UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE U.F.R. DE MEDECINE

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

Spécialité: Biomolécules et dynamique cellulaire

Présentée et soutenue publiquement le 18 octobre 2006

par

Arnaud BONNOMET

ROLE DU GENE *hNANOS1* DANS LE PROCESSUS D'INVASION TUMORALE

Composition du jury:

M. le Professeur François-Xavier Maquart (Reims)	Président du jury
Mme le Docteur Marie-Christine Rio (Strasbourg)	Rapporteur
M. le Professeur Jean-Michel Foidart (Liège, Belgique)	Rapporteur
M. le Professeur Frans van Roy (Gand, Belgique)	Examinateur
M. le Professeur Philippe Birembaut (Reims)	Examinateur
Mme le Docteur Béatrice Nawrocki-Raby (Reims)	Directeur de thèse

TITRE: ROLE DU GENE *hNANOS1* DANS LE PROCESSUS D'INVASION TUMORALE

RESUME:

La cadhérine-E est considérée comme un important suppresseur d'invasion dans les carcinomes humains. Cependant, les voies de signalisation intracellulaire régulées par la cadhérine-E sont encore méconnues. Dans ce contexte, nous avons étudié le rôle potentiel dans l'invasion tumorale de hNanos1 (human Nanos 1) dont l'expression est réprimée par la cadhérine-E.

Nous montrons *in vivo* que hNanos1 est surexprimé par les cellules tumorales dans les cancers bronchopulmonaires invasifs avec une localisation préférentielle au front d'invasion des massifs tumoraux. De plus, la surexpression de hNanos1 est associée à un taux d'expression élevé de la MT1-MMP et de la MMP-2, deux métalloprotéinases matricielles (MMPs) particulièrement impliquées dans l'invasion tumorale.

Par différents modèles *in vitro* et *in vivo*, nous démontrons que l'induction de hNanos1 se traduit par l'acquisition d'un phénotype plus dispersé et invasif des cellules tumorales DLD1 et favorise leur dissémination métastatique en souris Nude. Ce potentiel invasif accru est associé à la fois à une redistribution des molécules d'adhérence cadhérine-E, caténine-β, et caténine p120 dans le cytoplasme et à l'augmentation de l'expression de la MT1-MMP et de la MMP-2. De plus, la répression de hNanos1 dans des cellules tumorales invasives Hs578T et BZR induit une diminution de la production de la MT1-MMP et de la MMP-2 tout en réduisant leur potentiel invasif.

Au total, nos résultats démontrent que hNanos1, en régulant les molécules d'adhérence et les MMPs, joue un rôle important dans l'acquisition de propriétés invasives par les cellules tumorales épithéliales.

Mots clés: hNanos1, cadhérine-E, caténines, MMPs, invasion tumorale.

TITLE: ROLE OF hNANOS1 GENE IN THE TUMOR INVASION PROCESS

SUMMARY:

E-cadherin is considered as an important invasion suppressor in human carcinomas. However, the signalling pathways regulated by E-cadherin are yet unknown. In this context, we have studied the role of an E-cadherin-repressed gene, named hNanos1 (human Nanos1), in the tumor invasion process.

In vivo, we show that hNanos1 is overexpressed by tumor cells in invasive bronchopulmonary cancers, preferentially at the invasion front of tumor clusters. Moreover, hNanos1 overexpression is associated with high levels of MT1-MMP and MMP-2, two matrix metalloproteinases (MMPs) which are both implicated in the tumor invasion process.

Using different *in vivo* and *in vitro* models, we demonstrate that hNanos1 induction leads to the acquisition of a more dispersed and invasive phenotype by DLD1 tumor cells and acts in favor of the metastatic dissemination in Nude mice. This enhanced invasive ability is associated with the relocalization of adhesion molecules, E-cadherin, β -catenin and p120-catenin, to the cytoplasm and the increase of MT1-MMP and MMP-2 expression. Furthermore, hNanos1 silencing in Hs578T and BZR invasive tumor cells downregulates MT1-MMP and MMP-2 models.

Taken together, our results demonstrate that hNanos1, by regulating adhesion molecules and MMPs, plays an important role in the acquisition of invasive properties by epithelial tumor cells.

Key words: hNanos1, E-cadherin, catenins, MMPs, tumor invasion.

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES	
LISTE DES TABLEAUX	
LISTE DES ABREVIATIONS	
A. INTRODUCTION	1
A 1 I A PROCRESSION TUMORALE.	1
	······ 1
A.2 BUT DE L'ETUDE:	4
A.3 JONCTIONS INTERCELLULAIRES DE L'EPITHELIUM:	5
A.4 LA CADHERINE-E:	6
A.4.1 STRUCTURE DE LA CADHERINE-E:	6
A.4.2 LE COMPLEXE D'ADHERENCE CADHERINE-E/CATENINES:	
A.4.3 REGULATION DU COMPLEXE CADHERINE-E/CATENINES:	9
A.4.3.1 Phosphorylation du complexe cadhérine-E/caténines:	10
A.4.3.2 Internalisation et recyclage de la cadhérine-E:	11
A.4.3.3 Rôle des GTPases de la famille de Rho:	11
A.4.4 FONCTIONS DE LA CADHERINE-E:	12
A.4.4.1 Régulation des récepteurs à activité tyrosine kinase:	12
A.4.4.2 Régulation de la voie Wnt:	13
A.4.4.3 Régulation de la voie de la caténine p120:	15
A.4.5 LA CADHERINE-E: UN SUPRESSEUR DE TUMEUR ET D'INVASION:	16
A.4.5.1 Répression des complexes cadhérine-E/caténines dans les carcinomes:	17
A.4.5.2 Mécanismes réprimant la cadhérine-E dans les carcinomes:	18
A.4.5.2.1 Inactivation génétique du gène CDH1:	19
A.4.5.2.2 Inactivation épigénétique du gène CDH1:	19
A.4.5.2.2.1 Inactivation de la cadhérine-E par hyperméthylation:	19
A.4.5.2.2.2 Répression transcriptionnelle:	20
A.4.5.2.3 Inactivation post-traductionnelle de la cadhérine-E:	21
A.4.5.2.3.1 Inhibition par phosphorylation des tyrosines:	21
A.4.5.2.3.2 Clivage de la cadhérine-E:	
A.4.5.2.3.3 Inhibition par des protéoglycannes de surface:	
A.4.5.3 Rôle fonctionnel de la cadhérine-E dans le cancer:	

A.4.5.4	Conséquences de la répression de la cadhérine-E au cours de la prog	ression
	tumorale:	24
A.4.5.	4.1 Activation de la voie de la caténine-β nucléaire:	
A.4.5.	4.2 Activation de la voie de la caténine p120:	
A.4.5.	4.3 Activation de la voie de la cadhérine-E soluble:	
A.4.5.	4.4 Activation de la voie des Rho GTPases:	
A.4.5.	4.5 Activation de la voie des récepteurs à tyrosine kinase:	
A.5 LES N	METALLOPROTEINASES MATRICIELLES OU MMPS:	
A.5.1 L	A MATRICE EXTRACELLULAIRE:	
A.5.2 C	CARACTERISTIQUES GENERALES DES MMPs:	30
A.5.2.1	Classification fonctionnelle:	30
A.5.2.2	Classifcation structurale:	39
A.5.3 R	REGULATION DE L'EXPRESSION DES MMPS:	41
A.5.3.1	Régulation transcriptionnelle des MMPs:	41
A.5.3.	1.1 Généralités:	41
A.5.3.	1.2 Régulation transcriptionnelle de la MMP-2:	42
A.5.3.	1.3 Régulation transcriptionnelle de la MT1-MMP:	45
A.5.3.2	Régulation de l'activité des MMPs:	46
A.5.3.	2.1 Activation des MMPs:	46
A.5	.3.2.1.1 Mécanismes généraux:	
A.5	.3.2.1.2 Activation de la pro-MMP-2 par la MT1-MMP:	47
A.5.3.	2.2 Inhibition de l'activité des MMPs:	49
A.5	.3.2.2.1 Les TIMPs:	49
A.5	.3.2.2.2 La macroglobuline- α_2 :	51
A.5	.3.2.2.3 Autres inhibiteurs connus:	52
A.5.4 R	COLE DES MMPS DANS LE CANCER:	53
A.5.4.1	Perte d'adhérence:	54
A.5.4.2	Invasion tumorale:	55
A.5.4.3	Prolifération/survie:	56
A.5.4.4	Angiogenèse:	57
A.5.4.5	Intravasation, extravasation et croissance des tumeurs métastatiques:	58
A.5.5 N	IMPS, CIBLES THERAPEUTIQUES:	59
A.5.5.1	Généralités:	59

A.5.5.2	Inhibiteurs synthétiques spécifiques des MMPs:	. 60
A.5.5.3	Autres molécules inhibitrices des MMPs:	. 61
A.5.6	REGULATION DES MMPS PAR LA CADHERINE-E AU COURS DE L'INVAS	ION
	TUMORALE:	. 61
A.6 NAN	NOS:	. 63
A.6.1	NANOS CHEZ LA DROSOPHILE:	. 63
A.6.1.1	Détermination de l'axe antéro-postérieur:	. 63
A.6.1.2	Développement des lignées germinales:	. 64
A.6.1.3	Autres fonctions attribuées à Nanos chez la drosophile:	. 65
A.6.2	Homologues de Nanos:	. 65
A.6.3	HNANOS1 ET CANCER:	. 66
B. MAT	FERIELS ET METHODES	. 68
D1 EVD	DESSION IN VIVO DE UNANOSI DANS LES CANCEDS DOMCI	ю
D.I EAP	KESSION IN VIVO DE HINANOSI DANS LES CANCERS BRONCH MONAIDES.	10-
FUL		. 00
B.1.1	ECHANTILLONS TISSULAIRES:	. 68
B.1.2	ANALYSE PAR RT-PCR:	. 68
B.1.2.1	Préparation des échantillons d'ARN:	. 68
B.1.2.2	RT-PCR:	. 69
B.1.2.3	Analyse des résultats:	. 70
B.1.3	HYBRIDATION IN SITU:	. 70
B.1.3.1	Préparation des coupes:	. 70
B.1.3.2	Linéarisation du plasmide:	. 70
B.1.3.3	Marquage des sondes:	. 71
B.1.3.4	Hybridation:	. 71
B.1.3.5	Révélation immunohistochimique:	. 71
B.2 INF	LUENCE DE HNANOS1 SUR LE COMPORTEMENT INVASIF	DE
LIG	NEES CELLULAIRES TUMORALES	.72
B.2.1	CULTURE CELLULAIRE:	. 72
B.2.1.1	Lignées cellulaires:	. 72
B.2.1.2	Conditions de culture:	. 72
B.2.2	MODELE DE DISPERSION CELLULAIRE:	. 73
B.2.2.1	Vidéomicroscopie:	. 73

B.2.2.2	2 Analyse des images:	73
B.2.3	MODELE DE MIGRATION CELLULAIRE EN ANNEAU:	75
B.2.4	TEST D'INVASION EN CHAMBRE DE BOYDEN:	75
B.2.5	TEST D'INVASION IN VIVO EN SOURIS NUDE:	76
B.2.6	TRANSFECTION TRANSITOIRE DE SIRNA SPECIFIQUES DE HNANOS1:	76
B.2.7	ANALYSE PAR RT-PCR:	77
B.2.7.1	l Préparation des échantillons d'ARN:	77
B.2.7.2	2 RT-PCR:	77
B.2.8	ANALYSE PAR WESTERN BLOT:	78
<i>B</i> .2.8.1	l Préparation des échantillons protéiques:	78
<i>B</i> .2.8.2	2 Western blotting:	79
B.2.9	ANALYSE PAR ZYMOGRAPHIE	80
B.2.10	IMMUNOCYTOCHIMIE:	80
B.2.11	Analyse de l'activite de la catenine- β nucleaire:	81
B.2.12	ANALYSE STATISTIQUE DES DONNEES:	81
a		00
C. RES	SULTATS	82
C. RES	SULTATS ^E PARTIE: EXPRESSION <i>IN VIVO</i> DE HNANOS1 DANS LES CANO	82 CERS
C. RES C.1 1 ^{ERI} BR(SULTATS ^E PARTIE: EXPRESSION <i>IN VIVO</i> DE HNANOS1 DANS LES CANO ONCHO-PULMONAIRES:	82 CERS 82
C. REA C.1 1 ^{ERI} BRO C.1.1	SULTATS	82 CERS 82 NCHO-
C. REA C.1 1 ^{ERI} BRO C.1.1	SULTATS	82 CERS 82 NCHO- 82
C. REA C.1 1 ^{ERI} BRO C.1.1 C.1.2	SULTATS ^E PARTIE: EXPRESSION <i>IN VIVO</i> DE HNANOS1 DANS LES CANO ONCHO-PULMONAIRES: Taux d'expression de hNanos1 et des MMPs dans les cancers brom pulmonaires: Localisation des ARNm hNanos1 dans les tissus tumoraux:	82 CERS 82 NCHO- 82 84
C. REA C.1 1 ^{ERI} BRO C.1.1 C.1.2 C.2 2 ^{EM}	 ^E PARTIE: EXPRESSION IN VIVO DE HNANOS1 DANS LES CANO ONCHO-PULMONAIRES: TAUX D'EXPRESSION DE HNANOS1 ET DES MMPS DANS LES CANCERS BROMPULMONAIRES: LOCALISATION DES ARNM HNANOS1 DANS LES TISSUS TUMORAUX: ^E PARTIE: INFLUENCE DE L'EXPRESSION DE HNANOS1 SUI 	82 CERS 82 NCHO- 82 84 R LE
C. REA C.1 1 ^{ERI} BRO C.1.1 C.1.2 C.2 2 ^{EM} CO	SULTATS	82 CERS 82 NCHO- 82 84 R LE ES:
C. REA C.1 1 ^{ERI} BRO C.1.1 C.1.2 C.2 2 ^{EM} CO	SULTATS ^E PARTIE: EXPRESSION <i>IN VIVO</i> DE HNANOS1 DANS LES CANO ONCHO-PULMONAIRES: TAUX D'EXPRESSION DE HNANOS1 ET DES MMPS DANS LES CANCERS BROM PULMONAIRES: LOCALISATION DES ARNM HNANOS1 DANS LES TISSUS TUMORAUX: ^E PARTIE: INFLUENCE DE L'EXPRESSION DE HNANOS1 SUM MPORTEMENT INVASIF DE LIGNEES CELLULAIRES TUMORAL	82 CERS 82 NCHO- 82 84 R LE ES: 86
C. REA C.1 1 ^{ERI} BRO C.1.1 C.1.2 C.2 2 ^{EM} CO 	SULTATS ^E PARTIE: EXPRESSION <i>IN VIVO</i> DE HNANOS1 DANS LES CANO ONCHO-PULMONAIRES: TAUX D'EXPRESSION DE HNANOS1 ET DES MMPS DANS LES CANCERS BROM PULMONAIRES: LOCALISATION DES ARNM HNANOS1 DANS LES TISSUS TUMORAUX: E PARTIE: INFLUENCE DE L'EXPRESSION DE HNANOS1 SUM MPORTEMENT INVASIF DE LIGNEES CELLULAIRES TUMORAL INFLUENCE DE HNANOS1 SUR LE PHENOTYPE DES CELLULAIRES TUMORAL	82 CERS 82 NCHO- 82 84 R LE ES: 86 86
C. REA C.1 1 ^{ERI} BRO C.1.1 C.1.2 C.2 2 ^{EM} CO C.2.1 C.2.2	SULTATS ^E PARTIE: EXPRESSION IN VIVO DE HNANOS1 DANS LES CANO ONCHO-PULMONAIRES: TAUX D'EXPRESSION DE HNANOS1 ET DES MMPS DANS LES CANCERS BROMPULMONAIRES: LOCALISATION DES ARNM HNANOS1 DANS LES TISSUS TUMORAUX: E PARTIE: INFLUENCE DE L'EXPRESSION DE HNANOS1 SUI MPORTEMENT INVASIF DE LIGNEES CELLULAIRES TUMORALIZATION INFLUENCE DE HNANOS1 SUR LE PHENOTYPE DES CELLULES DLD1:	82 CERS 82 NCHO- 82 84 R LE ES: 86 86 87
C. REA C.1 1 ^{ERI} BRO C.1.1 C.1.2 C.2 2 ^{EM} CO C.2.1 C.2.1 C.2.2 C.2.3	SULTATS	82 CERS 82 NCHO- 82 84 R LE ES: 86 86 87)LD1-
C. REA C.1 1 ^{ERI} BRO C.1.1 C.1.2 C.2 2 ^{EM} CO C.2.1 C.2.2 C.2.3	SULTATS F PARTIE: EXPRESSION IN VIVO DE HNANOS1 DANS LES CANONCHO-PULMONAIRES: TAUX D'EXPRESSION DE HNANOS1 ET DES MMPS DANS LES CANCERS BROUPULMONAIRES: LOCALISATION DES ARNM HNANOS1 DANS LES TISSUS TUMORAUX: E PARTIE: INFLUENCE DE L'EXPRESSION DE HNANOS1 SUI MPORTEMENT INVASIF DE LIGNEES CELLULAIRES TUMORALIS INFLUENCE DE HNANOS1 SUR LE PHENOTYPE DES CELLULES DLD1: INFLUENCE DE HNANOS1 SUR LA DISPERSION DES CELLULES DLD1: INFLUENCE DE HNANOS1 SUR LES PROPRIETES MIGRATOIRES DES CELLULES INFLUENCE DE HNANOS1 SUR LES PROPRIETES MIGRATOIRES DES CELLULES INFLUENCE DE HNANOS1 SUR LES PROPRIETES MIGRATOIRES DES CELLULES INFLUENCE DE HNANOS1 SUR LES PROPRIETES MIGRATOIRES DES CELLULES INFLUENCE DE HNANOS1 SUR LES PROPRIETES MIGRATOIRES DES CELLULES INFLUENCE DE HNANOS1 SUR LES PROPRIETES MIGRATOIRES DES CELLULES INFLUENCE DE HNANOS1 SUR LES PROPRIETES MIGRATOIRES DES CELLULES INFLUENCE DE HNANOS1 SUR LES PROPRIETES MIGRATOIRES DES CELLULES INFLUENCE DE HNANOS1 SUR LES PROPRIETES MIGRATOIRES DES CELLULES INFLUENCE DE HNANOS1 SUR LES PROPRIETES MIGRATOIRES DES CELLULES INFLUENCE DE HNANOS1 SUR LES PROPRIETES MIGRATOIRES DES CELLULES INFLUENCE DE HNANOS1 SUR LES PROPRIETES MIGRATOIRES DES CELLULES INFLUENCE DE HNANOS1 SUR LES PROPRIETES MIGRATOIRES DES CELLULES INFLUENCE DE HNANOS1 SUR LES PROPRIETES MIGRATOIRES DES CELLULES INFLUENCE DE HNANOS1 SUR LES PROPRIETES MIGRATOIRES DES CELLULES INFLUENCE DE HNANOS1 SUR LES PROPRIETES MIGRATOIRES DES CELLULES INFLUENCE DE HNANOS1 SUR LES PROPRIETES MIGRATOIRES DES CELLULES INFLUENCE DE HNANOS1 SUR LES PROPRIETES MIGRATOIRES DES CELLULES INFLUENCE DE HNANOS1 SUR LES PROPRIETES MIGRATOIRES DES CELLULES INFLUENCE DE HNANOS1 SUR LES PROPRIETES MIGRATOIRES DES CELLULES INFLUENCE DE HNANOS1 DE	82 CERS 82 NCHO- 82 84 R LE ES: 86 86 87 DLD1: 89
C. REA C.1 1 ^{ERI} BRO C.1.1 C.1.2 C.2 2 ^{EM} CO C.2.1 C.2.2 C.2.3 C.2.4	SULTATS	82 CERS 82 NCHO- 82 84 R LE ES: 86 86 87 DLD1: 89 90
C. REA C.1 1 ^{ERI} BRO C.1.1 C.1.2 C.2 2 ^{EM} CO C.2.1 C.2.2 C.2.3 C.2.4 C.2.5	SULTATS F PARTIE: EXPRESSION IN VIVO DE HNANOS1 DANS LES CANONCHO-PULMONAIRES: TAUX D'EXPRESSION DE HNANOS1 ET DES MMPS DANS LES CANCERS BROUPULMONAIRES: LOCALISATION DES ARNM HNANOS1 DANS LES TISSUS TUMORAUX: E PARTIE: INFLUENCE DE L'EXPRESSION DE HNANOS1 SUI MPORTEMENT INVASIF DE LIGNEES CELLULAIRES TUMORALIA INFLUENCE DE HNANOS1 SUR LE PHENOTYPE DES CELLULES DLD1: INFLUENCE DE HNANOS1 SUR LES PROPRIETES MIGRATOIRES DES CELLULES INFLUENCE DE HNANOS1 SUR LES PROPRIETES MIGRATOIRES DES CELLULES DLD1: INFLUENCE DE HNANOS1 SUR LE POTENTIEL INVASIF DES CELLULES DLD1: INFLUENCE DE HNANOS1 SUR LES PROPRIETES TUMORATIONES DES CELLULES DLD1: INFLUENCE DE HNANOS1 SUR LES PROPRIETES TUMORIGENES ET INVASIVES INFLUENCE DE HNANOS1 SUR LES PROPRIETES TUMORIGENES ET INVASIVES INFLUENCE DE HNANOS1 SUR LES PROPRIETES TUMORIGENES ET INVASIVES INFLUENCE DE HNANOS1 SUR LES PROPRIETES TUMORIGENES ET INVASIVES INFLUENCE DE HNANOS1 SUR LES PROPRIETES TUMORIGENES ET INVASIVES INFLUENCE DE HNANOS1 SUR LES PROPRIETES TUMORIGENES ET INVASIVES INFLUENCE DE HNANOS1 SUR LES PROPRIETES TUMORIGENES ET INVASIVES INFLUENCE DE HNANOS1 SUR LES PROPRIETES TUMORIGENES ET INVASIVES INFLUENCE DE HNANOS1 SUR LES PROPRIETES TUMORIGENES ET INVASIVES INFLUENCE DE HNANOS1 SUR LES PROPRIETES TUMORIGENES ET INVASIVES INFLUENCE DE HNANOS1 SUR LES PROPRIETES TUMORIGENES ET INVASIVES INFLUENCE DE HNANOS1 SUR LES PROPRIETES TUMORIGENES ET INVASIVES INFLUENCE DE HNANOS1 SUR LES PROPRIETES TUMORIGENES ET INVASIVES INFLUENCE DE HNANOS1 SUR LES PROPRIETES TUMORIGENES ET INVASIVES INFLUENCE DE HNANOS1 SUR LES PROPRIETES TUMORIGENES ET INVASIVES INFLUENCE DE HNANOS1 SUR LES PROPRIETES TUMORIGENES ET INVASIVES INFLUENCE DE HNANOS1 SUR LES PROPRIETES TUMORIGENES ET INVASIVES INFLUENCE DE HNANOS1 SUR LES PROPRIETES TUMORIGENES ET INVASIVES INFLUENCE DE HNANOS1 SUR LES PROPRIETES TUMORIGENES ET INVASIVES INFLUENCE DE HNANOS1 SUR LES PROPRIETES TUMORIGENES ET INVASIVES INFLUENCE DE HNANOS1 SUR LES PROPRIET	82 CERS 82 NCHO- 82 84 R LE ES: 86 86 87 DLD1: 89 90 N VIVO

C.2.6	INFLUENCE DE HNANOS1 SUR L'EXPRESSION DES MOLECULES D'ADHERENCE
	INTERCELLULAIRE PAR LES CELLULES DLD1:
C.2.6.1	Influence de hNanos1 sur le taux d'expression des molécules d'ahérence
	intercellulaire:
C.2.6.2	Influence de hNanos1 sur la localisation des molécules d'adhérence
	intercellulaire:
C.2.6.3	Influence de hNanos1 sur l'activité co-transcriptionnelle de la caténine- β : 96
C.2.7	INFLUENCE DE HNANOS1 SUR LA PRODUCTION DE MMPS PAR LES CELLULES
	TUMORALES:
C.2.7.1	Influence de la surexpression de hNanos1 sur la production de MMPs par les
	cellules DLD1:
C.2.7.2	Influence de la répression de hNanos1 sur la production des MMPs par les
	cellules BZR et Hs578T:
D. DIS	CUSSION
E. CON	NCLUSIONS ET PERSPECTIVES 108
F. BIB	LIOGRAPHIE 110

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Les différentes étapes de la progression tumorale	3
Figure 2: Les différents types de jonctions intercellulaires:	5
Figure 3: Schéma de mise en place des interactions homophiliques.	7
Figure 4: Représentation des interactions au niveau des jonctions adhérentes	9
Figure 5: Rôle central de la caténine-ß dans la voie de signalisation Wnt et les complex	kes
d'adhérence.	14
Figure 6: Croisement entre les voies p120/Kaiso et Wnt	16
Figure 7: Régulation de l'expression de la cadhérine-E:	21
Figure 8: Voies de signalisation de la cadhérine-E impliquées dans la progression tumorale.	25
Figure 9: Classification structurale des MMPs.	40
Figure 10: Localisation des sites éléments liant des facteurs de transcription dans	les
promoteurs des MMPs.	42
Figure 11: Schéma des voies de signalisation régulant l'expression de la MMP-2	44
Figure 12: Représentation des principaux facteurs régulant la MMP-2	44
Figure 13: Activation extracellulaire des MMPs sécrétées	47
Figure 14: Processus d'activation de la pro-MMP-2.	48
Figure 15: Inhibiteurs des MMPs dans l'environnement péricellulaire	53
Figure 16: Rôle des MMPs dans la progression tumorale.	59
Figure 17: Illustration des différents modèles géométriques établis par le logiciel de sociolog	gie
cellulaire	74
Figure 18: Analyse par RT-PCR du taux d'expression de hNanos1 dans les cancers bronch	10-
pulmonaires	83
Figure 19: Analyse par RT-PCR du taux d'expression de la MT1-MMP et de la MMP-2 da	ins
les cancers broncho-pulmonaires:	84
Figure 20: Localisation par hybridation <i>in situ</i> des ARNm de hNanos dans les cance	ers
broncho-pulmonaires.	85
Figure 21: Influence de hNanos1 sur le phenotype des cellules DLD1.	86
Figure 22: Comparaison des distributions spatiales selon les modeles geometriques	ae
Voronoi, Delaunay et de l'arore de longueur minimale (ALM).	8/
d'ALM à 24b de culture:	00
GALM à 2411 de culture	00 00
Figure 25: Comparaison des vitesses de migration des cellules DLD1.	09 00
Figure 26: Analyse du notentiel invasif des cellules DI D1 en chambre de Boyden modifiée	01
Figure 27: Effet de hNanos 1 sur le potentiel tumorigène des cellules DI D1 en souris Nude	97 97
Figure 28: Histologie des tumeurs primaires et secondaires formées par les cellules DLD1	en
souris Nude après coloration HPS	94
Figure 29. Analyse par western blotting du taux protétique des molécules d'adhérer	ice
intercellulaire	95
Figure 30: Analyse par immunocytochimie de la localisation des molécules d'adhérer	ice
intercellulaire:	96
Figure 31: Analyse de l'activité co-transcriptionnelle de la caténine-B dans les cellules DLE) 1.
	97
Figure 32: Analyse de l'expression des ARNm des MMPs et des TIMPs.	98
Figure 33: Analyse de l'expression protéique de la MT1-MMP et de la MMP-2.	99
Figure 34: Analyse de l'expression des ARNm de la MT1-MMP et de la MMP-2 dans	les
$1 \qquad 1$	$\Omega \Omega$

Figure 35: Analyse de l'expression des protéines MT1-MMP et MMP-2	dans les transfectants
BZR et Hs578T.	
Figure 36: Analyse du potentiel invasif des transfectants BZR et Hs578T.	102

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Classification fonctionnelle des MMPs. 37
Tableau 2. Nature des substrats clivés par les MMPs et effets biologiques observés
Tableau 3: Propriétés des principaux inhibiteurs synthétiques des MMPs
Tableau 4: Distribution des échantillons tumoraux testés en fonction des stades TNM et des
niveaux de différenciation
Tableau 5: Séquences nucléotidiques utilisées pour amplifier spécifiquement les ARNm
codant pour 28S, hNanos1, MT1-MMP et MMP-269
Tableau 6: Conditions utilisées lors de la RT-PCR. 69
Tableau 7: Valeur des différents paramètres calculés à partir du diagramme de Voronoi, de la
triangulation de Delaunay et de l'arbre de longueur minimale pour des distributions
régulières, aléatoires et en amas
Tableau 8: Séquences nucléotidiques utilisées pour amplifier spécifiquement les ARNm
codant pour le 28s, la MT1-MMP, la MMP-2, le TIMP-1 et le TIMP-2
Tableau 9: Conditions utilisées lors de la RT-PCR. 78
Tableau 10: Effet de hNanos1 sur la production de métastases par les cellules DLD193

LISTE DES ABREVIATIONS

ADAMTS 1: a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin 1 motif ADN: acide desoxyribonucléique ADNc: ADN complémentaire AF-6: afadine-6 AP-2: activating protein-2 APC: adenomatous polyposis coli protein aPKC: atypical protein kinase C ARM: armadillo ARNm: acide ribonucléique messager ARF6: ADP-ribosylation factor 6 ARVCF: armadillo repeat gene deleted in velo cardio facial syndrome ASIP: aPKC-specific interacting protein ATCC: american tissue culture collection ATF3: activating transcription factor-3 bFGF: basic fibroblast growth factor bHLH: helix-loop-helix Brat: brain tumor BTB/POZ: Broad complex, Tramtrack and Bric-a-brac/Poxvirus and Zinc finger β-Trcp: β-transducin repeat containing protein C/EBP: CCAAT/enhancer-binding protein CBP: cAMP response element-binding protein Cdc42: cell division cycle gene 42 CKIa: casein kinase Ia CKII: casein kinase II CoR: co-répresseur COX: cyclooygenase 2 CREB: cAMP-response element-binding protein Dox: doxycycline DHSV: domaine similaire à l'hémopexine et à la vitronectine Dsh: dishevelled EC: ectodomaine EGF: epidermal growth factor Egr-1: early growth response-1 Ep-CAM: epithelial cell adhesion molecule ERK: extracellular signal-regulated kinase FAP: polypose adénomateuse familliale FBF: fem-3 binding factor FGF: fibroblast growth factor FN: fibronectine GAP: GTPase activating protein GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase GBP: GSK-3ß binding protein GEF: guanine exchange factor GPI: glycosyl phosphatidyl inositol GSK-3β: glycogen synthase kinase-3β GTP: guanine tri-phosphate HAV: histidine-alanine-valine Hb: hunchback HDAC: histone deacetylase HGF: hepatocyte growth factor HGFR: hepatocyte growth factor receptor HNF4: hepatocyte nuclear factor 4 ICAT: inhibitor of β-catenin and TCF Id: protéines inhibitrices de différenciation IGF: insulin growth factor IGFBP-3: insulin-like growth factor protein 3 IGFR: insulin growth factor receptor JNK1/2: c-jun N-terminal kinase 1/2

IL-6: interleukine 6 ILK: integrin-linked kinase INR: initiator-like sequence Kb: kilo bases KBS: kaiso binding site kDa: kilo Dalton KRE-M9: keratinocyte differenciation factor-1 element-M9 LAR-PTP: leukocyte antigen-related protein tyrosine phosphatase LDL-RP: low density lipoprotein receptor-related protein LEF: lynphoid enhancer factor 1 Lgs: legless LOH: loss of heterozygoty LRP-5/6: lipoprotein receptor-related proteins 5 and 6 MAGUK: membrane-associated guanylate kinase MAPK: mitogen activated protein kinase MBD: methyl-CpG binding domain MCP-3: monocyte chemoattractant protein-3 MDCK: Martin-Darby canine kidney cells MDR1: multidrug resistance Mitf: microphthalmia-associated transcription factor MMP: matrix metalloproteinase MPED: membrane proximal extracellular domain MTA2: metastasis-associated family 1, number 2 MtBP: microtubule-plus-end-binding protein MUC: mucine NAP: nectine-afadine-spondine NF-κB: nuclear factor-κB NLK: nemo-like kinase NPRAP: neural plakophilin-related armadillo repeat protein NRE: nanos responsive element OSE-2: osteoblastic cis-acting element PAR6: PDZ-domain-containing adapter like protein 6 RT-PCR: reverse transcription-polymerase chain reaction PAI-1: plasminogen activator inhibitor-1 PAR1: protease activated receptor-1 PCOLCE: pro-collagen C-proteinase enhancer PDGF: platelet-derived growth factor PDZ: PSD-95/Dlg-A/ZO-1 PEA-3: polyoma enhancer binding protein-3 PGC: primordial germ cell PI3: phosphatidylinositol 3 PI3-K: phosphatidylinositol 3 kinase PKC: protein kinase C PMA: phorbol 12-myristate 13-acetate PS1: presinilin-1 PTK: protein tyrosine kinase PTPase: protein tyrosine phosphatase PTEN: phosphatase/tensin homolog deleted from chromosome 10 PTP: protein tyrosine phosphatase PTK: protein tyrosine kinase Pygo: pygopus RASI: rheumatoid arthritis synovial inflammation Rb: retinoblastoma gene product RECK: reversion inducing cysteine riche protein with Kasal motifs RTK: receptor tyrosine kinase SDF-1: stromal cell-derived factor-1 sE-Cad: soluble E-cadherin SF/HGF: scatter factor/hepatocyte growth factor SHP-1: Src-homology phosphatase type-1 SIP1: smad interacting protein-1

siRNA: small interferent RNA SPRE: stromelysin-1 PDGF-responsive element STAT: signal transducer and ²activator of transcription TBP: TATA box binding protein TCE: translational control element TCF: T-cell factor TEM: transition épithélio-mésenchymateuse TFPI-2: tissue factor pathway inhibitor 2 TGF- β : transforming growth factor- β TIE: TGF- β inhibtory element TIMP: tissue inhibitor of matrix metalloproteinase tPA: tissue plasminogen activator TPA: 12-O-tetradecanoylphorbol-13 acetate TNF- α : tumor necrosis factor- α TSP-1: thrombospondine-1 TSP-2: thrombospondine-2 uPA: urokinase-type plasminogen activator UTR: untranslated region ZO: zonula occludens

A. INTRODUCTION

A.1 LA PROGRESSION TUMORALE:

La progression tumorale implique une succession d'évènements complexes au cours desquels les interactions entre les cellules tumorales, la matrice extracellulaire environnante et les cellules hôtes vont se trouver modifiées. En premier lieu, ce processus a pour origine l'exposition de cellules normales à des facteurs cancérogènes tels que des substances chimiques, des virus ou des rayonnements. Ces facteurs provoquent des altérations au niveau du génome qui sont dans un premier temps compensées par les systèmes de réparation de la cellule. Cependant, lors d'expositions prolongées à ces facteurs dits cancérogènes, les systèmes de réparation peuvent être débordés ou défectueux et alors des mutations génétiques persistent et s'accumulent au fil des divisions cellulaires. C'est ce qu'on appelle la phase d'initiation de la cancérogenèse. Ces mutations peuvent survenir sur des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire (les proto-oncogènes) ou des gènes suppresseurs de tumeur. Les cellules entrent alors dans un cycle dans lequel elles échappent au contrôle normal de leur multiplication cellulaire et de leur mort cellulaire. En proliférant de manière anarchique, les cellules forment une tumeur: c'est la phase de promotion tumorale. Au sein d'un épithélium et à ce stade, le cancer est appelé carcinome in situ puisqu'il est encore limité dans son extension par la membrane basale. A partir de là, les cellules tumorales perdent des propriétés et en acquièrent de nouvelles qui leur permettent ainsi de se propager au reste de l'organisme.

Au sein du foyer tumoral primaire, il arrive que certaines cellules se dissocient du massif primitif. Ce phénomène suppose la perte d'expression ou de fonctionnalité de molécules responsables de l'adhérence intercellulaire. Notamment, le complexe cadhérine-E/caténines présent au niveau des jonctions adhérentes et assurant la cohésion cellule-cellule de l'épithélium, est réprimé par divers mécanismes. La perte de cette caractéristique épithéliale est le point de départ d'un phénomène appelé transition épithélio-mésenchymateuse. Les cellules perdent progressivement leurs propriétés épithéliales pour acquérir un phénotype proche de celui d'une cellule mésenchymateuse. En effet, une fois dispersées, certaines cellules acquièrent également des propriétés de migration et de dégradation. Elles sécrétent certaines protéases et notamment des métalloprotéinases matricielles ou MMPs. Ces MMPs ont la capacité de dégrader la majorité des éléments de la matrice extracellulaire et à ce titre permettent à une cellule ou à un groupe de cellules de franchir la lame basale qui jusqu'alors délimitait la tumeur primaire. Une fois cette barrière

1

naturelle rompue, les cellules tumorales peuvent s'infiltrer dans le tissu conjonctif sous-jacent ou stroma interstitiel. Certaines cellules tumorales atteignent des vaisseaux sanguins ou lymphatiques et peuvent former des métastases à distance.

La formation de métastases dans des organes cibles est l'étape ultime de la progression tumorale. Au niveau clinique, c'est aussi une étape critique quant au pronostique de la pathologie cancéreuse. Certaines cellules tumorales pénétrent les vaisseaux par intravasation pour être transportées de manière passive par le système circulatoire vers d'autres organes. Là, une grande majorité des cellules tumorales est éliminée par le système immunitaire et une minorité seulement y échappe. Parmi elles, certaines sont stoppées dans des vaisseaux de petites tailles. Là, par extravasation, elles traversent une nouvelle fois l'endothélium vasculaire pour former à terme un nouveau foyer tumoral appelé métastase dans leur nouvel environnement tissulaire (Figure 1).



Figure 1: Les différentes étapes de la progression tumorale.

I. Epithélium normal. **II.** Initiation tumorale: une cellule épithéliale devient cancéreuse après accumulation de mutations génétiques. **III.** Promotion tumorale: Les cellules tumorales n'ont cessé de proliférer de manière anarchique et forment un carcinome dit *in situ*. **IV.** Invasion tumorale: Des cellules quittent la tumeur primaire, franchissent la lame basale en la dégradant et infiltrent les tissus sous-jacents. Ces cellules invasives peuvent pénétrer des vaisseaux sanguins par intravasation et envahir l'organisme par le sang. **V.** Formation de métastases: des cellules tumorales circulantes quittent la circulation sanguine par extravasation et générent des tumeurs secondaires dans des organes cibles.

A.2 BUT DE L'ÉTUDE:

Plusieurs études menées *in vivo* et *in vitro* ont montré un lien fonctionnel entre la perte d'expression de la cadhérine-E et la surexpression de MMPs dans les cellules tumorales. Bien que la nature de ce lien fonctionnel ne soit pas clairement définie, il semble néanmoins que la caténine- β joue un rôle prépondérant par l'intermédiaire de la voie caténine- β /Tcf. Cependant, d'autres voies de régulation méconnues pourraient intervenir. L'identification des acteurs de ces nouvelles voies ainsi que leurs fonctionnements constitue une étape essentielle dans la perspective d'obtenir de nouveaux marqueurs pronostiques et d'établir de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Récemment, l'équipe du Pr Van Roy et du Dr Geert Berx (Université de Gand, Belgique) a identifié le gène hNanos1 comme une nouvelle cible réprimée par la cadhérine-E. Le gène hNanos1 est un homologue de Nanos lequel a été largement étudié chez la drosophile pour son rôle dans la détermination de l'axe antéro-postérieur de l'embryon, la migration des cellules souches germinales et la gamétogenèse. Chez l'homme, son expression a été étudiée dans les cellules souches germinales. Son rôle dans le processus tumoral et lors des phénomènes de migration et d'invasion, en particulier, n'est pas encore défini. Ce travail de thèse a donc pour objet l'étude des fonctions de hNanos1 au cours de l'invasion tumorale et plus particulièrement son rôle potentiel dans la régulation des molécules d'adhérence et des MMPs. Pour cela, trois aspects seront étudiés:

1-L'expression de hNanos1 dans les cancers broncho-pulmonaires.

2-L'influence de hNanos1 sur les propriétés invasives des cellules tumorales.

3-Le rôle de hNanos1 dans la régulation des molécules d'adhérence et des MMPs.

A.3 JONCTIONS INTERCELLULAIRES DE L'ÉPITHÉLIUM:

La cohésion des feuillets épithéliaux est assurée par la présence de jonctions intercellulaires. La capacité de l'épithélium à protéger l'organisme de l'environnement extérieur dépend de l'intégrité des membranes cellulaires et de ces jonctions intercellulaires. Dans les cellules épithéliales, les jonctions intercellulaires sont de trois types:

-les jonctions serrées (ou «zonula occludens»), constituant une barrière physique délimitant les régions apicales et baso-latérales des cellules.

-les jonctions adhérentes (ou «zonula adherens»), formées par les interactions homophiliques des molécules de cadhérine-E et connectées au cytosquelette d'actine.

-les desmosomes, formés par interactions des cadhérines desmosomales et connectés aux filaments intermédiaires.



Figure 2: Les différents types de jonctions intercellulaires:

A. Représentation schématique des trois types de jonctions intercellulaires présentes dans les cellules épithéliales.
B. Image obtenue par microscopie électronique mettant en évidence l'ultrastructure des jonctions serrées, des jonctions adhérentes et des desmosomes. D'après (Perez-Moreno et coll., 2003).

Ces structures jonctionnelles contiennent des récepteurs transmembranaires de types glycoprotéiques assurant la position à la surface cellulaire et déterminent la spécificité de la réponse intracellulaire. Les protéines cytoplasmiques présentes établissent une connexion des récepteurs au cytosquelette des cellules, autorisant la communication moléculaire entre les différentes jonctions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire. La présence de protéines

de signalisation dans ces structures permet également l'intégration de signaux provenant de l'extérieur de la cellule jusqu'au noyau des cellules afin de répondre de manière adéquate à d'éventuelles modifications de l'environnement cellulaire.

A.4 LA CADHERINE-E:

A.4.1 STRUCTURE DE LA CADHERINE-E:

Principale molécule transmembranaire des jonctions adhérentes des cellules épithéliales, la cadhérine-E est responsable de l'adhérence intercellulaire de manière homotypique et calcium dépendante. Cette glycoprotéine de 120 kDa appartient à la superfamille des cadhérines comptant au minimum 80 membres et divisée au minimum en 6 sous-familles majeures sur la base de la présence de domaines caractéristiques, de la structure du gène et de l'analyse phylogénétique des séquences protéiques (Nollet et coll., 2000). La cadhérine-E est le membre de cette superfamille le mieux caractérisé et représente le prototype des cadhérines classiques. Du point de vue structural, la cadhérine-E est composée d'un domaine extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine cytoplasmique dont l'extrémité C-terminale est hautement conservée. Sa partie extracellulaire comprend 5 modules d'ectodomaine (EC1 à EC5 en allant vers la membrane) d'environ 111 résidus d'acides aminés avec des motifs contenant des sites de fixation du calcium (Blaschuk et coll., 1990; Takeichi, 1991). EC5 diffère des domaines homologues EC1 à EC4 et est également appelé MPED (Membrane Proximal Extracellular Domain) (Nollet et coll., 2000).

La structure et la fonction de la cadhérine-E sont modulées par la concentration en ions Ca^{2+} du milieu (voir figure 3). En absence d'ions Ca^{2+} (<0,05 M), la structure de la cadhérine-E est désorganisée et rend impossible la fonction d'adhérence. Lorsque la concentration en ions Ca^{2+} augmente, les ectodomaines vont progressivement devenir rigides et s'organiser en dimères. Pour une concentration supérieure à 1mM en ions Ca^{2+} , les dimères présents sur des cellules voisines vont pouvoir interagir et assurer l'adhérence intercellulaire (Pertz et coll., 1999).





L'unité fonctionnelle classique de la cadhérine-E est proposée comme un dimère (Shapiro et coll., 1995; Brieher et coll., 1996; Takeda et coll., 1999). La formation de dimères de cadhérine-E repose sur des interactions au niveau du premier module d'ectodomaine (EC1) (Shapiro et coll., 1995; Overduin et coll., 1995; Nagar et coll., 1996; Tamura et coll., 1998; Pertz et coll., 1999) ou des deux premiers modules d'ectodomaine (EC1 et EC2). Des interactions au niveau des régions transmembranaires (Huber et coll., 1999) et cytoplasmiques (Ozawa et Kemler, 1998) sont également possibles. Iino et coll. ont également décrit la formation d'oligomères de cadhérine-E à la surface cellulaire (de dimères à décamères) au préalable de la mise en place des sites d'adhérence cellule-cellule (lino et coll., 2001). Les domaines cytoplasmiques de la cadhérine-E pourraient être responsables de ce clustering à la surface cellulaire. De plus, ils contiennent deux régions conservées renforçant l'adhérence intercellulaire assurée par l'activité des ectodomaines. Le site de liaison de la caténine-B/plakoglobine situé en extrémité carboxy-terminale de la protéine comprend une région de 30 acides aminés contenant des résidus sérine dont la phosphorylation induit l'adhérence et l'affinité du complexe cadhérine-E/caténines (Stappert et Kemler, 1994; Lickert et coll., 2000). Enfin, la région juxtamembranaire interagit avec la caténine p120 (Yap et coll., 1998), ARVCF (Mariner et coll., 2000) ou la préseniline-1 (Baki et coll., 2001).

A.4.2 LE COMPLEXE D'ADHERENCE CADHERINE-E/CATENINES:

Le complexe cadhérine-E/caténines constitue l'élément structural et fonctionnel majeur des jonctions adhérentes des cellules épithéliales (Aberle et coll., 1996) (voir figure 4). La fonctionnalité de la cadhérine-E est assurée non seulement par la reconnaissance homophilique entre les domaines extracellulaires des molécules de cadhérine-E mais également par l'ancrage du domaine cytoplasmique à l'actine via les caténines (Ozawa et coll., 1989; Kintner, 1992). En effet, la cadhérine-E, par son domaine cytoplasmique, est liée à la caténine- β ou à la plakoglobine (caténine- γ), deux protéines de la famille armadillo, qui sont en compétition pour le même site de liaison. La caténine- β se lie directement à la queue carboxy-terminale de la cadhérine-E par ses répétitions armadillo (McCrea et coll., 1991; Hinck et coll., 1994). L'homologue de la caténine- β , la plakoglobine, peut se substituer à la présence de la caténine- β dans les complexes cadhérine-E/caténines sans déficit de l'adhérence intercellulaire, son rôle restant néanmoins méconnu (Butz et Kemler, 1994; Haegel et coll., 1995). A leur tour, ces deux caténines lient la caténine- α qui interagit avec le cytosquelette d'actine directement ou via des intermédiaires tels que la vinculine, l'α-actinine et ZO-1 (Imamura et coll., 1999). La caténine- α se lie notamment à la partie amino-terminale de la caténine- β liée à la cadhérine-E et à la F-actine (Jou et coll., 1995). La caténine p120 appartient, elle aussi, à la famille des protéines armadillo et se lie à la partie transmembranaire de la cadhérine-E par le biais de ses domaines répétitifs armadillo (Anastasiadis et Reynolds, 2000; Thoreson et coll., 2000). La caténine p120 stabilise la cadhérine-E à la membrane et régule son turnover (Davis et coll., 2003). La caténine p120 influence ainsi directement l'adhérence en contrôlant le taux de cadhérine-E disponible à la membrane. La présenilline-1 (PS1) se concentre aux contacts intercellulaires épithéliaux et entre en compétition avec la caténine p120 pour la liaison au domaine juxtamembranaire de la cadhérine-E (Baki et coll., 2001). Cette interaction stimule la liaison cadhérine-E/caténines, permet l'association au cytosquelette et augmente l'agrégation cellulaire. La caténine- β liée à la cadhérine-E ou la plakoglobine peuvent lier PS1 (Murayama et coll., 1998; Levesque et coll., 1999) formant un complexe trimérique stable dans lequel chaque membre se lie directement aux deux autres. Un certain nombre de protéines sont également co-localisées au niveau des jonctions adhérentes et vont interagir directement ou indirectement. Parmi elles, la nectine-2, une protéine membranaire de la famille des immunoglobulines, et la ponsine liées à l'afadine (Mandai et coll., 1997; Mandai et coll.,

1999), la protéine LIN-7, la protéine membranaire vezatine liée à la myosine VIIA (Nagafuchi, 2001) participent aux complexes multimoléculaires des jonctions adhérentes. Des régulateurs de la polymérisation de l'actine tels que Arp2/3 sont également rencontrés. Enfin, la capacité des caténines à interagir avec des protéines associées aux microtubules Mt-BPs (microtubule-plus-end-binding proteins) permet la connexion de la cadhérine-E au réseau de microtubules (D'Souza-Schorey, 2005).



