

**PASCAL DE NONCOURT**

**L'ÉLASTASE DES LEUCOCYTES CHEZ LE LYMPHOME NON-  
HODGKIN MURIN ET HUMAIN.**

Mémoire (par article)  
présenté pour l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M. Sc.) en Immunologie et Virologie

Jury :

Yves St-Pierre : INRS-Institut Armand Frappier  
Robert Delage : Professeur Hôpital St-Sacrement  
D. Oth : INRS-Institut Armand-Frappier

© Droits réservés  
MAI 2001  
INSTITUT ARMAND-FRAPPIER  
Université du Québec

## TABLES DES MATIÈRES

PAGE TITRE .....	I
TABLES DES MATIÈRES .....	II
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	IV
LISTES DES FIGURES.....	VII
SOMMAIRE.....	VIII

## CHAPITRE 1

### REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

<b>1. Définition et principe du processus métastatique</b>	
1.1 Définitions générales.....	1
1.2 Les différentes étapes du processus métastatique .....	1
1.3 Le lymphome : un modèle d'étude du processus métastatique .....	2
1.4 Définition du lymphome.....	2
1.5 Stades d'évolution, classification et aspects cliniques du lymphome.....	3
1.5.1 Évolution du lymphome.....	3
1.5.2 Classification du lymphome.....	4
1.5.3 Les néoplasmes de cellules matures .....	7
1.6 Traitement du lymphome : fondements et progrès .....	10
1.6.1 Traitement du lymphome Hodgkin.....	11
1.6.2 Traitement du lymphome non-Hodgkin.....	13
1.6.3 Traitement du lymphome non-Hodgkin selon le niveau d'agressivité.....	13
1.6.4 Conclusions, alternatives et perspectives des traitements contre le lymphome .....	14
1.7 Un modèle d'étude du lymphome : le modèle de Kaplan .....	15
<b>2. Les molécules d'adhésion cellulaires</b>	
2.1 Les étapes du processus d'adhésion et de l'extravasation du leucocyte ..	16
2.2 Les sélectines .....	17
2.3 Chémotactisme.....	18
2.4 Les intégrines.....	19
2.5 Les molécules d'adhésion de la superfamille des Ig.....	20
2.6 ICAM-1, une molécule d'adhésion fondamentale dans la dissémination du lymphome .....	20

<b>3. Le rôle des protéases extracellulaires</b>	
3.1 Les enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire : MMPs.....	34
3.2 Le rôle des MMPs dans le cancer .....	39
3.3 Les inhibiteurs des MMPs : Les Timps.....	40
3.4 L'activité élastolytique des MMPs.....	42
<b>4. Les élastases</b>	
4.1 Les élastases des leucocytes .....	43
4.2 Structure de HLE .....	43
4.3 Substrat de HLE.....	44
4.4 Régulation de l'activité enzymatique de HLE .....	45
4.5 Forme membranaire de HLE .....	46
4.6 Régulation transcriptionnelle de HLE : Implication de PU.1.....	46
<b>HYPOTHÈSE DE TRAVAIL .....</b>	<b>48</b>

## **CHAPITRE 2**

<b>ACCUSÉ RÉCEPTION .....</b>	<b>50</b>
<b>PARTICIPATION DES AUTEURS .....</b>	<b>52</b>
<b>ARTICLE « Leukocyte Elastase in Murine and Human Non-Hodgkin Lymphoma » de De Noncourt et al. 2001, tel que soumis à Journal of Leukocyte Biology. .....</b>	<b>53</b>

## **CHAPITRE 3**

<b>DISCUSSION ET CONCLUSION .....</b>	<b>91</b>
<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>96</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>97</b>

## LISTE DES.ABRÉVIATIONS

a.a.	acide aminé
Ac	anticorps
AcM	anticorps monoclonaux
ADN	acide déoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique de type messenger
BAL	« bronchoalveolar lavage »
CD	« cluster of différenciation »
CMH-II	complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
D.O.	densité optique
ECM	« extracellular matrix »
FK	fibrose kystique
HLA	« human leukocyte antigen »
HLE	« human leukocyte elastase »

ICAM- 1	« intercellular cell adhesion molecule-1 »
IFN- $\gamma$	interféron de type gamma
Ig	immunoglobuline
IL	interleukine
kDa	kilodalton
M	molaire
mL	millilitre
mM	millimolaire
MMP-9	« matrix metalloproteinase-9 »
PBS	« phosphate buffered saline »
PMA	12-phorbol 13-myristate acétate
PMN	polymorphonucléaire
rpm	rotation par minute
rsICAM-1	ICAM- 1 soluble recombinant
SDS-PAGE	« sodium docecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis »
SFV	sérum de veau foetal

sICAM-1	ICAM-1 soluble
TcR	« T cell receptor »
TNF	« tumor necrosis factor »
v/v	volume sur volume
°C	degré Celsius
μL	microlitre

## LISTE DES FIGURES ET SCHÉMAS

Figure 1 : Graphique démontrant la liaison dose-dépendante de l'élastase de leucocyte humaine (HLE) sur les cellules de lymphome 267.

Figure 2 : Graphique démontrant une corrélation entre la liaison de HLE et le niveau d'expression de 267 à la surface de cellules de lymphome.

Figure 3 : Photographie du gel d'agarose dont les échantillons sont les produits d'amplification par PCR de l'expression de l'ARNm de HLE chez des cellules Raji stimulées par plusieurs cytokines dont IL-6 et IL-13.

Figure 4 : Photographie du gel d'agarose dont les échantillons sont des produits d'amplification par PCR de l'expression de l'ARNm de HLE chez 20 spécimens de lymphomes humains présentant différents niveaux d'agressivité.

Figure 5 : Étude cytologique d'un ganglion lymphatique démontrant l'expression de HLE chez un lymphome non-Hodgkin's.

Tableau 1 : Séquence des oligonucléotides utilisés pour la détection de MMP, LE et IL-13 chez le lymphome non-Hodgkin.

## SOMMAIRE

L'élastase des leucocytes (HLE; E.C. 3.4.21.37) est une protéase extracellulaire capable de moduler la réponse immunitaire locale par sa capacité à cliver des immunomodulateurs clés, tels que l'IL-2, CD2, CD4, et CD43. Notre laboratoire a démontré que HLE peut également moduler directement, par clivage protéolytique, l'expression d'ICAM-1 à la surface des cellules. Or, ICAM-1 est essentiel à la dissémination des cellules lymphomateuses aux organes périphériques, possiblement par sa capacité à promouvoir le contact intercellulaire nécessaire à l'induction de MMP-9 dans les cellules cancéreuses. Puisque HLE peut également détruire par clivage protéolytique TIMP-1, un inhibiteur naturel de MMP-9, nous avons émis l'hypothèse que HLE pourrait être impliquée dans la croissance et la dissémination de cellules lymphomateuses. Cette hypothèse est appuyée notamment par le fait que les cellules de lymphomes malins expriment des niveaux anormalement élevés de MMP-9, et que le transfert de cDNA codant pour MMP-9 dans les cellules lymphomateuses augmente leur pouvoir tumorigénique. Dans le travail qui suit, nous avons démontré que: 1) HLE a la capacité de se lier à la surface de cellules lymphomateuses; 2) que la transfection d'ICAM-1 augmente cette capacité de LE à se lier à leur surface; 3) que l'expression de LE peut être retrouvée dans les tissus de lymphomes de type non-Hodgkin agressifs, de type B ou T ; 4) que l'expression de HLE dans les lymphomes est inductible via l'activation par l'interleukine-6 et surtout l'interleukine-13; et 5) que les lymphomes non-Hodgkin expriment l'interleukine-13. Ces travaux nous permettent de mettre en évidence pour la première fois le rôle possible de HLE dans le lymphome, et de mieux comprendre de façon générale le rôle et la régulation des protéases extracellulaires dans la métastase.

# Chapitre 1

## **1. Définitions et principes du processus métastatique**

### **1.1 Définitions générales**

Le néoplasme se définit comme une masse tissulaire dont la division cellulaire surpasse celle du tissu normal pendant et après la stimulation de croissance. Un néoplasme est communément appelé une tumeur. La métastase est le processus par lequel la naissance d'une tumeur secondaire s'effectue par dissémination de cellules tumorales. Ce processus débute par le détachement d'une cellule cancéreuse de la tumeur primaire, et comporte plusieurs étapes bien définies. Il est basé sur le principe de germination de la graine, ou le « Seed and Soil Hypothesis ».

### **1.2 Les différentes étapes du processus métastatique**

La cellule tumorale libérée de la tumeur primaire est au cancer, ce que la semence (ou graine) est à la naissance de la plante. Afin de croître et de proliférer, la semence, tout comme son environnement immédiat, doit posséder tous les éléments essentiels à la germination et la croissance.

Les principales étapes de la métastase sont :

- 1- **Détachement** de la cellule cancéreuse de la tumeur
- 2- **Migration** de la cellule à travers le stroma cellulaire avec la participation des enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire.
- 3- **Intravasation**, ou entrée de la cellule dans la circulation lymphatique ou vasculaire par diapédèse.
- 4- **Adhésion** de la cellule à l'endothélium vasculaire via les molécules d'adhésion.

- 5- **Interactions bidirectionnelles** entre les cellules cancéreuses et endothéliales menant à la réactivation des gènes codant pour les enzymes de dégradation des protéines de la matrice extracellulaire (ECM).
- 6- **Extravasation**, ou sortie de la cellule hors de la circulation par diapédèse.
- 7- **Migration** jusqu'au site secondaire, encore une fois impliquant la participation des enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire.
- 8- **Nidification et croissance** de la tumeur secondaire.

### **1.3 Le lymphome : un modèle d'étude du processus métastatique**

Lors du processus inflammatoire, le recrutement des leucocytes au site d'infection implique l'ancrage du leucocyte à l'endothélium par les molécules d'adhésion (Springer *et al.*, 1995), leur sortie de la circulation par diapédèse, et leur migration à travers l'ECM via la sécrétion de métalloprotéases de la matrice (MMP) (Conca *et al.*, 1994). Puisque le processus métastatique et le recrutement de cellules leucocytaires partagent un certain nombre de points communs, notamment en ce qui a trait à leur répertoire de molécules d'adhésion et de MMPs que ces cellules expriment, l'étude des mécanismes moléculaires utilisés par les leucocytes normaux et les lymphomes représente une opportunité unique de mieux comprendre le processus métastatique en général.

### **1.4 Définition du lymphome**

Le lymphome est une formation néoplasique naissant suite à la transformation de cellules lymphoïdes saines en cellules cancéreuses. Cette transformation est causée par une exposition à des agents initiateurs et promoteurs pro-cancéreux, notamment les virus

Epstein-Barr (EBV) et HTLV-1 (« Human T-Lymphotropic Virus-1 ») (Kutas, 2000). Aux États-Unis uniquement, plus de 120 000 cas de cancers lymphoïdes sont recensés chaque année, ce qui représente environ 11 % de l'ensemble des cancers. Les cancers lymphoïdes représentent ainsi la cause numéro un de la mort des jeunes femmes et hommes de 35 ans et moins (<http://www.leukemia-lymphoma.org>). Le nombre de cas augmente de 3-4% par année depuis 1970, ce qui en fait une des formes de cancers progressant le plus rapidement (Chassagne-Clément *et al.*, 1999). La pathologie du néoplasme lymphoïde prend de plus en plus d'ampleur mondialement, notamment chez les sidatiques (Tulpule et Levine, 1999). Ses principes d'évolution pathophysiologique et sa nature immunophénotypique, de plus en plus étudiés, se révèlent être extrêmement complexes tant au niveau moléculaire que cellulaire. La nature de l'évolution du lymphome, sa classification et sa catégorisation, en constante mise à jour, sont donc essentielles à sa compréhension.

## **1.5 Stades d'évolution, classification et aspects cliniques du lymphome**

### **1.5.1 Évolution du lymphome**

La formation néoplasique lymphoïde se caractérise tout d'abord par différents stades de croissance, qui s'appliquent à tous lymphomes provenant de la transformation de cellules lymphoïdes immatures ou matures. Les stades évolutifs du lymphome sont ainsi:

**Stade 1 :** Statut cancéreux d'un seul ganglion ou d'une seule région extralymphatique.

C'est le stade primaire de la maladie.

**Stade 2 :** Atteinte de deux ganglions sans toutefois se présenter sur les deux axes corporels du diaphragme.

**Stade 3 :** Évidence métastatique de plusieurs ganglions des deux côtés du diaphragme, incluant très fréquemment la rate et les organes extralymphatiques avoisinants les ganglions impliqués. À partir de ce stade, la maladie est considérée comme avancée et difficile à traiter.

**Stade 4 :** Statut cancéreux de plusieurs organes extralymphatiques de part et d'autre du système. Ce stade se caractérise également par la présence de plusieurs métastases périphériques. Le stade 4 est un niveau très avancé de la maladie où la majorité des traitements connus sont peu ou pas efficaces (Kutas, 2000).

### **1.5.2 La classification du lymphome**

Longtemps source de controverse à cause d'un manque d'information, la classification des différents types de lymphomes fait maintenant consensus : il s'agit de la *Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasm* ou REAL. Cette classification fait une distinction entre la souche de différenciation cellulaire, le stade d'émergence cancéreuse et le niveau d'agressivité du lymphome. La classification REAL distingue quatre groupes principaux de lymphomes :

- 1- Le néoplasme impliquant les précurseurs de cellules B (ou néoplasme de cellules B immatures)
- 2- Le néoplasme de cellules B matures
- 3- Le néoplasme des précurseurs de cellules T ( ou néoplasme de cellules T immatures);
- 4- Le néoplasme de cellules T et NK matures ; regroupant des néoplasmes exprimant des caractéristiques communes aux cellules T et / ou NK

### 1.5.2.1 Le néoplasme précurseur de cellules B (*Acute lymphoblastic/lymphocytic leukemia/lymphoma*)

Le néoplasme des précurseurs de cellules B est constitué de cellules pré-B transformées. Il est caractérisé par l'expression membranaire du marqueur cellulaire TdT («Terminal DeoxyTransférase», exprimée chez pré-B et T uniquement : Soslow *et al.*, 1997). Aucune immunoglobuline (Ig) n'est exprimée à sa surface. On note une prévalence élevée de néoplasmes précurseurs de cellules B, malgré un taux de rémission de plus de 90%, chez les jeunes enfants atteints de certains désordres de la moelle osseuse et 17% des cas adultes de lymphome enregistrés. Il est présent en Amérique mais cible spécifiquement l'Amérique Centrale (Ortega *et al.*, 1998). Généralement CD19-positif, ce type de néoplasme exprime de façon variable les antigènes de surface CD10 (Millar *et al.*, 1999) et CD20 (Davis *et al.*, 1999), et se caractérise par la présence de diverses translocations spécifiques.

#### 1.5.2.1.1 La translocation en t(12;21)

Cette translocation consiste en une pseudodiploïdie des gènes *tell* (« translocation-*ets-leukemia* ») et *aml1*. Le gène *tell*, aussi appelé *ets-Variant Gene*, est situé sur le chromosome 12. Les protéines TELs sont membres de la famille des facteurs de transcriptions ETS; protéines qui se lient à l'ADN. L'importance vitale du gène *tell* fut démontrée lors de l'élaboration de souris TELs-déficientes. Celles-ci n'ont pas survécues le stade d'embryogenèse. Deux protéines TELs ont été identifiées jusqu'à maintenant : TEL1 participe aux processus angiogéniques embryonnaires, et TEL2, dont la fonction se situerait au niveau de l'hématopoïèse. (Potter *et al.*, 2000). La protéine AML1, quant à

elle, est connue aussi sous le nom de CBFA2, et participe à l'expression de plusieurs protéines dont : la myéloperoxidase, le récepteur CSF-1, l'élastase de neutrophiles (« leukocyte elastase », LE) et la cytokine IL-3. AML1 est responsable du recrutement de complexes nucléoprotéiques, assumant ainsi un rôle de gestionnaire transcriptionnel de la cellule (Zent *et al.*, 1996). L'expression anormale des protéines de différenciation hématopoïétique et la croissance cellulaire démesurée entraînée par cette translocation provoque ainsi un désordre dans le développement cellulaire de la moelle osseuse (Rubnitzey *et al.*, 1999).

#### **1.5.2.1.2 La translocation en t(9;22)**

Cette translocation porte le nom de « Philadelphia translocation ». Elle consiste à l'échange génétique du locus BCR (« Breakpoint cluster region ») sur le chromosome 22 et le proto-oncogène *abl* (« Abelson leukemia virus ») sur le chromosome 9. La séquence résultante produit une protéine de fusions, p-190 BCR-ABL (Wlodarska *et al.*, 1997) dont l'activité tyrosine kinase semble être à la base d'une prolifération cellulaire démesurée (Seong *et al.*, 1994).

#### **1.5.2.1.3 La translocation t(4;11)**

La translocation t(4;11) résulte de la fusion des gènes *mll* («mixed-lineage leukemia») et *af-4* situés sur les chromosomes 11(11q23) et 4(4q21) respectivement. Bien que le processus de transformation par cette protéine de fusion soit peu connu, on sait que la protéine MLL présente une certaine homologie au niveau de sa séquence nucléotidique

avec les méthyltransférases de l'ADN, alors qu'AF-4 est un facteur de transcription et de régulation cellulaire (Domer *et al.*, 1993).

### **1.5.2.2 Les lymphomes précurseurs de cellules T**

**Les lymphomes précurseurs de cellules T** expriment les antigènes de surface CD1 et TdT (Hansen *et al.*, 1994), ainsi qu'une expression variable de marqueurs CD2, CD3, CD4, CD5 et CD8 (Quintanilla-Martinez *et al.*, 1995). Au niveau génomique, on y retrouve également certaines translocations typiques, telles que t(1;14)(p34;q11), où le protooncogène TAL1 est juxtaposé de sa position sur le chromosome 1 au locus des gènes codant pour les chaînes alpha et delta du TCR (« T cell receptor ») sur le chromosome 14 (Xia *et al.*, 1992). L'incidence clinique pour ce type de lymphome cible principalement les jeunes et les populations de l'Afrique et du Kenya (Cool *et al.*, 1997), et affecte potentiellement entre 10 et 20 millions de personnes à travers le monde (Edlich *et al.*, 2000).

### **1.5.3 Les néoplasmes de cellules matures**

La transformation **néoplasique de cellules matures** est nettement plus complexe et diversifiée que celles d'origine néoplasique immature. Leur catégorisation se divise en deux groupes : le lymphome de Hodgkin (HD; « Hodgkin's disease ») et le lymphome non-Hodgkin (NHL; « non-Hodgkin's lymphoma »).

### **1.5.3.1 Le lymphome de Hodgkin**

Le lymphome de Hodgkin est une formation néoplasique très spécifique et très rare. Seulement 7 400 nouveaux cas, sur un total d'environ 65 000 cas de lymphome recensés annuellement aux États-Unis, sont de ce type (Taylor *et al.*, 1998). La caractéristique principale du lymphome de Hodgkin est la présence de cellules **Reed-Sternberg**. Ces cellules sont de diamètre remarquablement large (de 15 à 45  $\mu\text{m}$ ), de morphologie binucléaire et binodulée, et ne représentent qu'une mince fraction de la masse totale de la tumeur (1 à 3 %). Ces cellules possèdent certaines aberrations chromosomiques sans toutefois démontrer aucune anormalité phénotypique. Elles expriment entre autres différents marqueurs qui caractérisent les lymphocytes B dont les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II), B-7 (Van Gool *et al.*, 1997), et différents réarrangements au niveau des gènes codant pour les chaînes lourdes et légères des immunoglobulines (Jox *et al.*, 1997). Les sites principaux de nidification de ce type de lymphome se retrouvent au niveau des nodules axiaux cervicaux, médiastinaux et para-aortiques. Éventuellement, ce type de lymphome adoptera une croissance continue et progressive plutôt qu'anarchique et démesurée comme dans le cas du lymphome NHL (Drexler *et al.*, 1992)

### **1.5.3.2 Le lymphome non-Hodgkin (NHL)**

Les lymphomes NHL constituent une famille très diversifiée et de plus en plus complexe au niveau de ses caractéristiques morphologiques et pathophysiologiques. Ils représentent la principale forme de lymphome aux États-Unis, avec une incidence de 50-60 000 nouveaux cas par année.

#### 1.5.3.2.1 Le lymphome folliculaire non-Hodgkin

Parmi les lymphomes NHL, le **lymphome folliculaire** est le plus important en nombre. Aux États-Unis uniquement, il comprend plus de 45% des cas totaux de lymphomes enregistrés chez les adultes. Il ne discrimine aucun sexe et afflige la tranche adulte de la population de l'Amérique du Nord et Centrale (Anderson *et al.*, 1998). Associé à une croissance nodulaire dans les ganglions lymphatiques, deux principaux types cellulaires se distinguent en proportions variables : On y retrouve d'abord la présence marquée de petites cellules, nommées centrocytes, de morphologie irrégulière et aux contours nucléaires discontinus, dont le cytoplasme est très minime. On y retrouve également la présence de cellules polynucléaires beaucoup plus larges, à cytoplasme restreint, nommées centroblastes (Peters *et al.*, 1987). L'analyse immunophénotypique et génomique du lymphome folliculaire démontre un centre de germination néoplasique curieusement similaire à un centre de germination folliculaire normal de cellules B (Peters *et al.*, 1987). On y retrouve aussi l'expression de marqueurs cellulaires comme CD19, CD20, et des Ig monotypiques (Voso *et al.*, 1997). Le lymphome folliculaire, contrairement aux autres types de lymphomes, se caractérise par une translocation spécifique entre le gène *bcl-2* localisé sur le chromosome 18 et un segment des gènes d'Ig du chromosome 14 (Bakhshi *et al.*, 1987). Cette modification chromosomique cause une surexpression de la protéine anti-apoptotique BCL 2, inhibant le mécanisme d'induction de mort cellulaire, favorisant ainsi une prolifération anarchique des cellules tumorales (Agrawal *et al.*, 1998).

### 1.5.3.2.2 Le lymphome de cellules B diffus

Le lymphome de cellules B diffus constitue environ 20% des lymphomes. Il cible une population d'âge d'environ 60 ans. Ce type de lymphome est souvent associé au syndrome d'immunodéficience acquis (SIDA) en phase avancée où les cellules T sont atteintes, et la réponse anti-tumorale diminuée (Kutas, 2000).

### 1.5.3.2.3 Le lymphome de Burkitt

Le lymphome de Burkitt est un lymphome très agressif et comprend trois sous-groupes : le lymphome endémique Africain de Burkitt (Magrath *et al.*, 1991), le lymphome sporadique non-endémique de Burkitt, et une petite partie de certains lymphomes très agressifs de patients sidatiques (Kutas *et al.*, 2000). La caractéristique principale du lymphome de Burkitt est la présence de translocations de *c-myc* sur le chromosome 8, des gènes codant pour les chaînes lourdes des Ig sur le locus t(8;14), et/ou sur les gènes  $\kappa$  (t(2;8)) et  $\lambda$ (t(8;22)). Le lymphome de Burkitt, associé à l'infection par le virus Epstein-Barr, représente environ 30% des lymphomes infantiles totaux en Afrique (Biggar *et al.*, 1979).

D'autres lymphomes pourraient être mentionnés, dont le **néoplasme plasmatique**, le **lymphome lymphoplasmocytaire** (*Waldenström Macroglobulinemia*), le **lymphome de Mante**, etc... Leurs caractéristiques sont toutefois hors du cadre de ce document.

## 1.6 Traitement du lymphome : fondement et progrès

Une distinction catégorique doit être faite entre les avenues thérapeutiques du lymphome de Hodgkin, et celles du lymphome non-Hodgkin. Le développement du lymphome de Hodgkin est moins agressif et sa croissance plus restreinte, alors que les lymphomes non-Hodgkin sont plus anarchiques, plus agressifs, et plus difficiles à traiter. La diversité cellulaire et moléculaire de chaque type de lymphome incitent ainsi les avenues thérapeutiques à offrir une panoplie de champs d'actions. On fait alors appel à plusieurs combinaisons d'agents thérapeutiques agissant sur les différentes facettes du développement de la maladie (croissance, division cellulaire, propagation, etc.).

### **1.6.1 Traitement du lymphome Hodgkin**

La chimiothérapie est le traitement par excellence dans le cas du lymphome de Hodgkin. Dans un contexte de détection très précoce, la cure totale du cancer est maintenant possible (Andrieu *et al*, 1990). Le traitement standard de chimiothérapie pour ce type de lymphome a longtemps été une combinaison de médicament ; le MOPP. Cette combinaison est constituée de mechlorethamine (agent alkylant d'acide nucléiques), d'oncovin (ou vincristine: inhibiteur de division cellulaire à la métaphase), de procarbazine (inhibiteur de la transméthylation de la méthionine de l'ARNt), et de prednisone (glucocorticoïde stimulant la production de globules rouges) (Andrieu *et al*, 1990). Le MOPP, malgré son efficacité ponctuelle, produit deux effets secondaires majeurs : 1) plus de 95% des patients traités deviennent stériles, et 2) des défaillances lymphocytaires, dont des leucémies, réapparaissent quelques 10 années après le traitement, et ce à amplitude généralement fatale (Kutas, 2000).

Une nouvelle combinaison chimiothérapeutique est maintenant couramment utilisée. L'ABVD consiste en l'administration de la combinaison d'adriamycine (ou doxorubicine : un agent intercalant au niveau de l'ADN inhibant la division cellulaire durant la phase S), de bleomycine (glycopeptides cytotoxiques à action antibiotique, isolés de *Streptomyces Verticillus*, inhibant la synthèse d'ADN), de vincristine (ou Velban , un agent interférant avec les microtubules cellulaires durant la phase S) et de dacarbazine (un inhibiteur de synthèse de l'ARNm par alkylation via un ion carbonium). Ce traitement réduit non seulement de façon significative les risques de défaillances lymphoïdes secondaires mortelles de 95% à moins de 3%, mais aussi les incidences d'infertilité de plus de 60% (Bonadonna et Santoro, 1982). Les seuls effets secondaires négatifs observés sont une légère toxicité cardiaque de la doxorubicine et une toxicité pulmonaire de la bléomycine (Auseon *et al.*, 1974). En raison de ces risques, la combinaison MOPP est encore prescrite aux patients âgés ou à ceux présentant des risques cardiaques. Dans toutes les autres situations, l'ABVD par injection intraveineuse demeure l'ordonnance de choix à ce jour.

#### **1.6.1.1 La radiothérapie pour traiter le lymphome Hodgkin**

La radiothérapie est également utilisée comme traitement en combinaison avec la chimiothérapie. En situation générale, on y aura recours dans le cas de larges tumeurs (6 cm ou plus). Bien évidemment, l'évolution de la maladie, la localisation des foyers de divisions tumorales, la dispersion tumorale et la réponse aux agents chimiothérapeutiques sont à considérer. L'union de deux thérapies est avantageuse puisqu'elle permet l'administration de doses moins massives, réduisant ainsi les risques d'effets secondaires

à long terme. Des irradiations quotidiennes pour une période d'un mois, jointes aux injections intraveineuses d'agents chimiothérapeutiques, sont ainsi prescrites pour un succès variant de 30 à 89% selon le stade d'évolution de la maladie (Peterson *et al.*, 1999).

### **1.6.2 Le traitement du lymphome non-Hodgkin.**

Puisqu'il existe une multitude de lymphomes non-Hodgkin, le répertoire de traitements disponibles variera beaucoup plus que dans les cas de lymphomes de Hodgkin. Le niveau d'agressivité et le stade d'évolution sont des critères de sélections essentiels dans le traitement de cette maladie. *Contrairement au lymphome de Hodgkin, dont la progression est constante et regroupée, les néoplasmes non-Hodgkin ont une croissance plus anarchique et démesurée, impliquant très fréquemment une dissémination métastatique précoce et prononcée. Ces néoplasmes sont donc plus complexes à traiter.* Environ 50% des patients atteints de ce type de lymphome ont une espérance de vie de moins de cinq ans (<http://www.leukemia-lymphoma.org>).

