

UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE
UFR SCIENCES EXACTES ET NATURELLES

THESE

Présentée en vue de l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE REIMS
CHAMPAGNE-ARDENNE

Spécialité : BIOCHIMIE

Par

Lucie BRIDOUX

**Effet de l'Inhibiteur Tissulaire des Métalloprotéinases-1
(TIMP-1) dans les cellules érythroïdes normales et
cancéreuses humaines.
Caractérisation du récepteur.**

Soutenue publiquement le 15 mai 2009

JURY

Président : Laurent MARTINY, Professeur des Universités, Reims.
Rapporteurs : Michaela FONTENAY, Professeur Hospitalier, Paris.
Fabrice GOUILLEUX, Directeur de Recherche CNRS, Tours.
Examineurs : Florence SMADJA-JOFFE, Directeur de recherche INSERM, Paris.
Philippe N'GUYEN, Professeur Hospitalier, Reims.
Directeur de thèse : Emmanuelle CHARPENTIER, Professeur des Universités, Reims.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le Pr Laurent MARTINY de m'avoir accueillie au sein du laboratoire SiRMA et pour la confiance qui m'a témoignée lors de ces années. Je le remercie d'avoir corrigé ce manuscrit et d'avoir accepté d'être le président du jury lors de ma soutenance de thèse.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance et à témoigner mes sincères remerciements à ma directrice de DEA et de thèse, le Pr Emmanuelle CHARPENTIER. Merci pour la confiance que vous m'avez témoignée durant ces cinq années, votre gentillesse et votre rigueur scientifique.

Je remercie le Pr Michaela FONTENAY et le Dr Fabrice GOUILLEUX d'avoir accepté de juger ce travail et d'être rapporteurs de cette thèse. Merci d'avoir apporté des corrections claires qui ont permis d'améliorer ce manuscrit. Je tiens également à les remercier pour la discussion qu'ils ont animée lors de ma soutenance et qui a contribué à l'ouverture de nouvelles perspectives de travail.

Je tiens à remercier les Pr Florence SMADJA-JOFFE et Philippe N'GUYEN d'avoir accepté d'être examinateurs de cette thèse et pour la discussion qu'ils ont animée lors de ma soutenance de thèse.

Je tiens tout particulièrement à remercier celle qui m'a pris sous son aile en arrivant au laboratoire et qui m'a appris à manipuler, Marie-Line. Merci pour ta gentillesse et ta disponibilité tout au long de ces cinq années. Je n'oublierai pas tous les bons moments que nous avons passés ensemble (les débriefings de plus belle la vie, les scoops, les heures passées à aliquoter sous la hotte, les photos secrètes, etc..) et j'espère que nous resterons en contact après.

Une pensée particulière pour mes deux camarades de bureau, apprentis-chanteurs à leurs heures perdues, Titof et Oliver. Merci de m'avoir fait partager votre répertoire et de m'avoir permis de rédiger cette thèse en chanson. Merci également pour tous les goûters (du lundi et du jeudi seulement... il faut travailler quand même ! lol), qui m'ont évité bon nombre de fringales. Vous pouvez maintenant me chanter « Adieu » !

Un grand merci à Elise pour ta gentillesse et ta disponibilité. Je te suis très reconnaissante de tout ce que tu m'as appris et de tous les conseils que tu m'as donnés tout au long de cette thèse. Je te souhaite tout plein de belles choses pour l'avenir.

Je tiens à remercier Jérôme pour toutes les lames que tu m'as passées au microscope confocal, et pour tes nombreux conseils. Une pensée également pour Jess.

Un grand merci à « celui qui à l'âge de ma mère », alias Manu ! Merci pour ta bonne humeur et ta joie de vivre et pour m'avoir « initiée » à la modélisation, chose que j'ai un peu de mal à comprendre il faut le reconnaître !

Une pensée pour les deux inséparables Dude et Hervé. Merci pour votre bonne humeur et votre sympathie. Dude, j'espère qu'on restera en contact et qu'on pourra enfin se faire une partie de Mario Kart en ligne ! Hervé, je n'aurais que quelques mots à ajouter : vive les Ardennes et leur fameux jambon !

Merci à Laetitia pour ta bonne humeur et ta sympathie, ainsi que pour toutes les discussions (de filles) que nous avons eues (surtout ces derniers temps !). Une belle aventure nous attend... Les paris sont lancés : qui sera la première à accoucher ???? Rendez-vous en novembre !!

Je tiens également à remercier le plus Bordelais d'entre nous, Stéphane. Tu es quelqu'un que j'apprécie beaucoup et j'espère qu'on restera en contact après. Merci également au lyonnais et son épouse, alias Fred et Christelle.

Une pensée pour mes deux compagnons de galère, Nico et Bénito. Que de chemin parcouru depuis le DEUG... Je vous souhaite bon courage pour la fin (Nico c'est fait...) et bonne chance pour la suite.

Farid et Poupette, je vous souhaite également bon courage pour la fin de thèse. Farid, je ne te le répéterai jamais assez : fais attention à toi et à ta santé!! Poupette, je n'oublierai pas la semaine que nous avons passée ensemble en Grèce : les Papadopoulos, les Mythos et le SiRMakis... sans oublier tes fameuses imitations de Benoit Poelvoorde qui me font mourir de rire!! Bonne continuation à vous deux ! Vous devez être soulagés, je ne serai plus là pour vous dire de ranger votre paillasse en électrophorèse !!!

Bonne chance pour les nouveaux thésards : Padawan et Gwenn. Gwenn, tu deviens la seule fille en thèse, ne te laisse pas faire par tous ces hommes !

Merci au dernier arrivé dans l'équipe TIMP-1 : Nicolas. Je tenais à te remercier pour tous tes conseils et ta vision « extérieure » qui m'ont permis d'aborder de nouvelles perspectives de travail. Je tenais également à remercier Stéphanie pour tous tes bons conseils, notamment sur l'extraction des progéniteurs, ce qui nous a permis de gagner du temps !

Je tiens à remercier Fanja pour m'avoir initiée aux joies de la qPCR. Tu es quelqu'un de très sympathique, garde ta joie de vivre et ce sourire qui te va si bien !

Je remercie également l'« intruse » du laboratoire SiRMa, Barakuda pour ta bonne humeur et ta sympathie.

Merci à Hassan, Laurent Debelle, Sabrina, Nanie, Annie, Bertrand, Isabelle, Cathie, Michel, Delphine, Francine et Catherine.. Et tous les membres du laboratoire SiRMA.

Je ne pourrais terminer ces remerciements sans avoir une pensée pour les « anciens » du laboratoire : Odette, Emilie, Géraldine, Amel, Christelle, Charlotte, Amélie et ma toute première stagiaire Cécile.

Je tiens à remercier mes amis : Vanessa, Rachel et Nico qui ont toujours été là pour moi et qui m'ont permis de décompresser le week-end. Enfin, je tiens à remercier ma famille qui m'a toujours soutenue : ma mère et mon beau-père, ma sœur et Adel, mon oncle et ma tante, Fanny et Norman, ainsi que mes beaux-parents. Cette thèse a également été marquée par la plus belle rencontre de ma vie : Greg. Un grand merci à toi qui as toujours été là et qui as su supporter mon sale caractère durant cette thèse. Une belle aventure nous attend...

Enfin, je tiens à dédier cette thèse à ma grand-mère qui est partie bien trop tôt et qui doit être fière de moi.

LISTE DES ABREVIATIONS	1
LISTE DES FIGURES	3
LISTE DES TABLEAUX	5
INTRODUCTION	6
I. La Matrice extracellulaire	7
I.1. Structure et composition de la matrice extracellulaire	7
I.1.1. Les protéines fibreuses	7
I.1.2. Les glycoprotéines	8
I.1.3. Les protéoglycanes	9
I.2. Les métalloprotéinases matricielles (MMPs).....	9
I.2.1. Classification des MMPs.....	10
I.2.2. Structure des MMPs.....	12
I.2.2. Régulation des MMPs.....	14
1. Régulation transcriptionnelle.....	14
2. Activation de la pro-enzyme.....	15
3. Inhibition de l'activité protéolytique par des inhibiteurs endogènes.....	16
II. Les TIMPs.....	16
II.1. Généralités	16
II.1.1. Structure des TIMPs	16
II.1.2. Structure du TIMP-1	20
II.2. Régulation des TIMPs	21
II.3. Activités biologiques des TIMPs	22
II.3.1. Activité inhibitrice des MMPs	22
II.3.2. Activité EPA (Erythroid Potentiating Activity).....	23
II.3.3. Activité mitogénique.....	24
II.3.3. Effet pro- ou anti-apoptotique.....	25
II.3.4. Activité stéroïdogénique	26
II.3.5. Activité anti-angiogénique.....	26
II.4. TIMPs et cancer	28
II.5. Les récepteurs des TIMPs et voies de signalisation associées.....	29

II.5.1. Le récepteur du TIMP-1	29
II.5.2. Le récepteur du TIMP-2	31
II.5.3. Le récepteur du TIMP-3	32
III. Hématopoïèse et microenvironnement hématopoïétique	33
III.1. Généralités	33
III.2. Les cellules hématopoïétiques	33
III.3. Régulation de l'hématopoïèse	35
III.3.1. Les facteurs de croissance	35
1. Les facteurs de régulation positive	35
2. Les facteurs de régulation négative	36
III.3.2. Le microenvironnement médullaire	36
IV. Voies de signalisation impliquées dans la survie cellulaire	37
IV.1. La voie PI 3-kinase/Akt.....	37
IV.1.1. Les PI 3-kinases	37
IV.1.2. Akt.....	41
IV.2. Les JAKs	43
IV.3. Les Src kinases	47
IV.4. La glycoprotéine CD44	50
IV.4.1. Généralités.....	50
IV.4.2. Structure de CD44	50
IV.4.3. Fonctions de CD44.....	52
IV.4.4. Protéines associées à CD44.....	53
IV.4.4.1. L'ankyrine	54
IV.4.4.2. Les protéines ERM (Ezrine, Radixine Moesine),	54
IV.4.4.3. CD44 et les Src kinases	56
IV.4.4.4. CD44 et la MMP-9	56
V. But du travail	58
 MATÉRIEL ET MÉTHODES	 60
I. Culture cellulaire.....	61
I.1. Les cellules UT-7	61

I.2. Les progéniteurs érythroïdes normaux.....	61
I.3. Stimulation des cellules UT-7.....	62
II. Mesure de la survie cellulaire par cytométrie en flux.....	63
III. Transfection des cellules.....	64
III.1. siRNA (short interfering RNA).....	64
III.2. Electroporation.....	64
IV. Analyse des protéines.....	65
IV.1. Extraits protéiques totaux.....	65
IV.2. Biotinylation des protéines membranaires.....	65
IV.3. Immunoprécipitation.....	66
IV.4. Mesure de l'activité PI 3-kinase.....	67
IV.5. Mesure de l'activité kinasique de Lyn.....	67
IV.6. Western blot.....	68
IV.7. Marquage par immunofluorescence.....	69
V. Transcription inverse et Réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR).....	69
V.1. Extraction des ARNs totaux.....	69
V.2. Dosage et contrôle de la qualité des ARNs.....	70
V.3. Transcription inverse (RT).....	70
V.4. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR).....	70
V.5. PCR quantitative (qPCR).....	71
VI. Anticorps et Inhibiteurs utilisés.....	72
VIII.1. Les anticorps.....	72
VIII.2. L'inhibiteur des Src kinases : le PP1.....	73
VII. Expression des résultats.....	73