Figure 4: Représentation des interactions au niveau des jonctions adhérentes.

L'interaction directe de la caténine- β et indirecte de la caténine- α à la partie cytoplasmique de la cadhérine-E relie les dimères de cadhérine-E au cytosquelette d'actine et aux protéines liant l'actine (α -actinine, vinculine, Arp2/3, myosine VI). Dans ce complexe cadhérine-E/caténines, la plakoglobine peut se substituer à la caténine- β . La caténine p120 et/ou ARVCF se lient à la région juxtamembranaire de la partie cytoplasmique de la cadhérine-E. Des interactions sont possibles entre le complexe cadhérine-E/caténines et l'afadine liée à la nectine-2 et la ponsine, ajuba, ZO-1 et la vezatine via la myosine VIIa.

A.4.3 REGULATION DU COMPLEXE CADHERINE-E/CATENINES:

Plusieurs processus cellulaires sont capables de moduler la fonction des complexes cadhérine-E/caténines, notamment la phosphorylation des composants de ces complexes, l'internalisation et le recyclage de la cadhérine-E et l'activité des membres de la famille Rho des GTPases.

A.4.3.1 Phosphorylation du complexe cadhérine-E/caténines:

L'intégrité structurale et fonctionnelle des complexes cadhérine-E/caténines est régulée en partie par la phosphorylation de ces composants (Lilien et coll., 2002). La phosphorylation des résidus sérine et thréonine de la caténine- β ou de la cadhérine-E augmente la stabilité des complexes cadhérine-E/caténines (Lickert et coll., 2000; Bek et Kemler, 2002). De manière générale, l'activation des tyrosines kinases provoque une perte d'adhérence et une augmentation du niveau de caténine- β cytoplasmique soit par libération directe de la caténine- β ou soit par activation de l'endocytose de la cadhérine-E. A l'opposé, l'activation des tyrosines phosphatases (PTPases) stabilise les complexes cadhérine-E/caténines et augmente l'adhérence intercellulaire (Nelson et Nusse, 2004).

La phosphorylation des résidus tyrosine des caténines est largement impliquée dans la régulation de l'adhérence (Gumbiner, 2000). Des études ont montré que la phosphorylation de la caténine- β par les kinases Src, Abl, Fer et Fyn ou les récepteurs à activité tyrosine kinase (c-met, RON, ErbB2) provoque une diminution de l'association de la caténine- β avec la cadhérine-E et la caténine- α et ainsi désorganise les complexes cadhérine-E/caténines (Roura et coll., 1999; Huber et Weis, 2001; Rhee et coll., 2002; Piedra et coll., 2003). D'autre part, la phosphorylation de la caténine p120 par Src ou Fer induit la perte des complexes cadhérine-E/caténines (Roura et coll., 1998). Différentes étapes de la progression tumorale sont ainsi corrélées avec l'activation et/ou la surexpression de ces protéines kinases (Mareel et Leroy, 2003; Birchmeier et coll., 2003).

Par ailleurs, plusieurs tyrosines phosphatases (PTP) sont associées aux complexes cadhérine-E/caténines. La PTP μ interagit directement avec la cadhérine-E (Brady-Kalnay et coll., 1998) mais peut réguler l'adhérence en modulant la voie de la PKC via l'interaction PTP μ /RACK (Hellberg et coll., 2002). La PTP μ , de la même manière que SHP-1 (Srchomology phosphatase type-1), peut également se lier à la caténine p120 provoquant sa déphosphorylation (Zondag et coll., 2000). Enfin, les phosphatases LAR-PTP (Leukocyte Antigen-Related Protein Tyrosine Posphatase), PTP κ et PTP λ interagissent avec la caténine- β et contrôlent sa phosphorylation (Fuchs et coll., 1996). La régulation de la phosphorylation des résidus tyrosine résulte donc de l'action combinée et compétitive des tyrosines kinases et des phosphatases.

A.4.3.2 Internalisation et recyclage de la cadhérine-E:

A l'état stationnaire, la cadhérine-E est sujette à l'endocytose et au recyclage à la surface cellulaire (Le et coll., 1999). L'augmentation de ces processus en absence de contacts cellulaires met en évidence l'implication de mécanismes dynamiques modulant l'expression de la cadhérine-E et l'adhérence. Notamment, on note l'intervention de vésicules recouvertes de clathrine permettant l'internalisation de la cadhérine-E à partir de la surface cellulaire (D'Souza-Schorey, 2005). Collectivement, ARF6, la dynamine et Nm23-H1 sont connus pour réguler l'endocytose de la cadhérine-E par ces vésicules et induire la dispersion cellulaire (D'Souza-Schorey, 2005). La glycosylation du domaine cytoplasmique de la cadhérine-E peut également réguler le transport de la cadhérine-E à la surface cellulaire et semble être impliqué dans la répression rapide de l'adhérence des cellules apoptotiques (Zhu et coll., 2001). Ceci met en avant la régulation dynamique par des glycosyltransférases et des glycosidases. Fujita et coll. décrivent également des mécanismes de dégradation par ubiquitination ciblant le complexe cadhérine-E/caténines (Fujita et coll., 2002). Notamment, Hakai, une E3 ligase, assure l'ubiquitination de la cadhérine-E et de la caténine-B phosphorylées permettant l'endocytose du complexe. La caténine p120 intervient dans la stabilisation de la cadhérine-E à la surface cellulaire, facilite son recyclage en favorisant son transport et en prévenant sa dégradation par le protéasome (D'Souza-Schorey, 2005). Enfin, il a été récemment montré que l'activation de Ra1 A, une protéine de la famille Rho GTPase, permet l'exocytose des molécules de cadhérine-E de l'endosome vers la surface cellulaire (Shipitsin et Feig, 2004).

A.4.3.3 Rôle des GTPases de la famille de Rho:

Le rôle de la protéine GTPase Rac1 dans la promotion de la formation des jonctions adhérentes est désormais bien établi. L'activation soutenue de Rac1 dans des cellules épithéliales induit l'accumulation de filaments d'actine polymérisée au niveau des contacts cellulaires et augmente l'adhérence par la cadhérine-E (Braga et coll., 1997; Noren et coll., 2001; Ehrlich et coll., 2002). Dans le même sens, la surexpression de Tiam 1, une GEF (Guanine Exchange Factor) régulant l'activité de Rac1 et localisée dans les jonctions adhérentes, a des effets similaires (Hordijk et coll., 1997). L'activation des GTPAses Rac1 et Cdc42 bloque l'endocytose de la cadhérine-E probablement en facilitant la polymérisation de l'actine (Izumi et coll., 2004). En plus de contrôler la dynamique de la polymérisation de l'actine au site d'adhérence intercellulaire, Rac1 et Cdc42 affectent la structure des jonctions

adhérentes. En effet, Rac1 et Cdc42 sont capables de se lier à la protéine IQGAP activant les GTPases (Van Aelst et D'Souza-Schorey, 1997). IQGAP liant Rac1 ou Cdc42 va alors interagir avec la caténine- β et ainsi empêcher l'interaction caténine- β -caténine- α (Fukata et coll., 2001). Les effets de l'activation de RhoA sur les jonctions adhérentes semblent être similaires à ceux observés pour Rac1 et cdc42 bien que peu de données soient connues sur ce sujet (Braga, 2002a).

A.4.4 FONCTIONS DE LA CADHERINE-E:

La cadhérine-E n'a pas uniquement pour fonction de permettre l'adhérence intercellulaire mais peut jouer un rôle dans la transduction de signaux de l'extérieur de la cellule vers le cytoplasme de nature à influencer les programmes morphogénétiques contrôlant l'intégrité structurale et fonctionnelle de l'épithélium (Delmas et coll., 1999; Blaschuk et Rowlands, 2002). La nature des voies biochimiques empruntées par la cadhérine-E est encore méconnue. Cependant, il est désormais démontré que certaines protéines associées à la cadhérine-E dans les jonctions intercellulaires interviennent de manière importante dans ces voies.

A.4.4.1 Régulation des récepteurs à activité tyrosine kinase:

De manière réciproque, la cadhérine-E est capable de moduler la signalisation des récepteurs à activité tyrosine kinase (Wheelock et Johnson, 2003). Lors de la mise en place des jonctions adhérentes, la cadhérine-E peut induire le recrutement et l'activation du récepteur de l'EGF indépendamment de son ligand et provoquer consécutivement une activation des MAP kinases et de rac1 (Pece et Gutkind, 2000; Betson et coll., 2002). Des observations contradictoires réalisées par Laprise et coll. montrent cependant une répression de l'activité des MAP kinases par la cadhérine-E via la voie PI3-kinase (Laprise et coll., 2004). Qian et coll. expliquent que la faible expression de la cadhérine-E (faible densité cellulaire) provoque l'activation des récepteurs à l'EGF, de Ras et des MAP kinases favorisant ainsi la mobilité cellulaire. La forte expression de la cadhérine-E (forte densité cellulaire) mène, quant à elle, à l'immobilisation des récepteurs à l'EGF et altère l'affinité du site de liaison pour son ligand renforçant ainsi l'adhérence intercellulaire (Qian et coll., 2004). Ces mécanismes permettraient donc le contrôle de la prolifération cellulaire par la cadhérine-E.

A.4.4.2 Régulation de la voie Wnt:

En séquestrant la caténine- β à la surface cellulaire, la cadhérine-E agit comme un régulateur négatif de la voie Wnt. En effet, la caténine- β constitue un élément central dans la cascade de signalisation Wnt en relayant le signal dans le noyau (Logan et Nusse, 2004).

La voie Wnt intervient largement dans le développement embryonaire normal de nombreux tissus et l'homéostasie des tissus adultes (Logan et Nusse, 2004). Cette voie est exceptionnelle quant à sa complexité et au nombre d'éléments qui la constituent (voir figure 5). La voie Wnt est, tout d'abord, initiée par la liaison de ligands Wnt (19 ont été identifiés chez l'homme) sur deux récepteurs, Frizzled et LRP-5/6 (Lipoprotein Receptor-related Proteins 5 and 6). En absence de ligands Wnt, la caténine- β est destinée à être dégradée après sa phopshorylation par les protéines serine/thréonine kinases GSK-3 β (Glycogen Synthase Kinase-3 β) (Yost et coll., 1996), CK1 α (Casein Kinase 1 α) (Amit et coll., 2002; Yanagawa et coll., 2002) associées à l'axine et l'APC (Adenomatous Polyposis Coli) (Hart et coll., 1998; Kishida et coll., 1998). Ce complexe est ensuite reconnu par la β -TrCP (β -Transducin Repeat-Containing-Protein), ubiquitiné et dégradé par le protéasome.

En présence de ligands Wnt, la phosphorylation des deux récepteurs provoque le recrutement des protéines dishevelled (Dsh) et axine à la membrane. L'absence de l'axine dans le complexe de dégradation ainsi que la déphosphorylation de la caténine- β par la phosphatase PP2A ont pour conséquence de stabiliser la caténine-β dans le cytoplasme (Cliffe et coll., 2003; Yang et coll., 2003; Tamai et coll., 2004). La caténine-β peut alors gagner le noyau où elle va jouer un rôle de co-facteur de la transcription de gènes cibles participant au développement par interaction avec les facteurs TCF/LEF liés à l'ADN (Behrens et coll., 1996; Molenaar et coll., 1996; van de et coll., 1997a). En absence de signal Wnt, TCF agit comme un répresseur des gènes cibles de Wnt (Brannon et coll., 1997) en formant un complexe avec Groucho (Cavallo et coll., 1998). Une fois dans le noyau, la caténine-ß convertit le complexe répresseur TCF en complexe d'activation transcriptionnelle en le dissociant de Groucho et en recrutant l'histone acétylase CBP/p300 (Cyclic AMP response element-Binding Protein) et la protéine TBP (TATA box Binding Protein) (Hecht et coll., 2000). Les protéines Brg-1, Pontine, Reptine, Legless/BCL9 (Lgs) et Pygopus (Pygo) interviennent également en tant que co-activateurs du complexe caténine-β/TCF (Brembeck et coll., 2006). A l'opposé, Chibby et ICAT (Inhibitor of β-Catenin And TCF) constituent des





Figure 5: Rôle central de la caténine- β dans la voie de signalisation Wnt et les complexes d'adhérence.

A. Lorsque la voie Wnt n'est pas activée, la caténine- β est amenée à être dégradée par le protéasome via la formation d'un complexe Axine/cat- β /APC phosphorylé par GSK3 et CK1 α . **B**. La voie Wnt est stimulée par la fixation d'un ligand Wnt sur le récepteur Frizzled ou par la dissociation du complexe d'adhérence cadhérine-E/caténines. La caténine- β échappe alors à la dégradation, s'accumule dans le cytoplasme et peut être délocalisée dans le noyau. En formant un complexe avec les facteurs de transcription TCF, elle va pouvoir activer la transcription de gènes cibles.

La régulation négative de la voie Wnt par la cadhérine-E peut être perturbée par l'action des récepteurs aux facteurs de croissance et des tyrosines kinases qui vont réprimer l'expression de la cadhérine-E à travers l'activation des répresseurs Slug/Snail ou dissocier les complexes cadhérine-E/caténines à la surface cellulaire (Nelson et Nusse, 2004). Ainsi, les composants des voies Wnt et de la cadhérine-E sont liés grâce à l'activité de la caténine- β mais sont également interconnectés par des boucles régulatrices qui permettent la coordination de l'expression de gènes et l'adhérence intercellulaire.

A.4.4.3 Régulation de la voie de la caténine p120:

Au même titre que la caténine-β, la caténine p120 est impliquée dans une voie de signalisation intracellulaire lorsqu'elle n'est pas associée à la cadhérine-E (voir fugure 6). Dans le cytoplasme, la caténine p120 joue un rôle dans la régulation des protéines Rho GTPases qui interviennent largement dans l'organisation du cytosquelette d'actine (Hatzfeld, 2005). La surexpression de la caténine p120 induit un phénotype branchant caractérisé par la formation de longues extensions cellulaires dans les fibroblastes ou de lamellipodes dans les cellules épithéliales (Reynolds et coll., 1996). Il a été montré, par la suite, que ce phénotype peut être attribué à l'inhibition de RhoA et/ou à l'activation de Rac1 par la caténine p120 (Anastasiadis et Reynolds, 2001). Alors que l'interaction de la caténine p120 avec RhoA semble directe et séquestre RhoA sous une forme GDP non active (Anastasiadis et coll., 2000), les effets sur Rac1 apparaissent indirects via l'implication de Vav-2, une GEF (Guanine exchange factor) (Noren et coll., 2000). Il a été montré, par ailleurs, que l'inhibition de RhoA facilite la migration cellulaire (Simpson et coll., 2004). Dans ce contexte, la caténine p120 pourrait être impliquée dans la régulation de l'équilibre entre adhérence et motilité cellulaire en modulant l'organisation des filaments d'actine.

La caténine p120 a été observée également au niveau nucléaire dans des cellules déficientes en cadhérine-E et semble dépendre de la présence de certains domaines protéiques et de son interaction avec la kinésine qui favorise son transport nucléaire (Van Hengel et coll., 1999; Roczniak-Ferguson et Reynolds, 2003; Mayerle et coll., 2003). Dans le noyau, la caténine p120 interagit avec Kaiso, un membre de la famille BTB/POZ (Broad complex, Tramtrack and Bric-a-brac/Poxvirus and Zinc finger) (Daniel et Reynolds, 1999) qui joue un rôle de répresseur transcriptionnel de gènes présentant des îlots méthylés CpG ou la séquence de reconnaissance KBS (Kaiso binding site). Le recrutement de co-répresseurs tels que NCOR-1 (nuclear receptor co-repressor 1) (Yoon et coll., 2003), CTCF (CTC-binding factor) (Defossez et coll., 2005) et groucho (Park et coll., 2005) semble essentiel à la fonction de Kaiso. Par ailleurs, Kaiso peut également se lier aux facteurs TCF/LEF et inhiber leur liaison à la caténine-β nucléaire (van Roy et McCrea, 2005). Le rôle de l'association caténine p120/Kaiso reste méconnu, cependant il semble que la caténine p120 lève la répression transcriptionnelle de Kaiso en le dissociant de l'ADN. Par ailleurs, la transcription de certains gènes cibles de la voie canonique est réprimée par Kaiso (van Roy et McCrea, 2005). Par

conséquent, ces données suggèrent que la caténine p120 et la caténine-β régulent de manière coordonnée les gènes cibles de la voie Wnt en conjonction avec les répresseurs Kaiso et TCF/LEF (van Roy et McCrea, 2005).



Figure 6: Croisement entre les voies p120/Kaiso et Wnt.

A. En absence de ligands Wnt ou lorsque la cadhérine-E est présente en forte quantité, la caténine-β et la p120 sont liées à la cadhérine-E et assurent l'adhérence intercellulaire. La caténine-β est phosphorylée par CK1 et GSK-3 avec la contribution d'un complexe macromoléculaire qui mène à sa dégradation par le protéasome. Kaiso transite par les pores nucléaires sous l'influence de facteurs environnementaux. Dans le noyau, Kaiso s'associe avec des co-répresseurs (CoR) et HDAC et va réprimer des gènes présentant des séquences KBS (Kaiso-binding site) ou des ilôts CpG méthylés (^mCpG-^mCpG) dans leur domaine régulateur. Les complexes groucho-LEF/TCF répriment des gènes présentant une séquence LBS (LEF binding site). **B.** Si la cadhérine-E est mutée ou réprimée, la caténine-β et la p120 sont redistribuées dans le cytoplasme. Là, la caténine p120 peut moduler l'activité de Rac et Rho. La caténine-β cytoplasmique s'accumule car elle n'est plus dégradée. La caténine-β et la p120 peuvent alors pénétrer dans le noyau et s'associer à LEF/TCF et Kaiso, respectivement. Chaque caténine lève la répression de la transcription de gènes cibles. DAAM1, dishevelled-associated activator of morphogenesis 1; GBP, GSK3-binding protein. Modifié d'après (van Roy et McCrea, 2005).

A.4.5 LA CADHERINE-E: UN SUPRESSEUR DE TUMEUR ET D'INVASION:

La perte d'expression ou de fonctionnalité des complexes cadhérine-E/caténines a été décrite comme intervenant dans le développement et la progression de la plupart des

carcinomes. Notamment, la dérégulation de la cadhérine-E est associée à la dédifférenciation, l'invasion, la transition épithélio-mésenchymateuse, le potentiel métastatique et un mauvais pronostic. La cadhérine-E a alors été définie comme un suppresseur de tumeur et d'invasion. Par ailleurs, les modifications du profil d'expression de la cadhérine-E et des caténines observées mettent en évidence la multiplicité des mécanismes d'inactivation impliqués.

A.4.5.1 Répression des complexes cadhérine-E/caténines dans les carcinomes:

La rupture des contacts intercellulaires représente un évènement clé dans la progression tumorale. L'expression du complexe cadhérine-E/caténines au cours de la progression tumorale a fait l'objet de nombreuses études, la majorité d'entre elles s'étant intéressée au rôle de la cadhérine-E. La perte d'expression de la cadhérine-E et/ou de sa fonction a été observée au cours de la progression de nombreux carcinomes (Takeichi, 1993; Birchmeier et Behrens, 1994). En effet, de nombreuses études immunohistochimiques menées avec des échantillons variés de tumeur ont démontré que l'expression aberrante de la cadhérine-E est associée aux caractéristiques histopathologiques de la tumeur (différenciation, statut invasif), le stade tumoral, la présence de métastases locales et distantes, la rechute et la survie des patients (Behrens et coll., 1999; Brennes et coll., 2002; Berx et van Roy, 2001; Nair et coll., 2006; Birchmeier et coll., 1999). Par ailleurs, la perte d'expression de la cadhérine-E est également associée à l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse qui survient lors de l'invasion (Christofori et Semb, 1999; Thiery, 2002). Dans certains types de tumeurs, la cadhérine-E est absente du foyer tumoral primaire mais semble rétablie dans les métastases des mêmes patients suggérant que sa répression soit un événement transitoire (Schipper et coll., 1991). Face aux données contradictoires obtenues quant à la valeur pronostique de la cadhérine-E, de nombreuses études se sont intéressées simultanément au profil d'expression des caténines. Ainsi, une corrélation entre la perte d'expression globale des complexes cadhérine-E/caténines et l'agressivité de plusieurs types de tumeurs a pu être observée (Hao et coll., 1997; Bailey et coll., 1998; Washington et coll., 1998; Silye et coll., 1998; Carico et coll., 2001; Papadavid et coll., 2001; Papadavid et coll., 2002). Selon certaines données, la perte de la caténine- α possède aussi une valeur pronostique importante dans certains carcinomes (Matsui et coll., 1994; Umbas et coll., 1997; Vermeulen et coll., 1999; Saito et coll., 2000). Très étudiée dans la tumorigenèse colorectale, la caténine-ß est considérée comme un oncogène important pour son implication dans la voie Wnt (Behrens, 2005). Notamment, une forte accumulation nucléaire de la caténine-ß traduisant l'activité constitutionnelle de la voie Wnt a été observée dans des tumeurs colorectales (Brabletz et coll., 1998; Brabletz et coll., 2001; El Bahrawy et coll., 2001), ainsi que dans des sarcomes synoviaux (Sato et coll., 2001) et endométriaux (Palacios et coll., 2001). Au contraire, on observe une perte d'expression de la caténine-β dans d'autres types de tumeurs (Garcia del Muro et coll., 2000; Sugio et coll., 2002). La fonction de la plakoglobine dans les carcinomes humains n'est pas encore claire mais semble jouer un rôle différent des autres caténines (Syrigos et coll., 1998). Dans de nombreux cas, l'expression anormale de la plakoglobine a une valeur pronostique particulière par rapport aux autres composants des complexes cadhérine-E/caténines (Bukholm et coll., 1998; Cerrato et coll., 1998; Papadavid et coll., 2002). En ce qui concerne la caténine p120, la perte de son expression a été observée dans des carcinomes de sein et de prostate (Dillon et coll., 1998; Kallakury et coll., 2001a; Kallakury et coll., 2001b). Néanmoins, une accumulation nucléaire de la caténine p120 a été également observée dans un grand nombre de lignées cellulaires tumorales et de cancers qui n'expriment plus la cadhérine-E (Van Hengel et coll., 1999; Roczniak-Ferguson et Reynolds, 2003; Mayerle et coll., 2003). Récemment, des études ont montré que la délocalisation de la caténine p120 dans le cytoplasme est associée à la progression tumorale et au mauvais pronostic de carcinomes de poumon et de colon (Bellovin et coll., 2005; Wang et coll., 2006).

L'expression aberrante d'autres membres de la famille des cadhérines a aussi été observée dans les carcinomes. Notamment, en accord avec l'idée d'un switch des cadhérines, l'expression *de novo* des cadhérines-N et -P a été reportée *in vivo* dans des tumeurs cadhérine-E négatives (Van Aken et coll., 2001; Gamallo et coll., 2001). L'expression de ces deux cadhérines est également associée à l'agressivité des carcinomes tels que les carcinomes mammaires (Kovacs et Walker, 2003; Nagi et coll., 2005) suggérant leur implication fonctionnelle dans la progression tumorale.

A.4.5.2 Mécanismes réprimant la cadhérine-E dans les carcinomes:

Au cours de la progression tumorale, le gène de la cadhérine-E peut être inactivé par différents mécanismes. Les mécanismes associés à la perte d'expression de la cadhérine-E dans les carcinomes incluent les mutations inactivantes, la perte d'hétérozygotie (loss of heterozygoty, LOH) et la régulation négative de l'expression du gène *CDH1* par méthylation de son promoteur et/ou répression transcriptionnelle. Ces différents mécanismes peuvent intervenir de manière combinée.

A.4.5.2.1 Inactivation génétique du gène CDH1:

Le gène *CDH1* de la cadhérine-E humaine a été localisé dans la région chromosomique 16q22.1 (Mansouri et coll., 1988; Natt et coll., 1989). Le bras long du chromosome 16 est une cible pour la LOH dans différents types de carcinomes (Strathdee, 2002). Les premières études menées sur des carcinomes hépatocellulaires et des cancers du sein ont démontré que la LOH dans cette région est associée à des tumeurs à fort potentiel métastatique (Tsuda et coll., 1990; Sato et coll., 1990). Par la suite, de nombreuses études ont montré la corrélation entre la survenue de LOH dans la région 16q et la perte de la cadhérine-E dans des cancers du sein. (Berx et coll., 1995a; Berx et coll., 1996; Bukholm et coll., 1997; Huiping et coll., 1999; Etzell et coll., 2001). Par ailleurs, quelques études suggèrent une implication possible des altérations de la p53 dans la haute fréquence de LOH pour la cadhérine-E (Bukholm et coll., 1997; Garcia del Muro et coll., 2000; Wang et coll., 2000).

Pour leur part, les mutations inactivant le gène de la cadhérine-E sont essentiellement retrouvées dans les carcinomes gastriques diffus et les carcinomes mammaires lobulaires et concernent rarement les autres types de tumeurs (Berx et coll., 1998). Ces mutations sont détectées très précocement suggérant une importance particulière de la perte de la cadhérine-E dans le développement de ce type de tumeur et renforçant le rôle de suppresseur de tumeur de la cadhérine-E (Strathdee, 2002). Dans le même ordre d'idée, des mutations de la cadhérine-E ont été observées chez des enfants présentant des cancers gastriques familiaux (Gayther et coll., 1998; Guilford et coll., 1998). De manière générale, les altérations génétiques les plus fréquentes touchant le gène *CDH1* dans les tumeurs impliquent des sauts d'exons et des mutations hors cadre en combinaison avec une perte d'hétérozygotie (Berx et coll., 1998).

A.4.5.2.2 Inactivation épigénétique du gène CDH1:

A coté des mécanismes d'inactivation génétiques, des mécanismes de répression transcriptionnelle ont été proposés pour expliquer la répression de la cadhérine-E dans les carcinomes humains.

A.4.5.2.2.1 Inactivation de la cadhérine-E par hyperméthylation:

Le processus d'hyperméthylation consiste en un recrutement de protéines liant l'ADN méthylé (MBDs) et possédant une activité histone désacétylase (HDACs), lesquelles contribuent mutuellement à la compaction de l'ADN dans la région promotrice et l'inactivation du gène. En ce qui concerne la cadhérine-E, des îlots CpG ont été identifiés à l'intérieur de sa région promotrice (Berx et coll., 1995b). L'hyperméthylation aberrante de ces îlots CpG a été montrée comme étant associée à la diminution de l'expression de la cadhérine-E dans différentes lignées cellulaires tumorales (Graff et coll., 1995; Yoshiura et coll., 1995) et différents types de carcinomes (Auerkari, 2006). De nombreuses études ont montré également que l'hyperméthylation du promoteur de la cadhérine-E est corrélée à la progression tumorale et la dissémination métastatique (Nass et coll., 2000).

A.4.5.2.2.2 Répression transcriptionnelle:

L'expression de la cadhérine-E est contrôlée par des structures conservées dans son promoteur et notamment une boîte CCAAT, des boîtes GC avec un rôle de régulateur positif et deux boîtes E (CACCTG) avec un rôle de répresseur (Nollet et coll., 1999). La perte d'expression de la cadhérine-E dans des cellules tumorales semblent être provoquée par des facteurs de régulation connus pour leur fonction d'inducteurs de la transition épithéliomésenchymateuse (TEM) et qui ciblent les éléments cités du promoteur de la cadhérine-E et régulent son activité (Huber et coll., 2005) (Figure 7).

Le facteur de transcription en doigt de zinc Snail apparaît comme le répresseur majeur de la cadhérine-E dans la plupart des études s'intéressant à la progression tumorale (Huber et coll., 2005). Il a été montré que Snail, en se liant aux boîtes E, réprime l'expression de la cadhérine-E et induit la TEM, la croissance tumorale, l'invasion et la production de métastases par des cellules cancéreuses épithéliales (Batlle et coll., 2000; Cano et coll., 2000). De la même manière, les facteurs de transcription en doigt de zinc Slug, SIP1/ZEB2, δEF1/ZEB-1 et le facteur de transcription hélice-boucle-hélice (bHLH) E12/E47 répriment la transcription de la cadhérine-E en se liant directement aux boîtes E présentes dans le promoteur du gène (Remacle et coll., 1999; Perez-Moreno et coll., 2001; Comijn et coll., 2001; Hajra et coll., 2002). Notamment, une association entre la répression de la cadhérine-E et l'expression de ces facteurs a été observée dans diverses lignées cellulaires tumorales et différents types de carcinomes (Huber et coll., 2005). Par ailleurs, les protéines inhibitrices de la différenciation (Id) Id2 et Id3 interagissent avec les protéines E2A et préviennent la répression du promoteur de la cadhérine-E (Kowanetz et coll., 2004). Enfin, le facteur de transcription bHLH Twist, a récemment été identifié comme un nouveau répresseur de la cadhérine-E et un inducteur de la TEM (Yang et coll., 2004; Kang et Massague, 2004).

D'autres facteurs de régulation ne présentant aucune activité intrinsèque de liaison au promoteur de la cadhérine-E vont réprimer également l'expression de la cadhérine-E en agissant en amont des répresseurs transcriptionnels. Notamment, le TGF- β réprime à la fois les protéines Id (Kowanetz et coll., 2004; Kondo et coll., 2004) et active les membres de la famille Snail ce qui établit un lien entre la signalisation du TGF- β , la répression de la cadhérine-E et l'initiation de la TEM (Comijn et coll., 2001; Peinado et coll., 2003). D'autre part, il a été montré que la sérine/thréonine kinase ILK (Integrin Linked Kinase) réprime l'expression de la cadhérine-E en activant le facteur de transcription Snail (Tan et coll., 2001). Enfin, différentes études ont montré que d'autres facteurs de régulation comme le récepteur à activité tyrosine kinase ErbB2 (D'Souza et Taylor-Papadimitriou, 1994), c-Fos (Reichmann et coll., 1992), la COX-2 (cyclooxygénase-2) (Tsujii et DuBois, 1995), la cytokine pro-inflammatoire IL-6 (Asgeirsson et coll., 1998) et le TNF- α (Perry et coll., 1999) possédent une activité de répression de la cadhérine-E dans des cellules tumorales épithéliales.



Figure 7: Régulation de l'expression de la cadhérine-E:

Les protéines contenant un domaine en doigt de zinc SIP-1, δ EF-1, Snail et Slug (en vert) et les facteurs de transcription en hélice-boucle-hélice E12/E47 et Twist (bleu) sont d'importants répresseurs qui se lient aux boîtes E du promoteur de la cadhérine-E. Les protéines Id (en mauve) répriment les protéines E12/E47. Les facteurs induisant la TEM comme le TGF- β ou les RTKs activent l'expression de Snail et SIP-1. ErbB2, TNF- α , IL-6, c-Fos et COX-2 sont des répresseurs de la cadhérine-E sans activité intrinsèque de liaison au promoteur de la cadhérine-E. Modifié et traduit d'après (Huber et coll., 2005).

A.4.5.2.3 Inactivation post-traductionnelle de la cadhérine-E:

A.4.5.2.3.1 Inhibition par phosphorylation des tyrosines:

Les changements du statut de phosphorylation des cadhérines et des caténines assuré par des protéines tyrosine kinases et des phosphatases peuvent constituer un mécanisme régulateur des complexes cadhérine-E/caténines au niveau post-traductionnel. Il a été démontré que la diminution de la phosphorylation de la cadhérine-E est associée à une expression cytoplasmique de la cadhérine-E, de la caténine- α et de la caténine- β dans des groupes de cellules invasives au sein de carcinomes broncho-pulmonaires primaires humains (Nawrocki et coll., 1998). Plusieurs études se sont intéressées également à la phosphorylation de la caténine-β et mettent en évidence son rôle important dans l'invasion, les métastases et la morphogenèse des cellules cancéreuses. En effet, il a été montré que la répression de la fonction des complexes cadhérine-E/caténines par la phosphorylation de la caténine-B se traduit par la diminution de la cohésion cellulaire (Matsuvoshi et coll., 1992) et l'induction de l'invasion in vitro (Behrens et coll., 1993). Il a été prouvé que la phosphorylation de la caténine-β altère sa liaison à la cadhérine-E mais pas sa fonction de transactivation avec LEF-1 (Kim et Lee, 2001). Cependant, une forte phosphorylation de la caténine-β est observée dans des lignées cellulaires cancéreuses généralement adhérentes qui ne présentent ni mutations ni diminution de l'expression de la cadhérine-E, de la caténine- α et de la caténine- β (Shibata et coll., 1994). D'autres études ont montré l'implication des récepteurs ErbB2 et c-met ainsi que de la tyrosine kinase Src dans la phosphorylation élevée de la caténine-β de manière associée à la dédifférenciation, la motilité cellulaire, l'invasion et les métastases (Shibata et coll., 1996; Nakopoulou et coll., 2000; Kitada et coll., 2001; Li et coll., 2001).

A.4.5.2.3.2 Clivage de la cadhérine-E:

Le domaine extracellulaire de la cadhérine-E existe sous la forme de peptides solubles de 80 kDa. Cette cadhérine-E soluble (sE-cad) est produite par clivage de la partie de l'ectodomaine de la protéine de cadhérine-E transmembranaire de 120 kDa. Notamment, des taux élevés circulants de cadhérine-E soluble ont été observés dans le sérum et l'urine de patients souffrant de différents types de cancers (Katayama et coll., 1994; Banks et coll., 1995; Griffiths et coll., 1996; Sundfeldt et coll., 2001). De plus, il a été démontré que la stromélysine-1 (MMP-3) et la matrilysine (MMP-7) sont capables de cliver la cadhérine-E et de libérer la cadhérine-E soluble (Lochter et coll., 1997; Noe et coll., 2001). Une autre forme tronquée de la cadhérine-E de 97 kDa (E-Cad⁹⁷) ancrée à la membrane a été identifiée dans des cellules épithéliales mammaires et prostatiques (Vallorosi et coll., 2000). Ce fragment résulte du clivage de la cadhérine-E au niveau du domaine cytoplasmique et a perdu la possibilité de lier la caténine- β ce qui rend la protéine non fonctionnelle. Une autre étude

montre l'accumulation de cette forme de cadhérine-E dans des cancers de la prostate par rapport aux tissus normaux adjacents (Rashid et coll., 2001). Depuis, une troisième forme tronquée de la cadhérine-E de 100 kDa (E-Cad¹⁰⁰) a été identifiée avec une distribution moins importante que la forme tronquée à 97 kDa dans les cancers de la prostate mais semble être présente dans toutes les tumeurs métastatiques de prostate examinées (Rios-Doria et coll., 2003). Le fragment E-Cad¹⁰⁰ est incapable de lier la caténine- β , la caténine- γ ou la p120 et présente un site de clivage par la calpaïne. D'autres expériences montrent ainsi que la calpaïne est capable de cliver la cadhérine-E et de libérer le fragment E-Cad¹⁰⁰.

A.4.5.2.3.3 Inhibition par des protéoglycannes de surface:

Les protéoglycannes présents à la surface cellulaire peuvent interférer potentiellement par encombrement stérique avec les interactions homophiliques entre les molécules de cadhérine-E et induire un phénotype invasif associé à la perte de fonctionnalité de la cadhérine-E (Vleminckx et coll., 1994). On observe une surexpression de la glycoprotéine de type mucine épisialine/MUC1 sur la surface entière des cellules de carcinomes (Kufe et coll., 1984). La suppression de la fonction des complexes cadhérine-E/caténines par MUC1 a été démontrée dans des lignées cellulaires tumorales de sein (Kondo et coll., 1998). Une autre glycoprotéine membranaire associée au cancer avec un domaine de type mucine appelée dysadhérine, a récemment été identifiée comme réprimant la cadhérine-E au niveau protéique (Ino et coll., 2002). La transfection de la dysadhérine dans des cellules cancéreuses réduit l'adhérence et induit l'invasion. Cependant, le mécanisme de régulation pour la répression transcriptionnelle de la cadhérine-E par la dysadhérine n'est pas clair. Enfin, l'expression accrue d'Ep-CAM a été observée in vivo en association avec la prolifération et la dédifférenciation dans des épithéliums épidermoïdes cervicaux (Ino et coll., 2002) et mène in vitro à l'abolition des jonctions adhérentes en affectant l'interaction des cadhérines avec le cytosquelette (Litvinov et coll., 1997).

A.4.5.3 Rôle fonctionnel de la cadhérine-E dans le cancer:

La perte d'expression de la cadhérine-E constitue un évènement majeur pour plusieurs étapes de la progression tumorale et peut déréguler des systèmes importants tels que la prolifération, l'équilibre entre la survie et l'apoptose, la migration cellulaire et induire l'invasion et la dissémination métastatique.
En premier lieu, la cadhérine-E est définie comme un suppresseur de tumeur. Des expériences de transfections ont démontré l'effet suppresseur de l'expression de la cadhérine-E sur la prolifération des cellules tumorales *in vitro* (Miyaki et coll., 1995) et la croissance des tumeurs *in vivo* (Meiners et coll., 1998). Les mécanismes supportant ce role de supresseur de tumeur sont encore inconnus. Cependant, il a été montré *in vitro* que l'inhibition de la croissance par la cadhérine-E implique l'inhibition de la voie mitogène initiée par les récepteurs à l'EGF (Takahashi et Suzuki, 1996) et qui en retour résulte en l'arrêt du cycle cellulaire via l'augmentation de la p 27^{kip1} (St Croix et coll., 1998). De plus, la surexpression de p 27^{kip1} bloque la prolifération induite par des anticorps anti-cadhérine-E (St Croix et coll., 1998). La cadhérine-E pourrait également affecter la prolifération des cellules en séquestrant la caténine- β et en prévenant sa signalisation dans le noyau (Behrens, 1999).

Le rôle le plus étudié de la cadhérine-E dans la progression tumorale demeure sa fonction de suppresseur d'invasion. Ce rôle a été démontré *in vitro* par la réversion du phénotype invasif des cellules tumorales suite à la transfection de l'ADNc de la cadhérine-E (Vleminckx et coll., 1991; Moersig et coll., 2002). Dans ce modèle, le caractère invasif des cellules transfectées peut être restauré par traitement avec des anticorps bloquant la cadhérine-E ou en réduisant son expression par ARN antisens. Ces expérimentations sont en accord avec la corrélation inverse observée dans des lignées cancéreuses humaines entre l'expression de la cadhérine-E et l'invasion (Frixen et coll., 1991). Enfin, ce concept est soutenu par la transition d'adénomes bien différenciés en carcinomes invasifs causée par la perte de la cadhérine-E dans un modèle de carcinogenèse pancréatique en souris transgéniques (Perl et coll., 1998).

La cadhérine-E possède également une fonction de suppresseur de métastases. En effet, il a été démontré que l'expression de la cadhérine-E dans des cellules tumorales circulantes supprime la capacité à former des métastases dans un modèle *in vivo* (Mbalaviele et coll., 1996). Une autre étude a montré que la répression de la cadhérine-E dans les cellules tumorales circulantes peut conduire à la progression métastatique (Graff et coll., 2000).

A.4.5.4 Conséquences de la répression de la cadhérine-E au cours de la progression tumorale:

En réponse à la perte d'expression et/ou l'inactivation fonctionnelle de la cadhérine-E, un certain nombre de mécanismes vont intervenir et favoriser la progression tumorale à plusieurs niveaux. Ces mécanismes mettent en jeu plusieurs voies de signalisation intracellulaires et régulent à terme différents acteurs de la prolifération, de l'apoptose, de la migration, de l'invasion et de la dissémination métastatique. Dans ce contexte, la voie de la caténine- β nucléaire reste la mieux décrite à ce jour, d'autres voies pouvant cependant jouer un rôle important (voir figure 8).



Figure 8: Voies de signalisation de la cadhérine-E impliquées dans la progression tumorale.

A.4.5.4.1 Activation de la voie de la caténine-β nucléaire:

Suite à la perte de la cadhérine-E, on assiste à l'accumulation cytoplasmique de la caténine- β libre et à sa translocation nucléaire. Ce processus commun à la voie Wnt a largement été décrit comme impliqué dans la tumorigenèse (Gumbiner, 1997; Peifer, 1997). L'accumulation cytoplasmique de la caténine- β est également provoquée par la survenue dans certaines tumeurs de mutations touchant la caténine- β elle-même ou l'APC, l'axine ou GSK- 3β et prévenant sa dégradation par le protéasome (Giles et coll., 2003; Behrens, 2005). Plusieurs études menées *in vitro* ont montré que la caténine- β active la transcription d'un certain nombre de gènes cibles dont beaucoup sont associés à la progression tumorale (liste de toutes les cibles identifiées sur le site www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html). Notamment, il a été montré que c-myc (He et coll., 1998) et la cycline D1 (Tetsu et

McCormick, 1999), deux protéines impliquées dans la prolifération, constituent des cibles de la caténine- β . L'activité co-transcriptionnelle de la caténine- β nucléaire est particulièrement impliquée dans les phénomènes de TEM et d'invasion tumorale. Ainsi, la caténine- β active notamment la transcription de la chaîne γ 2 de la laminine (Hlubek et coll., 2001), c-jun et fra-1 (Mann et coll., 1999), Slug (Conacci-Sorrell et coll., 2003), la vimentine (Gilles et coll., 2003), et les MMP-7 (Brabletz et coll., 1999; Crawford et coll., 1999), MT1-MMP (Takahashi et coll., 2002) et MMP-26 (Marchenko et coll., 2002). Par ailleurs, le complexe LEF1/caténine- β est décrit également comme supprimant l'activité transcriptionnelle de la cadhérine-E *in vivo* (Huber et coll., 1996).

A.4.5.4.2 Activation de la voie de la caténine p120:

La voie de la caténine p120 est très peu décrite quant à son rôle dans la tumorigenèse. Cependant, plusieurs études témoignent de son intérêt croissant dans ce contexte. Notamment, la caténine p120 cytoplasmique est impliquée dans la migration des cellules tumorales via des interactions avec les protéines Rho GTPases et la réorganisation du cytosquelette d'actine (Hatzfeld, 2005). Le rôle de la caténine p120 nucléaire est lui plus méconnu dans le contexte de la progression tumorale. Néanmoins, le fait que la caténine p120 interagisse avec Kaiso dont l'implication dans la progression cancéreuse est aujourd'hui bien établie (van Roy et McCrea, 2005), constitue un argument important. Ainsi, la caténine p120 peut lever la répression entretenue par Kaiso de plusieurs gènes cibles dont *MTA2* (Metastasis-associated family 1, number 2) et *S100A4*, associés à l'agressivité des carcinomes, les gènes de prolifération *cycline D1* et *Myc*, le facteur de transcription *Fos* (van Roy et McCrea, 2005). Parmi les cibles identifiées, on note que certaines constituent également des cibles du complexe caténine- β /TCF. Ceci constitue une preuve supplémentaire du fonctionnement coordonné de des voies Wnt et caténine p120/Kaiso (van Roy et McCrea, 2005).

A.4.5.4.3 Activation de la voie de la cadhérine-E soluble:

La cadhérine-E soluble de 80 kDa, après avoir été libérée par clivage, peut à son tour inhiber les fonctions de la cadhérine-E d'une manière paracrine (Noe et coll., 2001), d'induire la TEM et l'acquisition d'un phénotype infiltrant (Lochter et coll., 1997). Notamment, Nawrocki-Raby et coll. ont montré l'augmentation de l'expression des MMP-2, MMP-9 et

MT1-MMP par la sE-Cad (Nawrocki-Raby et coll., 2003a). Les mécanismes impliqués dans cette voie ne sont pas connus. Cependant, le peptide HAV (histidine, alanine-valine) présent dans l'ectodomaine EC1 de la cadhérine-E pourrait jouer un rôle important (Noe et coll., 1999; Makagiansar et coll., 2001) comme c'est la cas pour la cadhérine-N dont les motifs HAV permettent l'interaction directe avec les récepteurs FGFR1 et FGFR2 (Williams et coll., 1994; Williams et coll., 2001).

A.4.5.4.4 Activation de la voie des Rho GTPases:

L'adhérence intercellulaire par la cadhérine-E peut activer indépendamment les protéines Rho GTPases (Braga et coll., 1997). La désorganisation des complexes cadhérine-E/caténines peut donc déréguler l'activité des Rho GTPases. Les Rho GTPases contrôlent un grand nombre de voies de signalisation intracellulaire et régulent ainsi de nombreux processus cellulaires. Des études in vitro impliquant les protéines Rho GTPases dans l'adhérence cellulaire, la migration, l'activation transcriptionnelle, la progression du cycle cellulaire, la survie et la transformation suggèrent que ces protéines jouent un rôle dans la formation et la progression des tumeurs in vivo (Malliri et Collard, 2003; Ridley, 2004). La surexpression des Rho GTPases a été observée dans des tumeurs et leur rôle majeur dans l'invasion tumorale a été mis en évidence in vitro (Braga, 2002b). Par ailleurs, les GEFs qui stimulent les échanges GDP/GTP sur les protéines Rho GTPases, non seulement activent ces protéines mais participent aussi à la sélection directe ou indirecte de leurs effecteurs, conditionnant ainsi la voie de signalisation empruntée (Malliri et Collard, 2003). De cette manière, les Rho GTPases peuvent réguler indirectement l'expression de gènes associés à la progression tumorale. La voie des Rho GTPases est également impliquée dans la voie Wnt depuis que Tiam-1, une GEF de Rac, a été identifiée comme une cible de la voie Wnt. De plus, APC, un élément important de la voie Wnt, peut interagir indirectement avec Rac et induire la migration ainsi que la perturbation des jonctions adhérentes. Enfin, la liaison des ligands Wnt peut activer Rho et Rac afin de favoriser la migration (Malliri et Collard, 2003). Les données actuelles démontrent ainsi l'implication des protéines Rho GTPases dans les différentes étapes de l'initiation et de la progression tumorale ainsi que l'acquisition d'un phénotype invasif par les cellules tumorales.

A.4.5.4.5 Activation de la voie des récepteurs à tyrosine kinase:

Alors que les récepteurs à activité tyrosine kinase régulent l'adhérence intercellulaire, il est possible qu'en retour, les jonctions adhérentes influencent la signalisation de ces récepteurs. De manière générale, la cadhérine-E régule négativement les récepteurs à activité tyrosine kinase (Voir paragraphe A.4.4.1). Ainsi, la perte d'inhibition de ces récepteurs liée à la désorganisation des jonctions adhérentes pourrait être impliquée dans l'acquisition d'un phénotype migratoire et invasif (Andl et Rustgi, 2005).