### **1.6.3 Traitement du lymphome non-Hodgkin selon de niveau d'agressivité.**

Pour le traitement du lymphome non-Hodgkin de niveau d'agressivité intermédiaire (folliculaire, cellules B), un traitement CHOP-cyclophosphamide (un inhibiteur de transcription procédant par alkylation de l'ADN), doxorubicine, vincristine et prednisone d'une période de 6 cycles pour environ 1 mois, est courant. Des séances de radiothérapie sont également possibles dans le cas de tumeurs ayant un seuil très bas de réponse aux agents chimiothérapeutiques ou de très grande taille (6-10 cm de diamètre). Le traitement

du lymphome non-Hodgkin de grade élevé (Burkitt) est certes très difficile et n'offre généralement que très peu de réussites (Nademanee *et al.*, 1997). La détection très précoce, un suivi rigoureux et constant en combinaison avec des traitements chimio-radiothérapeutiques à haute intensité, sont parmi les avenues possibles. Le transfert de moelle osseuse suivant les traitements chimio-radiothérapeutiques sont également des moyens efficaces de reconstituer le système immunitaire lorsque les doses chimio/radiothérapeutiques sont myélotoxiques (Kwak *et al.*, 1991). Les techniques actuelles de transplantation autologue permettent ainsi l'administration de doses chimiothérapeutiques de 10 à 20 fois plus élevées que tout cycle exogène (Kutas, 2000). En retour, une réponse plus grande au traitement et ainsi une augmentation des probabilités de rémission semblent être observées (Burnett *et al.*, 1991).

#### **1.6.4 Conclusions, alternatives et perspective des traitements contre le lymphome.**

La recherche scientifique et médicale se spécialisant dans la rémission de lymphomes agressifs est en pleine effervescence. Présentement, la prolongation de la durée et de la qualité de vie du patient sont préconisées en absence de moyens efficaces de guérison. De nouvelles stratégies sont présentement en essais cliniques dans le cas des lymphomes agressifs ayant un pouvoir métastatiques (<http://clinicaltrials.gov>). La stimulation du système immunitaire par injections de médiateurs cellulaires afin d'augmenter la réponse anti-tumorale est à l'essai, de même que des traitements faisant appels à de nouveaux inhibiteurs enzymatiques de protéases extracellulaires pouvant inhiber la dissémination des cellules tumorales à des sites secondaires (Baker *et al.*, 2000). Le développement et la mise au point de nouvelles avenues thérapeutiques reposent donc sur l'étude des

mécanismes moléculaires du processus métastatique, notamment à l'intérieur de modèles murins.

### **1.7 Un modèle murin d'étude du lymphome : le modèle de Kaplan.**

L'un des modèles d'études les mieux caractérisés a été développé par Henry S. Kaplan (1969) suite aux observations d'après-guerre démontrant une prévalence anormalement élevée de lymphomes chez la population exposée aux irradiations lors des bombardements d'Hiroshima et de Nagasaki. Kaplan et ses collaborateurs ont reproduit le développement de ce type de lymphome (le lymphome thymique, i.e. des cellules T immatures) chez des souris C57BL/6 exposées (une fois/semaine x 4 semaines) avec de faibles doses de rayons X (175 rads). Ces études ont éventuellement mené à l'identification et à la caractérisation moléculaire des rétrovirus comme agents étiologiques de certaines formes de lymphomes T (Lieberman et Kaplan, 1966), et ont permis de mieux comprendre les différents stades de développements du lymphome, notamment durant la période préleucémique (Haran-Ghera *et al.*, 1992). Le prélèvement de la tumeur radio-induite permet en effet de maintenir en culture, de façon stable, les cellules tumorales récupérées au niveau du thymus, des ganglions, de la rate, des reins, pour ensuite les caractériser et les étudier (Lieberman *et al.*, 1979). Notre laboratoire a pu ainsi au cours des dernières années générer une banque importante de ces lignées afin d'analyser leur transcriptome (St-Pierre *et al.*, 2000). Ces cellules lymphomateuses peuvent induire une tumeur lorsqu'elles sont ré-injectées de façon intraveineuse, intrathymique, ou sous-cutanée chez des souris syngéniques. La disponibilité de lignées stables permet donc de mesurer l'effet de l'expression d'un gène en particulier sur le

processus métastatique du lymphome par le transfert de cDNA spécifiques. Ce modèle est utilisé dans notre laboratoire pour l'étude du rôle des métalloprotéases de la matrice (MMP) et des molécules d'adhésion intercellulaire lors du processus métastatique du lymphome T.

## **2.0 Les molécules d'adhésions cellulaires**

De nombreux évènements physiologiques ou pathophysiologiques comme l'embryogenèse, le développement de la réponse inflammatoire et la carcinogenèse impliquent les molécules d'adhésion. Ces protéines, exprimées à la surface de la membrane cytoplasmique des cellules jouent en effet un rôle clé dans les divers processus de reconnaissance intercellulaire, de même qu'avec les protéines de la matrice extracellulaire. De plus, puisque le leucocyte utilise constamment les principes de migration via les molécules d'adhésion de leur migration aux différents organes lymphoïdes et aux sites inflammatoires, l'étude du lymphome constitue en soi un excellent modèle d'étude pour mieux comprendre le rôle de ces molécules lors du processus de métastase.

### **2.1 Les étapes du processus d'adhésion et de l'extravasation du leucocyte**

Le processus de migration du leucocyte vers un site spécifique se divise en trois étapes principales (Springer, 1995). Il y a tout d'abord l'adhésion initiale de la cellule avec l'endothélium par liaisons faibles *via les sélectines* provoquant un mouvement de roulement (« rolling ») de la cellule à la surface de l'endothélium, permettant ainsi aux leucocytes de réagir à des facteurs activants ou des signaux chémoattractants exprimés

localement au niveau de l'endothélium vasculaire. L'influence des chémoattractants sur le leucocyte est un phénomène d'activation rapide et dynamique, et entraîne l'activation des intégrines exprimées à la surface des leucocytes, favorisant leur interaction avec leur ligands exprimés sur l'endothélium vasculaire. La liaison de forte affinité du leucocyte à l'endothélium via ses intégrines est en effet dépendante d'une activation puisque le niveau basal d'affinité des intégrines pour leurs ligands est presque nul (Springer, 1991). Après son adhésion ferme à l'endothélium via les intégrines, le leucocyte sort hors de la circulation (extravasation par diapédèse) et migre vers le site inflammatoire. De façon générale, on retrouve donc trois familles de molécules d'adhésion impliquées dans la migration des lymphocytes

## **2.2 Les sélectines :**

La famille des sélectines comprends trois membres : L, P et E-sélectines (CD62L, CD62P, et CD62E, respectivement). Les L-sélectines sont généralement distribuées sur les leucocytes alors que les sélectines P et E se situent surtout sur l'endothélium vasculaire (Rosen *et al.*, 1993). La nature de leur liaison à leur ligand, sensible à la glycosylation, dépend d'une complémentarité tridimensionnelle avec leur ligand : un carbohydrate sialé. La conformation structurale des sélectines dépend d'ions  $Ca^{2+}$  qui lient la partie N-terminale de la protéine (Bevilacqua *et al.*, 1991). Ainsi, les L-sélectines du leucocyte auront comme ligand sur les veinules (HEV, « High endothelial venules ») différentes molécules dont GlyCAM (Rosen *et al.*, 1993), CD34 (Lasky *et al.*, 1994), et MadCAM (Berg *et al.*, 1993). Pour les sélectines endothéliales P et E; un groupement particulier sialique sur des souches cellulaires particulières modulera les interactions de

liaisons. Par exemple, la P-sélectine aura comme ligand la « P-sélectine glycoprotéine ligand » ou (PSGL-1); constitutivement exprimée chez les leucocytes. (Furie *et al.*, 1995)

Les interactions sélectines-ligands sont des interactions rapides, réversibles et de faibles affinités. Elles jouent un rôle bien précis en dirigeant et en modulant le mouvement de roulement des leucocytes sur l'endothélium vasculaire. Les constantes dynamiques justifient le phénomène. Par associations aléatoires des sélectines à leurs ligands, elles ont une liaison de faible affinité ( $K_{eq}$ ), mais de rapides associations ( $K_{on}$ ) et de dissociations ( $K_{off}$ ), assurant le mouvement de roulement (Rosen *et al.*, 1993). Ces associations assurent ainsi une liaison de force suffisante pour maintenir la cellule dans sa course, et une souplesse de dissociation pour favoriser sa prochaine liaison en amont sans ralentir son mouvement (Springer, 1995). Ainsi, les leucocytes peuvent entrer en contact direct avec les chémoattractants présents sur l'endothélium.

### **2.3 Chémotactisme**

L'action des chémoattractants est essentielle pour l'activation des intégrines et pour diriger ultérieurement la migration des leucocytes aux sites inflammatoires. Le chémotactisme est le mouvement d'une cellule d'un site faible en concentration vers un site plus concentré en chémoattractants. Ces molécules sont généralement des facteurs solubles, soit des chémokines (MCP-1, MIP-1, SDF-1) ou des cytokines (e.g. IL-8, IL-16), des lipides (e.g. leukotriène B4) ou des éléments du complément C5a (Hopken *et al.*, 1992, Springer, 1995). Dans un contexte de circulation sanguine, l'adhésion primaire via les sélectines est nécessaire afin de permettre de favoriser la détection du gradient de

facteurs solubles, et ainsi permettre leur action biologique d'activation des leucocytes. Les récepteurs des chémoattractants ont cependant plusieurs fonctions autres que d'activer les intégrines; ils stimulent la dégranulation, induisent des modifications du cytosquelette, et la polymérisation de l'actine (Hopken *et al.*, 1992).

## 2.4 Les intégrines

Les intégrines forment une vaste famille de glycoprotéines transmembranaires formées de l'association non-covalente de deux sous unités  $\alpha$  et  $\beta$ . Seulement un nombre restreint d'intégrines est exprimées par les leucocytes. Ces molécules d'adhésion serviront d'ancrage lors de l'adhésion ferme des leucocytes aux cellules endothéliales et de co-stimulation lors d'interactions cellules-cellules (Springer, 1995). La chaîne  $\beta$  définit plusieurs sous-familles, et confère une spécificité au niveau du « homing » de certaines sous-populations leucocytaires à leurs cibles. Les membres de la sous-famille des intégrines  $\beta_1$  (CD49) sont impliqués, par exemple, dans le recrutement d'oesinophiles via l'intégrine  $\alpha_4\beta_1$  (Seminario *et al.*, 1997) se liant à son ligand VCAM-1 (« vascular cell adhesion molecule-1 »; CD106) (Matheny *et al.*, 2000). Les intégrines impliquées dans les mécanismes d'adhésions lymphocytaires sont quant à elles surtout de la sous-famille des intégrines  $\beta_2$  (CD18), telles que LFA-1 (« lymphocyte function-associated molecule-1 »; CD11a/CD18;  $\alpha_L\beta_2$ ), Mac-1 (CD11b/CD18;  $\alpha_M\beta_2$ ) et p150,95 (CD11c/CD18) (Boyd *et al.*, 1989). En plus des interactions avec l'endothélium, LFA-1 régule également les interactions interleucocytaires, et celles impliquant les cellules dendritiques, folliculaires dendritiques, et épithéliales (Springer, 1995).

## **2.5 Les molécules d'adhésion de la superfamille des Ig.**

L'attachement ferme des leucocytes à l'endothélium vasculaire lors du processus séquentiel de homing est possible grâce à l'expression *de novo* de ligands spécifiques aux intégrines  $\beta 1$  et  $\beta 2$  à la surface des cellules endothéliales. Les principaux ligands impliqués sont VCAM-1, MadCAM-1 (« mucosal addressin cellular adhesion molecule-1 »), ICAM-1 (« intercellular adhesion molecule-1 »), et ICAM-2 (« intercellular adhesion molecule-2 ») (Wang et Springer, 1998). Hormis ICAM-2, qui est exprimé de façon constitutive, les autres membres de cette famille sont exprimés suite à l'activation de l'endothélium par des agents pro-inflammatoires, tels que le TNF $\alpha$  et l'IL-1 (Bevilacqua *et al.*, 1987). La mise en évidence du rôle de ces molécules a surtout été étudiée par l'utilisation de souris génétiquement modifiées au niveau du gène *icam-1* et *icam-2* (Sligh *et al.*, 1993, Xu *et al.*, 1994, Gerwin *et al.*, 1999), étant donné que l'ablation génétique du gène *vcam-1* entraîne la mort au stade embryonnaire (Gurtner *et al.*, 1995). Les résultats obtenus dans le modèle de souris ICAM-1-déficientes ont permis de démontrer sans équivoque l'importance d'ICAM-1 dans la migration leucocytaire. L'ablation génétique de ce gène confère à ces souris une forte résistance aux chocs septiques induits par l'injection de lipopolysaccharides bactériens de *E.coli* (Xu *et al.*, 1994). Cette résistance est due à l'incapacité des leucocytes d'adhérer de façon ferme à l'endothélium vasculaire, de migrer au niveau des sites inflammatoires et d'infiltrer le stroma tissulaire des organes cibles, notamment au niveau du foie.

## **2.6 ICAM-1 : une molécule d'adhésion fondamentale dans la dissémination du lymphome.**

Étant donné qu'ICAM-1 joue un rôle prépondérant dans la dissémination des leucocytes, plusieurs auteurs ont étudié son implication possible dans le processus de dissémination des cellules lymphomateuses. Cette hypothèse était supportée par le fait que des niveaux anormalement élevés d'ICAM-1 solubles étaient retrouvés dans le sang de patients atteints de lymphomes agressifs (Banks *et al.*, 1993). De plus, d'autres travaux avaient démontré que les cellules lymphomateuses agressives exprimaient des niveaux très élevés de LFA-1 à leur surface en comparaison avec ceux que l'on retrouve chez des lymphocytes normaux (Roossien *et al.*, 1989). L'utilisation de modèles expérimentaux murins visant à contrer la dissémination des lymphomes par l'injection d'anticorps monoclonaux anti-ICAM-1 capables de bloquer l'interaction avec LFA-1 n'a toutefois pas permis de mettre en évidence un tel rôle. Prenant avantage des souris ICAM-1-déficientes, et du modèle murin de Kaplan, Aoudjit *et al.*, (1998a) a clairement démontré que l'ablation génétique du gène *icam-1* conférait à ces souris une forte résistance aux lymphomes T. De plus, il a été observé que ICAM-1 pouvait favoriser l'échange de signaux d'activation chez les leucocytes et les cellules vasculaires lors de l'adhésion ferme, démontrant que la liaison entre LFA-1 et ICAM-1 est primordiale pour la dissémination du lymphome (Aoudjit *et al.*, 1998b). Une meilleure compréhension des relations structures-fonctions d'ICAM-1 pourrait permettre de mieux comprendre le rôle des molécules d'adhésion dans le processus métastatique en général.

### **2.6.1 Expression cellulaire et distribution tissulaire**

Des études immunohistochimiques sur différents organes humains ont révélé la présence de ICAM-1 au niveau du thymus, des ganglions lymphatiques, des intestins, des reins, du

foie et de la peau ; la molécule était alors exprimée sur les cellules endothéliales et épithéliales, les macrophages, les fibroblastes, et les cellules dendritiques de ces différents organes (Dustin *et al.*, 1986). ICAM-1 est également exprimée durant l'hématopoïèse, plus spécifiquement par les cellules souches de la moelle osseuse, les cellules de lignées lymphoïdes, ainsi que par les cellules de lignées myéloïdes, et ce jusqu'au stade du myélocyte et de l'érythroblastocyte (Liesveld *et al.*, 1994), de même qu'à la surface des cellules de lignées monocytaires (Boyd *et al.*, 1989 ; Dustin *et al.*, 1986). L'expression de ICAM-1 peut également être induite sur d'autres types cellulaires qui n'expriment pas la molécule de façon constitutive. Plusieurs agents ont été rapportés comme étant capables d'induire ou de réduire l'expression de ICAM-1 (voir revue de van de Stolpe et van der Saag, 1996) ; des cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN- $\gamma$ , l'IL-1 et le TNF- $\alpha$  ont été rapportés comme étant d'importants inducteurs d'expression de ICAM-1 (Dustin *et al.*, 1986), alors que les glucocorticoïdes sont considérés comme des inhibiteurs d'expression d'ICAM-1 (van de Stolpe *et al.*, 1994).

### **2.6.2 Rôle biologique**

ICAM-1 joue un rôle déterminant dans plusieurs processus physiologiques, notamment durant le développement de la réponse immunitaire et inflammatoire. L'utilisation d'AcM, d'antisens dirigés contre les ARNm de ICAM-1, et le développement, par génie génétique, de souris ICAM-1-déficientes ont grandement contribué à l'élucidation et à la compréhension des principales fonctions biologiques de ICAM-1. La fonction majeure d'ICAM-1 apparaît alors comme étant de consolider les interactions intercellulaires qui

surviennent durant l'extravasation des leucocytes ainsi que durant l'activation des lymphocytes T.

En plus de remplir une fonction d'adhésion, ICAM-1 jouerait également un rôle en tant que molécules de transduction de signaux intracellulaires et ce, malgré un domaine cytoplasmique relativement court. De nombreux travaux ont fait état de la capacité de ICAM-1 à émettre des signaux intracellulaires («outside-in signaling») suite à son «cross-linking» à l'aide d'anticorps monoclonaux (AcM). Cette fonction pourrait mener, entre autre, à l'inhibition de la sécrétion de cytokines (e.g., IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , et IL-1) par les lymphocytes activés (Geissler *et al.*, 1990) ainsi qu'à l'induction de la flambée oxydatives par les monocytes (Rothlein *et al.*, 1993). Dans le cas des cellules endothéliales du cerveau, le cross-linking d'ICAM-1 induirait l'activation de la kinase pp60<sup>src</sup> qui à son tour, causerait la phosphorylation de la cortactine, une protéine du cytosquelette (Durieu-Trautmann *et al.*, 1994). Dans d'autres cas bien précis, le co-cross-linking d'ICAM-1 et des IgM membranaires sur des cellules de lymphomes de Burkitt interférerait avec la mobilisation du calcium (Horssen *et al.*, 1995). Par ailleurs, et toujours sur des cellules de lymphome B, Holland et Owens (1997) ont montré que le cross-linking d'ICAM-1 induisait : i) l'expression des protéines du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II), ii) la phosphorylation de tyrosines sur plusieurs protéines intracytoplasmiques, incluant la famille de kinase p53/p56 (*lyn*), et iii) l'activation des kinases Raf-1 et MAPK («mitogen-activated protein kinase»).

### **2.6.3 ICAM-1 et l'activation des lymphocytes T**

En plus de leur implication dans le processus de migration leucocytaire, les interactions ICAM-1/LFA-1 ont été démontrées comme étant déterminantes durant la génération d'une réponse inflammatoire impliquant les lymphocytes T (Springer, 1990). Au niveau du système immunitaire, ICAM-1 est exprimée sur les monocytes/macrophages (Dustin *et al.*, 1986, Dougherty *et al.*, 1988, Most *et al.*, 1992a et 1992b), les lymphocytes B et les plasmocytes (Clark *et al.*, 1986, Arkin *et al.*, 1991) ainsi que sur les lymphocytes T activés et mémoire (Dustin *et al.*, 1986, Dougherty *et al.*, 1988, Boyd *et al.*, 1989, Buckle *et al.*, 1990). Les cellules présentatrices d'antigène, comme les macrophages et les lymphocytes B, co-expriment ICAM-1 en association avec les protéines du CMH-II pour activer les cellules CD4<sup>+</sup> auxiliaires (Fischer *et al.*, 1992, Damle *et al.*, 1992). La présence d'ICAM-1 durant la présentation d'antigène est importante puisque la cotransfection d'ICAM-1 et de CMH-II a permis de reconstituer et d'augmenter le processus de présentation d'antigène sur des cellules initialement non-permissives au phénomène (Fischer *et al.*, 1992, Altmann *et al.*, 1989). Dans la réponse T à médiation cellulaire cytotoxique, ICAM-1 participe également à l'activation des cellules T cytotoxiques non-CMH dépendantes (Maio *et al.*, 1989, Makgoba *et al.*, 1988) ainsi que durant l'activation des cellules CD8<sup>+</sup> cytotoxiques CMH-I dépendantes (Vanky *et al.*, 1990, Jansen *et al.*, 1992, Ybarrondo *et al.*, 1994).

### **2.6.4 Structure générale d'ICAM-1**

ICAM-1 est une glycoprotéine transmembranaire composée de cinq domaines d'Ig (DI-D5) dont certains sont similaires à ceux retrouvés pour ICAM-2 (CD102), ICAM-3

(CD50) et ICAM-4 (LW) (Staunton *et al.*, 1989, Fawcett *et al.*, 1992, Fougerolles *et al.*, 1992, Bailly *et al.*, 1994 et 1995). ICAM-1 présente également plusieurs séquences d'homologies avec d'autres membres de la superfamille des Ig tels NCAM-1 (CD56) et la télencéphaline (ICAM-5) qui sont deux molécules d'adhésion du système nerveux (Simmons *et al.*, 1988, Tian *et al.*, 1997). La molécule ICAM-1 a été clonée chez plusieurs espèces, dont la souris (Siu *et al.*, 1989), le rat (Kita *et al.*, 1992) et le chien (Manning *et al.*, 1995). Leur séquence d'ADNc montre des homologies partielles avec la séquence humaine (55-65%). Le gène de ICAM-1 est constitué de sept exons qui sont entrecoupés par six introns, chacun des cinq domaines d'Ig étant individuellement codé par un exon (Voraberger *et al.*, 1991).

La séquence peptidique de la forme commune d'ICAM-1 contient 505 acides aminés (a.a.), et est divisée en trois régions distinctes: une partie extracellulaire constituée de 453 a.a majoritairement hydrophiles, une région transmembranaire hydrophobe (24 a.a.), et une queue cytoplasmique chargée (28 a.a.) (Staunton *et al.*, 1988). La partie extracellulaire est caractérisée par un alignement en série de cinq domaines d'Ig (D1 à D5 ; D1 étant le domaine N-terminal). Chacun des domaines d'Ig est caractérisé par : i) une séquence de 90-100 acides aminés, ii) deux feuillets formés de brins  $\beta$  anti-parallèles, et iii) des résidus cystéines localisés au niveau des brins  $\beta$  qui stabilisent leur structure tertiaire en formant des ponts disulfures. La structure tridimensionnelle complète d'ICAM-1 n'est présentement pas connue. Cependant, celle d'un fragment de 190 a.a. comprenant ses deux premiers domaines extracellulaires (DI-D2) a récemment été déterminée par cristallographie à une résolution de 3.0-Å (Casasnovas *et al.*, 1998).

L'étude de ces fragments a révélé la présence d'une interface hydrophobe, au niveau du domaine D1, impliquée dans l'homodimérisation d'ICAM-1. Ces résultats confirmaient donc d'autres travaux rapportant l'homodimérisation d'ICAM-1 à la surface cellulaire (voir section «Dimérisation » plus loin pour plus de détails).

L'observation par microscopie électronique de molécules ICAM-1 purifiées a également révélé que la molécule se présentait sous une forme linéaire d'une longueur et largeur approximative de 19 nm et de 2-3 nm consistant avec un alignement complet et en série des domaines extracellulaires (Staunton *et al.*, 1990). De plus, une région charnière («hinge rod») est également observée au centre d'ICAM-1, c'est-à-dire, entre ses domaines D3 et D4 ; celle-ci accorderait une certaine flexibilité à l'extrémité extracellulaire N-terminale d'ICAM-1.

### **2.6.5 Glycosylation de ICAM-1**

La partie extracellulaire d'ICAM-1 est glycosylée de façon distincte dépendamment des types cellulaires qui l'expriment, ce qui explique que l'hétérogénéité de sa masse moléculaire peut fluctuer entre 76 à 114 kDa (Dustin *et al.*, 1986, Rothlein *et al.*, 1986, Staunton *et al.*, 1988). La déglycosylation d'ICAM-1 résulte en une protéine de 55 kDa (Dustin *et al.*, 1986, Staunton *et al.*, 1988). La glycosylation peut donc constituer 30 à 50 pour cent de la masse moléculaire totale d'ICAM-1. Cette glycosylation différentielle est principalement due aux nombreux sites de N-glycosylation (huit en tout) qui sont retrouvés sur la partie extracellulaire de la protéine. Ces sites sont localisés tout au long des domaines D2, D3 et D4 (Bloom *et al.*, 1996), les domaines N-terminal (D1) et

membrane-basal (D5) n'étant pas glycosylés. Les oligosaccharides d'ICAM-1 possèdent différentes tailles pouvant présenter des structures moléculaires fort complexes (Bloom *et al.*, 1996). De nombreux résidus d'acide sialique sont également présents au niveau des extrémités oligosaccharidiques terminales (Dustin *et al.*, 1986, Staunton *et al.*, 1988, Bloom *et al.*, 1996). L'hétérogénéité de la glycosylation d'ICAM-1 pourrait possiblement avoir d'importantes répercussions sur la structure globale de son squelette polypeptidique et ainsi diversifier ses fonctions biologiques.

#### **2.6.6 Dimérisation de ICAM-1**

La dimérisation de ICAM-1 à la surface des cellules a initialement été proposée par Staunton *et al.* (1988) puisque la présence des résidus cystéines libres, localisés à proximité de la zone d'enclassement, suggéraient la formation de ponts disulfures intermoléculaires. Des homodimères d'ICAM-1 ont pu être mis en évidence en établissant des liens covalents entre ceux-ci, permettant de les visualiser clairement sur gel de polyacrylamide (Reilly *et al.*, 1995, Miller *et al.*, 1995). Le domaine transmembranaire d'ICAM-1 qui contient un motif de dimérisation ne serait pas la seule région impliquée dans la dimérisation puisque des fragments ICAM-1 contenant uniquement les deux premiers domaines extracellulaires (D1-D2) ont également la capacité de dimériser (Casasnovas *et al.*, 1998). L'analyse de la structure tridimensionnelle des deux premiers domaines (D1-D2) a en effet révélé la présence d'une interface hydrophobe dans le domaine D1 qui serait impliquée dans la dimérisation (Casasnovas *et al.*, 1998). Malgré l'homocomplexation des domaines D1, les épitopes de liaison de ICAM-1 envers LFA-1, de même que ceux impliqués dans l'ancrage des

rhinovirus ne sont pas camouflés, indiquant ainsi que la dimérisation n'interfère pas au niveau de la capacité de liaison d'ICAM-1 envers LFA-1 et les rhinovirus. En fait, il semble qu'au contraire les formes dimériques ont une affinité plus grande envers les molécules LFA-1 que les formes monomériques (Miller *et al.*, 1995). Dans le cas des rhinovirus, la dimérisation d'ICAM-1 semble également augmenter son affinité (Martin *et al.*, 1993, Casasnovas et Springer, 1995).

### **2.6.7 ICAM-1 : Association avec le cytosquelette**

Les molécules ICAM-1 peuvent être redistribuées puis concentrées au niveau de la zone de contact cellule-cellule (Dougherty *et al.*, 1988, Carpén *et al.*, 1992, Dustin *et al.*, 1992, Vignola *et al.*, 1994). Les molécules ICAM-1 sont alors principalement localisées sur les microvillosités cellulaires. Ces projections cytoplasmiques, appelées uropodes, sont principalement formées de filaments d'actine qui sont ancrés à la membrane cytoplasmique par l'intermédiaire de protéines d'ancrages, telle que l' $\alpha$ -actinine. Or, il a été démontré que la partie intracytoplasmique d'ICAM-1 pouvait se lier à l' $\alpha$ -actinine (Carpén *et al.*, 1992). L'étroite collaboration de ICAM-1 avec cet élément du cytosquelette expliquerait sa capacité à pouvoir focaliser son expression membranaire à des endroits stratégiques permettant alors d'optimiser et de stabiliser les interactions cellulaires. Ce processus d'expression polarisée d'ICAM-1, qui peut être induit par certaines chémokines lors d'interactions leucocyte/endothélium, pourrait ainsi faciliter le recrutement des leucocytes de la circulation sanguine (del Pozo *et al.*, 1995 et 1997).