RÉSULTATS.....	74
<i>Première Partie: Mise en évidence du rôle de la protéine CD44 dans l'effet anti-apoptotique du TIMP-1</i>	
I. La glycoprotéine CD44 est associée de manière constitutive à la pro-MMP-9.....	76
I.1. Expression de CD44 dans les cellules UT-7	76
I.2. CD44 est associée à la pro-MMP-9	77
I.3. CD44 et la pro-MMP-9 sont colocalisées à la membrane plasmique des cellules UT-7	78
II. CD44 est nécessaire à l'effet anti-apoptotique du TIMP-1	80
II.1. Validation de l'extinction de l'expression de CD44 par la technique d'interférence RNA (siRNA)	80
II.2. L'extinction de l'expression de CD44 modifie la localisation de la pro-MMP-9 à la membrane plasmique	82
II.3. L'extinction de l'expression de CD44 inhibe l'effet anti-apoptotique du TIMP-1	85
II.3.1 L'extinction de l'expression de CD44 inhibe la survie cellulaire induite par le TIMP-1	85
II.3.2. L'extinction de l'expression de CD44 inhibe la phosphorylation d'Akt induite par le TIMP-1	87
II.4. L'extinction de l'expression de CD44 modifie la localisation du TIMP-1 à la membrane	88
II.5. Effet de l'acide hyaluronique sur la phosphorylation d'Akt induite par le TIMP-1	90
III. Etude préliminaire du complexe pro-MMP-9/CD44 dans les cellules isolées à partir de progéniteurs normaux CD34+	91
III.1. Expression de CD44 et pro-MMP-9 dans les cellules isolées à partir de progéniteurs normaux CD34+	91
III.2. Marquage par immunofluorescence des protéines CD44 et pro-MMP-9 dans les cellules isolées à partir de progéniteurs normaux CD34+	93

Deuxième Partie: Etude de l'association entre la glycoprotéine CD44 et la tyrosine kinase JAK2

I. La glycoprotéine CD44 est associée de manière constitutive à la tyrosine kinase JAK2.....	96
II. Etude de l'interaction entre CD44 et JAK2 par modélisation moléculaire	97
II.1. Superposition des structures tridimensionnelles des domaines FERM de la radixine	98
II.2. Superposition des structures tridimensionnelles du domaine FERM de JAK2 avec le domaine FERM de la radixine	100
II.3. Etude de l'interaction entre le domaine FERM de JAK2 et le peptide de CD44	102
III. CD44 est nécessaire à l'activation de JAK2 par le TIMP-1	104

Troisième Partie: Mise en évidence du rôle de la Src kinase Lyn dans l'effet anti-apoptotique du TIMP-1

I. La Src kinase Lyn est impliquée dans l'effet anti-apoptotique du TIMP-1	107
I.1. Le PP1 inhibe la survie cellulaire induite par le TIMP-1.....	107
I.2. Expression de Lyn dans les UT-7	109
I.3. Le TIMP-1 induit l'activation de Lyn	110
I.3.1. Le TIMP-1 induit la déphosphorylation de la tyrosine 507 de Lyn	110
I.3.2. Le TIMP-1 induit l'activité kinasique de Lyn.....	111
I.4. L'extinction de l'expression de Lyn inhibe la survie cellulaire induite par le TIMP-1	112
I.4.1. Extinction de l'expression de Lyn dans les cellules transfectées.....	113
I.4.2. L'extinction de l'expression de Lyn inhibe l'effet anti-apoptotique du TIMP-1	115
I.5. La Src kinase Lyn est activée en amont de la PI 3-kinase	117
I.6. La Src kinase Lyn est activée en amont de la kinase Akt	119
I.6.1. Le PP1 inhibe la phosphorylation d'Akt induite par le TIMP-1	119

I.6.2. L'extinction de l'expression de Lyn inhibe la phosphorylation d'Akt induite par le TIMP-1	120
II. Etude de l'interaction entre Lyn et JAK2	121
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	122
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	134
Publications	135
Communications orales	135
Communications par affiche.....	136
RÉFÉRENCES	137
ANNEXES	158

LISTE DES ABREVIATIONS

ADAM	A Dysintegrin And Metalloproteinase
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ARN	Acide Ribonucléique
BCA	Acide Bicinchoninique
BET	Bromure d’Ethidium
BFU-E	Burst Forming Unit-Erythroid
BSA	Bovine Serum Albumin
Cbl	Casitas B lymphoma
CFU-E	Colony Forming Unit-Erythroid
CSF	Colony Stimulating Factor
DO	Densité Optique
EGF	Epidermal Growth Factor
EPA	Erythroid Potentiating Activity
Epo	Erythropoïétine
ERM	Ezrin, Radixin, Moesin
FAK	Focal Adhesion Kinase
FERM	Four Point One Band, Ezrin, Radixin, Moesin
FGF	Fibroblast Growth Factor
Gab	Grb2-associated binder
GAG	Glycosaminoglycane
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GM-CSF	Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
HA	Hyaluronic Acid
Il	Interleukine
IKK	IκB Kinase
IMDM	Iscove’s Modified Dulbecco’s Medium
IP	Iodure de Propidium
IRS-2	Insulin Receptor Substrate-2
JAK	Janus Kinase ou Just Another Kinase
JH	JAK Homology
kDa	kiloDalton
LB	Luria-Bertani
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
MEC	Matrice Extracellulaire
MIP1α	Macrophage Inflammatory Protein 1α
MMP	Matrix Metalloproteinase
MT-MMP	Membrane Type – MMP
NF-κB	Nuclear Factor-κB
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis

PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDK	Phosphatidyl Inositol Dependent Kinase
PIAS	Protein Inhibitor of activated STAT
PI 3-kinase	Phosphatidyl Inositol 3-kinase
PI	Phosphatidyl Inositol
PIP	Phosphatidyl Inositol Phosphate
PIP ₂	Phosphatidyl Inositol bisPhosphate
PIP ₃	Phosphatidyl Inositol trisPhosphate
PH	Pleckstrin Homology
PKB	Protein Kinase B
pRb	protéine du rétinoblastome
PS	Phosphatidyl Sérine
RECK	REversion-inducing Cystein rich protein with Kazal motifs
RT-PCR	Reverse Transcription-PCR
SCF	Stem Cell Factor
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
SH2 et 3	Src Homology 2 et 3
SHP	SH2-domain containing Phosphatase
siRNA	Short Interferring RNA
sncRNA	siRNA negative control
SOCS	Suppressor of Cytokine Signaling
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
SVF	Sérum de Veau Fœtal
TBE	Tris Borate EDTA
TBST	Tris Buffered Saline-Tween
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase
TNF- α	Tumor Necrosis factor- α
TPO	Thrombopoïétine
TRANCE	TNF-Related Activation-induced Cytokine
TYK2	tyrosine Kinase 2
uPA	urokinase Plasminogen Activator
UV	Ultra-Violet
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation schématique de la matrice extracellulaire 7

Figure 2: Structure des MMPs 13

Figure 3: Processus d'activation des pro-MMPs. 15

Figure 4: Structure primaire des TIMPs..... 17

Figure 5: Structure tridimensionnelle du TIMP-1 21

Figure 6: Voies de signalisation induites par l'interaction TIMP-1/CD63..... 30

Figure 7: Voies de signalisation induites par l'interaction TIMP-2/ $\alpha3\beta1$ 32

Figure 8: Schéma récapitulatif de l'hématopoïèse..... 34

Figure 9: Représentation schématique des principales isoformes des sous-unités régulatrices de la PI 3-kinase de classe IA..... 39

Figure 10: Mécanisme d'activation de la voie PI 3-kinase/Akt dans la survie cellulaire..... 43

Figure 11: Représentation schématique de la structure primaire des JAKs..... 44

Figure 12: Schéma d'activation de la voie JAK/STAT..... 45

Figure 13: Prédiction de structure de JAK2 47

Figure 14: Représentation schématique de la structure d'une Src kinase..... 48

Figure 15: Mécanisme d'activation des Src kinases 49

Figure 16: Représentation schématique du gène codant CD44..... 51

Figure 17: Représentation schématique de la structure de la protéine CD44 51

Figure 18: Représentation schématique de la structure des protéines ERM..... 55

Figure 19: Structure cristallographique du domaine FERM de la radixine 55

Figure 20: Schéma représentatif du double marquage à l'annexine-V-FLUOS et à l'iodure de propidium 63

Figure 21: Structure du PP1 73

Figure 22: Expression de CD44 dans les cellules UT-7..... 77

Figure 23: CD44 et la pro-MMP-9 sont associées de manière constitutive dans les cellules UT-7. 78

Figure 24: CD44 et la pro-MMP-9 sont colocalisés à la membrane plasmique des cellules UT-7. 79

Figure 25: Expression du gène de CD44 dans les cellules transfectées avec les siRNA CD44.. 81

Figure 26: Expression de la protéine CD44 dans les cellules transfectées avec les siRNA CD44.	82
Figure 27: L’extinction de l’expression de CD44 modifie la localisation de la pro-MMP-9 à la membrane cellulaire.	83
Figure 28: L'extinction de l'expression de CD44 modifie la localisation de la pro-MMP-9 à la surface cellulaire..	84
Figure 29: L'extinction de l'expression de CD44 inhibe l'effet anti-apoptotique du TIMP-1 dans les cellules UT-7.	86
Figure 30: L'extinction de l'expression de CD44 inhibe la phosphorylation d'Akt induite par le TIMP-1.	88
Figure 31: L'extinction de l'expression de CD44 modifie la fixation du TIMP-1 à la membrane plasmique.....	89
Figure 32: L'acide hyaluronique n'inhibe pas la phosphorylation d'Akt induite par le TIMP-1..	90
Figure 33: Expression de CD44, pro-MMP-9 et α -globine dans les cellules issues des progéniteurs CD34+.	92
Figure 34: Marquage par immunofluorescence des protéines CD44 et pro-MMP-9 dans les cellules issues des progéniteurs CD34+.	94
Figure 35: CD44 est associée de manière constitutive à JAK2.	97
Figure 36: Superposition des structures cristallographiques du domaine FERM des radixines complexées à la protéine NEP et à CD44.....	99
Figure 37: Structure tridimensionnelle de JAK2	100
Figure 38: Superposition du domaine FERM de la radixine avec JAK2.....	101
Figure 39: Etude de l'interaction entre la séquence QKKKLVING de CD44 et le domaine FERM de JAK2.....	102
Figure 40: Représentations de l'interaction entre la surface du domaine FERM de JAK2 et le peptide QKKKLVING de CD44.....	103
Figure 41: L'extinction d'expression de CD44 inhibe la phosphorylation de JAK2 induite par le TIMP-1.	104
Figure 42: Le PP1 inhibe la survie cellulaire induite par le TIMP-1	108
Figure 43: Expression de Lyn dans les cellules UT-7.....	110
Figure 44: Le TIMP-1 induit la déphosphorylation de la tyrosine 507 de Lyn.	111
Figure 45: Le TIMP-1 induit l'activité kinasique de Lyn.....	112
Figure 46: Expression du gène de Lyn dans les cellules transfectées avec les siRNA Lyn..	113

Figure 47: Expression protéique de Lyn dans les cellules transfectées avec les siRNA Lyn. 114

Figure 48: L'extinction d'expression de Lyn inhibe la survie cellulaire induite par le TIMP-1.. 116

Figure 49: Le PP1 inhibe l'activité PI 3-kinase induite par le TIMP-1..... 118

Figure 50: Le PP1 inhibe la phosphorylation d'Akt induite par le TIMP-1..... 119

Figure 51: L'extinction de l'expression de Lyn inhibe la phosphorylation d'Akt induite par le TIMP-1. 120

Figure 52: JAK2 est associée de manière constitutive à Lyn..... 121

Figure 53: L'intégrine β 1 et le TIMP-1 sont colocalisés à la membrane plasmique des cellules UT-7. 127

Figure 55: Les anticorps bloquant l'intégrine beta1 inhibent la phosphorylation de JAK2 induite par le TIMP-1. 128

Figure 54: L'intégrine β 1 immunoprécipite avec la MMP-9 et CD44. 128

Figure 56: Schéma récapitulatif 133

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Classification des MMPs en fonction de la spécificité de substrat..... 11

Tableau 2: Caractéristiques moléculaires des TIMPs 19

Tableau 3: Activités biologique des TIMPs 27

Tableau 4: Expression de CD44 dans différentes maladies hématopoïétiques 53

INTRODUCTION

I. La Matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) est un réseau complexe de macromolécules en contact avec les cellules. Elle intervient dans la constitution, le maintien et le remodelage de l'architecture tissulaire. Elle est constituée de polymères fibreux, comme les collagènes et l'élastine, et de molécules non fibreuses que sont les glycoprotéines et les glycosaminoglycans (GAGs) [Tanzer, 2006] (Figure 1).