A.5 LES METALLOPROTEINASES MATRICIELLES OU MMPS:

A.5.1 LA MATRICE EXTRACELLULAIRE:

La matrice extracellulaire (MEC) soutient l'adhérence des cellules et transmet des signaux à travers des récepteurs présents à la surface cellulaire. La MEC contient des collagènes, des glycoprotéines et des protéoglycannes (Egeblad et Werb, 2002). Certains constituants comme les ténascines, la fibronectine et différentes isoformes de la laminine sont trouvées dans les tumeurs et peuvent stimuler la progression tumorale (Bissell et Radisky, 2001). La membrane basale est une MEC spécialisée qui sépare les cellules épithéliales du stroma sous-jacent et ainsi constitue la première barrière contre l'invasion des carcinomes.

Les molécules de collagènes ont trois chaînes α et forment une triple hélice. Les collagènes fibrillaires (type I, II, II, V et XI) forment des fibrilles et influencent les fonctions cellulaires en interagissant avec les intégrines. Les collagènes des membranes basales forment quant à eux un réseau. Les cellules interagissent avec les molécules de collagène de type IV par l'intermédiaire des intégrines, de la laminine et des protéoglycannes à chaînes de sulfate d'héparanne. Les fragments protéolytiques de ces collagènes comme la tumstatine issue de la protéolyse de la chaîne α 3 du collagène de type IV et l'endostatine, issue de la protéolyse de la chaîne $\alpha 1$ du collagène de type XVIII, peuvent inhiber l'angiogenèse (O'Reilly et coll., 1997; Maeshima et coll., 2000). La gélatine correspond à du collagène dénaturé produit par la digestion du collagènes par les collagénases. Les laminines sont des glycoprotéines hétérotrimériques composées des chaînes α , β et γ . Elles sont localisées principalement dans les membranes basales, où elles forment des réseaux avec le collagène de type IV et le nidogène. Les laminines affectent les fonctions cellulaires par liaison aux intégrines et à d'autres récepteurs. Les fibronectines sont des glycoprotéines dimériques présentes dans la MEC et le sang. Elles forment des fibrilles et affectent la morphologie cellulaire, l'adhérence, la migration et la différenciation par liaison aux intégrines. Les protéoglycannes sont composés d'une protéine porteuse (core protein) et d'une ou plusieurs chaînes de glycosaminoglycannes (GAG). Le perlecan est le protéoglycanne à chaînes de sulfate d'héparanne le plus répandu dans les membranes basales et est trouvé également dans le stroma tumoral. Les autres protéoglycannes importants sont la décorine, qui orne les fibrilles de collagènes, et l'aggrécanne, qui est trouvé abondamment dans les tissus cartilagineux. Le versicanne est le protéoglycanne composé de chaînes de sulfate de chondroïtine le plus répandu dans les tissus non cartilagineux. Les syndécannes, les glypigannes et le CD44 sont des protéoglycannes de la surface cellulaire. L'acide hyaluronique (HA) est lui considéré simplement comme un glycosaminoglycanne et non un protéoglycanne car il n'est lié à aucune protéine.

A.5.2 CARACTERISTIQUES GENERALES DES MMPS:

Le remodelage de la MEC est un événement important dans de nombreux mécanismes physiologiques et pathologiques. De nombreux types de protéinases sont impliqués dans ce remodelage et spécialement les métalloprotéinases matricielles (MMPs) encore appelées matrixines.

En effet, les MMPs ont la capacité de dégrader la plupart des protéines de la MEC et de la membrane basale. Physiologiquement, les MMPs sont impliquées au niveau du remodelage de la MEC lors de la morphogenèse (incluant l'angiogenèse), la cicatrisation, l'ossification, le cycle menstruel et l'involution des glandes mammaires post-lactation. De plus, l'activité des MMPs permet physiquement la migration cellulaire, et modifie la signalisation inhérente à la MEC. La dégradation de la MEC implique aussi la modulation des différents facteurs de croissance et inhibiteurs de croissance liés à la MEC par leur clivage direct, par la rupture de leurs liaisons à la MEC ou par la modulation de l'activité de leurs antagonistes.

Les MMPs représentent une famille de 23 membres connus chez l'homme qui sont classés en sous-groupes en fonction de leur spécificité de substrat et leurs caractéristiques structurales. Ainsi, on retrouve les collagénases, les stromélysines, les matrilysines, les gélatinases, les MMPs de type membranaire et les MMPs non classées dans ces sous-groupes.

A.5.2.1 Classification fonctionnelle:

Les collagénases:

Le sous-groupe des collagénases comprend la MMP-1, la MMP-8, la MMP-13 et la MMP-18 (chez *Xenopus*). Ces collagénases sont capables de cliver les collagènes de type I, II et III mais également d'autres molécules de la MEC et protéines solubles. La MMP-1 (collagénase-1) fut le premier membre identifié des MMPs. L'expression de la MMP-1 est détectée dans une variété de processus physiologiques incluant le développement embryonnaire et la réparation ainsi que dans plusieurs processus pathologiques comme les ulcéres cutannés chroniques et de nombreux types de tumeurs malignes (Ala-aho et Kahari,

2005). La MMP-1 clive les collagènes de types I, II, III, VII, VIII et X, l'aggrecanne, ainsi que les inhibiteurs de sérine protéases et la macroglobuline- α (Ala-aho et Kahari, 2005). Une étude récente a montré que la MMP-1 pouvait activer PAR1 (Protease Activated Receptor-1) par clivage du dipeptide Arg-Ser, clivé également par la thrombine, ce qui permettrait la croissance et l'invasion des cellules de carcinome de sein (Boire et coll., 2005). La MMP-8 (collagénase-2) est synthétisée par les neutrophiles lors de leur maturation dans la moelle osseuse, stockée dans leurs granules intracellulaires et libérée en réponse à des stimuli externes (Hasty et coll., 1990). De plus, la MMP-8 humaine est exprimée par les chondrocytes du cartilage articulaire, les cellules épithéliales bronchiques et les monocytes lors de bronchites. Les substrats majeurs de la MMP-8 sont les collagènes I, II et III et l'aggrécanne (Ala-aho et Kahari, 2005). La MMP-13 (collagénase-3) a été clonée à partir de tissus de cancer du sein humain (Freije et coll., 1994). Par rapport aux autres MMPs, la MMP-13 posséde un large spectre de spécificité de substrats et un profil d'expression restreint. Elle clive les collagènes fibrillaires de type I, II et III, la gélatine, les collagènes de type IV, IX, X et XIV, la tenascine C, la fibronectine, l'aggrecanne, le versicanne, et l'ostéonectine (Ala-aho et Kahari, 2005). La MMP-13 peut activer des chémokines comme MCP-3 (monocyte chemoattractant protein-3) et SDF-1 (stromal cell-derived factor-1) (McQuibban et coll., 2000; McQuibban et coll., 2001) et semble impliquée dans l'activation du TGF-\u03b33 (Deng et coll., 2000). Son expression est limitée au remodelage de la MEC, le développement osseux fœtal et post-natal, la réparation et certains processus pathologiques mettant en jeu la destruction du collagène (paradontite, athérosclérose, ulcéres cutanés, etc.) (Ala-aho et Kahari, 2005).

Les gélatinases:

On compte deux gélatinases: la MMP-2 et la MMP-9. Elles présentent la capacité de dégrader la gélatine grâce à leurs trois séquences répétitives FN II qui permettent la liaison à la gélatine et au collagène. Elles ont pour substrats un grand nombre de molécules de la MEC dont les collagènes de types IV, V et XI, la laminine, la protéine du core de l'aggrécanne. La MMP-2 présente la particularité de digérer également les collagènes de type I, II et III de la même manière que les collagénases (Aimes et Quigley, 1995; Patterson et coll., 2001). La forme active de la MMP-2 a un poids moléculaire de 62 kDa alors que la pro-MMP-2 a un poids moléculaire de 72 kDa. Dans la majorité des cancers, la MMP-2 serait secrétée par les fibroblastes, puis recrutée au niveau des cellules tumorales par le biais de l'intégrine $\alpha\nu\beta$ 3. En plus des composants matriciels qu'elle dégrade la MMP-2 est aussi capable d'activer le

précurseur du TNF- α (Gearing et coll., 1995) et de dégrader l'IL-1 β (Ito et coll., 1996). La MMP-2 a été décrite pour la première fois par (Liotta et coll., 1979) qui ont trouvé cette enzyme sécrétée par une tumeur murine. La MMP-2 est unique parmi les MMPs puisqu'elle est exprimée de manière constitutive par un grand nombre de cellules différentes, possède une distribution tissulaire ubiquitaire et un mode d'activation qui diffère de celui des autres MMPs (voir paragraphe A.3.4.2.2.). La MMP-2 est capable d'activer la MMP-9 et la MMP-13 (Fridman et coll., 1995). Son rôle dans l'invasion tumorale et la dissémination métastatique a été largement décrit (Stetler-Stevenson, 1994; Chang et Werb, 2001; Egeblad et Werb, 2002; Polette et coll., 2004). L'implication de la MMP-2 dans l'invasion tumorale a été renforcée par l'étude de Itoh et coll. qui a montré que des souris déficientes en MMP-2 ont une angiogenèse et une progression tumorale réduites (Itoh et coll., 1998). La MMP-2 joue aussi un rôle dans la prolifération et la différenciation, l'adhérence et la migration (Yu et coll., 1997).

La MMP-9 a une spécificité de substrat très semblable à celle de la MMP-2. La MMP-9 a été découverte en 1974 par Sopata et Dancewicz dans les neutrophiles (Sopata et Dancewicz, 1974). En dehors des nombreux composés matriciels qu'elle dégrade, la MMP-9 régule aussi l'activité de cytokines et d'hormones puisqu'elle clive l'IL-1ß et la substance P (Backstrom et Tokes, 1995; Ito et coll., 1996). Elle clive également le peptide amyloïde β (Backstrom et coll., 1996). Un grand nombre de facteurs de croissance et de cytokines modifient l'expression de la MMP-9 dans de nombreux types cellulaires, comme le TGF-β, l'EGF, l'IL-1β, l'IL-2, le TNF-α (Mook et coll., 2004). La MMP-9 joue un rôle important dans divers processus comme l'implantation trophoblastique, le développement osseux, l'inflammation, la réparation (Buisson et coll., 1996), l'arthrite et la maladie d'Alzheimer (Lim et coll., 1997). La MMP-9 a aussi été impliquée dans les cancers, en particulier dans l'invasion tumorale et la formation des métastases de par sa capacité à dégrader les collagènes de la lame basale. Ainsi, la MMP-9 a été retrouvée dans les tumeurs de peau, poumon, sein, foie, prostate, cerveau, moelle osseuse et os (Turpeenniemi-Hujanen, 2005). Un certain nombre d'expériences menées sur des souris knock-out a permis de dégager certains rôles in vivo pour la MMP-9. Ainsi, Liu et coll. ont montré que les souris déficientes en MMP-9 sont résistantes aux pemphigoïdes bulleuses expérimentales (Liu et coll., 1998). D'autre part, Dubois et coll. ont établi que les souris déficientes en MMP-9 sont significativement moins susceptibles de développer une encéphalomyélite expérimentale par rapport aux souris sauvages (Dubois et coll., 1999).

Les stromélysines:

Les stromélysines (MMP-3, MMP-10 et MMP-11) ont un arrangement de leurs domaines similaires à celui des collagénases. Les MMP-3 (stromélysine-1) et -10 (stromélysine-2) ont une structure identique, un spectre large et similaire de substrats (collagènes de type III, IV, IX, et X, gélatine, laminine et protéoglycanne), et participent toutes deux à l'activation des pro-MMPs (Visse et Nagase, 2003). La MMP-3 est produite préférentiellement par les cellules stromales et sa surexpression est associée à l'invasion et aux métastases de divers types de cancer ainsi qu'à la progression des plaques d'athérosclérose (Sternlicht et coll., 2000). La MMP-10 semble exprimée par les cellules tumorales ellesmêmes dans différents carcinomes (O-charoenrat et coll., 2001; Kerkela et coll., 2001a; Mathew et coll., 2002). La MMP-11, pour sa part, a une activité plus faible sur les molécules de la MEC (Murphy et coll., 1993) mais est capable de cliver les serpines de façon plus efficace (Pei et coll., 1994). Elle possède un domaine de reconnaissance de la furine RX[R/K]R dans sa partie C-terminale du pro-peptide et pour cette raison est activée de manière intracellulaire (Pei et Weiss, 1995). Une isoforme intracellulaire de 40 kDa de la MMP-11 (β-stromélysine-3) a été identifiée dans des cellules en culture et dans le placenta mais sa fonction demeure méconnue (Luo et coll., 2002). L'expression de la MMP-11 est associée au remodelage durant l'embryogenèse, la réparation, l'involution des tissus et la métamorphose (Rio, 2002). Cependant, des études in vivo ont montré que la surexpression de la MMP-11 par les fibroblastes localisés à proximité des cellules cancéreuses (Basset et coll., 1990) est associée à l'agressivité de nombreux carcinomes humains (sein, colon, prostate, etc.) et un faible taux de survie des patients (Basset et coll., 1997). La MMP-11 semble posséder une fonction anti-apoptotique qui permet la survie des cellules cancéreuses (Boulay et coll., 2001; Wu et coll., 2001). Ainsi, la MMP-11 pourrait intervenir dans les étapes initiales du processus d'invasion (Rio, 2005).

Les matrilysines:

Les matrilysines MMP-7 et MMP-26 ne possèdent pas de domaine hémopexine. La MMP-7 (matrilysine-1) dégrade à la fois des composants de la MEC (collagène de type IV, laminine, entactine, ténascines C, vitronectine, fibronectine, protéolgycanne) (Wilson et Matrisian, 1996) et des molécules présentes à la surface cellulaire telles que la pro- α -défensine, le Fas-ligand, le pro-TNF- α et la cadhérine-E (Remy et Trespeuch, 2005). Présente

dans certains tissus à caractère glandulaire exocrine comme la glande mammaire, la prostate, le foie ou le pancréas, elle intervient dans la réparation tissulaire et la différenciation osseuse mais est surtout remarquable par sa présence ubiquitaire dans divers cancers notamment digestifs. Notamment, la MMP-7 est impliquée dans la formation des tumeurs et dans la dégradation tissulaire consécutive à l'extravasation des cellules tumorales (Remy et Trespeuch, 2005). Contrairement aux autres MMPs principalement stromales, elle est synthétisée par les cellules épithéliales et participe à l'invasion et la production de métastases (Yamashita et coll., 1998). La MMP-26 (ou endometase, matrilysine-2) est exprimée dans les cellules normales (endomètre) et certains carcinomes (endomètre, prostate, sein) (Zhao et coll., 2003; Zhao et coll., 2004). Elle digère quelques molécules de la MEC (collagène de type IV, gélatine, fibronectine) mais, à la différence des autres MMPs, est stockée en grande quantité dans la cellule (Marchenko et coll., 2004).

Les MMPs de type membranaire ou MT-MMPs:

Les MT-MMPs incluent 4 MMPs de type transmembranaire (MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP et MT5-MMP) et deux MMPs ancrées au Glycosyl Phosphatidyl Inositol (GPI) (MT4-MMP et MT6-MMP). Elles contiennent toutes une séquence de reconnaissance de la furine RX[R/K]R dans la partie C-terminale du pro-peptide. Elles sont activées de manière intracellulaire et sont exprimées ensuite à la membrane. Toutes les MT-MMPs hormis la MT4-MMP (MMP-17) sont capables d'activer la MMP-2 (English et coll., 2000). La MT1-MMP (MMP-14) a été identifiée comme un activateur spécifique de la pro-MMP-2 dans les tumeurs et joue un rôle important dans l'invasion de la membrane basale par les cellules tumorales (Sato et coll., 1994). De par son rôle dans l'activation de la MMP-2, la MT1-MMP est associée à un certain nombre de cancers: des adénocarcinomes de sein, des cancers bronchopulmonaires et des cancers cervicaux (Gilles et coll., 1996; Nawrocki et coll., 1997; Polette et coll., 1997; Polette et Birembaut, 1998). La MT1-MMP possède également une activité collagénolytique sur les collagènes de type I, II et III (Ohuchi et coll., 1997; Tam et coll., 2002). La MT1-MMP induit l'invasion et la prolifération des cellules tumorales dans une matrice de collagène (Hotary et coll., 2003; Sabeh et coll., 2004). La forme tronquée de la MT1-MMP privée de sa partie C-terminale contenant la partie transmembranaire (MT1-MMP soluble) en est incapable. Le site catalytique de la protéine est responsable de son activité protéolytique (Ohuchi et coll., 1997). Cependant, son activité collagénase est modulée par d'autres parties de la protéine. Notamment, le domaine hémopexine dans la partie C-terminale

permettrait de lier le collagène de type I et de dérouler la triple hélice pour le clivage (Tam et coll., 2002; Tam et coll., 2004). D'autre part, Anilkumar et coll. ont montré que l'unique cystéine présente dans le domaine cytoplasmique est palmitoylée de manière post-traductionnelle et cette modification est essentielle pour la fonction de la MT1-MMP dans la migration cellulaire (Anilkumar et coll., 2005). Une fois apparue à la surface cellulaire, la MT1-MMP est rapidement internalisée. Ceci intervient via des vésicules recouvertes de clathrine et implique la liaison du domaine cytoplasmique de la MT1-MMP à la sous-unité µ2 de la protéine adaptatrice 2 à travers le motif LLY (571-573) (Uekita et coll., 2001). La MT1-MMP internalisée est alors recyclée à la membrane plasmique par l'intermédiaire du motif DKV (580-582) dans le domaine cytoplasmique (Wang et coll., 2004).

Autres MMPs:

Sept MMPs ne sont référencées dans aucun des sous-groupes précédents. Parmi elles, les MMP-12, -20 et -27 ont des structures et des localisations chromosomiques identiques à celles des stromélysines. La métalloélastase (MMP-12) est exprimée majoritairement par les macrophages mais est trouvée également dans les chondrocytes hypertrophiés (Kerkela et coll., 2001b) et les ostéoclastes (Hou et coll., 2004). La MMP-12 digère l'élastine et de nombreuses molécules de la MEC. Enfin, elle joue un rôle important dans la migration des macrophages (Shipley et coll., 1996). La MMP-19 digère des éléments de la MEC et de la membrane basale (Stracke et coll., 2000). Egalement appelée RASI (Rheumatoid arthritis Synovial Inflammation), elle est trouvée dans les lymphocytes et le plasma de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde ou de lupus érythémateux (Sedlacek et coll., 1998). Elle est également exprimée dans des kératinocytes en prolifération lors de la cicatrisation (Sadowski et coll., 2003). L'énamelysine (MMP-20) est exprimée dans l'émail néo-synthétisé des dents et digère l'amélogénine (Ryu et coll., 1999). La MMP-21 a été découverte à l'origine chez le Xénope (Yang et coll., 1997) et plus récemment chez la souris et l'homme (Marchenko et coll., 2003). Elle est exprimée invariablement dans les tissus fœtaux et adultes ainsi que dans les cellules de carcinomes squameux et basaux (Ahokas et coll., 2003). Elle digère la gélatine mais aucun autre substrat de la MEC n'a encore été identifié. La MMP-23 est unique puisque c'est la seule MMP possédant un domaine de type Ig riche en cystéine à la place du domaine hémopexine (Velasco et coll., 1999). Elle a tout d'abord été considérée comme de type membranaire mais le pro-domaine contenant le domaine transmembranaire est clivé par une convertase (Pei et coll., 2000). La MMP-27 a été trouvée pour la première fois dans les fibroblastes d'embryon de poulet (Yang et Kurkinen, 1998). La MMP-27 de poulet digère la gélatine et la caséine, et provoque une autolyse de l'enzyme. Peu de choses sont encore connues sur son activité chez les mammifères. L'épilysine (MMP-28) est exprimée dans de nombreux tissus tels que le poumon, le cœur, le tractus gastro-intestinal et le testicule. Elle pourrait participer à la réparation quand elle est exprimée par les kératinocytes basaux de la peau (Saarialho-Kere et coll., 2002). On la retrouve en grande quantité dans le cartilage de patients atteints d'arthrite osseuse (Kevorkian et coll., 2004) et de polyarthrite rhumatoïde (Momohara et coll., 2004). Les MMP-21, -23 et -28 ont une séquence de reconnaissance à la furine avant le domaine catalytique et sont donc activées de manière intracellulaire et secrétées sous forme d'enzymes actives (voir tableau 1).

Enzyme	MMP	Localisation chromosomique	PM (pro/active) en kDa	Structure
Collagénases				
Collagénase 1	MMP-1	11q22-q23	52/41	В
Collagénase 2	MMP-8	11q21-q22	85/64	В
Collagénase 3	MMP-13	11q22.3	65/55	В
Collagénase 4 (Xenopus)	MMP-18		53/42	В
Gélatinases				
Gélatinase A	MMP-2	16q13	72/62	С
Gélatinase B	MMP-9	20q11.2-q13.1	92/85	С
Stromélysines				
Stromélysine 1	MMP-3	11q23	57/45, 28	В
Stromélysine 2	MMP-10	11q22.3-q23	56/47, 24	В
Stromélysine 3	MMP-11	22q11.2	58/28	D
Matrilysines				
Matrilysine 1	MMP-7	11q21-q22	28/19	А
Matrilysine 2 (endométase)	MMP-26	11p15	28/inconnu	А
MMPs de type membranaire				
(A)Type transmembranaire				
MT1-MMP	MMP-14	14q11-q12	63/60	Е
MT2-MMP	MMP-15	15q13-q21	68/62	Е
MT3-MMP	MMP-16	8q21	66/56	Е
MT5-MMP	MMP-24	20q11.2	63/45	Е
(B) Ancré au GPI				
MT4-MMP	MMP-17	12q24.3	57/53	F
MT6-MMP	MMP-25	16p13.3	inconnu	F
Autres				
Macrophage élastase	MMP-12	11q22.2-q22.3	54/45, 22	В
RASI-1	MMP-19	12q14	57/45	В
Enamélysine	MMP-20	11q22.3	54/22	В
XMMP	MMP-21	10q26.2	70/53	G
CA-MMP	MMP-23	1p36.3	inconnu	Н
-	MMP-27	11q24	inconnu	В
Epilysine	MMP-28	17q21.1	inconnu/58, 55	D

Tableau 1. Classification fonctionnelle des MMPs.

Les différentes MMPs sont listées avec leur localisation chromosomique chez l'homme, leur poids moléculaire et leur composition structurale qui fait référence à la figure 9 (d'après la base de données Merops regroupant toutes les peptidases: http://www.merops.sanger.ac.uk/).

Le tableau 2 reprend les différents substrats des MMPs ainsi que les effets biologiques induits par leurs clivages.

MMPs responsables	Substrat clivé	Effets biologiques observés	
MMP-1	Collagène de type I	Migration des kératinocytes et ré-épithélialisation	
	Non identifié	Agrégation plaquettaire	
	PAR-1	Activation de PAR1	
MMP-2	Protéoglycanne à sulfate de chondroïtine	Croissance neurale	
	Non identifié	Différenciation des cellules mésenchymateuses avec	
		phenotype inflammatoire	
	Endotheline	Generation de vasoconstricteur	
	Adromédulline	Conversion de vasodilatateur en vasoconstricteur	
	SDF-1a	Apoptose neuronale menant à la neurodégénérescence	
MMP-3	Membrane basale	Apoptose des cellules épithéliales mammaires	
	Membrane basale	Formation alvéolaire épithéliale mammaire	
	Cadhérine-E	TEM (cellules épithéliales mammaires)	
	Plasminogène	Génération de fragment de type angiostatine	
MMP-7	Fibronectine	Différenciation des adipocytes	
	Plasminogène	Génération de fragment de type angiostatine	
	Fas ligand	Apoptose assurée par le récepteur Fas	
	Pro-TNF-α	Pro-inflammatoire	
	Ligand RANK	Activation des ostéoclastes	
	EGF liant l'héparine	Vasoconstriction et croissance cellulaire	
MMP-9	Plasminogène	Génération de fragment de type angiostatine	
	ICAM-1	Résistance des cellules tumorales	
	Précurseur de TGF-β	Biodisponibilité du TGF-β	
	Collagène de type IV	Néovascularisation du thymus	
	Galactine-3	Apoptose des chondrocytes et recrutement des ostéoclastes	
	IL-2Rα	Réponse à l'IL-2 réduite	
MMP-11	IGFBP-1	Augmentation de la biodisponibilité de IGF-1	
	-	et prolifération cellulaire	
MMP-12	Plasminogène	Génération de fragment de type angiostatine	
MMP-13	Collagène de type I	Activation des ostéoclastes	
MT1-MMP	Collagène de type I	Tubulogenèse du rein	
	CD44	Migration cellulaire	
	Lamine 5 _β 3	Migration cellulaire	
	MUC-1	Attachement de l'embryon à l'épithélium utérin	
Collagènases	Collagène de type I	Apoptose	
MMP-1, -2 et -3	Fibronectine	Migration cellulaire	
MMP-1, -2, -3, -7 et -19	IGFBP-3	Augmentation de la biodisponibilité de IGF-1 et prolifération cellulaire	
MMP-1, -2 et -9	Dégradation de l'IL-1β	Anti-inflammatoire	
MMP-1, -2,-3, -13 et MT1- MMP	MCP-3	Anti-inflammatoire	
MMP-1, -3 et -9	Transformation de l'IL-1β	Pro-inflammatoire	
MMP-2, -3 et -7	Décorine	Augmentation de la biodisponibilité du TGF-β	
MMP-2, -3, -7, -9 et -13	BM-40 (SPARC/Ostéonectine)	Augmentation de l'affinité au collagène	
MMP-2, MT1-MMP,	Chaîne γ 2 de la Laminine 5	Migration des cellules épithéliales	
MMD 2 MMP 7	Cadhárina E	Puntura de l'agrégation callulaire et invesion	
MMD 2 of 12	Darlagon	Libération de bEGE	
MT1 MMD of MT2 MMD	Transalutaminasa	A dhérence cellulaire réduite et extension	
MMDs		Augmentation de la biodisponibilité de ICE 1	
TATTATT 2	IGFBP-5	et prolifération cellulaire	
	Collagène de type XVIII	Génération de fragment de type endostatine	
	CTGF	Activation du VEGF	

Tableau 2. Nature des substrats clivés par les MMPs et effets biologiques observés.

Traduit et modifié d'après (Visse et Nagase, 2003).

A.5.2.2 Classification structurale:

Les MMPs qui sont traditionnellement classées selon leurs affinités de substrats peuvent également être classsées en fonction de leur structure (Figure 9). Les MMPs sont des protéines extracellulaires mais des études récentes ont démontré que la MMP-1, la MMP-2 et la MMP-11 pouvaient agir comme des protéines intracellulaires. Une MMP typique consiste en un pro-peptide d'environ 80 acides aminés, un domaine catalytique d'environ 170 acides aminés, une région charnière de longueur variable et un domaine hémopexine d'environ 200 acides aminés. Les MMP-7, -26 et -23 représentent des exceptions puisqu'elles n'ont pas de peptide charnière et de domaine hémopexine. La MMP-23, quant à elle, possède uniquement un domaine riche en cystéine et un domaine de type immunoglobuline après le domaine catalytique. Les deux gélatinases MMP-2 et MMP-9 contiennent trois séquences peptidiques de structure analogue à la fibronectine de type II. Le pré-domaine est rapidement éliminé après la sécrétion cellulaire et est absent de la forme enzymatique active. Le pro-domaine maintient l'activité enzymatique sous forme latente et est classiquement constitué d'une séquence peptidique Pro-Arg-Cys-Gly-His-X-Pro-Asp comprenant un résidu cystéine qui interagit avec le site catalytique. Ce dernier contient un atome de zinc maintenu par trois résidus histidine au fond d'une structure peptidique His-Glu-Gly-His-X-X-Gly-X-X-His tridimensionnelle en forme de poche. Le clivage protéolytique du pro-domaine, libérant l'atome de zinc du résidu cystéine, entraîne l'activation du site catalytique qui peut alors se lier à son substrat. A part la MMP-7 et la MMP-26, les MMPs contiennent aussi un domaine similaire à l'hémopexine et à la vitronectine (DSHV). Le DSHV influence la liaison aux substrats et aux inhibiteurs tissulaires des MMPs (TIMPs), de même que l'activation membranaire des zymogènes. La région charnière, qui relie le domaine catalytique au DSHV, est variable d'une MMP à l'autre et influence aussi la liaison aux substrats.



Figure 9: Classification structurale des MMPs.

Pré, pré-pro-domaine; Pro, pro-domaine avec un groupement thiol libre; Fu, site de reconnaissance de la furine; Zn, site de liaison d'un élément zinc; Fn, domaine fibronectine de type II liant le collagène; H, région charnière; TM, domaine transmembranaire; C, queue cytoplasmique; GPI, domaine d'ancrage au GPI; Ig-like, domaine de type immunoglobuline; Vn, domaine similaire à la vitronectine (DSHV); CA, domaine riche en cystéine. D'après (Egeblad et Werb, 2002).

A.5.3 REGULATION DE L'EXPRESSION DES MMPS:

Les MMPs sont exprimées dans les tissus à différents niveaux du développement mais sont absentes dans les cellules normales de l'organisme adulte. De la même manière, leur expression basale est faible dans les cellules en culture. Cependant, une variété de stimuli externes comme les cytokines, les hormones, les facteurs de croissance, les modifications des contacts cellule-cellule et cellule-MEC peuvent rapidement induire l'expression de MMPs.

A.5.3.1 Régulation transcriptionnelle des MMPs:

A.5.3.1.1 Généralités:

Les promoteurs des gènes des MMPs sont sous le contrôle de facteurs de croissance, de cytokines et de promoteurs de tumeur par l'intermédiaire de voies de transduction intracellulaires. Les différentes voies aboutissent à la liaison de facteurs de transcription, activateurs ou répresseurs, sur des séquences spécifiques présentes au niveau des promoteurs des gènes des MMPs. Les sites de liaison de ces facteurs de transcription et leur identité a fait l'objet de plusieurs études. Une représentation schématique des régions promotrices est donnée en figure 10. Deux éléments majeurs agissant en cis sont trouvés dans la majorité des promoteurs des MMPs: le site AP-1 (activator protein-1) et le site PEA-3 (polyoma enhancer A binding protein-3). AP-1 et PEA-3 interagissent respectivement avec les familles de facteurs de transcription fos/Jun et Ets. Il existe également d'autres éléments présents individuellement dans les promoteurs des MMPs. Ainsi, les promoteurs de la MMP-1, la MMP-7, la MMP-13 et la MT1-MMP ont tous un ou plusieurs TGF-β inhibitor elements (TIEs) sur lesquels peuvent se lier les facteurs de transcriptions Smad (Lohi et coll., 2000). Les promoteurs des MMP-2, MMP-9 et MT1-MMP contiennent des boîtes GC et lient le facteur de transcription Sp1 (Benbow et Brinckerhoff, 1997; Lohi et coll., 2000). De plus, le promoteur de la MMP-9 possède un site de liaison du NF-κB (nuclear factor-κB) (Westermarck et Kahari, 1999). La MMP-1 et la MMP-13 ont également été décrites comme répondant au facteur de transcription NF-κB (Vincenti et Brinckerhoff, 2002). Certaines MMPs, dont la MMP-7 et la MT1-MMP, possédent au moins un site de liaison du facteur de transcription Tcf-4 et constituent ainsi des cibles du complexe de transcription caténine-\u00b3/Tcf (Brabletz et coll., 1999; Takahashi et coll., 2002). La combinaison des éléments se liant en cis ainsi que les interactions avec des facteurs de *trans*-activation permettent une régulation spatiale et temporelle de l'expression des MMPs.



Figure 10: Localisation des sites éléments liant des facteurs de transcription dans les promoteurs des MMPs.

C/EBP-h, CCAAT enhancer-binding protein; TIE, TGF-β inhibitory element; AP1, site de liaison de AP-1; PEA-3, polyoma enhancer A binding protein-3; OSE-2, osteoblastic *cis*-acting element; TATA, boîte TATA; AP2, site de laison de AP-2; Sil, silencer; Sp1, site de liaison de Sp-1; NF- κ B, site de liaison NF- κ B; CCAAT, boîte CCAAT; Tcf-4, site de liaison du Tcf-4; SPRE, stromelysin-1 PDGF-responsive element. Modifié d'après (Deschamps et Spinale, 2006).

A.5.3.1.2 Régulation transcriptionnelle de la MMP-2:

Trois voies MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) sont connues pour réguler l'expression de la MMP-2, la p38 kinase, JNK (c-Jun N-terminal Kinase) et ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase). Les kinases p38 et JNKs sont généralement activées en réponse aux cytokines inflammatoires, le stress osmotique et les signaux apoptotiques. ERK répond généralement aux cytokines, aux facteurs de croissance et aux esters de phorbol. En conséquence, un groupe de protéines kinases [MAPK kinase kinases (MAPKKKs)] phosphoryle des MAPK kinases (MAPKK) lesquelles phosphorylent et activent les MAPK. Les MAPK activées subissent alors une translocation dans le noyau et activent à leur tour une série de facteurs de transcription qui interagissent avec des sites de liaison présents dans les promoteurs des MMPs (voir figure 11) (Mook et coll., 2004).

Le gène de la MMP-2 a longtemps été considéré comme ne pouvant être régulé en raison de l'absence d'éléments de régulation caractéristiques dans sa région promotrice (Mauviel, 1993). Cependant, l'analyse de la séquence de la région promotrice du gène MMP-2 révèle la présence de nombreux éléments régulateurs agissant en cis (voir figure 12) et incluant des sites de liaison pour CREB (cAMP-Response Element-Binding protein), p53, Ets-1, C/EBP (CCAAT/Enhancer-Binding Protein), la séquence consensus de Sp1 (boîte GC), des sites de liaison TRE pour la liaison d'AP-1 (TPA Responsive Element) et un site de liaison AP-2 (Qin et coll., 1999). Un élément enhancer agissant en cis et contenant des motifs de liaison pour les facteurs AP-2, p53 et YB-1 a été désigné r2 chez l'homme. Bian et Sun ont montré que l'inactivation du promoteur est dépendante du site de liaison de p53 (Bian et Sun, 1997). Les facteurs de transcription AP2 et YB-1 semblent induire l'expression de la MMP-2 par synergie via la liaison d'un complexe héteromérique AP-2/YB-1 à l'élément r2. Il a été démontré également que YB-1 et p53 entrent en compétition pour se lier à AP-2. La combinaison d'AP-2, YB-1 et p53 se traduit par une augmentation majeure de la liaison sur r2 (Mertens et coll., 2002). Par ailleurs, nm23-H1, une nucleoside diphosphate kinase, entre en compétition pour le site YB-1, ce qui induit une réduction dose dépendante de l'expression de la MMP-2 (Cheng et coll., 2002). Les facteurs de transcription Sp1 et Sp3, se liant tous les deux aux sites de liaison Sp1, sont des activateurs du promoteur de la MMP-2 et agissent également de manière synergique (Qin et coll., 1999). L'activation par Sp1 est dépendante de l'activité de ERK via MKK1 et peut être supprimée par des drogues anti-inflammatoires non stéroïdiennes. D'autre part, ATF3 (activating transcription factor-3) supprime l'activité de promoteur de la MMP-2 de manière antagoniste à la p53 (Yan et coll., 2002). La sérine/thréonine kinase active stimule l'expression de la MMP-2 alors que l'activation de phosphatases telles que PTEN atténue l'activité d'AKT et supprime l'expression de la MMP-2 (Davies et coll., 1999). Ces données montrent que l'expression de la MMP-2 est constitutive mais que l'activité de son promoteur est inductible (Figure 12).



Figure 11: Schéma des voies de signalisation régulant l'expression de la MMP-2.

Les différents composants de la voie MAPK sont indiqués. Des signaux extracellulaires tels que les esters de phorbol (TPA), les intégrines, des facteurs de croissance et des cytokines activent la voie MAPK. Traduit et modifié de (Mook et coll., 2004).



Figure 12: Représentation des principaux facteurs régulant la MMP-2.

(+) augmentation de l'expression de la MMP-2, (-) diminution de l'expression de la MMP-2. D'après (Mook et coll., 2004).

A.5.3.1.3 Régulation transcriptionnelle de la MT1-MMP:

La régulation du gène de la MT1-MMP semble particulièrement singulière. In vitro, elle est exprimée de manière constitutive par différents types cellulaires comme les fibroblastes, les cellules enothéliales, et les cellules de muscle squelettique, et son expression est uniquement augmentée par le PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) et le TNF-α et diminuée par le dexamethasone (Lohi et Keski-Oja, 1995; Lohi et coll., 1996). De plus, l'expression de la MT1-MMP est augmentée par traitement à la lectine concanavaline A (conA). L'expression de la MT1-MMP est également régulée par des interactions MECcytosquelette dans des fibroblastes lors de leur culture en gel 3D de collagène, d'étirement mécanique ou en présence de cytochalasine D (Ailenberg et Silverman, 1996; Gilles et coll., 1997; Tyagi et coll., 1998). Le promoteur de la MT1-MMP ne contient pas de boîte TATA mais on constate la présence de séquences consensus CCAAT ou ATTGG. L'unique site de liaison de facteur de transcription présent est un site Sp1. Sp1 est notamment essentiel à l'activité basale du promoteur de la MT1-MMP (Seiki, 2003). Le facteur de transcritpion Egr-1, en se fixant à sa séquence de liaison, assure la transcription de la MT1-MMP dans les cellules endothéliales cultivées en gel de collagène (Haas et coll., 1999). Trois séquences avec une haute homologie pour l'élément inhibiteur TGF-β1 (TIE) sont également trouvées dans ce promoteur. En amont de ces sites, on trouve un élément répondant à v-src qui permet l'induction de l'expression du gène de la MT1-MMP dans les cellules MDCK transformées par v-src (Cha et coll., 2000). La voie des MAPK semble également être impliquée dans la régulation de la MT1-MMP par la cadhérine-E (Ara et coll., 2000). La MT1-MMP qui contient un site de liaison au Tcf dans son promoteur est une cible du complexe caténine- β /Tcf-4. De manière intéressante, le CD44 et la laminine γ 2 constituent également des cibles de ce complexe alors que tous deux coopèrent avec la MT1-MMP pour induire la migration (Koshikawa et coll., 2000; Kajita et coll., 2001). Récemment, il a été montré que la protéine ZO-1 des jonctions serrées, une fois délocalisée dans le cytoplasme, peut réguler le promoteur de la MT1-MMP en mettant en jeu l'activité transcriptionnelle des complexes caténine-β/Tcf (Polette et coll., 2005).

A.5.3.2 Régulation de l'activité des MMPs:

A.5.3.2.1 Activation des MMPs:

A.5.3.2.1.1 Mécanismes généraux:

La plupart des MMPs (13) est sécrétée sous forme de zymogènes inactifs latents et est activée dans l'espace extracellulaire. L'activation de ces zymogènes constitue une étape de régulation importante de l'activité des MMPs (Figure 13). La présence d'une région «leurre» dans le pro-peptide permet aux protéinases présentes dans les tissus ou le plasma ou d'origine bactérienne d'activer les pro-MMPs. Le clivage de cette région «leurre» enlève seulement une partie du pro-domaine et doit être complété par l'action d'autres MMPs actives pour ôter le pro-domaine entièrement (Nagase et coll., 1990). De nombreuses MMPs peuvent cliver in vitro le pro-domaine d'autres MMPs mais les mécanismes d'activation in vivo pour la majorité des MMPs restent peu clairs. Dans des systèmes expérimentaux, la plasmine a été décrite comme activant un grand nombre de MMPs latentes (Mignatti et Rifkin, 1996; DeClerck et Laug, 1996). En se fixant sur son récepteur cellulaire, l'urokinase-type plasminogen activator (uPA) permet l'activation du plasminogène en plasmine à la surface de la cellule, et ainsi une activation rapide des pro-MMPs (Kirchheimer et Remold, 1989). L'uPA est exprimé par de nombreux types cellulaires impliqués dans le remodelage tissulaire, et son inhibition in vitro réduit significativement la dégradation matricielle. L'inhibiteur de l'activateur du plasminogène, le PAI-1 (type-1 plasminogen activator inhibitor), a un effet inhibiteur sur l'uPA et constitue donc le contrepoids de la cascade d'activation des MMPs par la plasmine, et donc de l'activité métalloprotéasique matricielle. Les niveaux ultérieurs d'activation des MMPs constituent une boucle de rétrocontrôle, au cours de laquelle les MMPs sont capables de s'activer mutuellement et de s'auto-activer. Ainsi, la MMP-1 peut activer la MMP-2 latente. La forme latente de la MMP-13 pouvant être activée par la MT1-MMP, la MMP-3, la MMP-10 et la MMP-12 peut activer à son tour les formes latentes de la MMP-2 et de la MMP-9 (Knauper et coll., 1996). Néanmoins, le mécanisme d'activation le mieux connu est celui de la pro-MMP-2 par la MT1-MMP.



Figure 13: Activation extracellulaire des MMPs sécrétées.

Les pro-MMPs sont sécrétées sous forme de zymogènes inactifs qui peuvent être activés par des protéinases ou par des agents non protéolytiques. L'activation par des protéinases est assuré par le clivage de la région leurre. L'activation complète est achevée par la libération complète du pro-peptide par auto-catalyse. L'activation chimique est liée au swith des cystéines qui induit l'activation partielle des MMPs. Une dernière phase d'autocatalyse permet d'ôter le fragment restant du pro-peptide.

A.5.3.2.1.2 Activation de la pro-MMP-2 par la MT1-MMP:

La pro-MMP-2 forme un complexe avec le TIMP-2 (Tissue Inhibitor of MMP-2) via l'interaction entre son domaine hémopexine et le domaine C terminal de l'inhibiteur. La formation de ce complexe est essentielle à l'activation de la pro-MMP-2 par la MT1-MMP à la surface cellulaire (Itoh et Seiki, 2006). Le complexe se lie à une molécule de MT1-MMP active par le domaine N terminal inhibiteur du TIMP-2, ce qui a pour conséquence d'orienter la pro-MMP-2 face à une autre molécule de MT1-MMP. Les deux molécules de MT1-MMP interagissent mutuellement à la surface cellulaire par leur domaine hémopexine ce qui forme un complexe d'activation tétramérique. Une molécule de MT1-MMP agit comme récepteur du

complexe pro-MMP-2-TIMP-2 et l'autre comme activateur de la pro-MMP-2. Un excès de TIMP-2 prévient le processus d'activation par inhibition de la seconde molécule de MT1-MMP. La pro-MMP-2 peut former également un complexe avec le TIMP-3 et le TIMP-4 d'une manière similaire. Le complexe pro-MMP-2-TIMP-4 interagit avec la MT1-MMP, mais ce complexe n'est pas productif quant à l'activation de la MMP-2 (Bigg et coll., 2001). La fonction biologique du complexe pro-MMP-2-TIMP-3 n'est pas connue. L'intégrine $\alpha\nu\beta3$ semble également participer à l'activation de la MMP-2 par la MT1-MMP. Il a été mis en évidence que la MT1-MMP peut activer l'intégrine $\alpha\nu\beta3$ par clivage protéolytique. Cette intégrine, une fois active, peut alors se lier à la forme intermédiaire de la MMP-2 pour compléter son activation par autocatalyse. Cette liaison permet également de séquestrer la MMP-2 sous forme active au niveau des invadopodes (Deryugina et coll., 2000; Deryugina et coll., 2001).



Figure 14: Processus d'activation de la pro-MMP-2.

I. Les molécules de MT1-MMP forment des dimères ou des multimères à la surface cellulaire par interaction de leurs domaines homéopexine. II. Le TIMP-2 forme un complexe avec une première molécule de MT1-MMP. III. La pro-MMP-2 complexée au TIMP-2 lié quant à lui à la MT1-MMP est clivée par une seconde molécule de MT1-MMP adjacente. IV. La MMP-2 active est libérée et peut dégrader la MEC. V. L'intégrine $\alpha\nu\beta3$ est activée par la MT1-MMP et peut ainsi se lier à la MMP-2. VI. La liaison de la MMP-2 à l'intégrine $\alpha\nu\beta3$ provoque un changement de conformation stabilisant l'enzyme sous sa forme active après protéolyse. La concentration en TIMP-2 dans l'espace intracellulaire est critique pour assurer l'activation de la pro-MMP-2. Si le taux de TIMP-2 est trop élevé, il va saturer les molécules de MT1-MMP et de MMP-2 libres.

A.5.3.2.2 Inhibition de l'activité des MMPs:

L'activité des MMPs est régulée par des inhibiteurs endogènes spécifiques, les TIMPs, et non spécifiques comme la macroglobuline- α_2 et d'autres molécules.

A.5.3.2.2.1 Les TIMPs:

Quatre inhibiteurs physiologiques des MMPs, les TIMPs (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases) ont été clonés, purifiés et caractérisés. Ils participent activement à la régulation de l'activité protéolytique des MMPs, en conditions physiologiques et probablement en conditions pathologiques. Les TIMPs inhibent les MMPs de manière sélective mais réversible avec un rapport stœchiométrique 1:1. Les TIMPs sont constitués d'un domaine N terminal et d'un domaine C terminal. Chaque domaine contient trois ponts disulfures et le domaine N terminal enveloppe une unité indépendante avec l'activité inhibitrice. Les TIMPs inhibent toutes les MMPs à l'exception du TIMP-1 qui inhibe peu la MT1-MMP, la MT3-MMP la MT5-MMP et la MMP-19. Certains TIMPs ont montré également leur capacité à inhiber les ADAMs et les ADAMTSs.

TIMP-1: Le TIMP-1 est une petite protéine de 28 kDa riche en mannose dont le gène est localisé sur le chromosome 11 chez l'homme. Elle contient deux sites de glycosylation, mais ceux-ci ne semblent pas essentiels pour sa fonction inhibitrice. Cette molécule est très stable, en raison de la présence de six ponts disulfures intracaténaires. Le TIMP-1 est cependant très sensible à l'action des sérines protéases, telles que la trypsine, la chymotrypsine et l'élastase, mais est résistant à la plasmine. Le TIMP-1 est capable de se lier à la MMP-1, à la pro-MMP-9 ainsi qu'à sa forme activée et à la MMP-13. Le TIMP-1 joue un rôle important dans le développement du tissu osseux dans l'inhibition de l'angiogenèse. Il influence l'activité des facteurs de croissance et intervient dans les changements de morphologie cellulaire. Certains facteurs comme les facteurs de croissance sont capables de réguler le TIMP-1. Les esters de phorbol et l'IL-1 β stimulent son expression tout comme le TGF- β et les rétinoïdes (Gomez et coll., 1997).

TIMP-2: Le TIMP-2 est une petite protéine de 21 kDa dont le gène est localisé sur le chromosome 17 chez l'homme. Le TIMP-2 présente 40% d'homologie avec la séquence en acides aminés du TIMP-1 (Stetler-Stevenson et coll., 1989). Son expression est majoritairement constitutive. Le TIMP-2 est capable d'inhiber un grand nombre de MMPs.

Cependant, il a été rapporté comme inhibant préférentiellement la MMP-2 en formant un complexe stœchiométrique 1:1 avec celle-ci (Goldberg et coll., 1989; Kleiner, Jr. et coll., 1992). Le complexe pro-MMP-2/TIMP-2 stabilise la MMP-2 en prévenant l'auto-activation de la MMP-2.

TIMP-3: L'homologie de structure de cette protéine avec le TIMP-1 et le TIMP-2 est relativement faible. La protéine TIMP-3 est une protéine non glycosylée de 24 kDa dont le gène est localisé sur le chromosome 22 chez l'homme. Le TIMP-3 a d'abord été purifié à partir de fibroblastes de poulet et identifié comme le ChIMP-3 (Chiken Inhibitor of MMP) (Pavloff et coll., 1992). Le TIMP-3 présente 30% d'homologie avec le TIMP-1 et 38% avec le TIMP-2. Le TIMP-3 est le seul membre de la famille des TIMPs trouvé exclusivement dans la MEC. Le TIMP-3 a été montré comme favorisant le détachement de cellules transformées de la MEC et d'accélérer les changements morphologiques associés à la transformation oncogénique de ces cellules (Yang et Hawkes, 1992).