## 2.6.8 Les ligands d'ICAM-1

### 2.6.8.1 Ligands endogènes

ICAM-1 possède de nombreux ligands endogènes, notamment les intégrines- $\beta$ 2, c'est-à-dire, LFA-1, qui fut le premier ligand de ICAM-1 identifié, ainsi que Mac-1, et p150,95 (Marlin et Springer, 1987; Diamond *et al.*, 1990, 1991 et 1993). L'utilisation d'AcM de diverses spécificités envers les différents domaines extracellulaires d'ICAM-1 et l'utilisation de cellules transfectées avec différentes formes mutantes d'ICAM-1 (mutations ponctuelles ou délétion complète de certains domaines d'Ig) ont permis de localiser les différents épitopes de liaison de ICAM-1 envers la plupart de ses ligands. Le domaine N-terminal (D1) est reconnu comme étant la région possédant l'épitope de liaison envers LFA-1 (Staunton *et al.*, 1990) tandis que le site de liaison envers Mac-1 se situe au niveau du domaine D3 (Diamond *et al.*, 1991). La glycosylation de D3 semble également réguler l'affinité de ICAM-1 envers Mac-1 (ce qui n'est pas le cas pour la liaison avec LFA-1 puisque le domaine D1 ne possède aucun site de glycosylation). Ce phénomène a pu être démontré avec diverses formes purifiées d'ICAM-1 présentant des patrons différents de glycosylation ; les formes hypoglycosylées se liant plus fortement à Mac-1. De même, les mutations ponctuelles empêchant la glycosylation du domaine D3 augmentent l'affinité de ICAM-1 envers Mac-1 (Diamond *et al.*, 1991).

En plus de promouvoir l'adhésion intercellulaire, ICAM-1 sert également de récepteur pour le fibrinogène soluble et l'hyaluronate (Languino *et al.*, 1993, McCourt *et al.*, 1994). L'interaction d'ICAM-1 avec le fibrinogène se fait via un épitope de liaison situé au niveau du domaine D1 (Languino *et al.*, 1993, Altieri *et al.*, 1995, Duperray *et al.*, 1997)

mais distinct de celui reconnu par LFA-1 puisque certains AcM dirigés contre le domaine D1 inhibent l'interaction du fibrinogène sans affecter la liaison de LFA-1 (Languino *et al.*, 1995).

#### **2.6.8.2 Ligands exogènes**

ICAM-1 humain a également été rapporté comme étant le récepteur cellulaire du groupe majeur des rhinovirus et du virus coxsackie A13 (Greve *et al.*, 1989, Staunton *et al.*, 1989). Le domaine de liaison chevauche partiellement celui de LFA-1 (Staunton *et al.*, 1990, McClelland *et al.*, 1991). Des études moléculaires sur l'interaction entre ICAM-1 et le rhinovirus ont révélé que les deux premiers domaines d'ICAM-1 (D1-D2) se liaient à proximité ou à l'intérieur d'une dépression (appelée «canyon») de la capsid virale (McClelland *et al.*, 1991). Un épitope additionnel, également situé sur le domaine D1 et distinct de celui de LFA-1, est responsable de la liaison d'érythrocytes qui ont été préalablement infectés par *Plasmodium falciparum*, un des agents étiologiques de la malaria (Berendt *et al.*, 1989 et 1992 ; Ockenhouse *et al.*, 1992). *Hormis nos travaux présentés dans ce mémoire sur la liaison de l'élastase des leucocytes humaines, aucune étude n'a rapporté jusqu'à maintenant la liaison de protéases extracellulaires à ICAM-1.*

#### **2.6.9 Isoformes d'ICAM-1**

Des travaux récents ont identifié six isoformes murines d'ICAM-1 résultant de l'épissage alternatif du transcrit primaire. Ces isoformes sont exprimées de façon distincte dans les différents tissus de la souris (King *et al.*, 1995). Chez l'humain, un tel phénomène

d'épissage alternatif générant différentes isoformes membranaires d'ICAM-1 a été confirmé bien que les détails moléculaires de ces épissages demeurent inconnus, nonobstant l'existence d'un ARNm codant pour une forme soluble d'ICAM-1 (sICAM-1) rapportée chez l'humain par Wakatsuki *et al.* (1995).

#### **2.6.10 Formes solubles (sICAM-1)**

La présence de formes circulantes ou solubles d'ICAM-1 (cICAM-1, sICAM-1) a été rapportée dans divers liquides biologiques tels que le plasma sanguin, le liquide céphalorachidien, et les sécrétions bronchoalvéolaires (Gearing et Newman, 1993). Les cellules endothéliales, les cellules mononuclées du sang, les kératinocytes et des lignées cellulaires métastatiques se sont tous avérées des sources importantes de sICAM-1 (van de Stolpe et van der Saag, 1996). Des études ont montré que sICAM-1 possédait une masse moléculaire similaire à celle de la forme recombinante d'ICAM-1 (comprenant uniquement la partie extracellulaire) ainsi que légèrement inférieure à celle retrouvée pour la forme transmembranaire, suggérant alors la présence de la quasi-totalité des domaines extracellulaires d'ICAM-1 (Seth *et al.*, 1991). Une autre étude a effectivement démontré que sICAM-1 pouvait contenir tous les domaines extracellulaires d'ICAM-1 (D1-D5) puisque des anticorps dirigés contre les cinq domaines extracellulaires de ICAM-1 ont tous réagi envers sICAM-1 (Rothlein *et al.*, 1991). Des formes circulantes de masses moléculaires élevées (240, 430, et >500 kDa) ont également été détectées dans le plasma sanguin, en condition électrophorétique non-dénaturante, ce qui indiquerait une homocomplexation des molécules sICAM-1 entre elles, ou encore, une hétérocomplexation de sICAM-1 avec d'autres types de molécule (Seth *et al.*, 1991).

La fonction de sICAM-1 a été étudiée en purifiant la forme transmembranaire d'ICAM-1 ou en utilisant des formes recombinantes comprenant uniquement la partie extracellulaire (D1-D5). La bioactivité de sICAM-1 est en partie discutable puisqu'elle semble seulement avoir la capacité de se lier à LFA-1 que lorsque sICAM-1 est préalablement adsorbée sur un substrat quelconque (e.g. sphères de polyéthylènes) (Martin *et al.*, 1993, Cobb *et al.*, 1992, Welder *et al.*, 1993). Par ailleurs, d'autres études ont montré que sICAM-1 (non-adsorbée) conservait sa bioactivité en solution puisqu'elle avait la capacité d'inhiber les infections cellulaires causées par le groupe majeur des rhinovirus (HRV54) et le virus coxsackie A13 (Marlin *et al.*, 1990). De plus, des fragments monomériques de sICAM-1 qui contenaient uniquement les deux premiers domaines N-terminal d'ICAM-1 (D1-D2) peuvent encore se lier aux érythrocytes infectés par *Plasmodium falciparum*. (Martin *et al.*, 1993). Cette controverse au niveau de la bioactivité de sICAM-1 pourrait s'expliquer du fait que la liaison de sICAM-1 avec LFA-1 nécessiterait une homocomplexation des molécules sICAM-1 entre elles, tel que précédemment rapporté par Miller *et al.* (1995); les formes dimériques sembleraient, en effet, être les seules à avoir la capacité de se lier avec LFA- 1.

Selon certaines études, la forme soluble d'ICAM-1 résulterait d'un clivage protéolytique de la forme transmembranaire étant donné que des inhibiteurs de protéases inhibent la production de sICAM-1 par certains types cellulaires (Budnik *et al.*, 1996; Lyons et Benveniste, 1998). L'élastase de leucocytes (LE) humains et certaines métalloprotéases non-identifiées semblent jouer un rôle dans ce clivage (Champagne *et al.*, 1998 ; Lyons *et*

*al.*, 1998). La forme soluble pourrait également résulter d'un phénomène d'épissage alternatif du transcrit primaire de l'ARNm de ICAM-1 puisqu'un ARNm codant une molécule ICAM-1 sans domaine cytoplasmique, ni domaine transmembranaire, a été identifié chez l'humain (Wakatsuki *et al.*, 1995). La présence de sICAM-1 pourrait donc résulter à la fois d'un phénomène d'épissage alternatif et/ou d'un phénomène de protéolyse membranaire.

Bien que le rôle physiologique de sICAM-1 demeure inconnu, plusieurs études ont démontré que les niveaux sanguins de sICAM-1 augmentent considérablement dans de nombreux désordres inflammatoires et cancéreux. Des concentrations élevées de sICAM-1 dépassant de plusieurs fois les niveaux sanguins normaux (~200 ng par mL) ont été rapportées chez des individus présentant diverses infections virales (par le VIH, ou les virus de l'hépatite B ou C), divers types de cancers (lymphomes non-Hodgkin, mélanomes, cancers mammaires, carcinomes rénaux), maladies auto-immunitaires (arthrite rhumatoïde), ou rejets d'organes transplantés (Gearing et Newman, 1993). Il a alors été proposé que les concentrations élevées de sICAM-1 refléteraient une intense activité inflammatoire et que la quantification de sICAM-1 pourrait par conséquent être un outil intéressant pour le diagnostique et le suivi de certains désordres inflammatoires et cancéreux.

### **3.0 Le rôle des protéases extracellulaires**

De plus en plus d'études indiquent une relation étroite entre les mécanismes d'adhésion intercellulaires et l'expression d'une activité protéolytique par les cellules inflammatoires, tumorales, et péricellulaires (St-Pierre *et al.*, 1999; St-Pierre *et al.*, 2000).

Les protéases extracellulaires sont surtout reconnues pour être associées dans des processus inflammatoires et d'autoimmunité en clivant les protéines l'ECM. Jusqu'à maintenant, ces études ont surtout porté sur les membres de la famille des MMP, notamment les gélatinases A (MMP-2) et B (MMP-9).

### **3.1 Les enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire : MMPs**

Les MMPs sont des enzymes de dégradation, dépendantes du zinc et du calcium. Elles ont une affinité pour la gamme complète des substrats de l'ECM, dont la vitronectine (Imai *et al.*, 1995), la fibronectine (Homandberg *et al.*, 1996), le collagène (Krane *et al.*, 1996) et l'élastine (Senior *et al.*, 1991). Les MMPs sont impliquées dans plusieurs maladies dégénératives dont l'arthrite rhumatoïde, la dégradation de la barrière hémato-encéphalique, ainsi que dans la migration de lymphocytes et de cellules tumorales au travers de l'ECM (Clavel *et al.*, 1992).

La famille des MMPs comprend maintenant plus de vingt-six membres, certains d'entre eux pouvant être catégorisés selon leurs similitudes structurales et leur affinité envers les substrats de l'ECM. De façon générale, les MMP contiennent trois domaines communs qui précèdent le peptide signal : un propeptide, un domaine catalytique et un domaine homologue à l'hémopexine (Cockett *et al.*, 1994). La portion N-terminale des MMPs (le pro-peptide) est formée de 77 à 87 résidus comportant la séquence conservée PRCG(V/N)PD. Cette séquence est essentielle à la conservation de la forme latente de l'enzyme, puisqu'elle bloque l'entrée du site catalytique. Le domaine C-terminal hémopexique sert de gouvernail lors des interactions avec la matrice ou le substrat. Cette

portion C-terminale peut également contenir une séquence hydrophobique transmembranaire utilisée comme ancre dans le cas des MMPs membranaires (MT-MMPs, « membrane-type MMP ») (Tokuraku *et al.*, 1997). Différents sous-groupes de MMPs ont donc été établis en fonction de leurs traits structuraux distincts et leur affinité à certains substrats.

### **3.1.1 Les collagénases .**

Le terme collagénase fut longtemps utilisé pour décrire un groupe d'enzymes bactériennes impliquées dans la dégradation du collagène. La collagénase interstitielle (MMP-1 (E.C. 3.4.24.7), fut la première collagénase endogène à être identifiée lors des études sur la résorption tissulaire se produisant durant la métamorphose de la queue du têtard (Nagai *et al.*, 1966). Les collagénases incluent MMP-1 (collagénase 1), MMP-8 (collagénase 2; E.C. 3.4.24.34), MMP-13 (collagénase 3; E.C. non attribuée), et MMP-18 (collagénase 4; E.C. non attribuée). Les collagénases se distinguent des autres MMPs par leur capacité de dégrader des régions de structures hélicoïdales triples composées de divers types de collagène. De plus, MMP-1 et MMP-8 digèrent, bien qu'à un niveau moindre, plusieurs autres composants d'ECM, comme la gélatine et les protéoglycans. Préconisant une séquence d'acides aminés étendue, MMP-1 a une affinité plus grande pour  $\alpha_2$ -MG que pour le collagène, ce qui laisse supposer un rôle biologique à ce niveau (Nagase *et al.*, 1989). Alors que MMP-1 est synthétisée par plusieurs types cellulaires (fibroblastes, chondrocytes, ostéoblastes, macrophages, etc.) (Nagase, 1989), l'expression de MMP-8 est presque uniquement retrouvée chez les neutrophiles. MMP-8 fut en effet isolée pour la première fois au niveau fonctionnel dans les neutrophiles humains (Lazarus

*et al.*, 1968), plus spécifiquement au niveau des granules cytoplasmiques (Murphy *et al.*, 1977), où l'enzyme s'accumule durant la différenciation des cellules myéloïdes (Bainton *et al.*, 1971). MMP-13 et MMP-18 n'ont été clonées que plus récemment, à partir d'un carcinome mammaire (Freije *et al.*, 1994) et de *Xenopus laevis* (Stolow *et al.*, 1996). MMP-13 demeure une enzyme associée au carcinome mammaire, et son rôle physiologique demeure incertain. La séquence de MMP-18 a été identifiée par recherche d'homologie d'EST (« expressed sequence tags ») (Cossins *et al.*, 1996), mais peu de travaux ont jusqu'à maintenant permis d'élucider son rôle physiologique et pathophysiologique.

### **3.1.2. Les gélatinases.**

Les gélatinases comprennent MMP-2 (E.C. 3.4.24.24) et MMP-9 (3.4.24.35), reconnues pour leur capacité à dégrader le collagène dénaturé (gélatine) en zymographie, laissant supposer que ces MMP entrent en jeux de façon tardive lors du processus de dégradation de l'ECM. Elles peuvent également dégrader de façon plus ou moins efficace le collagène de type IV et V (Nagase *et al.*, 1991). Contrairement à MMP-9 et à la majorité des autres MMP, MMP-2 peut se retrouver au niveau membranaire dans sa forme proenzymatique, par une liaison indirecte avec MT1-MMP (« membrane-type 1 MMP ») via la liaison de son domaine C-terminal avec TIMP-2 (Nakagawa *et al.*, 1994). L'expression de MMP-2 et de MMP-9 se retrouve dans plusieurs tissus, d'origines lymphoïdes notamment, et au niveau des cellules endothéliales vasculaires, suggérant un rôle dans la capacité des cellules de lymphomes à migrer à travers le stroma tissulaire des organes cibles lors des dernières étapes de la métastase (St-Pierre *et al.*, 1999). Au

niveau du lymphome de Hodgkin, on retrouve ainsi une expression anormalement élevée des niveaux de ces enzymes (Kossakowska *et al.*, 1993). Des résultats semblables ont été obtenus chez le modèle de lymphomagénèse de Kaplan (Aoudjit *et al.*, 1997). De plus, les travaux plus récents de notre laboratoire ont démontré que l'expression constitutive de MMP-9 dans les cellules lymphomateuses 267 accélérerait la croissance tumorale intrathymique (Aoudjit *et al.*, 1999).

### **3.1.3. Les Stromélysines**

Les stromélysines représentent un sous-groupe d'enzymes avec une homologie structurale commune et furent originellement décrites comme dérivant des cellules stromales. La stromélysine-1 (E.C. 2.4.24.17) fut la première de ces enzymes à être identifiée et fut nommée MMP-3 pour la distinguer à l'époque de la collagénase interstitielle (MMP-1) et la gélatinase A (MMP-2) (Chin *et al.*, 1985). De façon normale, la distribution tissulaire de MMP-3 est très restreinte, et l'enzyme est surtout produite par les macrophages et cellules stromales, telles que les cellules endothéliales, musculaires, et fibroblastiques lorsque stimulées par des agents proinflammatoires tels que le TNF $\alpha$  et l'IL-1 (Chin *et al.*, 1985). La présence d'une bande supplémentaire lors d'analyse de type Southern du gène de MMP-3 a permis d'isoler et de cloner la stromélysine-2 (MMP-10; E.C. 3.4.24.22) (Breathnach *et al.*, 1987). La différence la plus significative entre MMP-3 et MMP-10 se situe au niveau de leur distribution tissulaire et de la régulation de leur expression. L'expression de MMP-10 est moins sensible aux agents inflammatoires (Brinckerhoff *et al.*, 1992), et on peut la retrouver chez certaines populations cellulaires telles que les lymphocytes T (Conca et Willmroth, 1994). MMP-10 peut également être

produite par les kératinocytes en réponse au PMA, au TGF (« Transforming Growth Factor »), et au EGF (« Epidermal Growth factor ») (Nagase *et al.*, 1995). Les protéines de l'ECM telles que l'aggrécan, la fibronectine, la laminine et les collagènes de type III, IV, et X, sont tous susceptibles à la dégradation par MMP-3 et MMP-10. La stromelysine-3 (MMP-11; E.C. non déterminée) fut quant à elle clonée par clonage différentiel d'ARNm isolés de tumeurs mammaires bénignes et malignes (Basset *et al.*, 1990). Contrairement à MMP-3 et MMP-10, la spécificité de cette enzyme est peu connue, et l'enzyme est reconnue comme étant incapable de dégrader les protéines de l'ECM. L'IGFBP-1 (« insulin-like growth factor binding protein ») pourrait représenter un des substrats physiologiques de MMP-11 (Manes *et al.*, 1997). Comme les autres membres de la famille des MMP, les stromélysines peuvent être inhibées par les Timps, les inhibiteurs synthétiques hydroxamiques, et les agents chélateurs.

#### **3.1.4. Les MT-MMP.**

Les membres de ce sous-groupe ont été clonés récemment par des stratégies basées sur l'étude d'homologies de séquences nucléotidiques entre MMP. Les MT-MMP se distinguent par la présence d'un domaine transmembranaire au niveau de leur domaine C-terminal leur permettant ainsi de s'ancrer au niveau de la membrane cytoplasmique (Tokuraku *et al.*, 1994, Will et Hinzmann, 1995; Takino *et al.*, 1995; Puente *et al.*, 1996). Ce sous-groupe comprend jusqu'à maintenant six membres distincts, MT1-MMP à MT4-MMP (MMP-14 à 17, respectivement), et MT5-MMP et MT6-MMP (MMP-24 et MMP-25, respectivement). Leur rôle est peu connu jusqu'à maintenant, mais la présence de MT1-MMP et de MT6-MMP à la surface de plusieurs cellules cancéreuses et leur

capacité à recruter et activer MMP-2 au niveau de la membrane laissent supposer qu'elles pourraient jouer un rôle important dans le potentiel invasif des cellules métastatiques (Velasco *et al.*, 2000).

### **3.1.5 Autres MMPs**

Plusieurs autres membres de la famille des MMP, tels que la matrilysine (MMP-7; E.C. 3.4.24.23), l'élastase des macrophage (MMP-12), et de nouvelles MMP identifiées récemment ont des particularités structurales et fonctionnelles distinctes qui ne permet de les classer dans les sous-groupes ci-haut. MMP-7 a une fourchette de substrat trop vaste et non spécifique pour être catégorisée. En plus de cliver les protéines de l'ECM comme le collagène de type IV, les gélatines de types I, III, IV, et V, la fibronectin, la laminine, l'entactine, l'aggrécan, l'élastine et la tenascine C (Wilson et Matrisian, 1996), elle peut cliver les fibulines 1 et 2, la vitronectine, et le versican, et de nombreuses molécules membranaires, telles que le pro-TNF $\alpha$ , le pro-uPA (« plasminogen activator »), l' $\alpha$ 1-proteinase inhibitor ( $\alpha$ 1-PI), la transferrine, l'insuline, la protéine basique de la myéline (Chandler *et al.*, 1995) et FasL (Powell *et al.*, 1999). Notons enfin que la nomenclature MMP comprend également quelques incohérences, notamment en ce qui a trait à MMP-6 (Wilhelm *et al.*, 1993) et MMP-4 (Overall et Sodek, 1987), reconnues ultérieurement comme étant identiques à MMP-3. Le nombre de membres de la famille des MMP ne cesse de croître, et on rapportait récemment la séquence de MMP-26 (GenBank; No. d'accession : AF291664).

## **3. 2 Le rôle des MMPs dans le cancer.**

Le rôle des MMPs dans le cancer fait l'objet d'une documentation importante, et ce à presque tout les niveaux dans les différents types de cancers (Nelson *et al.*, 2000). Au niveau du lymphome, notre laboratoire a démontré une forte augmentation de la sécrétion de MMP-9 lors du développement de lymphomes thymiques (Aoudjit *et al.*, 1997). Lors de la transfection du cDNA de MMP-9 dans certaines lignées lymphomateuses peu agressives, il y a une nette augmentation du pouvoir tumorigénique de la cellule (Aoudjit *et al.*, 1999). La régulation de MMP-9 dans le lymphome semble se produire au niveau de leur contact avec les cellules endothéliales via ICAM-1 (Aoudjit *et al.*, 1998b). Il a été également démontré que les lymphomes les plus agressifs surexpriment de façon constitutive MMP-9 (Kossakowska *et al.*, 1993; Lalancette *et al.*, 2000; St-Pierre *et al.*, 2000). Inversement, la surexpression des inhibiteurs naturels de MMP (e.g. Timps) produit une diminution du pouvoir métastatique chez la cellule tumorale (Kruger *et al.*, 1997), *ce qui démontre que la dégradation des protéines de la matrice semble jouer un rôle important dans le développement du lymphome.*

### **3. 3 Les inhibiteurs des MMPs : les Timps**

Les MMPs ont leur propre principe de régulation post-traductionnel. Étant dans un contexte dynamique de sécrétion, les Timps sont généralement sécrétés en même temps que les enzymes de dégradation. Leur principe d'inhibition consiste à bloquer le site actif des MMPs dans un rapport stœchiométrique de 1 :1 (Nagase *et al.*, 1999). L'ampleur de l'activité protéolytique sera donc modulée par le déséquilibre du rapport MMP/Timp. Le complexe extracellulaire étant très sensible à la protéolyse, une dégradation de l'inhibiteur favorisera ainsi l'action protéolytique de l'ECM par les MMPs.

Le premier membre de la famille des inhibiteurs de MMP, dont le spectre d'inhibition est très large, est Timp-1, une protéine de 28.5 kd, capable d'inhiber le pouvoir invasif des cellules tumorales, l'angiogénèse, et la métastase lorsque transfectée à des cellules tumorales (Wojtowicz-Praga *et al.*, 1997). Timp-1, inhibiteur dont l'expression est considérée comme inductible, a d'abord été identifié comme un facteur de croissance (Docherty *et al.*, 1985), ce qui laisse croire que les Timps pourraient avoir des fonctions indépendantes de leur pouvoir inhibiteur des MMP (Nagase *et al.*, 2000). Le second membre de la famille est Timp-2, une protéine de 21 Kd partageant 40% d'homologie avec Timp-1 au niveau de la séquence d'acides aminés. Timp-2 ne subit aucune glycosylation au cours de sa maturation. Son action inhibitrice cible autant la forme inactivée et activée de MMP-1, 2 et 9 (Ara *et al.*, 2000). Timp-3 est une protéine de 21 kd inhibant le chémotactisme des cellules endothéliales en réponse au VEGF (« vascular endothelial growth factor ») et bFGF (« basic fibroblast growth factor ») (Sang *et al.*, 1998). Timp-3 se retrouve exclusivement dans la matrice extracellulaire (Anand-Apte B *et al.*, 1996). Finalement, le dernier membre de la famille des Timps, Timp-4 a été cloné que récemment à partir d'une banque de cDNA de tissus cardiaque (Greene *et al.*, 1996). Cette protéine de 22.4 Kd semble également posséder une action anti-angiogénique (Brew *et al.*, 2000). Les Timps donc peuvent réguler la prolifération des cellules endothéliales, la migration cellulaire et la formation angiogénique. L'élastase des leucocytes peut toutefois directement influencer l'activité neutralisante des Timps en dégradant Timp lié à MMP-9, libérant ainsi la forme active de MMP-9 (Itoh et Nagase, 1995). Étant donné que l'élastase des leucocytes peut également convertir la forme

proenzymatique de MMP-9 en forme active, il est logique de supposer qu'il pourrait exister un lien fonctionnel entre MMP-9 et l'élastase des leucocytes *in vivo*. ***Le rôle de l'élastase des leucocytes dans le développement du cancer, y compris le lymphome, demeure toutefois totalement inconnu.***

### **3.4 L'activité élastolytique des MMPs**

Il a été observé que diverses MMPs ont une activité élastolytique (Senior *et al.*, 1991). Kossakowska *et al* (1998) a démontrée que des cellules de lymphome très agressives exprimant de très haut niveau d'expression de MMP-9 pouvaient migrer au travers de disques d'élastine, consistant avec l'idée que MMP-9 possède une activité élastolytique endogène, tout comme MMP-2, MMP-7 et MMP-12 (Senior *et al.*, 1991). Il est possible cependant que cette activité élastolytique puisse être modulée par la présence d'élastase des leucocytes. ***L'objectif principal de ce mémoire vise à étudier cette possibilité.***

## **4.0 Les élastases**

La famille des élastases comprend principalement les élastases pancréatiques (I et II; E.C. 3.4.21.36 et 3.4.21.71, respectivement), MMP-12 (l'élastase des macrophages; E.C. 3.4.24.65), identifiée pour la première fois au niveau fonctionnel par Werb et Gordon (1975), et l'élastase des leucocytes (LE; 3.4.21.37), identifiée au niveau des granules azurophyliques des neutrophiles par Janoff et Scherer (1968).

#### 4.1 L'élastase des leucocytes

L'élastase des leucocytes humains (HLE) a suscité énormément d'intérêt scientifique depuis plus de trente ans à cause de son implication dans diverses pathologies pulmonaires, comme l'emphysème, la fibrose kystique, et l'asthme, de même que dans l'arthrite rhumatoïde (Kidokoro *et al.*, 1977; Suzuki *et al.*, 1995; Doring *et al.*, 1995). Plusieurs équipes ont analysé les principaux médiateurs cellulaires responsables de la sécrétion de HLE ainsi que les principes régulateurs de son activité protéolytique. Une revue des principales propriétés physico-chimiques de HLE, des régulateurs de son activité enzymatique, ainsi que son implication dans les pathophysiologies humaines seront discutés.

#### 4.2 Structure de HLE

HLE est une glycoprotéine de masse moléculaire variant de 29 à 35 kDa selon ses niveaux de glycosylation différentiels aux résidus asparagine 95 et 144 (Sinha *et al.*, 1987). Sa séquence nucléotidique se retrouve sur un gène unique (« single copy gene ») d'environ 6 kb sur locus 11q14. Sa structure est composée de deux résidus basiques qui lui confère une charge nette positive (pI=11.0). HLE est une protéase à serine constituée d'une triade catalytique classique (Ser<sup>102</sup>-Asp<sup>195</sup>-His<sup>57</sup>) typique de la famille S1 du clan des protéases à serine et dont la forme linéaire est constituée d'une chaîne polypeptidique de 218 a.a., et dont la structure tertiaire est stabilisée par quatre ponts disulfures (Sinha *et al.*, 1987; Travis, 1988; Takahashi *et al.*, 1988; Jenne *et al.*, 1994). Toutes les études effectuées par cristallographie (sous une résolution de 1.84 Å) sont basées sur la forme de HLE complexée à son inhibiteur peptidique N-méthoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val

chlorométhyl cétone (MSAAPVCK) (Wei *et al.*, 1988). Ces analyses structurales ont révélé que HLE possède une forme globulaire compacte comprenant deux résidus arginines (de charge positive), pouvant agir comme site de glycosylation, distribués de façon asymétrique sur la surface externe de l'enzyme. Sa structure tertiaire est semblable aux protéases à serine de la famille des chymotrypsines et diffère substantiellement de la structure des élastases pancréatiques (Navia *et al.*, 1989).

