de MMP-9 dans les cellules stromales, et l'expression ectopique d'EGR-1 dans des cellules stromales inhibe l'expression constitutive et induite de MMP-9. Il semble donc que, lors de la croissance du lymphome thymique, *Egr-1* a un rôle de gène suppresseur de tumeur puisque le développement tumoral est inhibé et ce, via possiblement un contrôle sur l'activité transcriptionnelle du promoteur *MMP-9*.

Acceptation de l'article pour publication

BLOOD/2009/257030

EGR-1 activation by EGF inhibits MMP-9 expression and lymphoma growth
Frédéric Bouchard, Simon D. Bélanger, Katherine Biron-Pain, and Yves St-Pierre

Decision: Accept - Submit to First Edition; **Decision Date:** 22 Apr 2010

Date Received: 31 Mar 2010

Editor: Richard Van Etten

Article Type: Regular Article

Primary Scientific Category: Lymphoid Neoplasia

Corresponding Author: Yves St-Pierre

Keywords: NEOPLASIA, Lymphomas and Other Lymphoproliferative Conditions; NEOPLASIA, Lymphomas and Other Lymphoproliferative Conditions, Transcription factor changes; NEOPLASIA, Lymphomas and Other Lymphoproliferative Conditions, Signal transduction; NEOPLASIA, Lymphomas and Other Lymphoproliferative Conditions, Signaling therapies; EGF; Matrix metalloproteinases (MMP); Thymic lymphoma; egr-1

Blood Journal

2021 L St. NW, Suite 900, Washington, DC 20036-4929 USA

Tel: 202-776-0548; Fax: 202-776-0549; Email: editorial@hematology.org

Copyright © 2010 by The American Society of Hematology

EGR-1 activation by EGF inhibits MMP-9 expression and lymphoma growth.

Running title: Regulation of MMP-9 expression by EGR-1

Frédéric Bouchard¹, Simon D. Bélanger¹, Katherine Biron-Pain, and Yves St-Pierre

Running title: Egr-1 inhibits mmp-9 expression

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

¹These authors contributed equally to this work.

*This study was supported by the Cancer Research Society of Canada and the Canadian Institutes for Health Research (CIHR). F.B. is supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. S.D.B. is supported by the Terry Fox Foundation through the National Cancer Institute of Canada.

Corresponding author.

Yves St-Pierre, Ph.D.
INRS-Institut Armand-Frappier
531 Boul. des Prairies,
Laval, Québec, Canada
H7V1B7
Phone : 450-686-5354
Fax : 450-686-5501
E-mail: yves.st-pierre@iaf.inrs.ca

Word count: 4 500 words of text

Scientific heading : Lymphoid neoplasia

1. Abstract

Progression of hematological malignancies is strongly dependent on bi-directional interactions between tumor cells and stromal cells. Expression of members of the matrix metalloproteinase (MMP) family by stromal cells is a central event during these interactions. However, although several studies have focused on the mechanisms responsible for induction of MMP in stromal cells, the signals that negatively regulate their secretion in these cells remain largely unknown. Here, we provide evidence that MMP-9 production by stromal cells is suppressed through activation of EGR-1, thereby inhibiting the growth of thymic lymphoma. We found that EGR-1 expression is induced in stromal cells following contact with lymphoma cells via EGF. Moreover, development of thymic lymphoma was inhibited when induced by lymphoma cells overexpressing EGF compared to control lymphoma cells. Using transgenic mice containing MMP-9 promoter-driven luciferase transgene in its genome, we further demonstrated that EGF/EGR-1 repressed transcriptional activation of the *MMP-9* gene by stromal cells. *De novo* expression of *EGR-1* alone by gene transfer or exposure to recombinant human EGF also inhibited *MMP-9* expression. Taken together, these results indicate that EGR-1 could be a source of novel targets for therapeutic intervention in lymphoid tumors in which MMP-9 plays a critical role.

2. Introduction

Recent evidence has reinforced the notion that the tumor microenvironment plays a key role in the growth and survival of hematological malignancies.¹⁻³ In this tumor microenvironment, cancer cells are surrounded by numerous cell types including endothelial cells (EC) of the blood and lymphatic circulation, stromal fibroblasts and a variety of bone marrow-derived cells.⁴ Stromal cells express a wide variety of chemokine and growth factor receptors, rendering them responsive to the local production of soluble mediators, most notably during close contact with lymphoma cells. Interactions of tumor cells with these stromal elements are believed to be critical in the initiation and progression of the oncologic process.^{5,6} For example, we have previously shown that close contact between lymphoma cells and EC leads to the expression of several matrix metalloproteinases (MMP's), including MMP-9.⁷⁻⁹ Proteolytic remodeling of extracellular matrix in tumor progression by host-derived MMP-9 has also been observed both *in vivo* and *in vitro* in human and experimental models of cancers.¹⁰⁻¹⁴ While absence of MMP-9 does not prevent development of thymic lymphoma,¹⁵ abnormally high levels of MMP-9 has been shown to accelerate the growth of thymic lymphoma.¹⁴ However, while a large number of studies have focused on the molecular mechanisms that control the induction of MMP in stromal cells,¹⁶⁻²⁰ the nature of the signals which suppress MMP-9 secretion in peritumoral cells remains largely unknown.

The early growth response protein 1 (EGR-1) is a member of the immediate early gene family of transcription factors containing a DNA-binding domain consisting of three zinc fingers which regulates transcription through GC-rich, *cis*-acting promoter elements.^{21,22} EGR-1 controls the expression of a wide variety of genes, many of which play a pivotal role in the regulation of cell growth, differentiation, and apoptosis.²³ However, although several studies have shown that

EGR-1 promotes cancer progression,^{23,25} there is increasing evidence that EGR-1 may also exert tumor suppression.²⁶⁻³⁰ In leukemia, for instance, EGR-1 has been implicated in the apoptosis of myeloma cells via its interaction with c-JUN while it behaves as a tumor suppressor against the oncogenes E2F-1 and c-MYC.³¹⁻³³

In the present study, we found that *EGR-1* gene expression is induced in stromal cells upon close contact with lymphoma cells, an effect which is mediated by the epidermal growth factor (EGF). Using *in vivo* and *in vitro* experimental models, we further found that *de novo* expression of *EGR-1* induced by EGF inhibits the expression of MMP-9 and decreases the growth of thymic lymphoma.

3. Materials and methods

Mice. Breeder pairs for the C57BL/6 mouse colony were purchased from Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). The proMMP9-Luc transgenic mice containing MMP-9 promoter-driven luciferase transgene in its genome were generated in the 129 background by standard microinjection techniques. Transgenic founders were identified by PCR detection of *luciferase* gene from tail-clip DNA. The proMMP9-Luc transgenic lines were screened for constitutive luciferase expression following response to lipopolysaccharides (LPS). All transgenic lines showed inducible luciferase activity in multiple organs after LPS treatment while injection with saline did not induce luciferase expression. The founder which had the highest LPS-induced luciferase expression was selected for further studies and backcrossed to the C57BL/6 strain for at least five generations to generate progeny for further experiments. All animals were housed in a specific pathogen-free environment in accordance with institutional guidelines for animal care. Experiments were performed in accordance with institutional guidelines and approved by the local institutional animal care and use committee.

Cell lines and reagents. The origin of the 267, 164T2 and 164T2S11 T lymphoma cell lines has previously been described.³⁴ As a model to study lymphoma-EC interaction, we used the endothelioma cell line bEnd.3. In addition to expressing the von Willebrand factor, cells of this line express the same repertoire of adhesion molecules as those found on normal EC, including ICAM-1, VCAM-1, E-and P-selectins, CD31, and ICAM-2. The bEnd.3 cells upregulate the expression of cell adhesion molecules after stimulation with inflammatory cytokines such as IL-1 and TNF , with kinetics similar to those reported for primary ECs. The human Burkitt Raji B lymphoma, the human MDA-MB-231 breast carcinoma and the HEK 293 cell line was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). The MDA-MB-231 and

293 cell lines were maintained in culture in DMEM supplemented with 10% (v/v) FBS, 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES buffer. The B lymphoma and HT1080 cell lines were maintained in culture in RPMI 1640 and in DMEM, respectively, containing 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES buffer, 1 mM sodium pyruvate, 0.075% (w/v) sodium bicarbonate and supplemented with 10% (v/v) FBS. The T lymphoma and bEnd.3 cell lines were maintained in RPMI 1640 supplemented with 10% (v/v) FBS, 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES buffer and 55 µM β-mercaptoethanol. All products were purchased from Life technologies (Burlington, Ontario, Canada). Cell cultures were incubated at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. The mAb directed against human EGF receptor (EGF) (clone LA1) was purchased from Millipore (Jaffrey, NH). Recombinant human EGF and tumor necrosis factor α (TNFα) were purchased from Prospec TechnoGene (Rehovot, Israel) and Genzyme (Cambridge, MA), respectively.

***In vitro* lymphoma-endothelial cells interactions.** The bEnd.3 cells were seeded in 6- or 12-well plates (Corning, Acton, MA) and incubated overnight at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere until they reached approximately 80% confluence. Aliquots of 10⁷ lymphoma cells re-suspended in complete RPMI 1640 medium were then added to the layer of endothelial cells and the co-cultures incubated for 12 hours at 37°C. Controls included EC incubated without lymphoma cells. Lymphoma cells were removed from adherent cells using a warm solution of 0.004% trypsin-EDTA (Life technologies). The remaining adherent cells were then harvested using 0.05% trypsin-EDTA and sorted on the Epics elite system (Beckman Coulter, Miami, FL) based on size and granularity to discard the remaining lymphoma cells. The resulting bEnd.3 cell suspensions were immediately centrifuged and processed for RNA extraction and analysis by cDNA array.

Gene expression array. Total cellular RNA was extracted from bEnd.3 cells using a Qiagen RNeasy minikit (Qiagen, Chatsworth, CA). The Atlas cDNA Expression Array (Atlas Mouse 1.2, Clontech Laboratories, Palo Alto, CA) was performed according to the manufacturer's instructions. Briefly, using 50 µg of DNase-digested total RNA, Poly(A)⁺RNA was transcribed with Moloney murine leukemia virus transcriptase in the presence of [α -33P]dATP and purified by column chromatography (NucleoSpin Extraction Spin column; Clontech Laboratories). Prehybridization was carried out in ExpressHyb solution (Clontech Laboratories) containing 0.5 mg/ml sheared salmon testes DNA (Sigma-Aldrich) in hybridization bottles. The membranes were then hybridized with [α -33P]-labeled first-strand cDNA probes (10^7 cpm of each probe sample) overnight at 68°C in a hybridization oven. The membranes were then washed extensively (three 20-min washes in 2x SCC at 68°C, 1% SDS, followed by two 20-min washes in 0.1x SSC/0.5% SDS at 68°C and room temperature) and exposed to a PhosphorImager screen (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). The resulting hybridization signals were measured using a PhosphorImager SI (Molecular Dynamics). Arrays were analyzed using the ImageQuant 5.0 software (Molecular Dynamics). The gene expression in bEnd.3 cells following contact with thymocytes or lymphoma cells was compared with the corresponding bEnd.3 control population after normalization with housekeeping genes.

RNA isolation and semiquantitative RT-PCR. Total RNA was isolated from cells using Trizol reagent according to the manufacturer's instructions (Invitrogen Canada, Inc., Burlington, Ontario, Canada). Two micrograms of total RNA were reverse-transcribed using the Omniscript reverse transcriptase (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) and PCR-amplified using the following conditions: 94°C for 1 minute, 60°C for 1 minute, and 72°C for 1 minute, followed by a final extension step at 72°C for 10 minutes. The primers used for PCR amplification are (5'-TAA TAG

CAG CAG CAG CAG CAG C-3') for sense murine *EGR-1* and (5'-GTC GTT TGG CTG GGA TAA CTC G-3') for antisense, (5'-GGT CAG TGG CCT AGT GAG C-3') for sense human *EGR-1* and (5'-TGC TGT CGT TGG ATG GCA C-3') for antisense, (5'-AAG GTA CTC TCG CAG GGA AAT GG-3') for sense human *egf* and (5'- ACA TAC TCT CTC TTG CCT TGA CC-3') for antisense, (5'-CAA CAT CAC CTA TTG GAT CC-3') for sense human *mmp-9* and (5'-CGG GTG TAG AGT CTC TCG CT-3') for antisense, (5'-GAT AAA CCC AAA AAC CCC ACC TA-3') for sense human *mt1-mmp* and (5'-CCC TCC TCG TCC ACC TCA ATG-3') for antisense, (5'-CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT-3') for sense *gapdh* and (5'-AGC CTT CTC CAT GGT GAA GAC-3') for antisense and (5'-CAT GGA TGA CGA TAT CGC TGC GC-3') for sense *β-actin* and (5'-GCT GTC GCC ACG CTC GGT CAG GAT-3') for antisense. Thirty-five cycles of amplification (twenty-five cycles for *gapdh* and *β-actin*, RNA loading controls) were done in a thermal cycler (model PTC-100, MJ Research, Watertown, MA). The amplification for each gene was in the linear part of the curve. Amplified products were analyzed by electrophoresis on 1.5% agarose gels using Sybrsafe DNA staining (Invitrogen) and UV transillumination. Quantitative analysis was conducted using a computerized densitometric imager to obtain *EGR-1* or *mmp-9/gapdh* ratios.

Cloning of EGR-1 promoter. A 1222-bp DNA fragment of the mouse *EGR-1* promoter was isolated by PCR from the genomic DNA purified from bEnd.3 using the forward primer (5'-ACG GAG GGA ATA GCC TTT CG-3') and the reverse primer (5'-CAT CCC GGA CCA GCG AGC TGG-3'). The amplicon was ligated into pCR®4-TOPO® vector (Invitrogen, Carlsbad, CA) and subcloned into the promoter-less firefly luciferase reporter vector pGL3- Basic to create pGL3-promoter-EGR-1-luciferase (Promega, Madison, WI). For transduction analyses, the promoter-less pGL3-Basic vector was used as a negative control.

Transient transfections and luciferase assays. Transfections in 293 cells were performed using DNAfectine (ABM, Richmond, BC, Canada) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 7.5×10^4 cells/well (Corning 12-well plate) were seeded and cultured for 12 hours. At 80% confluence, cells were incubated with DNAfectine: DNA complexes containing 5 μ l of DNAfectine, 0.1 μ g of pGL3-EGR-1 promoter luciferase plasmid and 0.5 μ g of a control plasmid, the pRL-TK *Renilla* luciferase (Promega), in DMEM. Five hours later, the transfection mixture was replaced by regular growth medium. The co-culture assays were performed 24 hours post-transfection. In some cases, adherent cells were preincubated with blockings mAbs (10 μ g/ml) or isotypic control for 1 hour at 37°C and then washed with PBS to remove excess mAbs. For co-cultures assays, the stable transfectants (3×10^6 cells/well), the murine 267 T lymphoma cells (3×10^6 cells/well), the human Burkitt RAJI B lymphoma cells (3×10^6 cells/well), or the human MDA-MB-231 breast carcinoma cells (5×10^5 cells/well) were added to the epithelial layers. Cells lysis and luciferase assays were performed after 16 hours of co-cultures using the Dual-Luciferase Assay System (Promega) in a luminometer (Berthold Lumat LB 9507) and luciferase activity was normalized to the activity of the *Renilla* luciferase reporter gene to correct for transfection efficiency and the relative amount of luciferase activity in the untreated cells (ctrl) was designated as 1. In some experiments, 2 μ g of pCMV6-XL5-EGR-1 (Origene) or of an empty control vector were transfected in HT1080 cells using DNAfectin according to the manufacturer's instructions.

Induction of primary thymic lymphoma. Five- to 6-wk-old C57BL/6 mice (5-10 mice per group) were injected intrathymically (i.t.) in each thymic lobes with 5×10^3 EGF-expressing or control lymphoma cells. Mice were then regularly observed for clinical signs of thymic lymphoma (runting, swelling of the thorax, and dyspnea), which only appear at the end stage of

the disease and reveal imminent death owing to pulmonary compression by the oversized thymic tumor. When moribund, mice were sacrificed, and the presence of thymic lymphoma was confirmed and the tumor collected at necropsy.

***Ex vivo* promoter MMP-9 activity analysis.** Five- to 6-wk-old C57BL/6/proMMP9-Luc transgenic mice (5-10 mice per group) were injected i.t. in each thymic lobes with 5×10^3 EGF-expressing or control lymphoma cells. At 7 days post-injection, 150 mg/kg D-luciferin potassium salt (Regis Technologies, Morton Grove, IL) were injected i.p and 15 min later, mice were sacrificed. Thymuses were collected and imaged using the Xenogen IVIS imaging system. Thereafter, thymuses were crushed in Cell Culture Lysis Reagent (Promega) and luciferase assays were performed using the Luciferase Assay System (Promega).

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

4. Results

Identification of differentially expressed genes in bEnd.3 EC following contact with 164T2

T lymphoma cells. To screen for genes induced after contact between stromal cells and T lymphoma cells, we used an *in vitro* model in which the T lymphoma cells were co-cultured with the bEnd.3 endothelial cell line. This endothelioma cell line has been used by many investigators as an *in vitro* model to study the ability of normal and transformed cells to interact with vascular endothelium.³⁵⁻³⁸ Our previously published data and preliminary experiments using this model had established that a 12 h period of time was optimal to obtain a maximal induction of gene expression in EC following contact with lymphoma cells.⁷⁻⁹ After contact, the lymphoma cells were removed, the EC purified and an expression system was used to identify genes whose expression was modulated upon contact with lymphoma cells. Our results showed that while the percentage of genes that showed a relatively high change in their expression was rather limited (**Table I**), contact between T lymphoma cells and EC induced a strong upregulation of *EGR-1* (**Fig. 1A and 1B**), a gene encoding a transcription factor implicated in the transcription of multiple genes within the endothelium.³⁹ The induction of *EGR-1* in EC upon contact with T lymphoma cells was confirmed in independent experiments by RT-PCR analysis (**Fig. 2A**). Expression of *EGR-1* was also induced upon co-culture with thymocytes, 164T2 and aggressive T lymphoma cells 164T2S11. The upregulation of *EGR-1* was not due to the presence of contaminating T lymphoma cells following endothelial cell isolation after contact since RT-PCR analysis failed to detect expression of *L-selectin*, a gene specifically expressed in T cells but not in EC (**Fig. 2B**).

EGF induces EGR-1 expression at the transcriptional level in EC. EGR-1 has been known to be highly inducible in several cell lines stimulated by a wide variety of cytokines and growth

factors, most notably EGF.⁴⁰⁻⁴¹ We thus examined mouse and human lymphoma cells array for EGF expression and found that this growth factor was expressed constitutively in the human Raji B lymphoma cells (**Fig. 3A**) and in murine T lymphoma lines, including 164T2 T lymphoma cells (*See supplementary materials*). Our experiments also showed that *EGR-1* expression was upregulated by EGF in bEnd.3 cells (**Fig. 3B**). This ability of EGF to upregulate EGR-1 was confirmed in 293 cells transfected with a reporter vector containing the *EGR-1* promoter and treated with increasing doses of EGF (*See supplementary materials*). Most importantly, co-cultures between lymphoma and 293 cells conducted in presence or absence of blocking antibodies to EGFR confirmed the essential role of EGF secretion in inducing EGR-1 functional activity in stromal cells (**Fig. 3C**). Similar results were obtained using the MDA-MB-231 cells, which also constitutively express EGF. The functional relationship between EGFR and EGR-1 expression was specific, as demonstrated by the inability of control mouse IgG to block EGR-1 expression.