TIMP-4: Le TIMP-4 est une protéine de 22 kDa dont le gène a été identifié par clonage moléculaire (Greene et coll., 1996). Le TIMP-4 présente une homologie de structure avec le TIMP-2 d'environ 70 %. Le profil d'expression du TIMP-4 dans les tissus adultes humains montre un fort taux de transcrits dans le cœur et le cerveau et un niveau faible voire non détectable dans les autres organes. Comme le TIMP-2, le TIMP-4 peut se lier à la pro-MMP-2 et empêcher son activation sous l'action de la MT1-MMP.

Les TIMPs sont des protéines sécrétées mais peuvent être également localisés à la surface cellulaire en association avec des protéines liées à la membrane. Ainsi, les TIMP-2, TIMP-3 et TIMP-4 peuvent se lier à la MT1-MMP. Le TIMP-3 est séquestré au niveau de la MEC par liaison à des protéoglycannes contenant du sulfate d'héparanne ou potentiellement du sulfate de chondroïtine (Yu et coll., 2000).

Les TIMPs peuvent jouer un rôle dans les processus biologiques n'impliquant pas leur activité anti-protéasique tels que la croissance et la survie cellulaire. Le TIMP-1 a été identifié tout d'abord comme un activateur de la voie érythrocytaire (Gasson et coll., 1985) et un agent stimulant la croissance de certaines lignées cellulaires (Bertaux et coll., 1991; Hayakawa et coll., 1992). Le TIMP-2 est également un activateur de la voie érythrocytaire (Stetler-Stevenson et coll., 1992) et stimule la croissance des cellules de lymphome (Hayakawa et coll., 1994) et des fibroblastes (Corcoran et Stetler-Stevenson, 1995). Plus récemment, Sobue et coll. ont montré que le TIMP-1 et le TIMP-2 stimulent la résorption osseuse par les ostéoclastes via les voies tyrosine kinase et MAP kinase (Sobue et coll., 2001). Le TIMP-1 est capable de se lier à la surface cellulaire des cellules de carcinome mammaire MCF-7 et de

subir une translocation dans le noyau (Ritter et coll., 1999) bien qu'aucun récepteur ni de fonction particulière du TIMP-1 nucléaire ne soient encore identifiés. L'accumulation de TIMP-1 dans les noyaux de fibroblastes gingivaux a été montrée comme étant maximale en phase S du cycle cellulaire (Li et coll., 1995). Le TIMP-2 semble agir de manière spécifique par des récepteurs de haute affinité qui sont liés à des protéines G et aux voies de l'AMPc (Corcoran et Stetler-Stevenson, 1995). Des taux élevés de TIMP-3 favorisent l'apoptose dans de nombreux types cellulaires in vitro et in vivo (Ahonen et coll., 1998; Baker et coll., 1999; Bond et coll., 2000). Lors du développement, les taux élevés de TIMP-3 interviennent dans les cellules utérines durant l'implantation de l'embryon et sont liés à la survie de ces cellules différenciées (Alexander et coll., 1996). Le TIMP-4 est le promoteur de l'apoptose dans les fibroblastes cardiaques mais inhibe l'apoptose dans les cellules cancéreuses mammaires in vitro et dans les tumeurs mammaires in vivo. Il a été montré que l'expression des TIMPs peut également être associé à la progression tumorale. En effet, la surexpression du TIMP-1 et du TIMP-2 est observée dans des lignées cellulaires de lymphome de Burkitt (Stetler-Stevenson et coll., 1997). Dans ce même type de lignées, l'expression élevée de TIMP-1 est corrélée à l'expression accrue de marqueurs de survie et le TIMP-1 confère une résistance à l'apoptose induite par le ligand Fas (Guedez et coll., 1998a; Guedez et coll., 1998b). De façon contradictoire, le TIMP-2 peut, à la fois, promouvoir l'apoptose dans un modèle in vivo de cancer colorectal (Brand et coll., 2000) mais aussi protèger les cellules de mélanome B16 de ce processus (Valente et coll., 1998). Le TIMP-4 est lui surexprimé dans les cellules de carcinome mammaire et favorise la croissance tumorale en inhibant l'apoptose (Jiang et coll., 2001). Pour sa part, le TIMP-3 supprime efficacement l'invasion et induit l'apoptose de cellules tumorales d'origine diverses (Ahonen et coll., 1998; Baker et coll., 1999). Comme l'indiquent ces différents travaux, les TIMPs induisent des effets divergents sur la mort cellulaire programmée des cellules tumorales.

A.5.3.2.2.2 La macroglobuline- α_2 :

La **macroglobuline**- α_2 humaine est une glycoprotéine plasmatique de 772 kDa contenant 4 sous-unités identiques de 180 kDa. Elle inhibe la plupart des protéinases (comme les MMPs et les ADAMs) en formant un complexe qui les retient et qui va rapidement être éliminé par fixation sur un récepteur LDL-RP (Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein) puis endocytose et dégradation (Moestrup et coll., 1993). Il a été montré que la MMP-13 s'associe avec le récepteur LDL-RP sur les cellules ostéoblastiques menant à son

internalisation (Barmina et coll., 1999). Hahn-Dantona et coll. ont montré que la MMP-9 complexée au TIMP-1 peut être internalisée par liaison au récepteur LDL-RP (Hahn-Dantona et coll., 2001). Enfin, la macroglobuline- α_2 peut exercer des fonctions sans relation avec son rôle d'inhibiteur de protéinases notamment en liant le TGF- β et des cytokines (Armstrong et Quigley, 1999).

A.5.3.2.2.3 Autres inhibiteurs connus:

Un certain nombre d'autres molécules peuvent inhiber l'activité des MMPs. Parmi elles, des protéines présentant des similarités avec la partie N-terminale des TIMPs comme les netrines, les protéines sécrétées de type Frizzled et les protéines PCOLCE (pro-collagen C-proteinase enhancer) (Banyai et Patthy, 1999). Le **TFPI-2** (tissue factor pathway inhibitor 2), un inhibiteur de sérines protéinases, possède également une région interne présentant des homologies de séquences avec les TIMPs. Notamment, le TFPI-2 peut inhiber l'activité des gélatinases et des collagénases interstitielles via des interactions directes protéine/protéine (Herman et coll., 2001).

La thrombospondine-2 (TSP-2) constitue un autre inhibiteur de MMPs. Elle peut réguler la MMP-2 par la formation d'un complexe qui facilite son endocytose par le récepteur scavenger. De façon similaire, la thrombospondine-1 (TSP-1) peut inhiber l'activation de la pro-MMP-2 et de la pro-MMP-9 et moduler la production de MMP-2 (Egeblad et Werb, 2002).

Un peptide contenu dans le domaine NC1 du collagène de type IV et appelé **tumstatine** est capable d'inhiber les MMP-2, -9, -13 et la MT1-MMP (Pasco et coll., 2004).

RECK (Reversion inducing Cysteine riche protein with Kasal motifs) constitue une glycoprotéine de 110 kDa qui contient des domaines du type des inhibiteurs des sérines protéinases et s'associe avec la membrane cellulaire via des ancrages au GPI (Takahashi et coll., 1998). RECK est exprimé naturellement dans les tissus humains mais semble surexprimés dans de nombreuses lignées cellulaires dérivées de tumeurs. La surexpression de RECK dans de telles lignées induit la répression de la MMP-9 au niveau transcriptionnel ainsi que la baisse du potentiel invasif. RECK inhibe également l'activation cellulaire de la pro-MMP-2 (Butler et coll., 1998). RECK pourrait posséder d'autres fonctions mais ceci reste encore à déterminer.

L'ensemble des facteurs régulant l'activité des MMPs est schématisé en figure 15.



Figure 15: Inhibiteurs des MMPs dans l'environnement péricellulaire.

A. Inhibiteurs tissulaires des MMPs (TIMPs). **B.** Autres inhibiteurs. RECK, reversion inducing cysteine riche protein with Kasal motifs; LDL-RP, lipoprotein receptor-related protein; TSP-2, thrombospondin-2; TFPI-2, tissue factor pathway inhibitor-2. Modifiée d'après (Baker et coll., 2002).

A.5.4 ROLE DES MMPS DANS LE CANCER:

Les MMPs sont généralement présentes à des taux élevés et sous forme activée dans les tumeurs malignes plutôt que dans les tissus normaux ou les lésions bénignes et précancéreuses. L'expression la plus élevée des ces MMPs est particulièrement retrouvée au niveau des fronts de migration à l'interface tumeur/stroma (Sternlicht et Werb, 2001). Des corrélations positives ont été établies entre l'expression des MMPs et divers indicateurs de mauvais pronostic dans de nombreux types de cancer. Dans les cancers épithéliaux, la plupart des MMPs sont sur-exprimées par les cellules stromales plutôt que par les cellules épithéliales elles-mêmes (McKerrow et coll., 2000). Cependant, l'expression des MMPs par les cellules stromales voisines est souvent induite par les cellules épithéliales tumorales. L'implication des MMPs lors des différentes étapes de la progression tumorale s'appuie sur de nombreuses observations cliniques décrivant l'expression importante des MMPs dans différents cancers métastatiques humains (Figure 16). Elles sont aussi fondées sur le grand nombre de protéines matricielles et non matricielles qui sont modifiées par les MMPs et sur les conséquences de ces modifications dans le domaine de la croissance et de l'invasion tumorale (voir tableau 2).

A.5.4.1 Perte d'adhérence:

Les complexes d'adhérence intercellulaire jouent un rôle majeur dans le contrôle de l'invasion. La perte ou la redistribution des molécules d'adhérence intercellulaire telles que le complexe cadhérine-E/caténines ont souvent été décrites dans de nombreux carcinomes (Hirohashi, 1998). Certaines MMPs, en particulier la MMP-3 et la MMP-7, ont été impliquées dans la perte d'adhérence cellulaire et la modification phénotypique des cellules épithéliales. Ces enzymes peuvent en effet digérer la cadhérine-E et, de ce fait, rompre les adhérences intercellulaires des épithéliums et stimuler l'expression de gènes impliqués dans la progression tumorale en favorisant le transfert de la caténine-β vers le noyau cellulaire. Le clivage de la cadhérine-E libère dans le même temps un fragment de cadhérine-E soluble de 80kDa dans le milieu qui à son tour peut inhiber les fonctions de la cadhérine-E de manière paracrine et induire une perte d'adhérence cellulaire (Noe et coll., 2001). Les fragments de cadhérine-E soluble induisent à leur tour l'augmentation de l'expression de MMPs par des cellules tumorales de poumon (Nawrocki-Raby et coll., 2003a). Par leur activité de dégradation, les MMPs peuvent aussi réguler les interactions cellules/MEC. Ainsi, la MT1-MMP est impliquée dans le processing du CD44 et de l'intégrine av (Seiki, 2003). Enfin, les MMPs peuvent se lier à certaines molécules d'adhérence. La MMP-9 et la MMP-1 interagissent respectivement avec le CD44 et l'intégrine α2β1 (Yu et Stamenkovic, 1999; Dumin et coll., 2001). La pro-MMP-2 interagit, pour sa part, avec l'intégrine $\alpha v\beta 3$ ce qui joue un rôle important dans sa localisation à la membrane et son activation (Brooks et coll., 1996).

A.5.4.2 Invasion tumorale:

Le rôle des MMPs lors de l'étape d'invasion tumorale a été parmi les mieux étudiés. En particulier, des modèles expérimentaux ont montré que la surexpression des MMP-2, -3, -13 et de la MT1-MMP induit l'invasion de lignées cellulaires en collagène de type I et en matrigel (Lochter et coll., 1997; Deryugina et coll., 1997; Ala-aho et coll., 2002; Ip et coll., 2005).

Au front d'invasion, les MMPs présentes sont souvent produites non pas par les cellules tumorales mais par les cellules stromales (fibroblastes, cellules endothéliales, macrophages) stimulées spécifiquement par les cellules tumorales (Basset et coll., 1997). En effet, les transcrits de la plupart de ces MMPs (MMP-1, -2, -9, -11, -13 et MT1-MMP) sont synthétisées de façon prédominante par les cellules stromales (Basset et coll., 1990; Polette et coll., 1994b; Heppner et coll., 1996; Nawrocki et coll., 1997; Uria et coll., 1997; Nabeshima et coll., 2000) à l'exception des transcrits de la MMP-7 produits par les cellules tumorales (Nawrocki et coll., 1997). Les cellules tumorales peuvent stimuler la production de MMPs par les cellules stromales de manière paracrine à travers la sécrétion d'interleukines, d'interférons, de l'EMMPRIN (Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer) et de facteurs de croissance (Sternlicht et Werb, 2001). D'autre part, les MMPs sécrétées par les cellules stromales peuvent être recrutées à la surface des cellules tumorales. Notamment, l'ARNm de la MMP-2 est exprimé par les cellules stromales de cellules tumorales mammaires alors que la protéine MMP-2 est trouvée à la fois à la surface des cellules stromales et des cellules tumorales (Polette et coll., 1994a). Enfin, les cellules inflammatoires, comme les mastocytes qui infiltrent les sites d'invasion tumorale, peuvent aussi produire des MMPs et participer au remodelage de la MEC (Coussens et coll., 1999). Ces observations montrent qu'il existe une véritable coopération entre les cellules hôtes et les cellules tumorales.

Parmi les MMPs impliquées dans le processus tumoral, le rôle prépondérant de la MMP-2 et la MT1-MMP est largement décrit. Gilles et coll. ont montré que la MT1-MMP est impliquée dans l'activation de la MMP-2 par le collagène de type I dans les zones péritumorales. Ces données suggèrent également que ce mécanisme est utilisé *in vivo* à la fois par les fibroblastes et les cellules tumorales ayant subies une TEM dans le but d'augmenter le processus d'invasion tumorale (Gilles et coll., 1997). Par ailleurs, Bisson et coll. ont montré que les myofibroblastes constituent la principale source de MT1-MMP dans les carcinomes mammaires (Bisson et coll., 2003). Ces myofibroblastes sont situés à proximité des groupes de

cellules tumorales pré-invasives et invasives et expriment à la fois la MMP-2 et son activateur la MT1-MMP, alors que les fibroblastes expriment uniquement la MMP-2.

Les éléments de la MEC, en réponse à leur dégradation par les MMPs, peuvent également favoriser l'invasion tumorale. Le clivage de la laminine-5 par la MMP-2 et la MT1-MMP révèle un site cryptique qui induit la mobilité cellulaire *in vitro* (Giannelli et coll., 1997; Koshikawa et coll., 2000; Gilles et coll., 2001). Cette forme clivée est détectée fréquemment aux fronts d'invasion des massifs tumoraux in vivo (Giannelli et coll., 1997; Koshikawa et coll., 2000; Gilles et coll., 2001). Le CD44, récepteur majoritaire de l'acide hyaluronique est clivé par la MT1-MMP ce qui favorise la migration cellulaire (Kajita et coll., 2001). Par ailleurs, le CD44 est capable de se complexer au domaine hémopexine de la MT1-MMP. Ainsi, le CD44 joue un rôle important dans la régulation de la distribution de la MT1-MMP au cours de la migration cellulaire et de l'invasion (Mori et coll., 2002). La formation d'un complexe CD44/MMP-9 a été également décrit et semble requis pour la localisation de la MMP-9 à la surface cellulaire et sa fonction dans l'invasion tumorale (Yu et Stamenkovic, 1999). La localisation des MMPs dans les invadopodes est nécessaire à leur fonction de promoteur d'invasion (Nakahara et coll., 1997). La MMP-2, la MMP-9 et la MT1-MMP sont connues pour être localisées dans les invadopodes. La MT1-MMP est recrutée dans les invadopodes par le biais de ses domaines transmembranaire et cytoplasmique (Nakahara et coll., 1997) et la MMP-9 probablement par liaison au CD44 (Bourguignon et coll., 1998). Enfin la MMP-2 est localisée dans les invadopodes par liaison à l'intégrine $\alpha\nu\beta3$ ou la MT1-MMP (Brooks et coll., 1996).

A.5.4.3 Prolifération/survie:

Une troisième étape de la progression tumorale dans laquelle les MMPs ont été impliquées est la prolifération. Ce rôle inattendu fut initialement suspecté par l'observation de l'effet négatif que les inhibiteurs de MMPs peuvent avoir sur la croissance tumorale. Les mécanismes à l'origine de cet effet sont multiples et complexes. Ils impliquent tout d'abord les facteurs de croissance, les cytokines et leurs récepteurs. Plusieurs MMPs comme la MMP-3 sont capables de digérer des protéines extracellulaires qui séquestrent les facteurs de croissance comme c'est le cas de l'IGFBP-3 (Insulin-like Growth Factor Protein 3) qui se lie à l'IGF II (Insulin-Growth Factor II) ou du perlécan qui séquestre le bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) (Whitelock et coll., 1996; Martin et coll., 1999). D'autres MMPs peuvent aussi augmenter l'activité biologique de cytokines et de facteurs de croissance comme cela a

été démontré pour l'interleukine-8 dont l'activité augmente fortement après digestion par la MMP-9 (Van den Steen et coll., 2000). Enfin, par leur capacité à solubiliser des récepteurs membranaires de cytokines et, de ce fait, diminuer leur effet biologique, plusieurs MMPs ont paradoxalement un effet anti-prolifératif (Lombard et coll., 1998). Les MMPs agissent encore sur la prolifération des cellules tumorales par les modifications structurales qu'elles induisent dans les protéines de la MEC. La dégradation du collagène fibrillaire par les MMPs permet aux cellules de mélanome d'activer l'intégrine $\alpha 2\beta 1$, de diminuer l'expression de la protéine p27 et de stimuler ainsi la prolifération cellulaire (Henriet et coll., 1999). De la même manière, l'exposition de cellules de mélanome à du collagène dégradé leur permet de se protéger de l'apoptose (Petitclerc et coll., 1999). Par protéolyse, la MMP-7 rend le ligand Fas soluble et actif, ce qui potentialise l'apoptose des cellules épithéliales (Powell et coll., 1999). Enfin, il a récemment été mis en évidence que la MMP-11 diminue l'apoptose des cellules tumorales par un mécanisme encore méconnu (Boulay et coll., 2001; Wu et coll., 2001). D'autre part, les TIMPs sont capables de moduler directement la croissance cellulaire indépendamment des MMPs (Bertaux et coll., 1991; Hayakawa, 1994). Tous ces effets parfois contradictoires des MMPs et des TIMPs dépendent encore une fois de l'équilibre entre ces molécules au niveau local.

A.5.4.4 Angiogenèse:

La réponse angiogénique qui résulte de la synthèse de nouveaux vaisseaux dans les tissus tumoraux à partir de vaisseaux voisins existants est essentielle à la poursuite de la croissance tumorale. Les MMPs sont également largement impliquées dans les mécanismes d'angiogenèse pendant lesquels elles peuvent avoir à la fois un effet stimulateur et inhibiteur. La MMP-2, la MMP-9 et la MT1-MMP régulent directement le processus d'angiogenèse. L'absence d'expression de la MMP-2 réduit l'angiogenèse et la croissance tumorale dans différents modèles *in vivo* (Itoh et coll., 1998; Fang et coll., 2000). Par ailleurs, le clivage du collagène de type IV par la MMP-2 expose un site de liaison à l'intégrine $\alpha\nu\beta3$ et favorise la migration des cellules endothéliales et l'angiogenèse *in vitro* ainsi que la croissance tumorale ont également montré que la MMP-9 est importante pour l'angiogenèse (Bergers et coll., 2000; Coussens et coll., 2000). Notamment, la MMP-9 agit en augmentant la biodisponibilité du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (Bergers et coll., 2000). L'activité de la MT1-MMP permet la migration des cellules endothéliales, l'invasion et la formation de capillaires

in vitro (Galvez et coll., 2001). Notamment, la MT1-MMP peut dégrader la matrice de fibrine qui entoure les vaisseaux néo-formés et faciliter ainsi l'invasion des tissus tumoraux par les cellules endothéliales (Hiraoka et coll., 1998). Enfin, il a été montré que la MT1-MMP active une voie de signalisation intracellulaire contrôlant l'expression du VEGF dans le cadre de la croissance tumorale et de l'angiogenèse (Sounni et coll., 2002).

Les MMPs peuvent également produire des fragments qui ont des activités antiangiogéniques. Le clivage du plasminogène par les MMP-2, -3, -7, -9 et -12 (Dong et coll., 1997; Cornelius et coll., 1998; Gorrin-Rivas et coll., 2000) et du collagène de type XVIII par les MMP-3, -9, -12, -13 et -20 (Ferreras et coll., 2000) génère respectivement des fragments d'angiostatine et d'endostatine qui réduisent tous deux la prolifération des cellules endothéliales. L'endostatine inhibe également l'invasion des cellules endothéliales en agissant comme un inhibiteur de la MT1-MMP et de la MMP-2 (Kim et coll., 2000). La MMP-12 inhibe aussi l'angiogenèse par le clivage et la libération de l'uPAR (urokinase-type Plasminogen-activator receptor) présent à la surface cellulaire et nécessaire à l'invasion des cellules endothéliales (Koolwijk et coll., 2001).

A.5.4.5 Intravasation, extravasation et croissance des tumeurs métastatiques:

Les MMPs sont aussi actives dans le processus d'intravasation (pénétration d'un vaisseau par des cellules tumorales) de part leur capacité à dégrader la membrane basale qui entoure l'endothélium capillaire. Notamment, il a été démontré que la MMP-9 est nécessaire à ce processus dans un modèle d'intravasation (Kim et coll., 1998). La surexpression de la MT1-MMP augmente le nombre de cellules tumorales qui survivent après injection intraveineuse (Tsunezuka et coll., 1996). Le rôle des MMPs dans l'extravasation (sortie des cellules tumorales d'un vaisseau sanguin) est moins évident et controversé. En effet, si une étude a montré que l'utilisation d'inhibiteurs synthétiques réduit la formation de métastases spontanées à partir d'une tumeur primaire ou l'invasion d'une membrane basale reconstituée *in vitro* (Mignatti et coll., 1986), ce n'est pas le cas lorsque les cellules tumorales sont injectées dans la croissance de tumeurs métastatiques mais ce processus est complexe car il implique des effets simultanés sur l'angiogenèse et la prolifération cellulaire.



Figure 16: Rôle des MMPs dans la progression tumorale.

Les effets des MMPs sont indiqués à chaque étape de la progression tumorale. 1. Promotion tumorale; 2. Invasion locale; 3. Prolifération; 4. Angiogenèse; 5. Intravasation; 6. Extravasation 7. Croissance métastatique. Modifié d'après (Chantrain et DeClerck, 2002).

A.5.5 MMPs, CIBLES THERAPEUTIQUES:

A.5.5.1 Généralités:

De part leur rôle dans la progression tumorale et le processus métastatique, les MMPs sont depuis longtemps la cible de nouvelles stratégies thérapeutiques tendant à inhiber leur synthèse ou à bloquer leur activité.

La stratégie consistant à augmenter l'induction des TIMPs pour contrôler les processus métastatiques paraît théoriquement intéressante. Cependant, cette stratégie reste en pratique difficilement réalisable pour deux raisons:

-Les TIMPs sont des glycoprotéines de haut poids moléculaire (23 et 21 kDa respectivement) qui requièrent une portion significative de la molécule pour leur activité biologique rendant leur synthèse *ex-vivo* délicate.

-Leur demie-vie in vivo est de courte durée.
A.5.5.2 Inhibiteurs synthétiques spécifiques des MMPs:

Pour surmonter ces difficultés, des inhibiteurs synthétiques des MMPs de bas poids moléculaires ont été développés tel le BB-94 ou batimastat® et le BB-2516 ou marimastat®.

L'activité de ces molécules passe par leur liaison réversible avec l'atome Zn du site actif des MMPs ce qui leur confère un effet inhibiteur potentiel de l'activité protéolytique. Plusieurs molécules ayant une grande affinité pour les MMPs ont été synthétisées et peuvent être classées en trois catégories:

1-Les inhibiteurs pseudo-peptidiques:

Ces composés présentent une structure pseudo-peptidique mimant le site de clivage du substrat. Ces inhibiteurs entrent donc en compétition avec le substrat des MMPs et se lient au site catalytique par chélation de l'atome de zinc. La majorité des inhibiteurs étudiés *in vitro* et *in vivo* dans cette catégorie sont des dérivés hydroxamates dont les plus connus sont le batimastat® et le marimastat® (British Biotech). Ces deux molécules sont relativement non sélectives. Le marimastat® se distingue du batimastat® par une meilleure biodisponibilité orale et une faible inhibition de la MMP-3 (Hidalgo et Eckhardt, 2001).

2-Les inhibiteurs non peptidiques:

La faible biodisponibilité orale des inhibiteurs pseudopeptidiques (à l'exception du marimastat®), ainsi que leur manque de sélectivité, ont conduit à la synthèse d'inhibiteurs non peptidiques. La structure de ces composés est fondée sur l'analyse tridimensionnelle du site catalytique par radio-cristallographie. Le mode d'inhibition est similaire à celui des agents pseudo-peptidiques avec toutefois une plus grande spécificité pour le type de MMP inhibée. Leur spectre est donc plus sélectif avec une faible activité vis-à-vis des MMP-2 et -9 (Brown, 1999; Hidalgo et Eckhardt, 2001).

3-Les dérivés de tétracyclines:

Cette classe de médicaments comprend des antibiotiques classiques tels que la tétracycline, la doxycycline et la ménocycline, mais aussi de nouveaux composés analogues tels que le Metastat®, une tétracycline chimiquement modifiée pour éliminer l'activité antimicrobienne et la toxicité gastro-intestinale. Ces composés inhibent les collagénases et les gélatinases par divers mécanismes. Ils bloquent l'activité des MMPs par chélation de l'atome

de zinc du site catalytique, interfèrent avec l'activation protéolytique des pro-enzymes, réduisent l'expression des MMPs et diminuent leur dégradation (Hidalgo et Eckhardt, 2001; Rudek et coll., 2001) (voir tableau 3).

Inhibiteurs	Classe d'inhibiteurs	Spécificité
Batimastat® (BB-94)	pseudo-peptidique	Large spectre (MMP-1, -2, -3, -7 et -9)
Marimastat® (BB-2516)	pseudo-peptidique	Large spectre (MMP-1, -2, -7 et -9)
Prinomastat® (AG3340)	non peptidique	MMP-2, -3 et -9
BAY 12-9566	non peptidique	MMP-2, -3 et -9
BMS-275291	non peptidique	MMP-2 et -9
CGS-27023A	non peptidique	Large spectre
Metastat (COL-3)	Tétracycline modifiée	MMP-2 et -9

Tableau 3: Propriétés des principaux inhibiteurs synthétiques des MMPs.

D'après (Chantrain et DeClerck, 2002).

A.5.5.3 Autres molécules inhibitrices des MMPs:

D'autres molécules sont capables d'inhiber les MMPs. Ainsi, les biphosphonates, utilisés dans les désordres de l'équilibre calcique et plus récemment dans le traitement palliatif des métastases osseuses de certains cancers, semblent diminuer l'activité protéolytique et réduisent aussi la sécrétion des MMP-2 et MT1-MMP. Stearns et Wang ont démontré chez le rat que l'alendronate bloque partiellement les métastases osseuses mais augmente la survenue des métastases dans les tissus mous (Stearns et Wang, 1998). Le mécanisme d'action de cette molécule passe par l'inhibition de synthèse des MMP-2 et MMP-9. Dans la même étude, l'alendronate a été associé au paclitaxel (Taxol®). Ce dernier est déjà connu pour inhiber la synthèse et la sécrétion des MMPs sans altérer leur activité. Lorsqu'il est associé à l'alendronate, chez l'animal, l'activité anti-protéolytique est optimale avec un blocage de la croissance tumorale et une baisse significative du taux de métastases.

Enfin, il a été démontré que la vitamine D3 (calcitriol) inhibe la synthèse et l'activité des collagènases de type IV (MMP-2 et MMP-9). Elle a également un rôle anti-prolifératif et proapoptotique sur certaines lignées cellulaires d'adénocarcinomes.

A.5.6 REGULATION DES MMPS PAR LA CADHERINE-E AU COURS DE L'INVASION TUMORALE:

Des études ont montré que l'expression de la cadhérine-E est inversement corrélée à l'expression des MMPs *in vivo* dans des carcinomes (Kitadai et coll., 1996; Anzai et coll.,

1996; Polette et coll., 1998). Notamment, l'expression de la MT1-MMP dans les cellules épithéliales tumorales est corrélée à la ré-organisation des complexes cadherine-E/catenines (Takahashi et coll., 2002; Hlubek et coll., 2004). Un lien fonctionnel entre la cadhérine-E et les MMPs a été établi par la mise en évidence *in vitro* de la régulation négative de l'expression des MMPs par la cadhérine-E dans des lignées tumorales (Luo et coll., 1999; Ara et coll., 2000; Nawrocki-Raby et coll., 2003b). Les mécanismes mis en jeu lors de la régulation de l'expression des MMPs par la cadhérine-E sont encore mal connus. La voie caténine- β /Tcf semble être une des voies possibles de signalisation intracellulaire impliquée (Nawrocki-Raby et coll., 2003b). En effet, la MMP-7, la MT1-MMP ou la MMP-26 sont des cibles connues de la caténine- β (Brabletz et coll., 1999; Takahashi et coll., 2002; Marchenko et coll., 2004). Cependant, d'autres voies de régulation impliquant la cadhérine-E pourraient intervenir.

A.6 NANOS:

Les protéines de la famille de Nanos ont été identifiées dans un certain nombre d'organismes par la présence d'un domaine en doigt de zinc de liaison à l'ARN (CCHC)₂ dans leur extrémité carboxy-terminale. Le membre de cette famille le mieux décrit est la protéine Nanos de *Drosophila melanogaster*.

A.6.1 NANOS CHEZ LA DROSOPHILE:

A.6.1.1 Détermination de l'axe antéro-postérieur:

Le rôle du gène nanos a été mis en évidence au cours du processus de formation de l'abdomen chez la drosophile (Drosophila) (Wang et Lehmann, 1991). Chez la drosophile, l'établissement de la polarité antéro-postérieure a lieu avant la fécondation. Deux déterminants, les gènes nanos et bicoïd jouent un rôle important (St Johnston et Nusslein-Volhard, 1992). Au cours de l'ovogenèse, les ARNm nanos et bicoïd issus des cellules nourricières maternelles vont s'accumuler, respectivement, au pôle postérieur et au pôle antérieur de l'ovocyte. La protéine Nanos, traduite uniquement au pôle postérieur, va diffuser et former un gradient postéro-antérieur qui s'oppose au gradient de la protéine Bcd (Gavis et Lehmann, 1992; Wang et coll., 1994). La protéine Nanos agit directement sur la formation de l'abdomen en réprimant la traduction des ARNm de hunchback (hb) (Hulskamp et coll., 1990; Wharton et Struhl, 1991; Struhl et coll., 1992; Tautz et Schmid, 1998). La protéine Bicoïd, quant à elle, autorise l'expression de la protéine hunchback et permet le développement de la tête et du thorax (Driever et Nusslein-Volhard, 1989; Tautz, 1998). A son tour, la protéine Hb régule l'expression de gènes de types gap dans l'embryon qui définissent ultérieurement les différents segments de la larve et de l'adulte le long de l'axe antério-postérieur (Hulskamp et Tautz, 1991). Au cours de ce processus, la protéine Nanos agit en collaboration avec la protéine Pumilio afin de réprimer la traduction des ARNm maternels de hunchback (hb) (Tautz, 1988; Tautz et Pfeifle, 1989; Hulskamp et coll., 1989; Irish et coll., 1989; Struhl, 1989). Cette répression traductionnelle est assurée par la présence de sites spécifiques NREs (nanos responsive elements) dans la partie 3'UTR des ARNm de hunchback (hb) (Wharton et Struhl, 1991; Wharton et coll., 1998). Pumilio se lie directement aux sites NREs de manière spécifique et l'interaction Nanos-Pumilio est essentielle à l'activité de répression traductionnelle de hb (Murata et Wharton, 1995; Wharton et coll., 1998; Sonoda et Wharton, 1999).

A.6.1.2 Développement des lignées germinales:

Dans de nombreux organismes, les cellules progénitrices des lignées germinales (primordial germ cells, PGCs) sont formées dans une région embryonnaire distincte des gonades. Chez la drosophile, les lignées germinales ont pour origine des PGCs situées au pôle postérieur de l'embryon et vont migrer au cours de la morphogenèse vers les gonades où a lieu leur différenciation en cellules germinales (Kobayashi et coll., 2005). La protéine Nanos est présente dans les PGCs (ou cellules polaires) et restent détectable lors de leur migration (Wang et coll., 1994). Les PGCs qui n'expriment pas la protéine Nanos migrent mais sont incapables de se développer en cellules germinales fonctionnelles (Kobayashi et coll., 1996; Forbes et Lehmann, 1998). Notamment, l'étude de PGCs homozygotes pour une mutation de Nanos montre l'incapacité de ces cellules à être incorporées dans les gonades d'un embryon normal (Kobayashi et coll., 1996). De plus, ces cellules mutantes sont incapables de contribuer à la production de cellules œufs chez l'adulte femelle (Kobayashi et coll., 1996; Forbes et Lehmann, 1998). Pumilio semble également être requis pour la migration des PGCs (Asaoka-Taguchi et coll., 1999). Il a été suggéré que Nanos agit avec Pumilio pour réguler des évènements spécifiques dans les PGCs en réprimant la traduction de transcrits spécifiques.

Les ARNm de la cycline B constituent une des cibles de Nanos et Pumilio dans les PGCs (Asaoka-Taguchi et coll., 1999) par la présence de sites de type NREs dans leur partie 3'UTR (Dalby et Glover, 1993). Des études ont mis en évidence que les PGCs migrantes n'entrent plus en mitose et restent à l'état de quiescence en phase G2 du cycle cellulaire alors que les cellules somatiques continuent de proliférer. Dans le même temps, la traduction des transcrits cycline B est réprimée au cours de ce processus. (Dalby et Glover, 1993). Par ailleurs, de nouvelles études de mutants pour *nanos* et *pumilio* ont montré que des PGCs n'exprimant plus ces deux protéines expriment la cycline B et sont capables d'entrer en mitose (Asaoka-Taguchi et coll., 1999). Ce mécanisme permettrait d'éviter la dilution des facteurs maternels incorporés dans les PGCs et de favoriser la migration cellulaire et la régulation de gènes.

D'autres études ont montré que Nanos et Pumilio sont capables de réprimer l'apoptose des PGCs migrantes. En effet, en absence de Nanos et Pumilio, ces cellules sont éliminées par apoptose (Hayashi et coll., 2004). Enfin, il a été montré que les ARNm *hid* (head involution defective) codant pour une protéine requise pour l'induction de l'apoptose, constituent une cible supplémentaire de Nanos et Pumilio (Grether et coll., 1995).

A l'intérieur des PGCs, le gène *nanos* est impliqué dans le maintien d'un état de quiescence transcriptionnelle (Deshpande et coll., 1999). Notamment, l'activité de la protéine Nanos induit des modifications des histones et la condensation de l'ADN maintenant l'inactivité transcriptionnelle de la chromatine (Schaner et coll., 2003). Des travaux récents ont suggéré que Nanos maintient aussi cet état de quiescence dans les PGCs en réprimant la production de l'importine- α 2, requise pour le transport nucléaire de molécules telles que les facteurs de transcription (Kobayashi et coll., 2005), et en modifiant la phosphorylation de l'ARN polymérase II (Deshpande et coll., 2005). Ce mécanisme permettrait de réprimer la différenciation somatique des PGCs et de mettre en place l'identité sexuelle des cellules germinales (Hayashi et coll., 2004; Deshpande et coll., 2005). La prévention de la différenciation par Nanos pourrait également permettre l'auto-renouvellement des cellules souches germinales chez la drosophile adulte (Bhat, 1999; Wang et Lin, 2004).

A.6.1.3 Autres fonctions attribuées à Nanos chez la drosophile:

Récemment, le rôle émergent de Nanos dans d'autres processus a été mis en évidence. Une étude a montré que Nanos et Pumilio étaient également essentiels à la morphogenèse des dendrites dans les neurones périphériques de la drosophile (Ye et coll., 2004). D'autres études ont mis en évidence leur implication dans le développement de l'œil (Wharton et coll., 1998) et du nerf optique (Schmucker et coll., 1997), l'excitabilité neuronale (Schweers et coll., 2002) et la mémoire à long terme (Dubnau et coll., 2003). Cependant, les mécanismes mis en jeu ne sont pas encore connus.

A.6.2 HOMOLOGUES DE NANOS:

Plusieurs homologues de Nanos ont été clonés dans des organismes invertébrés comme HRO-NOS chez la sangsue *Helobdella robusta* (Pilon et Weisblat, 1997), *nos-1*, *nos-2* et *nos-3* chez le nématode *Caenorhabditis Elegans* (Subramaniam et Seydoux, 1999), *Cnnos-1* et *Cnnos-2* chez *Hydra magnipapillata* (Mochizuki et coll., 2000), *nos* chez le cricket (*Gryllus domesticus*) et la sauterelle (*Schistocerca americana*) (Lall et coll., 2003) et chez les vertébrés comme Xcat-2 (Xenopus cytoskeletal associated transcripts-2) chez le xénope *Xenopus laevis* (Mosquera et coll., 1993), *nos1* et *nos2* chez le zebrafish *Danio rerio* (Koprunner et coll., 2001). Chez la souris, trois gènes homologues de *nanos* ont été identifiés: *nanos1* (Haraguchi et coll., 2003), *nanos 2* et *nanos 3* (Tsuda et coll., 2003). Le gène *nanos1* est observé dans les tubules séminifères de testicules matures, dans les oocytes avant fécondation et plus tard dans le système nerveux central où son expression est maintenue chez l'adulte. Le gène *nanos2* est exprimé de façon prédominante dans les cellules germinales mâles alors que le gène *nanos3* est exprimé dans les PGCs migrantes.

Chez l'homme, la protéine Nanos1 a été identifiée comme interagissant avec la protéine Pumilio-2 via des domaines hautement conservés afin de former un complexe stable (Jaruzelska et coll., 2003). Cette étude montre que Nanos1 et Pumilio-2 sont particulièrement abondantes dans les cellules souches germinales humaines et suggère que la conservation de l'interaction Nanos1/Pumilio-2 joue également un rôle dans le développement des cellules germinales et de leur maintien chez l'homme.

La similarité entre les protéines Nanos des animaux de *phila* différents, invertébrés ou vertébrés, concerne uniquement les motifs en doigt de zinc CCHC présents dans la partie carboxy-terminale, suggérant une fonction conservée pour ces motifs. Ces organismes ont notamment en commun un mécanisme ancestral mettant en jeu l'interaction Nanos-Pumilio qui est essentielle au développement des cellules germinales et leur protection face à la mort cellulaire. La faible conservation de la partie amino-terminale de la protéine pourrait, quant à elle, être responsable de fonctions spécifiques de Nanos acquises lors de l'évolution.

A.6.3 HNANOS1 ET CANCER:

Comme il a été décrit précédemment, l'expression de la cadhérine-E est fréquemment réprimée dans de nombreux types de tumeurs ce qui se traduit par une perte de l'adhérence intercellulaire mais également par l'activation de voies de signalisation intracellulaire menant à l'expression de gènes associés à la progression tumorale. Dans le but d'identifier les gènes effecteurs agissant en aval de la cadhérine-E, Strumane et coll. (Strumane et coll., 2006) ont utilisé l'hybridation soustractive pour mettre en évidence les transcrits exprimés de manière préférentielle après ré-expression de la cadhérine-E dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-231. Ils ont pu mettre en évidence que le gène hNanos1 est réprimé par la cadhérine-E. De plus, l'analyse d'une série de lignées cellulaires tumorales montre l'existence d'une corrélation inverse entre les expressions de la cadhérine-E et de hNanos1. D'autres expérimentations montrent également que la modulation de l'expression de la cadhérine-E induit une régulation inverse de l'expression de hNanos1. L'expression induite de hNanos1 peut à son tour perturber l'aggrégation cellulaire cadhérine-E-dépendante et promouvoir l'invasion en gel de collagène. Ces données permettent de mettre en évidence le rôle potentiel de hNanos1 dans le développement tumoral. Cependant, les fonctions précises de hNanos1 dans ce contexte restent à déterminer.

B. MATERIELS ET METHODES

B.1 EXPRESSION *IN VIVO* DE HNANOS1 DANS LES CANCERS BRONCHO-PULMONAIRES:

B.1.1 ECHANTILLONS TISSULAIRES:

Les échantillons de tissus humains utilisés pour cette étude sont obtenus à partir de la résection de tumeurs bronchiques. 29 échantillons sont issus de carcinomes épidermoïdes et 21 de carcinomes glandulaires. La classification TNM et le niveau de différenciation de ces carcinomes sont indiqués dans le tableau suivant:

Tunos do	Stade TNM			Niveau de différenciation des tumeurs			
tumeur	Ι	II	III	Bien différenciées	Moyennement différenciées	Peu différenciées	
Epidermoïdes (n=29)	7	12	10	6	12	11	
Glandulaires (n=21)	9	6	6	8	5	8	

Tableau 4: Distribution des échantillons tumoraux testés en fonction des stades TNM et des niveaux de différenciation.

Les échantillons normaux sont issus de 12 tissus de bronches et de 15 tissus de parenchymes prélevés à distance du foyer tumoral et constituent les contrôles respectifs des échantillons de carcinomes épidermoïdes et de carcinomes glandulaires.

B.1.2 ANALYSE PAR RT-PCR:

B.1.2.1 Préparation des échantillons d'ARN:

Les différents échantillons de tissus sont tout d'abord broyés dans le tampon d'extraction fourni dans le kit « RNA Easy » (Qiagen, MD, USA). Les extraits obtenus sont ensuite transférés sur une colonne dans laquelle l'ARN est purifié selon les instructions du fournisseur. Les concentrations d'ARN des échantillons sont déterminées grâce au kit de quantification «Ribogreen RNA Quantitation Kit» (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). La lecture est réalisée sous spectrofluorimètre Xenius (Safas, Monaco) à une longueur d'onde d'excitation de 535 nm.

B.1.2.2 RT-PCR:

La RT-PCR est réalisée à partir de 10 ng d'ARN totaux selon le protocole du kit «RTth DNA Polymerase» (Applied-Biosystem, Branchburg, NJ, USA). Les couples d'amorces employés (Eurogentec, Seraing, Belgique) sont les suivants:

Enzyme	Amplicon	Primers
28S	212 pb	sens 5'-GTTCACCCACTAATAGGGAACGTGA-3' antisens 5'-GGATTCTGACTTAGAGGCGTTCAGT-3'
hNanos1	445 pb	sens 5'-TCTTAACCCCAGACCAGAGA-3' antisens 5'-ATACTCTCCTGCCCTCAAGA-3'
MT1-MMP	221 pb	sens 5'-GGATACCCAATGCCCATTGGCCA-3 antisens 5'-C CATTGGGCATCCAGAAGAGAC-3'
MMP-2	225 pb	sens 5'-AGATCTTCTTCTTCAAGGACCGGTT-3' antisens 5'-GGCTGGTCAGTGGCTTGGGGGTA-3'

Tableau 5: Séquences nucléotidiques utilisées pour amplifier spécifiquement les ARNm codant pour 28S, hNanos1, MT1-MMP et MMP-2.

La reverse transcription est réalisée à 70°C pendant 15 minutes. Après deux minutes à 95°C pour dénaturer les hétéroduplexes ARN-ADN, les séquences d'ADNc sont amplifiées selon les conditions décrites dans le tableau ci-dessous.

RT	PCR					
	1 ^{ère} étape	Dénaturation	Annealing	Elongation	Etape finale	
15 min à 70°C	2 min à 95C	15 sec à 94°C	20 sec à 68°C	10 sec à 72°C	2 min à 72°C	
		28S= 12cy MT1-MMP=2				

Tableau 6: Conditions utilisées lors de la RT-PCR.

Les produits de RT-PCR chargés avec du xylène-cyanol 5X sont séparés sur gel de polyacrylamide 12% pendant 1 heure à 200V. Les gels sont ensuite colorés avec du Sybr Gold (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) puis visualisés sous une caméra Las-1000 (Fuji, Stamford, CT, USA).

B.1.2.3 Analyse des résultats:

La densité des bandes correspondant aux produits de RT-PCR est analysée par un logiciel de quantification Aida (Fuji). Les valeurs obtenues pour hNanos1, la MT1-MMP et la MMP-2 sont ensuite normalisées avec les valeurs obtenues pour le contrôle d'amplification 28S. Les résultats sont ensuite analysés en fonction du statut normal/tumoral des échantillons, la classification TNM et le taux de différenciation des tumeurs dont sont issus les échantillons tumoraux. Enfin, l'analyse statistique des données est réalisée à l'aide d'un test de Mann Whitney.

B.1.3 HYBRIDATION *IN SITU*:

B.1.3.1 Préparation des coupes:

Des coupes sériées de 5 µm d'épaisseur sont réalisées au cryostat à partir de tissus frais cryofixés immédiatement après résection dans de l'azote liquide. Les coupes sont ensuite transférées sur des lames Superfrost, séchées à l'air pendant 20 min, fixées à l'acétone à -20°C pendant 20 min avant d'être à nouveau séchées et conservées à -20°C en attente de leur utilisation.

B.1.3.2 Linéarisation du plasmide:

Le plasmide pCS2 contenant l'insert Myctag-hNanos1 (don du Pr. Frans van Roy, Université de Gand, Belgique) est linéarisé par l'enzyme de restriction AspI pour générer la sonde ARN hNanos1 sens (contrôle négatif) et par NcoI pour générer la sonde ARN hNanos1 antisens. Après inactivation des enzymes à 80°C pendant 10 min, l'ADN est purifié sur colonne par l'intermédiaire du kit de purification « High Pure PCR Product Purification Kit » (Roche diagnostic GmbH, Mannhein, Allemagne).

B.1.3.3 Marquage des sondes:

Les sondes ARN hNanos1 sens (1399 b) et ARN hNanos1 antisens (1130 b) sont produites par transcription in vitro à partir d'1 µg d'ADN linéarisé avec incorporation de fluorescein-12-UTP (Fluorescein RNA labeling mix, Roche) en présence des ARN polymérases SP6 et T7 (Roche), respectivement. La réaction de transcription est stoppée par l'ajout d'EDTA 0,2 M à pH 8,0. Les sondes synthétisées sont purifiées avec le kit de purification « High Pure PCR Product Purification Kit » (Roche).

B.1.3.4 Hybridation:

Les lames sont remises à température ambiante. Les sondes marquées à la fluorescéine sont chauffées pendant 5 minutes à 80°C avant d'être diluées à 1,5 ng/µl dans une solution d'hybridation « mRNA in situ hybridization solution » prête à l'emploi (DakoCytomation, Glostrup, Danemark). 15 µl de sonde sont déposés sur chaque coupe recouverte ensuite avec une lamelle siliconée. L'hybridation est réalisée à 63°C toute une nuit sur un plateau en inox dans un four à hybridation en atmosphère humide.

Après hybridation, les lamelles sont ôtées et les lames sont rincées (3 x 5 minutes) en tampon TBST (Tris-Buffered Saline/Tween, DakoCytomation) à température ambiante puis en solution de lavage stringent (DakoCytomation) pendant 30 minutes à 75°C et de nouveau en tampon TBST (3 x 5 minutes) à température ambiante.