### 4.3 Substrats de HLE

Contrairement aux autres protéases, HLE peut solubiliser l'élastine fibreuse, riche en acides aminés non-polaires. L'élastine est une composante importante de la matrice au niveau des poumons, de la peau, des artères, et des articulations. HLE peut également dégrader la fibronectine (McDonald *et al.*, 1980), des protéoglycans (Janoff *et al.*, 1976) et du collagène de type I et III (Kafienah *et al.*, 1998; Gadek *et al.*, 1980, Mainardi *et al.*, 1980). La gamme de substrats de HLE s'étend aussi pour divers facteurs solubles comme les IgG (Solomon *et al.*, 1978), C3b et C5b (Taylor *et al.*, 1977), IL-2 (Ariel *et al.*, 1998) IL-8 (Leavell *et al.*, 1997), et divers facteurs de coagulation comme le plasminogène (Moroz *et al.*, 1981) et le fibrinogène (Plow, 1980). De plus, des récepteurs de surfaces sont également clivés par HLE dont CD4 et CD8 (Doring *et al.*, 1995), CD16 (Tosi et Berger, 1988), CD43 et PSGL-1 (Remold-O'Donnell *et al.*, 1995), le récepteur de la thrombine (Renesto *et al.*, 1997), le récepteur du fibrinogène : l'intégrine  $\alpha\text{IIb}\beta_3$  (Si-Tahar *et al.*, 1997). HLE participe aussi à l'activation des enzymes de dégradation des MMP par la dégradation de certains inhibiteurs dont Timp-1 (Itoh et Nagase, 1995). Notre laboratoire a également démontré que HLE interfère avec l'adhésion intercellulaire par le

clivage d'ICAM-1 (Champagne *et al.*, 1998). *Le répertoire de molécules sensibles au clivage par HLE inclut donc un nombre importants de molécules de l'ECM, et de récepteurs membranaires ou cytokines normalement impliquées dans la réponse anti-tumorale.*

#### **4.4 Régulation de l'activité enzymatique de HLE**

HLE étant une enzyme de classe très réactive (protéase à serine) et ayant un spectre de substrats très large, sa régulation doit être stricte et efficace, d'où l'existence d'une multitude d'inhibiteurs que l'on retrouve non seulement dans le plasma sanguin mais également au niveau intracellulaire. L' $\alpha$ 1-antitrypsine ( $\alpha$ 1-AT) et l' $\alpha$ 2-macroglobuline ( $\alpha$ 2-MG) sont considérées comme les deux principaux inhibiteurs plasmatiques de HLE (Robert *et al.*, 1995). L' $\alpha$ 1-AT, membre des SERPINS (« serine protease inhibitors ») possède une affinité élevée pour HLE puisque sa liaison implique deux liens ioniques, permanents et stables. L' $\alpha$ 2-MG est un inhibiteur tétramérique moins usuel de très haute masse moléculaire (720 kDa), formé de quatre sous-unités identiques emprisonnant HLE entièrement au lieu de spécifiquement bloquer le site actif rendant l'accès au substrat impossible (Robert *et al.*, 1995). Parmi la gamme des inhibiteurs de HLE, la littérature rapporte aussi le SLPI (11.7 kDa; « secretory leukocyte protease inhibitor »). Cet inhibiteur est présent dans les sécrétions de glandes parotides humaines, dans les tissus cartilagineux, les voies pulmonaires supérieures, et le cytosol des neutrophiles (Thompson *et al.*, 1986; Ohlsson *et al.*, 1986; Sallenave *et al.*, 1997). Un inhibiteur de faible masse moléculaire (7 kDa) a également été isolé à partir d'éruptions cutanées de patients atteint de psoriasis (Wiedow *et al.*, 1990). Cet inhibiteur a la particularité d'être

très spécifique à HLE puisqu'il s'est avéré inefficace dans l'inhibition d'autres sérines protéases de la même famille (S1), telles que la cathepsine G, la trypsine, l' $\alpha$ -chymotrypsine, et la plasmine. Son nom lui revient donc de sa spécificité pour l'élastase : Élafin.

#### **4.5 Forme membranaire de HLE**

Bien que HLE soit considérée avant tout comme une protéase soluble, diverses formes membranaires de HLE ont été mises en évidence à la surface des leucocytes. Les récepteurs, tels que Mac-1 (Wright *et al.*, 1996) et le facteur X (Altieri *et al.*, 1988), peuvent se lier de façon non-covalente entre HLE, tout en lui permettant de maintenir son activité enzymatique. De plus, l'association de HLE à la surface cellulaire empêche, par encombrement stérique, l'effet inhibiteur de molécules de taille imposante comme  $\alpha$ 1-AT, alors que des inhibiteurs de plus faible masse comme l'élafin ou le polypeptide MSAAPVCK gardent une certaine activité inhibitrice. La liaison de HLE à la membrane cellulaire serait donc une stratégie d'évitement des inhibiteurs au niveau biologique (Owen *et al.*, 1995).

#### **4.6 Régulation transcriptionnelle de HLE : Implication de PU.1.**

La régulation transcriptionnelle du gène codant pour LE implique surtout PU.1, une protéine intracellulaire retrouvée exclusivement chez les cellules de souche B et hématopoïétique. Membre de la famille des protéines ETS, elle possède un site de reconnaissance spécifique (5'GAGGAA3') pour sa liaison à l'ADN. Cette protéine possède trois portions distinctes : la portion N-terminale, acide et riche en glutamine;

le domaine C-terminal, qui comprend le site de liaison avec l'ADN; et finalement, toujours en C-terminal, un domaine de transactivation nommé PEST (« Pro-Glu-Ser-Thr ») (Lloberas, 1999). PU.1 est un site d'initiation transcriptionnel pour plusieurs gènes chez les cellules B et de la moelle osseuse, notamment les gènes des Ig (les chaînes légères  $\kappa$  et  $\lambda$ ; la chaîne lourde  $\mu$ , et la protéine MD1 associée à la protéine RP105 dans les lymphocytes B), des récepteurs spécifiques des Ig (FC $\gamma$ RI et FC $\gamma$ RIIIa, et les récepteurs du complément CR3 et CR4), des récepteurs de facteurs de croissance, tels que GM-CSF, G-CSF et M-CSF, des récepteurs « scavenger » type I et II, et les récepteurs de mannose. PU.1 régule aussi l'expression de plusieurs autres protéases extracellulaires, dont la protéinase 3 (E.C. 3.4.21.76), la cathepsine G (E.C. 3.4.21.20), et MMP-9 (Harendza *et al.*, 2000). L'activité de PU.1 est modulable par l'interaction avec d'autres facteurs de transcription. Ses résidus en position 148, lorsque phosphorylés, se complexeront avec diverses autres protéines intracellulaires afin d'augmenter son induction sur l'ADN. En effet, sa liaison avec une protéine sp1 augmente l'induction du gène de 5 fois. Une seconde complexation de PU.1 avec une protéine de la famille des ETS, la ETS-Like-Protein-1 (ELP-1), augmentera de 31 fois l'action de PU.1 (Shang *et al.*, 1999). *Bien que la régulation transcriptionnelle de LE est relativement bien connue au niveau des myélocytes et des neutrophiles, sa régulation au niveau des lymphocytes T, et plus particulièrement au niveau des lymphocytes B transformés, demeure toutefois inconnue.*

## 5.0 Hypothèse de travail :

Diverses observations circonstancielles associent LE avec le cancer, plus particulièrement au niveau du lymphome : 1) les lymphomes agressifs expriment une activité élastolytique accrue leur permettant de migrer à travers une matrice d'élastine (Kossakowska *et al.*, 1998); 2) LE peut directement ou indirectement participer à l'activation de MMP-9, un membre de la famille des MMP connu pour son rôle dans le développement du cancer et de la métastase, notamment au niveau du lymphome, et 3) LE peut interférer avec la réponse anti-tumorale en clivant les molécules clés impliquées dans la réponse immunitaire, telles que CD2, CD4, CD8, IL-2, IL-8, et ICAM-1. Dans le travail qui suit, nous avons étudié le rôle de LE dans le développement du lymphome. Pour ce faire, nous avons : 1) étudié la capacité de LE à se lier à la surface des lymphomes, 2) identifié un nouveau récepteur de surface impliqué dans cette liaison membranaire, 3) examiné l'expression de HLE chez des lymphomes non-Hodgkin, 4) étudié la régulation transcriptionnelle de l'expression de HLE dans une lignée de lymphome de Burkitt, et finalement 5) déterminé le rôle de LE à l'intérieur d'un modèle expérimental basé sur celui développé par Kaplan. Les résultats de ces recherches sont rapportés dans le manuscrit ci-joint.

## Chapitre 2

**Objet: ms submission - J0101-016**

**Date:** Sat, 13 Jan 2001 13:19:36 -0500

**De:** Journal of Leukocyte Biology <jleukbio@gscyclone.com>

**A:** Yves.st-pierre@inrs-iaf.quebec.ca

J0101-016

Dr. Yves St-Pierre

Human Health Research Center

INRS-Institut Armand-Frappier

531 Boul Des Prairies

Laval, Quebec, CANADA H7V 1B7

450-686-5354 fax 450-686-5501 Yves.st-pierre@inrs-iaf.quebec.ca

"Leukocyte elastase in murine and human non-hodgkin lymphomas"

Your manuscript has been received for consideration in the **Journal of Leukocyte Biology**. Please refer to the above number with any correspondence regarding your manuscript. **Please note, as per the information to authors, neither your manuscript nor your figures will be returned following review.**

We are happy that you have elected to submit your research work to the **Journal of Leukocyte Biology** for possible publication. I have forwarded your manuscript on for the Editorial Board review process, and hope to have their recommendations within about six weeks of submission.

Thank you for your interest. If you have any questions, feel free to contact me or my Managing Editor, Amy H. Imming, by e-mail at jleukbio@gscyclone.com or by FAX at (301) 371-7757.

Sincerely,

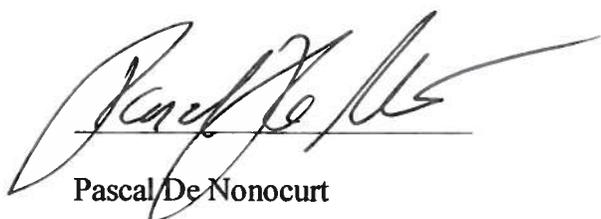
Joost J. Oppenheim, M.D.  
Editor-In-Chief  
**Journal of Leukocyte Biology**  
103 Baughman's Lane, #289  
Frederick, MD 21702

## PARTICIPATION DES AUTEURS

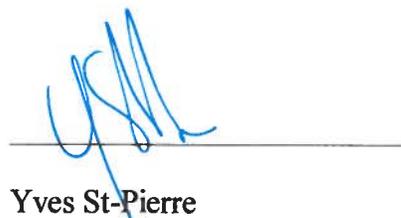
Pascal De Noncourt, premier auteur de l'article intitulé « Leukocyte Elastase in Murine and Human Non-Hodgkin Lymphomas » a effectué toutes les manipulations (analyses FASC, Immunobuvardage, RT-PCR) ayant mené aux résultats des figures 1 à 4.

L'élaboration des clones 718 a été effectuée par Monsieur Olivier Robledo. M. Tommy Alain, les docteurs Anna E. Kowsakowska et Stefan Urbanski ont procédé aux l'analyses de l'expression de l'élastase des leucocytes par immunohistochimie chez différents lymphomes humains.

Les Drs Yves St-Pierre et Edouard F. Potworowski ont supervisé le projet et ont contribué à le mener à terme par leurs judicieux conseils et leur expertise technique.



Pascal De Noncourt



Yves St-Pierre

**Leukocyte Elastase in Murine and Human Non-Hodgkin Lymphomas\***

**Short title:** Leukocyte Elastase in Lymphomas.

**Scientific Section Heading:** NEOPLASIA

Pascal De Noncourt<sup>1</sup>, Olivier Robledo<sup>1</sup>, Tommy Alain<sup>2</sup>, Anna E. Kossakowska<sup>2</sup>,  
Stefan J. Urbanski<sup>2</sup>, Edouard F. Potworowski<sup>1</sup>, and Yves St-Pierre<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Human Health Research Center, INRS-Institut Armand-Frappier, University of Quebec,  
Laval, Québec, CANADA

<sup>2</sup> Department of Pathology, University of Calgary and Calgary Laboratory Services,  
Calgary, Alberta, CANADA

\* **Footnote:** This work was supported by grants from the Medical Research Council of Canada (E.F.P. and Y.S.P) and the Fonds pour la Formation de Chercheur et d'Aide à la Recherche (F.C.A.R) (YSP). Y.S.P is a F.R.S.Q. scholar. P.D.N. is supported by a studentship from La Fondation Armand-Frappier.

<sup>4</sup> **Address correspondence to:**  
Yves St-Pierre, Ph.D.  
Human Health Research Center  
INRS-Institut Armand-Frappier  
531 Boul. Des Prairies,  
Laval, Québec, CANADA H7V 1B7  
Fax : 450-686-5501  
Phone : 450-686-5354  
E-mail : yves.st-pierre@inrs-iaf.quebec.ca

**Word Count :** 4 018 words.

## ABSTRACT

Extracellular proteases are clearly involved in the development of cancer. To date, however, most of the attention has been focused on members of the family of matrix metalloproteinases. There is increasing evidence that other proteases may also be involved in cancer. High grade lymphomas, for instance, express elevated levels of elastolytic activity. Leukocyte elastase (LE) is a prime candidate for an important role in the development of lymphoma because of its capacity to cleave a large number of molecules involved in the immune recognition of tumor cells, as well as its ability to cleave proteins of the extracellular matrix. To date, however, there has been no evidence that leukocyte elastase can be expressed in lymphoid neoplasms. In the present work, we show not only that lymphoma cells can express LE, but also that this expression is closely regulated by cytokines, most notably IL-6 and IL-13. We also show that induction of LE mRNA was concomitant with that of MMP-9, that lymphoma cells could recruit soluble LE at its surface, and that transfection of ICAM-1 gene in lymphoma cells increased their ability to bind LE. In addition, LE and IL-13 transcripts were detected in several non-Hodgkin lymphoma. Immunohistochemical staining confirmed expression of LE within the lymphoid tumors. Given the wide spectrum of key molecules that can be cleaved by LE, and the fact that LE and MMP-9 are concomitantly expressed in lymphoma, the present work opens the way to a wider scope of potential targets for anti-tumor agents.

**Corresponding author's e-mail:** [yves.st-pierre@inrs-iaf.quebec.ca](mailto:yves.st-pierre@inrs-iaf.quebec.ca)

## INTRODUCTION

The phenomenon of metastasis requires extensive phenotypic changes within the tumor cells at the primary site. They must detach from the primary tumor, enter the blood circulation, resist hemodynamic shearstress of the blood circulation, home to the target organ, and successfully extravasate. All tumor cells do not necessarily undergo uncontrolled division to form secondary tumors once they have « homed » to a target site: One of the major rate-limiting steps in metastasis is the ability of the extravasated tumor cells to find an appropriate "nest" (this process is referred herein as « nidification »), with favorable growth conditions. Only these cells which have successfully completed nidification will undergo massive proliferation and form a secondary tumor. Nidification is facilitated when tumor or peritumoral cells produce specific proteases, which degrade structural proteins of the extracellular matrix. In fact, among the key candidate genes known to confer metastatic behavior to tumor cells are those which encode for members of the matrix metalloproteinase (MMP) family of enzymes (1). In human high grade non-Hodgkin's lymphomas (NHL), for instance, there is a correlation between the level of expression of MMP-9 and the clinical aggressiveness of malignant lymphomas (2). Moreover, overexpression of MMP-9 by gene transfer in lymphoma increases their tumorigenicity (3).

The expression of MMP by tumor cells at late stages of metastases is thought to occur during contact with the vascular endothelium via cell adhesion molecules (4-6). Our recent finding that the vascular endothelial cell adhesion molecules ICAM-1 controls the production of MMP-9 in lymphoma cells (4) and that ICAM-1-deficient mice are resistant to the spread of lymphoma (7) indicate a strong relationship between adhesion molecules

and extracellular proteases. The MMPs, however, are not the only extracellular proteases that could be involved in lymphomas. Cathepsins and leukocyte elastase (LE), two extracellular proteases expressed in normal leukocytes, are among the key candidates that could modulate the spread of lymphoma cells. Although the pathophysiological role of these enzymes, most notably LE, has been well-documented in pulmonary disorders such as emphysema and cystic fibrosis (8), never has a participation of LE in cancer been established.

Several studies support the hypothesis that LE could be involved in metastases, most notably during the spread of lymphoma cells to peripheral organs. Not only can LE cleave cell surface ICAM-1 (9), it can also directly influence the architecture of target organs by degrading components of the extracellular matrix. Kossakowska et al., (10) have reported that cells isolated from aggressive non-Hodgkin's lymphomas, but not those isolated from hyperplastic tonsils, had an increased ability to penetrate a physical barrier constituted of elastin. LE could also indirectly affect remodeling of the extracellular matrix at late stages of metastasis by activating MMP-9 (11), or degrading TIMP-1 complexed with active MMP-9 (12). LE can also degrade IL-2 to yield IL-2 polypeptides that inhibit IL-2-induced release of lymphoid cells from laminin, Collagen IV, and fibronectin (13). Moreover, the impact of LE in lymphomas could well go beyond its ability to enhance the migration of tumor cells through the extracellular matrix; apart for cleaving ICAM-1, LE has also been shown to cleave a number of regulators of the anti-tumoral response, such as IgG, CD4 and CD8 (14). The fact, however, that aggressive lymphomas express high levels of MMP-9, an enzyme with an intrinsic elastolytic activity (15), implies that the ability of lymphoma cells to penetrate through the elastin barrier may not necessarily be

mediated through the secretion of LE. In the present work, we thus sought to determine if LE is expressed in lymphoma cells and tissues, and how this expression is regulated.

## MATERIAL AND METHODS

### *Mice*

C57BL/6-ICAM-1-deficient mice (C57BL/6<sup>tm1jegr</sup>) carrying a deletion mutation in the fourth exons of the ICAM-1 gene (16) was bred in our animal facility and maintained under specific pathogen-free conditions and in accordance with institutional guidelines. These mice do not express the common form of ICAM-1 but do express a limited repertoire of minor isoforms generated by alternative splicing (17).

### *Reagents and Abs*

Purified human LE was obtained from Calbiochem (La Jolla, CA). Sputum samples of patients with cystic fibrosis containing high concentrations of human LE were also used as a source of human LE for some experiments. The samples were prepared as previously described (9). The rat anti-mouse ICAM-1 mAb YN-1 was purified from hybridoma culture supernatants by chromatography on protein G-Sepharose (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ) using standard protocols. Detection of YN-1 binding was carried out using a phycoerythrin (PE)-conjugated donkey anti-rat antibody (Jackson Immunoresearch Laboratory, Mississauga, ON). The biotinylated 3E2 anti-mouse ICAM-1 mAb was obtained from Pharmingen (San Diego, CA). Mouse monoclonal IgG1 specific for human LE was obtained from Calbiochem (La Jolla, CA). Biotinylated anti-mouse IgG

(Fc specific) was obtained from Sigma (St.Louis, MO). Streptavidin-PE was obtained from Beckman-Coulter (Ville St-Laurent, QC). Recombinant cytokines IL-3, IL-5, IL-6, IL-11, and IL-13 were obtained from R&D Systems (Mineapolis, MN). pBK-RSV vector was obtained from Stratagene (La Jolla, CA).

#### *Culture of cell lines*

The mouse T lymphoma cell lines 267 and 718 were established in our laboratory from radiation-induced T cell lymphomas in C57BL/Ka and ICAM-1-deficient mice respectively, as previously described (3). Consequently, the 267 cells expressed the common form of ICAM-1 on its surface while the 718 cells only expressed a low but detectable level of ICAM-1 isoforms (3, and data not shown). Both cell lines expressed surface T cell receptors, CD90, CD102 (ICAM-2), and CD31. The human Burkitt's lymphoma Raji cell line was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). All cells were maintained in culture using RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS, 2 mM glutamine, 10 mM HEPES and antibiotics (complete medium).

#### *Transfection of ICAM-1 in 718 lymphoma cells.*

To restore the expression of ICAM-1 in 718 cells, the cDNA encoding the common form of murine ICAM-1 was subcloned into the SR $\alpha$  eukaryotic expression vector (kindly provided by Dr. François Denis, INRS-Institut Armand-Frappier). The 718 lymphoma cells were transfected using Superfect (Stratagene, La Jolla, CA) according to the manufacturer's instructions. Stable cell lines expressing distinct ICAM-1- levels were

established using puromycin selection. The ICAM-1 expression was assessed by flow cytometry, using the biotinylated 3E2 anti-ICAM-1 mAb and streptavidin-PE.

*Binding of LE to the surface of lymphoma cells.*

Aliquots of  $3-4 \times 10^5$  lymphoma cells were transferred to 96-wells plates and washed twice with serum-free RPMI medium. The cells were then incubated at 37°C with the indicated concentrations of purified recombinant human LE or dilutions of LE-containing human sputum. After washing with PBS, LE binding was measured by flow cytometry using LE-specific antibodies, biotinylated anti-mouse IgG, and SA-PE. Controls included cells incubated sequentially with LE, with the anti-mouse IgG, and with SA-PE.

*Flow cytometry.*

Cells were stained at 4°C and washed with PBS containing 0.5% BSA and 0.2% sodium azide (PBA). Prior to staining, cells were incubated with 10µg/ml of human IgG (Sigma) for 20 min at 4°C to block non-specific binding. Fluorochrome- or biotin-labeled mAbs were then added at appropriate concentrations and incubated for another 20 min. Cells were then washed four times with PBA. For indirect staining with streptavidin-Red 670 (GIBCO-BRL), cells were washed three times following the reaction with the first mAb and then incubated 20 min on ice with the fluorescent conjugate. Results shown are representative of at least three independent experiments. Flow cytometric analyses were performed on  $1-5 \times 10^5$  events using a Coulter XL-MCL™ flow cytometer (Coulter Electronics, Hialeah, FL), and recorded on a logarithmic scale.

### *Stimulation of Raji cells*

Raji cells were cultured at  $10^7$ /ml in serum-free RPMI medium for 12 hours in the presence or absence of PMA (Sigma), 50 nM; db-cAMP (Sigma), 1 mM, or with recombinant cytokines, i.e. IL-3, 10 ng/ml; IL-5, 10 ng/ml; IL-6, 100 ng/ml; IL-11, 10 ng/ml and IL-13, 100 ng/ml. Cells were then centrifuged and the pellets were frozen for RNA extraction.

### *Lymphoma specimen collection*

Non-Hodgkin lymphoma tissue samples in excess of that needed for diagnostic purposes were received in the Department of Pathology at the Foothills Hospital (Calgary, AB), snap-frozen in liquid nitrogen and kept at  $-70^{\circ}\text{C}$ . The cases were classified according to the REAL Working Formulation (18). All, except case 11, were of B-cell origin. Case 11 represents a large T-cell lymphoma. Cases: 6, 8, 13, 14, 16 and 18-32 were large B-cell, aggressive lymphomas. Cases 1 and 10 were small lymphocytic indolent lymphomas. Cases 2 and 3 were low grade, follicular lymphomas. Case 4 was a mantle cell lymphoma. Cases 12 and 15 represented angioimmunoblastic lymphadenopathy, which are not lymphomas. RNA extraction and reverse-transcription were carried out as previously described, using the acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction method and the Superscript RT RNase H-RT (GIBCO-BRL), as previously described (10).

### *RNA isolation and analysis*

Unless otherwise indicated, total cellular RNA was isolated using the Trizol reagent (GIBCO-BRL) according to the manufacturer's instructions. First strand cDNA was prepared from total cellular RNA using the Superscript RT RNase H-RT. After reverse

transcription, PCR amplification was carried out using the PCR core kit (Boehringer Mannheim, Laval, Que.) with specific primers for LE, human MMP-9 (10), IL-13 (19),  $\beta$ -actin (Stratagene, La Jolla, California), and GAPDH (Kindly provided from Dr Daniel Oth, INRS-Institut Armand-Frappier) (see Table I). The design of human LE-specific primer pairs was carried out using DNA sequences obtained from Genbank (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD) and chosen to have an approximately 50% GC content. The sense and antisense primers were located in exons III and V respectively. Thirty cycles of amplification were performed in a MJ Research Thermal cycler (model PTC-100TM) Each cycle of amplification consisted of a denaturing step at 94°C for one min, a primer annealing step at 60°C for two min, and a strand elongation step at 72°C for one min. The amplification for each gene was in the linear curve. Five to fifteen  $\mu$ l of the reaction mixture was size-separated on a 1.5% agarose gel, and specifically amplified products were detected by ethidium bromide staining and ultraviolet transillumination. Loading was equalized to the internal control mRNA (GAPDH or  $\beta$ -actin). Semi-quantitative analysis was carried out using a computerized densitometric imager (BioRad, model GS-670, Mississauga, Ont.).

## **RESULTS**

### *Binding of human LE to the surface of lymphoma cells.*

Since freshly isolated lymphoma cells have an intrinsic elastolytic activity (10), and LE has been shown to bind cell surface receptors on leukocytes via the integrin receptor CD11b/CD18 (20), we first sought to determine whether LE could bind to the membrane of T lymphoma cells, even though these lymphoma cells do not express detectable levels

of this integrin (21, and unpublished observation). For this purpose, 267 lymphoma cells were incubated with various concentrations of purified human recombinant LE, and the binding was measured by flow cytometry using specific anti-human LE monoclonal antibodies. Our results showed that LE can bind to the surface of lymphoma cells on a dose-dependent pattern (Figure 1a). The binding was time-dependent (Figures 1b), and was found to be reversible (Figure 1c), having reached a peak within 30 min. Moreover, the kinetic of de-binding correlated with the increase proteolytic activity in the supernatant, indicating that LE released from the cell surface remained proteolytically active. Similar results were obtained using natural LE using sputum of patients with cystic fibrosis (data not shown). All subsequent binding assays were thus performed at 37°C for 30 min using recombinant LE.

*Binding of LE to the surface of lymphoma cells correlates with ICAM-1 levels.*

Considering the fact that LE has been shown to cleave ICAM-1 (9), and that high concentrations of soluble ICAM-1 are found in patients with malignant lymphomas (22), it became pertinent to determine whether the level of expression of ICAM-1 could influence the binding of LE at the surface of lymphoma cells. To test this hypothesis, we compared the binding of LE on ICAM-1-deficient and ICAM-1-expressing lymphoma cells. The ICAM-1-deficient lymphoma 718 cell line was generated from a radiation-induced thymic lymphoma isolated from C57BL/6-ICAM-1-deficient mouse (C57BL/6<sup>tm1jegr</sup>) (17), while the 718-derived clones expressing different levels of the common form of ICAM-1 were obtained upon gene transfer of the cDNA encoding the common form of murine ICAM-1. Our results showed that binding of LE was significantly increased on the surface of clone 70, expressing high levels of ICAM-1 (Figure 2). Binding of LE on clone 36, expressing

intermediate levels of ICAM-1, was also higher than that observed on the 718 parental cell line, indicating that increased binding of LE correlated with the expression of ICAM-1 on the cell surface of lymphoma cells. Pre-incubation of lymphoma cells with saturating concentrations of murine ICAM-1-specific mAbs YN-1, capable of inhibiting LFA-1 binding to ICAM-1, did not decrease LE binding (data not shown). These results suggest that the capacity of lymphoma cells to recruit LE on their surface is dependent on their level of expression of ICAM-1.

*LE expression by lymphoma cells.*

The above results showed that ICAM-1 expressed at the surface of lymphoma cells could recruit LE secreted in the extracellular space. Although expression of LE had almost exclusively been associated with cells of the monocytic lineage, we next investigated whether LE could be expressed in lymphoma cells as well, and whether cytokines, previously shown to modulate the expression of MMPs in lymphoma cells (10), could modulate LE expression. Using the Raji lymphoma cells, we found no, or only very weak, expression of LE in resting lymphoma cells. However, exposure of lymphoma cells to IL-6, and even more so IL-13, strongly induced the expression of LE (Figure 3). The upregulation of LE expression was concomitant with that of MMP-9, suggesting that LE and MMP-9 are transcriptionally associated. This hypothesis was supported by the fact that: 1) IL-6 also upregulated LE and MMP-9, although the increase in the latter case was more modest; 2) induction of MMP-9 and LE were induced by PMA as well as by cAMP, both activators of PKC and PKA enzymes respectively. Taken together, these results

showed that lymphoma cells can express LE upon stimulation with cytokines, and that this upregulation was concomitant with that of MMP-9.

*Expression of IL-13 and LE in human lymphoma tissues.*

Since IL-13 was a strong inducer of LE and MMP-9, and that both are expressed at high level in human lymphomas, we proceeded to determine whether IL-13 was expressed in human NHL. Previous studies have indeed showed that IL-13 expression was found in cases of Burkitt's lymphomas (23). We thus analyzed by RT-PCR the expression of IL-13 in NHL tissues and found evidence of its expression at different levels in the majority of NHL cases of B- or T-cell origin (Figure 4). The strongest expression of IL-13 was found in a peripheral, large T-cell lymphoma (Case 11).

In the next series of experiments, we sought to determine whether expression of LE could be found within lymphoma tissues. To date, no studies have reported such expression of LE in lymphoma tissues. For this purpose, we performed RT-PCR analyses on cDNA generated from RNA extracted from different cases of human NHL. Among the panel we tested, we found that LE was expressed in five cases (Figure 4), all of which were high grade NHL, although not all aggressive NHL expressed LE. Case 11 had the highest expression level of LE; this case was a peripheral T-cell non-Hodgkin's lymphoma, large cell type. The other positive cases expressing intermediate LE levels were aggressive, high grade lymphomas of B-cell origin.