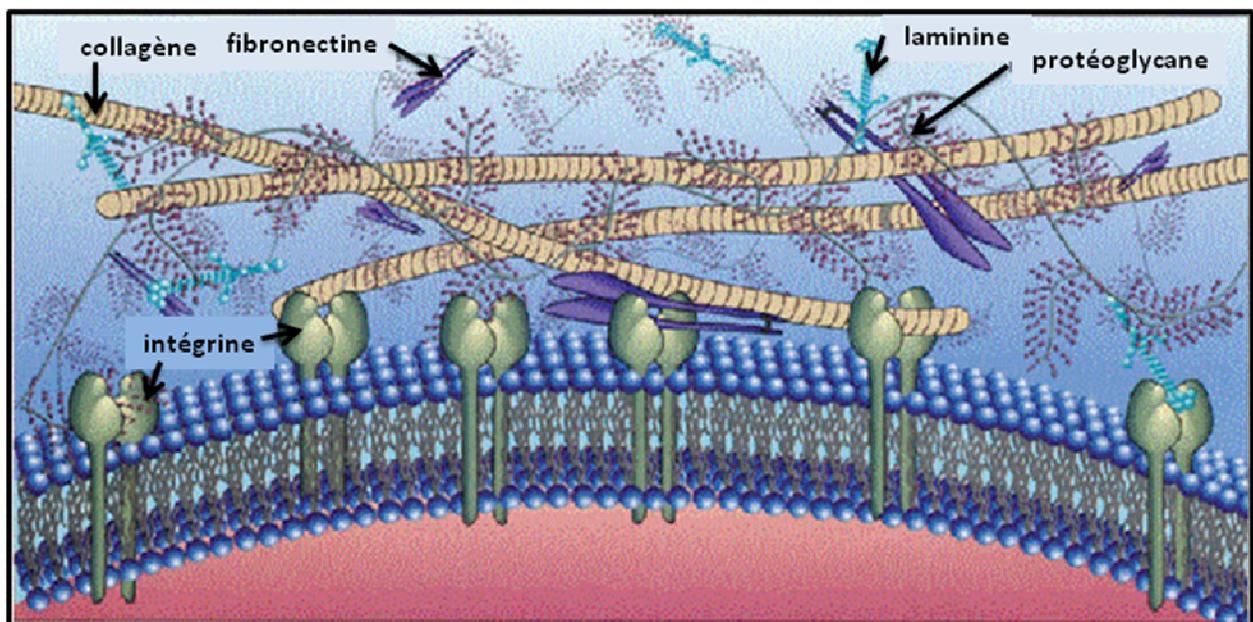


Figure 1 : Représentation schématique de la matrice extracellulaire

La composition de la MEC diffère selon les nécessités fonctionnelles des tissus. Les constituants de la MEC sont synthétisés et sécrétés par les cellules comme les fibroblastes, les ostéoblastes ou les chondrocytes [Kerrigan et coll., 2000].

I.1. Structure et composition de la matrice extracellulaire

I.1.1. Les protéines fibreuses

Les protéines fibreuses sont constituées des collagènes et de l'élastine.

Le collagène est la protéine la plus abondante de la MEC. C'est une protéine constituée de 3 chaînes polypeptidiques associées qui peuvent se combiner de différentes manières [Brown et coll., 1995]. Il existe 21 collagènes différents décrits chez l'Homme. Chaque type de collagène possède une structure propre et se trouve dans des organes particuliers. Par exemple, le collagène de type I intervient dans la formation de la peau, des tendons, des os et de la cornée, tandis que le collagène de type III se trouve au niveau du système cardiovasculaire.

Le collagène est synthétisé sous forme de procollagène qui est un assemblage de 3 chaînes de collagène α en hélice droite. Les fibres de procollagène s'assemblent en fibrilles de collagène et l'assemblage de plusieurs fibrilles forment la fibre de collagène. Les collagènes sont caractérisés par la répétition de séquences G-P-Hyp, les résidus prolyl et hydroxyprolyl conférant aux collagènes une conformation en triple hélice caractéristique.

L'élastine est une protéine fibreuse qui est sécrétée dans l'espace extracellulaire par les fibroblastes, essentiellement durant la croissance. Elle est d'abord sécrétée sous forme de proélastine puis de tropoélastine. L'élastine est formée d'une chaîne polypeptidique longue constituée de glycine et proline. La forte teneur en acides aminés hydrophobes est responsable de ses propriétés d'élasticité. L'élastine est présente dans la peau, les poumons, les vaisseaux sanguins, les tissus conjonctifs et certains tendons et cartilages.

I.1.2. Les glycoprotéines

Parmi les glycoprotéines les plus importantes, on trouve la fibronectine et les laminines.

La fibronectine joue un rôle important dans l'adhérence des cellules. Au moins 20 chaînes de fibronectine ont été identifiées et proviennent toutes de l'épissage alternatif d'un gène commun de fibronectine. La fibronectine est constituée de deux sous-unités similaires ou identiques de 220 à 250 kDa liées entre elles par un pont disulfure, formant ainsi un dimère. Chaque monomère est constitué de la combinaison de trois types de domaines répétés

homologues différents appelés Types I, II et III [Hynes, 1990]. Plus de la moitié des molécules sont composées de répétitions du motif III. La fibronectine contient des domaines de fixation pour la fibrine, l'héparine, les collagènes et les intégrines. Cette protéine est abondante dans le sang et dans la plupart des tissus.

Les laminines sont abondantes dans les membranes basales. Ce sont des hétérotrimères en forme de croix composés de trois chaînes α , β et γ . Il existe 5 chaînes α , 3 chaînes β et 3 chaînes γ , chacune codée par un gène individuel et formant ainsi 15 laminines distinctes. Les laminines peuvent moduler certaines fonctions cellulaires comme la différenciation des cellules épithéliales ou l'ancrage des cellules basales épidermales.

I.1.3. Les protéoglycanes

Les glycosaminoglycanes (GAGs) sont composés de longues chaînes linéaires sulfatées composées de la répétition d'un diholoside de base contenant toujours un glycosamine (N-acétylglucosamine (GlcNAc) ou N-acétylgalactosamine (GalNAc)) et d'un autre ose (acide glucuronique (GlcA), acide iduronique (IdoA) ou galactose (Gal)). Les GAGs comprennent le chondroïtine sulfate (cartilage élastique, cartilage hyalin, os, derme, cornée), le dermatane sulfate (derme, tendon, ligament, cartilage fibreux), le kératane sulfate (cartilage, cornée), l'héparine/héparane sulfate (foie, poumon, aorte) et l'acide hyaluronique (peau, cartilage, liquide synovial).

Les GAGs se fixent généralement de manière covalente à une protéine pour former les protéoglycanes. Les GAGs et les protéoglycanes forment un « gel » où vont pouvoir venir s'intégrer des protéines fibreuses, telles que le collagène. Ce « gel » permet la diffusion d'hormones et de nutriments.

I.2. Les métalloprotéinases matricielles (MMPs)

La MEC est une structure extrêmement dynamique qui est en perpétuel renouvellement, alternant synthèse et dégradation. Le remodelage de la MEC est assuré par un grand nombre d'enzymes protéolytiques, incluant les protéinases à acide aspartique, les

protéinases à cystéine, les sérines protéinases et les métalloprotéinases matricielles (MMPs). Les MMPs représentent une des classes principales d'enzymes responsable du renouvellement de la MEC [Kerrigan et coll., 2000].

I.2.1. Classification des MMPs

Les MMPs sont des endopeptidases qui peuvent cliver les composants de la MEC. Elles sont synthétisées par les cellules des tissus endogènes, mais également par un grand nombre de cellules hématopoïétiques [Murphy, 1995]. Les MMPs jouent un rôle important dans différents processus biologiques tels que l'embryogénèse, le remodelage tissulaire et l'angiogénèse mais également dans certaines pathologies telles que l'arthrite, le cancer, l'athérosclérose et les fibroses [Woessner, 1998].

A ce jour, 23 MMPs ont été identifiées chez l'Homme [Nagase et coll., 2006]. Elles ont tout d'abord été classées en 5 sous-groupes selon leur spécificité de substrat : on trouve les collagénases, gélatinases, stromélysines et matrilysines et MMPs transmembranaires [Kerrigan et coll., 2000] (Tableau 1).

Un nouveau système de classification des MMPs a ensuite été établi en fonction de leur structure.

Sous-classe	Enzyme	N° de MMP	Substrats
<i>Collagénases</i>	Collagénase interstitielle	MMP-1	Collagènes I, II, III, VII, VIII, X, gélatine, protéoglycane, aggrécane, versicane, ténacine, entactine
	Collagénase neutrophile	MMP-8	Collagènes I, II, III, V, VII, VIII, X, gélatine, aggrécane
	Collagénase-3	MMP-13	Collagènes I, II, III, IV, IX, X, XIV, gélatine, aggrécane, perlécane, fibronectine, ostéonectine
	Collagénase-4	MMP-18	Non connu
<i>Gélatinases</i>	Gélatinase-A	MMP-2	Collagènes I, IV, V, VII, X, XI, XIV, gélatine, élastine, fibronectine, laminine-1 et -5, galectine-3, versicane, protéoglycane, ostéonectine
	Gélatinase-B	MMP-9	Collagènes IV, V, VII, X, XIV, gélatine, élastine, galectine-3, aggrécane, fibronectine, versicane, protéoglycane, entactine, ostéonectine
<i>Stromélysines</i>	Stromélysine-1	MMP-3	Collagènes III, IV, V, IX, gélatine, aggrécane, versicane, perlécane, décorine, protéoglycane, ténascine-C, fibronectine, laminine, entactine, ostéonectine
	Stromélysine-2	MMP-10	Collagènes III, IV, V, gélatine, caséine, aggrécane, élastine, protéoglycane
	Stromélysine-3	MMP-11	Caséine, laminine, fibronectine, gélatine, collagène IV, transférine carboxyméthylée
<i>Membrane Type (MT-MMPs)</i>	MT1-MMP	MMP-14	Collagènes I, II, III, caséine, élastine, fibronectine, gélatine, laminine, vitronectine, ténascine-C, entactine, protéoglycanes
	MT2-MMP	MMP-15	Tenascine-C, fibronectine, laminine, entactine, aggrécane, perlécane
	MT3-MMP	MMP-16	Collagène III, fibronectine, gélatine, caséine
	MT4-MMP	MMP-17	Non connu
	MT5-MMP	MMP-24	Non connu
	MT6-MMP	MMP-25	Non connu
<i>Autres types</i>	Matrilysine	MMP-7	Collagène IV, V, gélatine, aggrécane, décorine, protéoglycane, fibronectine, laminine, fibronectine, entactine, tenascine-C, ostéonectine, intégrine, élastine, caséine, transférine
	Matrilysine-2	MMP-26	Collagène IV, gélatine, fibronectine
	Métalloélastase	MMP-12	Collagène IV, gélatine, élastine, caséine, laminine, fibronectine, vitronectine, entactine
	Non nommée	MMP-19	Gélatine
	Enamélysine	MMP-20	Amélogénine
	XMMP (Xénope)	MMP-21	Non connu
	CMMP (Poulet)	MMP-22	Non connu
	Non nommée	MMP-23	Non connu
	Epilysine	MMP-28	Caséine

Tableau 1: Classification des MMPs en fonction de la spécificité de substrat [d'après Chakraborti et coll., 2003]

1.2.2. Structure des MMPs

Les MMPs possèdent toutes une structure et des motifs fonctionnels semblables, ce qui démontre un mécanisme de protéolyse identique [Birkedal-Hansen et coll., 1993]. La plupart des MMPs sont organisées en trois domaines distincts et bien conservés : un propeptide N-terminal, un domaine catalytique et un domaine hémapexine situé en C-terminal (Figure 2).