Overexpression of EGF in T lymphoma cells induces EGR-1 expression in stromal cells. We next transfected the 267 T lymphoma cells with the cDNA encoding EGF. The 267 cells are routinely used to generate stable transfectants or for transient transfection purposes in our experimental model system.^{14,34,40,42,43} Furthermore, these cells have a low metastatic phenotype resembling to that of 164T2.⁴⁴ Following selection with puromycin, multiple clones were obtained and characterized for EGF overexpression at the mRNA and protein levels by RT-PCR and by ELISA (*See supplementary materials*). To confirm the functional reconstitution of EGF activity in these clones, EGF transfectants (267Egf) were co-cultured with 293 cells and the levels of *EGR-1* transcript examined after 16 h of contact. Our results showed that EGF transfectants induced *de novo* expression of *EGR-1* in epithelial cells (**Fig. 4A and 4B**). No such

induction was observed upon contact of control transfectants (267Sra). Additional co-culture experiments using 293 cells transfected with *EGR-1* reporter vectors confirmed the ability of lymphoma cells transfected with EGF to increase EGR-1-mediated transcriptional activity (**Fig. 4C**). Moreover, addition of anti-EGFR blocking antibodies inhibited the ability of EGF transfectants to induce *EGR-1* promoter activity. The ability of EGFR blocking antibodies to reduce EGR-1 in presence of the control 267Sra cells was likely due to low levels of EGF and other EGFR ligands by 267 cells.

EGF expression modulates T lymphoma growth *in vivo*. We next compared the growth of thymic lymphoma induced by intrathymic injection of EGF transfectants with that of control lymphoma cells transfected with a control vector. Frequency and mean survival time were determined for several clones of each group. Our results showed that expression of EGF in lymphoma cells significantly ($p = 0.0138$) decreased lymphoma growth rate as the mean survival time of mice injected with EGF transfectants was 72 ± 8 days compared to 57 ± 15 days for control mice (**Fig. 5A and 5B**). No differences were detected between EGF- transduced cells and control cells in terms of *in vitro* growth when cells were grown in either 10% FCS or under conditions of lowered serum concentration (*data not shown*), consistent with the observations that lymphoma cells do not express EGFR. Taken together, these data show that overexpression of EGF causes a decreased malignant growth of lymphoma cells *in vivo*.

EGR-1 represses MMP-9 expression at the transcriptional level *in vitro* and *ex vivo*. We next investigated the mechanism by which EGF inhibits lymphoma growth *in vivo*. Previous studies have shown that contact between lymphoma and stromal cells leads to the induction of several members of the MMP family, such as MMP-10, MMP-3, and MMP-9.⁷⁻⁹ These genes, most notably *MMP-9*, play a primary role in the progression and invasiveness of many cancer types,

including leukemias.^{39,40} We thus examined the possibility that activation of EGR-1 by EGF modulated *MMP-9* gene expression. For this purpose, we used the human HT1080 cells, a classical model used to characterize *in vitro* the transcriptional mechanism regulating *MMP-9* gene expression. Our results showed that recombinant EGF, in a dose-dependent manner, induced *EGR-1* expression while inhibiting *MMP-9* expression (**Fig. 6A and 6B**). Constitutive and induced *MMP-9* expressions were also both inhibited following *de novo* expression of *EGR-1* in HT1080 cells by gene transfer (**Fig. 6C**). To determine whether expression of EGF could repress the transcriptional activation of *MMP-9* *in vivo*, we used a transgenic mouse model harboring the *MMP-9* promoter fused to a *luciferase* reporter gene and showed that intrathymic injection of EGF (267Egf) or control (267Sra) transfectants in transgenic mice inhibited the transcriptional activation of the transgenic promoter (**Fig. 7A**). To confirm the *in vivo* activity data observed by live imaging, luciferase activity was measured *ex vivo* in dissected organs of transgenic mice after injection of lymphoma cells overexpressing EGF. As compared with the control transflectants, transgenic mice injected with EGF lymphoma cells expressed significantly lower levels of luciferase activity in the thymus than mice injected with control transflectants (**Fig. 7B**), thereby supporting our *in vitro* data indicating that EGF/EGR-1 repress MMP-9 expression by stromal cells.

5. Discussion

Although it is well established that tumor-stromal cell interaction plays a significant role in tumor growth, the molecular mechanisms underlying these interactions are still unclear. In the present work, we provide evidence that MMP-9 production by stromal cells can be suppressed through activation of the EGF/EGR-1 pathway, thereby inhibiting the growth of thymic lymphoma. More specifically, we showed that: 1) EGR-1 expression is induced in EC and other stromal cell types following contact with lymphoma cells; 2) exposure of EGF is sufficient to induce the expression of EGR-1; 3) EGR-1 expression inhibits constitutive and induced *MMP-9* expression; and 4) the development of thymic lymphoma is inhibited when induced by lymphoma cells overexpressing EGF compared to control lymphoma cells. We therefore propose that the suppressive effect of EGR-1 is mediated by the ability of EGF/EGR-1 to repress MMP-9 expression in stromal cells since: (a) in transgenic mice harboring the MMP-9 promoter fused to a luciferase reporter gene, lymphoma cells transfected with the EGF cDNA, but not control cells, inhibited the transcriptional activation of *MMP-9* gene in stromal cells; (b) addition of EGF induced *EGR-1* expression and inhibited *MMP-9* expression in stromal cells, and; (c) *MMP-9* expression was inhibited following *de novo* expression of *EGR-1* by gene transfer. Taken together, these data indicate that EGR-1 signaling pathways could be a source of novel targets for therapeutic intervention in tumors in which MMP-9 plays a critical role.

In previous investigations, we had used *in vitro* experimental models to investigate the molecular changes that occur as a result of the bi-directional ‘cross-talk’ between tumor cells and EC.⁷⁻⁹ We had found that several genes, including those encoding *MMP*'s were significantly upregulated during the interactions between tumor and EC. Here, we found that contact between T lymphoma and EC induced the upregulation of several members of the immediate-early gene family that

include *c-fos*, *c-jun*, and *EGR-1*. We found that the most prominent change, however, was the upregulation of *EGR-1*, a broadly expressed member of the zinc-finger family of transcription factors induced in many cell types by a variety of cytokines and growth factors.²² Based on their fast kinetic of induction, immediate-early genes are normally induced within minutes in cells, triggering diverse signals that control cell growth and differentiation.⁴⁵ We also found that EGF is a potent inducer of *EGR-1*, which is consistent with previous studies indicating that EGF stimulates *EGR-1* in many cells types.⁴¹ and with the idea that *EGR-1* has significant tumor suppressing properties. Previous studies have indeed shown that *EGR-1* inhibits tumor progression via its ability to induce TGF expression.⁴⁶ Others have shown that *EGR-1* can also act as gatekeeper of the p53 tumor suppressor, thereby promoting apoptosis of tumor cells.^{47,48} To our knowledge, however, the ability of EGF/*EGR-1* to specifically inhibit *MMP-9* gene activation has yet to be reported. Whether this inhibition is observed in specific or thymic stromal cell types remains, however, unclear. The ability of *EGR-1* to modulate *MMP-9* expression by stromal cells is critical in the context of lymphoma progression since several studies have shown that in humans, *MMP-9* is associated with high grade non-Hodgkin's lymphoma, while in pre-clinical models, its expression promotes lymphoma growth.^{49,50}

Our data showing a suppressive activity of EGF/*EGR-1* on *MMP-9* gene expression are also consistent with those recently reported by Rockel *et al.*⁵¹ who showed that *COL2A1* and *AGC1* genes, which encode Type II collagen and aggrecan matrix proteins and play a central role in extracellular matrix remodeling, are inhibited by *EGR-1* DNA binding activity. The authors showed that *COL2A1* and *AGC1* transcription was most likely due to the inhibitory effects of *EGR-1* on Sp1 binding sites that overlap with *EGR-1* binding sites in the promoters. Although no such classical *EGR-1* binding site is present within the *MMP-9* proximal promoter, we believe

that such competition between EGR-1 and Sp1 could impact on the *MMP-9* promoter since previous studies have shown that EGR-1 can compete with Sp1 in absence of such classical binding sites.⁵² Moreover, the inhibitory effect of EGF/EGR-1 could be observed using a reporter vector encoding several Sp1 binding sites. Alternatively, it is also possible that *MMP-9* transcriptional activity, which is dependent on NF-κB,⁵³ is linked to the ability of EGR-1 to suppress the NF-κB pathway.⁵⁴ EGR-1 is indeed known to repress NF-κB transcriptional activity in a regulatory way by preventing its interaction with promoter targets element.⁵⁵ As discussed above, it is also possible that EGF/EGR-1 induces the expression of transcriptional suppressors, such as TGFβ1, a gene which is often associated with the repressive activity of EGR-1.⁴⁶ This hypothesis, however, is unlikely since TGFβ1 positively regulates *MMP-9* in most cell types studied.¹⁸ A likely scenario is that EGF/EGR-1 induces the expression of a suppressive gene like *PTEN*,⁵⁶ which negatively regulates *MMP-9* expression.⁵⁷ These possibilities deserve further investigation.

On the basis of the importance of the EGFR in human cancer, considerable efforts have been devoted to the development of targeted therapeutics. The current successful approaches include antibodies that bind the extracellular domain of EGFR, as well as small molecule tyrosine kinase inhibitors that inhibit their intracellular kinase activity.⁵⁸ Erlotinib (Tarceva) is an orally available EGFR tyrosine kinase inhibitor advancing through clinical trials for the treatment of a range of human malignancies, in particular for the advanced non-small cell lung carcinoma.⁵⁹ Clinical trials have incorporated EGFR inhibitors in combination with radiation for a variety of cancer types in which radiation plays a central role. Interestingly, Erlotinib has been shown to attenuate EGR-1 expression following exposure to radiation in humans.⁶⁰ It would then be important to test whether the use of such inhibitors interferes with the ability of EGR-1 to reduce *MMP-9*

expression and tumor growth.

In conclusion, our study has uncovered the existence of a previously undescribed role for EGR-1 in thymic lymphoma, namely the repression of cancer cell growth. In addition, we showed that the ability of EGR-1 to suppress tumors is related to its capacity to reduce MMP-9 expression in stromal cells. Our findings are likely to impact on the interpretation of intercellular contact between tumor cells and stromal cells.

Acknowledgements

We thank Diane Tremblay for her excellent technical support, and Dr. Edouard F. Potworowski for critical reading of the manuscript.

Contribution: F. B. and S.D.B. designed and performed research, analyzed and interpreted results, made the figures, and wrote the paper; K.B.P. designed and performed research; and Y.S.P. designed and performed research, interpreted results, and wrote the paper.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing conflict of interest.

6. References

1. de Jong D, Enblad G. Inflammatory cells and immune microenvironment in malignant lymphoma. *J Intern Med.* 2008;264(6):528-536.
2. Herreros B, Sanchez-Aguilera A, Piris MA. Lymphoma microenvironment: culprit or innocent? *Leukemia.* 2008;22(1):49-58.
3. Kuppers R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2005;5(4):251-262.
4. Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(4):239-252.
5. Mbeunkui F, Johann DJ, Jr. Cancer and the tumor microenvironment: a review of an essential relationship. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2009;63(4):571-582.
6. Polyak K, Haviv I, Campbell IG. Co-evolution of tumor cells and their microenvironment. *Trends Genet.* 2009;25(1):30-38.
7. Van Themsche C, Alain T, Kossakowska AE, Urbanski S, Potworowski EF, St-Pierre Y. Stromelysin-2 (matrix metalloproteinase 10) is inducible in lymphoma cells and accelerates the growth of lymphoid tumors in vivo. *J Immunol.* 2004;173(6):3605-3611.
8. Van Themsche C, Potworowski EF, St-Pierre Y. Stromelysin-1 (MMP-3) is inducible in T lymphoma cells and accelerates the growth of lymphoid tumors in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;315(4):884-891.
9. Aoudjit F, Potworowski EF, St-Pierre Y. Bi-directional induction of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 during T lymphoma/endothelial cell contact: implication of ICAM-1. *J Immunol.* 1998;160(6):2967- 2973.
10. Coussens LM, Tinkle CL, Hanahan D, Werb Z. MMP-9 supplied by bone marrow- derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell.* 2000;103(3):481-490.
11. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002;420(6917):860-867.
12. Chantrain CF, Shimada H, Jodele S, et al. Stromal matrix metalloproteinase-9 regulates the vascular architecture in neuroblastoma by promoting pericyte recruitment. *Cancer Res.* 2004;64(5):1675-1686.
13. Gorden DL, Fingleton B, Crawford HC, Jansen DE, Lepage M, Matrisian LM. Resident stromal cell-derived MMP-9 promotes the growth of colorectal metastases in the liver microenvironment. *Int J Cancer.* 2007;121(3):495-500.
14. 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;71(1):71-78.
15. Roy JS, Van Themsche C, Demers M, Opdenakker G, Arnold B, St-Pierre Y. Triggering of T-cell leukemia and dissemination of T-cell lymphoma in MMP-9-deficient mice. *Leukemia.* 2007;21(12):2506-2511.
16. St-Pierre Y, Van Themsche C, Esteve PO. Emerging features in the regulation of MMP-9 gene expression for the development of novel molecular targets and therapeutic strategies. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2003;2(3):206-215.
17. Amano H, Ito Y, Suzuki T, et al. Roles of a prostaglandin E-type receptor, EP3, in upregulation of matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor during enhancement of tumor metastasis. *Cancer Sci.* 2009;100(12):2318-2324.
18. Stuelten CH, DaCosta Byfield S, Arany PR, Karpova TS, Stetler-Stevenson WG, Roberts AB. Breast cancer cells induce stromal fibroblasts to express MMP-9 via secretion of TNF-alpha and TGF-beta. *J Cell Sci.* 2005;118(10):2143-2153.

19. Acuff HB, Carter KJ, Fingleton B, Gorden DL, Matrisian LM. Matrix metalloproteinase-9 from bone marrow-derived cells contributes to survival but not growth of tumor cells in the lung microenvironment. *Cancer Res.* 2006;66(1):259-266.
20. Parmo-Cabanas M, Molina-Ortiz I, Matias-Roman S, et al. Role of metalloproteinases MMP-9 and MT1-MMP in CXCL12-promoted myeloma cell invasion across basement membranes. *J Pathol.* 2006;208(1):108-118.
21. Gashler A, Sukhatme VP. Early growth response protein 1 (Egr-1): prototype of a zinc-finger family of transcription factors. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 1995;50:191- 224.
22. Sukhatme VP, Cao XM, Chang LC, et al. A zinc finger-encoding gene coregulated with c-fos during growth and differentiation, and after cellular depolarization. *Cell.* 1988;53(1):37-43.
23. Thiel G, Cibelli G. Regulation of life and death by the zinc finger transcription factor Egr-1. *J Cell Physiol.* 2002;193(3):287-292.
24. Baron V, De Gregorio G, Krones-Herzig A, et al. Inhibition of Egr-1 expression reverses transformation of prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Oncogene.* 2003;22(27):4194-4204.
25. Fahmy RG, Dass CR, Sun LQ, Chesterman CN, Khachigian LM. Transcription factor Egr-1 supports FGF-dependent angiogenesis during neovascularization and tumor growth. *Nat Med.* 2003;9(8):1026-1032.
26. Lucerna M, Pomyje J, Mechtheriakova D, et al. Sustained expression of early growth response protein-1 blocks angiogenesis and tumor growth. *Cancer Res.* 2006;66(13):6708- 6713.
27. Calogero A, Arcella A, De Gregorio G, et al. The early growth response gene EGR-1 behaves as a suppressor gene that is down-regulated independent of ARF/Mdm2 but not p53 alterations in fresh human gliomas. *Clin Cancer Res.* 2001;7(9):2788-2796.
28. Das A, Chendil D, Dey S, et al. Ionizing radiation down-regulates p53 protein in primary Egr-1-/- mouse embryonic fibroblast cells causing enhanced resistance to apoptosis. *J Biol Chem.* 2001;276(5):3279-3286.
29. Liu C, Yao J, Mercola D, Adamson E. The transcription factor EGR-1 directly transactivates the fibronectin gene and enhances attachment of human glioblastoma cell line U251. *J Biol Chem.* 2000;275(27):20315-20323.
30. Huang RP, Fan Y, de Belle I, et al. Decreased Egr-1 expression in human, mouse and rat mammary cells and tissues correlates with tumor formation. *Int J Cancer.* 1997;72(1):102- 109.
31. Chen L, Wang S, Zhou Y, et al. Identification of early growth response protein 1 (EGR-1) as a novel target for JUN-induced apoptosis in multiple myeloma. *Blood.* 2009;115(1):61-67.
32. Gibbs JD, Liebermann DA, Hoffman B. Egr-1 abrogates the E2F-1 block in terminal myeloid differentiation and suppresses leukemia. *Oncogene.* 2008;27(1):98-106.
33. Shafarenko M, Liebermann DA, Hoffman B. Egr-1 abrogates the block imparted by c- Myc on terminal M1 myeloid differentiation. *Blood.* 2005;106(3):871-878.
34. Aoudjit F, Potworowski EF, St-Pierre Y. The metastatic characteristics of murine lymphoma cell lines in vivo are manifested after target organ invasion. *Blood.* 1998;91(2):623-629.
35. Williams RL, Risau W, Zerwes HG, Drexler H, Aguzzi A, Wagner EF. Endothelioma cells expressing the polyoma middle T oncogene induce hemangiomas by host cell recruitment. *Cell.* 1989;57(6):1053-1063.
36. Sheibani N, Frazier WA. Thrombospondin 1 expression in transformed endothelial cells restores a normal phenotype and suppresses their tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;9(15):6788-6792.
37. Fu M, Zhu X, Zhang J, et al. Egr-1 target genes in human endothelial cells identified by microarray analysis. *Gene.* 2003;315:33-41.