We next investigated the expression of LE at the protein level in lymphoma tissue. Figure 5a shows a low power view of a large cell, peripheral T-cell non-Hodgkin's lymphoma where LE expression was found to be present within the tumor. The blue area

represents residual normal lymphoid follicle where no staining of LE could be detected. Figure 5b shows high magnification of the cells expressing HLE. Small (reactive) lymphocytes do not appear to express HLE.

## DISCUSSION

In the present work, we have shown that: 1) LE exhibits specific, saturable and reversible binding to the surface of lymphoma cells, 2) transfection of ICAM-1 into lymphoma cells increases their ability to bind LE, 3) evidence of LE expression was found in aggressive human malignant non-Hodgkin's lymphomas of both T and B-cell origin, 4) LE expression can be induced in lymphoma cells upon exposure to cytokines, most notably IL-13, 5) induction of LE is concomitant to that of MMP-9, 6) IL-13 is expressed in many subtypes of NHL, and 7) evidence of LE expression can be found at both mRNA and protein levels in human NHL tissues.

To our knowledge, the present study is the first to address directly the expression of leukocyte elastase in tumors. The importance of extracellular proteases, such MMPs, has been well recognized at different stages of tumor development, or during the spread of tumor cells to the periphery. A first indication that elastolytic activity plays a role in lymphoma was reported in a previous study showing that lymphoma cells had the ability to penetrate through a elastin-rich matrix *in vitro*, suggesting that lymphoma cells possess an intrinsic elastolytic activity (10). We propose that this elastolytic activity results from the upregulation of LE expression by the lymphoma cells. Our *in vitro* data established clearly that lymphoma cells have the ability to express LE upon exposure to specific cytokines,

such as IL-6 and IL-13, which we found to be expressed in NHL. Alternatively, lymphoma cells may use their ability to recruit, via ICAM-1, soluble forms of LE released in the extracellular space by peritumoral cells, most notably those of the monocytic lineage, such as PMN, macrophages, or lymphocytes. Indeed, there is increasing evidence that peritumoral cells contribute significantly to the local production of extracellular proteases, thereby favoring tumor growth (24-26).

We found that IL-13 induced the expression of both LE and MMP-9 in Raji cells. Such a concomitant expression of both these proteases was also observed upon exposure to IL-6, suggesting that both LE and MMP-9 genes could share common transcriptional regulatory elements in their promoters. One candidate is PU.1, a transcription factor of the ets family present in B-cells and macrophages that has been shown to regulate the expression of LE and MMP-9 in monocytes and lymphocytes (27, 28). PU.1 involvement is supported by the fact that IL-13-mediated signals in B lymphocytes, such as those leading to the Ig heavy chain class switching to IgE, involves PU.1, in cooperation with STAT6 (29). However, there is also an argument against this possibility, namely the recent observation that PU.1 is part of a silencing sequence located in the promoter of gelatinase A (30). This enzyme, a member of the gelatinase subfamily of MMPs with structural and functional homology with MMP-9, has also been implicated indirectly in the invasive behavior of lymphomas (10). Furthermore, the fact that intracellular signals mediated through the IL-6 receptor seem to be intact in PU.1-deficient mice also suggest that other pathways may be involved in the activation of LE by these cytokines. A second candidate is the GABP, a heteromeric transcription factor complex that consists of GABP alpha, an ets factor, and GABP beta, a Notch-related protein. The binding of the GABP

protein to LE promoter ets site strongly activates its expression alone and in cooperation with the transcription factors c-Myb and C/EBP (31). Future experiments using reporter constructs containing promoter elements of both MMP-9 and LE genes will be needed to answer this question.

We found no direct correlation between the expression of IL-13 and that of LE. This was expected in cases where LE expression was not accompanied by IL-13 expression, since LE could also be upregulated upon stimulation by other cytokines often expressed in malignant lymphomas, such as IL-6 (10). In cases where we found no detectable LE expression in presence of IL-13, we could envisage that upregulation of LE by IL-13 was inefficient because of inappropriate numbers of functional cell surface receptors at that stage of the tumor development, as discussed above. IL-13 could, however, induce the secretion of LE by peritumoral cells, which can be recruited at the surface of lymphoma cells via their receptors, most notably ICAM-1. If so, it is likely that the expression of elastolytic activity would not be restricted to lymphomas, but could also be implicated in other types of cancer associated with a density of ICAM-1 adhesion molecules at their surface, such as melanoma (32). Although ICAM-1 has been shown to act as an accessory molecule in the killing of tumor cells by CTL or NK (33-35), our data could provide an alternative explanation for the association of ICAM-1 with poor prognosis in stage I tumors and for inhibition of experimental metastasis by melanomas by interfering with its expression (33).

Our study is the first to report the upregulation of LE expression upon exposure to IL-13 or IL-6. Interestingly, there has been an increasing number of studies pointing out to a possible role of IL-13 in tumor development, most notably lymphomas. Using cDNA

microarrays, Kapp et al., (23) found that IL-13 was highly expressed in Hodgkin's disease (HD)-derived cell lines. Although the authors concluded that the expression of IL-13 seemed to be restricted to HD lymphomas, our results clearly show that IL-13 can also be expressed in NHL cases, including T-cell lymphomas. The same study by Kapp *et al.* reported that *in situ* hybridization of lymph node tissue from HD patients showed that elevated levels of IL-13 were specifically expressed by Hodgkin/Reed-Sternberg (H/RS) tumor cells, and that neutralizing antibodies to IL-13 inhibited the proliferation of these cells, indicating that IL-13 could have multiple role in lymphomas. Moreover, Riemann *et al.*, (34) had previously shown that IL-13 up-regulated protein expression as well as enzymatic activity of aminopeptidase N and dipeptidylpeptidase IV, two transmembrane type II molecules thought to be involved in metastasis. Experimental studies using gene transfer strategies or genetically-engineered mouse models should help to determine the molecular mechanisms controlled via IL-13, that contribute to the aggressiveness of lymphoma cells.

We have clearly established that LE can be expressed by lymphoma cells or can be recruited to its surface via ICAM-1 when found in its soluble form. The molecular mechanisms by which LE could modulate the development of lymphoma is as yet unknown, but is likely to involve local extracellular matrix remodeling and/or protection from the anti-tumoral response. Experiments using gene transfection could help to resolve that question, although constitutive expression of high levels of LE in murine lymphoma cells is difficult to obtain (De Noncourt et al., unpublished observations). To date, however, our experiments using lymphomas transfected with a cDNA encoding LE have shown that transfection of LE in lymphoma cells did not have any significant effect on

their growth after their intrathymic injection (data not shown), as we had previously observed in the case of MMP-9 transfection (3). This would suggest that the biological role of LE in lymphomas could be distinct from that of MMP-9, and that the elastolytic activity of MMP-9 is different from that of LE. This would be consistent with our previous observations showing that only LE, but not MMP-9, even at high concentrations, can cleave ICAM-1 (9). Since LE can bind to ICAM-1, and cleave several key receptors involved in the recognition of tumor cells, it will be important to determine whether increased binding of LE on lymphoma cells can alter their recognition by anti-tumoral cells. The use of genetically-engineered mouse models with altered LE gene expression will help to better understand its role in lymphomagenesis.

Phylogenetic studies have shown that LE is a member of a separate branch (Class 6) of serine proteases that are expressed by cells of the immune system, and that clearly differs from that of well-known digestive enzymes such as trypsin, chymotrypsin, and pancreatic elastase (35). Cytogenetic positioning studies have shown that class 6 enzymes are disseminated in three main multigene clusters. In the case of the LE gene, it is co-localized with azurocidin and proteinase 3 within an approximately 50-kb cluster on human chromosome 19, sharing strong homology in terms of exon-intron organization and transcriptional orientation (36). Since all three genes are often expressed coordinately, it will thus be interesting to test in the future the role of other members of the class 6 enzymes in the development of lymphoid and myeloid neoplasia.

**ACKNOWLEDGMENTS:**

We would like to thank Ms. Doris Legault, Claire Beauchemin, and M Marcel Desrosiers for their excellent assistance, and Dr. André Cantin (University of Sherbrooke) for providing sputum samples.

**REFERENCES:**

1. Crawford HC, Matrisian LM. Tumor and stromal expression of matrix metalloproteinases and their role in tumor progression. *Invasion Metastasis*. 1994-95;14:234-245.
2. Kossakowska AE, Urbanski SJ, Watson A, Hayden LJ, Edwards DR. Patterns of expression of metalloproteinases and their inhibitors in human malignant lymphomas. *Oncol Res*. 1993;5:19-28.
3. Aoudjit F, Masure S, Opdenakker G, Potworowski EF, St-Pierre Y. Gelatinase B (MMP-9), but not its inhibitor (TIMP-1), dictates the growth rate of experimental thymic lymphoma. *Int J Cancer*. 1999;82:743-747.
4. 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;160:2967-2973.
5. Papadimitriou MN, Menter DG, Konstantopoulos K, Nicolson GL, McIntire LV. Integrin alpha4beta1/VCAM-1 pathway mediates primary adhesion of RAW117 lymphoma cells to hepatic sinusoidal endothelial cells under flow. *Clin Exp Metastasis*. 1999;17:669-676.

6. 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.
7. Aoudjit F, Potworowski EF, Springer TA, St-Pierre Y. Protection from lymphoma cell metastasis in ICAM-1 mutant mice: a posthoming event. *J Immunol*. 1998;161:2333-2338.
8. Doring G. Serine proteinase inhibitor therapy in alpha(1)-antitrypsin inhibitor deficiency and cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 1999;28:363-375.
9. Champagne B, Tremblay P, Cantin, A, St-Pierre Y. Proteolytic cleavage of ICAM-1 by human neutrophil elastase. *J Immunol*. 1998;161:6398-6405.
10. Kossakowska AE, Hinek A, Edwards DR, et al. Proteolytic activity of human non-Hodgkin's lymphomas. *Am J Pathol*. 1998;152:565-576.
11. Ferry G, Lonchamp M, Pennel L, de Nanteuil G, Canet E, Tucker GC. Activation of MMP-9 by neutrophil elastase in an in vivo model of acute lung injury. *FEBS Lett*. 1997;402:111-115.

12. Itoh Y, Nagase H. Preferential inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 that is bound to the precursor of matrix metalloproteinase 9 (progelatinase B) by human neutrophil elastase. *J Biol Chem.* 1995;270:16518-16521.
  
13. Ariel A, Yavin EJ, HersHKoviz R, et al. IL-2 induces T cell adherence to extracellular matrix: inhibition of adherence and migration by IL-2 peptides generated by leukocyte elastase. *J Immunol.* 1998;161:2465-2472.
  
14. Doring G, Frank F, Boudier C, Herbert S, Fleischer B, Bellon G. Cleavage of lymphocyte surface antigens CD2, CD4, and CD8 by polymorphonuclear leukocyte elastase and cathepsin G in patients with cystic fibrosis. *J Immunol.* 1995;154:4842-4850.
  
15. Senior RM, Griffin GL, Fliszar CJ, Shapiro SD, Goldberg GI, Welgus HG. Human 92- and 72-kilodalton type IV collagenases are elastases. *J Biol Chem.* 1991;266:7870-7875.
  
16. Xu H, Gonzalo JA, St Pierre Y, et al. Leukocytosis and resistance to septic shock in intercellular adhesion molecule 1-deficient mice. *J Exp Med.* 1994;180:95-109.
  
17. King PD, Sandberg ET, Selvakumar A, Fang P, Beaudet AL, Dupont B. Novel isoforms of murine intercellular adhesion molecule-1 generated by alternative RNA splicing. *J Immunol.* 1995;154:6080-6093.

18. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, et al. A Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms: A Proposal From the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994;84:1361-1392.

19. Jaffar ZH, Stanciu L, Pandit A, Lordan J, Holgate ST, Roberts K. Essential role for both CD80 and CD86 costimulation, but not CD40 interactions, in allergen-induced Th2 cytokine production from asthmatic bronchial tissue: role for alphabeta, but not gammadelta, T cells. *J Immunol*. 1999;163:6283-6291.

20. Cai TQ, Wright SD. Human leukocyte elastase is an endogenous ligand for the integrin CR3 (CD11b/CD18, Mac-1, alpha M beta 2) and modulates polymorphonuclear leukocyte adhesion. *J Exp Med*. 1996;184:1213-1223.

21. Lalancette M, Aoudjit F, Potworowski EF, St-Pierre Y. Resistance of ICAM-1-deficient mice to metastasis overcome by increased aggressiveness of lymphoma cells. *Blood*. 2000;95:314-319.

22. Banks RE, Gearing AJ, Hemingway IK, Norfolk DR, Perren TJ, Selby PJ. Circulating intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in human malignancies. *Br J Cancer*. 1993;68:122-124.

23. Kapp U, Yeh WC, Patterson B, et al. Interleukin 13 is secreted by and stimulates the growth of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *J Exp Med*. 1999;189:1939-1946.

24. Basset P, Bellocq JP, Wolf C, et al. A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature*. 1990;348:699-704.
25. Okada A, Bellocq JP, Rouyer N, et al. Membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) gene is expressed in stromal cells of human colon, breast, and head and neck carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:2730-2734.
26. Gilles C, Polette M, Seiki M, Birembaut P, Thompson EW. Implication of collagen type I-induced membrane-type 1-matrix metalloproteinase expression and matrix metalloproteinase-2 activation in the metastatic progression of breast carcinoma. *Lab Invest*. 1997;76:651-660.
27. Srikanth S, Rado TA. PU.1 regulates the expression of the human neutrophil elastase gene. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1398:215-223.
28. Lloberas J, Soler C, Celada A. The key role of PU.1/SPI-1 in B cells, myeloid cells and macrophages. *Immunol Today*. 1999;20:184-189.
29. Stutz AM, Woisetschlager M. Functional synergism of STAT6 with either NF-kappa B or PU.1 to mediate IL-4-induced activation of IgE germline gene transcription. *J Immunol*. 1999;163:4383-4391.

30. Harendza S, Lovett DH, Stahl RA. The hematopoietic transcription factor PU.1 represses gelatinase A transcription in glomerular mesangial cells. *J Biol Chem.* 2000;275:19552-19559.
31. Nuchprayoon I, Simkevich CP, Luo M, Friedman AD, Rosmarin AG. GABP cooperates with c-Myb and C/EBP to activate the neutrophil elastase promoter. *Blood.* 1997;89:4546-4554.
32. Johnson JP. Cell adhesion molecules of the immunoglobulin supergene family and their role in malignant transformation and progression to metastatic disease. *Cancer Metastasis Rev.* 1991;10:11-22.
33. Storkus WJ, Dawson JR. Target structures involved in natural killing (NK): characteristics, distribution, and candidate molecules. *Crit Rev Immunol.* 1991;10:393-416.
34. Anichini A, Mortarini R, Alberti S, Mantovani A, Parmiani G. T-cell-receptor engagement and tumor ICAM-1 up-regulation are required to by-pass low susceptibility of melanoma cells to autologous CTL-mediated lysis. *Int J Cancer.* 1993;53:994-1001.
35. Zamai L, Zauli G, Bavelloni A, et al. Tiazofurin induces a down-modulation of ICAM-1 expression on K562 target cells impairing NK adhesion and killing. *Cell Immunol.* 1995;164:100-104.

36. Johnson JP. Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* 1999;18:345-357.
37. Riemann D, Kehlen A, Langner J. Stimulation of the expression and the enzyme activity of aminopeptidase N/CD13 and dipeptidylpeptidase IV/CD26 on human renal cell carcinoma cells and renal tubular epithelial cells by T cell-derived cytokines, such as IL-4 and IL-13. *Clin Exp Immunol.* 1995;100:277-283.
38. Jenne DE. Structure of the azurocidin, proteinase 3, and neutrophil elastase genes. Implications for inflammation and vasculitis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994;150:S147-154.
39. Zimmer M, Medcalf RL, Fink TM, et al. Three human elastase-like genes coordinately expressed in the myelomonocyte lineage are organized as a single genetic locus on 19pter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89:8215-8219.

**Figure 1: Binding of LE to lymphoma cells.**

(A) Dose-dependent binding of human recombinant LE to lymphoma cells. 267 lymphoma cells were incubated with the indicated concentrations of purified LE at 37°C for 30 min, and binding of LE detected by flow cytometry using antibodies to LE. (B) Time-dependent binding of LE to 267 lymphoma cells. Lymphoma cells were incubated with 5 µg of recombinant LE for the indicated periods of time, and binding of LE detected by flow cytometry using antibodies to LE. (C) Release of active recombinant LE in the supernatant after binding to lymphoma cells. Lymphoma cells were incubated with 5 µg of recombinant LE for the indicated periods of time. LE activity (■) in the supernatants was measured by fluorescent-activated substrate conversion. Binding of LE (▲) was measured as described. Data are representative of at least three separate experiments.

**Figure 2: Correlation between LE binding and ICAM-1 expression in lymphoma cells.** ICAM-1-deficient 718 cells were transfected with cDNA encoding murine ICAM-1. Stable clones expressing different levels of ICAM-1 (*Lower panel*) were then characterized for their ability to bind LE (*Upper panel*). Binding was carried out at 37°C for 30 min using recombinant LE, and determined by flow cytometry using anti-LE antibodies. Results represent the mean fluorescent intensity measured on 5 000 cells. Results are representative of at least two independent experiments.

**Figure 3: Upregulation of LE in Raji cells upon exposure to IL-6 and IL-13.** Raji cells were stimulated with various cytokines, PMA (50 nm), or db-cAMP (1 mM) for eight hours. LE and MMP-9 mRNA expression was then measured by RT-PCR. Results are representative of at least three independent experiments.

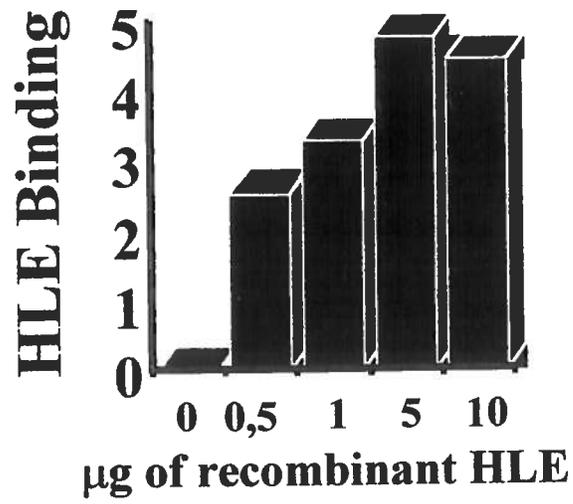
**Figure 4: Expression of IL-13 and LE in NHL lymphoma tissues.** Semi-quantitative analysis of the expression of human IL-13 and LE was measured by RT-PCR of RNA extracted from lymphoma tissues collected from 20 different cases of NHL's. Results are representative of three independent experiments.

**Figure 5: Human Leukocyte Elastase (HLE) expression in peripheral, large T-cell non-Hodgkin's lymphoma.** (A) Section of a lymph node shows partial replacement by peripheral, large T-cell non-Hodgkin's lymphoma (NHL). Anti-human leukocyte elastase antibodies bind to macrophages and polymorphonuclear (pmn) leukocytes within the tumor. Central area represents residual lymphoid follicle and shows no evidence of HLE expression. Magnification x 40. (B) Section from the tissue adjacent to the NHL described in A, stained with anti-HLE antibodies. Macrophages and pmn outside the tumor express HLE. Magnification x 100.

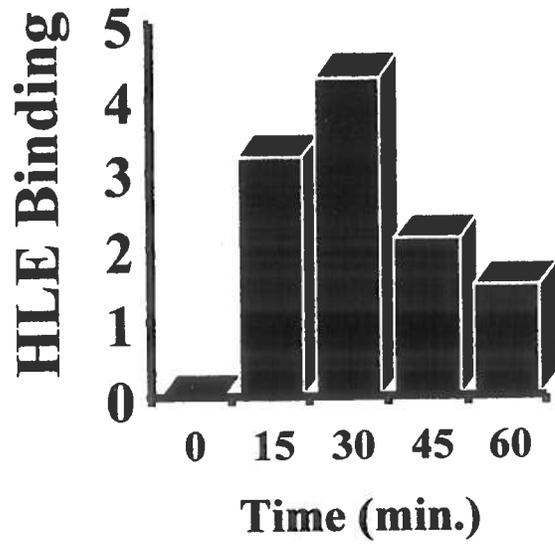
**Table I: Sequence of the oligoprimers used for the detection of MMP, LE, and IL-13 in NHL.**

Gene	Sense Sequence	Antisense Sequence	NT (bp)
Human LE	TTGGATGATAGAGTCGATCC	ACTTGCTCAACGACATCGTG	390
Human MMP-9	CAACATCACCTATTGGATCC	CGGGTGTAGAGTCTCTCGCT	400
Human IL-13	CGGTCATTGCTCTCACTTGCCTT	TTACCCCTCCCTAACCCCTCCTT	500

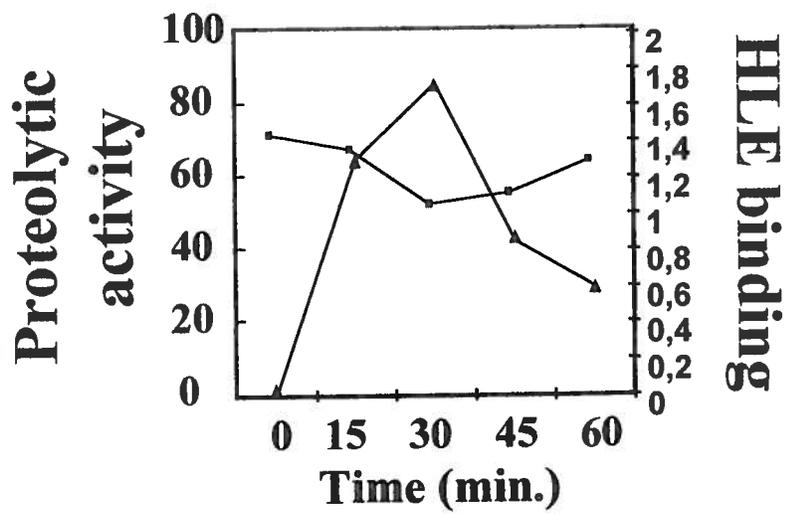
**A.**

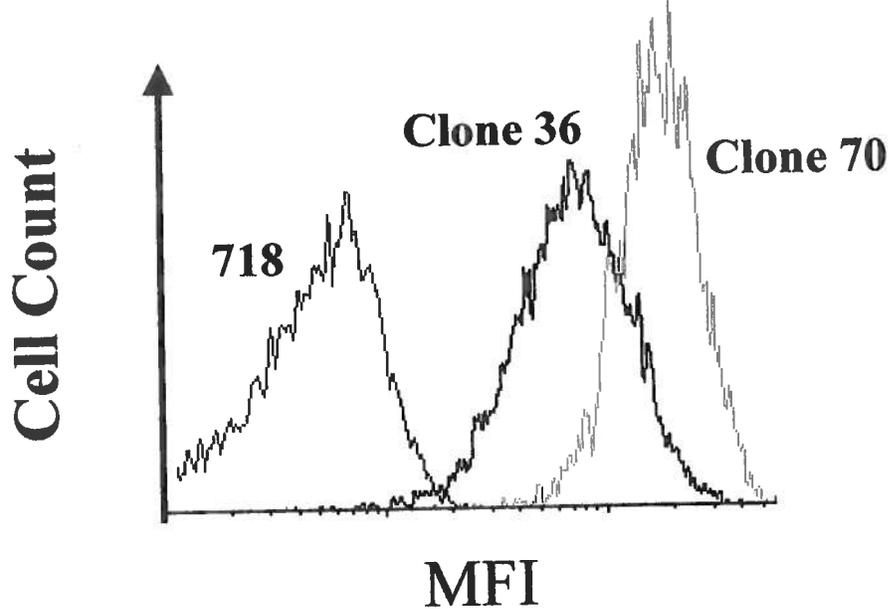
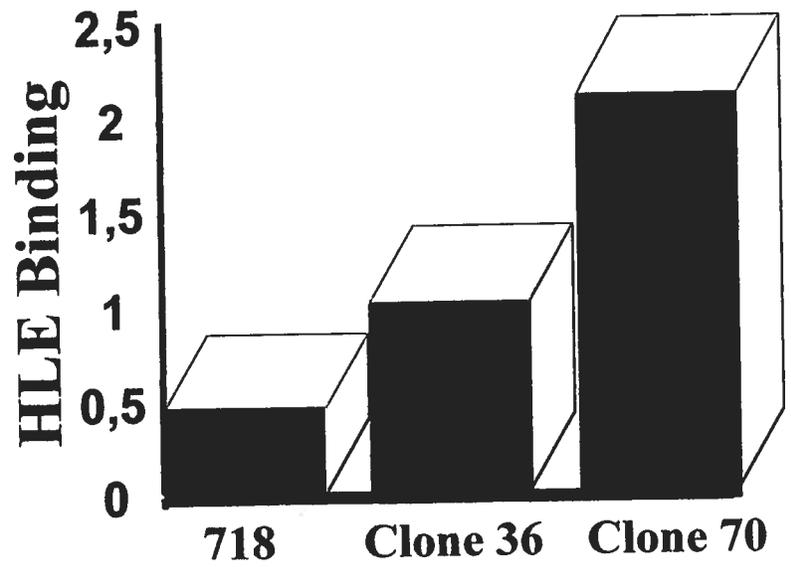