Les différents motifs constituant les MMPs sont :

- Le peptide signal (Pre) : il est constitué d'une séquence de 17-20 acides aminés hydrophobes qui facilite la sécrétion des MMPs dans l'espace extracellulaire *via* le réticulum endoplasmique.
- Le propeptide (Pro) : il est constitué de 80-90 acides aminés et contient un groupement thiol (-SH) qui interagit avec l'ion zinc situé dans le domaine catalytique, permettant ainsi le maintien des MMPs sous forme de zymogène inactif (pro-MMP).
- Le motif de reconnaissance des sérines protéases à Furine intracellulaire (Fu) : cette séquence de 25 acides aminés hydrophobes permet l'activation intracellulaire des MMPs par les sérines protéases à furine.
- Le domaine catalytique : il contient la séquence HEXXHXXGXXH qui est un site de fixation à un ion zinc (Zn). Le Zn est présent dans le site actif et est essentiel pour l'activité protéolytique des MMPs. Le domaine catalytique est composé de 160-170 acides aminés, les 50-54 acides aminés en C-terminal étant responsables de la fixation du Zn.
- Le domaine similaire aux séquences répétées de type II de la fibronectine (Fi) : seules les gélatinases (MMP-2 et -9) présentent 3 répétitions du domaine de type II de la fibronectine insérées dans le domaine catalytique juste avant le site de fixation de l'ion Zn. Ces résidus permettent la fixation de l'enzyme à la gélatine [Strongin et coll., 1993].
- La région charnière (H) : elle est située entre le domaine catalytique et le domaine hémapexine. Les MMP-7, -23 et -26 ne possèdent pas de région charnière.
- Le domaine hémapexine : il permet l'interaction des MMPs avec les TIMPs (Inhibiteurs Tissulaires des Métalloprotéinases), certaines molécules présentes à la

surface cellulaire et les substrats protéolytiques. La première et la dernière répétition des quatre répétitions du domaine hémapexine sont reliées par un pont disulfure (S-S).

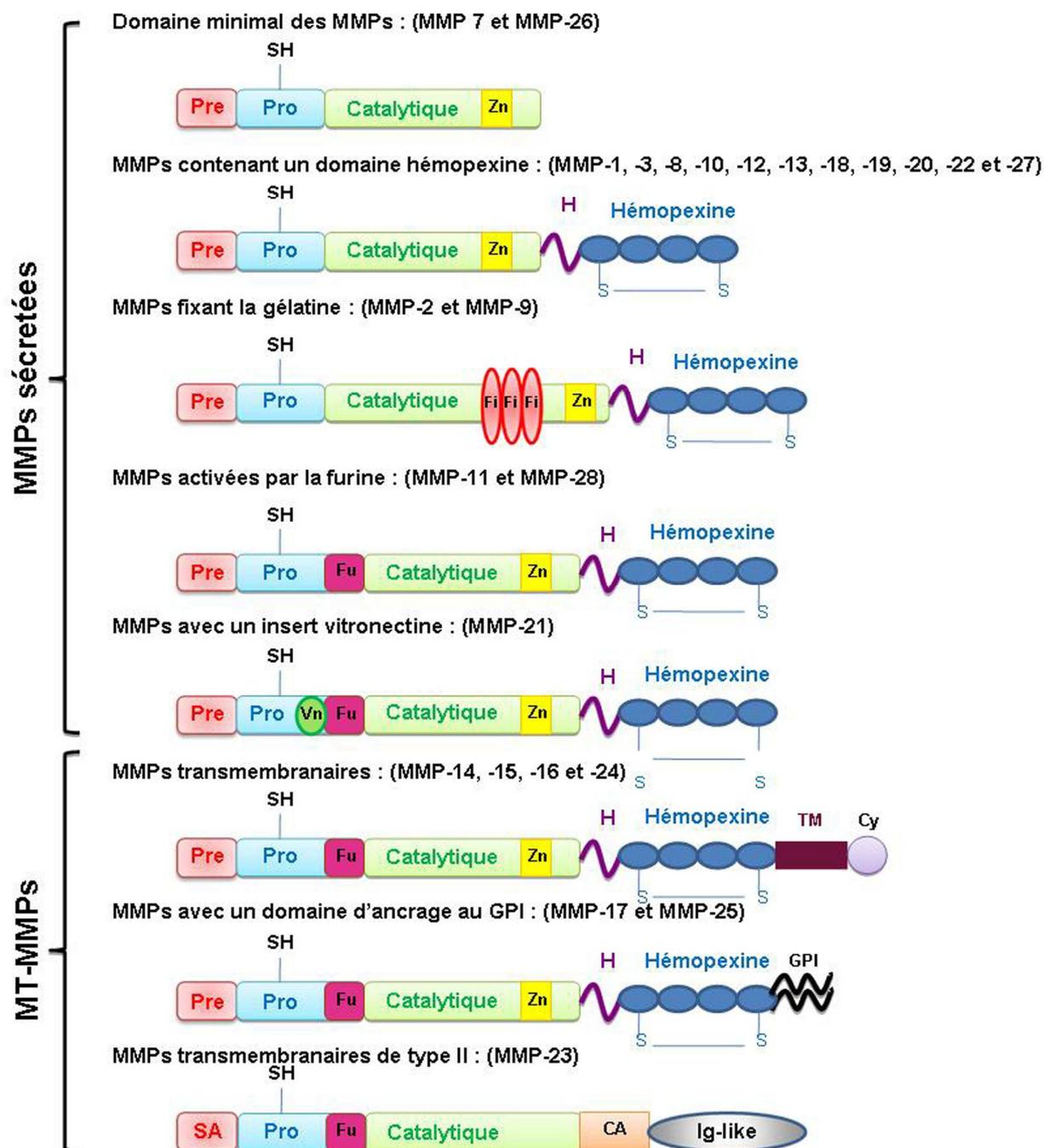


Figure 2: Structure des MMPs [Egeblad et Werb, 2002]

Pre = peptide signal, Pro = propeptide, catalytique = domaine catalytique, Zn = site de fixation du zinc, H = région charnière, hémapexine = domaine hémapexine, Fi = domaine similaire aux séquences répétées de type II de la fibronectine, Fu = domaine de reconnaissance des sérine protéases à furine intracellulaire, TM = domaine transmembranaire, Cy = domaine cytoplasmique, GPI = glycosylphosphatidylinositol, CA = domaine riche en cystéine, Ig-like = domaine similaire à l'immunoglobuline, SA = site d'ancrage

Il existe 8 catégories distinctes de MMPs : cinq MMPs sont sécrétées et trois sont fixées à la membrane, ce sont les membrane-type MMPs (MT-MMPs) [Egeblad et Werb, 2002].

Parmi les MT-MMPs, on trouve :

- ✓ Les MMPs transmembranaires qui possèdent un domaine C-terminal, un domaine à une seule traversée transmembranaire (TM) et un domaine cytoplasmique (Cy) très court.
- ✓ Les MMPs avec un domaine d'ancrage par un glycosylphosphatidylinositol (GPI).
- ✓ La MMP-23 représente le troisième type de MT-MMPs. Elle possède une séquence signal d'ancrage N-terminale (SA) qui la situe à la membrane plasmique. La MMP-23 est donc une MMP transmembranaire de type II. Elle possède un domaine unique riche en cystéine et un domaine similaire à l'immunoglobuline situé après le domaine catalytique.

1.2.2. Régulation des MMPs

La plupart des MMPs ne sont pas constitutivement exprimées par les cellules *in vivo*. Leur expression est induite en réponse à des agents exogènes tels que les cytokines, les facteurs de croissance et les hormones. Afin d'éviter une protéolyse excessive et des dommages tissulaires, l'activité protéolytique des MMPs est régulée à trois niveaux : au niveau transcriptionnel, au niveau de l'activation de la pro-enzyme et au niveau de l'inhibition de l'activité protéolytique.

1. Régulation transcriptionnelle

L'expression génique et la sécrétion des MMPs peuvent être contrôlées par un grand nombre de cytokines pro-inflammatoires (interleukine-1 β (IL-1 β), IL-6), de facteurs de croissance (PDGF (Platelet Derived Growth Factor)), d'hormones telles que les corticostéroïdes et de promoteurs tumoraux (TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α)) [Thompson et coll., 1996].

2. Activation de la pro-enzyme

Les MMPs sont sécrétées sous forme de pro-enzymes latentes qui doivent subir un clivage. Le propeptide permet de maintenir les pro-MMPs dans un état inactif. Un groupement cystéine-sulfhydryl à l'intérieur du motif consensus PRCGXPDV dans le domaine propeptide lie l'atome de zinc au site actif de l'enzyme, prévenant ainsi l'activation de la pro-MMP. Le processus d'activation des MMPs est un mécanisme en deux étapes : la première étape correspond au clivage peptidique à l'intérieur du prodomaine par d'autres MMPs déjà activées ou par certaines sérine protéases. La cystéine va alors réagir avec une molécule d'eau permettant la rupture de la liaison cystéine/Zn. Cette étape initiale est suivie par un clivage protéolytique du côté C-terminal du site PRCGXPDV par des enzymes activatrices telles que la MMP-3 ou par clivage autolytique conduisant à une perte irréversible du résidu cystéine [Nagase et coll., 1999 ; Nagase, 1997 ; Sternlicht et Werb, 2001] (Figure 3).

Une autre alternative de l'étape initiale correspond à la rupture de la liaison cystéine-Zn par des agents chimiques, tels que les agents modifiant le groupement thiol (HgCl_2 , N-éthylmaléimide ou l'acétate 4-aminophénylmercurique), le SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) et les agents chaotropiques. Les MMPs peuvent également être activées par une baisse de pH ou une augmentation de température.