B.1.3.5 Révélation immunohistochimique:

Les lames sont disposées en chambre humide afin de procéder à la révélation immunohistochimique par l'intermédiaire du kit « GenPoint fluorescein » (DakoCytomation). Tout d'abord, les péroxydases présentes sur les lames sont inactivées par incubation en H₂O₂ pendant 5 minutes. Après rinçage en TBST, les lames sont ensuite incubées avec un anticorps anti-FITC-HRP (FuoroIsoThiocyanate-HorseRadish Peroxydase) dilué au 1/100^{ème} pendant 30 minutes. Après de nouveaux rinçages en TBST, une incubation en fluorescyl-tyramide est réalisée pendant 15 minutes à température ambiante pour amplifier le signal. Après rinçage en TBST, un anticorps anti-fluorescéine est ajouté pendant 30 minutes à température ambiante. Après rinçage en TBST, le chromogène AEC (3-amino, 9 éthyl-carbazole chromogen, Dakocytomation) est ajouté pendant 10 minutes à l'obscurité. Après rinçage à l'eau, les tissus

sont contre-colorés à l'hématoxyline pendant 2 minutes avant le montage des lames au Faramount (DakoCytomation).

B.2 INFLUENCE DE HNANOS1 SUR LE COMPORTEMENT INVASIF DE LIGNEES CELLULAIRES TUMORALES

B.2.1 CULTURE CELLULAIRE:

B.2.1.1 Lignées cellulaires:

Les clones DLD1-Teton-mock et DLD1-Teton-hNanos1 nous ont été fournis par le Pr Frans van Roy et ont été obtenus comme décrit par Strumane et coll. (2006). Ces clones ont pour origine la lignée cellulaire DLD1 de carcinome de colon et possèdent tous deux un système Teton qui permet l'expression inductible d'un transactivateur tTA. Le clone DLD1-Teton-hNanos1 contient un plasmide d'expression pcDNA4/TO-Myc-hNanos1 qui présente un site de fixation de tTA ainsi que l'ADNc de hNanos1. Le clone DLD1-Teton-mock contient le plasmide pcDNA4/TO vide.

Les lignées tumorales d'origine mammaire Hs578T et BT549 et bronchique, BZR, proviennent de l'American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). Les lignées cellulaires BT549 et Hs578T sont issues de carcinomes mammaires canalaires métastatiques. La lignée cellulaire BZR a été obtenue en transfectant l'oncogène v-*Ha ras* dans les cellules Beas2B (cellules épithéliales bronchiques infectées par un virus hybride SV40/adénovirus).

B.2.1.2 Conditions de culture:

Les cellules DLD1-Teton-mock/hNanos1sont cultivées en milieu de culture RPMI 1640 et les lignées Hs578T, BT549 et BZR en DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium, Gibco-BRL) dans une atmosphère humide sous 5% de CO_2 à 37°C. Les milieux de culture contiennent de la L-glutamine et sont supplémentés en SVF (sérum de veau foetal) décomplémenté (10%), en pénicilline (100U/ml) et streptomycine (100µg/ml).

L'expression du gène hNanos1 est induite dans les cellules DLD1-Teton-hNanos1 en ajoutant de la doxycycline (2µg/ml), un analogue de la tétracycline, au milieu de culture. hNanos1 est exprimé sous forme d'une protéine de fusion Myc-hNanos1. La doxycycline est renouvelée toutes les 48 heures dans le milieu de culture afin de maintenir un taux d'expression du gène hNanos1 constant. Les cellules DLD1-Teton-mock traitées ou non par la

doxycycline ainsi que clone DLD1-Teton-hNanos1 sans traitement à la doxycycline font usage respectivement de contrôles pour l'effet de la doxycycline et de contrôle négatif.

Afin de procéder aux analyses par RT-PCR, Western blotting et zymographie, les cellules DLD1-Teton-mock/hNanos1 sont ensemencées à une densité de 8x10⁴ cellules/ml dans les puits d'une plaque 6 puits en présence ou non de doxycycline. A subconfluence, les cellules sont rincées deux fois en PBS. Les ARN totaux et les protéines sont alors extraits. Dans le but de récupérer les milieux conditionnés utilisés pour l'analyse de l'activité gélatinolytique par zymographie, une incubation supplémentaire de 48h en condition sans sérum est réalisée.

B.2.2 MODELE DE DISPERSION CELLULAIRE:

B.2.2.1 Vidéomicroscopie:

Les cellules DLD1-Teton-mock/hNanos1 sont ensemencées après dissociation à une densité de 2.10^5 cellules/ml dans les puits d'une plaque 12 puits en présence ou non de doxycycline (2 µg/ml). 2 heures après ensemencement, une fois que les cellules ont adhéré, la plaque est placée dans une chambre à l'atmosphère régulée à 5% de CO₂ et à 37°C d'un microscope Axiovert 200M (Zeiss, Oberkochen, Germany). Ce microscope est équipé d'une caméra CoolSNAP fx (Roper Scientific, Tucson, Arizona, USA) permettant l'enregistrement d'images en contraste de phase à intervalle régulier de 15 minutes pendant 48 heures. Un objectif x12,5 est utilisé afin d'observer un minimum de 100 cellules par champ.

B.2.2.2 Analyse des images:

La distribution spatiale des cellules est caractérisée en utilisant un programme algorithmique de sociologie cellulaire développé au sein du laboratoire basé sur trois modèles géométriques: le diagramme de Voronoï (VOR), la triangulation de Delaunay (DEL) et l'arbre de longueur minimale (ALM). Ces trois modèles géométriques construits à partir des positions de toutes les cellules du champ renseignent sur les relations de voisinage et de désordre des cellules. Ces trois représentations donnent lieu au calcul de paramètres. Le diagramme de Voronoï est caractérisé par la variabilité des surfaces de polygones («area disorder»=AD) et l'homogénéité du facteur de forme («roundness factor homogeneity»= RFH). La triangulation de Delaunay et l'arbre de longueur minimale sont tous les deux caractérisés par la longueur

moyenne, normalisée, des arêtes ou segments (m) et l'écart type, normalisé, des longueurs d'arêtes ou segments (σ).



Figure 17: Illustration des différents modèles géométriques établis par le logiciel de sociologie cellulaire.

A. Image binarisée représentant la position des noyaux cellulaires du champ observé. B. Diagramme de Voronoï déterminé à partir de l'image binarisée et représentant les zones d'influence des cellules. C. Triangulation de Delaunay établie à partir des 2 figures précédentes et où chaque noyau cellulaire est relié par une arête à ses plus proches voisins. D. Arbre de longueur minimale établi à partir des 3 figures précédentes et constitué de segments, dont la longueur est minimale, reliant tous les noyaux cellulaires du champ d'observation.

Afin de déterminer la distribution spatiale de la population cellulaire considérée (en amas, aléatoire ou régulière), les valeurs des paramètres expérimentaux sont comparées à des valeurs de référence obtenues par simulation de distribution spatiale sur ordinateur (Nawrocki et coll., 2001) (Tableau 8).

Distribution cellulaire	Voronoi		Delaunay		ALM	
	AD	RFH	m	σ	m	σ
régulière	0	1	1,2	0,2	1	0
aléatoire	0,33	0,8	1,14	0,59	0,68	0,33
en amas	0,57	0,77	1,05	0,93	0,54	0,42

Tableau 7: Valeur des différents paramètres calculés à partir du diagramme de Voronoi, de la triangulation de Delaunay et de l'arbre de longueur minimale pour des distributions régulières, aléatoires et en amas.

B.2.3 MODELE DE MIGRATION CELLULAIRE EN ANNEAU:

 11×10^4 cellules DLD1-Teton-mock/hNanos1 sont ensemencées à l'intérieur d'un anneau de restriction de 6 mm de diamètre placé dans des puits de 22 mm de diamètre. 24 heures après, l'anneau est enlevé, les cellules sont rincées avec du PBS et recouvertes avec du milieu de culture contenant ou non de la doxycycline (2 µg/ml). Dans ce modèle, les cellules vont migrer à partir du tapis cellulaire confluent initial délimité par l'anneau. 5 heures après avoir enlevé l'anneau, des images en contraste de phase de la zone d'excroissance sont enregistrées par l'intermédiaire du dispositif de vidéomicroscopie décrit plus haut avec un objectif x40 toutes les 15 minutes pendant une 1 heure. Les positions successives des noyaux des cellules périphériques sur chaque série d'images sont déterminées grâce à un logiciel de tracking 2D développé au laboratoire (Zahm et coll., 1997). Les trajectoires de chaque cellule sélectionnée sont établies sur une heure ainsi que les vitesses de migration respectives (µm/h).

B.2.4 TEST D'INVASION EN CHAMBRE DE BOYDEN:

Dans ce test sont utilisés des Transwell composés de deux compartiments superposés, séparés par une membrane microporeuse dont la taille des pores est de 8 μ m de diamètre (Corning Incorporated, Corning, NY, Etats-Unis). Les membranes sont préalablement recouvertes de matrigel (50 μ g/filtre) extrait de tumeurs EHS (Engelbrecht-Holm-Swarm) qui mime la composition des membranes basales (Kleinman et coll., 1986). 10⁵ cellules mises en suspension dans 300 μ l de milieu de culture sans SVF contenant 0,2% de BSA sont placées dans le compartiment supérieur. Pour les expériences d'inhibition des MMPs, le BB94 (Batimastat, British Biotech Pharmaceutical Ltd, Oxford, UK), un inhibiteur synthétique de nombreuses MMPs (MMP-1, -2, -3, -7, -9, -14) est utilisé à une concentration de 5.10⁻⁶ M. Le compartiment inférieur est rempli avec 600 μ l de milieu de culture contenant 10% de SVF et

2% de BSA. Les Transwell sont mis à incuber à 37°C pendant 24 heures. Les membranes sont ensuite fixées au méthanol pendant 10 minutes et colorées dans l'hématoxyline pendant 2 minutes. Les cellules présentes à la face supérieure des membranes sont ôtées avec un coton tige. La quantification du test d'invasion est alors réalisée en comptant le nombre de cellules présentes à la face inférieure des membranes (30 champs avec un objectif x40).

B.2.5 TEST D'INVASION *IN VIVO* EN SOURIS NUDE:

Les cellules DLD1-Teton-mock/hNanos1 pré-traîtées ou non à la doxycycline jusqu'à subconfluence sont resuspendues à une densité de 4.10^6 cellules/200µl de milieu sans SVF avec ou sans doxycycline (1µg/ml). Du matrigel à 12,5mg/ml est ajouté à la suspension cellulaire en proportion 1:1 et 400µl du mélange est injecté en sous-cutané dans chacun des flancs de souris Nude (nu/nu) âgées de 6 semaines. 9 souris ont été utilisées pour les cellules DLD1-Teton-mock non traitées ou traitées à la doxycycline et 13 souris pour les cellules DLD1-Teton-hNanos1 non traitées ou traitées à la doxycycline. Afin de maintenir les conditions de l'étude, la doxycycline (200 µg/ml) est ajoutée avec 5% de sucrose (Sigma) dans l'eau des biberons des souris. Ces derniers sont changés tous les deux jours pour conserver l'efficacité du traitement à la doxycycline. La taille des tumeurs est ensuite contrôlée trois fois par semaine en mesurant leur longueur et leur largeur. Le volume des tumeurs est alors déterminé en appliquant la formule: $l^2 x L x \pi/6$ (Reichert et coll., 2000). Après 6 semaines, les souris sont sacrifiées et la présence de métastases est analysée.

B.2.6 TRANSFECTION TRANSITOIRE DE SIRNA SPECIFIQUES DE HNANOS1:

Deux séquences de 19 nucléotides spécifiques de hNanos1 ont été sélectionnées dans la séquence codante du gène (Genebank accession number: NM199461) afin de générer deux brins sens et antisens de 21-nucléotides de types (19N) TT (N, nucléotide). Les séquences de 19 nucléotides sélectionnées sont les suivantes: hNanos1si1, 5'-GCCCGAGCUGCAGGUGUGC-3'; hNanos1si2, 5'-CGCGCACACCAUCAAGUAC-3'. Les séquences sont soumises à un «Blast» dans le génome humain afin de s'assurer de leur spécificité à la séquence ciblée. Ces séquences sens et antisens ont été ensuite annealées dans le but d'obtenir des duplexes avec des extrémités 3' identiques. Deux duplexes ne reconnaissant aucune séquence dans le génome humain sont utilisés comme contrôles négatifs (Cont1 et Cont2).

76

Les cellules Hs578T, BT549 et BZR sont ensemencées 24 heures avant la transfection à 100 000 cellules/puits dans une plaque 6 puits avec 2ml de milieu de culture par puits. 1 heure avant la transfection, le milieu de culture est changé. Les cellules sont ensuite transfectées par précipitation au phosphate calcique en ajoutant dans chaque puits 200µl d'un mélange contenant 20nM de duplexes de siRNA, 140mM de NaCl, 0,75mM de Na₂HPO₄, 6mM de glucose, 5mM de KCl, 25mM d'HEPES et 125mM de CaCl₂. 16 heures après la transfection, les cellules sont rincées avec du PBS pour éliminer le précipité et mises à incuber pendant 48 heures dans du milieu de culture avec ou sans SVF avant les analyses par RT-PCR, western blotting et zymographie ou test d'invasion en chambre de Boyden modifiée.

B.2.7 ANALYSE PAR RT-PCR:

B.2.7.1 Préparation des échantillons d'ARN:

Après rinçage des cellules en PBS, l'ARN est extrait en grattant les cellules en présence du tampon d'extraction fourni par le kit de purification « High Pure RNA Isolation Kit » (Roche). Le lysat est ensuite transféré sur une colonne dans laquelle l'ARN est purifié selon le protocole du fabricant. Les concentrations d'ARN des échantillons sont déterminées grâce au kit « Ribogreen RNA Quantitation Kit » (Molecular Probes) selon les instructions du fournisseur. La lecture est réalisée sous spectrofluorimètre Xenius (Safas, Monaco) à une longueur d'onde d'excitation de 535 nm.

B.2.7.2 RT-PCR:

La RT-PCR est réalisée comme indiquée dans le paragraphe B.1.2.2. Les couples d'amorces et les conditions utilisés sont indiqués dans les tableaux suivants:

Enzyme	Amplicon	Primers
28s	212 pb	sens 5'-GTTCACCCACTAATAGGGAACGTGA-3' antisens 5'-GGATTCTGACTTAGAGGCGTTCAGT-3'
hNanos1	445 pb	sens 5'-TCTTAACCCCAGACCAGAGA-3' antisens 5'-ATACTCTCCTGCCCTCAAGA-3'
MT1-MMP	221 pb	Sens 5'-GGATACCCAATGCCCATTGGCCA-3 antisens 5'-C CATTGGGCATCCAGAAGAGAC-3'
MMP-2	225 pb	sens 5'-AGATCTTCTTCTTCAAGGACCGGTT-3' antisens 5'-GGCTGGTCAGTGGCTTGGGGGTA-3'
TIMP-1	167 pb	sens 5'-CATCCTGTTGTTGCTGTGGCTGAT-3' antisens 5'-GTCATCTTGATCTCATAACGCTGG-3'
TIMP-2	154 pb	sens 5'-CTCGCTGGACGTTGGAGGAAAGAA-3' antisens 5'-AGCCCATCTGGTACCTGTGGTTCA-3'

Tableau 8: Séquences nucléotidiques utilisées pour amplifier spécifiquement les ARNm codant pour le 28s, la MT1-MMP, la MMP-2, le TIMP-1 et le TIMP-2.

RT	PCR						
	1 ^{ère} étape	Dénaturation	Annealing	Elongation	Etape finale		
15 min à 70°C	2 min à 95C	15 sec à 94°C	20 sec à 68°C	10 sec à 72°C	2 min à 72°C		
		28s=12cycles, hNanos1=30 cycles,					
		MT1-MMP= 26 cycles,					
		MMP-2= 32 cycles, TIMP-1= 24 cycles,					
		TIMP-2= 23 cycles					

Tableau 9: Conditions utilisées lors de la RT-PCR.

B.2.8 ANALYSE PAR WESTERN BLOT:

B.2.8.1 Préparation des échantillons protéiques:

Après rinçage des cellules au PBS, les protéines sont extraites en grattant les cellules en présence de tampon RIPA (Tris 50mM [pH 7.4], NaCl 150mM, Igepal 1% [v/v], sodium

deoxycholate 1% [w/v], iodoacetamide 5mM, SDS 0,1% [w/v]) contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases Complete (Roche diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). L'extrait cellulaire est incubé 15 min dans la glace avant d'être centrifugé 10 min à 10000g à 4°C afin d'éliminer les débris cellulaires. La concentration protéique des extraits cellulaires est déterminée par test colorimétrique en microplaque à l'aide du kit BC Assay UPTIMA (Interchim, Montluçon, France) et lecture de la densité optique de la coloration par le spectrophotomètre Xenius® (Safas) à 562 nm comme décrit par le fournisseur. La BSA (Bovine Serum Albumin) est utilisée comme protéine de référence pour la gamme étalon.

B.2.8.2 Western blotting:

Les extraits protéiques (pour les cellules HT1080: 1 µg; pour les cellules DLD1, 20 µg et 0,25 µg pour l'analyse des MMPs et des molécules d'adhérence, respectivement; pour les cellules BZR et Hs578T: 10 μg) additionnés de tampon Laemmli 5X contenant 5% de βmercaptoéthanol sont dénaturés 5 min à 100°C avant d'être soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10% en présence de SDS à ampérage constant (40mA). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de Polyvinylidene fluoride (PVDF) (NEN, Boston, MA, USA) sous l'effet d'un voltage constant (100V) durant 1 heure. Les membranes subissent tout d'abord un blocage des sites aspécifiques par une incubation de deux heures sous agitation à température ambiante dans un tampon de blocage (5% de lait écrémé lyophilisé + 0,1% de Tween-20 dans du PBS). Les membranes sont ensuite incubées toute une nuit à 4°C sous agitation lente avec des anticorps primaires monoclonaux de souris anti-MT1-MMP (1/500^{ème}, clone 5H2, R&D Systems, MN, USA), anti-c-Myc (1/1000^{ème}, clone 9E10, Sigma), anti-cadhérine-E (1/100^{ème}, Transduction Laboratories, San Jose, CA, USA), anti-caténine-B (1/500^{ème}, Transduction Laboratories) ou anti-caténine p120 (1/500^{ème}, Transduction Laboratories). Un anticorps primaire polyclonal de lapin anti-actine (1/200^{ème}, Sigma) est également utilisé dans le but de contrôler la quantité de protéines déposées. Après trois rincages de 1x15 et 2x5 minutes dans du tampon PBS + 0,1% Tween-20, les membranes sont incubées avec l'anticorps secondaire approprié anti-souris ou anti-lapin conjugués à une HRP (horse raddish peroxydase) (1:1000, DakoCytomation, Glostrup, Danemark) pendant une heure à température ambiante dans l'obscurité. La révélation est réalisée à l'aide du kit ECL+ (Amersham Pharmacia Biotech, Buckingamshire, Royaume-Uni). L'observation du signal est obtenue à l'aide d'un densitomètre sensible à la chimioluminescence (LAS-1000, Fuji).

B.2.9 ANALYSE PAR ZYMOGRAPHIE

Au préalable, les milieux conditionnés des cellules DLD1 sont centrifugés sur des colonnes Nanosep 10 K omega (Pall Life Sciences, Ann Arbo, MI, USA) pour en concentrer le contenu protéique (100 fois). Les surnageants des différents transfectants additionnés de tampon Laemmli 5X sont soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10% contenant 1mg/ml de gélatine (Sigma, St-Louis, MO, USA) en présence de SDS à ampérage constant (40mA) à 4°C. Après la migration, le gel est lavé deux fois 30 minutes dans un bain de Triton X-100 à 2% sous agitation à température ambiante afin d'éliminer par compétition le SDS qui inhiberait l'activité enzymatique. Le gel est ensuite incubé une nuit à 37°C dans une solution de Tris 50mM pH 7,6, CaCl₂ 5mM et triton X-100 0,1% afin de révéler l'activité enzymatique. Le gel est alors coloré 30 minutes dans un bain de bleu de Coomassie R250 contenant 10% d'acide acétique et 20% de méthanol avant d'être décoloré dans des bains d'acide acétique (10%) et méthanol (40%). La présence de gélatinases est visualisée par l'apparition de bandes claires sur fond bleu indiquant la protéolyse du substrat.

B.2.10 IMMUNOCYTOCHIMIE:

Les cellules DLD1-Teton-mock/hNanos1 sont cultivées jusqu'à subconfluence sur lamelles en verre (Ø 12 mm) disposées dans les puits d'une plaque 24 puits. Les cellules sont ensuite rincées deux fois en PBS pour être fixées en paraformaldéhyde (PF) 2,5% pendant 30 minutes. Les membranes des cellules sont ensuite perméabilisées par incubation en PBS/triton X-100 0,2% pendant 15 minutes. Les sites aspécifiques sont alors bloqués par une incubation de 30 minutes en PBS/BSA 1% + triton 0,1% à température ambiante. Les lamelles sont ensuite mises à incubées pendant 1 heure à température ambiante avec un anticorps primaire monoclonal de souris reconnaissant c-Myc (1/500^{ème}, clone 9E10, Sigma), la cadhérine-E (1/100^{ème}, Transduction Laboratories, San Jose, CA, USA), la caténine-ß (1/500^{ème}, Transduction Laboratories) ou la caténine p120 (1/500^{ème}, Transduction Laboratories) dilué en PBS/BSA 1%. Après trois rinçages de 5 min en PBS, les lamelles sont ensuite recouvertes avec un anticorps secondaire anti-souris couplé à l'alexa 594 (rouge) (1/200^{ème}, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). Après trois nouveaux rinçages de 5 min en PBS, les noyaux sont colorés au dapi (di aminido phenyl indo, 1/1000^{ème}, Molecular Probes) pendant 10 min à température ambiante. Après deux rinçages de 5 min, les lamelles sont montées sur lames de verre avec du milieu de montage Aqua Polyamount (Polysciences Inc, Warrington, PA, USA).

B.2.11 Analyse de l'activite de la catenine- β nucleaire:

Pour ces expériences, nous utilisons le plasmide rapporteur TOP-FLASH contenant trois sites de liaison du complexe caténine- β /TCF de type sauvage (5'-CCTTTGATC-3') et son contrôle, le plasmide FOP-FLASH contenant trois sites de liaison du complexe caténine- β /TCF de type muté (5'-CCTTTGATC-3'). Dans ces plasmides, les sites de liaison du complexe caténine- β /TCF sauvages ou mutés sont disposés en amont d'un promoteur minimal c-*fos* permettant l'expression de la luciférase. Ces deux plasmides ont été fournis par le docteur H. C. Clevers [University Hospital, Utrecht, the Netherlands] (Korinek et coll., 1997); van de et coll., 1997b).

Une heure avant la transfection, 50 000 cellules DLD1-Teton-mock ou DLD1-TetonhNanos1 dans 500 µl de RPMI contenant 10% de SVF et supplémenté ou non en doxycycline (2 µg/ml) sont ensemencées par puits d'une plaque 24 puits. La transfection est réalisée en ajoutant à chaque puits un mélange contenant 20 µl de RPMI sans sérum, 0,6 µl de FuGENE (Roche diagnostic GmbH, Mannhein, Allemagne), 0,4 µg de plasmide TOP-FLASH ou FOP-FLASH et 0,8 ng du rapporteur *Renille* phRG-TK (Promega, Madison, WI, USA) utilisé comme contrôle interne.

24 heures après transfection, les cellules sont rincées en PBS et lysées dans 100 µl de tampon « passive lysis buffer » (Promega). L'activité luciférase est déterminée avec un luminomètre utilisant le système de dosage Dual Luciférase (Promega) sur 20 µl de lysat. Pour chaque expérience, l'activité luciférase est normalisée par rapport à l'activité de la *Renille* utilisée comme contrôle interne. Les valeurs obtenues avec le plasmide FOP-FLASH sont soustraites aux valeurs obtenues avec le plasmide TOP-FLASH. Les résultats sont exprimés en unités lumineuses relatives.

B.2.12 ANALYSE STATISTIQUE DES DONNEES:

Les données obtenues à l'issue des expériences de RT-PCR, western blotting, zymographie et invasion en chambre de Boyden modifiée sont exprimées en fois d'induction. Les fois d'induction sont déterminées par normalisation aux valeurs de chaque contrôle respectif. Un one sample t-test a été utilisé pour déterminer la signification des résultats. Une valeur de p<0,05 est considérée significative.

C. RESULTATS

C.1 1^{ÈRE} PARTIE: EXPRESSION *IN VIVO* DE HNANOS1 DANS LES CANCERS BRONCHO-PULMONAIRES:

C.1.1 TAUX D'EXPRESSION DE HNANOS1 ET DES MMPS DANS LES CANCERS BRONCHO-PULMONAIRES:

Afin de comparer le taux d'expression *in vivo* de hNanos1 entre les tumeurs broncho-pulmonaires et les tissus normaux prélevés à distance de la tumeur, une analyse de l'expression des ARNm de hNanos1 a été réalisée par RT-PCR. Nous avons pu observer une surexpression des ARNm de hNanos1 dans les tissus tumoraux (valeur médiane: 0,50) par rapport aux tissus normaux (valeur médiane: 0,26) (p=0,0117) (Figure 18A). Cette surexpression est également significative pour le groupe des tumeurs épidermoïdes par rapport aux tissus de bronches normales et pour le groupe des tumeurs glandulaires par rapport aux tissus de parenchymes normaux.

Afin d'étudier le lien entre le taux d'expression de hNanos1 et l'agressivité des tumeurs, nous avons comparé le taux d'expression des ARNm de hNanos1 entre les tumeurs de différents stades TNM. Parmi ces tumeurs, 17 sont de stade I et, à ce titre, présentent une invasion locale limitée d'après l'examen histologique réalisé préalablement, 33 sont de stade II ou III et présentent une invasion plus étendue des tissus et, dans certains cas, une ou plusieurs métastases ganglionnaires. L'analyse par RT-PCR révèle que l'expression des ARNm de hNanos1 est significativement plus élevée dans les échantillons de tumeurs de hauts grades (stades II/III) (valeur médiane: 0,30) par rapport aux échantillons correspondant à des tumeurs de grade inférieur (stade I) (valeur médiane: 0,68) (p=0,0357) (Figure 18B). Cette surexpression est également significative pour le groupe des tumeurs glandulaires. Ces résultats suggèrent que l'expression de hNanos1 est corrélée au statut invasif des tumeurs bronchiques.

L'analyse de l'expression de hNanos1 a été également réalisée en fonction du niveau de différenciation des tumeurs. Cependant, aucune corrélation significative n'a pu être mise en évidence.



Figure 18: Analyse par RT-PCR du taux d'expression de hNanos1 dans les cancers broncho-pulmonaires

A. Analyse en fonction de la malignité des tissus. **B.** Analyse en fonction du stade TNM des tumeurs. Les tableaux présentés contiennent les valeurs médianes, les valeurs minimales et maximales, et les valeurs statistiques calculées par le test de Mann Whitney.

Afin d'effectuer une étude corrélative de l'expression de hNanos1 et des MMPs impliquées dans l'invasion tumorale, nous avons étudié en parallèle l'expression de la MMP-2 et de la MT1-MMP dans ces mêmes échantillons. D'après l'analyse par RT-PCR de leurs transcrits, on constate que les taux d'expression de la MT1-MMP et de la MMP-2 sont significativement plus élevés dans les tissus tumoraux (valeur médiane: 0,96 et 1,17; respectivement) que dans les tissus normaux (valeur médiane: 0,58 et 0,90; respectivement) (p=0093 et p=0,0279, respectivement). Une surexpression de la MT1-MMP et de la MMP-2, toutefois non significative, est également observée dans les tumeurs de stades TNM II/III (valeur médiane: 1,41 et 1,1, respectivement) par rapport aux tumeurs de stade I (valeur médiane: 0,7 et 0,77, respectivement) (Figure 19).



Figure 19: Analyse par RT-PCR du taux d'expression de la MT1-MMP et de la MMP-2 dans les cancers broncho-pulmonaires:

A et C. Analyse en fonction de la malignité des tissus. B et D. Analyse en fonction du stade TNM des tumeurs. Tableau présentant les valeurs médianes, les valeurs minimales et maximales, et la signification par le test de Mann Whitney.

 $C.1.2 \qquad \mbox{Localisation des ARNM } \mbox{HNanos1 dans les tissus tumoraux:} \\$

Après avoir mis en évidence la surexpression des ARNm *hNanos1* dans les tissus tumoraux, nous avons étudié leur localisation sur des coupes histologiques par la technique d'hybridation *in situ*.

Les ARNm de hNanos1 sont retrouvés dans les massifs tumoraux avec une expression plus marquée en périphérie aux fronts d'invasion. Les cellules stromales expriment également les ARNm de hNanos1 (Figure 20).



Figure 20: Localisation par hybridation *in situ* des ARNm de hNanos1 dans les cancers broncho-pulmonaires.

A. Hybridation avec la sonde hNanos1 antisens. Barre: 74 μ m (**B**). Contrôle: Hybridation avec la sonde hNanos1 sens. Barre: 74 μ m (**C**) Massif tumoral à fort grossissement après hybridation avec la sonde hNanos1 antisens. Les flèches indiquent le front d'invasion. Barre: 18 μ m. (**D**) Hybridation avec la sonde hNanos1 antisens. Les flèches indiquent la présence de fibroblastes marqués. Barre: 37 μ m. **T:** massif tumoral. Grossissements utilisés: x10 (**A** et **B**), x20 (**D**) et x40 (**C**).

En conclusion de cette partie, nous avons démontré que hNanos1 est surexprimé dans les tumeurs broncho-pulmonaires par rapport aux tissus normaux. De plus, l'expression de hNanos1 est corrélée au statut invasif des tumeurs testées, avec une expression préférentielle dans les cellules tumorales du front d'invasion. Par ailleurs, la surexpression de hNanos1 est associée à une surexpression de la MT1-MMP et la MMP-2. Par conséquent, nos résultats suggèrent que hNanos1 est associé au processus d'invasion tumorale.

C.2 2^{ÈME} PARTIE: INFLUENCE DE L'EXPRESSION DE HNANOS1 SUR LE COMPORTEMENT INVASIF DE LIGNEES CELLULAIRES TUMORALES:

Afin de déterminer dans quelle mesure l'expression de hNanos1 peut modifier le comportement invasif des cellules tumorales, nous avons utilisé un clone issu de cellules tumorales humaines de colon DLD1, exprimant de manière inductible la protéine hNanos1 taggée par un fragment Myc. Nous avons également utilisé la technique de siRNA pour étudier l'effet de l'inhibition de hNanos1 sur les propriétés invasives de lignées tumorales mammaire et bronchique.

C.2.1 INFLUENCE DE HNANOS1 SUR LE PHENOTYPE DES CELLULES DLD1:

L'observation des cellules en culture à l'aide d'un microscope à contraste de phase permet de mettre en évidence des modifications phénotypiques induites par hNanos1. Les cellules parentales DLD1 sont connues pour présenter un phénotype épithélial et cohésif. Nos observations confirment la présence de ce phénotype pour les cellules contrôles DLD1-Teton mock et les cellules hNanos1 en absence de traitement à la doxycycline (Figure 21 A, B et C). Les cellules DLD1-Teton-hNanos1 traitées à la doxycycline et exprimant hNanos1 présentent une morphologie allongée de type fibroblastoïde avec de longues extensions et un aspect moins cohésif (Figure 21 D).



Figure 21: Influence de hNanos1 sur le phénotype des cellules DLD1.

A, B et C. Les cellules présentent un phénotype épithélial. D. Les cellules exprimant hNanos1 présentent un phénotype plus fibroblastoïde. Barre= $11 \mu m$.

C.2.2 INFLUENCE DE HNANOS1 SUR LA DISPERSION DES CELLULES DLD1:

En réponse à ces premières observations, les cellules DLD1-Teton-mock et DLD1-Teton-hNanos1 avec ou sans traitement à la doxycycline ont été testées dans un modèle de dispersion cellulaire basé sur l'analyse de la distribution spatiale des populations cellulaires.



Figure 22: Comparaison des distributions spatiales selon les modèles géométriques de Voronoï, Delaunay et de l'arbre de longueur minimale (ALM).

Distributions spatiales des cellules DLD1-Teton-mock et hNanos1 avec ou sans doxycycline à 24h représentées par le diagramme de Voronoï (A, D, G et J), la triangulation de Delaunay (B, E, H et K) et l'arbre de longueur minimale (ALM) (C, F, I et L).

Au cours des premières heures de culture, les cellules DLD1-Teton-mock et DLD1-Teton-hNanos1, non traitées ou traitées à la doxycycline, présentent le même profil, notamment une homogénéité de la surface des aires de Voronoï et de la longueur des segments pour les graphiques de Delaunay et de l'ALM correspondant à une distribution spatiale aléatoire. Ensuite, nous avons observé l'apparition progressive des différences de comportement entre les cellules exprimant ou non hNanos1. Après 24 h de culture, les cellules DLD1-Teton-mock traitées et non traitées ainsi que les cellules DLD1-Teton-hNanos1 non traitées à la doxycycline présentent une grande hétérogénéité de la surface des aires de Voronoï et une grande variabilité de la longueur des segments pour les graphiques de Delaunay et l'ALM (Figure 22 A-I), alors que les cellules DLD1-Teton-hNanos1 traitées à la doxycycline ont conservé une plus grande homogénéité dans la surface des aires de Voronoï ou la longueur des segments de Delaunay et de l'ALM (Figure 22 J-L).



Figure 23: Comparaison des paramètres calculés pour les modèles de Voronoï, Delaunay et d'ALM à 24h de culture:

Sur ces trois graphiques, on observe que la valeur RFH (roundness factor homogeneity) augmente alors que la valeur de AD (area disorder) diminue et la valeur de m (average length) augmente alors que la valeur de σ (SD) diminue. Ceci indique que les cellules DLD1-Teton-hNanos1 traitées (+ dox) exprimant hNanos1 présentent une distribution spatiale plus dispersée et aléatoire que ces mêmes cellules non traitées (- dox) et les cellules DLD1-Teton-mock non traitées (- dox) et traitées (+ dox), lesquelles présentent toutes une distribution spatiale cohésive en amas (P<0.05). Les astérisques représentent les valeurs de référence calculées par simulation sur ordinateur d'une distribution spatiale donnée.

Le calcul des paramètres à partir de ces partitions et leur comparaison avec les valeurs de référence permettent d'attribuer aux cellules contrôles une distribution spatiale en amas alors que les cellules qui expriment hNanos1 ont une distribution spatiale plus aléatoire (Figure 23). Nawrocki-Raby et coll. ont démontré qu'une distribution aléatoire est caractéristique d'un phénotype plus invasif des cellules tumorales (Nawrocki-Raby et coll., 2001). Par conséquent, ces résultats montrent que l'expression de hNanos1 induit un phénotype plus dispersé et invasif des cellules DLD1.

C.2.3 INFLUENCE DE HNANOS1 SUR LES PROPRIETES MIGRATOIRES DES CELLULES DLD1:

Afin d'étudier les effets de l'induction de l'expression de hNanos1 sur les propriétés migratoires des cellules DLD1, un modèle *in vitro* de migration cellulaire en 2D a été utilisé pour comparer les trajectoires ainsi que les vitesses de migration des cellules DLD1-Teton-mock et hNanos1 avec ou sans traitement à la doxycycline.



Figure 24: Comparaison des comportements migratoires des cellules DLD1:

A. Images en contraste de phase des zones périphériques d'excroissance des cellules DLD1-Teton-mock et DLD1-Teton-hNanos1 non traitées (+ Dox) et traitées avec la doxycycline (+ Dox) à t=0 (a, b, c et d) et t =1 hr (e, f, g et h). **B**. Trajectoires de migration des cellules DLD1-Teton-mock et DLD1-Teton-hNanos1 non traitées (- Dox) et traitées avec la doxycycline (+ Dox) (a, b, c et d). Les trajectoires des cellules sont établies à partir des images enregistrées toutes les 15 minutes pendant 1 heure. Barres d'échelle: 11 μ m.

Comme l'illustre la figure 24, les cellules DLD1-Teton-mock traitées ou non à la doxycycline et les cellules DLD1-Teton-hNanos1 non traitées ont une mobilité réduite et aléatoire. A l'opposé, les cellules DLD1-Teton-hNanos1 exprimant hNanos1 présentent une migration orientée. Aucune différence significative dans les valeurs des vitesses de migration n'a été observée entre les cellules DLD1-Teton-mock traitées et non traitées à la doxycycline (11,48 \pm 3,51 µm/h et 11,44 \pm 4,09 µm/h, respectivement), alors que l'expression de hNanos1 dans les cellules DLD1-Teton-hNanos1 induit une augmentation significative (81%, *p*<0,001) de la vitesse de migration en comparaison avec les cellules DLD1-Teton-hNanos1 non traitées à la doxycycline (29,23 \pm 7,56 µm/h et 16,14 \pm 3,99 µm/h, respectivement) (Figure 25). L'ensemble des données obtenues dans notre modèle de migration en 2D démontre ainsi que hNanos1 augmente les propriétés migratoires des cellules DLD1.



Figure 25: Comparaison des vitesses de migration des cellules DLD1.

Les cellules DLD1-Teton-mock non traitées (- dox) et traitées (+ dox) à la doxycycline présentent des vitesses de migrations comparables (11,48 \pm 3,51 μ m/h et 11,44 \pm 4,09 μ m/h, respectivement) alors que les cellules DLD1-Teton-hNanos1 traitées (+ dox), exprimant hNanos1, présentent une vitesse de migration supérieure à celle des cellules DLD1-Teton-hNanos1 non traitées (- dox) (29,23 \pm 7,56 μ m/h et 16,14 \pm 3,99 μ m/h, respectivement).

$C.2.4 \qquad \text{Influence de hNanos1 sur le potentiel invasif des cellules DLD1:}$

Afin d'étudier le rôle potentiel de hNanos1 lors de l'acquisition de propriétés d'invasion et de dégradation par les cellules tumorales, nous avons testé les cellules DLD1 en chambre de Boyden modifiée. Nous avons observé que les cellules DLD1-Teton-mock non traitées à la doxycyline présentent des capacités invasives similaires alors que les

cellules DLD1-Teton-hNanos1 traitées à la doxycycline et exprimant hNanos1 sont significativement plus invasives que les cellules DLD1-Teton-hNanos1 non traitées (1,45 fois, p<0,05) (Figure 28). De plus, l'ajout d'un inhibiteur synthétique de MMPs, le BB-94, inhibe totalement l'invasion des cellules DLD1-Teton-hNanos1 induite par hNanos1 en présence de doxycycline (p<0,05). D'autre part, le BB-94 n'a pas d'effet sur les cellules DLD1-Teton-hNanos1 non traitées ou traitées à la doxycycline et les cellules DLD1-Teton-hNanos1 non traitées (Figure 26). Ces résultats démontrent que hNanos1 induit l'invasion des cellules DLD1 de manière MMP-dépendante.



Figure 26: Analyse du potentiel invasif des cellules DLD1 en chambre de Boyden modifiée.

L'induction de l'expression de hNanos1 augmente le potentiel invasif des cellules DLD1-Teton-hNanos1 de manière MMP-dépendante. *P<0,05.

C.2.5 INFLUENCE DE HNANOS1 SUR LES PROPRIETES TUMORIGENES ET INVASIVES *IN VIVO* DES CELLULES DLD1 EN SOURIS NUDE:

Afin de compléter nos données obtenues *in vitro*, nous avons testé le rôle potentiel de hNanos1 *in vivo* dans la formation de tumeur et la dissémination métastatique par des injections ectopiques des cellules DLD1-Teton-mock/hNanos1 traitées ou non à la doxycycline dans les flancs de souris Nude.

L'analyse du volume des tumeurs générées en souris Nude agées de 6 semaines après l'injection montre que les tumeurs générées par les cellules DLD1-Teton-hNanos1 dont l'expression de hNanos1 est induite par le traitement à la doxycycline présentent un volume significativement inférieur (médiane: 618 mm³) aux tumeurs générées par les cellules DLD1-Teton-hNanos1 non traitées (médiane: 1515 mm³) (p<0,001). Dans le même temps, les

volumes des tumeurs générées par les cellules DLD1-Teton-mock avec ou sans traitement à la doxycycline sont équivalents et ne témoignent pas d'un effet de la doxycycline (Figure 27).



В

Cellules injectées	Volume médian des tumeurs (mm ³)	Volume max Volume min. (mm ³)	
mock - dox	1252	570-3300	
mock + dox	1415	380-2940	
hNanos1 - dox	1515	530-3370	
hNanos1 + dox	618	60-2360	

Figure 27: Effet de hNanos1 sur le potentiel tumorigène des cellules DLD1 en souris Nude.

A. Graphique comparant les volumes des tumeurs observées à six semaines après injection. **B**. Tableau présentant le bilan statistique du volume des tumeurs obtenues pour chaque groupe de souris injectées.

Ces données indiquent que l'expression de hNanos1 ne favorise pas la formation des tumeurs primaires aux sites d'injection. Au contraire, on assiste à un effet négatif de l'expression de hNanos1 sur le volume de la tumeur primaire.

Les autopsies réalisées sur les souris ont permis d'analyser la présence ou non de foyers tumoraux secondaires dans différents organes tels que le foie, la rate, les poumons et les reins. Les données obtenues (tableau 10) démontrent que la présence de métastases péritonéales est plus fréquente chez les souris ayant subi l'injection des cellules DLD1-Teton-hNanos1 traitées à la doxycycline et exprimant hNanos1 (46,15 %) plutôt que l'injection de ces mêmes cellules non traitées (16,66 %) (*p*=0,091). La formation de métastases chez les souris injectées avec les cellules contrôles DLD1-Teton-mock avec ou sans traitement de doxycycline est presque identique dans les deux groupes de souris (25% contre 22,22%). Ces foyers tumoraux secondaires observés ont la forme de petites masses disséminées dans le tissu conjonctif péritonéal et de façon préférentielle au niveau du mésentère. Ces observations sont similaires aux constatations cliniques décrites dans le cadre de cancers colorectaux humains. Par ailleurs, aucune autre métastase n'a pu être détectée visuellement dans les différents organes prélevés.

Groupe de souris	Nombre de souris analysées (n)	Nombre de souris avec métastases péritonéales	Pourcentage	р	
mock - dox	8	2	25%	0.000	
mock + dox	9	2	22,22 %	0,892	
hNanos1 - dox	13	2	15,38 %	0.001	
hNanos1 + dox	13	6	46,15 %	0,091	

Tableau 10: Effet de hNanos1 sur la production de métastases par les cellules DLD1.

Le pourcentage indique le nombre de souris présentant des métastases péritonéales rapporté au nombre total de souris autopsiées. Probabilité p calculée par test Khi².

Les tumeurs primaires ainsi que les différents organes pouvant présenter des métastases ont été prélevés afin d'être soumis à une analyse histologique. L'analyse des tumeurs primaires révèle la structure glandulaire caractéristique d'un adénocarcinome de colon dont sont issues les cellules DLD1 (Figure 28 A et B). Les cellules DLD1-Teton-hNanos1 traitées à la doxycycline présentent toutefois un aspect plus fusiforme. L'analyse des métastases péritonéales découvertes montre que les cellules tumorales forment des petits massifs cerclés d'une couche épaisse de mésothélium (Figure 28 C). Nous distinguons également que des cellules tumorales peuvent envahir des ganglions lymphatiques comme l'indique la figure 28 D. L'examen des coupes a permis de confirmer l'absence de métastases ou de micrométastases au sein des organes prélevés.



Figure 28: Histologie des tumeurs primaires et secondaires formées par les cellules DLD1 en souris Nude après coloration HPS.

A. Tumeur primaire sous-cutanée observée six semaines après injection des cellules DLD1-Teton-hNanos1 - dox. Barre d'échelle: $32 \ \mu\text{m}$. **B**. Tumeur primaire sous-cutanée observée six semaines après injection des cellules DLD1-Teton-hNanos1 + dox. Barre d'échelle: $32 \ \mu\text{m}$. **C**. Métastase péritonéale observée dans le mésentère. Les flèches indiquent une fibrose stromale en périphérie. Barre d'échelle: $64 \ \mu\text{m}$. **D**. Métastase péritonéale (M) dans un nodule lymphatique (L) présent dans le mésentère. Barre d'échelle: $128 \ \mu\text{m}$. (Grossissement original: 5x (**D**), 10x (**C**) et 20x (**A** et **B**)).

Ces données obtenues *in vivo* en souris Nude confirment que l'expression de hNanos1 favorise le phénomène d'invasion tumorale qui potentialise la dissémination métastatique des cellules tumorales.

- C.2.6 INFLUENCE DE HNANOS1 SUR L'EXPRESSION DES MOLECULES D'ADHERENCE INTERCELLULAIRE PAR LES CELLULES DLD1:
- C.2.6.1 Influence de hNanos1 sur le taux d'expression des molécules d'ahérence intercellulaire:

Dans le but de déterminer si l'induction de propriétés de dispersion et d'invasion par hNanos1 s'accompagne d'une modification de l'expression des molécules d'adhérence intercellulaire des cellules DLD1, une analyse du taux de cadhérine-E, caténine p120 et caténine- β a été réalisée par Western blot. L'analyse des extraits protéiques des cellules DLD1-Teton-mock et DLD1-Teton-hNanos1 non traitées ou traitées à la doxycyline ne montre aucune variation significative de l'expression de la cadhérine-E, la caténine- β ou de la caténine p120 (Figure 29).



Figure 29: Analyse par western blotting du taux protéique des molécules d'adhérence intercellulaire.

L'induction de l'expression de hNanos1, mise en évidence par un anticorps dirigé contre myc, ne modifie pas les taux protéiques des molécules d'adhérence cadhérine-E, caténine- β et p120. La quantité de protéines déposée a été contrôlée par immunoblot de la GAPDH.

C.2.6.2 Influence de hNanos1 sur la localisation des molécules d'adhérence intercellulaire:

L'étude de l'influence de hNanos1 sur la localisation des molécules d'adhérence intercellulaire a été réalisée par immunocytochimie. L'analyse immunocytochimique confirme la présence de la protéine de fusion Myc-hNanos1 sous la forme de «points» cytoplasmiques avec une forte concentration périnucléaire uniquement dans les cellules DLD1-Teton-hNanos1 traitées à la doxycycline. En ce qui concerne les molécules d'adhérence, la cadhérine-E, la caténine- β et la caténine p120, elles sont localisées préférentiellement au niveau membranaire des cellules DLD1-Teton-mock non traitées et traitées à la doxycycline ainsi que des cellules DLD1-Teton-hNanos1 non traitées. Lorsque l'expression de hNanos1 est induite, on note une diminution importante du signal au niveau membranaire et l'apparition d'un marquage cytoplasmique plus intense notamment en ce qui concerne la caténine p120. Au niveau nucléaire, aucun marquage n'a pu être observé de manière significative pour ces molécules (Figure 30).


Figure 30: Analyse par immunocytochimie de la localisation des molécules d'adhérence intercellulaire:

L'induction de l'expression de myc-hNanos1 induit une redistribution des molécules d'adhérence cadhérine-E, caténine- β et p120 de la membrane vers le cytoplasme des cellules. Les noyaux des cellules sont marqués au dapi (bleu). Les différents antigènes apparaissent en rouge.

C.2.6.3 Influence de hNanos1 sur l'activité co-transcriptionnelle de la caténine- β :

L'expression de hNanos1 induisant la redistribution de la caténine- β de la membrane cellulaire vers le cytoplasme, l'activité co-transcriptionnelle de la caténine- β dans les cellules DLD1 a donc été mesurée. Un test rapporteur de l'activité de la caténine- β nucléaire montre que l'expression de hNanos1 réduit significativement l'activité de la caténine- β nucléaire dans les cellules DLD1-Teton-hNanos1, alors que le traitement à la doxycycline des cellules DLD1-Teton-mock ne modifie pas cette activité (Figure 31).