38. Tsai JC, Liu L, Guan J, Aird WC. The Egr-1 gene is induced by epidermal growth factor in ECV304 cells and primary endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000;279(5):C1414-1424.
39. Stefanidakis M, Koivunen E. Cell-surface association between matrix metalloproteinases and integrins: role of the complexes in leukocyte migration and cancer progression. *Blood.* 2006;108(5):1441-1450.
40. Demers M, Magnaldo T, St-Pierre Y. A novel function for galectin-7: promoting tumorigenesis by up-regulating MMP-9 gene expression. *Cancer Res.* 2005;65(12):5205- 5210.
41. Mayer SI, Rossler OG, Endo T, Charnay P, Thiel G. Epidermal-growth-factor-induced proliferation of astrocytes requires Egr transcription factors. *J Cell Sci.* 2009;122(18):3340- 3350.
42. De Noncourt P, Robledo O, Alain T, Kossakowska AE, Urbanski SJ, Potworowski EF, St-Pierre Y. Leukocyte elastase in murine and human non-Hodgkin lymphomas. *J Leukoc Biol.* 2001;70(4):585-591.
43. Demers M, Biron-Pain K, Hébert J, Lamarre A, Magnaldo T, St-Pierre Y. Galectin-7 in lymphoma: elevated expression in human lymphoid malignancies and decreased lymphoma dissemination by antisense strategies in experimental model. *Cancer Res.* 2007;67(6):2824- 2829.
44. Lalancette M, Aoudjit F, Potworowski EF, St-Pierre Y. Resistance of ICAM-1- deficient mice to metastasis overcome by increased aggressiveness of lymphoma cells. *Blood.* 2000;95(1):314-319.
45. Khachigian LM, Collins T. Early growth response factor 1: a pleiotropic mediator of inducible gene expression. *J Mol Med.* 1998;76(9):613-616
46. Liu C, Yao J, de Belle I, Huang RP, Adamson E, Mercola D. The transcription factor EGR-1 suppresses transformation of human fibrosarcoma HT1080 cells by coordinated induction of transforming growth factor-beta1, fibronectin, and plasminogen activator inhibitor-1. *J Biol Chem.* 1999;274(7):4400-4411.
47. Krones-Herzig A, Mittal S, Yule K, et al. Early growth response 1 acts as a tumor suppressor in vivo and in vitro via regulation of p53. *Cancer Res.* 2005;65(12):5133-5143. À
48. Krones-Herzig A, Adamson E, Mercola D. Early growth response 1 protein, an upstream gatekeeper of the p53 tumor suppressor, controls replicative senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(6):3233-3238.
49. Kossakowska AE, Hinek A, Edwards DR, et al. Proteolytic activity of human non-Hodgkin's lymphomas. *Am J Pathol.* 1998;152(2):565-576.
50. Stetler-Stevenson M, Mansoor A, Lim M, et al. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in reactive and neoplastic lymphoid cells. *Blood.* 1997;89(5):1708-1715.
51. Rockel JS, Bernier SM, Leask A. Egr-1 inhibits the expression of extracellular matrix genes in chondrocytes by TNFalpha-induced MEK/ERK signalling. *Arthritis Res Ther.* 2009;11(1):R8.
52. Lin JX, Leonard WJ. The immediate-early gene product Egr-1 regulates the human interleukin-2 receptor beta-chain promoter through noncanonical Egr and Sp1 binding sites. *Mol Cell Biol.* 1997;17(7):3714-3722.
53. St-Pierre Y, Couillard J, Van Themsche C. Regulation of MMP-9 gene expression for the development of novel molecular targets against cancer and inflammatory diseases. *Expert Opin Ther Targets.* 2004;8(5):473-489.
54. Ma J, Ren Z, Ma Y, et al. Targeted knockdown of EGR-1 inhibits IL-8 production and IL-8 mediated invasion of prostate cancer cells through suppressing EGR-1/NF-kappaB synergy. *J Biol Chem.* 2009; ;284(50):34600-34606.
55. Chapman NR, Perkins ND. Inhibition of the RelA(p65) NF-kappaB subunit by Egr-1. *J*

- Biol Chem. 2000;275(7):4719-4725.
- 56. Okamura H, Yoshida K, Morimoto H, Haneji T. PTEN expression elicited by EGR-1 transcription factor in calyculin A-induced apoptotic cells. J Cell Biochem. 2005;94(1):117- 125.
 - 57. Furukawa K, Kumon Y, Harada H, et al. PTEN gene transfer suppresses the invasive potential of human malignant gliomas by regulating cell invasion-related molecules. Int J Oncol. 2006;29:73-81.
 - 58. Hynes NE, MacDonald G. ErbB receptors and signaling pathways in cancer. Curr Opin Cell Biol. 2009;21:177-184.
 - 59. Gazdar AF. Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. Oncogene. 2009;28 Suppl 1:S24-31.
 - 60. Chinnaiyan P, Huang S, Vallabhaneni G, et al. Mechanisms of enhanced radiation response following epidermal growth factor receptor signaling inhibition by erlotinib (Tarceva). Cancer Res. 2005;65:3328-3335.

Table 1. Genes differentially expressed in endothelial cells following contact with thymocytes or T lymphoma cells.

Genes	Accessio n number	Gene expression in bEnd.3			+164T2S 19
		Control	+Thymocy tes	+ 164T2	
<i>Up-regulated genes</i>					
Basic fibroblast growth factor receptor 1 (BFGFR1)	M28998	1	9 030	11 519	14 307
Ezrin	X60671	24 152	32 914	35 856	51 538
Dystroglycan (DAG1)	U43512	12 499	17 499	23 768	28 253
Tyrosine kinase c-abl	L10656	7 678	13 220	22 052	25 333
Early growth response protein 1 (EGR-1)	M20157	20 839	223 565	212 240	85 021
c-jun	J04115	13 749	59 087	42 905	26 318
c-fos	V00727	1	26 197	19 031	8 334
fos-related antigen-2	X83971	11 672	19 457	10 339	33 390
Src homology 2 domain-containing transforming protein C1 (Shc1)	U15784	15 514	14 466	16 510	31 240
E47 interaction protein 1 (EIP1)	Y07836	11 071	13 766	27 965	35 795
<i>Down-regulated genes</i>					
Calcyclin binding protein	U97327	29 845	16 105	21 630	9 408
WSB1 protein	AF03318 6	10 111	1	3 476	5 731
WSB2 protein	AF03318 8	12 751	5 825	3 605	4 785
Proteasome alpha7/C8 subunit	AF05598 3	20 360	6 095	7 108	5 256
Eph-related receptor tyrosine kinase	M68513	8 100	4 915	2 280	1 689

7. Figure legends

Figure 1. Identification of differentially expressed genes in bEnd.3 endothelial cell line following contact with 164T2 T lymphoma cells. (A) Gene expression profiling was performed using RNA isolated from bEnd.3 EC cultured alone (control, *left panel*) and bEnd.3 cells after contact with 164T2 T lymphoma cell line (*right panel*). (B) Scatter plot analysis of densitometric quantification of expression data. Each point represents one of the 1176 genes on the array and the location of each point on the scatter plot is determined by the gene expression level in bEnd.3 cells, represented on the *x*-axis, and the gene expression level in bEnd.3 cells after contact with lymphoma cells, represented in the *y*-axis. *EGR-1* is indicated by the arrow.

Figure 2. EGR-1-induced expression in endothelial cell lines following contact with T lymphoma cells. (A) Following *in vitro* contact with freshly isolated murine thymocytes, 164T2 or 164T2S11 T lymphoma cell lines, bEnd.3 cells were harvested and total RNA was extracted and then subjected to RT-PCR to quantify *EGR-1* expression. (B) Expression of *L-selectin* in bEnd.3 cells following contact with 164T2 T lymphoma cells as a control of bEnd.3 purity following sorting. No expression of *L-selectin* was detected in bEnd.3 or after purification following co-culture with T lymphoma cells. The 164T2 cells were used as a positive control for *L-selectin* expression. In both the above experiments, the control included bEnd.3 cells incubated without lymphoid cells in the same culture conditions and *GAPDH* expression was used as internal control. Bars, SD. *, $p \leq 0.05$.

Figure 3. EGF activates transcription of EGR-1 expression in endothelial cell lines. (A) Constitutive expression of *EGF* in the human Burkitt Raji B lymphoma cells and the human MDA-MB-231 breast carcinoma cells, as shown by RT-PCR analysis. (B) bEnd.3 cells were treated with vehicle alone or 10 ng/ml of EGF for 1 h. Positive control consisted of bEnd.3 cells incubated with 50 ng/ml of PMA for 1 h. Total RNA was extracted and subjected to RT-PCR to quantify *EGR-1* expression. (C) 293 cells were co-transfected with the pGL3-EGR-1 promoter construct and the pRL-TK *Renilla* luciferase as described in *Materials and Methods*. After 24 h, the 293 cells were preincubated for 1 h with blocking mAbs specific for EGFR or control mouse IgG. Thereafter, the murine 267 T lymphoma cells (3×10^6 cells/well), the human Burkitt Raji B lymphoma cells (3×10^6 cells/well), and the human MDA-MB-231 breast carcinoma cells (5×10^5 cells/well) were added to adherent cells for 16 h. Cells were collected, and luciferase activity was measured. Controls included 293 cells without tumor cells. The firefly luciferase was normalized to *Renilla* luciferase activity. Results are representative of three independent experiments performed in triplicate. Bars, SD. *, $p \leq 0.05$, significantly different from the control mouse IgG treatment.

Figure 4. EGR-1-induced expression in epithelial cell lines following contact with EGF transfectants. (A) Following a 16 h *in vitro* contact with stable transfectants (3×10^6 cells/well), 293 cells were harvested, total RNA was extracted and subjected to RT-PCR to quantify *EGR-1* expression. 293 cells stimulated with EGF (50 ng/ml) for 1 h were used as a positive control. (B) Quantitative analysis of the induction of *EGR-1* expression was performed by imaging densitometry. The results are presented normalized relative to *GAPDH* expression. Results are representative of three independent experiments with several clones expressing EGF and controls. (C) pGL3-EGR-1 promoter construct (0.1 μ g) was transiently co-transfected with pRL-TK *Renilla* luciferase (0.5 μ g) into 293 cells as described in *Materials and Methods*. After 24 h,

the 293 cells were preincubated for 1 h with blocking mAbs specific for EGFR or control mouse IgG. Thereafter, the stable transfectants (3×10^6 cells/well) were added to adherent cells for 16 h. Cells were collected, and luciferase activity was measured. Controls included 293 cells without tumor cells. The firefly luciferase was normalised to *Renilla* luciferase activity. Results are representative of three independent experiments performed in triplicata. Bars, SD. *, $p \leq 0.05$.

Figure 5. EGF expression decrease thymic lymphoma growth. (A) Survival analysis of 5- to 6-week-old syngeneic C57BL/6 mice injected intrathymically with 5×10^3 per lobe of lymphoma cell transfectants (□) or controls (■). Lymphoma growth is restricted to the thymus following intrathymic injection and does not metastasize to peripheral organ. When clinical signs of thymic lymphoma became evident (runting, swelling of the thorax, and dyspnea), mice were sacrificed, and thymic lymphoma was confirmed and collected at necropsy. (B) Histogram showing the mean survival times (MST) of mice following intrathymic injection of lymphoma cell transfectants or controls. Data are representative of two independent experiments with several different clones expressing EGF and controls. Bars, SD. *, $p \leq 0.05$.

Figure 6. Inhibition of MMP-9 mRNA expression by EGR-1. (A) The HT1080 fibrosarcoma cells were treated with different doses of EGF for (A) 0.5 h or (B) 18 h. Total RNA was extracted and the subjected to RT-PCR to quantify *EGR-1* and *MMP-9* expression respectively. (C) pCMV6-XL5-EGR-1 (2 µg) or empty vector pCDNA3.1 (2 µg) was transiently transfected as described in *Materials and Methods*. Cells were either not stimulated or stimulated with recombinant human TNF (50 ng/ml) for 18 h. HT1080 cells were collected, total RNA was extracted and then subjected to RT-PCR to quantify *MMP-9* expression. Densitometry was conducted for *MMP-9* and the results are presented normalized relative to *GAPDH* expression. (D) Levels of *MT1-MMP* transcripts are shown as a specificity control. Results are representative of three independent experiments. Bars, SD. *, $p \leq 0.05$.

Figure 7. EGF expression decreases MMP-9 promoter activity *ex vivo*. (A) The C57BL/6/proMMP9-Luc Tg mice were injected intrathymically with 5×10^3 per lobe of lymphoma cell transfectants (267Egf) or controls (267Sra). At 7 days post-injection, thymuses were collected and imaged using the Xenogen IVIS imaging system. Shown are representative images of thymus injected with lymphoma cells. (B) Thymuses were crushed and luciferase activity in tissue extracts was determined and normalized to the protein content. Controls included thymus without tumor cells. Bars, SD. *, $p \leq 0.05$.

8. Supplementary materials

RNA isolation and RT-PCR.

Total RNA was isolated from cells using Trizol reagent according to the manufacturer's protocol (Invitrogen). Briefly, total RNA (2 µg) was reverse transcribed using the OmniScript reverse transcriptase (Qiagen, Mississauga, ON) and PCR amplified using the following conditions: 94°C for 1 min, 62°C for 1 min, and 72°C for 1 min followed by a final extension step at 72°C for 10 min. The primers used for PCR amplification were the following: murine EGF (*EGF*), 5'-TCCCAGCGAGAAAGACTGAT-3' (sense) and 5'-CATGCTGCCTTGAAGACGTA-3' (antisense); murine *HB-EGF*, 5'-CAGGACTTCCAAGGGACAGA-3' (sense) and 5'-TGAGAAGTCCCACGATGACA-3' (antisense); and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), 5'-CGGAGTCAACGGATTGGTCGTAT-3' (sense) and 5'-AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3' (antisense). 30 or 35 cycles of amplification were carried out in a thermal cycler (model PTC-100 TM, MJ Research, Watertown, MA). Each assay was repeated three times to verify the accuracy of the results. As an internal control, amplification of *GAPDH* mRNA was carried out by reverse transcription-PCR (RT-PCR) using specific primers. Amplified products were analyzed by electrophoresis on 1% agarose gels using ethidium bromide staining and UV illumination. Loading was equalized to the internal control mRNA.

Generation of stable transfecants expressing EGF. The cDNA encoding the human *EGF* gene (NCBI Reference Sequence: NM_001963.3) was purchased from Origene (Rockville, MD). To obtain stable 267 transfecants expressing EGF constitutively, the cDNA encoding the human EGF was inserted into the Srα eukaryotic expression vector (kindly provided by Dr. François Denis). Controls were generated using 267 lymphoma cells transfected with empty Srα vector

alone. Transfection was carried out by electroporation (Gene Pulser, Bio-Rad Laboratories) using the following parameters: 40 µg of DNA per 10^7 cells in PBS on ice; 960 µFD; 300 mV. After 24 hours of culture in complete medium, transfected cells were allowed to grow in complete medium containing 4 µg/ml puromycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) before individual colonies were selected and expanded. EGF expression was assessed by RT-PCR and ELISA analyses.

ELISA. The levels of human EGF in the supernatant of cultured cells and in the cell lysate were determined by ELISA according to the manufacturer's protocol (Duoset ELISA Development Kit, R&D Systems, Burlington, ON, Canada).

Figure S1: EGF expression in T lymphoma. (A) RT-PCR analysis showing low levels of EGFR ligands, including heparin-binding EGF-like factor (HB-EGF) in 267 and 164T2 T lymphoma cells.

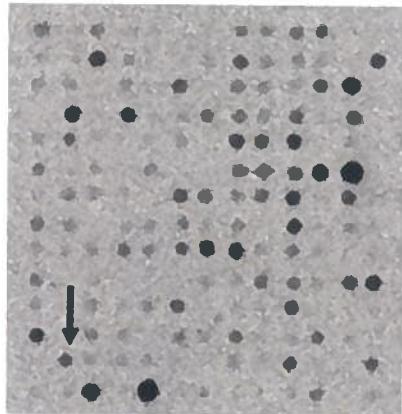
Figure S2: EGF activates transcription of EGR-1 expression. pGL3-EGR-1 promoter construct was transiently co-transfected with pRL-TK *Renilla* luciferase into 293 cells as described in *Materials and Methods*. After 24 h, cells were treated with different doses of EGF for 16 h, cells were collected, and luciferase activity measured. *, $p \leq 0.05$, significantly different from unstimulated cells.

Figure S3. Expression of EGF transfectants. (A) 267 T lymphoma cells were transfected with Sra puro expression vector containing the human EGF cDNA and stable transfectants (267Egf #1, 267Egf #4 and 267Egf #19) constitutively expressing EGF were obtained. The levels of EGF expression were examined by RT-PCR and β -ACTIN was used as an internal control. Control transfectants (267Sra#2 and 267Sra#3) included lymphoma cells transfected with Sra puro expression vector without cDNA insert. (B) The levels of overexpressed EGF protein were determined by ELISA. The constitutive overexpression of EGF was not decreased upon long-term *in vitro* culture of the clones but was nevertheless always assessed by ELISA analysis before their *in vivo* testing.

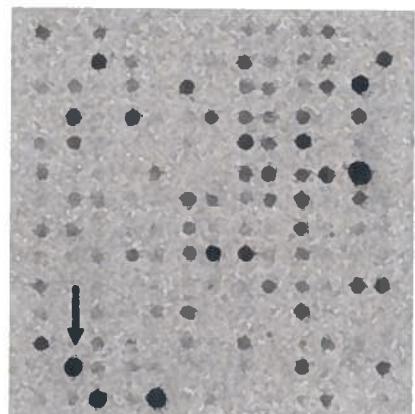
Figure 1

A

Endothelial cells



Endothelial + T lymphoma cells



B

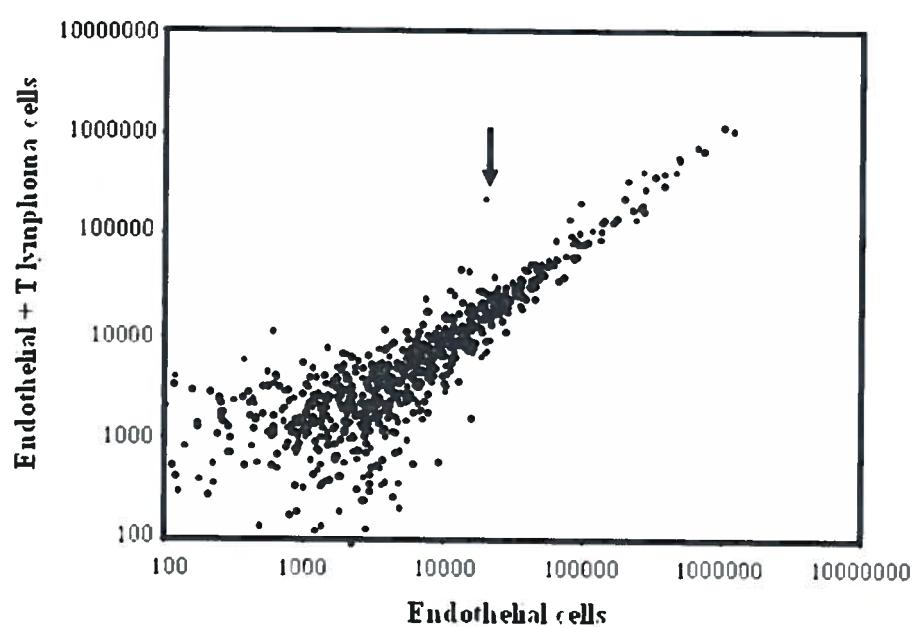
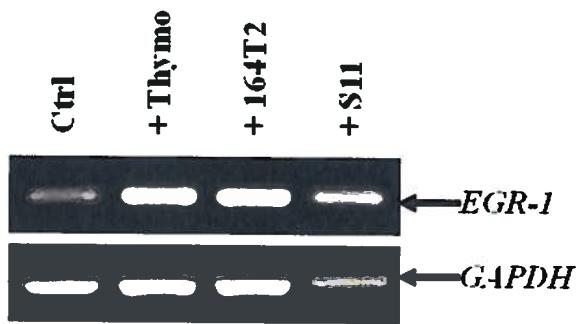