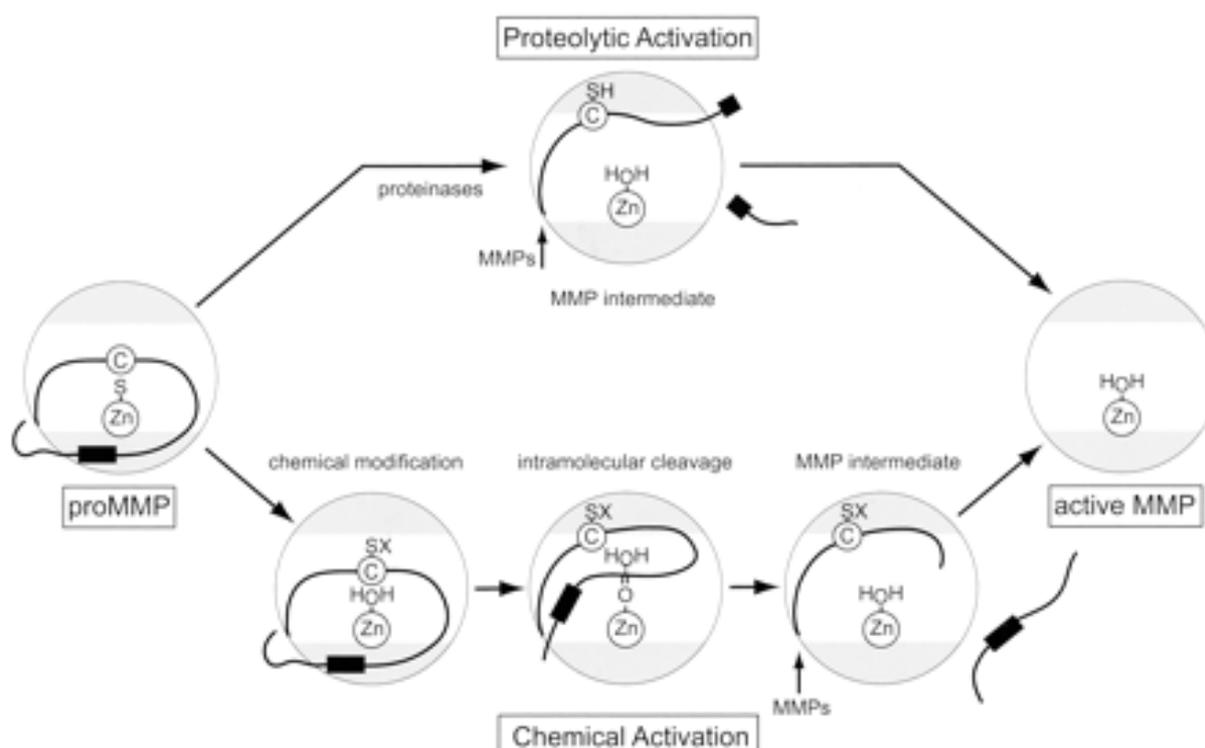


Figure 3: Processus d'activation des pro-MMPs [Visse et Nagase, 2003].

Les principaux mécanismes physiologiques d'activation des pro-MMPs sont :

- L'activation extracellulaire par d'autres MMPs, principalement par les MT-MMPs. L'exemple le plus représentatif de ce mécanisme est l'activation de la pro-MMP-2 par le complexe MT1-MMP/TIMP-2 [Nollendorfs et coll., 2001; Annabi et coll., 2002]. Le TIMP-2 se fixe sur la MT1-MMP et le complexe TIMP-2/MT1-MMP agit comme un récepteur pour la pro-MMP-2. Le complexe trimérique MT1-MMP/TIMP-2/pro-MMP-2 est ensuite présenté à une MT1-MMP adjacente, ce qui va faciliter le clivage protéolytique du propeptide et induire l'activation de la pro-MMP-2.
- L'activation extracellulaire par des agents non-protéolytiques. Les activateurs les plus connus sont la plasmine, le système uPA (Urokinase Plasminogen Activator) et son récepteur spécifique uPA-r, les inhibiteurs du plasminogène (PAI-1 et PAI-2) et les espèces réactives de l'oxygène. La plasmine a un double rôle : elle peut dégrader directement les composés de la MEC et catalyser l'activation de la majorité des pro-MMPs.

3. Inhibition de l'activité protéolytique par des inhibiteurs endogènes

L'activité protéolytique des MMPs est également contrôlée par certains inhibiteurs endogènes tels que l' α 2-macroglobuline, les thrombospondines et la protéine RECK (REversion-inducing Cystein rich protein with Kazal motifs). Les MMPs peuvent également être inhibées par leurs inhibiteurs naturels, les TIMPs (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase).

II. Les TIMPs

II.1. Généralités

II.1.1. Structure des TIMPs

A ce jour, 4 TIMPs sont caractérisés chez les mammifères et appelés TIMP-1 à TIMP-4. Ils sont exprimés par différents types cellulaires comme les kératinocytes, fibroblastes,

ostéoclastes et cellules endothéliales et sont présents dans la plupart des tissus et fluides corporels [Stamenkovic, 2000].

Les TIMPs sont des protéines de 21 à 34 kDa qui possèdent 12 résidus cystéyles conservés qui forment 6 ponts disulfures, permettant ainsi le repliement de la protéine en deux domaines: un grand domaine N-terminal d'environ 125 acides aminés et un petit domaine C-terminal d'environ 65 acides aminés [Gomez et coll., 1997 ; Visse et Nagase, 2003]. Le domaine N-terminal des TIMPs joue un rôle important dans l'inhibition des MMPs tandis que le domaine C-terminal semble être impliqué dans la formation de complexes avec les pro-enzymes (Figure 4).

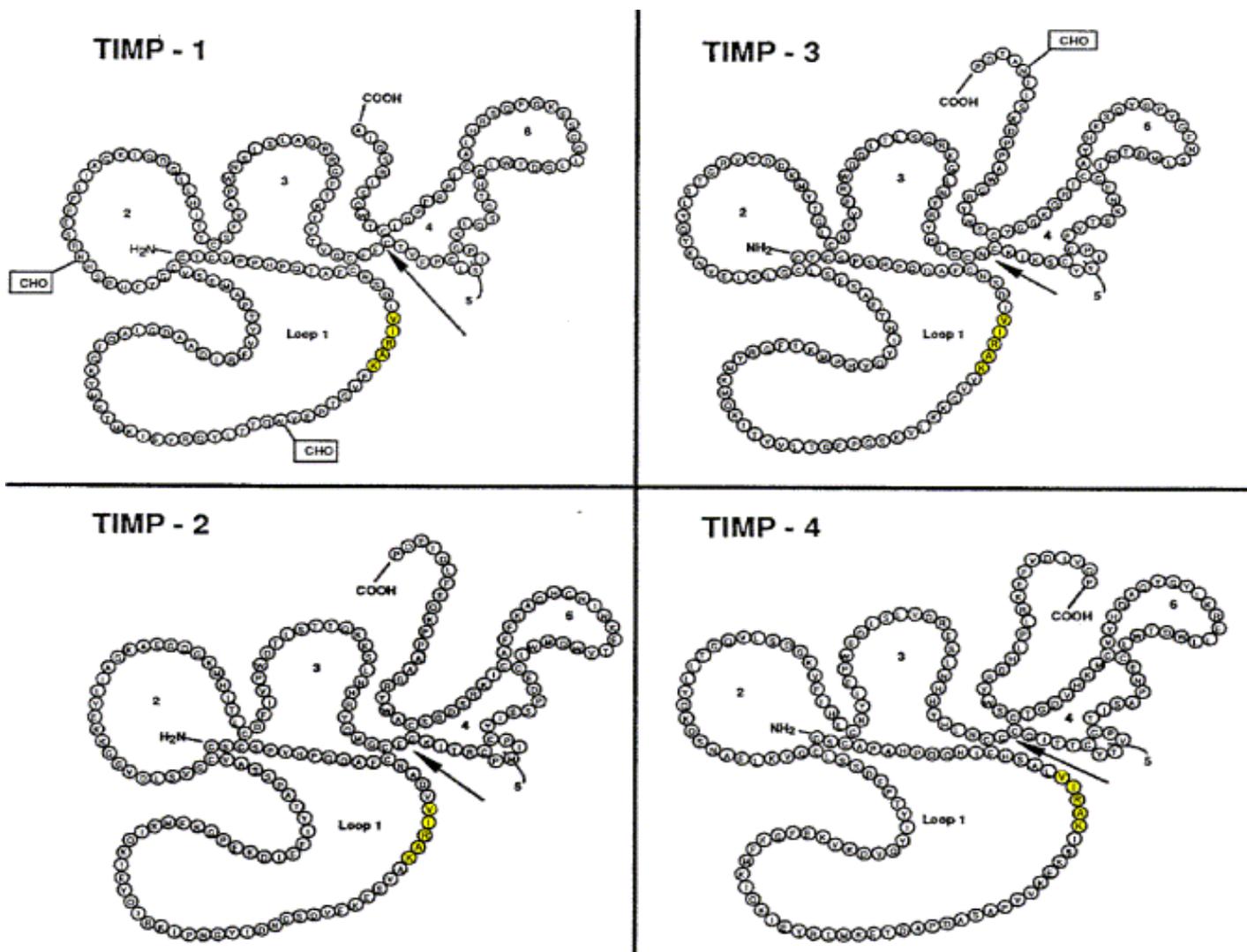


Figure 4: Structure primaire des TIMPs [Douglas et coll., 1997]. Les flèches indiquent la jonction entre le domaine N-terminal et le domaine C-terminal des TIMPs. La séquence VIRAK est indiquée en jaune.

Les 22 premiers acides aminés du domaine N-terminal des formes matures des TIMPs sont hautement conservés et sont nécessaires à l'activité inhibitrice des MMPs [Hayakawa, 2002]. L'isolement du domaine N-terminal du TIMP-1 montre que cette région seule est responsable de l'activité inhibitrice des MMPs [Huang et coll., 1996 ; Murphy et coll., 1991]. Des approches expérimentales ont confirmé ce résultat. Ainsi, par des expériences de mutagenèse dirigée, une séquence entre les cystéines 3 et 13 a été définie comme étant primordiale pour l'activité inhibitrice des MMPs [O'Shea et coll., 1992]. D'autres études de mutations ont montré que le pont disulfure entre les cystéines 1 et 70 situées dans le domaine N-terminal du TIMP-1 joue un rôle primordial dans l'inhibition de l'activité des MMPs [Caterina et coll., 1997].

Les TIMP-1 et TIMP-2 possèdent 40 % d'homologie, principalement dans leur domaine N-terminal. Dans le domaine N-terminal est présente la séquence VIRAK (en jaune), le rôle de cette séquence n'est toujours pas identifié.

Les TIMPs ont des caractéristiques moléculaires différentes, comme par exemple la solubilité, l'interaction avec les pro-enzymes et la régulation de leur expression. Le TIMP-3 interagit spécifiquement avec des glycosaminoglycanes sulfatés, ce qui le lie à la MEC, alors que les autres TIMPs sont solubles [Lambert et coll., 2003].

Toutes les caractéristiques des TIMPs sont résumées dans le Tableau 2.

	TIMP-1	TIMP-2	TIMP-3	TIMP-4
Localisation chromosomique	Xp11,23-11,4	17q23-17q25	22q12,1-22q13,2	3p25
mRNA (kb)	0,9	3,5-1,0	5,0 (2,6-2,4)	1,4
Masse moléculaire (kDa)	28,5	21	22/27	22
Acides aminés	23	26	23	29
Peptide signal				
Forme mature	184	194	188	196
Homologie de séquence				
Sites de N-glycosylation	2	0	1	0
Localisation de la protéine	soluble	soluble/surface cellulaire	MEC	soluble/surface cellulaire
Association avec des pro-MMPs	pro-MMP-9	pro-MMP-2	pro-MMP-2/-9	pro-MMP-2
MMPs faiblement inhibées	MT1-MMP MT2-MMP MT3-MMP MT5-MMP MMP-19	aucune	aucune	aucune
Inhibition des ADAMs	ADAM-10	aucune	ADAM-12 ADAM-17 ADAM-19 (ADAM-10) ADAMTS-4, TS-5	aucune
Expression	inductible	constitutive	inductible	inductible

Tableau 2: Caractéristiques moléculaires des TIMPs [Lambert et coll., 2004]

II.1.2. Structure du TIMP-1

Le TIMP-1 est exprimé dans de nombreux types cellulaires comme les fibroblastes, les cellules épithéliales et endothéliales, les ostéoblastes, les chondrocytes, les cellules de muscle lisse ainsi que dans plusieurs types de cellules tumorales [Welgus et coll., 1985 ; Bord et coll., 1999 ; Cawston et coll., 1986]. Il est également exprimé dans les lignées de cellules myéloïdes, érythroïdes et mégacaryoblastiques mais pas dans les lignées lymphoïdes [Murate et coll., 1997 ; Ries et coll., 1999]. Une augmentation significative du taux de TIMP-1 a été détectée chez les patients atteints de dérèglements hématologiques [Murate et coll., 1997].