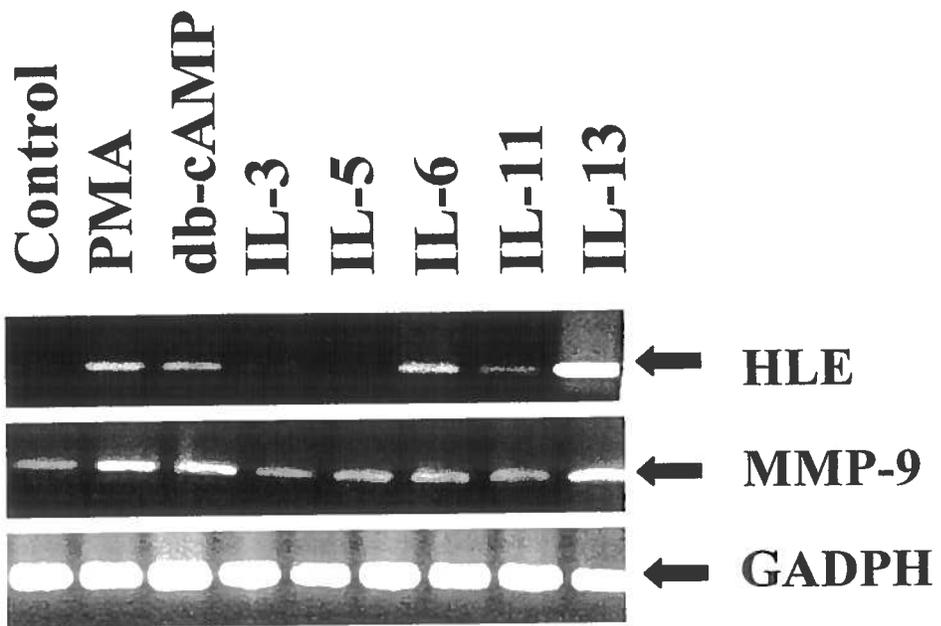
**B.**

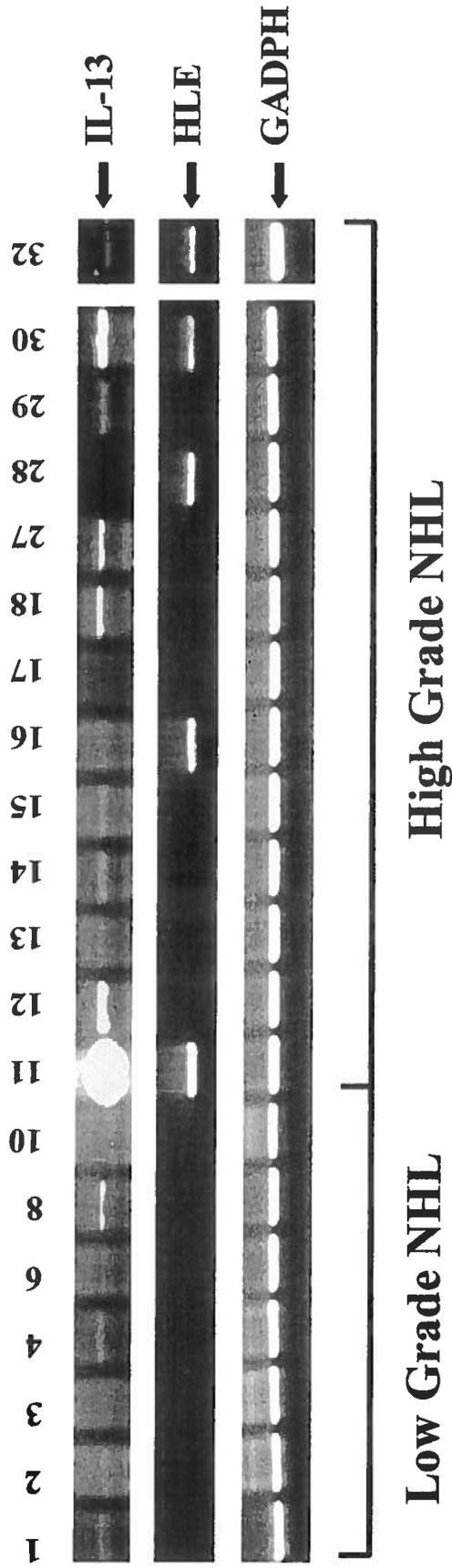


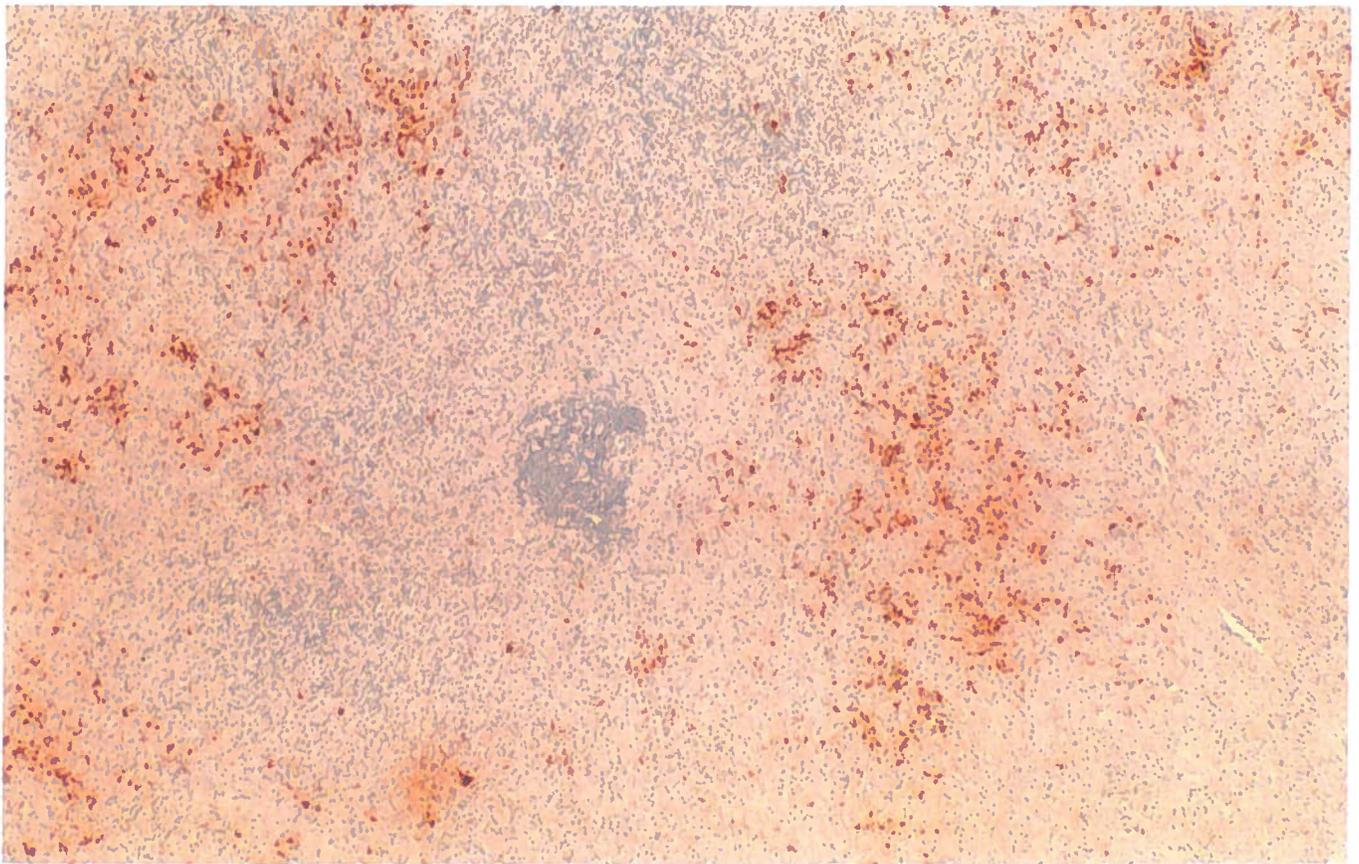
**C.**











## Chapitre 3

## DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Les résultats obtenus lors de nos études ont démontré que : 1) la liaison de LE sur les cellules de lymphome est saturable, dose-dépendante et transitoire. 2) la transfection du cDNA de ICAM-1 chez des cellules lymphomateuses augmente leur capacité à recruter LE au niveau de leur membrane, 3) LE est exprimée au niveau de l'ARNm chez les lymphomes agressifs B et T, 4) l'IL-6 et IL-13 induisent au niveau transcriptionnel l'expression de LE dans les cellules lymphomateuses Raji, et 5) on retrouve une expression élevée de HLE dans les tissus humains de lymphomes NHL.

L'importance des protéases extracellulaires dans le développement du cancer, particulièrement les MMPs, fait l'objet de nombreuses études, notamment dans le but d'élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques utilisant les inhibiteurs de MMPs. A notre connaissance, notre étude est la première démontrant une implication possible de HLE dans le lymphome et dans le processus de dissémination tumorale. Cette étude fait suite à une série d'observations passées, notamment celles démontrant que certaines souches de lymphome, particulièrement les souches agressives, démontraient une activité élastolytique *in vitro* (Kossakowska *et al.*, 1998). À la lumière de nos résultats, nous pouvons soulever l'hypothèse que cette activité est peut être due à l'expression de LE par les cellules tumorales elles mêmes. Nos résultats démontrant que l'expression de LE peut être induite dans la lignée de lymphome de Burkitt supportent cette hypothèse. Alternativement, nous pouvons supposer que cette activité observée précédemment chez les lymphomes agressifs est due à un recrutement de formes solubles de LE produites par les cellules péri-tumorales. Nos résultats sur la liaison de LE à la surface des lymphomes

sont consistants avec cette hypothèse. Plusieurs études ont d'ailleurs clairement démontré l'implication des cellules péri-tumorales dans la croissance tumorale par sécrétion de protéases extracellulaires (Basset *et al.*, 1990)

L'étude de la régulation de LE chez les cellules de lymphome a révélé une induction de l'expression de cette protéase chez la cellule Raji. IL-13 et à moindre niveau IL-6, induisent l'expression de LE. De plus, MMP-9 semble avoir un patron d'activation parallèle à LE, suggérant un facteur de transcription commun dans le contrôle transcriptionnel de ces deux enzymes, qui pourrait impliquer notamment PU.1. Membre de la famille des ets et retrouvé chez les macrophages et les lymphocytes B, le rôle de PU.1 dans la régulation de LE et MMP-9 a été bien établi (Lloberas *et al.*, 2000). De plus, l'implication de PU.1 via l'IL-13 est d'ailleurs consistante avec la capacité de cette cytokine à moduler le réarrangement isotypique des chaînes lourdes chez le lymphocyte B (Cocks *et al.*, 1993). Il y a toutefois certains contre-arguments à cette hypothèse. Tout d'abord, il a été observé que PU.1 fait partie intégrante d'une séquence inhibitrice (« Silencing sequence ») du promoteur de la gélatinase A. Cette enzyme étant homologue fonctionnel et structural à MMP-9, son implication indirecte fut largement démontrée dans les processus évasifs de la métastase. De plus, l'induction de MMP-9 chez des souris PU.1 déficiente s'effectue sans problème d'où la possible implication de d'autres facteurs de transcriptions impliqués. Un second candidat pour la régulation de l'expression de LE chez le lymphome serait le GABP. GABP est un facteur de transcription hétérodimérique composé d'un facteur ets (GABP alpha), et d'une portion de la famille des Notch (GADP beta) (Hoare *et al.*, 1999) La liaison de la protéine GABP sur le gène de HLE, avec la

participation de c-Myb et C/EBP, induit une activation significative de la synthèse de l'ARNm de l'élastase. D'autres études portant sur la signalisation cellulaire sont présentement en cours.

Nous n'avons pu démontrer une corrélation directe entre l'expression de IL-13 et l'expression de HLE. Cette observation peut s'expliquer par le fait que HLE peut être induit par l'IL-6, par exemple, une cytokine que l'on retrouve de façon presque ubiquitaire au niveau des lymphomes (Kossakowska et al., 1999). L'absence d'ARNm codant pour HLE dans plusieurs lymphomes agressifs et le fait que les études précédentes aient démontré une activité élastolytique chez les lymphomes agressifs laissent supposer que d'autres enzymes possédant une activité élastolytique pourrait être impliquées, notamment MMP-12. L'expression de cette enzyme dans les lymphomes n'a pas été rapportée jusqu'à maintenant et mérite d'être investiguée. Alternativement, il est possible que l'absence d'ARNm codant pour LE s'explique par le fait que l'activité élastolytique des lymphomes pourrait dans certaines situations serait due au recrutement de LE sécrétée par les neutrophiles. Bien que les vacuoles cytoplasmiques de ces cellules contiennent une concentration importante de LE, ils n'expriment pas l'ARNm de LE, puisque la synthèse de l'enzyme au niveau protéique s'effectue durant les étapes précoces de différenciations des myélocytes en neutrophiles (Zimmer et al., 1992). Des études immunohistochimiques sur des coupes de tissus de lymphomes avec l'aide d'anticorps monoclonaux contre LE ou MMP-12, de même que des études par RT-PCR ciblant d'autres membres de la famille des MMP connus pour leur activité élastolytique intrinsèque, pourraient éclaircir cette question.

Notre étude est la première étude démontrant l'induction de HLE par IL-6 et IL-13. Or, il existe déjà un certain nombre d'études reliant IL-13 au développement tumoral, notamment chez le lymphome. Kapp *et al.*, (1999) ont démontré dans les lymphomes de Hodgkin que le blocage spécifique des récepteurs de l'IL-13 chez les cellules Reed-Sternberg cause une nette inhibition de leur prolifération. De plus, Riemann *et al.*, (1995) ont rapporté que l'IL-13 avait la capacité d'induire l'expression de l'aminopeptidase N et la dipeptidylpeptidase, deux molécules transmembranaires de type II impliquées dans le processus métastatique. La capacité de l'IL-13 d'augmenter l'expression de HLE dans le lymphome pourrait donc représenter un nouveau mécanisme par lequel cette interleukine modulerait le pouvoir métastatique. Des expériences à l'intérieur de modèles expérimentaux murins, notamment celui de Kaplan, pourrait aider à élucider son rôle. Il serait possible, par exemple, de déterminer l'influence de la surexpression de IL-13 dans les cellules de lymphomes en générant des lignées stables avec des vecteurs d'expressions codant pour l'IL-13, ou en mesurant l'effet de l'ablation génétique de cette cytokine sur la susceptibilité des souris à développer des lymphomes.

Le mécanisme moléculaire par lequel LE pourrait être impliqué dans le cancer demeure inconnu. Une participation de LE au remodelage de l'ECM et/ou une élaboration d'une protection par les cellules tumorales contre une réponse anti-tumorale sont parmi les possibilités. Une dégradation accélérée de l'élastine pourrait ainsi faciliter la migration et particulièrement la nidification de la cellules tumorales exprimant LE constitutivement. De plus, une expression de LE pourrait inhiber la réponse anti-tumorale du système immunitaire en clivant les IgGs et les molécules du complément (C3b et C5b), et ainsi perturber l'opsonophagocytose (Solomon *et al.*, 1978). LE pourrait aussi

cliver des molécules impliquées dans la reconnaissance de cellules tumorales (CD2, CD4 et CD8 : Doring *et al.*, 1995), ou des molécules d'adhésion nécessaires à l'ancrage des leucocytes pour effectuer la réponse anti-tumorale hors des vaisseaux sanguins (en périphérie). Des études supplémentaires *in vitro*, notamment des tests visant à démontrer la sensibilité des lymphomes exprimant LE à l'action cytolytique directe ou indirecte (via l'ADCC; « antibody-dependent cytotoxicity ») des cellules NK (« natural killer cells ») ou des lymphocytes T cytotoxiques pourraient aider à élucider les mécanismes impliqués. De plus, il ne faudrait pas négliger la possibilité que la liaison de LE à la surface des lymphomes puisse également générer des signaux intracellulaires via ICAM-1. Il est bien établi que ICAM-1 peut médier la transmission de signaux intracellulaires, notamment dans les lymphocytes B (Holland *et al.*, 1997). L'étude du profil de phosphorylation induit par une telle liaison, plus précisément sur les résidus tyrosines, thréonines et sérines, pourrait clarifier la voie de transduction activée par la liaison de LE sur la membrane. Il serait alors intéressant de déterminer quels sont les gènes potentiellement induits par le contact d'ICAM-1 avec LE en utilisant les nouvelles techniques de cDNA MicroArray.

En conclusion, nos résultats représentent un premier pas dans l'étude du rôle de LE dans le cancer, plus spécifiquement dans le lymphome. D'autres études seront nécessaires afin de déterminer s'il est raisonnable d'envisager l'utilisation d'inhibiteur de protéases extracellulaire spécifique LE dans certains types de cancer ou à certains stades. Sans doute que des tests à l'intérieur de modèles murins où l'on pourrait induire, par génie génétique, une surexpression d'inhibiteur spécifique de LE, comme l'élafin, sauront nous éclaircir sur le potentiel d'une telle stratégie thérapeutique.

## **REMERCIEMENTS**

Nous remercions mesdames Doris Legault et Claire Beauchemin, ainsi que monsieur Marcel Desrosiers pour leur assistance technique, ainsi que le Dr André Cantin (Université de Sherbrooke) qui a gracieusement fourni les sputums contenant de l'élastase de leucocyte humaine afin de mettre au point nos différents tests enzymatiques et d'immunobuvardage.

## BIBLIOGRAPHIE

- Agrawal S, Marquet J, Delfau-Larue MH, Copie-Bergman C, Jouault H, Reyes F, Bensussan A, Farcet JP. 1998. CD3 hyporesponsiveness and in vitro apoptosis are features of T cells from both malignant and nonmalignant secondary lymphoid organs. *J Clin Invest* 1:102(9):1715-23.
- Altieri, D.C., Duperray, A., Plescia, J., Thornton, G.B., Languino, L.R. 1995. Structural recognition of a novel fibrinogen 7 chain sequence (117-133) by intercellular adhesion molecule-1 mediates leukocyte-endothelium interaction. *J Biol Chem* 270:696-99.
- Altieri, D.C., Edgington, T.S. 1988. The saturable high affinity association of factor X to ADP-stimulated monocytes defines a novel function of the Mac-1 receptor. *J Biol Chem* 263:7007-15.
- Altmann, D.M., Hogg, N., Trowsdale, J., Wilkinson, D. 1989. Cotransfection of ICAM-1 and HLA-DR reconstitutes human antigen-presenting cell function in mouse L cells. *Nature* 338:512-14.
- Anand-Apte B, Bao L, Smith R, Iwata K, Olsen BR, Zetter B, Apte SS. 1996. A review of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) and experimental analysis of its effect on primary tumor growth. *Biochem Cell Biol*;74(6):853-62.
- Anderson JR, Armitage JO, Weisenburger DD. 1998. Epidemiology of the non-Hodgkin's lymphomas: distributions of the major subtypes differ by geographic locations. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Ann Oncol Jul*;9(7):717-20
- Andrieu JM, Ifrah N, Payen C, Fermanian J, Coscas Y, Flandrin G. 1990. Increased risk of secondary acute nonlymphocytic leukemia after extended-field radiation therapy combined with MOPP chemotherapy for Hodgkin's disease. *J Clin Oncol Jul*;8(7):1148-54.
- Aoudjit F, Masure S, Opdenakker G, Potworowski EF, St-Pierre Y. 1999. Gelatinase B (MMP-9), but not its inhibitor (TIMP-1), dictates the growth rate of experimental thymic lymphoma. *Int J Cancer* 27;82(5):743-7.
- Aoudjit F, Potworowski EF, Springer TA, St-Pierre Y. 1998. Protection from lymphoma cell metastasis in ICAM-1 mutant mice: a posthoming event. *J Immunol* 1;161(5):2333-38

- Aoudjit F, Potworowski EF, St-Pierre Y. 1998. Bi-directional induction of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 during T lymphoma/endothelial cell contact: implication of ICAM-1. *J Immunol* 15;160(6):2967-73.
- Ara T, Kusafuka T, Inoue M, Kuroda S, Fukuzawa M, Okada A. 2000. Determination of imbalance between MMP-2 and TIMP-2 in human neuroblastoma by reverse-transcription polymerase chain reaction and its correlation with tumor progression. *J Pediatr Surg*; 35(3):432-7.
- Ariel A, Yavin EJ, Hershkoviz R, Avron A, Franitza S, Hardan I, Cahalon L, Fridkin M, Lider O. 1998. IL-2 induces T cell adherence to extracellular matrix: inhibition of adherence and migration by IL-2 peptides generated by leukocyte elastase. *J Immunol* 1;161(5):2465-72.
- Arkin, S., Naprstek, B., Guarini, L., Ferrone, S., Lipton, J.M. 1991. Expression of intercellular adhesion molecules (CD54) on hematopoietic progenitors. *Blood* 77:948-53.
- Auseon JC, Pritchard CL, Purdy RE..1974. Clinical use of bleomycin: two case reports and review of toxicity. *J Am Osteopath Assoc*;73(10):811-5.
- Bailly, P., Hermand, P., Callebaut, I., Sonneborn, H.H., Khamlichi, S., Mornon, J.P., Carton, J.P. 1994. The LW blood group glycoprotein is homologous to intercellular adhesion molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:5306-12.
- Bailly, P., Tontti, E., Hermand, P., Carton, J.-P., Gahmberg, C.G. 1995. The red cell LW blood group protein is an intercellular adhesion molecule which binds to CDII/CD18 leukocyte integrins. *Eur J Immuno* 125:3316-24.
- Bainton DF, Ulliyot JL, Farquhar MG. 1971. The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. *J Exp Med* 1;134(4):907-34.
- Baker AH, Ahonen M, Kahari VM. 2000. Potential applications of tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) overexpression for cancer gene therapy. *Adv Exp Med Biol*; 465:469-83.
- Bakhshi A, Wright JJ, Graninger W, Seto M, Owens J, Cossman J, Jensen JP, Goldman P, Korsmeyer SJ. 1987. Mechanism of the t(14;18) chromosomal translocation: structural analysis of both derivative 14 and 18 reciprocal partners. *Proc Natl Acad Sci U S A*;84(8):2396-400.

- Banda, M.J., Rice A.G., Griffin G.L., Senior, R.M. 1988. The inhibitory complex of human alpha 1-proteinase inhibitor and human leukocyte elastase is a neutrophil chemoattractant. *J Exp Med* **167**: 1608-15.
- Banks RE, Gearing AJ, Hemingway IK, Norfolk DR, Perren TJ, Selby PJ. 1993. Circulating intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in human malignancies. *Br J Cancer*; **68**(1):122-4.
- Barnett, C.C., Moore, E.E., Moore, F.A., Carl, V.S., Biffl, W.L. 1996. Soluble ICAM-1 (sICAM-1) provokes PMN elastase release. *J Surg Res* **63**:6-10.
- Barnett, C.C., Moore, E.E., Moore, F.A., Carl, V.S., Biffl, W.L., Partrick D.A. 1996. Soluble intercellular adhesion molecules provokes polymorphonuclear leukocyte elastase release by CD19. *Surgery* **120**:395-402.
- Basset P, Bellocq JP, Wolf C, Stoll I, Hutin P, Limacher JM, Podhajcer OL, Chenard MP, Rio MC, Chambon P. 1990. A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature*; **348**(6303):699-704.
- Baumhueter S, Dybdal N, Kyle C, Lasky LA. 1994 Global vascular expression of murine CD34, a sialomucin-like endothelial ligand for L-selectin. *Blood* **15**; **84**(8):2554-65.
- Bazil, V. 1995. Physiological enzymatic cleavage of leukocyte membrane molecules. *Immunol Today* **16**:135-40.
- Beekhuizen, H., Verdegaal, E.M.E., Blokland, I., van Furth, R. 1992. Contribution of ICAM-1 and VCAM-1 to the morphological changes in monocytes bound to human venous endothelial cells stimulated with recombinant interleukin-4 (rIL-4 or rIL-1 $\alpha$ ) *Immunology* **77**: 469-72.
- Bella J, Kolatkar PR, Marlor CW, Greve JM, Rossmann MG. 1998. The structure of the two amino-terminal domains of human ICAM-1 suggests how it functions as a rhinovirus receptor and as an LFA-1 integrin ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* **14**; **95**(8):4140-5.
- Berendt, A.R., McDowall, A., Craig, A.G., Bates, P.A., Sternberg, M.J.E., Marsh, K., Newbold, C.I., Hogg, N. 1992. The binding site on ICAM-1 for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes overlaps, but is distinct from, the LFA-1 binding site. *Cell* **68**:71-81.

- Berendt, A.R., Simmons, D.L., Tansey, J., Newbold, C.I., Marsh, K. 1989. Intercellular adhesion molecules is an endothelial cell adhesion receptor for *Plasmodium falciparum*. *Nature* **341**:57-59.
- Berg EL, McEvoy LM, Berlin C, Bargatze RF, Butcher EC. 1993. L-selectin-mediated lymphocyte rolling on MAdCAM-1. *Nature*; **366**(6456):695-8.
- Bevilacqua M, Butcher E, Furie B, Furie B, Gallatin M, Gimbrone M, Harlan J, Kishimoto K, Lasky L, McEver R. 1991 Selectins: a family of adhesion receptors. *Cell* **18**;67(2):233-9.
- Bevilacqua MP, Pober JS, Mendrick DL, Cotran RS, Gimbrone MA Jr. 1987. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **84**(24):9238-42.
- Biggar RJ, Nkrumah FK, Perkins I. 1979 Presenting clinical features of Burkitt's lymphoma in Ghana, West Africa. *Trop Pediatr Environ Child Health Dec*; **25**(6):157-61.
- Bloom, J.W., Madanat, M.S., Ray, M.K. 1996. Cell line and site specific comparative analysis of the N-linked oligosaccharides on human ICAM-1 (CD54) by electrospray ionization mass spectrometry. *Biochem* **35**:1856-64.
- Bokoch GM. 1995 Chemoattractant signaling and leukocyte activation. *Blood* **1**; **86**(5):1649-60.
- Bonadonna G, Santoro A. 1982. ABVD chemotherapy in the treatment of Hodgkin's disease. *Cancer Treat Rev*; **9**(1):21-35.
- Bord S, Horner A, Hembry RM, Reynolds JJ, Compston JE. 1997 Distribution of matrix metalloproteinases and their inhibitor, TIMP-1, in developing human osteophytic bone. *J Anat*; **191** ( Pt 1):39-48.
- Boyd, A.W., Dunn, S.M., Secondo, J.V., Culvenor, J.G., DiIrsen, U., Burns, G.F., Wayryk, S.O. 1989. Regulation of expression of a human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) during lymphohematopoietic differentiation. *Blood* **73**:1896-03.
- Braun, N.J., Bodmer, J.L., Virca, G.D., Metz-Virca, G., Maschler, R., Bieth, J.G., Schnebli, H.P. 1987. Kinetic studies on the interaction of eglin C with human leukocyte elastase and cathepsin G. *Biol Chem Hoppe Seyler* **368**:299-7.

- Breathnach R, Matrisian LM, Gesnel MC, Staub A, Leroy P. 1987. Sequences coding for part of oncogene-induced transin are highly conserved in a related rat gene. *Nucleic Acids Res* Feb 11;15(3):1139-51.
- Brew K, Dinakarandian D, Nagase H. 2000. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* Mar 7;1477(1-2):267-83
- Brinckerhoff CE, Sirum-Connolly KL, Karmilowicz MJ, Auble DT. 1992. Expression of stromelysin and stromelysin-2 in rabbit and human fibroblasts. *Matrix Suppl*;1:165-75.
- Bristow, C.L., Lyford, L.K., Stevens, D.P., Flood, P.M. 1991. Elastase is a constituent product of T cells. *Biochim Biophys Res Com* 181:232-9.
- Buckle, A.M., Hogg, N. 1990. Human memory T cells express intercellular adhesion molecules which can be increased by interleukin 2 and interferon-7. *Eur J Immunol* 20:337-41.
- Budnik, A., Grewe, M., Gyufko, K., Krutmann, J. 1996. Analysis of the production of soluble ICAM-1 molecules by human cells. *Exp Hematol* 24:352-59.
- Burnett AK. 1991 Autologous bone marrow transplant in the treatment of acute leukaemia. *Baillieres Clin Haematol* Jul;4(3):751-73.
- Butcher EC, Kishimoto TK, Jutila MA, Berg EL 1989. Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. *Science* 15;245(4923):1238-41.
- Butcher, E.C. 1991. Leukocyte-endothelial cell recognition : three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 67 :1033-36.
- Cai, T.-Q., Wright, S.D. 1996. Human leukocyte elastase is an endogenous ligand for the integrin CR3 (CD 11b/CD 18, Mac-1) and modulates polymorphonuclear leukocyte adhesion. *J Exp Med* 184:1213-23.
- Campbell EJ, Silverman EK, Campbell MA. 1989. Elastase and cathepsin G of human monocytes. Quantification of cellular content, release in response to stimuli, and heterogeneity in elastase-mediated proteolytic activity. *J Immunol* 1;143(9):2961-8.
- Campbell, E.J., Campbell M.A. 1988. Pericellular proteolysis by neutrophils in the presence of proteinase inhibitors: effects of substrate opsonization. *J Cell Biol* 106:667-76.

- Campbell, E.J., Silverman, E.K., Campbell, M.A. 1989. Elastase and cathepsin G of human monocytes; Quantification of cellular content, release in response to stimuli, and heterogeneity in elastase-mediated proteolytic activity. *J Immunol* **143**:2961-68.
- Carpén, O., Pallai, P., Staunton, D.E., Springer, T.A. 1992 Association of intercellular adhesion molecule- 1 (ICAM-1) with actin-containing cytoskeleton and  $\alpha$ -actinin. *J Cell Biol* **118**:1223-34.
- Casasnovas, J.M., Springer, T.A. 1995. Kinetics and thermodynamics of virus binding to receptor; Studies with rhinovirus, intercellular adhesion molecules (ICAM-1), and surface plasmon resonance. *J Biol Chem* **270**:13216-24.
- Casasnovas, J.M., Springer, T.A., Liu, J.-H., Harrison, S.C., Wang, J.-H. 1997. Crystal structure of ICAM-2 reveals a distinctive integrin recognition surface. *Nature* **387**:312-15
- Casasnovas, J.M., Stehle, T., Liu, J.-H., Wang, J.-H., Springer, T.A. 1998. A dimeric crystal structure for the N-terminal two domains of intercellular adhesion molecule-1. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:4134-39.
- Champagne B, Tremblay P, Cantin A, St Pierre Y. 1998. Proteolytic cleavage of ICAM-1 by human neutrophil elastase. *J Immunol* **161**(11):6398-405.
- Chandler S, Coates R, Gearing A, Lury J, Wells G, Bone E. 1995. Matrix metalloproteinases degrade myelin basic protein. *Neurosci Lett* Dec **15**;201(3):223-6.
- Chassagne-Clement C, Blay JY, Treilleux I, Sebban C, Bergeron C, Biron P, Philip T., 1999. Epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma: recent data. *Bull Cancer*;86(6):529-36.
- Chin JR, Murphy G, Werb Z. 1985. Stromelysin, a connective tissue-degrading metalloendopeptidase secreted by stimulated rabbit synovial fibroblasts in parallel with collagenase. Biosynthesis, isolation, characterization, and substrates. *J Biol Chem*;260(22):12367-76.
- Clark, E.A., Ledbetter, J.A., Holly, R.C., Dinndorf, P.A., Shu, G. 1986. Polypeptides on human B lymphocytes associated with cell activation. *Hum Immunol* **16**:100-5.
- Clavel C, Polette M, Doco M, Binniger I, Birembaut P. 1992. Immunolocalization of matrix metallo-proteinases and their tissue inhibitor in human mammary pathology. *Bull Cancer*;79(3):261-70.