Figure 2

A



B

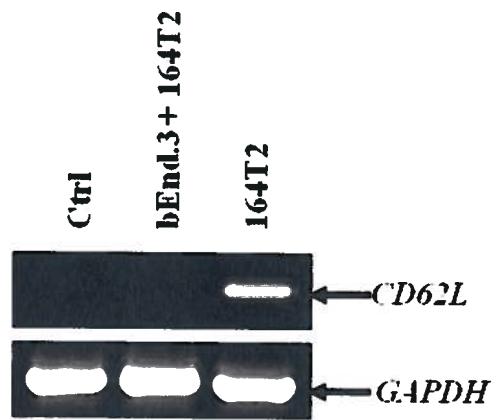


Figure 3

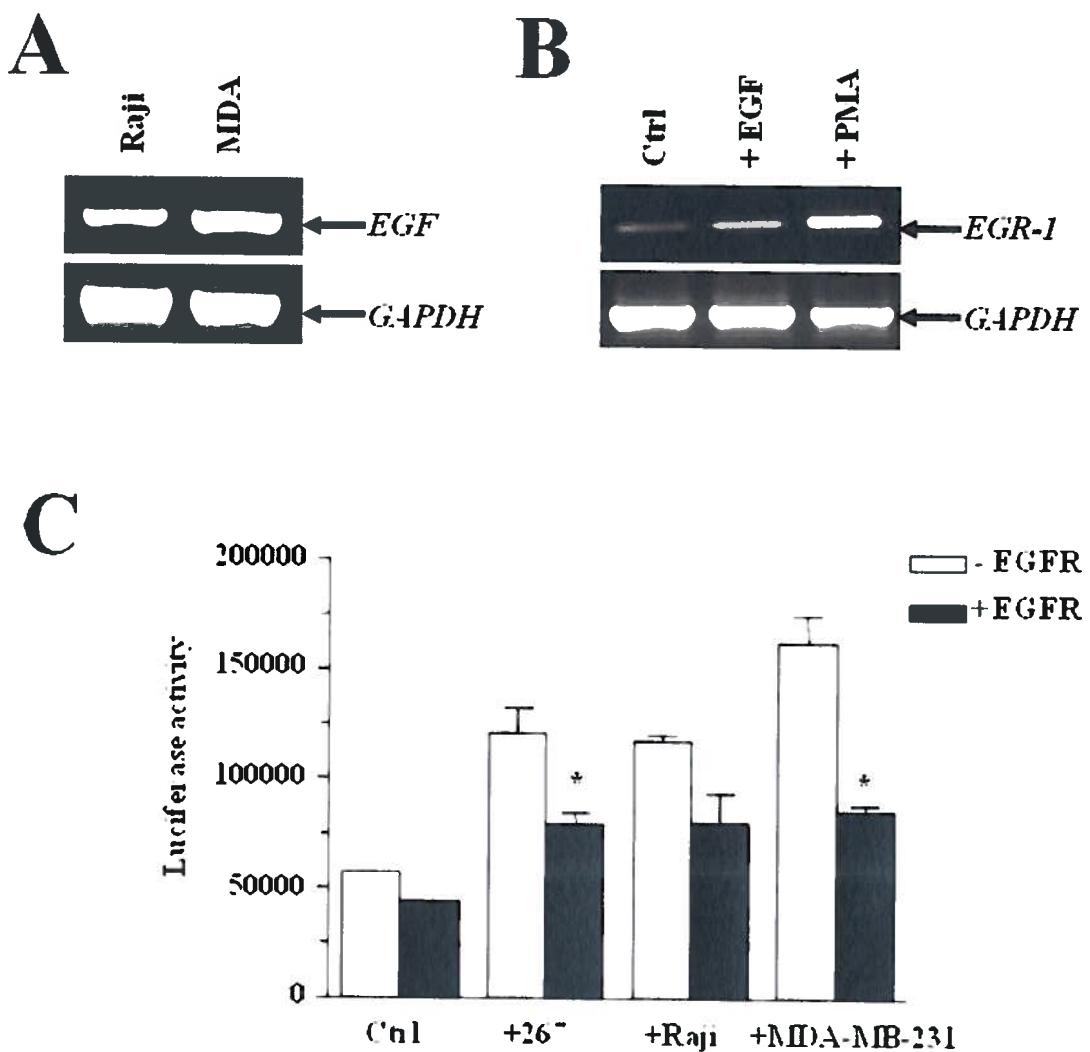


Figure 4

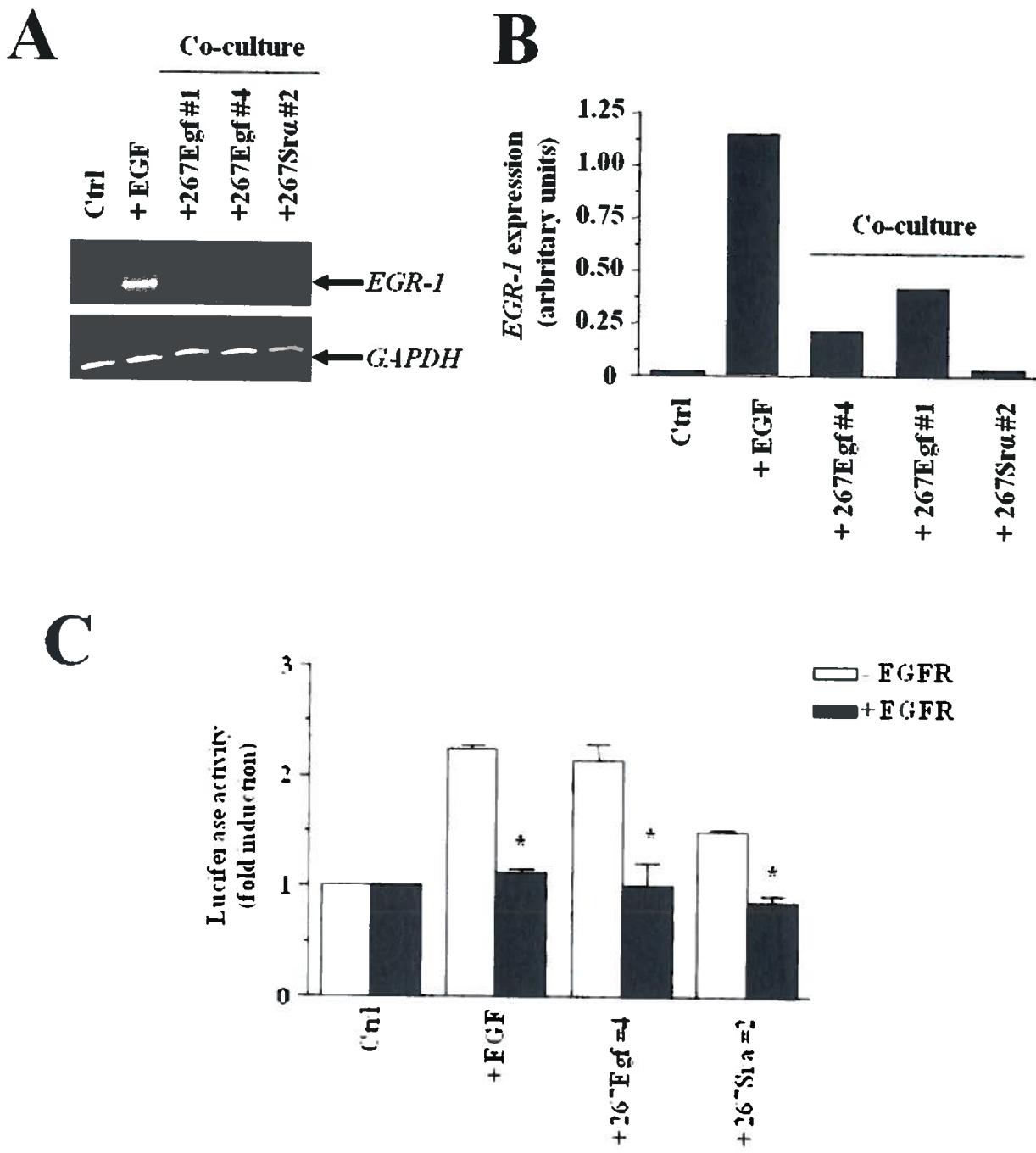
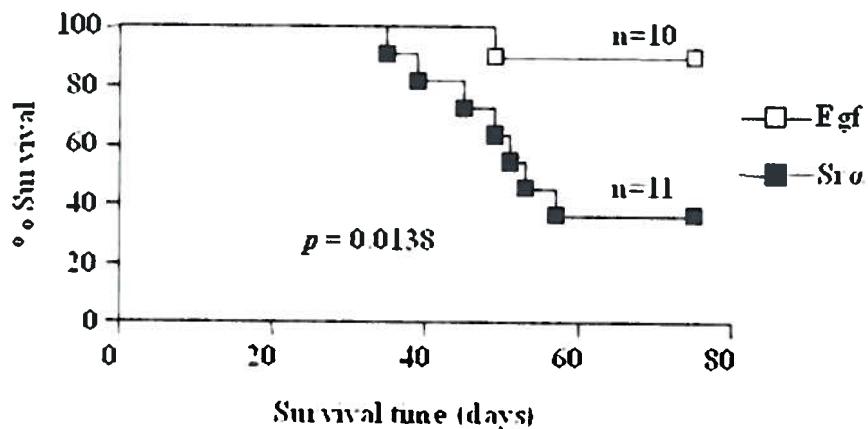


Figure 5

A



B

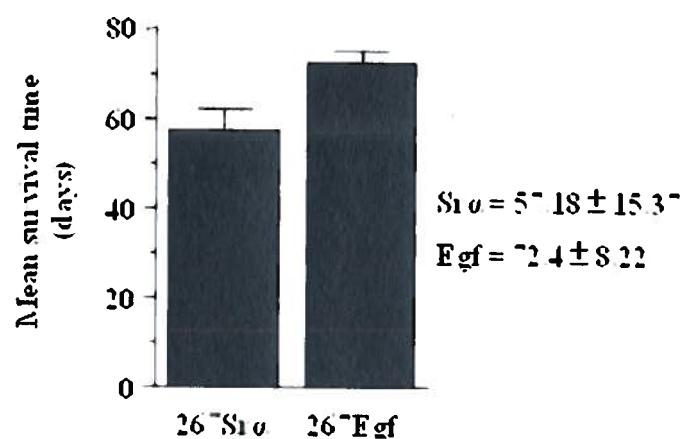


Figure 6

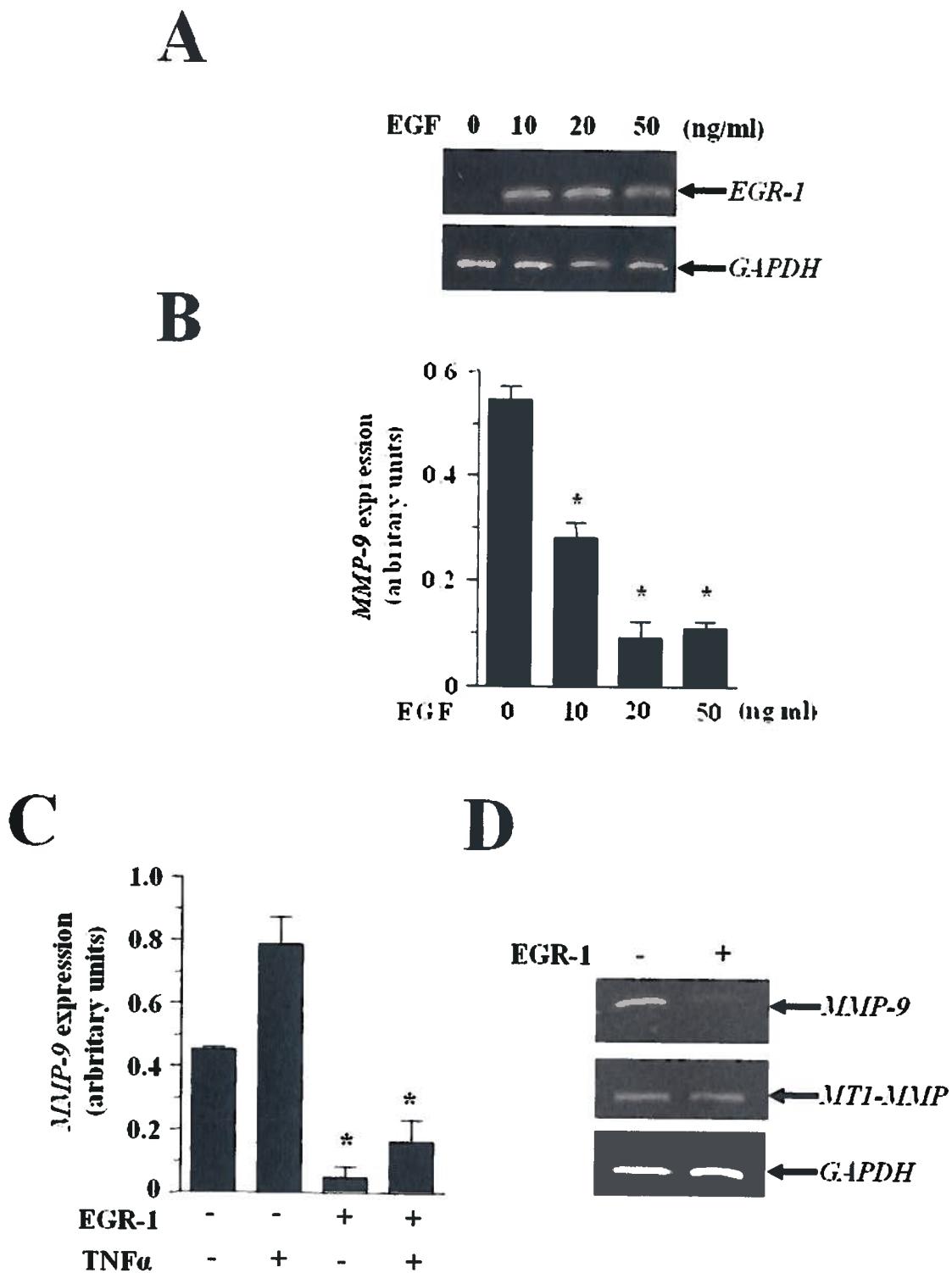
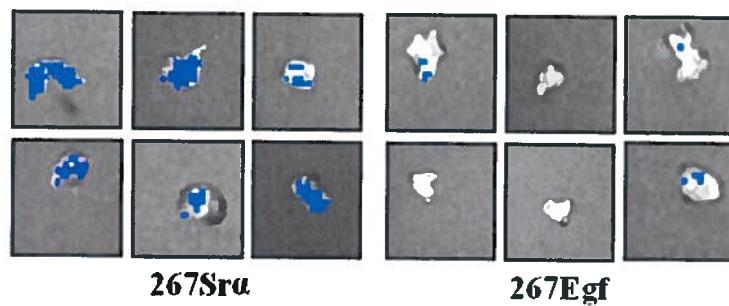
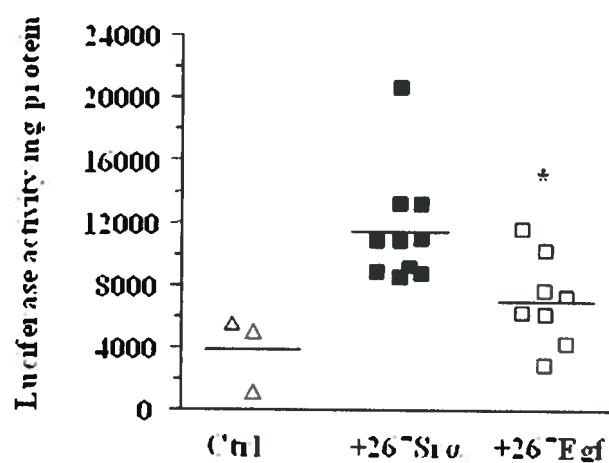


Figure 7

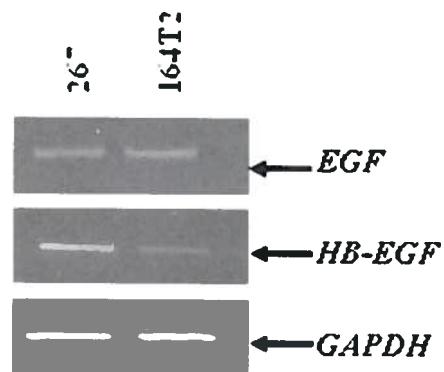
A



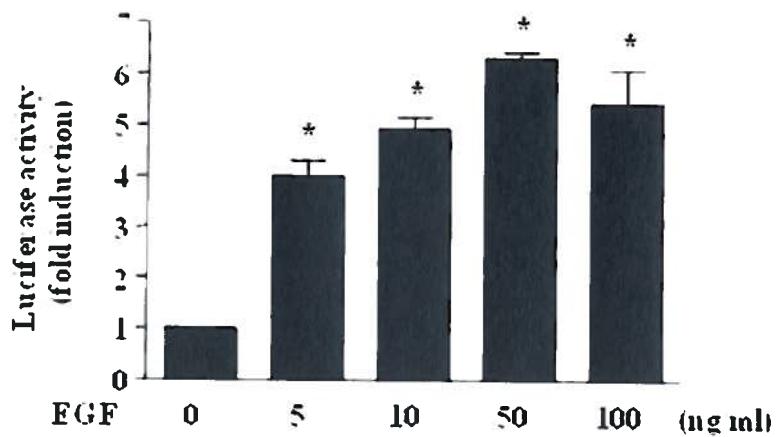
B



Supplementary Figure 1

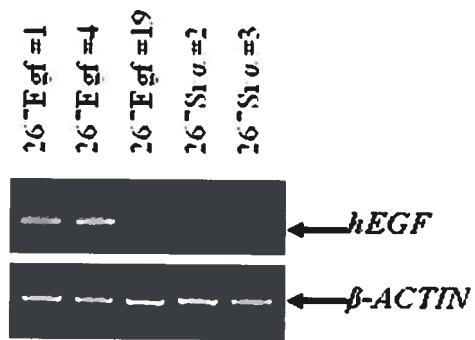


Supplementary Figure 2

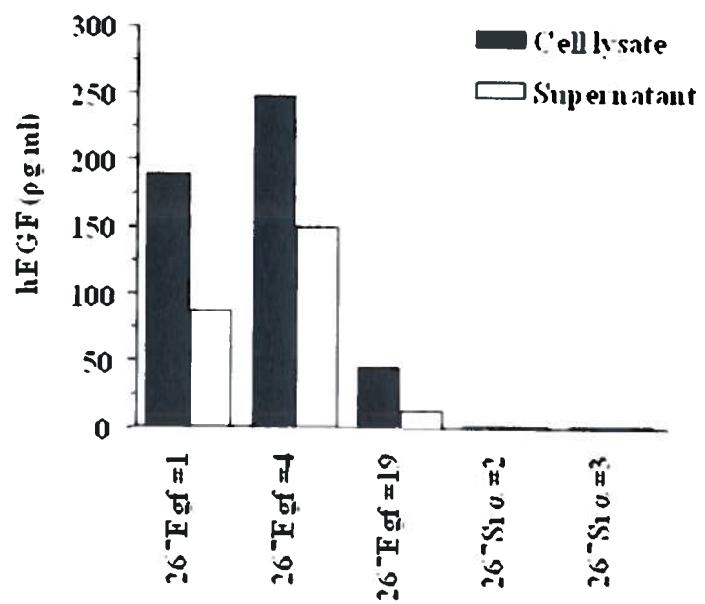


Supplementary Figure 3

A



B



Chapitre III

Discussion générale

1. Rappel des objectifs de recherche

Les interactions entre les cellules tumorales et les cellules stromales sont bien connues pour leur rôle dans la progression tumorale et ce, particulièrement dans l'induction de l'expression de gènes pro-métastatiques dans les cellules de lymphome. Cependant, il existe peu de données disponibles quant à l'induction de l'expression de gènes dans les cellules stromales, notamment dans l'endothélium vasculaire, suite au contact intercellulaire. Le facteur de transcription *Egr-1* fut identifié comme un des gènes modulés dans les cellules endothéliales lors d'un contact avec les cellules de lymphome. Notre projet de recherche visait à déterminer la nature de l'induction d'EGR-1 et le rôle de ce facteur de transcription lors des contacts lympho-stromaux dans la croissance du lymphome thymique. Nos travaux ont démontré que ; 1) l'expression d'EGR-1 est induite dans les cellules endothéliales et dans d'autres cellules stromales suivant un contact avec les cellules de lymphome ; 2) la présence du facteur de croissance EGF, exprimé de façon constitutive par les cellules de lymphome, est suffisante pour induire EGR-1 ; 3) la croissance du lymphome est inhibée par des cellules de lymphomes surexprimant EGF et ; 4) cet arrêt de la croissance tumorale est possiblement modulé via la capacité d'EGR-1 à inhiber l'expression de MMP-9. L'implication d'*Egr-1* comme gène suppresseur de tumeur dans la croissance localisée du lymphome T non hodgkinien s'ajoute aux cancers du sein (182), du cerveau (195), des poumons (211), de la peau (198) et au fibrosarcome (212) où un tel rôle pour EGR-1 a été identifié.