Le TIMP-1 est une protéine glycosylée dont le poids moléculaire varie de 28,5 à 34 selon le degré de glycosylation. Les oligosaccharides sont composés d'acide sialique, mannose, galactose et N-acétylglucosamine. La glycosylation du TIMP-1 semble jouer un rôle dans différentes fonctions telles que le repliement correct de la protéine, le transport à la surface cellulaire et la stabilité de la protéine [Caterina et coll., 1998]. Le TIMP-1 est composé de 184 acides aminés dont 12 résidus cystéyles conservés. Le domaine N-terminal comporte 126 acides aminés et le domaine C-terminal 58 acides aminés. Ces deux domaines sont composés chacun de trois boucles. La structure tridimensionnelle du TIMP-1, représentée dans la figure 5, est organisée en 4 hélices α (représentées en rouge) et 10 feuillets β (représentés en bleu) dont 6 sont localisés dans la partie N-terminale [Gomez et coll., 1997].

Le TIMP-1 possède un petit exon 1 qui est transcrit mais non traduit, ce qui le différencie des autres TIMPs. La fonction de l'exon 1 semble être liée au contrôle de la spécificité tissulaire et semble contenir des éléments répresseurs spécifiques des tissus [Clark et coll., 2008 ; Dean et coll., 2000].

La régulation du TIMP-1 se déroule principalement au niveau transcriptionnel et implique les facteurs de transcription AP-1, SP-1, NF- κ B, CRE et GATA-1 [Aicher et coll., 2003 ; Bachmeier et coll., 2005 ; Bohelho et coll., 1998 ; Logan et coll., 1996 ; Sohara et coll., 2002 ; Kadri et coll., 2005].

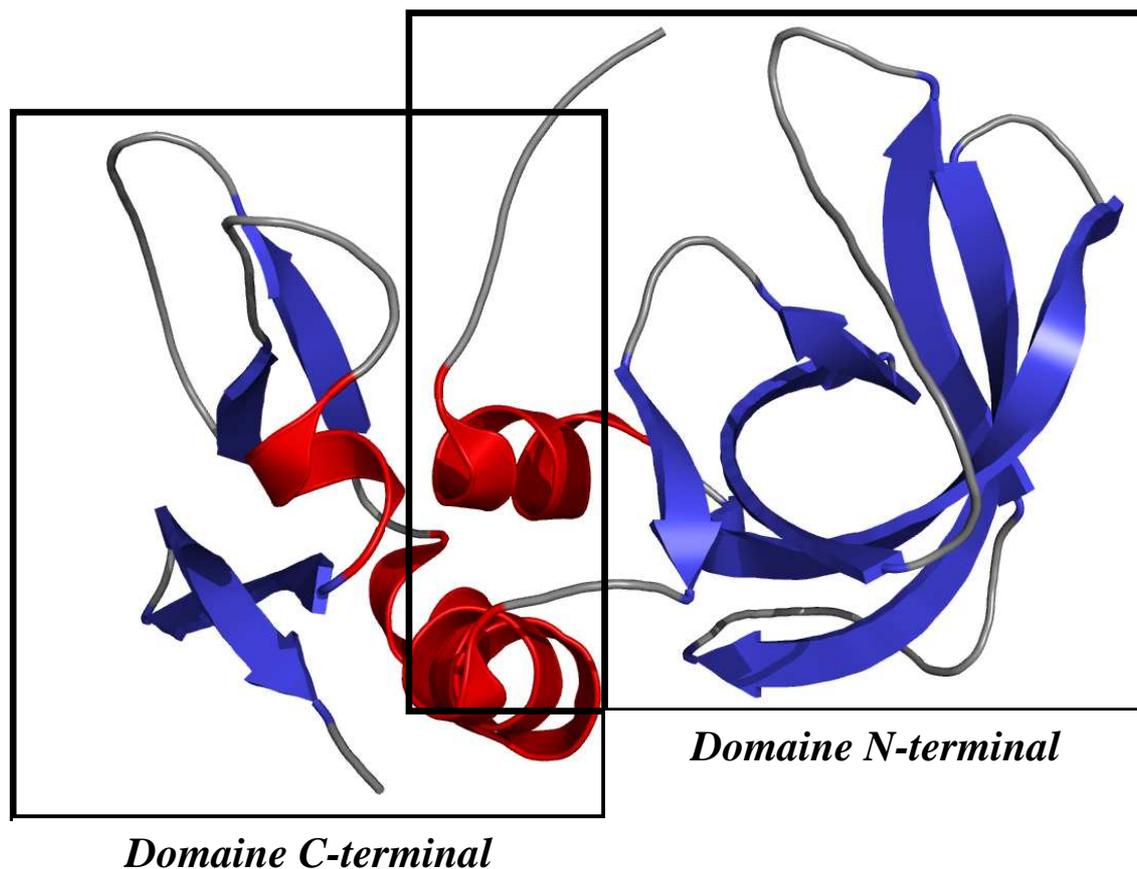


Figure 5: Structure tridimensionnelle du TIMP-1 (d'après PDB n° 1UEA) [Gomis-Ruth et coll., 1997]

II.2. Régulation des TIMPs

L'expression des TIMPs peut être régulée au niveau transcriptionnel par différentes cytokines et facteurs de croissance. Leur expression est donc spécifique du tissu, constitutive ou inductible [Clark et coll., 2008]. Ainsi, le TIMP-1 est exprimé dans les organes reproducteurs et le TIMP-3 dans le cœur, le rein et le thymus. L'expression du TIMP-4 est plus sélective puisque le TIMP-4 est trouvé principalement dans le cœur et le cerveau et dans une moindre mesure dans les muscles et les ovaires [Baker et coll., 2002 ; Nuttall et coll., 2004].

L'expression du TIMP-2 est constitutive, tandis que celle des TIMP-1, -3 et -4 est inductible. En effet, l'expression du TIMP-1 peut être induite par différents stimuli extérieurs

comme les facteurs de croissance (PDGF, EGF), les esters de phorbol, le sérum et les cytokines (IL-6, IL-1 et IL-1 β). L'érythropoïétine (Epo) a été décrite comme pouvant induire l'expression et la sécrétion de TIMP-1 dans la lignée érythroleucémique humaine UT-7 dépendante de l'Epo et dans les progéniteurs érythroïdes CD36⁺ isolés à partir de sang de cordon ombilical [Kadri et coll., 2000].

II.3. Activités biologiques des TIMPs

II.3.1. Activité inhibitrice des MMPs

La première fonction décrite pour les TIMPs est d'inhiber les MMPs afin de réguler la dégradation de la MEC durant le développement et le remodelage tissulaire. Les TIMPs inhibent les MMPs en formant des complexes stœchiométriques 1 :1 entre le domaine N-terminal du TIMP et le site actif de la MMP. Les TIMPs diffèrent dans leur capacité à inhiber les MMPs [Nagase et Woessner, 1999]. Le TIMP-1 inhibe préférentiellement la MMP-1 et la MMP-3 [Howard et coll., 1991 ; Ward et coll., 1991 ; Taylor et coll., 1996]. Il inhibe également les MMPs-2, -8 et -9 [Apte et coll., 1995] et dans une moindre mesure la MMP-19 et les MT1, 2, 3 et 5-MMPs.

En plus d'inhiber les formes actives des MMPs, les TIMPs peuvent également se lier aux pro-enzymes. La fixation TIMP/pro-MMP est de stœchiométrie 1:1, non covalente et permet d'inhiber l'auto-activation intramoléculaire des proenzymes [Howard et coll., 1991 ; Okada et coll., 1992]. Ces complexes impliquent le domaine C-terminal du TIMP et le domaine C-terminal de la pro-MMP. De plus, le TIMP complexé à la pro-MMP est toujours capable d'inhiber les MMPs actives, ce qui suggère la formation d'un complexe ternaire. Ainsi, le TIMP-1 se fixe principalement à la pro-MMP-9 au niveau de son domaine similaire à l'hémopexine [Gomez et coll., 1997 ; Olson et coll., 2000] tandis que le TIMP-2 se fixe à la pro-MMP-2, facilitant ainsi son activation [Ward et coll., 1991 ; Howard et coll., 1991]. Le TIMP-3 peut se fixer à la pro-MMP-2 et à la pro-MMP-9 [Butler et coll., 1999]. Le TIMP-4 peut se fixer à la pro-MMP-2 d'une manière similaire au TIMP-2, mais cette liaison conduit à l'inhibition compétitive de l'activation de la pro-MMP-2 par la MT1-MMP [Bigg et coll., 1997, Hernandez-Barrantes et coll., 2001].

Enfin, le TIMP-1 peut également inhiber d'autres métalloenzymes à zinc, les ADAMs (A Disintegrin And Metalloproteinase). En effet, le TIMP-1 inhibe préférentiellement l'ADAM-10 [Amour et coll., 2000].

II.3.2. Activité EPA (Erythroid Potentiating Activity)

En plus de leur activité inhibitrice des MMPs, les TIMPs sont également capables de réguler d'autres fonctions cellulaires telles que la prolifération, l'apoptose et l'angiogénèse.

Le TIMP-1 a été initialement décrit pour son activité EPA (Erythroid Potentiating Activity). L'activité EPA, produite par la lignée humaine de lymphocytes T (Mo), est capable de potentialiser les effets de l'Epo sur la prolifération de progéniteurs érythroïdes normaux (BFU-E et CFU-E) et de lignées érythroleucémiques humaines K562 et murines Friend [Westbrook et coll., 1984 ; Gauwerky et coll., 1980 ; Avalos et coll., 1988]. Des études de clonage moléculaire ont montré que le TIMP-1 et l'EPA étaient une seule et même protéine [Gasson et coll., 1985 ; Docherty et coll., 1985]. Des études d'Hakawaya et coll. ont montré que le TIMP-1 produit par la lignée cellulaire humaine stromale de moelle osseuse KM102 présente une activité EPA et une activité inhibitrice de MMPs [Hakawaya et coll., 1990]. L'activité EPA maximale observée *in vitro* pour les TIMP-1 et -2 varie de 80 à 100 pM, soit une concentration beaucoup plus faible que la concentration plasmatique qui est de 10 à 20 nM [Larsen et coll., 2005 ; Corcoran et Stetler-Stevenson, 1995].

Des expériences de mutation ponctuelle du domaine N-terminal du TIMP-1 montrent que le TIMP-1 muté conserve une activité EPA similaire à celle du TIMP-1 non muté, mais ne possède plus d'activité inhibitrice des MMPs [Chesler et coll., 1995]. Une séquence primordiale pour l'activité inhibitrice des MMPs a ainsi été définie entre les résidus cytéyles 3 et 13 appartenant au domaine N-terminal [O'Shea et coll., 1992]. Ces résultats indiquent que l'activité inhibitrice des MMPs et l'activité EPA du TIMP-1 impliquent des domaines différents.

II.3.3. Activité mitogénique

Le TIMP-1 a été décrit pour son activité mitogénique dans de nombreux types cellulaires comme les fibroblastes, les kératinocytes et différentes lignées de carcinome [Bertaux et coll., 1991 ; Hayakawa et coll., 1992 ; Yamashita et coll., 1996]. L'activité mitogénique est obtenue pour des concentrations de TIMP-1 comprises entre 10 et 50 nM selon le type cellulaire étudié.

Le TIMP-1, tout comme le TIMP-2, est un constituant du sérum humain et du sérum de veau fœtal (SVF) [Hayakawa et coll., 1992 ; Kodama et coll., 1989 ; Fujimoto et coll., 1995]. Hayakawa et coll. ont montré qu'en absence de TIMP-1 dans le sérum, la prolifération des cellules normales et cancéreuses était inhibée, mais pouvait être restaurée par ajout de TIMP-1 dans le milieu de culture. Ces résultats mettent en évidence l'importance des TIMP-1 et -2 comme facteur de croissance dans le sérum [Hayakawa et coll., 1994].