- Clavel C, Polette M, Doco M, Binnering I, Birembaut. 1992 Immunolocalization of matrix metallo-proteinases and their tissue inhibitor in human mammary pathology. *Bull Cancer*;79(3):261-70.
- Cobb, R.R., Dubins, J.S., Warner, J., Molony, L. 1992. Functional expression of soluble ICAM-1 by baculovirus-infected Sf9 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 185:1022-33.
- Cockett MI, Birch ML, Murphy G, Hart IR, Docherty AJ. 1994 Metalloproteinase domain structure, cellular invasion and metastasis. *Biochem Soc Trans* 22(1):55-7.
- Cocks BG, de Waal Malefyt R, Galizzi JP, de Vries JE, Aversa G. 1993. IL-13 induces proliferation and differentiation of human B cells activated by the CD40 ligand. *Int Immunol*;5(6):657-63.
- Conca W, Willmroth F. 1994 Human T lymphocytes express a member of the Matrix Metalloproteinase gene family. *Arthritis Rheum* ;37(6):951-6.
- Cool CD, Bitter MA. 1997 The malignant lymphomas of Kenya: morphology, immunophenotype, and frequency of Epstein-Barr virus in 73 cases. *Hum Pathol*;28(9):1026-33
- Cossins J, Dudgeon TJ, Catlin G, Gearing AJ, Clements JM.1996. Identification of MMP-18, a putative novel human matrix metalloproteinase. *Biochem Biophys Res Commun*;228(2):494-8.
- Cuvelier A, Kuntz C, Sesboue R, Muir JF, Martin JP. 1997. Metalloproteinases in the extracellular matrix: structure and activity. *Rev Mal Respir*;14(1):1-10
- Damle, N.K., Klussman, K., Linsley, P.S., Aruffo, A. 1992. Differential costimulatory effects of adhesion molecules B7, ICAM-1, LFA-3, and VCAM-1 on resting and antigen-primed CD4+ T lymphocytes. *J Immunol* 148:1985-92.
- Davis TA, Czerwinski DK, Levy R. 1999. Therapy of B-cell lymphoma with anti-CD20 antibodies can result in the loss of CD20 antigen expression *Clin Cancer Res* Mar;5(3):611-5.
- de Rose, V., Oliva, A., Messori, B., Grosso, B., Mollar, C., Pozzi, E. 1998. Circulating adhesion molecules in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 157:1234-41.

- del Pozo, M.A., Cabanas, C., Montoya, M.C., Ager, A., Sanchez-Mateos, P. and SanchezMadrid, F. 1997. ICAMs redistributed by chemokines to cellular uropods as a mechanism for recruitment of T lymphocytes. *J Cell Biol* **137**:493-508.
- del Pozo, M.A., Sanchez-Mateos, P., Nieto, M., Sanchez-Madrid, F. 1995. Chemokines regulate cellular polarization and adhesion receptor redistribution during lymphocyte interaction with endothelium and extracellular matrix. Involvement of cAMP signaling pathway. *J Cell Biol* **131**:495-508.
- Diamond, M.S., Springer, T.A. 1993. A subpopulation of Mac-1 (CD11b/CD18) molecules mediates neutrophil adhesion to ICAM-1 and fibrinogen. *J Cell Biol* **120**:545-56.
- Diamond, M.S., Staunton, D.E., de Fougerolles, A.R., Stacker, S.A., Garcia-Aguilar, J., Hibbs, M.L., Springer, T.A. 1990. ICAM-1 (CD54): a counter-receptor for Mac-I (CD11b/CD18). *J Cell Biol* **111**:3129-39.
- Diamond, M.S., Staunton, D.E., Marlin, S.D., Springer, T.A. 1991. Binding of the integrin Mac-I (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glycosylation. *Cell* **65**:961-71.
- Docherty AJ, Lyons A, Smith BJ, Wright EM, Stephens PE, Harris TJ, Murphy G, Reynolds JJ. 1985. Sequence of human tissue inhibitor of metalloproteinases and its identity to erythroid-potentiating activity. *Nature*; **318**(6041):66-9
- Domer PH, Fakharzadeh SS, Chen CS, Jockel J, Johansen L, Silverman GA, Kersey JH, Korsmeyer SJ. 1993. Acute mixed-lineage leukemia t(4;11)(q21;q23) generates an MLL-AF4 fusion product. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **90**(16):7884-8
- Doring G, Frank F, Boudier C, Herbert S, Fleischer B, Bellon G. 1995. Cleavage of lymphocyte surface antigens CD2, CD4, and CD8 by polymorphonuclear leukocyte elastase and cathepsin G in patients with cystic fibrosis. *J Immunol*; **154**(9):4842-50
- Döring, G. 1994. The role of neutrophil elastase in chronic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* **150**: S114-S117.
- Döring, G., Goldstein, W., Botzenhart, K., Kharazml, A., Schiotz, P.O., Hoiby, N., Dasgupta, M. 1986. Elastase from polymorphonuclear leucocytes : a regulatory enzyme in immune complex disease. *Clin Exp Immunol* **64**:597-605.

- Dougherty, G.J., Murdoch, S., Hogg, N. 1988. The function of human intercellular adhesion molecules (ICAM-1) in the generation of an immune response. *Eur J Immunol* **18**:35-39.
- Drexler HG. 1992. Recent results on the biology of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. I. Biopsy material. *Leuk Lymphoma*;8(4-5):283-313
- Drexler L., Uphoff CC, MacLeod RA, Denkmann SA, Golub TR, Borkhardt A, Janssen JW. 1997. Occurrence of TEL-AML1 fusion resulting from (12;21) translocation in human early B-lineage leukemia cell lines. *Leukemia*;11(3):441-7
- D'Souza, S.E., Byers-Ward, V.J., Gardiner, E.E., Wang, H., Sung, S.S. 1996 Identification of an active sequence within the first immunoglobulin domain of intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1) that interacts with fibrinogen. *J Biol Chem* **271**:24270-77.
- Duperray, A., Languino, L.R., Plescia, J., McDowall, A., Hogg, N., Craig, A.G., Erendt, A.R., Altieri, D.C. 1997. Molecular identification of a novel fibrinogen binding site on the first domain of ICAM-1 regulating leukocyte-endothelium bridging. *J Biol Chem* **272**:435-41.
- Durieu-Trautmann, O., Chaverot, N., Cazauban, S., Donny, Strosberg, A., Couraud, P.O. 1994. Intercellular adhesion molecules activation induces tyrosine phosphorylation of the cytoskeleton-associated protein cortactin in brain microvessel endothelial cells. *J Biol Chem* **269**:12536-40.
- Dustin, M.L., Carpen, O., Springer, T.A. 1992. Regulation of locomotion and cell-cell contact area by the LFA-1 and ICAM-1 adhesion receptors. *J Immunol* **148**:2654-63.
- Dustin, M.L., Rothlein, R., Bhan, A.K., Dinarello, C.A., Springer, T.A. 1986. Induction by IL-1 and interferon- $\gamma$ : Tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol* **137**:245-54.
- Dustin, M.L., Springer, T.A. 1988. Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) interaction with intercellular adhesion molecules (ICAM-1) is one of at least three mechanisms for lymphocyte adhesion to cultured endothelial cells. *J Cell Biol* **107**:321-31.
- Edlich RF, Arnette JA, Williams FM., 2000. Global epidemic of human T-cell lymphotropic virus type-I (HTLV-I). *J Emerg Med* Jan;**18**(1):109-19.

- Ehlers, M.R.W., Riordan, J.F. 1991. Membrane proteins with soluble counterparts: Role of proteolysis in the release of transmembrane proteins. *Biochemistry* **30**:10065-74.
- Enghild JJ, Salvesen G, Brew K, Nagase H. 1989. Interaction of human rheumatoid synovial collagenase(matrix metalloproteinase 1) and stromelysin (matrix metalloproteinase 3) with human alpha 2-macroglobulin and chicken ovostatin. Binding kinetics and identification of matrix metalloproteinase cleavage sites. *J Biol Chem*; **264**(15):8779-85
- Erlandsen, S.L., Hasslen, S.R., Nelson, R.D. 1993. Detection and spatial distribution of the b2 integrin (Mac-1) and L-selectin (LECAM-1) adherence receptors on human neutrophils by high-resolution field emission SEM. *J Histochem Cytochem* **41**:327.
- Fata JE, Ho AT, Leco KJ, Moorehead RA, Khokha R. 2000. Cellular turnover and extracellular matrix remodeling in female reproductive tissues: functions of metalloproteinases and their inhibitors. *Cell Mol Life Sci*; **57**(1):77-95.
- Fawcett, J., Holness, C.L.L., Needham, L.A., Turley, H., Gatter, K.C., Mason, D.Y., Simmons, D.L. 1992. Molecular cloning of ICAM-3, a third ligand for LFA-1, constitutively expressed on resting leukocytes. *Nature* **360**:481-4.
- Fischer, H., Gjbrloff, A., Hedlund, G., Hedman, H., Lundgren, E., Kalland, T., Sjögren H.O., Dohlsten, M. 1992. Stimulation of human naive and memory T helper cells with bacterial superantigen. *J Immunol* **148**:1993-8.
- Fortin, J.-F., Cantin, R., Lamontagne, G., Tremblay, M. 1997. Host-derived ICAM-1 glycoproteins incorporated on human immunodeficiency virus type I are biologically active and enhance viral infectivity. *J Virol* **71**:3588-96.
- Fougerolles, A.R., Springer, T.A. 1992. Intercellular adhesion molecule 3, a third adhesion counter-receptor for lymphocyte function-associated molecule 1 on resting lymphocytes. *J Exp Med* **175**:185-90.
- Fouret, P., DuBois, R.M., Bernaudin, J.-F., Takahashi, H., Ferrans, V.J., Crystal, R.G. 1989. Expression of the neutrophil elastase gene during human bone marrow cell differentiation. *J Exp Med* **169**:833-45.
- Freije JM, Diez-Itza I, Balbin M, Sanchez LM, Blasco R, Tolivia J, Lopez-Otin C., 1994. Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. *J Biol Chem* 1994 Jun 17;**269**(24):16766-73

- Friedman AD, Nuchprayoon I, Shang J, Simkevich CP, Luo M, Rosmarin AG. 1999. An enhancer located between the neutrophil elastase and proteinase 3 promoters is activated by Sp1 and an Ets factor. *J Biol Chem*;274(2):1085-91
- Frohlich, D., Eiber, R.M., Jochum, M., Billing, A. 1997. Perioperative pattern of peritoneal interleukin 8, tumour necrosis factor- $\alpha$ , and granulocyte elastase release in human secondary peritonitis. *Cytokine* 9:288-95.
- Furie B, Furie BC, 1995. The molecular basis of platelet and endothelial cell interaction with neutrophils and monocytes: role of P-selectin and the P-selectin ligand, PSGL-1. *Thromb Haemost* Jul;74(1):224-7.
- Gadek, J.E., Fells, G.A., Wright, D.G., Crystal, R.G. 1980. Human neutrophil elastase functions as a type III collagen "collagenase". *Biochem Biophys Res Commun* 95:1815-22.
- Gearing, A.J.H., Newman, W. 1993. Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol Today* 14:506-12.
- Geissler, D., Gaggl, S., Most, J., Greil, R., Herold, M., Dietrich, M. 1990. A monoclonal antibody directed against the human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) modulates the release of tumor necrosis factor- $\alpha$ , interferon- $\gamma$  and interleukin 1. *Eur J Immunol* 20:2591-96.
- Gerdes J, Van Baarlen J, Pileri S, Schwarting R, Van Unnik JA, Stein H. 1987. Tumor cell growth fraction in Hodgkin's disease. *Am J Pathol*;128(3):390-3.
- Gerwin N, Gonzalo JA, Lloyd C, Coyle AJ, Reiss Y, Banu N, Wang B, Xu H, Avraham H, Engelhardt B, Springer TA, Gutierrez-Ramos JC. 1999. Prolonged eosinophil accumulation in allergic lung interstitium of ICAM-2 deficient mice results in extended hyperresponsiveness. *Immunity*;10(1):9-16.
- Gluck L, Merritt TA, Cochrane CG, Holcomb K, Bohl B, Hallman M, Strayer D, Edwards DK. 1983. Elastase and alpha 1-proteinase inhibitor activity in tracheal aspirates during respiratory distress syndrome. Role of inflammation in the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *J Clin Invest* Aug;72(2):656-66
- Goldstein, W., Döring, G. 1986. Lysosomal enzymes from polymorphonuclear leukocytes and proteinase inhibitors in patients with cystic fibrosis. *134*:49-56.
- Greenberger, P.A. 1997. Immunologic aspects of lung diseases and cystic fibrosis. *JAMA* 278:1924-30.

- Greene J, Wang M, Liu YE, Raymond LA, Rosen C, Shi YE. 1996. Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *J Biol Chem* Nov 29;271(48):30375-80.
- Greve, J.M., Davis, G., Meyer, A.M., Forte, C.P., Yost, S.C., Marlor, C.W., Kamarck, M.E., McClelland, A. 1989. The major human rhinovirus receptor is ICAM-1. *Cell* 56:839-47.
- Gurtner GC, Davis V, Li H, McCoy MJ, Sharpe A, Cybulsky MI., 1995. Targeted disruption of the murine VCAM1 gene: essential role of VCAM-1 in chorioallantoic fusion and placentation. *Genes Dev* Jan 1;9(1):88-101.
- Hanasaki, K., Varki, A., Stamenkovich, I., Bevilacqua, M.P. 1994. Cytokine-induced galactoside  $\alpha$ 2,6-sialyltransferase in human endothelial cells mediates  $\alpha$ 2,6sialylation of adhesion molecules and CD22 ligands. *J Biol Chem* 269:10637-43.
- Hansen ER, Bang B, Larsen JK, Vejlsgaard GL, Baadsgaard O, 1994. In cutaneous T-cell lymphoma, class II MHC molecules on CD1+ antigen-presenting cells are upregulated in involved compared with uninvolved epidermis *Br J Dermatol*;131(6):780-8.
- Haran-Ghera N, Peled A, Krautghamer R, Resnitzky P..1992. Initiation and promotion in radiation-induced myeloid leukemia.*Leukemia*;6(7):689-95.
- Harendza S, Lovett DH, Stahl RA. 2000. The hematopoietic transcription factor PU.1 represses gelatinase A transcription in glomerular mesangial cells. *J Biol Chem*. 30; 275(26):19552-9.
- Himelstein BP, Canete-Soler R, Bernhard EJ, Dilks DW, Muschel RJ. 1994. Metalloproteinases in tumor progression: the contribution of MMP-9. *Invasion Metastasis*;14(1-6):246-58.
- Hoare S, Copland JA, Wood TG, Jeng YJ, Izban MG, Soloff MS. 1999. Identification of a GABP alpha/beta binding site involved in the induction of oxytocin receptor gene expression in human breast cells, potentiation by c-Fos/c-Jun. *Endocrinology*;140(5):2268-79.
- Holland, J., Owens, T. 1997. Signaling through intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in a B cell lymphoma line; The activation of Lyn tyrosine kinase and the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 272:9108-12.

- Homandberg GA, Hui F. 1996. Association of proteoglycan degradation with catabolic cytokine and stromelysin release from cartilage cultured with fibronectin fragments. *Arch Biochem Biophys*;334(2):325-31.
- Hopken UE, Lu B, Gerard NP, Gerard C. 1996. The C5a chemoattractant receptor mediates mucosal defence to infection. *Nature* 5;383(6595):86-9.
- Horssen van, M., Loman, S., Rijkers, G.T., Boom, S.E., Bloem, A.C. 1995. Co-ligation of ICAM-1 (CD54) and membrane IgM negatively affects B cell receptor signaling. *Eur J Immunol* 25:154-8.
- Huang C, Springer TA. 1995. A binding interface on the I domain of lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) required for specific interaction with intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1). *J Biol Chem* ;270(32):19008-16.
- Imai K, Shikata H, Okada Y. 1995. Degradation of vitronectin by matrix metalloproteinases-1, -2, -3, -7 and -9. *FEBS Lett*;369(2-3):249-51.
- Imai S, Konttinen YT, Jumppanen M, Lindy O, Ceponis A, Kemppinen P, Sorsa T, Santavirta S, Xu JW, Lopez-Otin C. 1998. High levels of expression of collagenase-3 (MMP-13) in pathological conditions associated with a foreign-body reaction. *J Bone Joint Surg Br*;80(4):701-10.
- Imai Y, Lasky LA, Rosen SD. 1993. Sulphation requirement for GlyCAM-1, an endothelial ligand for L-selectin. *Nature*;361(6412):555-7.
- Itoh Y, Nagase H. 1995. Preferential inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinases -1 that is bound to the precursor of matrix metalloproteinase 9 (progelatinase B) by human neutrophil elastase. *J Biol Chem*;270(28):16518-21.
- Jackson SP. 1996. The recognition of DNA damage *Curr Opin Genet Dev*;6(1):19-25.
- Janet Fricker. 1999. - A role for interleukin 13 in Hodgkin's disease [News], *Molecular Medicine Today*, 5:11:463-71.
- Janoff A, Scherer J. 1968. Mediators of inflammation in leukocyte lysosomes. IX. Elastolytic activity in granules of human polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med*;128(5):1137-55.
- Janoff, A., Feinstein, G., Malemud, C.J., Elias, J.M. 1976. Degradation of cartilage proteoglycan by human leukocyte granule neutral proteases--a model of joint injury. 1. Penetration of enzyme into rabbit articular cartilage and release of <sup>35</sup>S04-labeled material from the tissue. *J Clin Invest* 57:615-24.

- Jansen, J.H., van der Harst, D., Wientjens G.J.H.M., Kooy-Winkelaar, Y.M.C., Brand, A., Willemze, R., Kluin-Nelemans, H.C. 1992. Induction of CD11a/leukocyte function antigen-1 and CD54/intercellular adhesion molecules on hairy cell leukemia cells is accompanied by enhanced susceptibility to T-cell but not lymphokine-activated killer-cell cytotoxicity. *Blood* **80**:478-83.
- Jenne, D.E. 1994. Structure of the azurocidin, proteinase 3, and neutrophil elastase genes; Implications for inflammation and vasculitis. *Am J Respir Crit Care Med* **150**:S147-S154.
- Jox A, Wolf J, Diehl V. 1997. Hodgkin's disease biology: recent advances. *Hematol Oncol Nov*;15(4):165-71
- Kafienah, W., Buttle, D.J., Burnett, D., Hollander, A.P. 1998. Cleavage of native type 1 collagen by human neutrophil elastase. *Biochem J* **330**:897-902.
- Kaplan HS, Lieberman M, Decleve A, Ricciardi-Castagnoli P, Boniver J, Finn OJ. 1979. Establishment, characterization and virus expression of cell lines derived from radiation- and virus-induced lymphomas of C57BL/Ka mice. *Int J Cancer Aug*;24(2):168-77.
- Kapp U, Yeh WC, Patterson B, Elia AJ, Kagi D, Ho A, Hessel A, Tipword M, Williams A, Mirtsos C, Itie A, Moyle M, Mak TW. 1999. Interleukin 13 is secreted by and stimulates the growth of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *J Exp Med*;189(12):1939-46.
- Kidokoro Y, Kravis TC, Moser KM, Taylor JC, Crawford IP. 1977. Relationship of leukocyte elastase concentration to severity of emphysema in homozygous alpha1-antitrypsin-deficient persons. *Am Rev Respir Dis May*;115(5):793-03.
- King, P.D., Sandberg, E.T., Selvakumar, A., Fang, P., Beaudet, A.L., Dupont, B. 1995. Novel isoforms of murine intercellular adhesion molecules generated by alternative RNA splicing. *J Immunol* **154**:6080-93.
- Kita, Y., Takashi, T., Iigo, Y., Tamatani, T., Miyasaki, M., Horiuchi, T. 1992. Sequence and expression of rat ICAM-1. *Biochim Biophys Acta* **1131**:108-10.
- Kossakowska AE, Edwards DR, Prusinkiewicz C, Zhang MC, Guo D, Urbanski SJ, Grogan T, Marquez LA, 1999. Interleukin-6 regulation of matrix metalloproteinase (MMP-2 and MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1) expression in malignant non-Hodgkin's lymphomas. *Blood*;94(6):2080-9.

- Kossakowska AE, Hinek A, Edwards DR, Lim MS, Zhang CL, Breitman DR, Prusinkiewicz C, Stabbler AL. 1998. Proteolytic activity of human non-Hodgkin's lymphomas. *Am J Pathol* Feb; **152**(2):565-76.
- Kossakowska AE, Urbanski SJ, Watson A, Hayden LJ, Edwards DR. 1993. Patterns of expression of metalloproteinases and their inhibitors in human malignant lymphomas. *Oncol Res*; **5**(1):19-28.
- Krane SM, Byrne MH, Lemaitre V, Henriot P, Jeffrey JJ, Witter JP, Liu X, Wu H, Jaenisch R, Eeckhout Y. 1996. Different collagenase gene products have different roles in degradation of type I collagen. *J Biol Chem*; **271**(45):28509-15.
- Kruger A, Fata JE, Khokha R. 1997. Altered tumor growth and metastasis of a T-cell lymphoma in Timp-1 transgenic mice. *Blood*; **90**(5):1993-2000.
- Kupfer, A., Singer, S.J. 1989. Cell biology of cytotoxic and helper T cell functions: immunofluorescence microscopic studies of single cells and cell couples. *Annu Rev Immunol* **7**:309-313.
- Kutas, George j., Armitage James O., Howard O. 2000. Current approaches to the lymphoma. *Patient Care Canada*. **11**:6-14.
- Kwak LW, Campbell MJ, Zelenetz AD, Levy R. 1991. Transfer of specific immunity to B-cell lymphoma with syngeneic bone marrow in mice: a strategy for using autologous marrow as an anti-tumor therapy. *Blood* Nov 15; **78**(10):2768-72.
- Lalancette M, Aoudjit F, Potworowski EF, St-Pierre Y. 2000. Resistance of ICAM-1-deficient mice to metastasis overcome by increased aggressiveness of lymphoma cells. *Blood* Jan 1; **95**(1):314-9.
- Languino, L.R., Duperray, A., Joganic, K.J., Fornaro, M., Thornton, G.B., Altieri, D.C. 1995. Regulation of leukocyte-endothelium interaction and leukocyte transendothelial migration by intercellular adhesion molecule 1-fibrinogen recognition. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**:1505-09.
- Languino, L.R., Plescia, J., Duperray, A., Brian, A.A., Plow, E.F., Geltosky, J.E., Altieri, D.C. 1993. Fibrinogen mediates leukocyte adhesion to vascular endothelium through an ICAM-1-dependent pathway. *Cell* **73**:1423-34.
- Lasky LA, Singer MS, Dowbenko D, Imai Y, Henzel WJ, Grimley C, Fennie C, Gillett N, Watson SR, Rosen SD. 1992. An endothelial ligand for L-selectin is a novel mucin-like molecule. *Cell* Jun 12; **69**(6):927-38.

- Lazarus GS, Daniels JR, Brown RS, Bladen HA, Fullmer HM. 1968. Degradation of collagen by a human granulocyte collagenolytic system. *J Clin Invest* Dec;47(12):2622-9
- Leavell, K.J., Peterson, M.W., Gross, T.J. 1997. Human neutrophil elastase abolishes interleukin-8 chemotactic activity. *J Leukoc Biol* 61:361-66.
- Lieberman M, Declève A, Ricciardi-Castagnoli P, Boniver J, Finn OJ, Kaplan HS. 1979. Establishment, characterization and virus expression of cell lines derived from radiation- and virus-induced lymphomas of C57BL/Ka mice. *Int J Cancer*;24(2):168-77.
- Lieberman M, Kaplan HS. 1966. Lymphoid tumor induction by mouse thymocytes infected in vitro with radiation leukemia virus. *Natl Cancer Inst Monogr*;22: 549-57
- Liesveld JL, Frediani KE, Harbol AW, DiPersio JF, Abboud CN. 1994. Characterization of the adherence of normal and leukemic CD34+ cells to endothelial monolayers. *Leukemia*;8(12):2111-7.
- Liou, T.G., Campbell, E.J. 1995. Nonisotropic enzyme-inhibitor interactions: A novel nonoxidative mechanism for quantum proteolysis by human neutrophils. *Biochem* 34:16171-77.
- Liou, T.G., Campbell, E.J. 1996. Quantum proteolysis resulting from release of single granules by human neutrophils. *J Immunol* 157:2624-31.
- Lloberas J, Soler C, Celada A. 1999. The key role of PU.1/SPI-1 in B cells, myeloid cells and macrophages. *Immunol Today* Apr;20(4):184-89
- Lo, S.K., Detmers, P.A., Levin, S.M., Wright, S.D. 1989. Transient adhesion of neutrophils to endothelium. *J Exp Med* 169:1779-93.
- Lub, M., van Kooyk, Y., Figdor, C.G. 1996. Competition between lymphocyte function-associated antigen I (CD11a/CD18) and Mac-1 (CD11b/CD18) for binding to intercellular adhesion molecules (CD54). *J Leukoc Biol* 59:648-55.
- Lungarella, G.R., Menegazzi, C., Gardi, P., Spessoto, M., Margherita de Santi, P., Bertocin, P., Patriarca, P., Calzoni, P., Zabucchi, G. 1992. Identification of elastase in human eosinophils: immunolocalization, isolation, and partial characterization. *Arch Biochem Biophys* 292:128-39.

- Lyons PD, Benveniste EN. 1998. Cleavage of membrane-associated ICAM-1 from astrocytes: involvement of a metalloprotease. *Glia*;22(2):103-12.
- Madri JA, Graesser D, Haas T. 1996. The roles of adhesion molecules and proteinases in lymphocyte transendothelial migration. *Biochem Cell Biol*;74(6):749-57.
- Magrath IT. 1991. African Burkitt's lymphoma. History, biology, clinical features, and treatment. *Am J Pediatr Hematol Oncol*;13(2):222-46
- Mainardi, C.L., Hasty, D.L., Seyer, J.M., Kang, A.H. 1980. Specific cleavage of human type III collagen by human polymorphonuclear leukocyte elastase. *J Biol Chem* 255:12006-10.
- Maio, M., Tessitori, G., Pinto, A., Temponi, M., Colombatti, A., Ferrone, S. 1989. Differential role of distinct determinants of intercellular adhesion molecules in immunologic phenomena. *J Immunol* 143:181-88.
- Mak TW, Kapp U, Yeh WC, Patterson B, Elia AJ, Kagi D, Ho A, Hessel A, Tipword M, Williams A, Mirtsos C, Itie A, Moyle M. 1999. Interleukin 13 is secreted by and stimulates the growth of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *J Exp Med*;189(12):1939-46.
- Makgoba, M.W., Sanders, M.E., Ginther-Luce, G.E., Dustin, M.L., Springer, T.A., Clark, E.A., Mannoni, P., Shaw, S. 1988. ICAM-1 a ligand for LFA-1-dependent adhesion of B, T, and myeloid cells. *Nature* 331:86-88.
- Manes S, Mira E, Barbacid MM, Cipres A, Fernandez-Resa P, Buesa JM, Merida I, Aracil M, Marquez G, Martinez-A C. 1997. Identification of insulin-like growth factor-binding protein-1 as a potential physiological substrate for human stromelysin-3. *J Biol Chem*;272(41):25706-12.
- Manning, A.M., Lu, H.F., Kukielka, G.L., Oliver, M.G., Ty, T., Toman, C.A., Drong, R.F., Slightom, J.L., Ballantyne, C.M., Entman, M.L., Smith, C.W., Anderson, D.C. 1995. Cloning and comparative sequence analysis of the gene encoding canine intercellular adhesion molecule- I (ICAM- 1). *Gene* 156:291-5.
- Marlin SD, Springer TA. 1987. Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). *Cell* Dec 4;51(5):813-9.
- Marlin, S.D., Staunton, D.E., Springer, T.A., Stratowa, C., Sommergruber, W., Merluzzi, V.J. 1990. A soluble form of intercellular adhesion molecules inhibits rhinovirus infection. *Nature* 344:70-72.