2. Identification de l'induction de l'expression d'EGR-1 dans les cellules stromales

Notre laboratoire a démontré que des souris déficientes en molécules d'adhésion résistent à la dissémination des cellules de lymphome vers les organes périphériques. Or, cette résistance n'est pas due à l'incapacité des cellules tumorales à migrer vers les organes cibles, mais plutôt à l'absence de signaux d'activation dans les cellules tumorales et stromales (36, 37). Selon notre modèle, cette signalisation via les contacts intercellulaires serait normalement responsable de l'expression de gènes pro-métastatiques dans les cellules tumorales et stromales (24, 39, 40). Plus spécifiquement, étant donné que le microenvironnement tumoral est composé d'un ensemble de cellules stromales, nous avons soulevé l'hypothèse que l'adhésion des cellules de lymphome lors du développement tumoral induit l'expression de gènes pro-métastatiques dans les cellules stromales, modulant ainsi la croissance et la dissémination des cellules cancéreuses. Afin

d'identifier les gènes modulés par ce contact, nous avons utilisé une approche génomique. L'analyse comparative, par matrice différentielle d'ADNc, des cellules endothéliales en co-culture avec les cellules de lymphome et des cellules endothéliales sans contact intercellulaire nous a permis d'analyser l'expression de 1176 gènes différents. Parmi ceux-ci, nous avons observé une forte augmentation de l'expression du gène *Egr-1*. Ce dernier est connu pour être un facteur de transcription rapidement et transitoirement induit par des stimulations mitogéniques dans plusieurs types cellulaires. Tout comme EGR-1, on retrouve d'autres membres de la famille des facteurs de transcriptions à réponse précoce/immédiate induits lors de ce contact intercellulaire tels que c-jun, c-fos, et un petit variant de l'épissage, *Fra-2 (fos-related antigen 2)*. En fait, il a été démontré que dans différents processus physiologiques, cet ensemble de facteurs de transcription est habituellement co-régulé (78, 213). Lors de la co-culture entre les cellules de lymphome et les cellules endothéliales, l'interaction crée une synapse où différents stimuli vont moduler l'expression de ces facteurs de transcription à réponse précoce/immédiate, et en particulier celle d'EGR-1. Ces derniers vont par la suite contrôler l'expression de gènes nécessitant cette première vague de facteurs de transcription pour leur régulation transcriptionnelle. Ces observations sont consistantes avec l'augmentation d'EGR-1 dans les tumeurs lymphoïdes du foie s'étant développées en réponse à l'injection des cellules de lymphome par voie i.v. (**S. Bélanger, résultats non publiés**), bien que la contribution intrinsèque des cellules stromales dans les tumeurs lymphoïdes demeure inconnue. Nos recherches indiquent donc pour la première fois que, lors d'une interaction avec des cellules tumorales, l'expression d'EGR-1 est induite dans les cellules stromales.

3. Rôle d'EGF dans l'induction de l'expression d'EGR-1

Dans la première partie de nos travaux, nous avons voulu déterminer par quelle voie l'expression d'EGR-1 était induite dans les cellules endothéliales. Nous avons tout d'abord observé que même si le contact direct provoque une plus forte expression d'EGR-1 (**résultats non publiés**), la sécrétion de molécules solubles suffisait à stimuler l'expression de ce facteur. Parmi les molécules solubles connues pour induire EGR-1, nous avons identifié les facteurs de croissance EGF, HB-EGF et PDGF produits de façon constitutive par les cellules de lymphome et par d'autres cellules cancéreuses. Par contre, seul l'ajout d'EGF recombinant a été en mesure d'induire l'expression d'EGR-1 dans notre lignée de cellules endothéliales. EGF est bien connu

pour être exprimé par des cellules de lymphome T (214) tandis que les lymphocytes T et B normaux n'expriment habituellement pas EGF (215). Le développement du modèle de co-culture *in vitro* a permis de déterminer qu'EGF induit de façon spécifique et significative l'activité transcriptionnelle du promoteur *Egr-1* dans les cellules endothéliales. Lors du contact direct, l'expression d'EGR-1 demeure plus importante, particulièrement avec les cellules épithéliales 293, un modèle couramment utilisé pour les études de la voie EGR-1, ce qui suggère qu'au-delà du complexe EGF/EGFR, des signaux de costimulation générés par d'autres voies peuvent participer au contrôle transcriptionnelle d'EGR-1. Il a été démontré que les intégrines s'associent avec EGFR au niveau membranaire et contribuent à l'activation d'EGR-1 lors de l'adhésion cellulaire (148). Des études supplémentaires, utilisant d'autres anticorps neutralisants, par exemple contre ICAM-1 et les sélectines, pourront certainement aider à éclaircir le répertoire de voies impliquées dans cette induction. Les propriétés de signalisation des molécules d'adhésion en sont de bons candidats pour la propagation d'une cascade de signalisation. Par exemple, il a été démontré que l'adhésion de cellules cancéreuses du côlon à E-sélectine augmente l'activité de ERK et p38 (216), des voies connues pour induire l'expression d'EGR-1 (103, 120). Il serait ainsi intéressant dans une perspective à long terme, de déterminer les voies de signalisation empruntées pour la modulation de l'expression d'EGR-1 suite au contact avec les cellules de lymphome.

4. Inhibition de la croissance du lymphome thymique : implication d'EGR-1

Dans le but de déterminer l'importance de l'induction d'EGR-1 dans la croissance tumorale, nous avons fait appel au modèle murin où l'injection i.t. de cellules de lymphome dans une souris de 3-5 semaines induit un lymphome thymique. Comme nous l'avons démontré, la surexpression d'EGF par les cellules de lymphome inhibe de façon significative la formation d'un lymphome thymique. EGF confère donc à lui seul un net désavantage au lymphome en inhibant sa croissance primaire. Cette inhibition peut être expliquée, du moins en partie, par nos résultats *in vitro* démontrant qu'EGF exprimé par les cellules de lymphome induit l'expression d'EGR-1 dans les cellules stromales. On peut donc croire que la surexpression d'EGF stimulerait l'expression d'EGR-1, qui à son tour initierait des changements à long terme dans le microenvironnement tumoral thymique qui inhiberaient la croissance du lymphome. Il est également possible qu'EGF et EGR-1 forment une boucle d'activation. En effet, il a été démontré

que l'activité transcriptionnelle d'EGFR est régulée par EGR-1 lors de l'hypoxie (113). De façon similaire, il serait donc possible qu'EGF sécrété de façon constitutive par les cellules de lymphome induit l'expression d'EGR-1 et qu'en retour, EGR-1 stimule l'expression d'EGFR dans les cellules stromales créant une amplification du signal et favorisant leur activité biologique. Dans une étude, l'administration i.p. d'EGF dans des souris provoque la phosphorylation d'EGFR et l'expression d'EGR-1 pour une période d'une à 4 heures (106). Dans ce contexte, suivant l'injection des cellules de lymphome, il serait intéressant d'analyser dans les thymus les niveaux d'expression d'EGR-1 à différents temps hâtifs et la source de cette augmentation dans le stroma thymique. À ce propos, des études utilisant un modèle de souris transgénique comprenant la construction du promoteur *EGR-1* fusionnée à un gène rapporteur pourraient permettre d'élucider le ou les types cellulaires stromaux responsables de l'expression d'EGR-1 dans le thymus lors de la croissance du lymphome. Un modèle transgénique similaire avec le promoteur d'EGFR fusionné au gène de la *chloramphénicol acétyltransférase* a démontré que l'activité transcriptionnelle du promoteur était principalement retrouvée dans le thymus et que les thymocytes n'affichaient aucune activité, suggérant que l'expression d'EGFR dans le thymus est confinée au stroma thymique principalement composé de cellules épithéliales (217).

5. Souris déficiente en EGR-1 et lymphome

Ainsi, l'augmentation de l'expression d'EGR-1 par les cellules endothéliales et autres cellules stromales comme les fibroblastes suite au contact avec les cellules de lymphome, tel que nous l'avons mis en évidence, a joué un rôle de suppresseur de tumeur. Plusieurs études ont expérimenté l'inhibition de l'expression d'EGR-1 dans diverses étapes de la progression tumorale (176, 194, 218). Par contre, dans la plupart de ces études, l'absence d'EGR-1 est retrouvée non seulement dans les cellules stromales, mais également dans les cellules néoplasiques et par le fait même, rend difficile la contribution réelle d'EGR-1 du microenvironnement tumoral. En fait, nos études ne nous permettent pas jusqu'à présent de confirmer un rôle pour EGR-1 dans la croissance du lymphome. L'utilisation de souris déficientes en EGR-1 pourrait être utile dans ce contexte. Dans notre modèle d'injection i.t. des cellules de lymphome, l'emploi de ces souris pourrait sans doute aider à établir de façon inconditionnelle le rôle d'EGR-1 exprimé par les cellules stromales dans la croissance du lymphome thymique, et s'il y a lieu, l'expression d'EGR-1 au sein de la tumeur. Toutefois, les femelles déficientes en EGR-1, générées par le groupe de

Milbrandt (219) présentent un problème de fertilité suite à une déficience pour l'hormone lutéinisante. Une avenue possible afin de contourner ce problème d'infertilité causée par l'inactivation du gène *EGR-1* est la mutagenèse conditionnelle avec le système loxP/CRE. Ainsi, la délétion du gène *EGR-1* dans un tissu spécifique, comme le microenvironnement thymique, nous permettrait d'améliorer l'analyse fonctionnelle de notre gène d'intérêt dans la croissance du lymphome thymique. Les souris déficientes en *EGR-1* nous permettraient également d'établir si *EGR-1* est essentiel dans la lymphomagenèse en comparant l'incidence du développement de lymphome radio-induit dans ces dernières et les souris normales. S'il s'avérait que la lymphomagenèse puisse être induite dans ces souris déficientes, nous pourrions tirer avantage de cette étude et établir de nouvelles lignées de lymphome dépourvues totalement d'*EGR-1*. Ces lignées pourraient ensuite être utilisées dans l'élucidation du rôle d'*EGR-1* dans les cellules lymphomateuses, un aspect encore jamais étudié pour ce facteur de transcription.

6. Relation fonctionnelle entre EGR-1 et MMP-9

Avec l'objectif de déterminer le mécanisme impliqué dans l'inhibition de la croissance du lymphome thymique, nous avons étudié la relation entre EGF, *EGR-1*, et *MMP-9*, ce dernier étant associé à la majorité des processus de progression néoplasique de la plupart des types de cancers, incluant le lymphome, au niveau de l'angiogenèse, l'invasion et la métastasie aux organes secondaires (41). En fait, les macrophages infiltrant la tumeur et d'autres cellules inflammatoires, comme les mastocytes et les neutrophiles, contribuent à l'angiogenèse par leur habilité à sécréter *MMP-9*, laquelle favorise le relâchement de VEGF, un inducteur de l'angiogenèse. De plus, en absence de *MMP-9*, la migration des cellules cancéreuses est diminuée de façon importante (220). Différentes études dans des modèles murins de lymphome T ont montré que *MMP-9* joue un rôle important dans l'agressivité et la métastasie du lymphome aux organes (221, 222). Bien que la source principale de *MMP-9* dans le microenvironnement tumoral reste les cellules immunitaires, particulièrement celles de l'immunité innée, les études dans les modèles de cancers tant humains que murins montrent que les cellules épithéliales, vasculaires et stromales participent également à la production de *MMP-9* (223). En outre, Aoudjit et al. ont démontré que les souris ayant des lymphomes thymiques possédaient des taux de *MMP-9* trois fois supérieurs aux niveaux normaux. Or, les cellules de lymphome testées ne produisaient pas de *MMP-9* *in vivo*, mais semblaient plutôt induire la sécrétion de cette protéase par les

macrophages, les monocytes et les cellules stromales (224), augmentant ainsi les concentrations de MMP-9 dans le microenvironnement tumoral (225). L'ensemble de ces études suggère donc que l'inhibition de la croissance du lymphome T est possiblement modulée par la capacité d'EGR-1 à inhiber l'expression de MMP-9 par les cellules stromales du microenvironnement tumoral. Le transfert de cellules de lymphome surexprimant EGF dans des souris déficientes en MMP-9 pourrait démontrer l'impact réel de MMP-9 dans l'inhibition de la croissance tumorale.

Des études antérieures ont démontré qu'EGR-1 peut réguler à la hausse l'expression de MMP-2 dans les fibroblastes pulmonaires (226), de même que l'expression de MMP-14 durant l'angiogenèse de l'endothélium (227). Dans la présente étude, nous avons observé aucune modulation de l'expression de MMP-14 (MT1-MMP) par EGR-1 (**Figure 6D**) de même que celle de MMP-2 (**Résultats non publiés**). Pour ce qui est de la régulation de l'expression de MMP-9, le rôle d'EGR-1 est moins bien connu. Le promoteur *MMP-9* contient plusieurs régions régulatrices, incluant des sites de liaison pour les facteurs AP-1, NF-κB, SP-1 et Ets-1, impliquées dans l'expression basale et induite de MMP-9 (228). Aucun motif de liaison d'EGR-1 n'a été mis en évidence dans le promoteur de *MMP-9* jusqu'à ce que le groupe de Shin et *al.* identifie récemment un site de liaison fonctionnel pour EGR-1 chevauchant le site SP-1 (229). Dans ce cas, ils ont démontré qu'EGR-1 joue un rôle essentiel pour l'induction de MMP-9 via TNF α dans les cellules HeLa. Bien que ces travaux confirment que MMP-9 peut être régulé directement par EGR-1, la littérature concède à EGR-1, comme aux membres de la famille EGR, des caractéristiques fonctionnelles distinctes en relation avec le type cellulaire, et nos résultats suggèrent maintenant une nouvelle variation en fonction du microenvironnement et de ses facteurs. La relation entre EGR-1 et MMP-9 ouvre de nouvelles perspectives sur les mécanismes impliquant un gène suppresseur de tumeur dans le lymphome.

7. Utilisation d'un modèle *in vivo* de bioluminescence

Pour de nombreux cancers, les niveaux d'expression et d'activité enzymatique des MMPs sont des données fondamentales pour élucider le rôle physiologique de ces enzymes dans le microenvironnement tumoral. À ce jour, plusieurs techniques d'imagerie ont permis d'étudier l'expression et/ou l'activités des MMPs *in vivo*, comme par exemple le transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET), la tomographie par émission de positons (TEP), la tomographie d'émission monophotonique (TEMP) et l'imagerie par résonance magnétique

nucléaire (IRM) (230). Lors de notre étude, nous avons plutôt opté pour un modèle murin transgénique où le promoteur *MMP-9* est fusionné au gène de la *luciférase*. Ce gène rapporteur, le plus utilisé pour la bioluminescence, catalyse la transformation de son substrat, la D-luciférine, en oxyluciférine dans un processus dépendant de l'ATP résultant en l'émission de photons pouvant être détectés (231). Nous avons tiré profit de ce modèle afin de déterminer la capacité des lymphomes surexprimant EGF à moduler l'expression de *MMP-9* dans les cellules thymiques de l'hôte comparativement aux lymphomes témoins. Le traitement des souris par des injections i.p. de D-luciférine nous permettait, à l'aide d'un système de caméra développé par IVIS, l'imagerie rapide de l'animal anesthésié ou en post-mortem. La mesure de bioluminescence nous a donc permis d'évaluer l'activation transcriptionnelle du promoteur *MMP-9* par les cellules stromales. De telles études bioluminescences pour les MMPs ont déjà été effectuées avec le promoteur de *MMP-13* dans un modèle de réparation de blessure (232) et avec des cellules tumorales transfectées avec le gène de la *luciférase* dans un essai métastatique dans des souris déficientes en *MMP-9* (233). Bien qu'une telle approche similaire ait été rapportée en fusionnant le promoteur de *MMP-9* avec la *béta-galactosidase* (234), nous sommes les premiers à utiliser l'imagerie bioluminescence avec un modèle transgénique comprenant la construction du promoteur *MMP-9* fusionnée à la *luciférase*.

8. Mécanisme d'action d'EGR-1 dans l'inhibition de la croissance du lymphome

Le dévoilement de l'inhibition de *MMP-9* par EGR-1 laisse présager un nouveau mécanisme par lequel ce facteur de transcription peut agir en tant que gène suppresseur de tumeur. Néanmoins, considérant le répertoire de gènes sous le contrôle d'EGR-1, il est possible que des mécanismes complémentaires et/ou alternatifs puissent être impliqués dans cette inhibition de la croissance du lymphome thymique. Une analyse par micromatrice des gènes sous le contrôle d'EGR-1 exprimés de façon constitutive a démontré qu'il existe un nombre important de gènes capables de moduler diverses étapes du processus tumoral (194). On y retrouve notamment les gènes codant pour *CXCL14*, un inhibiteur d'angiogenèse via le blocage du recrutement de précurseurs de cellules endothéliales (235), les inhibiteurs de MMPs (soit TIMP-1 et -3 (*tissue inhibitor of metalloproteinase*)), lesquels sont connus pour inhiber directement l'angiogenèse en bloquant l'activité des MMPs et la liaison de VEGF à VEGFR-2 (236). Plusieurs gènes pro-apoptotiques, dont *SIVA* (*SIVA1, apoptosis-inducing factor*) (237), *DEDD2*

(*death effector domain containing 2*) (238), et *DUSP2* (*dual specificity phosphatase 2*) (239) sont également régulés à la hausse par EGR-1. Ce dernier régule aussi des gènes aux fonctions antiprolifératives, tels que les effecteurs du cycle cellulaire, *p57/KIP2* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1C*) (240) et *GADD45B* (*growth arrest and DNA-damage-inducible, beta*) (241), de même que *TGF-β* (242). Le facteur TGF-β peut être envisagé parmi les mécanismes possibles par lequel EGR-1 peut inhiber la croissance du lymphome thymique. EGR-1 est bien connu pour induire l'expression de ce facteur, notamment dans les fibroblastes HT1080 et le promoteur de *TGF-β* contient un motif de liaison pour EGR-1 (184). De plus, l'idée que TGF-β puisse diminuer la croissance du lymphome est supportée par des études antérieures démontrant que la sécrétion de ce facteur dans le microenvironnement thymique inhibe la croissance et la différenciation des populations de thymocytes immatures (243). Cependant, ce même facteur induit, du moins à un certain niveau, l'expression de MMP-9 dans ces mêmes cellules, bien que l'expression de l'inhibiteur de MMP-9, TIMP-1, y soit supérieure et suffisante pour inhiber l'action des métalloprotéases (244). Quelles sont les cellules stromales influencées par EGR-1 et quels sont les autres mécanismes par lesquels EGR-1 inhibe la croissance du lymphome thymique? Ces questions restent à élucider et sont présentement en étude.