Une étude récente indique que le TIMP-1 induit l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 en inhibant la cycline D1 et en augmentant la régulation de la protéine p27^{Kip} et l'autophosphorylation de la protéine du rétinoblastome (pRb) [Taube et coll., 2006]. Ces données suggèrent que le TIMP-1 induit l'inhibition de la prolifération cellulaire. Bien qu'elles soient arrêtées en phase G1 du cycle cellulaire, les cellules surexprimant du TIMP-1 restent viables et ne présentent aucun signe d'apoptose, ce qui est en accord avec l'effet anti-apoptotique du TIMP-1.

Les TIMP-3 et -4 régulent également la prolifération de plusieurs lignées cellulaires. Le TIMP-3 induit la croissance des fibroblastes embryonnaires de poulet en culture et le TIMP-4 inhibe la prolifération des cellules cancéreuses G401 de Wilm [Yang et coll., 1992 ; Celiker et coll., 2001].

De nombreuses études montrent que la prolifération cellulaire induite par les TIMP-1 et -2 est indépendante de l'activité des MMPs. En effet, des expériences avec des TIMPs réduits et alkylés, dépourvus d'activité inhibitrice des MMPs, montrent que les TIMPs conservent leur activité mitogénique [Hayakawa et coll., 1994].

II.3.3. Effet pro- ou anti-apoptotique

En plus de leur activité mitogénique, les TIMPs peuvent également réguler l'apoptose cellulaire, soit en l'activant soit en l'inhibant.

Le TIMP-1 inhibe l'apoptose de cellules de lymphome de Burkitt, de lymphocytes B, de cellules épithéliales mammaires humaines MCF10A et de cellules de carcinome mammaire T47-D [Li et coll., 1999 ; Stetler-Stevenson et coll., 1997 ; Guedez et coll., 1998 ; Liu et coll., 2005]. L'effet anti-apoptotique du TIMP-1 a également été décrit dans les cellules érythroleucémiques humaines UT-7 et les cellules myéloïdes murines 32D [Lambert et coll., 2003].

Le TIMP-2 a été décrit pour son activité pro-apoptotique dans les lymphocytes humains et pour son activité anti-apoptotique dans les cellules de mélanome B16F10 [Valente et coll., 1998, Lim et coll., 1999].

Le TIMP-3 induit l'apoptose des cellules de muscle lisse vasculaire et de différentes lignées tumorales comme les lignées Hela, MCF-7, HT1080 et K562 [Baker et coll., 1998 ; Ahonen et coll., 2003 ; Baker et coll., 1999]. Il induit également l'apoptose de cellules de cancer du colon [Bian et coll., 1996 ; Smith et coll., 1997]. Le TIMP-3 possède également des propriétés anti-apoptotiques. En effet, des études réalisées avec des souris TIMP-3 démontrent une accélération de l'apoptose dans les cellules des glandes mammaires [Fata et coll., 2001].

Le TIMP-4 induit la survie des cellules de carcinome mammaire mais également l'apoptose des fibroblastes cardiaques et des cellules de muscle lisse chez le rat [Guo et coll., 2004 ; Baker et coll., 2002 ; Tummalapalli et coll., 2001]

Les mécanismes par lesquels les TIMPs peuvent moduler l'apoptose sont dépendants ou non de l'inhibition des MMPs. En effet, dans les lymphocytes B, le TIMP-1 inhibe l'apoptose indépendamment de son activité inhibitrice des MMPs alors que dans les cellules hépatiques, l'inhibition des MMPs stimule l'effet anti-apoptotique du TIMP-1 [Guedez et coll., 1998 ; Murphy et coll., 2002].

II.3.4. Activité stéroïdogénique

Le TIMP-1 est exprimé dans les tissus stéroïdogéniques, comme les ovaires, la glande surrénale et le placenta. L'implication du TIMP-1 dans la stéroïdogénèse a été pour la première fois décrite dans les cellules de Leydig et les cellules de granulosa ovarienne [Boujrad et coll., 1995]. En formant un complexe avec la procathepsine L, le TIMP-1 peut stimuler la stéroïdogénèse et donc le développement des cellules germinales mâles et femelles.

II.3.5. Activité anti-angiogénique

L'angiogénèse correspond à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. C'est un processus physiologique normal que l'on retrouve notamment lors du développement embryonnaire. Mais c'est également un processus pathologique primordial dans la croissance des tumeurs malignes et le développement des métastases.

Les TIMPs présentent des propriétés anti-angiogéniques. L'implication des TIMPs dans l'angiogénèse a tout d'abord été décrite dans les membranes de sac du jaune d'œuf d'embryon de poulet où l'angiogénèse induite par des polyamines est inhibée par les TIMP-1 et -2 [Takigawa et coll., 1990]. La surexpression de TIMP-1 dans les cellules de cancer pancréatique inhibe l'angiogénèse et l'implantation cellulaire [Bloomston et coll., 2002].

D'autres études ont montré que le TIMP-3 isolé à partir de requin possédait des activités anti-angiogéniques et anti-invasives [Kang et coll., 2003]. Des études plus récentes ont montré que le TIMP-3 inhibe l'angiogénèse tumorale dans les cellules de cancers pulmonaire et ovarien [Chetty et coll., 2008 ; Kang et coll., 2008].

D'autres études ont montré que le TIMP-4 pouvait quant à lui moduler l'angiogénèse *in vitro* mais qu'il était incapable de l'inhiber *in vivo* [Fernandez et Moses, 2006].

Toutes les activités biologiques des TIMPs sont résumées dans le tableau 3.

	TIMP-1	TIMP-2	TIMP-3	TIMP-4
Prolifération cellulaire	↑ précurseurs érythroïdes ↑ cellules tumorales ↑ fibroblastes ↑ kératinocytes ↑ cellules épithéliales ↓ cancer mammaire	↑ précurseurs érythroïdes ↑ cellules tumorales ↑ fibroblastes ↓ cellules de muscle lisse ↓ cellules endothéliales ↓ cellules tumorales ↓ neurones	↑ cellules de muscle lisse ↑ cellules tumorales ↓ cellules endothéliales ↓ cancer du colon	↑ cancer mammaire ↓ cellules tumorales de Wilm
Apoptose	↓ lymphome de Burkitt ↓ cancer mammaire ↓ lymphocytes B ↓ cardiomyocytes ↓ cellules hématopoïétiques	↑ cancer colorectal ↓ lymphocytes T humains ↓ mélanome	↑ cellules de muscle lisse ↑ cellules tumorales ↑ cellules épithéliales ↑ cancer du colon ↓ cancer mammaire	↑ fibroblastes cardiaques ↓ cancer mammaire
Angiogénèse tumorale	↑ cancer mammaire ↓ cancer du foie ↓ cancer du pancréas	↓ mélanome ↓ cancer mammaire	↓ mélanome ↓ cancer du poumon ↓ cancer ovarien	
Angiogénèse <i>in vitro</i>	Pas d'effet	Inhibition	Inhibition	Inhibition
Tumorigénèse	Inhibition	Inhibition	Inhibition	Inhibition
Effet métastatique	Stimulation			Stimulation

Tableau 3: Activités biologiques des TIMPs

II.4. TIMPs et cancer

Le développement métastatique est constitué d'une série d'événements qui impliquent la dégradation de la MEC et l'angiogénèse, permettant ainsi la propagation et la prolifération des cellules cancéreuses. Ces événements impliquent les MMPs mais également les TIMPs. Un déséquilibre entre l'activité des MMPs et celle des TIMPs peut conduire à une dégradation excessive de la matrice, favorisant ainsi l'invasion tumorale et les métastases [Hicks et coll., 1984 ; Liotta et coll., 1991 ; Tanaka et coll., 1995]. De nombreuses études montrent que les effets des TIMPs se retrouvent à différents stades de la progression tumorale, comme l'invasion, l'angiogénèse, la prolifération et les métastases [Henriet et coll., 1999].

L'expression des TIMPs a été étudiée dans les tissus normaux et cancéreux [Li et coll., 2002 ; Korem et coll., 2002]. Une étude utilisant la technique de PCR quantitative a montré que les quatre TIMPs étaient exprimés dans la plupart des tissus murins sains [Nuttall et coll., 2004]. Le TIMP-2 est exprimé de manière abondante et constitutive dans tous les tissus murins adultes, alors que l'expression des autres TIMPs présente une distribution plus sélective. L'augmentation d'expression des TIMPs a été démontrée dans différents cancers comme celui du sein, du colon, du poumon et de l'estomac [Jiang et coll., 2002]. Alors que la fonction principale des TIMPs est l'inhibition des MMPs, des niveaux élevés de TIMPs devraient inhiber l'invasion et les métastases, et ainsi améliorer le pronostic de guérison. Dans les cellules cancéreuses humaines, l'expression du TIMP-2 est diminuée alors que celle du TIMP-1 est augmentée, et plus particulièrement dans les cas de cancers mammaire et colorectal. Or, l'expression élevée des TIMPs est corrélée à un mauvais pronostic dans différentes tumeurs solides. Ainsi, l'augmentation d'expression du TIMP-1 est souvent associée au mauvais pronostic de patients atteints de cancer colorectal, cancer mammaire, carcinome gastrique, cancer de la prostate et du poumon. Les niveaux plasmatiques de TIMP-1 de patients atteints de cancer de la prostate sont beaucoup plus élevés que les contrôles, ce qui suggère que le TIMP-1 est un marqueur de la progression maligne du cancer de la prostate [Lein et coll., 2002].

II.5. Les récepteurs des TIMPs et voies de signalisation associées

De nombreuses études ont démontré que les TIMPs pouvaient activer des voies de signalisation intracellulaires. Cependant, les récepteurs des TIMPs ne sont toujours pas identifiés et font l'objet de nombreux travaux [Stetler-Stevenson, 2008]. Les récepteurs des TIMPs semblent être spécifiques des types cellulaires considérés et des effets biologiques induits.

II.5.1. Le récepteur du TIMP-1

Les premières études du récepteur du TIMP-1 ont été réalisées avec du TIMP-1 radiomarqué et ont montré que le TIMP-1 se fixe à la surface des cellules leucémiques myéloïdes chroniques humaines K562 et des kératinocytes [Bertaux et coll., 1991 ; Avalos et coll., 1988]. Ces premiers résultats suggèrent que la fixation du TIMP-1 sur son récepteur est directe et covalente.

D'autres études ont été ensuite réalisées dans différents types cellulaires. Luparello et coll. ont étudié comment le TIMP-1 exogène stimule la prolifération des cellules de carcinome mammaire humain BC-61 [Luparello et coll., 1999]. Ils ont montré que les cellules BC-61 expriment sélectivement une protéine transmembranaire de 80 kDa qui est capable de fixer *in vivo* et *in vitro* le TIMP-1 avec une haute affinité ($K_D = 0,07 \pm 0,004$ nM). Par zymographie et PCR, ils ont montré que cette protéine de 80 kDa n'est pas une MMP.

Récemment, la protéine CD63, un membre de la famille des tétraspanines, a été identifiée comme la protéine permettant la fixation du TIMP-1 à la surface des cellules de cancer mammaire humaines MCF10A [Jung et coll., 2006]. Grâce à des expériences d'immunoprécipitation, Jung et coll. ont montré que le TIMP-1 biotinylé coimmunoprécipite avec CD63 dans les cellules MCF10A. L'interaction TIMP-1-CD63 à la surface cellulaire a été confirmée par des expériences de microscopie confocale. CD63 interagit avec le domaine C-terminal du TIMP-1, ce qui suggère que l'interaction entre CD63 et le TIMP-1 est indépendante de l'activité inhibitrice des MMPs du TIMP-1. Par des expériences d'immunoprécipitation et d'immunofluorescence, Jung et coll. ont également montré que le TIMP-1 et CD63 interagissent avec l'intégrine $\beta 1$ dans les cellules MCF10A. L'interaction TIMP-1/CD63/intégrine $\beta 1$ à la surface cellulaire régule les voies de signalisation conduisant à la survie cellulaire et l'inhibition de la prolifération cellulaire (Figure 6) [Berditchevski et

Odintsova, 1999]. Le TIMP-1 interagit avec CD63 qui est associée à l'intégrine $\beta 1$. En aval de CD63, le TIMP-1 inhibe la mort cellulaire par activation de la voie FAK/PI 3-kinase et de la kinase ERK. Le TIMP-1 inhibe la prolifération cellulaire par un mécanisme impliquant l'inhibition de la cycline D1 et la stimulation de la protéine $p27^{Kip1}$, conduisant à l'hypophosphorylation de la protéine pRb et l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1.