Figure 31: Analyse de l'activité co-transcriptionnelle de la caténine- β dans les cellules DLD1.

L'activité co-transcriptionnelle de la caténine- β est évaluée en transfectant le plasmide rapporteur de l'activité caténine- β /Tcf TOP-FLASH. Les données sont exprimées en unité lumineuse relative. ** p<0,01.

Ces données indiquent donc que la surexpression de hNanos1 perturbe la fonctionnalité des complexes d'adhérence cadhérine-E/caténines en induisant une redistribution des molécules d'adhérence du compartiment membranaire vers le compartiment cytoplasmique et une diminution de l'activité co-transcriptionnelle de la caténine- β .

C.2.7 INFLUENCE DE HNANOS1 SUR LA PRODUCTION DE MMPS PAR LES CELLULES TUMORALES:

La surexpression de hNanos1 dans les tumeurs bronchiques étant associée à une surexpression de la MMP-2 et de la MT1-MMP et l'invasion induite par hNanos1 des cellules tumorales DLD1 étant MMP-dépendante, nous avons analysé l'effet de hNanos1 sur l'expression des MMPs. Ceci a été réalisé en utilisant des transfectants DLD1 surexprimant hNanos1 ainsi que des cellules tumorales à fort potentiel invasif d'origine bronchique (lignée BZR) et mammaire (lignée Hs578T) dont l'expression de hNanos1 est réprimée par la transfection transitoire de siRNAs spécifiques.

C.2.7.1 Influence de la surexpression de hNanos1 sur la production de MMPs par les cellules DLD1:

Afin de mettre en évidence la régulation transcriptionnelle de l'expression de MMPs par hNanos1, nous avons procédé à une analyse par RT-PCR des ARNm de plusieurs MMPs

dans les cellules DLD1-Teton-mock et hNanos1 traitées ou non à la doxycycline. Parmi les MMPs testées, la MMP-2 et la MT1-MMP présentent une modification de l'expression de leur ARNm lorsque hNanos1 est surexprimé dans les cellules DLD1-teton-hNanos1 après traitement à la doxycycline. Notamment, on constate une augmentation de 3,5 fois pour les transcrits de la MMP-2 (p<0,05) et de 1,5 fois (p<0,05) pour les transcrits de la MT1-MMP (Figure 32 A et B). Dans le même temps, on ne constate aucune modification du taux d'expression des transcrits des TIMP-1 et -2, leurs inhibiteurs tissulaires, dans ces mêmes cellules (Figure 32 A et C). Par ailleurs, le traitement à la doxycycline n'a aucune conséquence sur la production de MMPs et de TIMPs par les cellules contrôles DLD1-Teton-mock (Figure 32).





A. Analyse des produits de RT-PCR des cellules DLD1-Teton-mock et hNanos1 non traitées ou traitées à la doxycycline. B et C. Les valeurs densitométriques correspondantes aux taux d'expression des MMPs et des TIMPs sont normalisées par rapport aux valeurs obtenues pour l'ARNr 28s. Les données sont exprimées en fois d'induction pour les cellules DLD1-Teton mock/hNanos1 traitées à la doxycycline rapportées à leurs contrôles respectifs non traités à la doxycycline. *p < 0,05.

Nous avons ensuite analysé l'expression de la MT1-MMP et de la MMP-2 au niveau protéique respectivement par Western blotting et zymographie. Nous avons observé que les cellules DLD1-Teton-hNanos1 traitées à la doxycycline produisent un taux plus élevé de la

forme active de la MT1-MMP à 60 kDa (1.5 ± 0.2 , p < 0.01) par rapport à ces mêmes cellules non traitées (Figure 33 A). L'analyse de l'activité gélatinolytique de la MMP-2 par zymographie révèle que la production de la pro-forme à 72 kDa de la MMP-2 est plus élevée dans les cellules DLD1-Teton-hNanos1 traitées à la doxycycline (2.2 ± 0.2 , p < 0.001) (Figure 33 B). Le traitement à la doxycycline n'a aucun effet sur la production de la MT1-MMP et de la MMP-2 par les cellules DLD1-Teton-mock (Figure 33).



Figure 33: Analyse de l'expression protéique de la MT1-MMP et de la MMP-2.

A. Analyse de la production de la MT1-MMP par Western blotting. **B**. Analyse de l'activité gélatinolytique de la MMP-2 par zymographie. Les valeurs densitométriques correspondantes aux taux protéiques de MT1-MMP et MMP-2 produites sont normalisées respectivement par rapport aux valeurs obtenues pour l'actine et à la quantité de protéines contenues dans les milieux conditionnés. Les données sont exprimées en fois d'induction pour les cellules DLD1-Teton mock/hNanos1 traitées à la doxycycline rapportées aux contrôles respectifs non traités à la doxycycline. *p<0,05; *** p<0,001.

C.2.7.2 Influence de la répression de hNanos1 sur la production des MMPs par les cellules BZR et Hs578T:

Afin de confirmer que l'expression de hNanos1 participe au phénotype invasif des cellules tumorales en régulant l'expression des MMPs, nous avons réprimé l'expression de hNanos1 dans deux lignées tumorales à fort potentiel invasif, les cellules BZR et les cellules Hs578T. Pour cela, nous avons procédé à la transfection transitoire de deux séquences de siRNAs réprimant spécifiquement l'expression protéique de hNanos1 dans ces cellules tumorales. Après avoir vérifié que l'expression de hNanos1 est réduite dans les différents

transfectants, nous avons analysé l'expression des MMPs au niveau de leurs ARNm et de leurs protéines et enfin nous avons testé en parallèle leur potentiel invasif en chambre de Boyden modifiée.

L'analyse par RT-PCR confirme que la transfection des deux siRNAs hNanos1 (si1 et si2) réduit l'expression des ARNm de hNanos1 de manière significative dans les deux lignées (Figure 34 A). Parallèlement, les deux siRNAs hNanos1 (si1 et si2) réduisent significativement l'expression des ARNm de la MT1-MMP et de la MMP-2 dans les deux lignées tumorales Hs578T et BZR par rapport aux contrôles respectifs (cont1 et cont2) (respectivement, 0,79 et 0,65 fois pour Si1, 0,54 et 0,44 fois pour Si2 pour la MT1-MMP ; 0,63 et 0,71 fois pour Si1, 0,51 et 0,32 fois pour Si2 pour la MMP-2) (Figure 34 B et C).



Figure 34: Analyse de l'expression des ARNm de la MT1-MMP et de la MMP-2 dans les transfectants BZR et Hs578T.

A. Analyse des différents transcrits hNanos1, MT1-MMP et MMP-2 par RT-PCR. **B.** Quantification de l'expression des ARNm de la MT1-MMP. **C.** Quantification de l'expression des ARNm de la MMP-2. Les valeurs densitométriques correspondantes aux taux en ARNm de la MT1-MMP et de la MMP-2 sont normalisées par rapport aux valeurs obtenues pour l'ARNr 28s. Les données sont exprimées en fois d'induction pour les transfectants si1 et si2 rapportées aux transfectants contrôles respectifs, cont1 et cont2. *p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

Nous avons ensuite vérifié ces données en analysant la production de ces deux MMPs par Western blotting et zymographie. Nous constatons que la diminution des ARNm de la MT1-MMP et de la MMP-2 est corrélée à une diminution de l'expression des protéines correspondantes. Par Western blotting, nous observons une diminution significative de la proforme à 63 kDa et de la forme active à 60 kDa de la MT1-MMP dans les cellules Hs578T transfectées par les deux siRNAs hNanos1 (0,66 fois pour si1 et 0,51 fois pour si2). En ce qui concerne les transfectants BZR, nous observons la diminution significative de la forme active à 60 kDa (0,62 fois pour si1 et 0,47 fois pour si2) (Figure 35 A). Enfin, notre analyse par zymographie permet de mettre en évidence une diminution significative de la pro-forme à 72 kDa de la MMP-2 pour les transfectants Hs578T et BZR (respectivement, 0,62 et 0,53 fois pour si1 et 0,68 et 0,66 fois pour si2) (Figure 35 B).



Figure 35: Analyse de l'expression des protéines MT1-MMP et MMP-2 dans les transfectants BZR et Hs578T.

A. Analyse par Western blotting de la MT1-MMP. **B**. Analyse de l'activité gélatinolytique de la MMP-2. Les valeurs densitométriques correspondantes aux taux protéiques de MT1-MMP sont normalisées par rapport aux valeurs obtenues pour l'actine. Les données sont exprimées en fois d'induction pour les transfectants si1 et si2, rapportées aux transfectants contrôles respectifs, cont1 et cont2. *p<0,05; **p<0,01.

Nous avons ensuite vérifié que la répression de hNanos1 induisant une diminution de l'expression des MMPs par les cellules tumorales Hs578T et BZR, se traduit par une baisse de leur potentiel invasif en chambre de Boyden modifiée. Comme l'indique la figure 37, la

transfection des deux siRNAs hNanos1 (si1 et si2) provoque une diminution significative de la capacité inflitrante des cellules invasives Hs578T et BZR (respectivement, 0,56 et 0,57 fois pour Si1; 0,45 et 0,54 fois pour Si2).



Figure 36: Analyse du potentiel invasif des transfectants BZR et Hs578T.

Le potentiel invasif de chaque transfectant est évalué en comptant les cellules ayant franchi la membrane poreuse recouverte de matrigel. Les données sont exprimées en fois d'induction pour les transfectants sil et si2, rapportées aux transfectants contrôles respectifs, contl et cont2. *p<0,05; **p<0,01, ***p<0,001.

L'ensemble des données obtenues par l'utilisation de siRNA hNanos1 démontre que la répression de hNanos1 induit une diminution de l'expression des MMPs s'accompagnant d'une diminution du potentiel invasif des cellules tumorales Hs578T et BZR.

D. DISCUSSION

Dans notre étude, nous démontrons que le gène hNanos1, récemment identifié comme une cible réprimée par la cadhérine-E, est surexprimé *in vivo* dans les carcinomes bronchiques humains invasifs. Nous prouvons également que l'expression de hNanos1 induit la délocalisation du complexe d'adhérence cadhérine-E/caténines, la production de MT1-MMP et MMP-2 et l'invasion *in vitro* et *in vivo* des cellules tumorales.

Notre étude in vivo réalisée par RT-PCR montre que hNanos1 est surexprimé dans les tissus tumoraux bronchiques par rapport aux contrôles normaux. De plus, le taux d'expression de hNanos1 est corrélé à l'agressivité des tumeurs comme l'indique la classification TNM. L'analyse par hybridation in situ nous informe que hNanos1 est exprimé majoritairement par les cellules tumorales avec une localisation préférentielle au front d'invasion des massifs tumoraux. L'ensemble de ces données suggère un rôle majeur de hNanos1 lors du processus d'invasion tumorale. L'ensemble de nos travaux in vitro et in vivo effectuées à l'aide de modèles cellulaires de migration/invasion a permis de montrer que la surexpression de hNanos1 induit une augmentation des propriétés invasives des cellules tumorales. Notamment, hNanos1 induit la dispersion cellulaire, l'augmentation des propriétés migratoires et infiltrantes in vitro ainsi que la dissémination métastatique des cellules tumorales in vivo en souris Nude. En ce qui concerne les tests in vivo réalisés en souris Nude, nous avons mis en évidence que les tumeurs générées par les cellules surexprimant hNanos1 présentent des volumes inférieurs aux tumeurs formées par les cellules ne l'exprimant pas, ce qui peut sembler paradoxal par rapport au rôle de hNanos1 dans la progression tumorale. Cet effet négatif sur la formation de tumeurs peut s'expliquer par la dispersion rapide des cellules tumorales à partir du foyer tumoral primaire. Nous n'avons pas noté d'effet intrinsèque de hNanos1 sur la prolifération in vitro des cellules DLD1. Dans le même temps, une fréquence plus importante de métastases péritonéales est observée après injection de cellules exprimant hNanos1. Ces données qui sont à mettre en parallèle avec les résultats in vitro de dispersion cellulaire suggèrent donc que l'expression de hNanos1 favorise l'échappement des cellules tumorales à partir de la tumeur tumorale au profit de l'invasion et la formation de métastases. Ces différents résultats, en accord avec nos observations in vivo corrélant l'expression de hNanos1 au caractère invasif des tumeurs testées, confirment également les premières données

fonctionnelles obtenues par Strumane et coll. montrant que hNanos1 induit l'invasion cellulaire en gel de collagène de type-I (Strumane et coll., 2006).

Lors du processus d'invasion tumorale, on constate fréquemment une perte d'adhérence intercellulaire liée à des perturbations des molécules des complexes jonctionnels. Notre analyse immunocytochimique révèle que hNanos1 induit la redistribution des molécules d'adhérence cadhérine-E, caténine- β et caténine p120 des complexes jonctionnels membranaires vers le cytoplasme des cellules. Cependant, nous n'observons pas de modification du niveau total de ces protéines jonctionnelles. Ces données indiquent donc que la surexpression de hNanos1 perturbe la fonction des complexes cadhérine-E/caténines dans les cellules tumorales sans altérer leurs niveaux d'expression. Strumane et coll. (2006) ayant démontré par immunoprécipitation que hNanos1 est capable d'interagir avec la caténine-ß et la caténine p120, nous pouvons envisager que hNanos1 recrute dans le cytoplasme les caténines-ß et p120, les détournant, ainsi de la cadhérine-E et, de ce fait, de leur fonction d'adhérence intercellulaire. Cette perte de fonctionnalité des molécules d'adhérence explique au moins en partie le phénotype plus dispersé et invasif des cellules surexprimant hNanos1. De nombreuses études ont montré en effet que la redistribution des molécules d'adhérence, en particulier la relocalisation de la caténine- β , est corrélée à l'augmentation des propriétés migratoires et invasives dans des systèmes cellulaires in vitro et in vivo (Jiang et Mansel, 2000; Beavon, 2000; Berx et Van Roy, 2001). De même, la localisation cytoplasmique de la caténine p120 a été observée dans différents types de tumeurs et semble également être associée au phénotype invasif des cellules tumorales (Thoreson et Reynolds, 2002; Shibata et coll., 2004). D'après l'ensemble de ces données, nous pouvons donc attribuer à hNanos1 un rôle de promoteur d'invasion qui agit en aval de la perte d'expression de la cadhérine-E dans les cellules tumorales épithéliales en perturbant les complexes d'adhérence intercellulaire. Ce mécanisme aboutit à l'amplification de la perte d'adhérence.

Les tests réalisés en chambre de Boyden modifiée avec les transfectants DLD1 reflètent l'augmentation des propriétés de dégradation par hNanos1. Notamment, l'utilisation d'un inhibiteur synthétique des MMPs, le BB-94, prouve que hNanos1 augmente l'invasion des cellules DLD1 de manière MMP-dépendante. L'analyse de l'expression des MMPs par les transfectants DLD1 révèle que hNanos1 augmente l'expression de la MT1-MMP et la MMP-2 à la fois au niveau de leur ARNm et de leur protéine. Inversement, la transfection de deux siRNAs spécifiques de hNanos1 dans les cellules tumorales invasives d'origine mammaire Hs578T et bronchique BZR diminue l'expression de ces deux MMPs et réduit dans le même

temps l'invasion de ces différents transfectants en chambre de Boyden modifiée. Ces résultats sont renforcés par les observations in vivo d'une surexpression de hNanos1 associée à une surexpression de la MT1-MMP et la MMP-2 dans les tissus tumoraux par rapport aux tissus normaux. En relation avec nos travaux, le rôle de la MMP-2 et son activateur la MT1-MMP dans les processus de migration et d'invasion a été largement décrit. Un nombre important d'études a rapporté que la surexpression de la MT1-MMP et de la MMP-2 est corrélée à la progression de nombreux types de cancer (Polette et coll., 2004). De plus, des observations in vitro ont montré que ces deux MMPs sont associées aux propriétés invasives des lignées cellulaires tumorales d'origine épithéliale (Gilles et coll., 2004). Nous montrons ici également que l'expression de hNanos1 ou sa répression n'affecte pas l'expression du TIMP-1 et du TIMP-2 ce qui souligne que hNanos1 provoque la rupture de l'équilibre entre les MMPs et leurs inhibiteurs en faveur d'une activité protéolytique élevée. L'ensemble de ces données démontre donc que hNanos1 augmente la production de la MT1-MMP et de la MMP-2 et permet d'établir une relation de cause à effet entre la promotion de l'invasion tumorale et la surexpression hNanos1. Il est à noter que la localisation préférentielle des ARNm de hNanos1 observée dans les cellules tumorales plutôt que dans les fibroblastes ne semble pas concorder avec une régulation directe des MT1-MMP et MMP-2 qui elles sont préférentiellement retrouvées dans les fibroblastes des cancers broncho-pulmonaires (Nawrocki et coll., 1997), ce qui sous-entend un mécanisme complexe de régulation. Toutefois, le débat sur l'origine cellulaire des MMPs, notamment de la MT1-MMP, MMP transmembranaire dont la protéine est largement retrouvée dans les cellules tumorales par immunohistochimie, reste ouvert.

Les voies de signalisation empruntées par hNanos1 lors de l'invasion tumorale restent à caractériser. L'interaction de la protéine hNanos1 avec des partenaires identifiés ou supposés est essentielle aux fonctions de cette molécule dans le développement. Toutes les protéines de la famille de Nanos caractérisées dans différents organismes contiennent un domaine conservé C-terminal en doigt de zinc (CCHC)₂ (Arrizabalaga et Lehmann, 1999; Kraemer et coll., 1999). Chez la drosophile, Nanos est recrutée par la protéine Pumilio au niveau des éléments NRE (Nanos responsive element) localisé dans la partie 3'-UTR (3'-untranslated region). Le complexe Nanos/Pumilio va réprimer la traduction de transcrits cibles tels que les ARNm *hunchback* et *cycline B* (Murata et Wharton, 1995; Wreden et coll., 1997; Asaoka-Taguchi et coll., 1999; Sonoda et Wharton, 2001). Chez l'homme, hNanos1 interagit avec Pumilio-2 et est trouvé également en abondance dans les cellules souches germinales (Jaruzelska et coll., 2003). La présence de ce complexe dans les cellules germinales de la drosophile et de nombreuses espèces jusqu'à celle de l'homme témoigne du rôle conservé de l'interaction

Nanos-Pumilio dans le développement des cellules germinales. D'après ces éléments, les protéines Nanos sont considérées comme des répresseurs traductionnels en se liant aux ARN de leurs cibles. Nous montrons ici que hNanos1 agit comme un activateur transcriptionnel en activant la transcription des MMPs, ce qui représente une fonction nouvelle pour les protéines Nanos. Par ailleurs, la faible conservation parmi les espéces de la partie N-terminale de la protéine hNanos1 suggère l'acquisition de nouvelle(s) fonctionnalité(s) au cours de l'évolution. La structure de Pumilio révèle la présence d'un domaine Puf contenant des motifs répétitifs en hélice (PUM repeats) qui montre une homologie avec les domaines répétitifs armadillo (Edwards et coll., 2001). Parmi les protéines de la famille armadillo, la caténine-β, une fois dissociée de la cadhérine-E, peut s'accumuler dans le cytoplasme et pénétrer dans le noyau où elle va jouer un rôle de co-facteur de transcription de nombreux gènes associés à l'invasion tumorale. La caténine- β est notamment connue pour réguler l'expression de la cadhérine-E ainsi que celle de la MT1-MMP en se complexant aux facteurs Tcf/LEF (Takahashi et coll., 2002). Notre étude révèle paradoxalement que hNanos1 réduit l'activité co-transcriptionnelle de la caténine- β . Ceci suggère donc que hNanos1 régule l'expression de la MT1-MMP et de la MMP-2 par l'intermédiaire d'une voie différente et agoniste de la voie classique de la caténine-β nucléaire. De plus, le promoteur de la MMP-2 ne contient pas de site de liaison des facteurs Tcf/LEF. hNanos1, capable d'interagir avec la caténine-ß (Strumane et coll., 2006), pourrait réguler l'expression des MMPs en recrutant la caténine-ß loin du facteur de transcription Tcf, soit pour la séquestrer, soit pour l'engager dans une autre voie de signalisation.

La caténine p120, appartenant également à la famille des protéines armadillo, interagit elle aussi avec le domaine N-terminal de hNanos1 (Strumane et coll., 2006). La caténine p120 est impliquée dans la régulation du turnover de la cadhérine-E à la membrane et ainsi joue un rôle dans le contrôle des propriétés d'adhérence intercellulaire (Hatzfeld, 2005). Dans les cellules n'exprimant plus la cadhérine-E, l'accumulation de caténine p120 cytoplasmique et nucléaire est impliquée dans la progression tumorale (Reynolds et Roczniak-Ferguson, 2004). De plus, il a été montré que l'accumulation de caténine p120 cytoplasmique affecte l'activité des Rho GTPases menant à l'augmentation de la migration et de l'invasion cellulaire (Reynolds et Roczniak-Ferguson, 2004). Par ailleurs, Strumane et coll. suggère que hNanos1 peut intervenir dans la signalisation Rho GTPases via la caténine p120 (Strumane et coll., 2006). L'augmentation significative de la caténine p120 cytoplasmique observée après l'induction de hNanos1 dans notre système cellulaire tumoral supporte en effet l'hypothèse que hNanos1 intervient dans la régulation de la migration/invasion cellulaire par la caténine p120. Un tel mécanisme pourrait être envisagé dans des processus physiologiques tels que la migration des cellules germinales primordiales (Forbes et Lehmann, 1998) et le « branching » des dendrites neuronaux (Ye et coll., 2004), dans lesquels la participation de hNanos1 est décrite. D'autre part, une étude récente a démontré que l'invasion de cellules de mélanomes induite par CXCL12 dépend de l'intervention de la MT1-MMP et de la MMP-2 et implique la signalisation des Rho GTPases via la protéine GEF Vav (Bartolome et coll., 2006). D'après ces données, hNanos1 pourrait réguler l'expression de la MT1-MMP et de la MMP-2 en interagissant avec la caténine p120 et en modulant consécutivement l'activité des Rho GTPases. D'autres études ont montré un rôle de la caténine p120 nucléaire sur l'expression de gènes associés à la progression tumorale. En effet, la caténine p120 nucléaire peut se complexer à la protéine BTB/POZ Kaiso qui agit essentiellement comme un répresseur transcriptionnel. L'interaction caténine p120/Kaiso a pour conséquence de libérer Kaiso de l'ADN et de lever la répression de gènes cibles. Peu d'éléments sont encore connus sur la nature de ces cibles. Cependant, certaines cibles des complexes caténine-β-Tcf/LEF comme la MMP-7 sont également réprimées par Kaiso (van Roy et McCrea, 2005). Il semble maintenant établi que la voie de la caténine-β nucléaire et la voie caténine p120/Kaiso agissent de concert pour réguler l'expression de gènes associés à la progression tumorale. A ce jour, les études se consacrant au rôle de Kaiso n'ont pas permis d'identifier la MT1-MMP et la MMP-2 comme des cibles potentielles. D'autres investigations sont donc nécessaires pour déterminer le rôle de cette voie dans la régulation des MMPs par hNanos1.

Au total, ce travail démontre que hNanos1 promeut l'invasion tumorale en perturbant l'adhérence intercellulaire et en induisant l'expression de MMPs par les cellules tumorales. Les mécanismes généraux impliqués par la surexpression de hNanos1 dans les cellules tumorales restent inconnus à ce jour cependant, les caténines (caténine-β et caténine p120) dont l'accumulation cytoplasmique a été observée dans notre étude pourraient jouer un rôle central dans l'acquisition de propriétés migratoires et invasives par hNanos1.

E. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

A l'issue de nos travaux, nous pouvons définir hNanos1 comme un promoteur d'invasion agissant par la régulation des molécules d'adhérence et des MMPs. Nos résultats suggèrent également l'existence d'un nouveau mécanisme de régulation de l'expression des MMPs par la cadhérine-E dans lequel le gène d'invasion hNanos1 pourrait jouer un rôle central. Ainsi, nous pouvons envisager des études complémentaires afin de mieux appréhender les fonctions régulatrices de hNanos1.

La mise au point d'un anticorps spécifique anti-hNanos1 permettrait une analyse immunohistochimique de l'expression de la protéine hNanos1 dans les tissus et notamment établierait un lien avec des travaux réalisés par hybridation *in situ* en comparant la localisation de la protéine hNanos1 à celle des ARNm des MT1-MMP et MMP-2. Nous pouvons également réaliser une étude à large échelle dans des banques de tumeurs d'origine bronchopulmonaire, mammaire et colique de l'expression de hNanos1 en relation avec des paramètres cliniques et d'évaluer ainsi sa valeur diagnostique et pronostique.

Dans le but de compléter nos résultats d'invasion *in vivo* en souris Nude, nous pourrons utiliser des cellules tumorales de potentiel métastatique varié dont l'expression de hNanos1 sera modifiée. Notamment, nous pourrons effectuer la transduction de siRNAs hNanos1 stables dans des lignées cellulaires tumorales à haut potentiel métastatique et la transfection stable de l'ADNc de hNanos1 dans des lignées cellulaires tumorales à faible potentiel métastatique. Pour faire un parallèle avec notre étude prospective sur des cancers bronchopulmonaires, nous transfecterons des cellules tumorales bronchiques pour les tester dans un modèle de xénogreffe bronchique humanisé développé au sein du laboratoire et qui mime le processus d'invasion tumorale broncho-pulmonaire.

Les voies de signalisation induites par hNanos1 sont encore méconnues. Nous avons vu que l'interaction de hNanos1 avec les caténines pourrait y jouer un rôle central. Notamment, le rôle de signalisation de la caténine p120 dans le cytoplasme et le noyau ainsi que l'implication des protéines Rho GTPases peuvent faire l'objet de futures investigations. D'autres voies potentielles intervenant dans la régulation des MMPs pourront être étudiées notamment par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des principales voies connues. De plus, en accord avec l'idée que hNanos1 joue un rôle direct de facteur ou de co-facteur de transcription, la liaison de hNanos1 au niveau des promoteurs des MMPs pourra être analysée. Dans notre étude, nous montrons que hNanos1 agit en tant que promoteur d'invasion en délocalisant les molécules d'adhérence et en augmentant l'expression des MMPs. D'autres cibles moléculaires peuvent être régulées par hNanos1 et pourraient participer à l'acquisition d'un phénotype migratoire et invasif des cellules tumorales. Des analyses en micro-array des différents transfectants utilisés dans notre étude devraient mettre en évidence de nouvelles cibles effectrices de hNanos1.

La poursuite de ces travaux devrait permettre à terme d'identifier les voies de signalisation et les molécules impliquées dans les relations entre les molécules d'adhérence, hNanos1 et les MMPs. Ainsi, hNanos1 pourrait constituer une cible moléculaire de choix dans le cadre du développement de nouvelles stratégies thérapeutiques anti-cancéreuses.

F. BIBLIOGRAPHIE

1. ABERLE H, SCHWARTZ H et KEMLER R.

Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function. J.Cell Biochem. 1996, 61, 514-523.

2. AHOKAS K, LOHI J, ILLMAN SA, LLANO E, ELOMAA O, IMPOLA U et coll.

Matrix metalloproteinase-21 is expressed epithelially during development and in cancer and is upregulated by transforming growth factor-beta1 in keratinocytes. Lab Invest 2003, 83, 1887-1899.

3. AHONEN M, BAKER AH et KAHARI VM.

Adenovirus-mediated gene delivery of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 inhibits invasion and induces apoptosis in melanoma cells. Cancer Res. 1998, 58, 2310-2315.

4. AILENBERG M et SILVERMAN M.

Cellular activation of mesangial gelatinase A by cytochalasin D is accompanied by enhanced mRNA expression of both gelatinase A and its membrane-associated gelatinase A activator (MT-MMP). Biochem.J. 1996, 313 (Pt 3), 879-884.

5. AIMES RT et QUIGLEY JP.

Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments. J.Biol.Chem. 1995, 270, 5872-5876.

6. ALA-AHO R, JOHANSSON N, BAKER AH et KAHARI VM.

Expression of collagenase-3 (MMP-13) enhances invasion of human fibrosarcoma HT-1080 cells. Int.J Cancer 2002, 97, 283-289.

7. ALA-AHO R et KAHARI VM.

Collagenases in cancer. Biochimie 2005, 87, 273-286.

8. ALEXANDER CM, HANSELL EJ, BEHRENDTSEN O, FLANNERY ML, KISHNANI NS, HAWKES SP et coll.

Expression and function of matrix metalloproteinases and their inhibitors at the maternal-embryonic boundary during mouse embryo implantation. Development 1996, 122, 1723-1736.

- 9. **AMIT S, HATZUBAI A, BIRMAN Y, ANDERSEN JS, BEN SHUSHAN E, MANN M et coll.** Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. Genes Dev. 2002, 16, 1066-1076.
- ANASTASIADIS PZ, MOON SY, THORESON MA, MARINER DJ, CRAWFORD HC, ZHENG Y et coll. Inhibition of RhoA by p120 catenin.

Nat.Cell Biol. 2000, 2, 637-644.

- ANASTASIADIS PZ et REYNOLDS AB. The p120 catenin family: complex roles in adhesion, signaling and cancer. J.Cell Sci. 2000, 113 (Pt 8), 1319-1334.
- 12. **ANASTASIADIS PZ et REYNOLDS AB**. Regulation of Rho GTPases by p120-catenin. Curr.Opin.Cell Biol 2001, 13, 604-610.

13. ANDL CD et RUSTGI AK.

No one-way street: cross-talk between e-cadherin and receptor tyrosine kinase (RTK) signaling: a mechanism to regulate RTK activity. Cancer Biol Ther. 2005, 4, 28-31.

- 14. **ANILKUMAR N, UEKITA T, COUCHMAN JR, NAGASE H, SEIKI M et ITOH Y**. Palmitoylation at Cys574 is essential for MT1-MMP to promote cell migration. FASEB J. 2005, 19, 1326-1328.
- 15. ANZAI H, KITADAI Y, BUCANA CD, SANCHEZ R, OMOTO R et FIDLER IJ. Intratumoral heterogeneity and inverse correlation between expression of E-cadherin and collagenase type IV in human gastric carcinomas. Differentiation 1996, 60, 119-127.
- 16. **ARA T, DEYAMA Y, YOSHIMURA Y, HIGASHINO F, SHINDOH M, MATSUMOTO A et coll.** Membrane type 1-matrix metalloproteinase expression is regulated by E-cadherin through the suppression of mitogen-activated protein kinase cascade. Cancer Lett. 2000, 157, 115-121.
- ARMSTRONG PB et QUIGLEY JP. Alpha2-macroglobulin: an evolutionarily conserved arm of the innate immune system. Dev.Comp Immunol. 1999, 23, 375-390.
- ARRIZABALAGA G et LEHMANN R. A selective screen reveals discrete functional domains in Drosophila Nanos. Genetics 1999, 153, 1825-1838.
- ASAOKA-TAGUCHI M, YAMADA M, NAKAMURA A, HANYU K et KOBAYASHI S. Maternal Pumilio acts together with Nanos in germline development in Drosophila embryos. Nat.Cell Biol. 1999, 1, 431-437.
- 20. ASGEIRSSON KS, OLAFSDOTTIR K, JONASSON JG et OGMUNDSDOTTIR HM. The effects of IL-6 on cell adhesion and e-cadherin expression in breast cancer. Cytokine 1998, 10, 720-728.

21. AUERKARI EI.

Methylation of tumor suppressor genes p16(INK4a), p27(Kip1) and E-cadherin in carcinogenesis. Oral Oncol. 2006, 42, 5-13.

- BACKSTROM JR, LIM GP, CULLEN MJ et TOKES ZA. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) is synthesized in neurons of the human hippocampus and is capable of degrading the amyloid-beta peptide (1-40). J.Neurosci. 1996, 16, 7910-7919.
- BACKSTROM JR et TOKES ZA. The 84-kDa form of human matrix metalloproteinase-9 degrades substance P and gelatin. J.Neurochem. 1995, 64, 1312-1318.
- 24. **BAILEY T, BIDDLESTONE L, SHEPHERD N, BARR H, WARNER P et JANKOWSKI J**. Altered cadherin and catenin complexes in the Barrett's esophagus-dysplasia-adenocarcinoma sequence: correlation with disease progression and dedifferentiation. Am.J.Pathol. 1998, 152, 135-144.
- 25. **BAKER AH, EDWARDS DR et MURPHY G**. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. J.Cell Sci. 2002, 115, 3719-3727.

26. BAKER AH, GEORGE SJ, ZALTSMAN AB, MURPHY G et NEWBY AC.

Inhibition of invasion and induction of apoptotic cell death of cancer cell lines by overexpression of TIMP-3.

Br.J.Cancer 1999, 79, 1347-1355.

27. BAKI L, MARAMBAUD P, EFTHIMIOPOULOS S, GEORGAKOPOULOS A, WEN P, CUI W et coll.

Presenilin-1 binds cytoplasmic epithelial cadherin, inhibits cadherin/p120 association, and regulates stability and function of the cadherin/catenin adhesion complex. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 2001, 98, 2381-2386.

28. **BANKS RE, PORTER WH, WHELAN P, SMITH PH et SELBY PJ**. Soluble forms of the adhesion molecule E-cadherin in urine. J.Clin.Pathol. 1995, 48, 179-180.

29. BANYAI L et PATTHY L.

The NTR module: domains of netrins, secreted frizzled related proteins, and type I procollagen C-proteinase enhancer protein are homologous with tissue inhibitors of metalloproteases. Protein Sci. 1999, 8, 1636-1642.

- BARMINA OY, WALLING HW, FIACCO GJ, FREIJE JM, LOPEZ-OTIN C, JEFFREY JJ et coll. Collagenase-3 binds to a specific receptor and requires the low density lipoprotein receptor-related protein for internalization. J.Biol.Chem. 1999, 274, 30087-30093.
- 31. BARTOLOME RA, MOLINA-ORTIZ I, SAMANIEGO R, SANCHEZ-MATEOS P, BUSTELO XR et TEIXIDO J.

Activation of Vav/Rho GTPase Signaling by CXCL12 Controls Membrane-Type Matrix Metalloproteinase-Dependent Melanoma Cell Invasion. Cancer Res. 2006, 66, 248-258.

- 32. **BASSET P, BELLOCQ JP, WOLF C, STOLL I, HUTIN P, LIMACHER JM et coll.** A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. Nature 1990, 348, 699-704.
- BASSET P, OKADA A, CHENARD MP, KANNAN R, STOLL I, ANGLARD P et coll. Matrix metalloproteinases as stromal effectors of human carcinoma progression: therapeutic implications. Matrix Biol 1997, 15, 535-541.
- 34. **BATLLE E, SANCHO E, FRANCI C, DOMINGUEZ D, MONFAR M, BAULIDA J et coll.** The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. Nat.Cell Biol. 2000, 2, 84-89.

35. BEAVON IR.

The E-cadherin-catenin complex in tumour metastasis: structure, function and regulation. Eur.J Cancer 2000, 36, 1607-1620.

36. BEHRENS J.

Cadherins and catenins: role in signal transduction and tumor progression. Cancer Metastasis Rev. 1999, 18, 15-30.

37. BEHRENS J.

The role of the Wnt signalling pathway in colorectal tumorigenesis. Biochem.Soc.Trans. 2005, 33, 672-675.

- 38. BEHRENS J, VAKAET L, FRIIS R, WINTERHAGER E, VAN ROY F, MAREEL MM et coll. Loss of epithelial differentiation and gain of invasiveness correlates with tyrosine phosphorylation of the E-cadherin/beta-catenin complex in cells transformed with a temperature-sensitive v-SRC gene. J.Cell Biol. 1993, 120, 757-766.
- BEHRENS J, VON KRIES JP, KUHL M, BRUHN L, WEDLICH D, GROSSCHEDL R et coll. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. Nature 1996, 382, 638-642.

40. BEK S et KEMLER R.

Protein kinase CKII regulates the interaction of beta-catenin with alpha-catenin and its protein stability. J Cell Sci. 2002, 115, 4743-4753.

- BELLOVIN DI, BATES RC, MUZIKANSKY A, RIMM DL et MERCURIO AM. Altered localization of p120 catenin during epithelial to mesenchymal transition of colon carcinoma is prognostic for aggressive disease. Cancer Res. 2005, 65, 10938-10945.
- 42. **BENBOW U et BRINCKERHOFF CE**. The AP-1 site and MMP gene regulation: what is all the fuss about? Matrix Biol. 1997, 15, 519-526.
- 43. **BERGERS G, BREKKEN R, MCMAHON G, VU TH, ITOH T, TAMAKI K et coll.** Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. Nat.Cell Biol. 2000, 2, 737-744.
- 44. **BERTAUX B, HORNEBECK W, EISEN AZ et DUBERTRET L**. Growth stimulation of human keratinocytes by tissue inhibitor of metalloproteinases. J.Invest Dermatol. 1991, 97, 679-685.
- 45. **BERX G, BECKER KF, HOFLER H et VAN ROY F**. Mutations of the human E-cadherin (CDH1) gene. Hum.Mutat. 1998, 12, 226-237.
- 46. BERX G, CLETON-JANSEN AM, NOLLET F, DE LEEUW WJ, VAN D, V, CORNELISSE C et coll.

E-cadherin is a tumour/invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancers. EMBO J. 1995a, 14, 6107-6115.

47. BERX G, CLETON-JANSEN AM, STRUMANE K, DE LEEUW WJ, NOLLET F, VAN ROY F et coll.

E-cadherin is inactivated in a majority of invasive human lobular breast cancers by truncation mutations throughout its extracellular domain. Oncogene 1996, 13, 1919-1925.

48. BERX G, STAES K, VAN HENGEL J, MOLEMANS F, BUSSEMAKERS MJ, VAN BOKHOVEN A et coll.

Cloning and characterization of the human invasion suppressor gene E-cadherin (CDH1). Genomics 1995b, 26, 281-289.

49. BERX G et VAN ROY F.

The E-cadherin/catenin complex: an important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression. Breast Cancer Res. 2001, 3, 289-293.

50. BETSON M, LOZANO E, ZHANG J et BRAGA VM.

Rac activation upon cell-cell contact formation is dependent on signaling from the epidermal growth factor receptor.

J Biol Chem. 2002, 277, 36962-36969.

51. BHAT KM.

The posterior determinant gene nanos is required for the maintenance of the adult germline stem cells during Drosophila oogenesis. Genetics 1999, 151, 1479-1492.

52. BIAN J et SUN Y.

Transcriptional activation by p53 of the human type IV collagenase (gelatinase A or matrix metalloproteinase 2) promoter. Mol.Cell Biol. 1997, 17, 6330-6338. 53. BIGG HF, MORRISON CJ, BUTLER GS, BOGOYEVITCH MA, WANG Z, SOLOWAY PD et coll.

Tissue inhibitor of metalloproteinases-4 inhibits but does not support the activation of gelatinase A via efficient inhibition of membrane type 1-matrix metalloproteinase. Cancer Res. 2001, 61, 3610-3618.

- BIRCHMEIER C, BIRCHMEIER W, GHERARDI E et VANDE WOUDE GF. Met, metastasis, motility and more. Nat.Rev.Mol.Cell Biol. 2003, 4, 915-925.
- BIRCHMEIER W et BEHRENS J. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. Biochim.Biophys.Acta 1994, 1198, 11-26.
- 56. **BISSELL MJ et RADISKY D**. Putting tumours in context. Nat.Rev.Cancer 2001, 1, 46-54.
- 57. BISSON C, BLACHER S, POLETTE M, BLANC JF, KEBERS F, DESREUX J et coll. Restricted expression of membrane type 1-matrix metalloproteinase by myofibroblasts adjacent to human breast cancer cells. Int.J.Cancer 2003, 105, 7-13.
- BLASCHUK OW et ROWLANDS TM. Plasma membrane components of adherens junctions (Review). Mol.Membr.Biol. 2002, 19, 75-80.
- BLASCHUK OW, SULLIVAN R, DAVID S et POULIOT Y. Identification of a cadherin cell adhesion recognition sequence. Dev.Biol. 1990, 139, 227-229.
- BOIRE A, COVIC L, AGARWAL A, JACQUES S, SHERIFI S et KULIOPULOS A. PAR1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells. Cell 2005, 120, 303-313.
- 61. **BOND M, MURPHY G, BENNETT MR, AMOUR A, KNAUPER V, NEWBY AC et coll.** Localization of the death domain of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 to the N terminus. Metalloproteinase inhibition is associated with proapoptotic activity. J.Biol.Chem. 2000, 275, 41358-41363.
- 62. BOULAY A, MASSON R, CHENARD MP, EL FAHIME M, CASSARD L, BELLOCQ JP et coll. High cancer cell death in syngeneic tumors developed in host mice deficient for the stromelysin-3 matrix metalloproteinase. Cancer Res. 2001, 61, 2189-2193.
- 63. BOURGUIGNON LY, GUNJA-SMITH Z, IIDA N, ZHU HB, YOUNG LJ, MULLER WJ et coll. CD44v(3,8-10) is involved in cytoskeleton-mediated tumor cell migration and matrix metalloproteinase (MMP-9) association in metastatic breast cancer cells. J Cell Physiol 1998, 176, 206-215.
- 64. **BRABLETZ T, JUNG A, DAG S, HLUBEK F et KIRCHNER T**. beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. Am.J.Pathol. 1999, 155, 1033-1038.
- 65. **BRABLETZ T, JUNG A, HERMANN K, GUNTHER K, HOHENBERGER W et KIRCHNER T**. Nuclear overexpression of the oncoprotein beta-catenin in colorectal cancer is localized predominantly at the invasion front. Pathol.Res.Pract. 1998, 194, 701-704.

BRABLETZ T, JUNG A, REU S, PORZNER M, HLUBEK F, KUNZ-SCHUGHART LA et coll. 66. Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment.

Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 2001, 98, 10356-10361.

- 67. BRADY-KALNAY SM, MOURTON T, NIXON JP, PIETZ GE, KINCH M, CHEN H et coll. Dynamic interaction of PTPmu with multiple cadherins in vivo. J.Cell Biol. 1998, 141, 287-296.
- 68. BRAGA VM. Cell-cell adhesion and signalling. Curr.Opin.Cell Biol 2002a, 14, 546-556.
- 69 BRAGA VM. GEF without a Dbl domain? Nat.Cell Biol 2002b, 4, E188-E190.
- 70. BRAGA VM, MACHESKY LM, HALL A et HOTCHIN NA. The small GTPases Rho and Rac are required for the establishment of cadherin-dependent cell-cell contacts. J Cell Biol 1997, 137, 1421-1431.
- BRAND K, BAKER AH, PEREZ-CANTO A, POSSLING A, SACHARJAT M, GEHEEB M et coll. 71. Treatment of colorectal liver metastases by adenoviral transfer of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 into the liver tissue. Cancer Res. 2000, 60, 5723-5730.
- BRANNON M. GOMPERTS M. SUMOY L. MOON RT et KIMELMAN D. 72 A beta-catenin/XTcf-3 complex binds to the siamois promoter to regulate dorsal axis specification in Xenopus. Genes Dev. 1997, 11, 2359-2370.
- BREMBECK FH, ROSARIO M et BIRCHMEIER W. 73. Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin. Curr.Opin.Genet.Dev. 2006, 16, 51-59.
- 74. BRIEHER WM, YAP AS et GUMBINER BM. Lateral dimerization is required for the homophilic binding activity of C-cadherin. J.Cell Biol. 1996, 135, 487-496.
- BROOKS PC, STROMBLAD S, SANDERS LC, VON SCHALSCHA TL, AIMES RT, STETLER-75. STEVENSON WG et coll. Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3.

Cell 1996, 85, 683-693.

- 76. **BROWN PD.** Clinical studies with matrix metalloproteinase inhibitors. APMIS 1999, 107, 174-180.
- BUISSON AC, ZAHM JM, POLETTE M, PIERROT D, BELLON G, PUCHELLE E et coll. 77. Gelatinase B is involved in the in vitro wound repair of human respiratory epithelium. J.Cell Physiol 1996, 166, 413-426.
- 78. BUKHOLM IK, NESLAND JM, KARESEN R, JACOBSEN U et BORRESEN-DALE AL. Expression of E-cadherin and its relation to the p53 protein status in human breast carcinomas. Virchows Arch. 1997, 431, 317-321.
- 79. BUKHOLM IK, NESLAND JM, KARESEN R, JACOBSEN U et BORRESEN-DALE AL.

E-cadherin and alpha-, beta-, and gamma-catenin protein expression in relation to metastasis in human breast carcinoma. J.Pathol. 1998, 185, 262-266.

80. BUTLER GS, BUTLER MJ, ATKINSON SJ, WILL H, TAMURA T, SCHADE VW et coll.

The TIMP2 membrane type 1 metalloproteinase "receptor" regulates the concentration and efficient activation of progelatinase A. A kinetic study. J.Biol.Chem. 1998, 273, 871-880.

81. BUTZ S et KEMLER R.

Distinct cadherin-catenin complexes in Ca(2+)-dependent cell-cell adhesion. FEBS Lett. 1994, 355, 195-200.

82. CANO A, PEREZ-MORENO MA, RODRIGO I, LOCASCIO A, BLANCO MJ, DEL BARRIO MG et coll. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression.

Nat.Cell Biol. 2000, 2, 76-83.

- CARICO E, ATLANTE M, BUCCI B, NOFRONI I et VECCHIONE A. 83. E-cadherin and alpha-catenin expression during tumor progression of cervical carcinoma. Gynecol.Oncol. 2001, 80, 156-161.
- 84. CAVALLO RA, COX RT, MOLINE MM, ROOSE J, POLEVOY GA, CLEVERS H et coll. Drosophila Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. Nature 1998, 395, 604-608.
- 85. CERRATO A, FULCINITI F, AVALLONE A, BENINCASA G, PALOMBINI L et GRIECO M. Beta- and gamma-catenin expression in thyroid carcinomas. J.Pathol. 1998, 185, 267-272.

CHA HJ, OKADA A, KIM KW, SATO H et SEIKI M. 86.

Identification of cis-acting promoter elements that support expression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) in v-src transformed Madin-Darby canine kidney cells. Clin.Exp.Metastasis 2000, 18, 675-681.

87. CHANG C et WERB Z.

The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. Trends Cell Biol. 2001, 11, S37-S43.

CHANTRAIN CF et DECLERCK YA. 88.

Les métalloprotéases matricielles et leurs inhibiteurs synthétiques dans la progression tumorale. Medecine Sciences 2002, 18, 565-575.

89. CHENG S, ALFONSO-JAUME MA, MERTENS PR et LOVETT DH.

Tumour metastasis suppressor, nm23-beta, inhibits gelatinase A transcription by interference with transactivator Y-box protein-1 (YB-1). Biochem.J. 2002, 366, 807-816.

- 90. CHRISTOFORI G et SEMB H. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. Trends Biochem.Sci. 1999, 24, 73-76.
- 91. CLIFFE A, HAMADA F et BIENZ M. A role of Dishevelled in relocating Axin to the plasma membrane during wingless signaling. Curr.Biol. 2003, 13, 960-966.
- 92. COMIJN J, BERX G, VERMASSEN P, VERSCHUEREN K, VAN GRUNSVEN L, BRUYNEEL E et coll.

The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion.

Mol.Cell 2001, 7, 1267-1278.

CONACCI-SORRELL M, SIMCHA I, BEN YEDIDIA T, BLECHMAN J, SAVAGNER P et BEN 93. ZE'EV A.

Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions: the roles of beta-catenin signaling, Slug, and MAPK. J.Cell Biol. 2003, 163, 847-857.

CORCORAN ML et STETLER-STEVENSON WG. 94.

Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 stimulates fibroblast proliferation via a cAMP-dependent mechanism.

J.Biol.Chem. 1995, 270, 13453-13459.