9. Avenue thérapeutique

L'administration topique d'EGF est utilisée depuis 1989 pour stimuler le processus de réparation pour une variété de blessure tissulaire, de même que l'administration i.v., orale et rectale pour les dommages gastro-intestinaux (245). Bien que les mécanismes employés par EGF pour stimuler la réparation tissulaire soient les mêmes que ceux qui sont impliqués dans le développement tumoral (prolifération et migration cellulaire, angiogenèse) (51), les essais cliniques récents n'ont présenté aucun effet secondaire à long terme. Plusieurs études ont mentionné qu'EGF n'induit pas de génotoxicité, de mutagénicité ou de cytotoxicité (246). Il a été démontré, entre autres, qu'EGF agit en tant qu'agent cytoprotecteur dans le traitement de la mucosite associée à la chimiothérapie tumorale (247) et qu'il prévient l'induction d'un cancer rectal chez des rats exposés à l'azoxyméthane (248). *In vitro*, EGF inhibe la croissance de lignées cancéreuses d'origine épithéliale (249, 250) et ne peut stimuler la prolifération de lignées d'adénocarcinomes gastriques (251). De plus, chez des souris exposées à EGF, il n'y a eu aucune formation de polypes ni de transformation cellulaire (252). Les nombreuses études pré-cliniques

basées sur l'administration d'EGF sur de longue période et à des concentrations supra-physiologiques ont conclu que ce facteur de croissance induit l'hyperplasie dépendamment de la dose et de la durée de l'exposition. Cette croissance épithéliale excessive était réversible avec le retrait du traitement et ne présentait aucune évidence histologique de dysplasie et/ou d'anaplasie (253-255). Alors que l'inhibition du récepteur EGF par des petites molécules ou des anticorps est largement utilisée pour traiter différents types de cancers, il nous est permis de croire que l'administration d'EGF à des fins thérapeutiques pourrait être envisagée dans un contexte spécifique de lymphome thymique où nous avons démontré qu'EGF induit l'expression d'*EGR-1*, un gène suppresseur de tumeur. En revanche, avant de considérer EGF à des fins thérapeutiques, il demeure essentiel de définir le rôle physiologique de la cascade EGF-EGR-1-MMP-9 dans les cellules normales afin de mieux connaître les conséquences sur les processus cellulaires d'une action thérapeutique ciblant cette cascade.

10. Conclusion

Nos travaux ont démontré que l'interaction entre les cellules de lymphome et les cellules stromales mène à la modulation de l'expression génique de l'endothélium par les cellules cancéreuses. Nous avons documenté pour la première fois que le facteur de transcription *EGR-1* est induit dans les cellules stromales via la sécrétion de facteurs solubles par les lymphomes, et que le facteur de croissance EGF est le principal facteur responsable de cette induction. De plus, lors de la croissance du lymphome thymique, *EGR-1* exerce un rôle de gène suppresseur de tumeur puisque le développement tumoral est inhibé possiblement par un contrôle sur l'expression de plusieurs gènes, notamment, *MMP-9* (**Figure 3.1**). Dans l'ensemble, ces travaux nous ont permis de fournir une meilleure compréhension des bases moléculaires lors des contacts lympho-stromaux, en plus de fournir des informations précieuses sur les mécanismes utilisés par *Egr-1* afin de le définir comme gène suppresseur de tumeur dans la croissance du lymphome thymique.

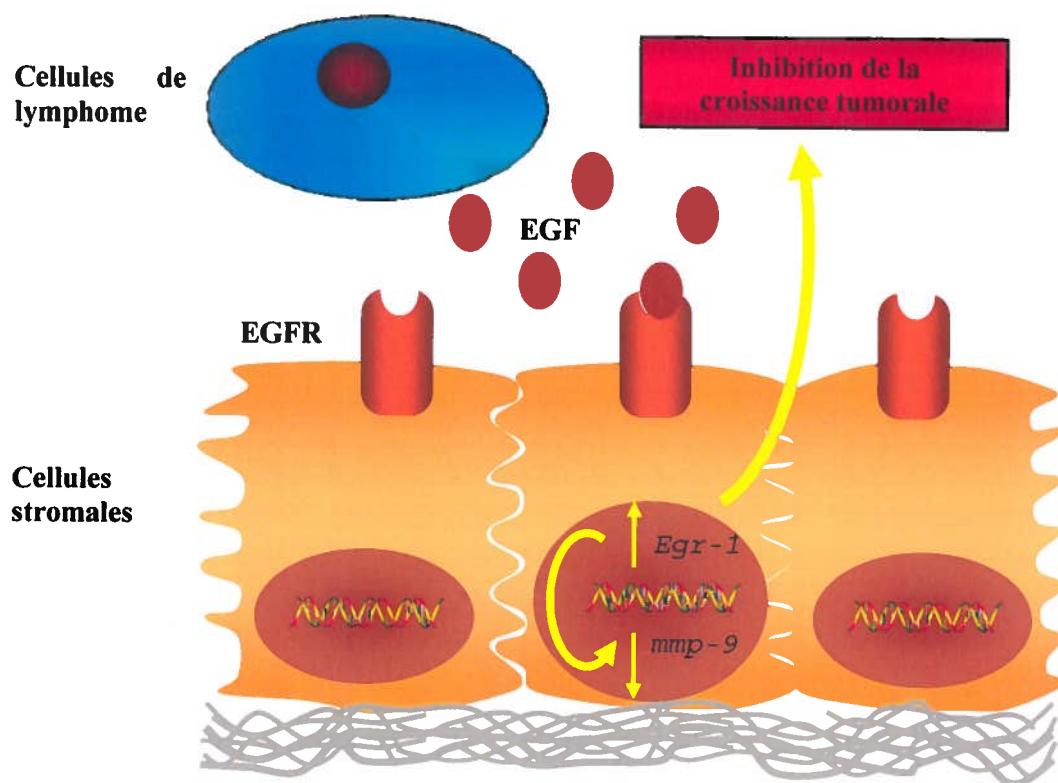


Figure 3.1: Modèle d'étude. Lors de la croissance du lymphome thymique, les cellules de lymphome entrent en contact avec le microenvironnement thymique, composé d'un ensemble de cellules stromales. L'interaction permet la création d'une synapse amplifiant les signaux déclenchés au niveau du microenvironnement par les molécules solubles. La sécrétion du facteur de croissance EGF par les cellules de lymphome entraîne ainsi l'activation des récepteurs EGFR exprimés sur les cellules stromales et par conséquent, l'induction de l'expression d'EGR-1. Ce facteur de transcription va par la suite inhiber l'expression de MMP-9, une métalloprotéase de la matrice connue pour être associée à la majorité des processus de progression néoplasique du lymphome. Finalement, cette perte de l'expression de MMP-9 mène à une inhibition de la croissance du lymphome thymique.

Bibliographie

1. Levine AM. Acquired immunodeficiency syndrome-related lymphoma. *Blood* 1992; 80: 8-20.
2. Robert-Guroff M, Nakao Y, Notake K, Ito Y, Sliski A, Gallo RC. Natural antibodies to human retrovirus HTLV in a cluster of Japanese patients with adult T cell leukemia. *Science* 1982; 215: 975-8.
3. Hardell L, Eriksson M. A case-control study of non-Hodgkin lymphoma and exposure to pesticides. *Cancer* 1999; 85: 1353-60.
4. List AF, Greer JP, Cousar JB, et al. Non-Hodgkin's lymphoma after treatment of Hodgkin's disease: association with Epstein-Barr virus. *Ann Intern Med* 1986; 105: 668-73.
5. Brennan NJ, Fennelly JJ, Towers RP, FitzGerald MX. Sarcoidosis and lymphoma in the same patient. *Postgrad Med J* 1983; 59: 581-5.
6. Kassan SS, Thomas TL, Moutsopoulos HM, et al. Increased risk of lymphoma in sicca syndrome. *Ann Intern Med* 1978; 89: 888-92.
7. Purtilo DT. Pathogenesis and phenotypes of an X-linked recessive lymphoproliferative syndrome. *Lancet* 1976; 2: 882-5.
8. Rudiger T, Weisenburger DD, Anderson JR, et al. Peripheral T-cell lymphoma (excluding anaplastic large-cell lymphoma): results from the Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Ann Oncol* 2002; 13: 140-9.
9. Rizvi MA, Evens AM, Tallman MS, Nelson BP, Rosen ST. T-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2006; 107: 1255-64.
10. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J. Lymphoma classification--from controversy to consensus: the R.E.A.L. and WHO Classification of lymphoid neoplasms. *Ann Oncol* 2000; 11 Suppl 1: 3-10.
11. Rogers BB. Overview of non-Hodgkin's lymphoma. *Semin Oncol Nurs* 2006; 22: 67-72.
12. Armitage JO. Treatment of non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 1993; 328: 1023-30.
13. Hamilton A, Gallipoli P, Nicholson E, Holyoake TL. Targeted therapy in haematological malignancies. *J Pathol*; 220: 404-18.
14. Buttgereit P, Schakowski F, Marten A, et al. Effects of adenoviral wild-type p53 gene transfer in p53-mutated lymphoma cells. *Cancer Gene Ther* 2001; 8: 430-9.
15. Nagata S, Onda M, Numata Y, et al. Novel anti-CD30 recombinant immunotoxins containing disulfide-stabilized Fv fragments. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 2345-55.
16. Moura IC, Lepelletier Y, Arnulf B, et al. A neutralizing monoclonal antibody (mAb A24) directed against the transferrin receptor induces apoptosis of tumor T lymphocytes from ATL patients. *Blood* 2004; 103: 1838-45.
17. Harvey S, Decker R, Dai Y, et al. Interactions between 2-fluoroadenine 9-beta-D-arabinofuranoside and the kinase inhibitor UCN-01 in human leukemia and lymphoma cells. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 320-30.
18. Piekorz RL, Robey R, Sandor V, et al. Inhibitor of histone deacetylation,depsipeptide (FR901228), in the treatment of peripheral and cutaneous T-cell lymphoma: a case report. *Blood* 2001; 98: 2865-8.
19. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood* 2008; 111: 5446-56.

20. Kaplan HS, Brown MB. A quantitative dose-response study of lymphoid-tumor development in irradiated C 57 black mice. *J Natl Cancer Inst* 1952; 13: 185-208.
21. Defresne MP, Rongy AM, Greimers R, Boniver J. Cellular aspects of radiation leukemogenesis in C57 BL/Ka mice: alterations to thymic microenvironment and lymphopoiesis. *Leuk Res* 1986; 10: 783-9.
22. Verlaet M, Deregowski V, Denis G, et al. Genetic imbalances in preleukemic thymuses. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 283: 12-8.
23. St-Pierre Y, Aoudjit F, Lalancette M, Potworowski EF. Dissemination of T cell lymphoma to target organs: a post-homing event implicating ICAM-1 and matrix metalloproteinases. *Leuk Lymphoma* 1999; 34: 53-61.
24. Aoudjit F, Potworowski EF, St-Pierre Y. Bi-directional induction of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 during T lymphoma/endothelial cell contact: implication of ICAM-1. *J Immunol* 1998; 160: 2967-73.
25. Drillenburg P, Pals ST. Cell adhesion receptors in lymphoma dissemination. *Blood* 2000; 95: 1900-10.
26. Pals ST, de Gorter DJ, Spaargaren M. Lymphoma dissemination: the other face of lymphocyte homing. *Blood* 2007; 110: 3102-11.
27. Kansas GS. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* 1996; 88: 3259-87.
28. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992; 69: 11-25.
29. Williams AF, Barclay AN. The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition. *Annu Rev Immunol* 1988; 6: 381-405.
30. Bargatze RF, Jutila MA, Butcher EC. Distinct roles of L-selectin and integrins alpha 4 beta 7 and LFA-1 in lymphocyte homing to Peyer's patch-HEV in situ: the multistep model confirmed and refined. *Immunity* 1995; 3: 99-108.
31. Campbell JJ, Hedrick J, Zlotnik A, Siani MA, Thompson DA, Butcher EC. Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science* 1998; 279: 381-4.
32. de Gorter DJ, Beuling EA, Kersseboom R, et al. Bruton's tyrosine kinase and phospholipase Cgamma2 mediate chemokine-controlled B cell migration and homing. *Immunity* 2007; 26: 93-104.
33. Kinashi T. Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 546-59.
34. Johnson-Leger CA, Aurrand-Lions M, Beltraminelli N, Fasel N, Imhof BA. Junctional adhesion molecule-2 (JAM-2) promotes lymphocyte transendothelial migration. *Blood* 2002; 100: 2479-86.
35. Pals ST, Horst E, Ossekoppele GJ, Figdor CG, Scheper RJ, Meijer CJ. Expression of lymphocyte homing receptor as a mechanism of dissemination in non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1989; 73: 885-8.
36. Aoudjit F, Potworowski EF, Springer TA, St-Pierre Y. Protection from lymphoma cell metastasis in ICAM-1 mutant mice: a posthomming event. *J Immunol* 1998; 161: 2333-8.
37. Belanger SD, St-Pierre Y. Role of selectins in the triggering, growth, and dissemination of T-lymphoma cells: implication of L-selectin in the growth of thymic lymphoma. *Blood* 2005; 105: 4800-6.
38. Orr FW, Wang HH, Lafrenie RM, Scherbarth S, Nance DM. Interactions between cancer cells and the endothelium in metastasis. *J Pathol* 2000; 190: 310-29.

39. Van Themsche C, Alain T, Kossakowska AE, Urbanski S, Potworowski EF, St-Pierre Y. Stromelysin-2 (matrix metalloproteinase 10) is inducible in lymphoma cells and accelerates the growth of lymphoid tumors in vivo. *J Immunol* 2004; 173: 3605-11.
40. Van Themsche C, Potworowski EF, St-Pierre Y. Stromelysin-1 (MMP-3) is inducible in T lymphoma cells and accelerates the growth of lymphoid tumors in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 315: 884-91.
41. Demers M, Couillard J, Belanger S, St-Pierre Y. New roles for matrix metalloproteinases in metastasis. *Crit Rev Immunol* 2005; 25: 493-523.
42. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev* 1989; 8: 98-101.
43. Tlsty TD, Coussens LM. Tumor stroma and regulation of cancer development. *Annu Rev Pathol* 2006; 1: 119-50.
44. Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* 2009; 9: 239-52.
45. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406: 747-52.
46. Weigelt B, Glas AM, Wessels LF, Witteveen AT, Peterse JL, van't Veer LJ. Gene expression profiles of primary breast tumors maintained in distant metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 15901-5.
47. Chin K, de Solorzano CO, Knowles D, et al. In situ analyses of genome instability in breast cancer. *Nat Genet* 2004; 36: 984-8.
48. Yao J, Weremowicz S, Feng B, et al. Combined cDNA array comparative genomic hybridization and serial analysis of gene expression analysis of breast tumor progression. *Cancer Res* 2006; 66: 4065-78.
49. Barsky SH, Karlin NJ. Myoepithelial cells: autocrine and paracrine suppressors of breast cancer progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2005; 10: 249-60.
50. Sadlonova A, Novak Z, Johnson MR, et al. Breast fibroblasts modulate epithelial cell proliferation in three-dimensional in vitro co-culture. *Breast Cancer Res* 2005; 7: R46-59.
51. Bissell MJ, Radisky D. Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer* 2001; 1: 46-54.
52. Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 2005; 438: 820-7.
53. Ono M, Izumi H, Yoshida S, et al. Angiogenesis as a new target for cancer treatment. *Cancer Chemother Pharmacol* 1996; 38 Suppl: S78-82.
54. Luo Y, Zhou H, Krueger J, et al. Targeting tumor-associated macrophages as a novel strategy against breast cancer. *J Clin Invest* 2006; 116: 2132-41.
55. Loeffler M, Kruger JA, Niethammer AG, Reisfeld RA. Targeting tumor-associated fibroblasts improves cancer chemotherapy by increasing intratumoral drug uptake. *J Clin Invest* 2006; 116: 1955-62.
56. Joyce JA. Therapeutic targeting of the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 2005; 7: 513-20.
57. Gingras D, Boivin D, Deckers C, Gendron S, Barthomeuf C, Beliveau R. Neovastat--a novel antiangiogenic drug for cancer therapy. *Anticancer Drugs* 2003; 14: 91-6.
58. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 161-74.
59. Dauer DJ, Ferraro B, Song L, et al. Stat3 regulates genes common to both wound healing and cancer. *Oncogene* 2005; 24: 3397-408.

60. Liby K, Royce DB, Williams CR, et al. The synthetic triterpenoids CDDO-methyl ester and CDDO-ethyl amide prevent lung cancer induced by vinyl carbamate in A/J mice. *Cancer Res* 2007; 67: 2414-9.
61. Bertl E, Bartsch H, Gerhauser C. Inhibition of angiogenesis and endothelial cell functions are novel sulforaphane-mediated mechanisms in chemoprevention. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 575-85.
62. Xu C, Shen G, Chen C, Gelinas C, Kong AN. Suppression of NF-kappaB and NF-kappaB-regulated gene expression by sulforaphane and PEITC through IkappaBalphalpha, IKK pathway in human prostate cancer PC-3 cells. *Oncogene* 2005; 24: 4486-95.
63. Kong X, Lin Z, Liang D, Fath D, Sang N, Caro J. Histone deacetylase inhibitors induce VHL and ubiquitin-independent proteasomal degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol Cell Biol* 2006; 26: 2019-28.
64. Buteau-Lozano H, Ancelin M, Lardeux B, Milanini J, Perrot-Applanat M. Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by estradiol and tamoxifen in breast cancer cells: a complex interplay between estrogen receptors alpha and beta. *Cancer Res* 2002; 62: 4977-84.
65. Kim BG, Li C, Qiao W, et al. Smad4 signalling in T cells is required for suppression of gastrointestinal cancer. *Nature* 2006; 441: 1015-9.
66. Suh N, Roberts AB, Birkey Reffey S, et al. Synthetic triterpenoids enhance transforming growth factor beta/Smad signaling. *Cancer Res* 2003; 63: 1371-6.
67. Jin H, Varner J. Integrins: roles in cancer development and as treatment targets. *Br J Cancer* 2004; 90: 561-5.
68. Pietras K, Sjoblom T, Rubin K, Heldin CH, Ostman A. PDGF receptors as cancer drug targets. *Cancer Cell* 2003; 3: 439-43.
69. Graff JR, McNulty AM, Hanna KR, et al. The protein kinase Cbeta-selective inhibitor, Enzastaurin (LY317615.HCl), suppresses signaling through the AKT pathway, induces apoptosis, and suppresses growth of human colon cancer and glioblastoma xenografts. *Cancer Res* 2005; 65: 7462-9.
70. Manley PW, Bold G, Bruggen J, et al. Advances in the structural biology, design and clinical development of VEGF-R kinase inhibitors for the treatment of angiogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1697: 17-27.
71. Sukhatme VP. Early transcriptional events in cell growth: the Egr family. *J Am Soc Nephrol* 1990; 1: 859-66.
72. Morgan JI, Curran T. Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes. *Trends Neurosci* 1989; 12: 459-62.
73. Beckmann AM, Wilce PA. Egr transcription factors in the nervous system. *Neurochem Int* 1997; 31: 477-510; discussion 7-6.
74. Chavrier P, Lemaire P, Revelant O, Bravo R, Charnay P. Characterization of a mouse multigene family that encodes zinc finger structures. *Mol Cell Biol* 1988; 8: 1319-26.
75. Nardelli J, Gibson TJ, Vesque C, Charnay P. Base sequence discrimination by zinc-finger DNA-binding domains. *Nature* 1991; 349: 175-8.
76. Miller J, McLachlan AD, Klug A. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *EMBO J* 1985; 4: 1609-14.
77. Sukhatme VP. The Egr family of nuclear signal transducers. *Am J Kidney Dis* 1991; 17: 615-8.
78. Sukhatme VP, Cao XM, Chang LC, et al. A zinc finger-encoding gene coregulated with c-fos during growth and differentiation, and after cellular depolarization. *Cell* 1988; 53: 37-43.