- Martin, S., Casasnovas, J.M., Staunton, D.E., Springer, T.A. 1993. Efficient neutralization and disruption of rhinovirus by chimeric ICAM-1/immunoglobulin molecules. *J Virol* **67**:3561-68.
- Martin, S., Martin, A., Staunton, D.E., Springer, T.A. 1993. Functional studies of truncated soluble intercellular adhesion molecules expressed in *E. Vcherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **37**:1278-85.
- Matheny HE, Deem TL, Cook-Mills JM. 2000. Lymphocyte migration through monolayers of endothelial cell lines involves VCAM-1 signaling via endothelial cell NADPH oxidase. *J Immunol*; **164**(12):6550-9.
- Matsuzawa K, Fukuyama K, Hubbard SL, Dirks PB, Rutka JT. 1996. Transfection of an invasive human astrocytoma cell line with a TIMP-1 cDNA: modulation of astrocytoma invasive potential. *J Neuropathol Exp Neurol*; **55**(1):88-96
- McClelland, A., DeBear, J., Connolly Yost, S., Meyer, A.M., Marlor, C.W., Greve, M. 1991. Identification of monoclonal antibody epitopes and critical residues for rhinovirus binding in domain 1 of intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**:7993-97.
- McCourt, P.A.G., Ek, B., Forsberg, N., Gustafson, S. 1994. Intercellular adhesion molecules is a cell surface receptor for Hyaluronan. *J Biol Chem* **269**:30081-84.
- McDonald, J.A., Kelley, D.G. 1980. Degradation of fibronectin by human leukocyte elastase. Release of biologically active fragments. *J Biol Chem* **255**:8848-59.
- McElvaney, N.G., Hubbard, R.C., Birrer, P., Chernick, M.S., Caplan, D.B., Frank, M.M., Crystal, R.G. 1991. Aerosol  $\alpha$ 1-antitrypsin treatment for cystic fibrosis. *Lancet* **337**:392-94.
- McRae, B., Nakajima, K., Travis, J., Powers, J.C. 1980. Studies on reactivity of human leukocyte elastase, cathepsin G, and porcine pancreatic elastase toward peptides including sequences related to the reactive sites of  $\alpha$ 1-protease inhibitor ( $\alpha$ -1antitrypsin). *Biochemistry* **19**:3973-78.
- Meier, H.L., Schulman, E.S., Heck, L.W., MacGlashan, D., Newhall, H.H., Kaplan, A.P. 1989. Release of elastase from purified human lung mast cells and basophils. *Inflammation* **13**:295-06.
- Melo JV, Robinson DS, De Oliveira MP, Thompson IW, Lampert IA, Ng JP, Galton DA, Catovsky D. 1988. Morphology and immunology of circulating cells in leukaemic phase of follicular lymphoma. *J Clin Pathol*; **41**(9):951-9.

- Meng Q, Malinovskii V, Huang W, Hu Y, Chung L, Nagase H, Bode W, Maskos K, Brew K. 1999. Residue 2 of TIMP-1 is a major determinant of affinity and specificity for matrix metalloproteinases but effects of substitutions do not correlate with those of the corresponding P1' residue of substrate. *J Biol Chem*;274(15):10184-9.
- Messinger Y, Chelstrom L, Gunther R, Uckun FM. 1996. Selective homing of human leukemic B-cell precursors to specific lymphohematopoietic microenvironments in SCID mice: a role for the beta 1 integrin family surface adhesion molecules VLA-4 and VLA-5. *Leuk Lymphoma*;23(1-2):61-9.
- Meyer, D.M., Dustin, M.L., Carron, C.P. 1995. Characterization of intercellular adhesion molecules ectodomain (sICAM-1) as an inhibitor of lymphocyte function-associated molecules interaction with ICAM-1. *J Immunol* 155:3578-84.
- Millar EK, Waldron S, Spencer A, Braye S. 1999. CD10 positive thyroid marginal zone non-Hodgkin lymphoma, *J Clin Pathol*;52(11):849-50
- Miller, J., Knorr, R., Ferrone, M., Houdei, R., Carron, C.P., Dustin, M.L. 1995. Intercellular adhesion molecule- I dimerisation and its consequences for adhesion mediated by lymphocyte function associated-1. *J Exp Med* 182:1231-41.
- Moroz LA. 1981. Mini-plasminogen: a mechanism for leukocyte modulation of plasminogen activation by urokinase. *Blood*;58(1):97-104.
- Möst, J., Schwaeble, W., Dierich, M.P. 1992. Expression of intercellular adhesion molecules (ICAM-1) on human monocytes. *Immunobiol* 185:327-36.
- Möst, J., Schwaeble, W., Drach, J., Sommerauer, A., Dierich, M.P. 1992. Regulation of the expression of ICAM-1 on human monocytes and monocytic tumor cell lines. *J Immunol* 148:1635-42.
- Murphy G, Reynolds JJ, Bretz U, Baggiolini M. 1977. Collagenase is a component of the specific granules of human neutrophil leucocytes. *Biochem J* Jan 15;162(1):195-7.
- Nademanee A, Molina A, O'Donnell MR, Daxis A, Snyder DS, Parker P, Stein A, Smith E, Planas I, Kashyap A, Spielberger R, Fung H, Wong KK, Somlo G, Margolin K, Chow W, Sniecinski I, Vora N, Blume KG, Niland J, Forman SJ, 1997. Results of high-dose therapy and autologous bone marrow/stem cell transplantation during remission in poor-risk intermediate- and high-grade lymphoma: international index high and high-intermediate risk group. *Blood*;90(10):3844-52.

- Nademanee A, Molina A, O'Donnell MR, Dagens A, Snyder DS, Parker P, Stein A, Smith E, Planas I, Kashyap A. 1997. Results of high-dose therapy and autologous bone marrow/stem cell transplantation during remission in poor-risk intermediate- and high-grade lymphoma: international index high and high-intermediate risk group. *Blood*;90(10):3844-52.
- Nagai Y, Lapiere CM, Gross J. 1966. Tadpole collagenase. Preparation and purification. *Biochemistry*;5(10):3123-30
- Nagase H, Itoh Y, 1995. Preferential inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 that is bound to the precursor of matrix metalloproteinase 9 (progelatinase B) by human neutrophil elastase. *J Biol Chem* 270(28):16518-21.
- Nagase H, Meng Q, Malinovskii V, Huang W, Chung L, Bode W, Maskos K, Brew K. 1999. Engineering of selective TIMPs. *Ann N Y Acad Sci.* 30;878:1-11.
- Nagase H, Ogata Y, Suzuki K, Enghild JJ, Salvesen. 1991. Substrate specificities and activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biochem Soc Trans*;19(3):715-8.
- Nagase H. 1995. Human stromelysins 1 and 2. *Methods Enzymol*;248:449-70.
- Nakagawa T, Kubota T, Kabuto M, Sato K, Kawano H, Hayakawa T, Okada Y. 1994. Production of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 by human brain tumors. *J Neurosurg*;81(1):69-77.
- Nakajima, K., Powers, J.C. 1979. Mapping the extended substrate binding site of cathepsin G and human leukocyte elastase; Studies with peptide substrates related to the  $\alpha$ 1-protease inhibitor reactive site. *J Biol Chem* 254:4027-32.
- Navia, M.A., Brian, McKeever, B.M., Springer, J.P., Lin, T.-Y., Williams, H.R., Fluder, E.M., Dorn, C.P., Hoogsteen. 1989. Structure of human neutrophil elastase in complex with a peptide chloromethyl ketone inhibitor at 1.84-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:7-11.
- Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM. 2000. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol*;18(5):1135-49.
- Ockenhouse, C.F., Betageri, R., Springer, T.A., Staunton, D.E. 1992. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes bind ICAM-1 at a site distinct from LFA-1, Mac-1 and human rhinovirus. *Cell* 68:63-69.

- Ohlsson, K., Olsson, I. 1974. The neutral proteases of human granulocytes. *Eur J Biochem* **12**:519-30.
- Ohlsson, S., Tufvesson, B., Polling, A., Ohlsson K. 1997. Distribution of the secretory leucocyte proteinase inhibitor in human articular cartilage. *J Biol Chem* **378**:1055-58.
- Ortega V, Verastegui E, Flores G, Meneses A, Ocadiz R, Alfaro G.. 1998. Non-Hodgkin's lymphomas in Mexico. A clinicopathological and molecular analysis. *Leuk Lymphoma*; **31**(5-6):575-81.
- Overall CM, Sodek J. 1987. Initial characterization of a neutral metalloproteinase, active on native 3/4-collagen fragments, synthesized by ROS 17/2.8 osteoblastic cells, periodontal fibroblasts, and identified in gingival crevicular fluid. *J Dent Res*; **66**(7):1271-82.
- Owen, C.A., Campbell, M.A., Sannes, P.L., Boukedes, S.S., Campbell, E.J. 1995. Cell surface-bound elastase and cathepsin G on human neutrophils: A novel, nonoxidative mechanism by which neutrophils focus and preserve catalytic activity of serine proteinases. *J Cell Biol* **131**:775-89.
- Peters JP, Rademakers LH, de Boer RJ, Van Unnik J.. 1987. Cellular composition of follicles of follicle centre cell lymphomas in relation to germinal centres of reactive lymph nodes. A morphometrical electromicroscopical study. *J Pathol*; **153**(3):233-44.
- Peterson BA. 1999. Current treatment of follicular low-grade lymphomas. *Semin Oncol*; **26**(5 Suppl 14):2-11.
- Plow, E.F. 1982. Leukocyte elastase release during blood coagulation. *J Clin Invest* **69**:564-76.
- Potter MD, Buijs A, Kreider B, van Rompaey L, Grosveld GC. 2000. Identification and characterization of a new human ETS-family transcription factor, TEL2, that is expressed in hematopoietic tissues and can associate with TEL1/ETV6. *Blood Jun* **1**; **95**(11):3341-8.
- Powell WC, Fingleton B, Wilson CL, Boothby M, Matrisian LM. 1999. The metalloproteinase matrilysin proteolytically generates active soluble Fas ligand and potentiates epithelial cell apoptosis. *Curr Biol*; **9**(24):1441-7.

- Puente XS, Pendas AM, Llano E, Velasco G, Lopez-Otin C. 1996. Molecular cloning of a novel membrane-type matrix metalloproteinase from a human breast carcinoma. *Cancer Res*;56(5):944-9.
- Quintanilla-Martinez L, Zukerberg LR, Ferry JA, Harris NL. 1995. Extramedullary tumors of lymphoid or myeloid blasts. The role of immunohistology in diagnosis and classification. *Am J Clin Pathol*;104(4):431-43.
- Reilly, P.L., Woska, J.R., Jeanfavre, D.D., McNally, E., Rothlein, R., Bormann, B.J. 1995. The native structure of intercellular adhesion molecules (ICAM-1) is a dimer; Correlation with binding to LFA-1. *J Immunol* 155:529-32.
- Remold-O'Donnell E, Parent D. 1995. Specific sensitivity of CD43 to neutrophil elastase. *Blood*;86(6):2395-402.
- Renesto, P., Si-Tahar, M., Moniatte, M., Balloy, V., Van Dorselaer, A., Pidard, D., Chignard, M. 1997. Specific inhibition of thrombin-induced cell activation by the neutrophil proteinase elastase, cathepsin G, and proteinase 3: Evidence for distinct cleavage sites within the aminoterminal domain of the thrombin receptor. *Blood* 89:1944-53.
- Riemann D, Kehlen A, Langner J. 1995. Stimulation of the expression and the enzyme activity of aminopeptidase N/CD13 and dipeptidylpeptidase IV/CD26 on human renal cell carcinoma cells and renal tubular epithelial cells by T cell-derived cytokines, such as IL-4 and IL-13. *Clin Exp Immunol*;100(2):277-83.
- Roberts, R.M., Mathialagan, N., Duffy, J.Y., Smith, G.W. 1995. Regulation and regulatory role of proteinase inhibitors. *Crit Rev Euk Gen Exp* 5:385-436.
- Roossien FF, de Rijk D, Bikker A, Roos E. 1989. Involvement of LFA-1 in lymphoma invasion and metastasis demonstrated with LFA-1-deficient mutants. *J Cell Biol May*;108(5):1979-85.
- Rosen SD. 1993. Cell surface lectins in the immune system. *Semin Immunol Aug*;5(4):237-47.
- Rothlein, R., Czajkowski, M., O'Neill, M.M., Marlin, S.D., Mainolfi, E., Merluzzi, V.J. 1988. Induction of intercellular adhesion molecule I on primary and continuous cell lines by pro-inflammatory cytokines. *J Immunol* 141:1665-69.
- Rothlein, R., Kishimoto, T.K., Mainolfi, E. 1993. Cross-linking of ICAM-1 induces cosignaling of an oxidative burst from mononuclear leukocytes. *J Immunol* 152:2488-95.

- Rothlein, R., Mainolfi, E.A., Czajkowski, Marlin, S.D. 1991. A form of circulating ICAM-1 in human serum. *J Immunol* **147**:3788-93.
- Rubnitzey JE, Pui CH, Downing JR.. 1999. The role of TEL fusion genes in pediatric leukemias. *Leukemia*;13(1):6-13.
- Sallenave, J.M., Si-Tahar, M., Cox, G., Chignard, M., Gauldie, J. 1997. Secretory leukocyte proteinase inhibitor is a major leukocyte elastase inhibitor in human neutrophils. *J Leuk Biol* **61**:695-702.
- Sang QX. 1998. Complex role of matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Cell Res*;8(3):171-7.
- Seminario MC, Bochner BS. 1997. Expression and function of beta 1 integrins on human eosinophils. *Mem Inst Oswaldo Cruz*;92 Suppl **2**:157-64.
- Senior RM, Griffin GL, Fliszar CJ, Shapiro SD, Goldberg GI, Welgus HG. 1991. Human 92- and 72-kilodalton type IV collagenases are elastases. *J Biol*; **266**(12):7870-5.
- Seong DC, Song MY, Henske EP, Zimmerman SO, Champlin RE, Deisseroth AB, Siciliano MJ. 1994. Analysis of interphase cells for the Philadelphia translocation using painting probe made by inter-Alu-polymerase chain reaction from a radiation hybrid. *Blood*;83(8):2268-73.
- Seth, R., Raymond, F.D., Makgoba, M.W. 1991. Circulating ICAM-1 isoforms: diagnostic prospects for inflammatory and immune disorders. *Lancet* **338**:83-84.
- Shang J, Simkevich CP, Luo M, Rosmarin AG, Friedman AD. 1999. An enhancer located between the neutrophil elastase and proteinase 3 promoters is activated by Sp1 and an Ets factor. *J Biol Chem* 1999;274(2):1085-91.
- Simmons, D., Malegapuru, W.M., Seed, B. 1988. ICAM, an adhesion ligand of LFA-1, is homologous to the neural cell adhesion molecule NCAM. *Nature* **331**:624-7.
- Sinha, S., Watorek, W., Karr, S., Giles, J., Bode, W., Travis, J. 1987. Primary structure of human neutrophil elastase. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**:2228-32.
- Si-Tahar, M., Pidard, D., Balloy, V., Moniatte, M., Kieffer, N., Van Dorsselaer, A., Chignard, M. 1997. Human neutrophil elastase proteolytically activates the platelet integrin  $\alpha$ IIb3 through cleavage of the carboxyl terminus of the  $\alpha$ IIb subunit heavy chain. *J Biol Chem* **272**:11636-47.

- Siu, G., Hedrick, S.M., Brian, A.A. 1989. Isolation of the murine intercellular adhesion molecule 1(ICAM-1) gene. *J Immunol* **143**:3813-20.
- Sligh, J.E., Ballantyne, C.M., Rich, S.S., Hawkins, H.K., Smith, C.W., Bradley, A., Beudet, A.L. 1993. Inflammatory and immune responses are impaired in mice deficient in intercellular adhesion molecule-1. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**:8529-33.
- Solomon, A., Gramse, M., Havemann, K. 1978. Proteolytic cleavage of human IgG molecules by neutral proteases of polymorphonuclear leukocytes. *Eur J Immunol* **8**:782-5.
- Soslow RA, Bhargava V, Warnke RA.. 1997. MIC2, TdT, bcl-2, and CD34 expression in paraffin-embedded high-grade lymphoma/acute lymphoblastic leukemia distinguishes between distinct clinicopathologic entities. *Hum Pathol*;28(10):1158-65.
- Spielberger R, Fung H, Wong KK, Somlo G, Margolin K, Chow W, Sniecinski I, Vora N, Blume KG, Niland J, Forman SJ.. 1997. Results of high-dose therapy and autologous bone marrow/stem cell transplantation during remission in poor-risk intermediate- and high-grade lymphoma: international index high and high-intermediate risk group. *Blood*;90(10):3844-52.
- Springer TA, Girard JP. 1995. High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration. *Immunol Today*;16(9):449-57.
- Springer TA, Lawrence MB. 1991 Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell* May 31;65(5):859-73.
- Springer TA. 1995. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol*; **57**:827-72.
- Springer, T.A. 1990. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* **346**:425-34.
- Staunton, D.E., Dustin, M.L., Erickson, H.P., Springer T.A. 1990. The arrangement of the immunoglobulin-like domains of ICAM-1 and the binding sites for LFA-1 and rhinovirus. *Cell* **61**:243-54.
- Staunton, D.E., Dustin, M.L., Springer, T.A. 1989. Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. *Nature* **339**:61-4.

- Staunton, D.E., Marlin, S.D., Stratowa, C., Dustin, M.L., Springer, T.A. 1988. Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene families. *Cell* **52**:925-933.
- Staunton, D.E., Merluzzi, V.J., Rothlein, R., Barton, R., Marlin, S.D., Springer, T.A. 1989. A cell adhesion molecule, ICAM-1, is the major surface receptor for rhinoviruses. *Cell* **56**:849-53.
- Stockley, R.A. 1994. The role of proteinases in the pathogenesis of chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* **150**:S109-113.
- Stolow MA, Bauzon DD, Li J, Sedgwick T, Liang VC, Sang QA, Shi YB. 1996 Identification and characterization of a novel collagenase in *Xenopus laevis*: possible roles during frog development. *Mol Biol Cell*;7(10):1471-83.
- St-Pierre Y, Aoudjit F, Lalancette M, Potworowski EF. 1998. Dissemination of t cell lymphoma to target organs: a post-homing event implicating ICAM-1 and Matrix Metalloproteinases. *Leukemia and lymphoma* **34**(1-2):53-61.
- St-Pierre Y, Potworowski EF. 2000. T cell control of extracellular matrix degradation. *Developmental immunology* vol **08** pp 1-7
- St-Pierre, Y., Desrosiers, M., Tremblay, P., Esteve, P.-O., Opdenakker, G. 1996. Flow cytometric analysis of gelatinase B (MMP-9) activity using immobilized fluorescent substrate on microspheres. *Cytometry* **25**:374-80.
- St-Pierre, Yves, Potworoski, Edouard F. 1999. Interplay between cell adhesion molecules and expression of extracellular proteases in the regulation of T cell function. *Recent Res. Devel. Immunology*, **1**: 339-48.
- Suzuki S, Sakamoto S, Koide M, Kobayashi H, Matsuo M, Shimano C, Matsuo T. 1995. Effective anticoagulation by argatroban during immunoabsorption therapy for malignant rheumatoid arthritis with a high polymorphonuclear leukocyte elastase level. *Thromb Res Oct* **1;80**(1):93-8.
- Takahashi, H., Nukiwa, T., Yoshimura, K., Quick, C.D., States, D.J., Holmes, M.D., Whang-Peng, J., Knutsen, T., Crystal, R.G. 1988. Structure of the human neutrophil elastase gene. *J Biol Chem* **263**:14739-47.
- Takino T, Sato H, Shinagawa A, Seiki M. 1995. Identification of the second membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP-2) gene from a human placenta cDNA library. MT-MMPs form a unique membrane-type subclass in the MMP family. *J Biol Chem*;270(39):23013-20.

- Taylor PR, Angus B, Owen JP, Proctor SJ. 1998 Hodgkin's disease: a population-adjusted clinical epidemiology study (PACE) of management at presentation. Northern Region Lymphoma Group. *QJM*;91(2):131-9.
- Taylor, J.C., Crawford, I.P., Hugli, T.E. 1977. Limited degradation of the third component (C3) of human complement by human leukocyte elastase (HLE): Partial characterization of C3 fragments. *Biochemistry* 16:3390-98.
- Thompson, R.C., Ohlsson, K. 1986. Isolation, properties, and complete amino acid sequence of human secretory leukocyte protease inhibitor, a potent inhibitor of leukocyte elastase. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:6692-6.
- Tian, L., Yoshihara, Y., Mizuno, T., Mori, K., Gahmberg, C.G. 1997. The neuronal glycoprotein telencephalin is a cellular ligand for the CD11a/CD18 leukocyte integrin. *J Immunol* 158:928-36.
- Tokuraku M, Sato H, Murakami S, Okada Y, Watanabe Y, Seiki M. 1995. Activation of the precursor of gelatinase A/72 kDa type IV collagenase/MMP-2 in lung carcinomas correlates with the expression of membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) and with lymph node metastasis. *Int J Cancer* Oct 20;64(5):355-9.
- Tokuraku M, Sato H, Watanabe Y, Seiki M. 1995. Expression of membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) and activation of MMP-2 in lung cancer. *Nippon Rinsho* Jul;53(7):1822-6.
- Tosi, M.F., Berger, M. 1988. Functional differences between the 40 kDa and 50 to 70 kDa IgG Fc receptors on human neutrophils revealed by elastase treatment and antireceptor antibodies. *J Immunol* 141:2097-102.
- Travis J, Watorek W, Farley D, Salvesen G. 1988. Neutrophil elastase and cathepsin G: structure, function, and biological control. *Adv Exp Med Biol*;240:23-31.
- Travis, J. 1988. Structure, function, and control of neutrophil proteinases. *Am J Med* 84:37-42.
- Tulpule A, Levine A. 1999. AIDS-related lymphoma. *Blood Rev*;13(3):147-50.
- van de Stolpe A, Caldenhoven E, Stade BG, Koenderman L, Raaijmakers JA, Johnson JP, van der Saag PT. 1994. 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate- and tumor necrosis factor alpha-mediated induction of intercellular adhesion molecule-1 is inhibited by dexamethasone. Functional analysis of the human intercellular adhesion molecular-1 promoter. *J Biol Chem* 1994;269(8):6185-92.

- Van de Stolpe, A., van der Saag, P.T. 1996. Intercellular adhesion molecule-1. *J. Mol. Med.* **74**:13-33.
- Van Gool SW, Delabie J, Vandenberghe P, Coorevits L, De Wolf-Peeters C, Ceuppens JL. 1997. Expression of B7-2 (CD86) molecules by Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *Leukemia*; **11**(6):846-51.
- Vanlky, F., Wang, P., Patarroyo, M., Klein, E. 1990. Expression of the adhesion molecule ICAM-1 and major histocompatibility complex class I antigens on human tumor cells is required for their interaction with autologous lymphocytes in vitro. *Cancer Immunol Immunother* **31**:19-27.
- Velasco G, Cal S, Merlos-Suarez A, Ferrando AA, Alvarez S, Nakano A, Arribas J, Lopez-Otin C. 2000. Human MT6-matrix metalloproteinase: identification, progelatinase A activation, and expression in brain tumors. *Cancer Res* Feb **15**; **60**(4):877-82.
- Vignola, A.M., Chanez, P., Campbell, A.M., Pinel, A.M., Bousquet, J., Michel, F.B., Godard, P.H. 1994. Quantification and localization of HLA-DR and intercellular adhesion molecules (ICAM-1) molecules on bronchial epithelial cells of asthmatics using confocal microscopy. *Clin Exp Immunol* **96**:104-10.
- Voraberger, G., Schdfer, R., Straowa, C. 1991. Cloning of the human gene for intercellular adhesion molecule I and analysis of its 5'-regulatory region. *J Immunol* **147**:2777-86.
- Voso MT, Hohaus S, Moos M, Haas R. 1997. Lack of t(14;18) polymerase chain reaction-positive cells in highly purified CD34+ cells and their CD19 subsets in patients with follicular lymphoma. *Blood* May **15**; **89**(10):3763-8.
- Wakatsuki, T., Kimura, K., Kimura, F., Shimomiya, N., Ohtsubo, M., Ishizawa, M., Yamamoto, M. 1995. A distinct mRNA encoding a soluble form of ICAM-1 molecule expressed in human tissues. *Cell Adhes Commun* **3**:283-92.
- Wang J, Springer TA. 1998. Structural specializations of immunoglobulin superfamily members for adhesion to integrins and viruses. *Immunol Rev*; **163**:197-215.
- Wei AZ, Mayr I, Bode W. 1988. The refined 2.3 Å crystal structure of human leukocyte elastase in a complex with a valine chloromethyl ketone inhibitor. *FEBS Lett*; **234**(2):367-73.

- Welder, C.A., Lee, D.H., Takei, F. 1993. Inhibition of cell adhesion by microspheres coated with recombinant soluble intercellular adhesion molecule-1. *J Immunol* **150**:2203-10.
- Werb Z, Gordon S. 1975. Elastase secretion by stimulated macrophages. Characterization and regulation. *J Exp Med*; **142**(2):361-77.
- Wiedow, O., Schröder, J.M., Gregory, H., Young, J.A., Christophers, E. 1990. Elafin: An elastase-specific inhibitor of human skin. *J Biol Chem* **265**:14791-95.
- Will H, Hinzmann B. 1995. cDNA sequence and mRNA tissue distribution of a novel human matrix metalloproteinase with a potential transmembrane segment. *Eur J Biochem*; **231**(3):602-8.
- Wilson CL, Matrisian LM. 1996. Matrilysin: an epithelial matrix metalloproteinase with potentially novel functions. *Int J Biochem Cell Biol*; **28**(2):123-36
- Wlodarska I, Pittaluga S, Stul M, Martiat P, Dierlamm J, Michaux L, De Wolf-Peeters C, Cassiman JJ, Mecucci C, Van den Berghe H. 1997. Philadelphia translocation t(9;22)(q34;q11) found in a follicular lymphoma involving not BCR and ABL but IGL-mediated rearrangement of an unknown gene on 9q34. *Genes Chromosomes Cancer*; **20**(2):113-9.
- Wojtowicz-Praga SM, Dickson RB, Hawkins MJ. 1997. Matrix metalloproteinase inhibitors. *Invest New Drugs*; **15**(1):61-75.
- Wright SD, Cai TQ. 1996. Human leukocyte elastase is an endogenous ligand for the integrin CR3 (CD11b/CD18, Mac-1, alpha M beta 2) and modulates polymorphonuclear leukocyte adhesion *J Exp Med*; **184**(4):1213-23 .
- Xia Y, Brown L, Tsan JT, Yang CY, Siciliano MJ, Crist WM, Carroll AJ, Baer R., 1992. The translocation (1;14)(p34;q11) in human T-cell leukemia: chromosome breakage 25 kilobase pairs downstream of the TAL1 protooncogene. *Genes Chromosomes Cancer*; **4**(3):211-6.
- Xu, H., Gonzalo, J.A., St Pierre, Y., Williams, I.R., Kupper, T.S., Cotran, R.S., Springer, T.A., Gutierrez-Ramos, J.C. 1994. Leukocytosis and resistance to septic shock in intercellular adhesion molecule 1 -deficient mice. *J Exp Med* **180**:95-109.
- Ybarrondo, B., O'Rourke, A.M., Brian, A.A., Mescher, M.F. 1994. Contribution of lymphocyte function-associated-1/intercellular adhesion molecules binding to the adhesion/signaling cascade of cytotoxic T lymphocyte activation. *J Exp Med* **179**:359-63.

Zent C, Kim N, Hiebert S, Zhang DE, Tenen DG, Rowley JD, Nucifora G. 1996. Rearrangement of the AML1/CBFA2 gene in myeloid leukemia with the 3;21 translocation: expression of co-existing multiple chimeric genes with similar functions as transcriptional repressors, but with opposite tumorigenic properties. *Curr Top Microbiol Immunol*;211:243-52.

Zimmer M, Medcalf RL, Fink TM, Mattmann C, Lichter P, Jenne DE. 1992. Three human elastase-like genes coordinately expressed in the myelomonocyte lineage are organized as a single genetic locus on 19pter. *Proc Natl Acad Sci USA*;89(17):8215-9.

Sites internet:

<http://www.leukemia-lymphoma.org>