95. CORNELIUS LA, NEHRING LC, HARDING E, BOLANOWSKI M, WELGUS HG, KOBAYASHI DK et coll.

Matrix metalloproteinases generate angiostatin: effects on neovascularization. J.Immunol. 1998, 161, 6845-6852.

COUSSENS LM, RAYMOND WW, BERGERS G, LAIG-WEBSTER M, BEHRENDTSEN O, 96. WERB Z et coll.

Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. Genes Dev. 1999, 13, 1382-1397.

97. COUSSENS LM, TINKLE CL, HANAHAN D et WERB Z.

MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. Cell 2000, 103, 481-490.

98. CRAWFORD HC, FINGLETON BM, RUDOLPH-OWEN LA, GOSS KJ, RUBINFELD B, POLAKIS P et coll.

The metalloproteinase matrilysin is a target of beta-catenin transactivation in intestinal tumors. Oncogene 1999, 18, 2883-2891.

D'SOUZA B et TAYLOR-PAPADIMITRIOU J. 99.

Overexpression of ERBB2 in human mammary epithelial cells signals inhibition of transcription of the Ecadherin gene.

Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 1994, 91, 7202-7206.

100. D'SOUZA-SCHOREY C.

Disassembling adherens junctions: breaking up is hard to do. Trends Cell Biol 2005, 15, 19-26.

101. DALBY B et GLOVER DM.

Discrete sequence elements control posterior pole accumulation and translational repression of maternal cyclin B RNA in Drosophila. EMBO J. 1993, 12, 1219-1227.

102. DANIEL JM et REYNOLDS AB.

The catenin p120(ctn) interacts with Kaiso, a novel BTB/POZ domain zinc finger transcription factor. Mol.Cell Biol. 1999, 19, 3614-3623.

103. DAVIES MA, KOUL D, DHESI H, BERMAN R, MCDONNELL TJ, MCCONKEY D et coll. Regulation of Akt/PKB activity, cellular growth, and apoptosis in prostate carcinoma cells by MMAC/PTEN.

Cancer Res. 1999, 59, 2551-2556.

104. DAVIS MA, IRETON RC et REYNOLDS AB. A core function for p120-catenin in cadherin turnover. J.Cell Biol. 2003, 163, 525-534.

105. DECLERCK YA et LAUG WE.

Cooperation between matrix metalloproteinases and the plasminogen activator-plasmin system in tumor progression.

Enzyme Protein 1996, 49, 72-84.

106. DEFOSSEZ PA, KELLY KF, FILION GJ, PEREZ-TORRADO R, MAGDINIER F, MENONI H et coll.

The human enhancer blocker CTC-binding factor interacts with the transcription factor Kaiso. J.Biol.Chem. 2005, 280, 43017-43023.

107. DELMAS V, PLA P, FERACCI H, THIERY JP, KEMLER R et LARUE L.

Expression of the cytoplasmic domain of E-cadherin induces precocious mammary epithelial alveolar formation and affects cell polarity and cell-matrix integrity. Dev.Biol. 1999, 216, 491-506.

108. DENG SJ, BICKETT DM, MITCHELL JL, LAMBERT MH, BLACKBURN RK, CARTER HL, III et coll.

Substrate specificity of human collagenase 3 assessed using a phage-displayed peptide library. J Biol Chem. 2000, 275, 31422-31427.

109. DERYUGINA EI, BOURDON MA, JUNGWIRTH K, SMITH JW et STRONGIN AY.

Functional activation of integrin alpha V beta 3 in tumor cells expressing membrane-type 1 matrix metalloproteinase. Int.J Cancer 2000, 86, 15-23.

Int.J Cancel 2000, 80, 13-23.

110. DERYUGINA EI, LUO GX, REISFELD RA, BOURDON MA et STRONGIN A.

Tumor cell invasion through matrigel is regulated by activated matrix metalloproteinase-2. Anticancer Res. 1997, 17, 3201-3210.

111. DERYUGINA EI, RATNIKOV B, MONOSOV E, POSTNOVA TI, DISCIPIO R, SMITH JW et coll.

MT1-MMP initiates activation of pro-MMP-2 and integrin alphavbeta3 promotes maturation of MMP-2 in breast carcinoma cells. Exp.Cell Res. 2001, 263, 209-223.

112. DESCHAMPS AM et SPINALE FG. Pathways of matrix metalloproteinase induction in heart failure: bioactive molecules and transcriptional regulation. Cardiovasc.Res. 2006, 69, 666-676.

113. DESHPANDE G, CALHOUN G, JINKS TM, POLYDORIDES AD et SCHEDL P.

Nanos downregulates transcription and modulates CTD phosphorylation in the soma of early Drosophila embryos.

Mech.Dev. 2005, 122, 645-657.

114. DESHPANDE G, CALHOUN G, YANOWITZ JL et SCHEDL PD.

Novel functions of nanos in downregulating mitosis and transcription during the development of the Drosophila germline.

Cell 1999, 99, 271-281.

115. DILLON DA, D'AQUILA T, REYNOLDS AB, FEARON ER et RIMM DL.

The expression of p120ctn protein in breast cancer is independent of alpha- and beta-catenin and Ecadherin.

Am.J.Pathol. 1998, 152, 75-82.

116. DONG Z, KUMAR R, YANG X et FIDLER IJ.

Macrophage-derived metalloelastase is responsible for the generation of angiostatin in Lewis lung carcinoma.

Cell 1997, 88, 801-810.

117. DRIEVER W et NUSSLEIN-VOLHARD C.

The bicoid protein is a positive regulator of hunchback transcription in the early Drosophila embryo. Nature 1989, 337, 138-143.

- 118. DUBNAU J, CHIANG AS, GRADY L, BARDITCH J, GOSSWEILER S, MCNEIL J et coll. The staufen/pumilio pathway is involved in Drosophila long-term memory. Curr.Biol 2003, 13, 286-296.
- 119. DUBOIS B, MASURE S, HURTENBACH U, PAEMEN L, HEREMANS H, VAN DEN OJ et coll. Resistance of young gelatinase B-deficient mice to experimental autoimmune encephalomyelitis and necrotizing tail lesions. J.Clin.Invest 1999, 104, 1507-1515.
- 120. DUMIN JA, DICKESON SK, STRICKER TP, BHATTACHARYYA-PAKRASI M, ROBY JD, SANTORO SA et coll. Pro-collagenase-1 (matrix metalloproteinase-1) binds the alpha(2)beta(1) integrin upon release from

keratinocytes migrating on type I collagen. J.Biol.Chem. 2001, 276, 29368-29374.

121. EDWARDS TA, PYLE SE, WHARTON RP et AGGARWAL AK. Structure of Pumilio reveals similarity between RNA and peptide binding motifs. Cell 2001, 105, 281-289.

122. EGEBLAD M et WERB Z. New functions for the matrix metalloproteiu

New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. Nat.Rev.Cancer 2002, 2, 161-174.

- 123. EHRLICH JS, HANSEN MD et NELSON WJ. Spatio-temporal regulation of Rac1 localization and lamellipodia dynamics during epithelial cell-cell adhesion. Dev.Cell 2002, 3, 259-270.
- 124. **EL BAHRAWY MA, POULSOM R, JEFFERY R, TALBOT I et ALISON MR**. The expression of E-cadherin and catenins in sporadic colorectal carcinoma. Hum.Pathol. 2001, 32, 1216-1224.
- 125. ENGLISH WR, PUENTE XS, FREIJE JM, KNAUPER V, AMOUR A, MERRYWEATHER A et coll.

Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MMP17) has tumor necrosis factor-alpha convertase activity but does not activate pro-MMP2. J.Biol.Chem. 2000, 275, 14046-14055.

- 126. ETZELL JE, DEVRIES S, CHEW K, FLORENDO C, MOLINARO A, LJUNG BM et coll. Loss of chromosome 16q in lobular carcinoma in situ. Hum.Pathol. 2001, 32, 292-296.
- 127. **FANG J, SHING Y, WIEDERSCHAIN D, YAN L, BUTTERFIELD C, JACKSON G et coll.** Matrix metalloproteinase-2 is required for the switch to the angiogenic phenotype in a tumor model. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 2000, 97, 3884-3889.
- 128. **FERRERAS M, FELBOR U, LENHARD T, OLSEN BR et DELAISSE J**. Generation and degradation of human endostatin proteins by various proteinases. FEBS Lett. 2000, 486, 247-251.

FORBES A et LEHMANN R. Nanos and Pumilio have critical roles in the development and function of Drosophila germline stem cells. Development 1998, 125, 679-690.

 FREIJE JM, DIEZ-ITZA I, BALBIN M, SANCHEZ LM, BLASCO R, TOLIVIA J et coll. Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. J Biol Chem. 1994, 269, 16766-16773.

- 131. FRIDMAN R, TOTH M, PENA D et MOBASHERY S. Activation of progelatinase B (MMP-9) by gelatinase A (MMP-2). Cancer Res. 1995, 55, 2548-2555.
- 132. FRIXEN UH, BEHRENS J, SACHS M, EBERLE G, VOSS B, WARDA A et coll. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. J.Cell Biol. 1991, 113, 173-185.
- 133. FUCHS M, MULLER T, LERCH MM et ULLRICH A. Association of human protein-tyrosine phosphatase kappa with members of the armadillo family. J.Biol.Chem. 1996, 271, 16712-16719.
- 134. **FUJITA Y, KRAUSE G, SCHEFFNER M, ZECHNER D, LEDDY HE, BEHRENS J et coll.** Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. Nat.Cell Biol. 2002, 4, 222-231.
- 135. FUKATA M, NAKAGAWA M, ITOH N, KAWAJIRI A, YAMAGA M, KURODA S et coll. Involvement of IQGAP1, an effector of Rac1 and Cdc42 GTPases, in cell-cell dissociation during cell scattering. Mol.Cell Biol. 2001, 21, 2165-2183.
- 136. GALVEZ BG, MATIAS-ROMAN S, ALBAR JP, SANCHEZ-MADRID F et ARROYO AG. Membrane type 1-matrix metalloproteinase is activated during migration of human endothelial cells and modulates endothelial motility and matrix remodeling. J Biol Chem. 2001, 276, 37491-37500.
- 137. GAMALLO C, MORENO-BUENO G, SARRIO D, CALERO F, HARDISSON D et PALACIOS J. The prognostic significance of P-cadherin in infiltrating ductal breast carcinoma. Mod.Pathol. 2001, 14, 650-654.
- 138. GARCIA DEL MURO X, TORREGROSA A, MUNOZ J, CASTELLSAGUE X, CONDOM E, VIGUES F et coll.

Prognostic value of the expression of E-cadherin and beta-catenin in bladder cancer. Eur.J.Cancer 2000, 36, 357-362.

139. GASSON JC, GOLDE DW, KAUFMAN SE, WESTBROOK CA, HEWICK RM, KAUFMAN RJ et coll.

Molecular characterization and expression of the gene encoding human erythroid-potentiating activity. Nature 1985, 315, 768-771.

140. GAVIS ER et LEHMANN R.

Localization of nanos RNA controls embryonic polarity. Cell 1992, 71, 301-313.

- 141. GAYTHER SA, GORRINGE KL, RAMUS SJ, HUNTSMAN D, ROVIELLO F, GREHAN N et coll. Identification of germ-line E-cadherin mutations in gastric cancer families of European origin. Cancer Res. 1998, 58, 4086-4089.
- 142. GEARING AJ, BECKETT P, CHRISTODOULOU M, CHURCHILL M, CLEMENTS JM, CRIMMIN M et coll.

Matrix metalloproteinases and processing of pro-TNF-alpha. J.Leukoc.Biol. 1995, 57, 774-777.

143. GIANNELLI G, FALK-MARZILLIER J, SCHIRALDI O, STETLER-STEVENSON WG et QUARANTA V.

Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5. Science 1997, 277, 225-228.

144. GILES RH, VAN ES JH et CLEVERS H.

Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. Biochim.Biophys.Acta 2003, 1653, 1-24.

145. GILLES C, NEWGREEN D, SATO H et THOMPSON EW.

Matrix Metalloproteinases and Epithelia-to-mesenchymal transition:implications for carcinoma metastasis.

In: Rise and Fall of Epithelial Phenotype.P.Savagner, editor.Eurekah.com and Kluwer Academic/Plenum Publishers. 2004, chapter 22,

- 146. GILLES C, POLETTE M, CORAUX C, TOURNIER JM, MENEGUZZI G, MUNAUT C et coll. Contribution of MT1-MMP and of human laminin-5 gamma2 chain degradation to mammary epithelial cell migration. J.Cell Sci. 2001, 114, 2967-2976.
- 147. GILLES C, POLETTE M, MESTDAGT M, NAWROCKI-RABY B, RUGGERI P, BIREMBAUT P et coll.

Transactivation of vimentin by beta-catenin in human breast cancer cells. Cancer Res. 2003, 63, 2658-2664.

- 148. **GILLES C, POLETTE M, PIETTE J, MUNAUT C, THOMPSON EW, BIREMBAUT P et coll.** High level of MT-MMP expression is associated with invasiveness of cervical cancer cells. Int.J.Cancer 1996, 65, 209-213.
- 149. GILLES C, POLETTE M, SEIKI M, BIREMBAUT P et 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.
- 150. GOLDBERG GI, MARMER BL, GRANT GA, EISEN AZ, WILHELM S et HE CS. Human 72-kilodalton type IV collagenase forms a complex with a tissue inhibitor of metalloproteases designated TIMP-2. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 1989, 86, 8207-8211.
- 151. GOMEZ DE, ALONSO DF, YOSHIJI H et THORGEIRSSON UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. Eur.J.Cell Biol. 1997, 74, 111-122.
- 152. **GORRIN-RIVAS MJ, ARII S, FURUTANI M, MIZUMOTO M, MORI A, HANAKI K et coll.** Mouse macrophage metalloelastase gene transfer into a murine melanoma suppresses primary tumor growth by halting angiogenesis. Clin.Cancer Res. 2000, 6, 1647-1654.
- 153. GRAFF JR, GABRIELSON E, FUJII H, BAYLIN SB et HERMAN JG. Methylation patterns of the E-cadherin 5' CpG island are unstable and reflect the dynamic, heterogeneous loss of E-cadherin expression during metastatic progression. J.Biol.Chem. 2000, 275, 2727-2732.
- 154. GRAFF JR, HERMAN JG, LAPIDUS RG, CHOPRA H, XU R, JARRARD DF et coll. E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas. Cancer Res. 1995, 55, 5195-5199.
- 155. GREENE J, WANG M, LIU YE, RAYMOND LA, ROSEN C et SHI YE. Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4. J.Biol.Chem. 1996, 271, 30375-30380.
- 156. GRETHER ME, ABRAMS JM, AGAPITE J, WHITE K et STELLER H. The head involution defective gene of Drosophila melanogaster functions in programmed cell death. Genes Dev. 1995, 9, 1694-1708.

157. GRIFFITHS TR, BROTHERICK I, BISHOP RI, WHITE MD, MCKENNA DM, HORNE CH et coll.

Cell adhesion molecules in bladder cancer: soluble serum E-cadherin correlates with predictors of recurrence.

Br.J.Cancer 1996, 74, 579-584.

158. GUEDEZ L, COURTEMANCH L et STETLER-STEVENSON M.

Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 induces differentiation and an antiapoptotic phenotype in germinal center B cells. Blood 1998a, 92, 1342-1349.

159. GUEDEZ L, STETLER-STEVENSON WG, WOLFF L, WANG J, FUKUSHIMA P, MANSOOR A et coll.

In vitro suppression of programmed cell death of B cells by tissue inhibitor of metalloproteinases-1. J.Clin.Invest 1998b, 102, 2002-2010.

160. GUILFORD P, HOPKINS J, HARRAWAY J, MCLEOD M, MCLEOD N, HARAWIRA P et coll. E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. Nature 1998, 392, 402-405.

161. GUMBINER BM.

Carcinogenesis: a balance between beta-catenin and APC. Curr.Biol. 1997, 7, R443-R446.

162. GUMBINER BM.

Regulation of cadherin adhesive activity. J Cell Biol 2000, 148, 399-404.

- 163. HAAS TL, STITELMAN D, DAVIS SJ, APTE SS et MADRI JA. Egr-1 mediates extracellular matrix-driven transcription of membrane type 1 matrix metalloproteinase in endothelium. J.Biol.Chem. 1999, 274, 22679-22685.
- 164. HAEGEL H, LARUE L, OHSUGI M, FEDOROV L, HERRENKNECHT K et KEMLER R. Lack of beta-catenin affects mouse development at gastrulation. Development 1995, 121, 3529-3537.

165. HAHN-DANTONA E, RUIZ JF, BORNSTEIN P et STRICKLAND DK. The low density lipoprotein receptor-related protein modulates levels of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) by mediating its cellular catabolism. J.Biol.Chem. 2001, 276, 15498-15503.

166. HAJRA KM, CHEN DY et FEARON ER. The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer. Cancer Res. 2002, 62, 1613-1618.

167. HAO X, PALAZZO JP, ILYAS M, TOMLINSON I et TALBOT IC. Reduced expression of molecules of the cadherin/catenin complex in the transition from colorectal adenoma to carcinoma. Anticancer Res. 1997, 17, 2241-2247.

168. HARAGUCHI S, TSUDA M, KITAJIMA S, SASAOKA Y, NOMURA-KITABAYASHID A, KUROKAWA K et coll. nanos1: a mouse nanos gene expressed in the central nervous system is dispensable for normal development. Mech.Dev. 2003, 120, 721-731.

169. HART MJ, DE LOS SR, ALBERT IN, RUBINFELD B et POLAKIS P.

Downregulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-catenin and GSK3 beta.

Curr.Biol. 1998, 8, 573-581.

170. HASTY KA, POURMOTABBED TF, GOLDBERG GI, THOMPSON JP, SPINELLA DG, STEVENS RM et coll.

Human neutrophil collagenase. A distinct gene product with homology to other matrix metalloproteinases. J Biol Chem. 1990, 265, 11421-11424.

171. HATZFELD M. The p120 family of cell adhesion molecules. Eur.J.Cell Biol. 2005, 84, 205-214.

172. HAYAKAWA T.

Tissue inhibitors of metalloproteinases and their cell growth-promoting activity. Cell Struct.Funct. 1994, 19, 109-114.

- 173. HAYAKAWA T, YAMASHITA K, OHUCHI E et SHINAGAWA A. Cell growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2). J.Cell Sci. 1994, 107 (Pt 9), 2373-2379.
- 174. HAYAKAWA T, YAMASHITA K, TANZAWA K, UCHIJIMA E et IWATA K. Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells. A possible new growth factor in serum. FEBS Lett. 1992, 298, 29-32.
- 175. HAYASHI Y, HAYASHI M et KOBAYASHI S. Nanos suppresses somatic cell fate in Drosophila germ line. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 2004, 101, 10338-10342.
- 176. HE TC, SPARKS AB, RAGO C, HERMEKING H, ZAWEL L, DA COSTA LT et coll. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. Science 1998, 281, 1509-1512.
- 177. **HECHT A, VLEMINCKX K, STEMMLER MP, VAN ROY F et KEMLER R**. The p300/CBP acetyltransferases function as transcriptional coactivators of beta-catenin in vertebrates. EMBO J. 2000, 19, 1839-1850.
- 178. HELLBERG CB, BURDEN-GULLEY SM, PIETZ GE et BRADY-KALNAY SM. Expression of the receptor protein-tyrosine phosphatase, PTPmu, restores E-cadherin-dependent adhesion in human prostate carcinoma cells. J.Biol.Chem. 2002, 277, 11165-11173.
- 179. **HENRIET P, BLAVIER L et DECLERCK YA**. Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) in invasion and proliferation. APMIS 1999, 107, 111-119.

180. HEPPNER KJ, MATRISIAN LM, JENSEN RA et RODGERS WH. Expression of most matrix metalloproteinase family members in breast cancer represents a tumor-induced host response. Am.J.Pathol. 1996, 149, 273-282.

- 181. HERMAN MP, SUKHOVA GK, KISIEL W, FOSTER D, KEHRY MR, LIBBY P et coll. Tissue factor pathway inhibitor-2 is a novel inhibitor of matrix metalloproteinases with implications for atherosclerosis. J.Clin.Invest 2001, 107, 1117-1126.
- HIDALGO M et ECKHARDT SG. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. J.Natl.Cancer Inst. 2001, 93, 178-193.

183. HINCK L, NATHKE IS, PAPKOFF J et NELSON WJ.

Dynamics of cadherin/catenin complex formation: novel protein interactions and pathways of complex assembly.

J.Cell Biol. 1994, 125, 1327-1340.

184. HIRAOKA N, ALLEN E, APEL IJ, GYETKO MR et WEISS SJ.

Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins. Cell 1998, 95, 365-377.

185. HIROHASHI S.

Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. Am.J.Pathol. 1998, 153, 333-339.

186. HLUBEK F, JUNG A, KOTZOR N, KIRCHNER T et BRABLETZ T.

Expression of the invasion factor laminin gamma2 in colorectal carcinomas is regulated by beta-catenin. Cancer Res. 2001, 61, 8089-8093.

187. HLUBEK F, SPADERNA S, JUNG A, KIRCHNER T et BRABLETZ T. Beta-catenin activates a coordinated expression of the proinvasive factors laminin-5 gamma2 chain and MT1-MMP in colorectal carcinomas. Int.J.Cancer 2004, 108, 321-326.

188. HORDIJK PL, TEN KLOOSTER JP, VAN DER KAMMEN RA, MICHIELS F, OOMEN LC et COLLARD JG.

Inhibition of invasion of epithelial cells by Tiam1-Rac signaling. Science 1997, 278, 1464-1466.

189. HOTARY KB, ALLEN ED, BROOKS PC, DATTA NS, LONG MW et WEISS SJ. Membrane type I matrix metalloproteinase usurps tumor growth control imposed by the three-dimensional extracellular matrix. Cell 2003, 114, 33-45.

190. HOU P, TROEN T, OVEJERO MC, KIRKEGAARD T, ANDERSEN TL, BYRJALSEN I et coll. Matrix metalloproteinase-12 (MMP-12) in osteoclasts: new lesson on the involvement of MMPs in bone resorption. Bone 2004, 34, 37-47.

191. HUBER AH et WEIS WI.

The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin. Cell 2001, 105, 391-402.

192. HUBER MA, KRAUT N et BEUG H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. Curr.Opin.Cell Biol. 2005, 17, 548-558.

193. HUBER O, KEMLER R et LANGOSCH D. Mutations affecting transmembrane segment interactions impair adhesiveness of E-cadherin. J.Cell Sci. 1999, 112 (Pt 23), 4415-4423.

- 194. HUBER O, KORN R, MCLAUGHLIN J, OHSUGI M, HERRMANN BG et KEMLER R. Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1. Mech.Dev. 1996, 59, 3-10.
- 195. HUIPING C, SIGURGEIRSDOTTIR JR, JONASSON JG, EIRIKSDOTTIR G, JOHANNSDOTTIR JT, EGILSSON V et coll. Chromosome alterations and E-cadherin gene mutations in human lobular breast cancer. Br.J.Cancer 1999, 81, 1103-1110.

196. HULSKAMP M, PFEIFLE C et TAUTZ D.

A morphogenetic gradient of hunchback protein organizes the expression of the gap genes Kruppel and knirps in the early Drosophila embryo. Nature 1990, 346, 577-580.

197. HULSKAMP M, SCHRODER C, PFEIFLE C, JACKLE H et TAUTZ D.

Posterior segmentation of the Drosophila embryo in the absence of a maternal posterior organizer gene. Nature 1989, 338, 629-632.

198. HULSKAMP M et TAUTZ D. Gap genes and gradients--the logic behind the gaps. Bioessays 1991, 13, 261-268.

199. IINO R. KOYAMA I et KUSUMI A.

Single molecule imaging of green fluorescent proteins in living cells: E-cadherin forms oligomers on the free cell surface.

Biophys.J. 2001, 80, 2667-2677.

200. IMAMURA Y, ITOH M, MAENO Y, TSUKITA S et NAGAFUCHI A.

Functional domains of alpha-catenin required for the strong state of cadherin-based cell adhesion. J.Cell Biol. 1999, 144, 1311-1322.

201. INO Y, GOTOH M, SAKAMOTO M, TSUKAGOSHI K et HIROHASHI S.

Dysadherin, a cancer-associated cell membrane glycoprotein, down-regulates E-cadherin and promotes metastasis.

Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 2002, 99, 365-370.

202. IP YC, CHEUNG ST, LEUNG KL et FAN ST. Mechanism of metastasis by membrane type 1-matrix metalloproteinase in hepatocellular carcinoma. World J Gastroenterol. 2005, 11, 6269-6276.

203. IRISH V, LEHMANN R et AKAM M.

The Drosophila posterior-group gene nanos functions by repressing hunchback activity. Nature 1989, 338, 646-648.

- 204. ITO A, MUKAIYAMA A, ITOH Y, NAGASE H, THOGERSEN IB, ENGHILD JJ et coll. Degradation of interleukin 1beta by matrix metalloproteinases. J.Biol.Chem. 1996, 271, 14657-14660.
- 205. ITOH T, TANIOKA M, YOSHIDA H, YOSHIOKA T, NISHIMOTO H et ITOHARA S. Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. Cancer Res. 1998, 58, 1048-1051.

206. ITOH Y et SEIKI M. MT1-MMP: a potent modifier of pericellular microenvironment. J.Cell Physiol 2006, 206, 1-8.

- 207. IZUMI G, SAKISAKA T, BABA T, TANAKA S, MORIMOTO K et TAKAI Y. Endocytosis of E-cadherin regulated by Rac and Cdc42 small G proteins through IQGAP1 and actin filaments. J.Cell Biol. 2004, 166, 237-248.
- 208. JARUZELSKA J, KOTECKI M, KUSZ K, SPIK A, FIRPO M et REIJO PERA RA. Conservation of a Pumilio-Nanos complex from Drosophila germ plasm to human germ cells. Dev.Genes Evol. 2003, 213, 120-126.
- 209. JIANG WG et MANSEL RE. E-cadherin complex and its abnormalities in human breast cancer. Surg.Oncol. 2000, 9, 151-171.

210. JIANG Y, WANG M, CELIKER MY, LIU YE, SANG QX, GOLDBERG ID et coll.

Stimulation of mammary tumorigenesis by systemic tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 4 gene delivery.

Cancer Res. 2001, 61, 2365-2370.

211. JOU TS, STEWART DB, STAPPERT J, NELSON WJ et MARRS JA.

Genetic and biochemical dissection of protein linkages in the cadherin-catenin complex. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 1995, 92, 5067-5071.

212. KAJITA M, ITOH Y, CHIBA T, MORI H, OKADA A, KINOH H et coll.

Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration. J Cell Biol 2001, 153, 893-904.

213. KALLAKURY BV, SHEEHAN CE et ROSS JS. Co-downregulation of cell adhesion proteins alpha- and beta-catenins, p120CTN, E-cadherin, and CD44 in prostatic adenocarcinomas. Hum.Pathol. 2001a, 32, 849-855.

214. KALLAKURY BV, SHEEHAN CE, WINN-DEEN E, OLIVER J, FISHER HA, KAUFMAN RP, JR. et coll.

Decreased expression of catenins (alpha and beta), p120 CTN, and E-cadherin cell adhesion proteins and E-cadherin gene promoter methylation in prostatic adenocarcinomas. Cancer 2001b, 92, 2786-2795.

215. KANG Y et MASSAGUE J.

Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. Cell 2004, 118, 277-279.

- 216. KATAYAMA M, HIRAI S, KAMIHAGI K, NAKAGAWA K, YASUMOTO M et KATO I. Soluble E-cadherin fragments increased in circulation of cancer patients. Br.J.Cancer 1994, 69, 580-585.
- 217. KERKELA E, ALA-AHO R, LOHI J, GRENMAN R, KAHARI V et SAARIALHO-KERE U. Differential patterns of stromelysin-2 (MMP-10) and MT1-MMP (MMP-14) expression in epithelial skin cancers. Br.J Cancer 2001a, 84, 659-669.

218. KERKELA E, BOHLING T, HERVA R, URIA JA et SAARIALHO-KERE U.

Human macrophage metalloelastase (MMP-12) expression is induced in chondrocytes during fetal development and malignant transformation. Bone 2001b, 29, 487-493.

219. **KEVORKIAN L, YOUNG DA, DARRAH C, DONELL ST, SHEPSTONE L, PORTER S et coll.** Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in cartilage. Arthritis Rheum. 2004, 50, 131-141.

220. KIM J, YU W, KOVALSKI K et OSSOWSKI L.

Requirement for specific proteases in cancer cell intravasation as revealed by a novel semiquantitative PCR-based assay.

Cell 1998, 94, 353-362.

221. **KIM K et LEE KY**.

Tyrosine phosphorylation translocates beta-catenin from cell-->cell interface to the cytoplasm, but does not significantly enhance the LEF-1-dependent transactivating function. Cell Biol.Int. 2001, 25, 421-427.

222. KIM YM, JANG JW, LEE OH, YEON J, CHOI EY, KIM KW et coll.

Endostatin inhibits endothelial and tumor cellular invasion by blocking the activation and catalytic activity of matrix metalloproteinase. Cancer Res. 2000, 60, 5410-5413.

223. KINTNER C.

Regulation of embryonic cell adhesion by the cadherin cytoplasmic domain. Cell 1992, 69, 225-236.

224. KIRCHHEIMER JC et REMOLD HG.

Functional characteristics of receptor-bound urokinase on human monocytes: catalytic efficiency and susceptibility to inactivation by plasminogen activator inhibitors. Blood 1989, 74, 1396-1402.

225. KISHIDA S, YAMAMOTO H, IKEDA S, KISHIDA M, SAKAMOTO I, KOYAMA S et coll.

Axin, a negative regulator of the wnt signaling pathway, directly interacts with adenomatous polyposis coli and regulates the stabilization of beta-catenin.

J.Biol.Chem. 1998, 273, 10823-10826.

226. KITADA T, MIYOSHI E, NODA K, HIGASHIYAMA S, IHARA H, MATSUURA N et coll. The addition of bisecting N-acetylglucosamine residues to E-cadherin down-regulates the tyrosine phosphorylation of beta-catenin. J.Biol.Chem. 2001, 276, 475-480.

- 227. KITADAI Y, ELLIS LM, TUCKER SL, GREENE GF, BUCANA CD, CLEARY KR et coll. Multiparametric in situ mRNA hybridization analysis to predict disease recurrence in patients with colon carcinoma. Am.J.Pathol. 1996, 149, 1541-1551.
- 228. KLEINER DE, JR., UNSWORTH EJ, KRUTZSCH HC et STETLER-STEVENSON WG. Higher-order complex formation between the 72-kilodalton type IV collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases-2. Biochemistry 1992, 31, 1665-1672.
- 229. KLEINMAN HK, MCGARVEY ML, HASSELL JR, STAR VL, CANNON FB, LAURIE GW et coll.

Basement membrane complexes with biological activity. Biochemistry 1986, 25, 312-318.

- 230. KNAUPER V, WILL H, LOPEZ-OTIN C, SMITH B, ATKINSON SJ, STANTON H et coll. Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation. Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase a (MMP-2) are able to generate active enzyme. J.Biol.Chem. 1996, 271, 17124-17131.
- 231. KOBAYASHI S, SATO K et HAYASHI Y. The role of mitochondrial rRNAs and nanos protein in germline formation in Drosophila embryos. Zoolog.Sci. 2005, 22, 943-954.
- 232. KOBAYASHI S, YAMADA M, ASAOKA M et KITAMURA T. Essential role of the posterior morphogen nanos for germline development in Drosophila. Nature 1996, 380, 708-711.

233. KONDO K, KOHNO N, YOKOYAMA A et HIWADA K. Decreased MUC1 expression induces E-cadherin-mediated cell adhesion of breast cancer cell lines. Cancer Res. 1998, 58, 2014-2019.

- 234. KONDO M, CUBILLO E, TOBIUME K, SHIRAKIHARA T, FUKUDA N, SUZUKI H et coll. A role for Id in the regulation of TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transdifferentiation. Cell Death.Differ. 2004, 11, 1092-1101.
- 235. KOOLWIJK P, SIDENIUS N, PETERS E, SIER CF, HANEMAAIJER R, BLASI F et coll. Proteolysis of the urokinase-type plasminogen activator receptor by metalloproteinase-12: implication for angiogenesis in fibrin matrices. Blood 2001, 97, 3123-3131.

- 236. KOOP S, KHOKHA R, SCHMIDT EE, MACDONALD IC, MORRIS VL, CHAMBERS AF et coll. Overexpression of metalloproteinase inhibitor in B16F10 cells does not affect extravasation but reduces tumor growth. Cancer Res. 1994, 54, 4791-4797.
- 237. KOPRUNNER M, THISSE C, THISSE B et RAZ E. A zebrafish nanos-related gene is essential for the development of primordial germ cells. Genes Dev. 2001, 15, 2877-2885.
- 238. KORINEK V, BARKER N, MORIN PJ, VAN WICHEN D, DE WEGER R, KINZLER KW et coll. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. Science 1997, 275, 1784-1787.
- 239. KOSHIKAWA N, GIANNELLI G, CIRULLI V, MIYAZAKI K et OUARANTA V. Role of cell surface metalloprotease MT1-MMP in epithelial cell migration over laminin-5. J.Cell Biol. 2000, 148, 615-624.
- 240. KOVACS A et WALKER RA. P-cadherin as a marker in the differential diagnosis of breast lesions. J Clin.Pathol. 2003, 56, 139-141.
- 241. KOWANETZ M, VALCOURT U, BERGSTROM R, HELDIN CH et MOUSTAKAS A. Id2 and Id3 define the potency of cell proliferation and differentiation responses to transforming growth factor beta and bone morphogenetic protein. Mol.Cell Biol. 2004, 24, 4241-4254.
- 242. KRAEMER B, CRITTENDEN S, GALLEGOS M, MOULDER G, BARSTEAD R, KIMBLE J et coll.

NANOS-3 and FBF proteins physically interact to control the sperm-oocyte switch in Caenorhabditis elegans.

Curr.Biol. 1999, 9, 1009-1018.

243. KUFE D, INGHIRAMI G, ABE M, HAYES D, JUSTI-WHEELER H et SCHLOM J.

Differential reactivity of a novel monoclonal antibody (DF3) with human malignant versus benign breast tumors.

Hybridoma 1984, 3, 223-232.

244. LALL S, LUDWIG MZ et PATEL NH. Nanos plays a conserved role in axial patterning outside of the Diptera. Curr.Biol. 2003, 13, 224-229.

245. LAPRISE P, LANGLOIS MJ, BOUCHER MJ, JOBIN C et RIVARD N.

Down-regulation of MEK/ERK signaling by E-cadherin-dependent PI3K/Akt pathway in differentiating intestinal epithelial cells. J Cell Physiol 2004, 199, 32-39.

- 246. LE TL, YAP AS et STOW JL. Recycling of E-cadherin: a potential mechanism for regulating cadherin dynamics. J.Cell Biol. 1999, 146, 219-232.
- 247. LEVESQUE G, YU G, NISHIMURA M, ZHANG DM, LEVESQUE L, YU H et coll. Presenilins interact with armadillo proteins including neural-specific plakophilin-related protein and betacatenin. J.Neurochem. 1999, 72, 999-1008.
- 248. LI G, SCHAIDER H, SATYAMOORTHY K, HANAKAWA Y, HASHIMOTO K et HERLYN M. Downregulation of E-cadherin and Desmoglein 1 by autocrine hepatocyte growth factor during melanoma development. Oncogene 2001, 20, 8125-8135.

249. LI H, NISHIO K, YAMASHITA K, HAYAKAWA T et HOSHINO T. Cell cycle-dependent localization of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 immunoreactivity in cultured

human gingival fibroblasts. Nagoya J.Med.Sci. 1995, 58, 133-142.

250. LICKERT H, BAUER A, KEMLER R et STAPPERT J.

Casein kinase II phosphorylation of E-cadherin increases E-cadherin/beta-catenin interaction and strengthens cell-cell adhesion. J.Biol.Chem. 2000, 275, 5090-5095.

LILIEN J, BALSAMO J, ARREGUI C et XU G. Turn-off, drop-out: functional state switching of cadherins. Dev.Dyn. 2002, 224, 18-29.

252. LIM GP, RUSSELL MJ, CULLEN MJ et TOKES ZA. Matrix metalloproteinases in dog brains exhibiting Alzheimer-like characteristics. J.Neurochem. 1997, 68, 1606-1611.

253. LIOTTA LA, ABE S, ROBEY PG et MARTIN GR.

Preferential digestion of basement membrane collagen by an enzyme derived from a metastatic murine tumor.

Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 1979, 76, 2268-2272.

254. LITVINOV SV, BALZAR M, WINTER MJ, BAKKER HA, BRIAIRE-DE BRUIJN IH, PRINS F et coll.

Epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) modulates cell-cell interactions mediated by classic cadherins.

J.Cell Biol. 1997, 139, 1337-1348.

255. LIU Z, SHIPLEY JM, VU TH, ZHOU X, DIAZ LA, WERB Z et coll.

Gelatinase B-deficient mice are resistant to experimental bullous pemphigoid. J.Exp.Med. 1998, 188, 475-482.

256. LOCHTER A, GALOSY S, MUSCHLER J, FREEDMAN N, WERB Z et BISSELL MJ.

Matrix metalloproteinase stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that leads to stable epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells. J.Cell Biol. 1997, 139, 1861-1872.

257. LOGAN CY et NUSSE R.

The Wnt signaling pathway in development and disease. Annu.Rev.Cell Dev.Biol. 2004, 20, 781-810.

258. LOHI J et KESKI-OJA J.

Calcium ionophores decrease pericellular gelatinolytic activity via inhibition of 92-kDa gelatinase expression and decrease of 72-kDa gelatinase activation. J.Biol.Chem. 1995, 270, 17602-17609.

259. LOHI J, LEHTI K, VALTANEN H, PARKS WC et KESKI-OJA J.

Structural analysis and promoter characterization of the human membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) gene. Gene 2000, 242, 75-86.

260. LOHI J, LEHTI K, WESTERMARCK J, KAHARI VM et KESKI-OJA J.

Regulation of membrane-type matrix metalloproteinase-1 expression by growth factors and phorbol 12myristate 13-acetate. Eur.J.Biochem. 1996, 239, 239-247.

261. LOMBARD MA, WALLACE TL, KUBICEK MF, PETZOLD GL, MITCHELL MA, HENDGES SK et coll.

Synthetic matrix metalloproteinase inhibitors and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2, but not TIMP-1, inhibit shedding of tumor necrosis factor-alpha receptors in a human colon adenocarcinoma (Colo 205) cell line.

Cancer Res. 1998, 58, 4001-4007.

- LUO D, MARI B, STOLL I et ANGLARD P.
 Alternative splicing and promoter usage generates an intracellular stromelysin 3 isoform directly translated as an active matrix metalloproteinase.
 J Biol Chem. 2002, 277, 25527-25536.
- LUO J, LUBAROFF DM et HENDRIX MJ. Suppression of prostate cancer invasive potential and matrix metalloproteinase activity by E-cadherin transfection. Cancer Res. 1999, 59, 3552-3556.
- 264. MAESHIMA Y, COLORADO PC, TORRE A, HOLTHAUS KA, GRUNKEMEYER JA, ERICKSEN MB et coll.

Distinct antitumor properties of a type IV collagen domain derived from basement membrane. J.Biol.Chem. 2000, 275, 21340-21348.

265. MAKAGIANSAR IT, AVERY M, HU Y, AUDUS KL et SIAHAAN TJ. Improving the selectivity of HAV-peptides in modulating E-cadherin-E-cadherin interactions in the intercellular junction of MDCK cell monolayers. Pharm.Res. 2001, 18, 446-453.

266. MALLIRI A et COLLARD JG.

Role of Rho-family proteins in cell adhesion and cancer. Curr.Opin.Cell Biol 2003, 15, 583-589.

267. MANDAI K, NAKANISHI H, SATOH A, OBAISHI H, WADA M, NISHIOKA H et coll.

Afadin: A novel actin filament-binding protein with one PDZ domain localized at cadherin-based cell-tocell adherens junction. J.Cell Biol. 1997, 139, 517-528.

- 268. MANDAI K, NAKANISHI H, SATOH A, TAKAHASHI K, SATOH K, NISHIOKA H et coll. Ponsin/SH3P12: an l-afadin- and vinculin-binding protein localized at cell-cell and cell-matrix adherens junctions. J.Cell Biol. 1999, 144, 1001-1017.
- 269. MANN B, GELOS M, SIEDOW A, HANSKI ML, GRATCHEV A, ILYAS M et coll.

Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas.

Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 1999, 96, 1603-1608.

270. MANSOURI A, SPURR N, GOODFELLOW PN et KEMLER R.

Characterization and chromosomal localization of the gene encoding the human cell adhesion molecule uvomorulin.

Differentiation 1988, 38, 67-71.

271. MARCHENKO GN, MARCHENKO ND, LENG J et STRONGIN AY.

Promoter characterization of the novel human matrix metalloproteinase-26 gene: regulation by the T-cell factor-4 implies specific expression of the gene in cancer cells of epithelial origin. Biochem.J. 2002, 363, 253-262.

272. MARCHENKO GN, MARCHENKO ND et STRONGIN AY.

The structure and regulation of the human and mouse matrix metalloproteinase-21 gene and protein. Biochem.J. 2003, 372, 503-515.

273. MARCHENKO ND, MARCHENKO GN, WEINREB RN, LINDSEY JD, KYSHTOOBAYEVA A, CRAWFORD HC et coll.

Beta-catenin regulates the gene of MMP-26, a novel metalloproteinase expressed both in carcinomas and normal epithelial cells. Int.J.Biochem.Cell Biol. 2004, 36, 942-956.

274. **MAREEL M et LEROY A**. Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion. Physiol Rev. 2003, 83, 337-376.

275. MARINER DJ, WANG J et REYNOLDS AB.

ARVCF localizes to the nucleus and adherens junction and is mutually exclusive with p120(ctn) in Ecadherin complexes. J.Cell Sci. 2000, 113 (Pt 8), 1481-1490.

276. MARTIN DC, FOWLKES JL, BABIC B et KHOKHA R.

Insulin-like growth factor II signaling in neoplastic proliferation is blocked by transgenic expression of the metalloproteinase inhibitor TIMP-1. J.Cell Biol. 1999, 146, 881-892.

277. MATHEW R, KHANNA R, KUMAR R, MATHUR M, SHUKLA NK et RALHAN R.

Stromelysin-2 overexpression in human esophageal squamous cell carcinoma: potential clinical implications.

Cancer Detect.Prev. 2002, 26, 222-228.

- 278. MATSUI S, SHIOZAKI H, INOUE M, TAMURA S, DOKI Y, KADOWAKI T et coll. Immunohistochemical evaluation of alpha-catenin expression in human gastric cancer. Virchows Arch. 1994, 424, 375-381.
- 279. MATSUYOSHI N, HAMAGUCHI M, TANIGUCHI S, NAGAFUCHI A, TSUKITA S et TAKEICHI M.

Cadherin-mediated cell-cell adhesion is perturbed by v-src tyrosine phosphorylation in metastatic fibroblasts.

J.Cell Biol. 1992, 118, 703-714.

280. MAUVIEL A.

Cytokine regulation of metalloproteinase gene expression. J.Cell Biochem. 1993, 53, 288-295.

281. MAYERLE J, FRIESS H, BUCHLER MW, SCHNEKENBURGER J, WEISS FU, ZIMMER KP et coll.

Up-regulation, nuclear import, and tumor growth stimulation of the adhesion protein p120 in pancreatic cancer.

Gastroenterology 2003, 124, 949-960.

282. MBALAVIELE G, DUNSTAN CR, SASAKI A, WILLIAMS PJ, MUNDY GR et YONEDA T.

E-cadherin expression in human breast cancer cells suppresses the development of osteolytic bone metastases in an experimental metastasis model. Cancer Res. 1996, 56, 4063-4070.

283. MCCREA PD, TURCK CW et GUMBINER B. A homolog of the armadillo protein in Drosophila (plakoglobin) associated with E-cadherin. Science 1991, 254, 1359-1361.

284. MCKERROW JH, BHARGAVA V, HANSELL E, HULING S, KUWAHARA T, MATLEY M et coll.

A functional proteomics screen of proteases in colorectal carcinoma. Mol.Med. 2000, 6, 450-460.

285. MCQUIBBAN GA, BUTLER GS, GONG JH, BENDALL L, POWER C, CLARK-LEWIS I et coll. Matrix metalloproteinase activity inactivates the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1. J Biol Chem. 2001, 276, 43503-43508.
286. MCQUIBBAN GA, GONG JH, TAM EM, MCCULLOCH CA, CLARK-LEWIS I et OVERALL CM.

Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3. Science 2000, 289, 1202-1206.

287. MEINERS S, BRINKMANN V, NAUNDORF H et BIRCHMEIER W.

Role of morphogenetic factors in metastasis of mammary carcinoma cells. Oncogene 1998, 16, 9-20.

288. MERTENS PR, STEINMANN K, ALFONSO-JAUME MA, EN-NIA A, SUN Y et LOVETT DH.

Combinatorial interactions of p53, activating protein-2, and YB-1 with a single enhancer element regulate gelatinase A expression in neoplastic cells. J.Biol.Chem. 2002, 277, 24875-24882.

289. MIGNATTI P et RIFKIN DB. Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in angiogenesis. Enzyme Protein 1996, 49, 117-137.

290. MIGNATTI P, ROBBINS E et RIFKIN DB.

Tumor invasion through the human amniotic membrane: requirement for a proteinase cascade. Cell 1986, 47, 487-498.

291. MIYAKI M, TANAKA K, KIKUCHI-YANOSHITA R, MURAOKA M, KONISHI M et TAKEICHI M.

Increased cell-substratum adhesion, and decreased gelatinase secretion and cell growth, induced by Ecadherin transfection of human colon carcinoma cells. Oncogene 1995, 11, 2547-2552.

292. MOCHIZUKI K, SANO H, KOBAYASHI S, NISHIMIYA-FUJISAWA C et FUJISAWA T. Expression and evolutionary conservation of nanos-related genes in Hydra.

Dev.Genes Evol. 2000, 210, 591-602.

293. MOERSIG W, HORN S, HILKER M, MAYER E et OELERT H.

Transfection of E-cadherin cDNA in human lung tumor cells reduces invasive potential of tumors. Thorac.Cardiovasc.Surg. 2002, 50, 45-48.

294. MOESTRUP SK, HOLTET TL, ETZERODT M, THOGERSEN HC, NYKJAER A, ANDREASEN PA et coll.

Alpha 2-macroglobulin-proteinase complexes, plasminogen activator inhibitor type-1-plasminogen activator complexes, and receptor-associated protein bind to a region of the alpha 2-macroglobulin receptor containing a cluster of eight complement-type repeats. J.Biol.Chem. 1993, 268, 13691-13696.

295. MOLENAAR M, VAN DE WM, OOSTERWEGEL M, PETERSON-MADURO J, GODSAVE S, KORINEK V et coll.

XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in Xenopus embryos. Cell 1996, 86, 391-399.

296. **MOMOHARA S, OKAMOTO H, KOMIYA K, IKARI K, TAKEUCHI M, TOMATSU T et coll.** Matrix metalloproteinase 28/epilysin expression in cartilage from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis: comment on the article by Kevorkian et al. Arthritis Rheum. 2004, 50, 4074-4075.

297. MOOK OR, FREDERIKS WM et VAN NOORDEN CJ. The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis.

Biochim.Biophys.Acta 2004, 1705, 69-89.

298. MORI H, TOMARI T, KOSHIKAWA N, KAJITA M, ITOH Y, SATO H et coll.

CD44 directs membrane-type 1 matrix metalloproteinase to lamellipodia by associating with its hemopexin-like domain.

EMBO J 2002, 21, 3949-3959.