79. Joseph LJ, Le Beau MM, Jamieson GA, Jr., et al. Molecular cloning, sequencing, and mapping of EGR2, a human early growth response gene encoding a protein with "zinc-binding finger" structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85: 7164-8.
80. Patwardhan S, Gashler A, Siegel MG, et al. EGR3, a novel member of the Egr family of genes encoding immediate-early transcription factors. *Oncogene* 1991; 6: 917-28.
81. Zipfel PF, Decker EL, Holst C, Skerka C. The human zinc finger protein EGR-4 acts as autoregulatory transcriptional repressor. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1354: 134-44.
82. Madden SL, Cook DM, Morris JF, Gashler A, Sukhatme VP, Rauscher FJ, 3rd. Transcriptional repression mediated by the WT1 Wilms tumor gene product. *Science* 1991; 253: 1550-3.
83. Christy BA, Lau LF, Nathans D. A gene activated in mouse 3T3 cells by serum growth factors encodes a protein with "zinc finger" sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85: 7857-61.
84. Milbrandt J. A nerve growth factor-induced gene encodes a possible transcriptional regulatory factor. *Science* 1987; 238: 797-9.
85. Lemaire P, Revelant O, Bravo R, Charnay P. Two mouse genes encoding potential transcription factors with identical DNA-binding domains are activated by growth factors in cultured cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85: 4691-5.
86. Lim RW, Varnum BC, Herschman HR. Cloning of tetradecanoyl phorbol ester-induced 'primary response' sequences and their expression in density-arrested Swiss 3T3 cells and a TPA non-proliferative variant. *Oncogene* 1987; 1: 263-70.
87. Madden SL, Rauscher FJ, 3rd. Positive and negative regulation of transcription and cell growth mediated by the EGR family of zinc-finger gene products. *Ann N Y Acad Sci* 1993; 684: 75-84.
88. Cao XM, Koski RA, Gashler A, et al. Identification and characterization of the Egr-1 gene product, a DNA-binding zinc finger protein induced by differentiation and growth signals. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 1931-9.
89. Gashler AL, Swaminathan S, Sukhatme VP. A novel repression module, an extensive activation domain, and a bipartite nuclear localization signal defined in the immediate-early transcription factor Egr-1. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 4556-71.
90. Russo MW, Matheny C, Milbrandt J. Transcriptional activity of the zinc finger protein NGFI-A is influenced by its interaction with a cellular factor. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 6858-65.
91. Ackerman SL, Minden AG, Williams GT, Bobonis C, Yeung CY. Functional significance of an overlapping consensus binding motif for Sp1 and Zif268 in the murine adenosine deaminase gene promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 7523-7.
92. Takimoto Y, Wang ZY, Kobler K, Deuel TF. Promoter region of the human platelet-derived growth factor A-chain gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 1686-90.
93. Khachigian LM, Lindner V, Williams AJ, Collins T. Egr-1-induced endothelial gene expression: a common theme in vascular injury. *Science* 1996; 271: 1427-31.
94. Christy B, Nathans D. DNA binding site of the growth factor-inducible protein Zif268. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 8737-41.
95. Cao X, Mahendran R, Guy GR, Tan YH. Detection and characterization of cellular EGR-1 binding to its recognition site. *J Biol Chem* 1993; 268: 16949-57.
96. Nakagama H, Heinrich G, Pelletier J, Housman DE. Sequence and structural requirements for high-affinity DNA binding by the WT1 gene product. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 1489-98.

97. Wang ZY, Deuel TF. An S1 nuclease-sensitive homopurine/homopyrimidine domain in the PDGF A-chain promoter contains a novel binding site for the growth factor-inducible protein EGR-1. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 188: 433-9.
98. Russo MW, Sevetson BR, Milbrandt J. Identification of NAB1, a repressor of NGFI-A- and Krox20-mediated transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 6873-7.
99. Svaren J, Sevetson BR, Apel ED, Zimonjic DB, Popescu NC, Milbrandt J. NAB2, a corepressor of NGFI-A (Egr-1) and Krox20, is induced by proliferative and differentiative stimuli. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 3545-53.
100. Thiel G, Kaufmann K, Magin A, Lietz M, Bach K, Cramer M. The human transcriptional repressor protein NAB1: expression and biological activity. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1493: 289-301.
101. Ehrengreuber MU, Muhlebach SG, Sohrman S, Leutenegger CM, Lester HA, Davidson N. Modulation of early growth response (EGR) transcription factor-dependent gene expression by using recombinant adenovirus. *Gene* 2000; 258: 63-9.
102. Tsai JC, Liu L, Guan J, Aird WC. The Egr-1 gene is induced by epidermal growth factor in ECV304 cells and primary endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 279: C1414-24.
103. Kaufmann K, Thiel G. Epidermal growth factor and platelet-derived growth factor induce expression of Egr-1, a zinc finger transcription factor, in human malignant glioma cells. *J Neurol Sci* 2001; 189: 83-91.
104. Shin SY, Song H, Kim CG, et al. Egr-1 is necessary for fibroblast growth factor-2-induced transcriptional activation of the glial cell line-derived neurotrophic factor in murine astrocytes. *J Biol Chem* 2009; 284: 30583-93.
105. Gaggioli C, Deckert M, Robert G, et al. HGF induces fibronectin matrix synthesis in melanoma cells through MAP kinase-dependent signaling pathway and induction of Egr-1. *Oncogene* 2005; 24: 1423-33.
106. Liu L, Tsai JC, Aird WC. Egr-1 gene is induced by the systemic administration of the vascular endothelial growth factor and the epidermal growth factor. *Blood* 2000; 96: 1772-81.
107. Sakamoto KM, Fraser JK, Lee HJ, Lehman E, Gasson JC. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 signaling pathways converge on the CREB-binding site in the human egr-1 promoter. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 5975-85.
108. Hoffmann E, Ashouri J, Wolter S, et al. Transcriptional regulation of EGR-1 by the interleukin-1-JNK-MKK7-c-Jun pathway. *J Biol Chem* 2008; 283: 12120-8.
109. Cao XM, Guy GR, Sukhatme VP, Tan YH. Regulation of the Egr-1 gene by tumor necrosis factor and interferons in primary human fibroblasts. *J Biol Chem* 1992; 267: 1345-9.
110. Kubosaki A, Tomaru Y, Tagami M, et al. Genome-wide investigation of in vivo EGR-1 binding sites in monocytic differentiation. *Genome Biol* 2009; 10: R41.
111. Kaufmann K, Thiel G. Epidermal growth factor and thrombin induced proliferation of immortalized human keratinocytes is coupled to the synthesis of Egr-1, a zinc finger transcriptional regulator. *J Cell Biochem* 2002; 85: 381-91.
112. Guha M, O'Connell MA, Pawlinski R, et al. Lipopolysaccharide activation of the MEK-ERK1/2 pathway in human monocytic cells mediates tissue factor and tumor necrosis factor alpha expression by inducing Elk-1 phosphorylation and Egr-1 expression. *Blood* 2001; 98: 1429-39.
113. Nishi H, Nishi KH, Johnson AC. Early Growth Response-1 gene mediates up-regulation of epidermal growth factor receptor expression during hypoxia. *Cancer Res* 2002; 62: 827-34.
114. Huang RP, Adamson ED. A biological role for Egr-1 in cell survival following ultra-violet irradiation. *Oncogene* 1995; 10: 467-75.

115. Datta R, Taneja N, Sukhatme VP, Qureshi SA, Weichselbaum R, Kufe DW. Reactive oxygen intermediates target CC(A/T)6GG sequences to mediate activation of the early growth response 1 transcription factor gene by ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 2419-22.
116. Harada S, Smith RM, Smith JA, White MF, Jarett L. Insulin-induced egr-1 and c-fos expression in 32D cells requires insulin receptor, Shc, and mitogen-activated protein kinase, but not insulin receptor substrate-1 and phosphatidylinositol 3-kinase activation. *J Biol Chem* 1996; 271: 30222-6.
117. Garrington TP, Johnson GL. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11: 211-8.
118. Gineitis D, Treisman R. Differential usage of signal transduction pathways defines two types of serum response factor target gene. *J Biol Chem* 2001; 276: 24531-9.
119. Aicher WK, Sakamoto KM, Hack A, Eibel H. Analysis of functional elements in the human Egr-1 gene promoter. *Rheumatol Int* 1999; 18: 207-14.
120. Rolli M, Kotlyarov A, Sakamoto KM, Gaestel M, Neininger A. Stress-induced stimulation of early growth response gene-1 by p38/stress-activated protein kinase 2 is mediated by a cAMP-responsive promoter element in a MAPKAP kinase 2-independent manner. *J Biol Chem* 1999; 274: 19559-64.
121. Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA. The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci* 2004; 117: 1281-3.
122. Tian SS, Tapley P, Sincich C, Stein RB, Rosen J, Lamb P. Multiple signaling pathways induced by granulocyte colony-stimulating factor involving activation of JAKs, STAT5, and/or STAT3 are required for regulation of three distinct classes of immediate early genes. *Blood* 1996; 88: 4435-44.
123. Ingram JL, Antao-Menezes A, Mangum JB, et al. Opposing actions of Stat1 and Stat6 on IL-13-induced up-regulation of early growth response-1 and platelet-derived growth factor ligands in pulmonary fibroblasts. *J Immunol* 2006; 177: 4141-8.
124. Schwachtgen JL, Campbell CJ, Braddock M. Full promoter sequence of human early growth response factor-1 (Egr-1): demonstration of a fifth functional serum response element. *DNA Seq* 2000; 10: 429-32.
125. Yang SH, Sharrocks AD. Convergence of the SUMO and MAPK pathways on the ETS-domain transcription factor Elk-1. *Biochem Soc Symp* 2006: 121-9.
126. Ling Y, Lakey JH, Roberts CE, Sharrocks AD. Molecular characterization of the B-box protein-protein interaction motif of the ETS-domain transcription factor Elk-1. *EMBO J* 1997; 16: 2431-40.
127. Whitmarsh AJ, Shore P, Sharrocks AD, Davis RJ. Integration of MAP kinase signal transduction pathways at the serum response element. *Science* 1995; 269: 403-7.
128. Cibelli G, Jungling S, Schoch S, Gerdes HH, Thiel G. Identification of a functional cAMP response element in the secretogranin II gene. *Eur J Biochem* 1996; 236: 171-9.
129. Jungling S, Cibelli G, Czardybon M, Gerdes HH, Thiel G. Differential regulation of chromogranin B and synapsin I gene promoter activity by cAMP and cAMP-dependent protein kinase. *Eur J Biochem* 1994; 226: 925-35.
130. Meyer RG, Kupper JH, Kandolf R, Rodemann HP. Early growth response-1 gene (Egr-1) promoter induction by ionizing radiation in U87 malignant glioma cells in vitro. *Eur J Biochem* 2002; 269: 337-46.

131. Cui MZ, Laag E, Sun L, Tan M, Zhao G, Xu X. Lysophosphatidic acid induces early growth response gene 1 expression in vascular smooth muscle cells: CRE and SRE mediate the transcription. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 1029-35.
132. Thiel G, Cibelli G. Regulation of life and death by the zinc finger transcription factor Egr-1. *J Cell Physiol* 2002; 193: 287-92.
133. Lemaire P, Vesque C, Schmitt J, Stunnenberg H, Frank R, Charnay P. The serum-inducible mouse gene Krox-24 encodes a sequence-specific transcriptional activator. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 3456-67.
134. Cao X, Mahendran R, Guy GR, Tan YH. Protein phosphatase inhibitors induce the sustained expression of the Egr-1 gene and the hyperphosphorylation of its gene product. *J Biol Chem* 1992; 267: 12991-7.
135. Huang RP, Adamson ED. The phosphorylated forms of the transcription factor, Egr-1, bind to DNA more efficiently than non-phosphorylated. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 200: 1271-6.
136. Muller HJ, Skerka C, Bialonski A, Zipfel PF. Clone pAT 133 identifies a gene that encodes another human member of a class of growth factor-induced genes with almost identical zinc-finger domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 10079-83.
137. Cui MZ, Parry GC, Oeth P, et al. Transcriptional regulation of the tissue factor gene in human epithelial cells is mediated by Sp1 and EGR-1. *J Biol Chem* 1996; 271: 2731-9.
138. Fukada T, Tonks NK. The reciprocal role of Egr-1 and Sp family proteins in regulation of the PTP1B promoter in response to the p210 Bcr-Abl oncoprotein-tyrosine kinase. *J Biol Chem* 2001; 276: 25512-9.
139. Hu CT, Chang TY, Cheng CC, et al. Snail associates with EGR-1 and SP-1 to upregulate transcriptional activation of p15. *FEBS J*.
140. Chapman NR, Perkins ND. Inhibition of the RelA(p65) NF-kappaB subunit by Egr-1. *J Biol Chem* 2000; 275: 4719-25.
141. Zhang X, Liu Y. Suppression of HGF receptor gene expression by oxidative stress is mediated through the interplay between Sp1 and Egr-1. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 284: F1216-25.
142. Srivastava S, Weitzmann MN, Kimble RB, et al. Estrogen blocks M-CSF gene expression and osteoclast formation by regulating phosphorylation of Egr-1 and its interaction with Sp-1. *J Clin Invest* 1998; 102: 1850-9.
143. Decker EL, Nehmann N, Kampen E, Eibel H, Zipfel PF, Skerka C. Early growth response proteins (EGR) and nuclear factors of activated T cells (NFAT) form heterodimers and regulate proinflammatory cytokine gene expression. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: 911-21.
144. Mouillet JF, Sonnenberg-Hirche C, Yan X, Sadovsky Y. p300 regulates the synergy of steroidogenic factor-1 and early growth response-1 in activating luteinizing hormone-beta subunit gene. *J Biol Chem* 2004; 279: 7832-9.
145. Wong DL, Siddall BJ, Ebert SN, Bell RA, Her S. Phenylethanolamine N-methyltransferase gene expression: synergistic activation by Egr-1, AP-2 and the glucocorticoid receptor. *Brain Res Mol Brain Res* 1998; 61: 154-61.
146. Liu J, Grogan L, Nau MM, Allegra CJ, Chu E, Wright JJ. Physical interaction between p53 and primary response gene Egr-1. *Int J Oncol* 2001; 18: 863-70.
147. Wary KK, Mainiero F, Isakoff SJ, Marcantonio EE, Giancotti FG. The adaptor protein Shc couples a class of integrins to the control of cell cycle progression. *Cell* 1996; 87: 733-43.
148. Cabodi S, Morello V, Masi A, et al. Convergence of integrins and EGF receptor signaling via PI3K/Akt/FoxO pathway in early gene Egr-1 expression. *J Cell Physiol* 2009; 218: 294-303.

149. Fu M, Zhu X, Zhang J, et al. Egr-1 target genes in human endothelial cells identified by microarray analysis. *Gene* 2003; 315: 33-41.
150. Liu YG, Gano J, Huang R, Lin Y, Wang SM, Huang RP. Analysis of gene expression in Egr-1 transfected human fibrosarcoma cells. *J Surg Oncol* 2002; 80: 190-6.
151. Perez-Castillo A, Pipaon C, Garcia I, Alemany S. NGFI-A gene expression is necessary for T lymphocyte proliferation. *J Biol Chem* 1993; 268: 19445-50.
152. Biesiada E, Razandi M, Levin ER. Egr-1 activates basic fibroblast growth factor transcription. Mechanistic implications for astrocyte proliferation. *J Biol Chem* 1996; 271: 18576-81.
153. Krishnaraju K, Nguyen HQ, Liebermann DA, Hoffman B. The zinc finger transcription factor Egr-1 potentiates macrophage differentiation of hematopoietic cells. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 5499-507.
154. Nguyen HQ, Hoffman-Liebermann B, Liebermann DA. The zinc finger transcription factor Egr-1 is essential for and restricts differentiation along the macrophage lineage. *Cell* 1993; 72: 197-209.
155. Lee SL, Wang Y, Milbrandt J. Unimpaired macrophage differentiation and activation in mice lacking the zinc finger transplantation factor NGFI-A (EGR1). *Mol Cell Biol* 1996; 16: 4566-72.
156. Gashler A, Sukhatme VP. Early growth response protein 1 (Egr-1): prototype of a zinc-finger family of transcription factors; 1995.
157. Mayer SI, Rossler OG, Endo T, Charnay P, Thiel G. Epidermal-growth-factor-induced proliferation of astrocytes requires Egr transcription factors. *J Cell Sci* 2009; 122: 3340-50.
158. Polager S, Ginsberg D. p53 and E2f: partners in life and death. *Nat Rev Cancer* 2009; 9: 738-48.
159. Das A, Chendil D, Dey S, et al. Ionizing radiation down-regulates p53 protein in primary Egr-1-/ mouse embryonic fibroblast cells causing enhanced resistance to apoptosis. *J Biol Chem* 2001; 276: 3279-86.
160. Nair P, Muthukumar S, Sells SF, Han SS, Sukhatme VP, Rangnekar VM. Early growth response-1-dependent apoptosis is mediated by p53. *J Biol Chem* 1997; 272: 20131-8.
161. Cibelli G, Policastro V, Rossler OG, Thiel G. Nitric oxide-induced programmed cell death in human neuroblastoma cells is accompanied by the synthesis of Egr-1, a zinc finger transcription factor. *J Neurosci Res* 2002; 67: 450-60.
162. Messmer UK, Brune B. Nitric oxide-induced apoptosis: p53-dependent and p53-independent signalling pathways. *Biochem J* 1996; 319 (Pt 1): 299-305.
163. de Belle I, Huang RP, Fan Y, Liu C, Mercola D, Adamson ED. p53 and Egr-1 additively suppress transformed growth in HT1080 cells but Egr-1 counteracts p53-dependent apoptosis. *Oncogene* 1999; 18: 3633-42.
164. Yu J, de Belle I, Liang H, Adamson ED. Coactivating factors p300 and CBP are transcriptionally crossregulated by Egr1 in prostate cells, leading to divergent responses. *Mol Cell* 2004; 15: 83-94.
165. Gomez-Martin D, Diaz-Zamudio M, Galindo-Campos M, Alcocer-Varela J. Early growth response transcription factors and the modulation of immune response Implications towards autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2009.
166. Ke J, Gururajan M, Kumar A, et al. The role of MAPKs in B cell receptor-induced down-regulation of Egr-1 in immature B lymphoma cells. *J Biol Chem* 2006; 281: 39806-18.

167. Maltzman JS, Carmen JA, Monroe JG. Transcriptional regulation of the Icam-1 gene in antigen receptor- and phorbol ester-stimulated B lymphocytes: role for transcription factor EGR1. *J Exp Med* 1996; 183: 1747-59.
168. Maltzman JS, Carman JA, Monroe JG. Role of EGR1 in regulation of stimulus-dependent CD44 transcription in B lymphocytes. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 2283-94.
169. Skerka C, Decker EL, Zipfel PF. A regulatory element in the human interleukin 2 gene promoter is a binding site for the zinc finger proteins Sp1 and EGR-1. *J Biol Chem* 1995; 270: 22500-6.
170. Crispin JC, Tsokos GC. Transcriptional regulation of IL-2 in health and autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2009; 8: 190-5.
171. Cron RQ, Bandyopadhyay R, Genin A, et al. Early growth response-1 is required for CD154 transcription. *J Immunol* 2006; 176: 811-8.
172. Bettini M, Xi H, Milbrandt J, Kersh GJ. Thymocyte development in early growth response gene 1-deficient mice. *J Immunol* 2002; 169: 1713-20.
173. Pluda JM. Tumor-associated angiogenesis: mechanisms, clinical implications, and therapeutic strategies. *Semin Oncol* 1997; 24: 203-18.
174. Fahmy RG, Dass CR, Sun LQ, Chesterman CN, Khachigian LM. Transcription factor Egr-1 supports FGF-dependent angiogenesis during neovascularization and tumor growth. *Nat Med* 2003; 9: 1026-32.
175. Worden B, Yang XP, Lee TL, et al. Hepatocyte growth factor/scatter factor differentially regulates expression of proangiogenic factors through Egr-1 in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2005; 65: 7071-80.
176. Abdulkadir SA, Qu Z, Garabedian E, et al. Impaired prostate tumorigenesis in Egr1-deficient mice. *Nat Med* 2001; 7: 101-7.
177. Baron V, De Gregorio G, Krones-Herzig A, et al. Inhibition of Egr-1 expression reverses transformation of prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Oncogene* 2003; 22: 4194-204.
178. Baron V, Duss S, Rhim J, Mercola D. Antisense to the early growth response-1 gene (Egr-1) inhibits prostate tumor development in TRAMP mice. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 1002: 197-216.
179. Thigpen AE, Cala KM, Guileyardo JM, Molberg KH, McConnell JD, Russell DW. Increased expression of early growth response-1 messenger ribonucleic acid in prostatic adenocarcinoma. *J Urol* 1996; 155: 975-81.
180. Eid MA, Kumar MV, Iczkowski KA, Bostwick DG, Tindall DJ. Expression of early growth response genes in human prostate cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 2461-8.
181. Sauer L, Gitenay D, Vo C, Baron VT. Mutant p53 initiates a feedback loop that involves Egr-1/EGF receptor/ERK in prostate cancer cells. *Oncogene*.
182. Huang RP, Fan Y, de Belle I, et al. Decreased Egr-1 expression in human, mouse and rat mammary cells and tissues correlates with tumor formation. *Int J Cancer* 1997; 72: 102-9.
183. Baron V, Adamson ED, Calogero A, Ragona G, Mercola D. The transcription factor Egr1 is a direct regulator of multiple tumor suppressors including TGF β 1, PTEN, p53, and fibronectin. *Cancer Gene Ther* 2006; 13: 115-24.
184. Liu C, Adamson E, Mercola D. Transcription factor EGR-1 suppresses the growth and transformation of human HT-1080 fibrosarcoma cells by induction of transforming growth factor beta 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 11831-6.
185. Kane S, Prentice MA, Mariano JM, Cuttitta F, Jakowlew SB. Differential induction of early response genes by adrenomedullin and transforming growth factor-beta1 in human lung cancer cells. *Anticancer Res* 2002; 22: 1433-44.

186. de Belle I, Mercola D, Adamson ED. Method for cloning in vivo targets of the Egr-1 transcription factor. *Biotechniques* 2000; 29: 162-9.
187. Liu C, Yao J, Mercola D, Adamson E. The transcription factor EGR-1 directly transactivates the fibronectin gene and enhances attachment of human glioblastoma cell line U251. *J Biol Chem* 2000; 275: 20315-23.
188. Liu C, Yao J, de Belle I, Huang RP, Adamson E, Mercola D. The transcription factor EGR-1 suppresses transformation of human fibrosarcoma HT1080 cells by coordinated induction of transforming growth factor-beta1, fibronectin, and plasminogen activator inhibitor-1. *J Biol Chem* 1999; 274: 4400-11.
189. Virolle T, Adamson ED, Baron V, et al. The Egr-1 transcription factor directly activates PTEN during irradiation-induced signalling. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 1124-8.
190. Krones-Herzig A, Adamson E, Mercola D. Early growth response 1 protein, an upstream gatekeeper of the p53 tumor suppressor, controls replicative senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 3233-8.
191. Ahmed MM. Regulation of radiation-induced apoptosis by early growth response-1 gene in solid tumors. *Curr Cancer Drug Targets* 2004; 4: 43-52.
192. Ahmed MM, Sells SF, Venkatasubbarao K, et al. Ionizing radiation-inducible apoptosis in the absence of p53 linked to transcription factor EGR-1. *J Biol Chem* 1997; 272: 33056-61.
193. Zagurovskaya M, Shareef MM, Das A, et al. EGR-1 forms a complex with YAP-1 and upregulates Bax expression in irradiated prostate carcinoma cells. *Oncogene* 2009; 28: 1121-31.
194. Lucerna M, Pomyje J, Mechtkerilova D, et al. Sustained expression of early growth response protein-1 blocks angiogenesis and tumor growth. *Cancer Res* 2006; 66: 6708-13.
195. Calogero A, Lombari V, De Gregorio G, et al. Inhibition of cell growth by EGR-1 in human primary cultures from malignant glioma. *Cancer Cell Int* 2004; 4: 1.
196. Okamura H, Yoshida K, Morimoto H, Haneji T. PTEN expression elicited by EGR-1 transcription factor in calyculin A-induced apoptotic cells. *J Cell Biochem* 2005; 94: 117-25.
197. Han B, Dong Z, Liu Y, Chen Q, Hashimoto K, Zhang JT. Regulation of constitutive expression of mouse PTEN by the 5'-untranslated region. *Oncogene* 2003; 22: 5325-37.
198. Krones-Herzig A, Mittal S, Yule K, et al. Early growth response 1 acts as a tumor suppressor in vivo and in vitro via regulation of p53. *Cancer Res* 2005; 65: 5133-43.
199. Han SS, Chung ST, Robertson DA, Chelvarajan RL, Bondada S. CpG oligodeoxynucleotides rescue BKS-2 immature B cell lymphoma from anti-IgM-mediated growth inhibition by up-regulation of egr-1. *Int Immunol* 1999; 11: 871-9.
200. Ahmed MM, Venkatasubbarao K, Fruitwala SM, et al. EGR-1 induction is required for maximal radiosensitivity in A375-C6 melanoma cells. *J Biol Chem* 1996; 271: 29231-7.
201. Krishnaraju K, Hoffman B, Liebermann DA. The zinc finger transcription factor Egr-1 activates macrophage differentiation in M1 myeloblastic leukemia cells. *Blood* 1998; 92: 1957-66.
202. Shafarenko M, Liebermann DA, Hoffman B. Egr-1 abrogates the block imparted by c-Myc on terminal M1 myeloid differentiation. *Blood* 2005; 106: 871-8.
203. Gibbs JD, Liebermann DA, Hoffman B. Egr-1 abrogates the E2F-1 block in terminal myeloid differentiation and suppresses leukemia. *Oncogene* 2008; 27: 98-106.
204. Le Beau MM, Espinosa R, 3rd, Neuman WL, et al. Cytogenetic and molecular delineation of the smallest commonly deleted region of chromosome 5 in malignant myeloid diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 5484-8.
205. Fundia A, Gorla N, Larripa I. Non-random distribution of spontaneous chromosome aberrations in two Bloom Syndrome patients. *Hereditas* 1995; 122: 239-43.

206. Liu P, Xu B, Li J, Lu H. LY294002 inhibits leukemia cell invasion and migration through early growth response gene 1 induction independent of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 377: 187-90.
207. Liu P, Li J, Lu H, Xu B. Thalidomide inhibits leukemia cell invasion and migration by upregulation of early growth response gene 1. *Leuk Lymphoma* 2009; 50: 109-13.
208. Joslin JM, Fernald AA, Tennant TR, et al. Haploinsufficiency of EGR1, a candidate gene in the del(5q), leads to the development of myeloid disorders. *Blood* 2007; 110: 719-26.
209. Gururajan M, Chui R, Karuppannan AK, Ke J, Jennings CD, Bondada S. c-Jun N-terminal kinase (JNK) is required for survival and proliferation of B-lymphoma cells. *Blood* 2005; 106: 1382-91.
210. Chen L, Wang S, Zhou Y, et al. Identification of early growth response protein 1 (EGR-1) as a novel target for JUN-induced apoptosis in multiple myeloma. *Blood*; 115: 61-70.
211. Levin WJ, Press MF, Gaynor RB, et al. Expression patterns of immediate early transcription factors in human non-small cell lung cancer. The Lung Cancer Study Group. *Oncogene* 1995; 11: 1261-9.
212. Huang RP, Fan Y, Peng A, et al. Suppression of human fibrosarcoma cell growth by transcription factor, Egr-1, involves down-regulation of Bcl-2. *Int J Cancer* 1998; 77: 880-6.
213. Saeki Y, Endo T, Ide K, et al. Ligand-specific sequential regulation of transcription factors for differentiation of MCF-7 cells. *BMC Genomics* 2009; 10: 545.
214. Courville P, Wechsler J, Thomine E, et al. Pseudoepitheliomatous hyperplasia in cutaneous T-cell lymphoma. A clinical, histopathological and immunohistochemical study with particular interest in epithelial growth factor expression. The French Study Group on Cutaneous Lymphoma. *Br J Dermatol* 1999; 140: 421-6.
215. Boonstra J, Rijken P, Humbel B, Cremers F, Verkleij A, van Bergen en Henegouwen P. The epidermal growth factor. *Cell Biol Int* 1995; 19: 413-30.
216. Tremblay PL, Auger FA, Huot J. Regulation of transendothelial migration of colon cancer cells by E-selectin-mediated activation of p38 and ERK MAP kinases. *Oncogene* 2006; 25: 6563-73.
217. Jhappan C, Stahle C, Wolff M, Merlino G, Pastan I. An epidermal growth factor receptor promoter construct selectively expresses in the thymus and spleen of transgenic mice. *Cell Immunol* 1993; 149: 99-106.
218. Mitchell A, Dass CR, Sun LQ, Khachigian LM. Inhibition of human breast carcinoma proliferation, migration, chemoinvasion and solid tumour growth by DNAzymes targeting the zinc finger transcription factor EGR-1. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: 3065-9.
219. Lee SL, Sadovsky Y, Swirnoff AH, et al. Luteinizing hormone deficiency and female infertility in mice lacking the transcription factor NGFI-A (Egr-1). *Science* 1996; 273: 1219-21.
220. Kim J, Yu W, Kovalski K, Ossowski L. Requirement for specific proteases in cancer cell intravasation as revealed by a novel semiquantitative PCR-based assay. *Cell* 1998; 94: 353-62.
221. Adjei AA, Cohen RB, Franklin W, et al. Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the oral, small-molecule mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 inhibitor AZD6244 (ARRY-142886) in patients with advanced cancers. *J Clin Oncol* 2008; 26: 2139-46.
222. Kruger A, Arlt MJ, Gerg M, et al. Antimetastatic activity of a novel mechanism-based gelatinase inhibitor. *Cancer Res* 2005; 65: 3523-6.
223. Coussens LM, Tinkle CL, Hanahan D, Werb Z. MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell* 2000; 103: 481-90.

224. Aoudjit F, Esteve PO, Desrosiers M, Potworowski EF, St-Pierre Y. Gelatinase B (MMP-9) production and expression by stromal cells in the normal and adult thymus and experimental thymic lymphoma. *Int J Cancer* 1997; 71: 71-8.
225. Owen JL, Iragavarapu-Charyulu V, Gunja-Smith Z, Herbert LM, Grosso JF, Lopez DM. Up-regulation of matrix metalloproteinase-9 in T lymphocytes of mammary tumor bearers: role of vascular endothelial growth factor. *J Immunol* 2003; 171: 4340-51.
226. Ning W, Dong Y, Sun J, et al. Cigarette smoke stimulates matrix metalloproteinase-2 activity via EGR-1 in human lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; 36: 480-90.
227. Haas TL, Stitelman D, Davis SJ, Apte SS, Madri JA. Egr-1 mediates extracellular matrix-driven transcription of membrane type 1 matrix metalloproteinase in endothelium. *J Biol Chem* 1999; 274: 22679-85.
228. St-Pierre Y, Couillard J, Van Themsche C. Regulation of MMP-9 gene expression for the development of novel molecular targets against cancer and inflammatory diseases. *Expert Opin Ther Targets* 2004; 8: 473-89.
229. Shin SY, Kim JH, Baker A, Lim Y, Lee YH. Transcription Factor Egr-1 Is Essential for Maximal Matrix Metalloproteinase-9 Transcription by Tumor Necrosis Factor {alpha}. *Mol Cancer Res.*
230. Scherer RL, McIntyre JO, Matrisian LM. Imaging matrix metalloproteinases in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2008; 27: 679-90.
231. Edinger M, Cao YA, Hornig YS, et al. Advancing animal models of neoplasia through in vivo bioluminescence imaging. *Eur J Cancer* 2002; 38: 2128-36.
232. Wu N, Opalenik S, Liu J, Jansen ED, Giro MG, Davidson JM. Real-time visualization of MMP-13 promoter activity in transgenic mice. *Matrix Biol* 2002; 21: 149-61.
233. Acuff HB, Carter KJ, Fingleton B, Gorden DL, Matrisian LM. Matrix metalloproteinase-9 from bone marrow-derived cells contributes to survival but not growth of tumor cells in the lung microenvironment. *Cancer Res* 2006; 66: 259-66.
234. Bargagna-Mohan P, Mohan R, Russo L, Kochevar IE, Fini ME. Cell lines and transgenic mice expressing a matrix metalloproteinase-9 promoter-driven reporter gene: potential for assay of ultraviolet light effects and light-inhibiting compounds. *Cutan Ocul Toxicol* 2007; 26: 383-97.
235. Shellenberger TD, Wang M, Gujrati M, et al. BRAK/CXCL14 is a potent inhibitor of angiogenesis and a chemotactic factor for immature dendritic cells. *Cancer Res* 2004; 64: 8262-70.
236. Qi JH, Ebrahem Q, Moore N, et al. A novel function for tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3): inhibition of angiogenesis by blockage of VEGF binding to VEGF receptor-2. *Nat Med* 2003; 9: 407-15.
237. Fortin A, MacLaurin JG, Arbour N, et al. The proapoptotic gene SIVA is a direct transcriptional target for the tumor suppressors p53 and E2F1. *J Biol Chem* 2004; 279: 28706-14.
238. Alcivar A, Hu S, Tang J, Yang X. DEDD and DEDD2 associate with caspase-8/10 and signal cell death. *Oncogene* 2003; 22: 291-7.
239. Yin Y, Liu YX, Jin YJ, Hall EJ, Barrett JC. PAC1 phosphatase is a transcription target of p53 in signalling apoptosis and growth suppression. *Nature* 2003; 422: 527-31.
240. Yang W, Shen J, Wu M, et al. Repression of transcription of the p27(Kip1) cyclin-dependent kinase inhibitor gene by c-Myc. *Oncogene* 2001; 20: 1688-702.
241. Thyss R, Virolle V, Imbert V, Peyron JF, Aberdam D, Virolle T. NF-kappaB/Egr-1/Gadd45 are sequentially activated upon UVB irradiation to mediate epidermal cell death. *EMBO J* 2005; 24: 128-37.

242. Sutton AB, Canfield AE, Schor SL, Grant ME, Schor AM. The response of endothelial cells to TGF beta-1 is dependent upon cell shape, proliferative state and the nature of the substratum. *J Cell Sci* 1991; 99 (Pt 4): 777-87.
243. Plum J, De Smedt M, Leclercq G, Vandekerckhove B. Influence of TGF-beta on murine thymocyte development in fetal thymus organ culture. *J Immunol* 1995; 154: 5789-98.
244. Kwak HJ, Park MJ, Cho H, et al. Transforming growth factor-beta1 induces tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression via activation of extracellular signal-regulated kinase and Sp1 in human fibrosarcoma cells. *Mol Cancer Res* 2006; 4: 209-20.
245. Berlanga-Acosta J, Gavilondo-Cowley J, Lopez-Saura P, et al. Epidermal growth factor in clinical practice - a review of its biological actions, clinical indications and safety implications. *Int Wound J* 2009; 6: 331-46.
246. Maraschin R, Bussi R, Conz A, Orlando L, Pirovano R, Nyska A. Toxicological evaluation of u-hEGF. *Toxicol Pathol* 1995; 23: 356-66.
247. Sonis ST, Costa JW, Jr., Evitts SM, Lindquist LE, Nicolson M. Effect of epidermal growth factor on ulcerative mucositis in hamsters that receive cancer chemotherapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992; 74: 749-55.
248. Reeves JR, Richards RC, Cooke T. The effects of intracolonic EGF on mucosal growth and experimental carcinogenesis. *Br J Cancer* 1991; 63: 223-6.
249. Knowles AF, Salas-Prato M, Villela J. Epidermal growth factor inhibits growth while increasing the expression of an ecto-Ca²⁺-ATPase of a human hepatoma cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; 126: 8-14.
250. Barnes DW. Epidermal growth factor inhibits growth of A431 human epidermoid carcinoma in serum-free cell culture. *J Cell Biol* 1982; 93: 1-4.
251. Xia L, Yuan YZ, Xu CD, Zhang YP, Qiao MM, Xu JX. Effects of epidermal growth factor on the growth of human gastric cancer cell and the implanted tumor of nude mice. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 455-8.
252. Bashir O, Fitzgerald AJ, Berlanga-Acosta J, Playford RJ, Goodlad RA. Effect of epidermal growth factor administration on intestinal cell proliferation, crypt fission and polyp formation in multiple intestinal neoplasia (Min) mice. *Clin Sci (Lond)* 2003; 105: 323-30.
253. Kissmeyer-Nielsen P, Vinter-Jensen L, Smerup M. Effects of longterm epidermal growth factor treatment on the normal rat colon. *Gut* 1996; 38: 582-6.
254. Vinter-Jensen L, Juhl CO, Teglbaerg PS, Poulsen SS, Dajani EZ, Nexo E. Systemic treatment with epidermal growth factor in pigs induces ductal proliferations in the pancreas. *Gastroenterology* 1997; 113: 1367-74.
255. Vinter-Jensen L, Smerup M, Jorgensen PE, et al. Chronic treatment with epidermal growth factor stimulates growth of the urinary tract in the rat. *Urol Res* 1996; 24: 15-21.