- 299. MOSQUERA L, FORRISTALL C, ZHOU Y et KING ML. A mRNA localized to the vegetal cortex of Xenopus oocytes encodes a protein with a nanos-like zinc finger domain. Development 1993, 117, 377-386.
- 300. MURATA Y et WHARTON RP. Binding of pumilio to maternal hunchback mRNA is required for posterior patterning in Drosophila embryos. Cell 1995, 80, 747-756.
- 301. MURAYAMA M, TANAKA S, PALACINO J, MURAYAMA O, HONDA T, SUN X et coll. Direct association of presenilin-1 with beta-catenin. FEBS Lett. 1998, 433, 73-77.
- 302. MURPHY G, SEGAIN JP, O'SHEA M, COCKETT M, IOANNOU C, LEFEBVRE O et coll. The 28-kDa N-terminal domain of mouse stromelysin-3 has the general properties of a weak metalloproteinase. J.Biol.Chem. 1993, 268, 15435-15441.

303. NABESHIMA K, INOUE T, SHIMAO Y, OKADA Y, ITOH Y, SEIKI M et coll.

Front-cell-specific expression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase and gelatinase A during cohort migration of colon carcinoma cells induced by hepatocyte growth factor/scatter factor. Cancer Res. 2000, 60, 3364-3369.

304. NAGAFUCHI A. Molecular architecture of adherens junctions. Curr.Opin.Cell Biol. 2001, 13, 600-603.

305. NAGAR B, OVERDUIN M, IKURA M et RINI JM. Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization. Nature 1996, 380, 360-364.

306. NAGASE H, ENGHILD JJ, SUZUKI K et SALVESEN G. Stepwise activation mechanisms of the precursor of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) by proteinases and (4-aminophenyl)mercuric acetate. Biochemistry 1990, 29, 5783-5789.

307. NAGI C, GUTTMAN M, JAFFER S, QIAO R, KEREN R, TRIANA A et coll. N-cadherin expression in breast cancer: correlation with an aggressive histologic variant--invasive micropapillary carcinoma. Breast Cancer Res.Treat. 2005, 94, 225-235.

308. NAKAHARA H, HOWARD L, THOMPSON EW, SATO H, SEIKI M, YEH Y et coll. Transmembrane/cytoplasmic domain-mediated membrane type 1-matrix metalloprotease docking to invadopodia is required for cell invasion. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 1997, 94, 7959-7964.

- 309. NAKOPOULOU L, GAKIOPOULOU H, KERAMOPOULOS A, GIANNOPOULOU I, ATHANASSIADOU P, MAVROMMATIS J et coll. c-met tyrosine kinase receptor expression is associated with abnormal beta-catenin expression and favourable prognostic factors in invasive breast carcinoma. Histopathology 2000, 36, 313-325.
- 310. NASS SJ, HERMAN JG, GABRIELSON E, IVERSEN PW, PARL FF, DAVIDSON NE et coll. Aberrant methylation of the estrogen receptor and E-cadherin 5' CpG islands increases with malignant progression in human breast cancer. Cancer Res. 2000, 60, 4346-4348.

311. NATT E, MAGENIS RE, ZIMMER J, MANSOURI A et SCHERER G.

Regional assignment of the human loci for uvomorulin (UVO) and chymotrypsinogen B (CTRB) with the help of two overlapping deletions on the long arm of chromosome 16. Cytogenet.Cell Genet. 1989, 50, 145-148.

312. NAWROCKI B, POLETTE M, MARCHAND V, MONTEAU M, GILLERY P, TOURNIER JM et coll.

Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human bronchopulmonary carcinomas: quantificative and morphological analyses. Int.J.Cancer 1997, 72, 556-564.

313. NAWROCKI B, POLETTE M, VAN HENGEL J, TOURNIER JM, VAN ROY F et BIREMBAULT P.

Cytoplasmic redistribution of E-cadherin-catenin adhesion complex is associated with down-regulated tyrosine phosphorylation of E-cadherin in human bronchopulmonary carcinomas. Am.J.Pathol. 1998, 153, 1521-1530.

314. NAWROCKI RB, POLETTE M, GILLES C, CLAVEL C, STRUMANE K, MATOS M et coll.

Quantitative cell dispersion analysis: new test to measure tumor cell aggressiveness. Int.J.Cancer 2001, 93, 644-652.

315. NAWROCKI-RABY B, GILLES C, POLETTE M, BRUYNEEL E, LARONZE JY, BONNET N et coll.

Upregulation of MMPs by soluble E-cadherin in human lung tumor cells. Int.J.Cancer 2003a, 105, 790-795.

316. NAWROCKI-RABY B, GILLES C, POLETTE M, MARTINELLA-CATUSSE C, BONNET N, PUCHELLE E et coll.

E-Cadherin mediates MMP down-regulation in highly invasive bronchial tumor cells. Am.J.Pathol. 2003b, 163, 653-661.

317. NELSON WJ et NUSSE R.

Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. Science 2004, 303, 1483-1487.

- 318. NOE V, FINGLETON B, JACOBS K, CRAWFORD HC, VERMEULEN S, STEELANT W et coll. Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. J.Cell Sci. 2001, 114, 111-118.
- 319. NOE V, WILLEMS J, VANDEKERCKHOVE J, ROY FV, BRUYNEEL E et MAREEL M. Inhibition of adhesion and induction of epithelial cell invasion by HAV-containing E-cadherin-specific peptides. J.Cell Sci. 1999, 112 (Pt 1), 127-135.

320. NOLLET F, BERX G et VAN ROY F. The role of the E-cadherin/catenin adhesion complex in the development and progression of cancer. Mol.Cell Biol Res.Commun. 1999, 2, 77-85.

- 321. NOLLET F, KOOLS P et VAN ROY F. Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. J.Mol.Biol. 2000, 299, 551-572.
- 322. NOREN NK, LIU BP, BURRIDGE K et KREFT B. p120 catenin regulates the actin cytoskeleton via Rho family GTPases. J.Cell Biol. 2000, 150, 567-580.

323. NOREN NK, NIESSEN CM, GUMBINER BM et BURRIDGE K. Cadherin engagement regulates Rho family GTPases. J Biol Chem. 2001, 276, 33305-33308.

324. **O'REILLY MS, BOEHM T, SHING Y, FUKAI N, VASIOS G, LANE WS et coll.** Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth.

Cell 1997, 88, 277-285.

325. O-CHAROENRAT P, RHYS-EVANS PH et ECCLES SA.

Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the head and neck. Arch.Otolaryngol.Head Neck Surg. 2001, 127, 813-820.

326. OHUCHI E, IMAI K, FUJII Y, SATO H, SEIKI M et OKADA Y.

Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules.

J.Biol.Chem. 1997, 272, 2446-2451.

327. **OVERDUIN M, HARVEY TS, BAGBY S, TONG KI, YAU P, TAKEICHI M et coll.** Solution structure of the epithelial cadherin domain responsible for selective cell adhesion. Science 1995, 267, 386-389.

328. OZAWA M, BARIBAULT H et KEMLER R.

The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. EMBO J. 1989, 8, 1711-1717.

329. OZAWA M et KEMLER R.

The membrane-proximal region of the E-cadherin cytoplasmic domain prevents dimerization and negatively regulates adhesion activity. J.Cell Biol. 1998, 142, 1605-1613.

330. PALACIOS J, CATASUS L, MORENO-BUENO G, MATIAS-GUIU X, PRAT J et GAMALLO C. Beta- and gamma-catenin expression in endometrial carcinoma. Relationship with clinicopathological features and microsatellite instability. Virchows Arch. 2001, 438, 464-469.

331. PAPADAVID E, PIGNATELLI M, ZAKYNTHINOS S, KRAUSZ T et CHU AC.

The potential role of abnormal E-cadherin and alpha-, beta- and gamma-catenin immunoreactivity in the determination of the biological behaviour of keratoacanthoma. Br.J.Dermatol. 2001, 145, 582-589.

332. PAPADAVID E, PIGNATELLI M, ZAKYNTHINOS S, KRAUSZ T et CHU AC.

Abnormal immunoreactivity of the E-cadherin/catenin (alpha-, beta-, and gamma-) complex in premalignant and malignant non-melanocytic skin tumours. J.Pathol. 2002, 196, 154-162.

333. **PARK JI, KIM SW, LYONS JP, JI H, NGUYEN TT, CHO K et coll.** Kaiso/p120-catenin and TCF/beta-catenin complexes coordinately regulate canonical Wnt gene targets.

Kaiso/p120-catenin and TCF/beta-catenin complexes coordinately regulate canonical Wnt gene targets. Dev.Cell 2005, 8, 843-854.

334. PASCO S, RAMONT L, VENTEO L, PLUOT M, MAQUART FX et MONBOISSE JC.

In vivo overexpression of tumstatin domains by tumor cells inhibits their invasive properties in a mouse melanoma model.

Exp.Cell Res. 2004, 301, 251-265.

335. PATTERSON ML, ATKINSON SJ, KNAUPER V et MURPHY G. Specific collagenolysis by gelatinase A, MMP-2, is determined by the hemopexin domain and not the fibronectin-like domain. FEBS Lett. 2001, 503, 158-162.

336. PAVLOFF N, STASKUS PW, KISHNANI NS et HAWKES SP.

A new inhibitor of metalloproteinases from chicken: ChIMP-3. A third member of the TIMP family. J.Biol.Chem. 1992, 267, 17321-17326.

337. PECE S et GUTKIND JS.

Signaling from E-cadherins to the MAPK pathway by the recruitment and activation of epidermal growth factor receptors upon cell-cell contact formation. J.Biol.Chem. 2000, 275, 41227-41233.

338. PEI D, KANG T et QI H.

Cysteine array matrix metalloproteinase (CA-MMP)/MMP-23 is a type II transmembrane matrix metalloproteinase regulated by a single cleavage for both secretion and activation. J.Biol.Chem. 2000, 275, 33988-33997.

339. PEI D, MAJMUDAR G et WEISS SJ.

Hydrolytic inactivation of a breast carcinoma cell-derived serpin by human stromelysin-3. J.Biol.Chem. 1994, 269, 25849-25855.

340. PEI D et WEISS SJ.

Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. Nature 1995, 375, 244-247.

341. **PEIFER M**.

Beta-catenin as oncogene: the smoking gun. Science 1997, 275, 1752-1753.

342. PEINADO H, QUINTANILLA M et CANO A.

Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions. J Biol Chem. 2003, 278, 21113-21123.

343. PEREZ-MORENO M, JAMORA C et FUCHS E.

Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions. Cell 2003, 112, 535-548.

344. PEREZ-MORENO MA, LOCASCIO A, RODRIGO I, DHONDT G, PORTILLO F, NIETO MA et coll.

A new role for E12/E47 in the repression of E-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transitions. J.Biol.Chem. 2001, 276, 27424-27431.

345. PERL AK, WILGENBUS P, DAHL U, SEMB H et CHRISTOFORI G. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. Nature 1998, 392, 190-193.

346. PERRY I, TSELEPIS C, HOYLAND J, IQBAL TH, SCOTT D, SANDERS SA et coll. Reduced cadherin/catenin complex expression in celiac disease can be reproduced in vitro by cytokine stimulation. Lab Invest 1999, 79, 1489-1499.

347. PERTZ O, BOZIC D, KOCH AW, FAUSER C, BRANCACCIO A et ENGEL J.

A new crystal structure, Ca2+ dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation.

EMBO J. 1999, 18, 1738-1747.

348. PETITCLERC E, STROMBLAD S, VON SCHALSCHA TL, MITJANS F, PIULATS J, MONTGOMERY AM et coll. Integrin alpha(v)beta3 promotes M21 melanoma growth in human skin by regulating tumor cell survival. Cancer Res. 1999, 59, 2724-2730.

349. PIEDRA J, MIRAVET S, CASTANO J, PALMER HG, HEISTERKAMP N, GARCIA DH et coll. p120 Catenin-associated Fer and Fyn tyrosine kinases regulate beta-catenin Tyr-142 phosphorylation and beta-catenin-alpha-catenin Interaction. Mol.Cell Biol. 2003, 23, 2287-2297.

350. **PILON M et WEISBLAT DA**. A nanos homolog in leech.

Development 1997, 124, 1771-1780.

- 351. POLETTE M et BIREMBAUT P. Membrane-type metalloproteinases in tumor invasion. Int.J.Biochem.Cell Biol. 1998, 30, 1195-1202.
- 352. POLETTE M, GILBERT N, STAS I, NAWROCKI B, NOEL A, REMACLE A et coll.

Gelatinase A expression and localization in human breast cancers. An in situ hybridization study and immunohistochemical detection using confocal microscopy. Virchows Arch. 1994a, 424, 641-645.

353. POLETTE M, GILLES C, DE BENTZMANN S, GRUENERT D, TOURNIER JM et BIREMBAUT P.

Association of fibroblastoid features with the invasive phenotype in human bronchial cancer cell lines. Clin.Exp.Metastasis 1998, 16, 105-112.

- 354. POLETTE M, GILLES C, MARCHAND V, SEIKI M, TOURNIER JM et BIREMBAUT P. Induction of membrane-type matrix metalloproteinase 1 (MT1-MMP) expression in human fibroblasts by breast adenocarcinoma cells. Clin.Exp.Metastasis 1997, 15, 157-163.
- 355. POLETTE M, GILLES C, NAWROCKI-RABY B, LOHI J, HUNZIKER W, FOIDART JM et coll. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase expression is regulated by zonula occludens-1 in human breast cancer cells. Cancer Res. 2005, 65, 7691-7698.
- 356. POLETTE M, NAWROCKI B, PINTIAUX A, MASSENAT C, MAQUOI E, VOLDERS L et coll. Expression of gelatinases A and B and their tissue inhibitors by cells of early and term human placenta and gestational endometrium. Lab Invest 1994b, 71, 838-846.
- 357. POLETTE M, NAWROCKI-RABY B, GILLES C, CLAVEL C et BIREMBAUT P. Tumour invasion and matrix metalloproteinases. Crit Rev.Oncol.Hematol. 2004, 49, 179-186.
- 358. **POWELL WC, FINGLETON B, WILSON CL, BOOTHBY M et MATRISIAN LM**. The metalloproteinase matrilysin proteolytically generates active soluble Fas ligand and potentiates epithelial cell apoptosis. Curr.Biol. 1999, 9, 1441-1447.
- 359. QIAN X, KARPOVA T, SHEPPARD AM, MCNALLY J et LOWY DR. E-cadherin-mediated adhesion inhibits ligand-dependent activation of diverse receptor tyrosine kinases. EMBO J 2004, 23, 1739-1748.
- 360. QIN H, SUN Y et BENVENISTE EN. The transcription factors Sp1, Sp3, and AP-2 are required for constitutive matrix metalloproteinase-2 gene expression in astroglioma cells. J.Biol.Chem. 1999, 274, 29130-29137.
- 361. RASHID MG, SANDA MG, VALLOROSI CJ, RIOS-DORIA J, RUBIN MA et DAY ML. Posttranslational truncation and inactivation of human E-cadherin distinguishes prostate cancer from matched normal prostate. Cancer Res. 2001, 61, 489-492.
- 362. REICHERT M, MULLER T et HUNZIKER W.

The PDZ domains of zonula occludens-1 induce an epithelial to mesenchymal transition of Madin-Darby canine kidney I cells. Evidence for a role of beta-catenin/Tcf/Lef signaling. J Biol Chem. 2000, 275, 9492-9500.

- 363. REICHMANN E, SCHWARZ H, DEINER EM, LEITNER I, EILERS M, BERGER J et coll. Activation of an inducible c-FosER fusion protein causes loss of epithelial polarity and triggers epithelialfibroblastoid cell conversion. Cell 1992, 71, 1103-1116.
- 364. REMACLE JE, KRAFT H, LERCHNER W, WUYTENS G, COLLART C, VERSCHUEREN K et coll.

New mode of DNA binding of multi-zinc finger transcription factors: deltaEF1 family members bind with two hands to two target sites. EMBO J. 1999, 18, 5073-5084.

- 365. **REMY L et TRESPEUCH C**. [Matrilysin-1 and cancer pathology]. Med.Sci.(Paris) 2005, 21, 498-502.
- 366. REYNOLDS AB, DANIEL JM, MO YY, WU J et ZHANG Z. The novel catenin p120cas binds classical cadherins and induces an unusual morphological phenotype in NIH3T3 fibroblasts. Exp.Cell Res. 1996, 225, 328-337.
- 367. REYNOLDS AB et ROCZNIAK-FERGUSON A. Emerging roles for p120-catenin in cell adhesion and cancer. Oncogene 2004, 23, 7947-7956.
- 368. RHEE J, MAHFOOZ NS, ARREGUI C, LILIEN J, BALSAMO J et VANBERKUM MF. Activation of the repulsive receptor Roundabout inhibits N-cadherin-mediated cell adhesion. Nat.Cell Biol. 2002, 4, 798-805.
- 369. RIDLEY AJ. Rho proteins and cancer. Breast Cancer Res.Treat. 2004, 84, 13-19.
- 370. Rio, M. C. Kluwer Academic Edition, Vol. 4, Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, 2002, p 81-107.
- 371. RIO MC.

From a unique cell to metastasis is a long way to go: clues to stromelysin-3 participation. Biochimie 2005, 87, 299-306.

372. **RIOS-DORIA J, DAY KC, KUEFER R, RASHID MG, CHINNAIYAN AM, RUBIN MA et coll.** The role of calpain in the proteolytic cleavage of E-cadherin in prostate and mammary epithelial cells. J.Biol.Chem. 2003, 278, 1372-1379.

373. RITTER LM, GARFIELD SH et THORGEIRSSON UP. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) binds to the cell surface and translocates to the nucleus of human MCF-7 breast carcinoma cells. Biochem.Biophys.Res.Commun. 1999, 257, 494-499.

- 374. **ROCZNIAK-FERGUSON A et REYNOLDS AB**. Regulation of p120-catenin nucleocytoplasmic shuttling activity. J.Cell Sci. 2003, 116, 4201-4212.
- 375. ROSATO R, VELTMAAT JM, GROFFEN J et HEISTERKAMP N. Involvement of the tyrosine kinase fer in cell adhesion. Mol.Cell Biol 1998, 18, 5762-5770.
- 376. **ROURA S, MIRAVET S, PIEDRA J, GARCIA DH et DUNACH M**. Regulation of E-cadherin/Catenin association by tyrosine phosphorylation. J.Biol.Chem. 1999, 274, 36734-36740.

377. RUDEK MA, FIGG WD, DYER V, DAHUT W, TURNER ML, STEINBERG SM et coll.

Phase I clinical trial of oral COL-3, a matrix metalloproteinase inhibitor, in patients with refractory metastatic cancer. J.Clin.Oncol. 2001, 19, 584-592.

- 378. RYU OH, FINCHAM AG, HU CC, ZHANG C, QIAN Q, BARTLETT JD et coll. Characterization of recombinant pig enamelysin activity and cleavage of recombinant pig and mouse amelogenins. J.Dent.Res. 1999, 78, 743-750.
- 379. SAARIALHO-KERE U, KERKELA E, JAHKOLA T, SUOMELA S, KESKI-OJA J et LOHI J. Epilysin (MMP-28) expression is associated with cell proliferation during epithelial repair. J.Invest Dermatol. 2002, 119, 14-21.
- 380. SABEH F, OTA I, HOLMBECK K, BIRKEDAL-HANSEN H, SOLOWAY P, BALBIN M et coll. Tumor cell traffic through the extracellular matrix is controlled by the membrane-anchored collagenase MT1-MMP. J.Cell Biol. 2004, 167, 769-781.
- 381. SADOWSKI T, DIETRICH S, KOSCHINSKY F et SEDLACEK R. Matrix metalloproteinase 19 regulates insulin-like growth factor-mediated proliferation, migration, and adhesion in human keratinocytes through proteolysis of insulin-like growth factor binding protein-3. Mol.Biol.Cell 2003, 14, 4569-4580.
- 382. SAITO T, ODA Y, SAKAMOTO A, TAMIYA S, KINUKAWA N, HAYASHI K et coll. Prognostic value of the preserved expression of the E-cadherin and catenin families of adhesion molecules and of beta-catenin mutations in synovial sarcoma. J.Pathol. 2000, 192, 342-350.
- 383. SATO H, HASEGAWA T, KANAI Y, TSUTSUMI Y, OSAMURA Y, ABE Y et coll. Expression of cadherins and their undercoat proteins (alpha-, beta-, and gamma-catenins and p120) and accumulation of beta-catenin with no gene mutations in synovial sarcoma. Virchows Arch. 2001, 438, 23-30.
- 384. SATO H, TAKINO T, OKADA Y, CAO J, SHINAGAWA A, YAMAMOTO E et coll. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. Nature 1994, 370, 61-65.
- 385. **SATO T, TANIGAMI A, YAMAKAWA K, AKIYAMA F, KASUMI F, SAKAMOTO G et coll.** Allelotype of breast cancer: cumulative allele losses promote tumor progression in primary breast cancer. Cancer Res. 1990, 50, 7184-7189.
- 386. SCHANER CE, DESHPANDE G, SCHEDL PD et KELLY WG. A conserved chromatin architecture marks and maintains the restricted germ cell lineage in worms and flies. Dev.Cell 2003, 5, 747-757.
- 387. SCHMUCKER D, JACKLE H et GAUL U. Genetic analysis of the larval optic nerve projection in Drosophila. Development 1997, 124, 937-948.
- 388. SCHWEERS BA, WALTERS KJ et STERN M. The Drosophila melanogaster translational repressor pumilio regulates neuronal excitability. Genetics 2002, 161, 1177-1185.
- 389. SEDLACEK R, MAUCH S, KOLB B, SCHATZLEIN C, EIBEL H, PETER HH et coll. Matrix metalloproteinase MMP-19 (RASI-1) is expressed on the surface of activated peripheral blood mononuclear cells and is detected as an autoantigen in rheumatoid arthritis. Immunobiology 1998, 198, 408-423.
- 390. SEIKI M.

Membrane-type 1 matrix metalloproteinase: a key enzyme for tumor invasion. Cancer Lett. 2003, 194, 1-11.

- 391. SHAPIRO L, FANNON AM, KWONG PD, THOMPSON A, LEHMANN MS, GRUBEL G et coll. Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. Nature 1995, 374, 327-337.
- 392. SHIBATA T, GOTOH M, OCHIAI A et HIROHASHI S. Association of plakoglobin with APC, a tumor suppressor gene product, and its regulation by tyrosine phosphorylation. Biochem.Biophys.Res.Commun. 1994, 203, 519-522.
- 393. SHIBATA T, KOKUBU A, SEKINE S, KANAI Y et HIROHASHI S. Cytoplasmic p120ctn regulates the invasive phenotypes of E-cadherin-deficient breast cancer. Am.J Pathol. 2004, 164, 2269-2278.
- 394. SHIBATA T, OCHIAI A, KANAI Y, AKIMOTO S, GOTOH M, YASUI N et coll. Dominant negative inhibition of the association between beta-catenin and c-erbB-2 by N-terminally deleted beta-catenin suppresses the invasion and metastasis of cancer cells. Oncogene 1996, 13, 883-889.

395. SHIPITSIN M et FEIG LA.

RalA but not RalB enhances polarized delivery of membrane proteins to the basolateral surface of epithelial cells.

Mol.Cell Biol 2004, 24, 5746-5756.

- 396. SHIPLEY JM, WESSELSCHMIDT RL, KOBAYASHI DK, LEY TJ et SHAPIRO SD. Metalloelastase is required for macrophage-mediated proteolysis and matrix invasion in mice. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 1996, 93, 3942-3946.
- 397. SILYE R, KARAYIANNAKIS AJ, SYRIGOS KN, POOLE S, VAN NOORDEN S, BATCHELOR W et coll. E-cadherin/catenin complex in benign and malignant melanocytic lesions

E-cadherin/catenin complex in benign and malignant melanocytic lesions. J.Pathol. 1998, 186, 350-355.

- 398. SIMPSON KJ, DUGAN AS et MERCURIO AM. Functional analysis of the contribution of RhoA and RhoC GTPases to invasive breast carcinoma. Cancer Res. 2004, 64, 8694-8701.
- 399. SOBUE T, HAKEDA Y, KOBAYASHI Y, HAYAKAWA H, YAMASHITA K, AOKI T et coll. Tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 directly stimulate the bone-resorbing activity of isolated mature osteoclasts. J.Bone Miner.Res. 2001, 16, 2205-2214.
- 400. **SONODA J et WHARTON RP**. Recruitment of Nanos to hunchback mRNA by Pumilio. Genes Dev. 1999, 13, 2704-2712.
- 401. **SONODA J et WHARTON RP**. Drosophila Brain Tumor is a translational repressor. Genes Dev. 2001, 15, 762-773.
- 402. **SOPATA I et DANCEWICZ AM**. Presence of a gelatin-specific proteinase and its latent form in human leucocytes. Biochim.Biophys.Acta 1974, 370, 510-523.
- 403. SOUNNI NE, DEVY L, HAJITOU A, FRANKENNE F, MUNAUT C, GILLES C et coll. MT1-MMP expression promotes tumor growth and angiogenesis through an up-regulation of vascular endothelial growth factor expression. FASEB J 2002, 16, 555-564.

- 404. SPRING CM, KELLY KF, O'KELLY I, GRAHAM M, CRAWFORD HC et DANIEL JM. The catenin p120ctn inhibits Kaiso-mediated transcriptional repression of the beta-catenin/TCF target gene matrilysin. Exp.Cell Res. 2005, 305, 253-265.
- 405. ST CROIX B, SHEEHAN C, RAK JW, FLORENES VA, SLINGERLAND JM et KERBEL RS. E-Cadherin-dependent growth suppression is mediated by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(KIP1). J.Cell Biol. 1998, 142, 557-571.

406. **ST JOHNSTON D et NUSSLEIN-VOLHARD C**. The origin of pattern and polarity in the Drosophila embryo. Cell 1992, 68, 201-219.

407. STAPPERT J et KEMLER R.

A short core region of E-cadherin is essential for catenin binding and is highly phosphorylated. Cell Adhes.Commun. 1994, 2, 319-327.

408. STEARNS ME et WANG M.

Alendronate blocks metalloproteinase secretion and bone collagen I release by PC-3 ML cells in SCID mice.

Clin.Exp.Metastasis 1998, 16, 693-702.

409. STERNLICHT MD, BISSELL MJ et WERB Z.

The matrix metalloproteinase stromelysin-1 acts as a natural mammary tumor promoter. Oncogene 2000, 19, 1102-1113.

410. STERNLICHT MD et WERB Z.

How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. Annu.Rev.Cell Dev.Biol. 2001, 17, 463-516.

411. STETLER-STEVENSON M, MANSOOR A, LIM M, FUKUSHIMA P, KEHRL J, MARTI G et coll.

Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in reactive and neoplastic lymphoid cells. Blood 1997, 89, 1708-1715.

412. STETLER-STEVENSON WG.

Progelatinase A activation during tumor cell invasion. Invasion Metastasis 1994, 14, 259-268.

413. STETLER-STEVENSON WG, BERSCH N et GOLDE DW.

Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) has erythroid-potentiating activity. FEBS Lett. 1992, 296, 231-234.

414. STETLER-STEVENSON WG, KRUTZSCH HC et LIOTTA LA.

Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2). A new member of the metalloproteinase inhibitor family. J.Biol.Chem. 1989, 264, 17374-17378.

415. STRACKE JO, HUTTON M, STEWART M, PENDAS AM, SMITH B, LOPEZ-OTIN C et coll.

Biochemical characterization of the catalytic domain of human matrix metalloproteinase 19. Evidence for a role as a potent basement membrane degrading enzyme. J.Biol.Chem. 2000, 275, 14809-14816.

416. STRATHDEE G.

Epigenetic versus genetic alterations in the inactivation of E-cadherin. Semin.Cancer Biol. 2002, 12, 373-379.

417. STRUHL G.

Differing strategies for organizing anterior and posterior body pattern in Drosophila embryos.

Nature 1989, 338, 741-744.

- 418. STRUHL G, JOHNSTON P et LAWRENCE PA. Control of Drosophila body pattern by the hunchback morphogen gradient. Cell 1992, 69, 237-249.
- 419. STRUMANE K, BONNOMET A, STOVE C, VANDENBROUCKE R, NAWROCKI-RABY B, BRUYNEEL E et coll. E-cadherin regulates human Nanos1, which interacts with p120ctn and induces tumor cell migration and invasion.

Cancer research 2006,

420. SUBRAMANIAM K et SEYDOUX G.

nos-1 and nos-2, two genes related to Drosophila nanos, regulate primordial germ cell development and survival in Caenorhabditis elegans. Development 1999, 126, 4861-4871.

- 421. SUGIO K, KASE S, SAKADA T, YAMAZAKI K, YAMAGUCHI M, ONDO K et coll. Micrometastasis in the bone marrow of patients with lung cancer associated with a reduced expression of E-cadherin and beta-catenin: risk assessment by immunohistochemistry. Surgery 2002, 131, S226-S231.
- 422. SUNDFELDT K, IVARSSON K, RASK K, HAEGER M, HEDIN L et BRANNSTROM M. Higher levels of soluble E-cadherin in cyst fluid from malignant ovarian tumours than in benign cysts. Anticancer Res. 2001, 21, 65-70.
- 423. SYRIGOS KN, HARRINGTON K, WAXMAN J, KRAUSZ T et PIGNATELLI M. Altered gamma-catenin expression correlates with poor survival in patients with bladder cancer. J.Urol. 1998, 160, 1889-1893.
- 424. **TAKAHASHI C, SHENG Z, HORAN TP, KITAYAMA H, MAKI M, HITOMI K et coll.** Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK.

Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 1998, 95, 13221-13226.

425. TAKAHASHI K et SUZUKI K.

Density-dependent inhibition of growth involves prevention of EGF receptor activation by E-cadherinmediated cell-cell adhesion. Exp.Cell Res. 1996, 226, 214-222.

426. TAKAHASHI M, TSUNODA T, SEIKI M, NAKAMURA Y et FURUKAWA Y. Identification of membrane-type matrix metalloproteinase-1 as a target of the beta-catenin/Tcf4 complex in human colorectal cancers. Oncogene 2002, 21, 5861-5867.

427. **TAKEDA H, SHIMOYAMA Y, NAGAFUCHI A et HIROHASHI S**. E-cadherin functions as a cis-dimer at the cell-cell adhesive interface in vivo. Nat.Struct.Biol. 1999, 6, 310-312.

428. TAKEICHI M.

Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. Science 1991, 251, 1451-1455.

429. TAKEICHI M.

Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. Curr.Opin.Cell Biol 1993, 5, 806-811.

430. TAM EM, MOORE TR, BUTLER GS et OVERALL CM.

Characterization of the distinct collagen binding, helicase and cleavage mechanisms of matrix metalloproteinase 2 and 14 (gelatinase A and MT1-MMP): the differential roles of the MMP hemopexin c domains and the MMP-2 fibronectin type II modules in collagen triple helicase activities. J.Biol.Chem. 2004, 279, 43336-43344.

431. TAM EM, WU YI, BUTLER GS, STACK MS et OVERALL CM.

Collagen binding properties of the membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) hemopexin C domain. The ectodomain of the 44-kDa autocatalytic product of MT1-MMP inhibits cell invasion by disrupting native type I collagen cleavage. J.Biol.Chem. 2002, 277, 39005-39014.

- 432. TAMAI K, ZENG X, LIU C, ZHANG X, HARADA Y, CHANG Z et coll. A mechanism for Wnt coreceptor activation. Mol.Cell 2004, 13, 149-156.
- 433. TAMURA K, SHAN WS, HENDRICKSON WA, COLMAN DR et SHAPIRO L. Structure-function analysis of cell adhesion by neural (N-) cadherin. Neuron 1998, 20, 1153-1163.

434. TAN C, COSTELLO P, SANGHERA J, DOMINGUEZ D, BAULIDA J, DE HERREROS AG et coll.

Inhibition of integrin linked kinase (ILK) suppresses beta-catenin-Lef/Tcf-dependent transcription and expression of the E-cadherin repressor, snail, in APC-/- human colon carcinoma cells. Oncogene 2001, 20, 133-140.

435. TAUTZ D.

Regulation of the Drosophila segmentation gene hunchback by two maternal morphogenetic centres. Nature 1988, 332, 281-284.

436. TAUTZ D.

Evolutionary biology. Debatable homologies. Nature 1998, 395, 17, 19.

437. TAUTZ D et PFEIFLE C.

A non-radioactive in situ hybridization method for the localization of specific RNAs in Drosophila embryos reveals translational control of the segmentation gene hunchback. Chromosoma 1989, 98, 81-85.

438. TAUTZ D et SCHMID KJ.

From genes to individuals: developmental genes and the generation of the phenotype. Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol Sci. 1998, 353, 231-240.

439. TETSU O et MCCORMICK F.

Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. Nature 1999, 398, 422-426.

440. **THIERY JP**.

Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. Nat.Rev.Cancer 2002, 2, 442-454.

441. THORESON MA, ANASTASIADIS PZ, DANIEL JM, IRETON RC, WHEELOCK MJ, JOHNSON KR et coll.

Selective uncoupling of p120(ctn) from E-cadherin disrupts strong adhesion. J.Cell Biol. 2000, 148, 189-202.

442. THORESON MA et REYNOLDS AB. Altered expression of the catenin p120 in human cancer: implications for tumor progression. Differentiation 2002, 70, 583-589.

443. TSUDA H, ZHANG WD, SHIMOSATO Y, YOKOTA J, TERADA M, SUGIMURA T et coll.

Allele loss on chromosome 16 associated with progression of human hepatocellular carcinoma. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 1990, 87, 6791-6794.

- 444. TSUDA M, SASAOKA Y, KISO M, ABE K, HARAGUCHI S, KOBAYASHI S et coll. Conserved role of nanos proteins in germ cell development. Science 2003, 301, 1239-1241.
- 445. TSUJII M et DUBOIS RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. Cell 1995, 83, 493-501.
- 446. **TSUNEZUKA Y, KINOH H, TAKINO T, WATANABE Y, OKADA Y, SHINAGAWA A et coll.** Expression of membrane-type matrix metalloproteinase 1 (MT1-MMP) in tumor cells enhances pulmonary metastasis in an experimental metastasis assay. Cancer Res. 1996, 56, 5678-5683.
- 447. TURPEENNIEMI-HUJANEN T.
 Gelatinases (MMP-2 and -9) and their natural inhibitors as prognostic indicators in solid cancers. Biochimie 2005, 87, 287-297.
- 448. TYAGI SC, LEWIS K, PIKES D, MARCELLO A, MUJUMDAR VS, SMILEY LM et coll. Stretch-induced membrane type matrix metalloproteinase and tissue plasminogen activator in cardiac fibroblast cells. J.Cell Physiol 1998, 176, 374-382.
- 449. UEKITA T, ITOH Y, YANA I, OHNO H et SEIKI M. Cytoplasmic tail-dependent internalization of membrane-type 1 matrix metalloproteinase is important for its invasion-promoting activity. J.Cell Biol. 2001, 155, 1345-1356.
- 450. UMBAS R, ISAACS WB, BRINGUIER PP, XUE Y, DEBRUYNE FM et SCHALKEN JA. Relation between aberrant alpha-catenin expression and loss of E-cadherin function in prostate cancer. Int.J.Cancer 1997, 74, 374-377.
- 451. URIA JA, STAHLE-BACKDAHL M, SEIKI M, FUEYO A et LOPEZ-OTIN C. Regulation of collagenase-3 expression in human breast carcinomas is mediated by stromal-epithelial cell interactions. Cancer Res. 1997, 57, 4882-4888.
- 452. VALENTE P, FASSINA G, MELCHIORI A, MASIELLO L, CILLI M, VACCA A et coll. TIMP-2 over-expression reduces invasion and angiogenesis and protects B16F10 melanoma cells from apoptosis. Int.J.Cancer 1998, 75, 246-253.
- 453. VALLOROSI CJ, DAY KC, ZHAO X, RASHID MG, RUBIN MA, JOHNSON KR et coll. Truncation of the beta-catenin binding domain of E-cadherin precedes epithelial apoptosis during prostate and mammary involution. J.Biol.Chem. 2000, 275, 3328-3334.
- 454. VAN AELST L et D'SOUZA-SCHOREY C. Rho GTPases and signaling networks. Genes Dev. 1997, 11, 2295-2322.
- 455. VAN AKEN E, DE WEVER O, CORREIA DA ROCHA AS et MAREEL M. Defective E-cadherin/catenin complexes in human cancer. Virchows Arch. 2001, 439, 725-751.
- 456. VAN DE WM, CAVALLO R, DOOIJES D, VAN BEEST M, VAN ES J, LOUREIRO J et coll. Armadillo coactivates transcription driven by the product of the Drosophila segment polarity gene dTCF.

Cell 1997b, 88, 789-799.

- 457. VAN DE WM, CAVALLO R, DOOIJES D, VAN BEEST M, VAN ES J, LOUREIRO J et coll. Armadillo coactivates transcription driven by the product of the Drosophila segment polarity gene dTCF. Cell 1997a, 88, 789-799.
- 458. VAN DEN STEEN PE, PROOST P, WUYTS A, VAN DAMME J et OPDENAKKER G. Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO-alpha and leaves RANTES and MCP-2 intact. Blood 2000, 96, 2673-2681.

459. VAN HENGEL J, VANHOENACKER P, STAES K et VAN ROY F. Nuclear localization of the p120(ctn) Armadillo-like catenin is counteracted by a nuclear export signal and by E-cadherin expression. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 1999, 96, 7980-7985.

- 460. VAN ROY FM et MCCREA PD. A role for Kaiso-p120ctn complexes in cancer? Nat.Rev.Cancer 2005, 5, 956-964.
- 461. VELASCO G, PENDAS AM, FUEYO A, KNAUPER V, MURPHY G et LOPEZ-OTIN C. Cloning and characterization of human MMP-23, a new matrix metalloproteinase predominantly expressed in reproductive tissues and lacking conserved domains in other family members. J.Biol.Chem. 1999, 274, 4570-4576.
- 462. VERMEULEN SJ, NOLLET F, TEUGELS E, VENNEKENS KM, MALFAIT F, PHILIPPE J et coll.

The alphaE-catenin gene (CTNNA1) acts as an invasion-suppressor gene in human colon cancer cells. Oncogene 1999, 18, 905-915.

463. VINCENTI MP et BRINCKERHOFF CE.

Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors. Arthritis Res. 2002, 4, 157-164.

464. VISSE R et NAGASE H.

Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. Circ.Res. 2003, 92, 827-839.

465. VLEMINCKX K, VAKAET L, JR., MAREEL M, FIERS W et VAN ROY F.

Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role.

Cell 1991, 66, 107-119.

466. VLEMINCKX KL, DEMAN JJ, BRUYNEEL EA, VANDENBOSSCHE GM, KEIRSEBILCK AA, MAREEL MM et coll.

Enlarged cell-associated proteoglycans abolish E-cadherin functionality in invasive tumor cells. Cancer Res. 1994, 54, 873-877.

467. WANG C, DICKINSON LK et LEHMANN R. Genetics of nanos localization in Drosophila. Dev.Dyn. 1994, 199, 103-115.

468. WANG C et LEHMANN R.

Nanos is the localized posterior determinant in Drosophila. Cell 1991, 66, 637-647.

469. WANG EH, LIU Y, XU HT, DAI SD, LIU N, XIE CY et coll.

Abnormal expression and clinicopathologic significance of p120-catenin in lung cancer.

Histol.Histopathol. 2006, 21, 841-847.

470. WANG G, HUANG CH, ZHAO Y, CAI L, WANG Y, XIU SJ et coll.

Genetic aberration in primary hepatocellular carcinoma: correlation between p53 gene mutation and lossof-heterozygosity on chromosome 16q21-q23 and 9p21-p23. Cell Res. 2000, 10, 311-323.

WANG X, MA D, KESKI-OJA J et PEI D.
 Co-recycling of MT1-MMP and MT3-MMP through the trans-Golgi network. Identification of DKV582 as a recycling signal.
 J.Biol.Chem. 2004, 279, 9331-9336.

472. WANG Z et LIN H.

Nanos maintains germline stem cell self-renewal by preventing differentiation. Science 2004, 303, 2016-2019.

- 473. WASHINGTON K, CHIAPPORI A, HAMILTON K, SHYR Y, BLANKE C, JOHNSON D et coll. Expression of beta-catenin, alpha-catenin, and E-cadherin in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinomas. Mod.Pathol. 1998, 11, 805-813.
- 474. WESTERMARCK J et KAHARI VM. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. FASEB J. 1999, 13, 781-792.
- 475. WHARTON RP, SONODA J, LEE T, PATTERSON M et MURATA Y. The Pumilio RNA-binding domain is also a translational regulator. Mol.Cell 1998, 1, 863-872.

476. WHARTON RP et STRUHL G. RNA regulatory elements mediate control of Drosophila body pattern by the posterior morphogen nanos. Cell 1991, 67, 955-967.

477. WHEELOCK MJ et JOHNSON KR. Cadherin-mediated cellular signaling. Curr.Opin.Cell Biol 2003, 15, 509-514.

478. WHITELOCK JM, MURDOCH AD, IOZZO RV et UNDERWOOD PA. The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases. J.Biol.Chem. 1996, 271, 10079-10086.

479. WILLIAMS EJ, FURNESS J, WALSH FS et DOHERTY P. Activation of the FGF receptor underlies neurite outgrowth stimulated by L1, N-CAM, and N-cadherin. Neuron 1994, 13, 583-594.

- 480. WILLIAMS EJ, WILLIAMS G, HOWELL FV, SKAPER SD, WALSH FS et DOHERTY P. Identification of an N-cadherin motif that can interact with the fibroblast growth factor receptor and is required for axonal growth. J Biol Chem. 2001, 276, 43879-43886.
- 481. WILSON CL et MATRISIAN LM. Matrilysin: an epithelial matrix metalloproteinase with potentially novel functions. Int.J Biochem.Cell Biol 1996, 28, 123-136.
- 482. WREDEN C, VERROTTI AC, SCHISA JA, LIEBERFARB ME et STRICKLAND S. Nanos and pumilio establish embryonic polarity in Drosophila by promoting posterior deadenylation of hunchback mRNA. Development 1997, 124, 3015-3023.

483. WU E, MARI BP, WANG F, ANDERSON IC, SUNDAY ME et SHIPP MA. Stromelysin-3 suppresses tumor cell apoptosis in a murine model. J.Cell Biochem. 2001, 82, 549-555.

484. XU J, RODRIGUEZ D, PETITCLERC E, KIM JJ, HANGAI M, MOON YS et coll. Proteolytic exposure of a cryptic site within collagen type IV is required for angiogenesis and tumor growth in vivo. J Cell Biol 2001, 154, 1069-1079.

485. YAMASHITA K, AZUMANO I, MAI M et OKADA Y. Expression and tissue localization of matrix metalloproteinase 7 (matrilysin) in human gastric carcinomas. Implications for vessel invasion and metastasis. Int.J Cancer 1998, 79, 187-194.

486. YAN C, WANG H et BOYD DD. ATF3 represses 72-kDa type IV collagenase (MMP-2) expression by antagonizing p53-dependent transactivation of the collagenase promoter. J.Biol.Chem. 2002, 277, 10804-10812.

- 487. YANAGAWA S, MATSUDA Y, LEE JS, MATSUBAYASHI H, SESE S, KADOWAKI T et coll. Casein kinase I phosphorylates the Armadillo protein and induces its degradation in Drosophila. EMBO J. 2002, 21, 1733-1742.
- 488. **YANG J, MANI SA, DONAHER JL, RAMASWAMY S, ITZYKSON RA, COME C et coll.** Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. Cell 2004, 117, 927-939.

489. YANG J, WU J, TAN C et KLEIN PS. PP2A:B56epsilon is required for Wnt/beta-catenin signaling during embryonic development. Development 2003, 130, 5569-5578.

490. YANG M et KURKINEN M.

Cloning and characterization of a novel matrix metalloproteinase (MMP), CMMP, from chicken embryo fibroblasts. CMMP, Xenopus XMMP, and human MMP19 have a conserved unique cysteine in the catalytic domain.

J.Biol.Chem. 1998, 273, 17893-17900.

491. YANG M, MURRAY MT et KURKINEN M. A novel matrix metalloproteinase gene (XMMP) encoding vitronectin-like motifs is transiently expressed in Xenopus laevis early embryo development. J.Biol.Chem. 1997, 272, 13527-13533.

492. YANG TT et HAWKES SP.

Role of the 21-kDa protein TIMP-3 in oncogenic transformation of cultured chicken embryo fibroblasts. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 1992, 89, 10676-10680.

493. YAP AS, NIESSEN CM et GUMBINER BM. The juxtamembrane region of the cadherin cytoplasmic tail supports lateral clustering, adhesive strengthening, and interaction with p120ctn. J.Cell Biol. 1998, 141, 779-789.

494. YE B, PETRITSCH C, CLARK IE, GAVIS ER, JAN LY et JAN YN. Nanos and Pumilio are essential for dendrite morphogenesis in Drosophila peripheral neurons. Curr.Biol. 2004, 14, 314-321.

495. YOON HG, CHAN DW, REYNOLDS AB, QIN J et WONG J. N-CoR mediates DNA methylation-dependent repression through a methyl CpG binding protein Kaiso. Mol.Cell 2003, 12, 723-734.

496. YOSHIURA K, KANAI Y, OCHIAI A, SHIMOYAMA Y, SUGIMURA T et HIROHASHI S.

Silencing of the E-cadherin invasion-suppressor gene by CpG methylation in human carcinomas. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 1995, 92, 7416-7419.

497. YOST C, TORRES M, MILLER JR, HUANG E, KIMELMAN D et MOON RT.

The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in Xenopus embryos by glycogen synthase kinase 3. Genes Dev. 1996, 10, 1443-1454.

498. **YU AE, HEWITT RE, CONNOR EW et STETLER-STEVENSON WG**. Matrix metalloproteinases. Novel targets for directed cancer therapy. Drugs Aging 1997, 11, 229-244.

499. YU Q et STAMENKOVIC I.

Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. Genes Dev. 1999, 13, 35-48.

- 500. **YU WH, YU S, MENG Q, BREW K et WOESSNER JF, JR.** TIMP-3 binds to sulfated glycosaminoglycans of the extracellular matrix. J.Biol.Chem. 2000, 275, 31226-31232.
- 501. **ZAHM JM, KAPLAN H, HERARD AL, DORIOT F, PIERROT D, SOMELETTE P et coll.** Cell migration and proliferation during the in vitro wound repair of the respiratory epithelium. Cell Motil.Cytoskeleton 1997, 37, 33-43.
- 502. ZHAO YG, XIAO AZ, NEWCOMER RG, PARK HI, KANG T, CHUNG LW et coll. Activation of pro-gelatinase B by endometase/matrilysin-2 promotes invasion of human prostate cancer cells. J Biol Chem. 2003, 278, 15056-15064.

503. **ZHAO YG, XIAO AZ, PARK HI, NEWCOMER RG, YAN M, MAN YG et coll.** Endometase/matrilysin-2 in human breast ductal carcinoma in situ and its inhibition by tissue

Endometase/matrilysin-2 in human breast ductal carcinoma in situ and its inhibition by tissue inhibitors of metalloproteinases-2 and -4: a putative role in the initiation of breast cancer invasion. Cancer Res. 2004, 64, 590-598.

504. ZHU W, LEBER B et ANDREWS DW. Cytoplasmic O-glycosylation prevents cell surface transport of E-cadherin during apoptosis. EMBO J. 2001, 20, 5999-6007.

505. ZONDAG GC, REYNOLDS AB et MOOLENAAR WH. Receptor protein-tyrosine phosphatase RPTPmu binds to and dephosphorylates the catenin p120(ctn). J.Biol.Chem. 2000, 275, 11264-11269.