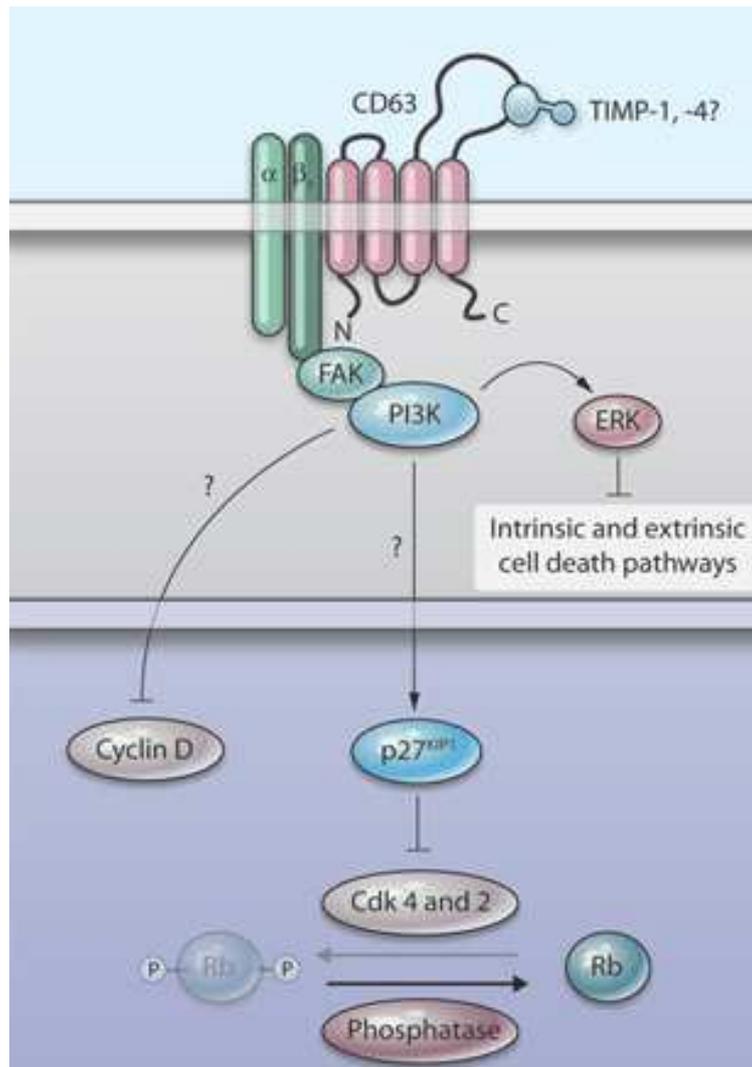


Figure 6: Voies de signalisation induites par l'interaction TIMP-1/CD63 [Stetler-Stevenson, 2008]

CD63 peut interagir également avec le TIMP-4 mais pas avec les TIMP-2 et -3 [Chirco et coll., 2006].

II.5.2. Le récepteur du TIMP-2

Des études de Seo et coll. ont montré pour la première fois que le TIMP-2 interagit avec l'intégrine $\beta 1$ à la surface des cellules endothéliales hMVECs [Seo et coll., 2003]. Ils ont montré que la fixation du TIMP-2 est saturable et réversible avec un K_d de 900 pM. Des études de fixation compétitives ont montré que la fixation du TIMP-2 à la surface de ces cellules hMVECs pouvait être bloquée par des anticorps bloquant les intégrines $\beta 1$ et $\alpha 3$, ce qui suggère que le TIMP-2 interagit avec l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ à la surface des cellules hMVECs. Ce résultat a été confirmé par des études d'immunoprécipitation.

La fixation du TIMP-2 sur l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ active différentes voies de signalisation en relation avec les effets suivants:

- ✓ Inhibition de la migration cellulaire : La fixation du TIMP-2 sur l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ active la C-terminal Src kinase (Csk), qui inactive la Src kinase (Src) et inhibe la phosphorylation de la paxilline (PAX) associée à l'intégrine $\alpha 3\beta 1$. La déphosphorylation de PAX active la GTPase Rap-1. L'augmentation de l'expression de RECK, un inhibiteur de MMPs associé à la membrane, est corrélée avec l'inhibition de la migration [Oh et coll., 2004] (Figure 7A).
- ✓ Inhibition des récepteurs à tyrosine kinase (RTK) : La fixation du TIMP-2 sur l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ induit l'activation de la tyrosine phosphatase Shp-1. Shp-1 activée va se fixer aux domaines SH2 des RTK, favorisant ainsi leur inactivation, et donc l'inhibition *in vitro* de la prolifération et *in vivo* de l'angiogénèse des cellules hMVECs induites par le Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2) et le Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A) [Seo et coll., 2003] (Figure 7B).
- ✓ Arrêt du cycle cellulaire : La fixation du TIMP-2 sur l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et la synthèse *de novo* de la protéine $p27^{Kip1}$ par inhibition des kinases Cdk4 et Cdk2 [Seo et coll., 2003] (Figure 7C).

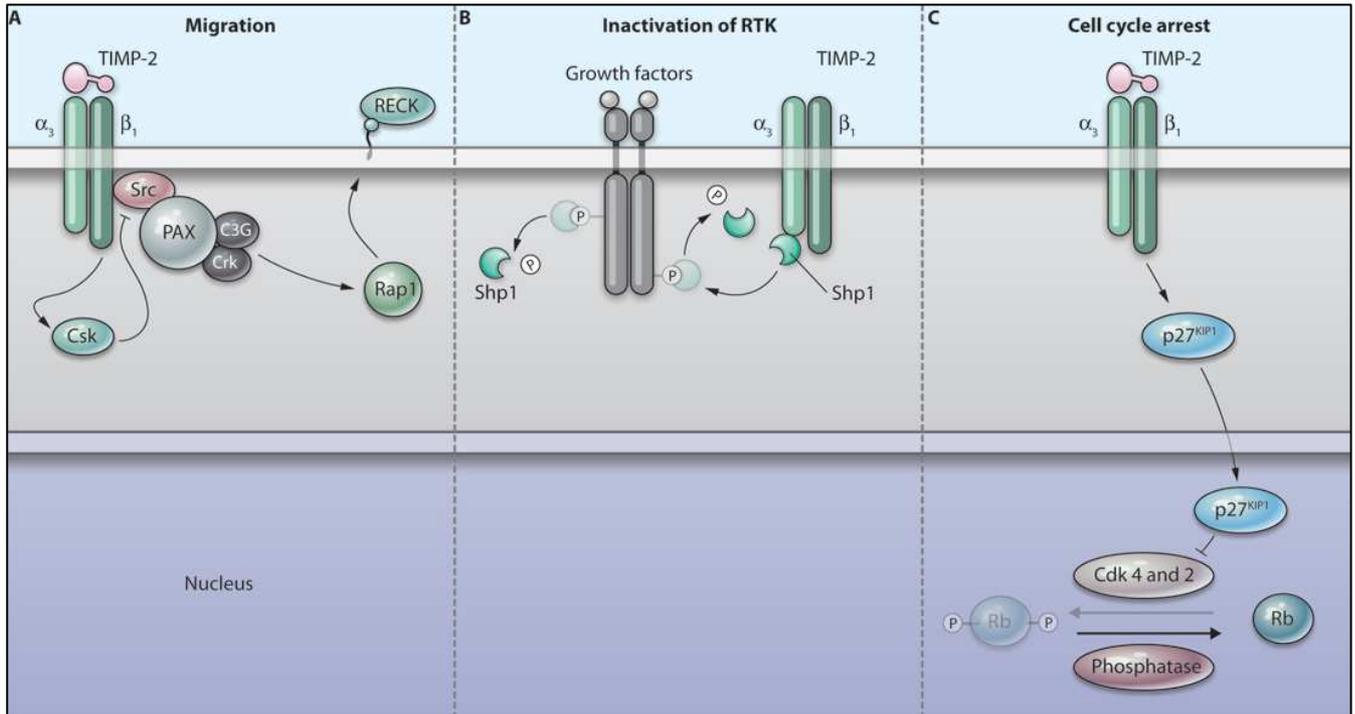


Figure 7: Voies de signalisation induites par l'interaction TIMP-2/ α 3 β 1 [Stetler-Stevenson, 2008].

II.5.3. Le récepteur du TIMP-3

Des études récentes ont montré que le TIMP-3 peut se lier au récepteur du VEGF (VEGFR-2) et induire la prolifération de cellules endothéliales. Cette fixation inhibe la fixation du VEGF-A, le TIMP-3 agissant ainsi comme un antagoniste du VEGF-A [Qi et coll., 2003]. Cette activité est complètement indépendante de l'activité inhibitrice des MMPs. Le TIMP-3 peut également interagir avec le récepteur de type II de l'angiotensine pour inhiber l'angiogénèse [Kang et coll., 2008].

A ce jour, il n'existe pas de données sur un récepteur potentiel du TIMP-4.

III. Hématopoïèse et microenvironnement hématopoïétique

III.1. Généralités

L'hématopoïèse correspond à l'ensemble des mécanismes qui conduisent à la formation de cellules sanguines. Les cellules sanguines sont des cellules, pour la plupart, très différenciées dont la durée de vie est très courte (quelques heures pour les polynucléaires, quelques jours pour les plaquettes et quelques semaines pour les hématies). L'hématopoïèse assure donc une production importante de cellules sanguines, de l'ordre de 10^{13} cellules sanguines/jour. Cette production est assurée par les cellules souches hématopoïétiques et est contrôlée afin de maintenir constant le nombre de cellules sanguines malgré les variations de consommation importantes liées aux processus pathologiques (hémorragies, infection...).

Chez l'homme, l'hématopoïèse fœtale a lieu au niveau de tissu conjonctif embryonnaire jusqu'au 2^e mois, dans le foie fœtal du 2^e au 6^e mois et devient médullaire à partir du 4^e mois. Après la naissance, l'hématopoïèse a lieu exclusivement dans la moelle osseuse.

III.2. Les cellules hématopoïétiques

L'hématopoïèse comporte 4 compartiments (figure 8) :

- ✓ **Les cellules souches pluripotentes** : cellules très primitives ayant un haut pouvoir de prolifération, capables d'autorenouvellement et de différenciation vers toutes les lignées hématopoïétiques.

- ✓ **Les progéniteurs** : cellules capables de proliférer sans s'autorenouveler et de se différencier. Ces cellules sont déjà engagées vers une seule lignée cellulaire : BFU-E (Burst-Forming Unit Erythroid) et CFU-E (Colony Forming Unit Erythroid) pour la lignée érythroblastique, BFU-Meg et CFU-Meg pour la lignée mégacaryoblastique, CFU-M pour la lignée granulo-monocytaire, progéniteurs B et T pour les lymphocytes B et T.

✓ **Les précurseurs** : cellules morphologiquement identifiables, correspondant à des cellules en cours de maturation avant leur passage dans la circulation sanguine.

✓ **Les cellules matures** : cellules fonctionnelles qui circulent dans le sang.

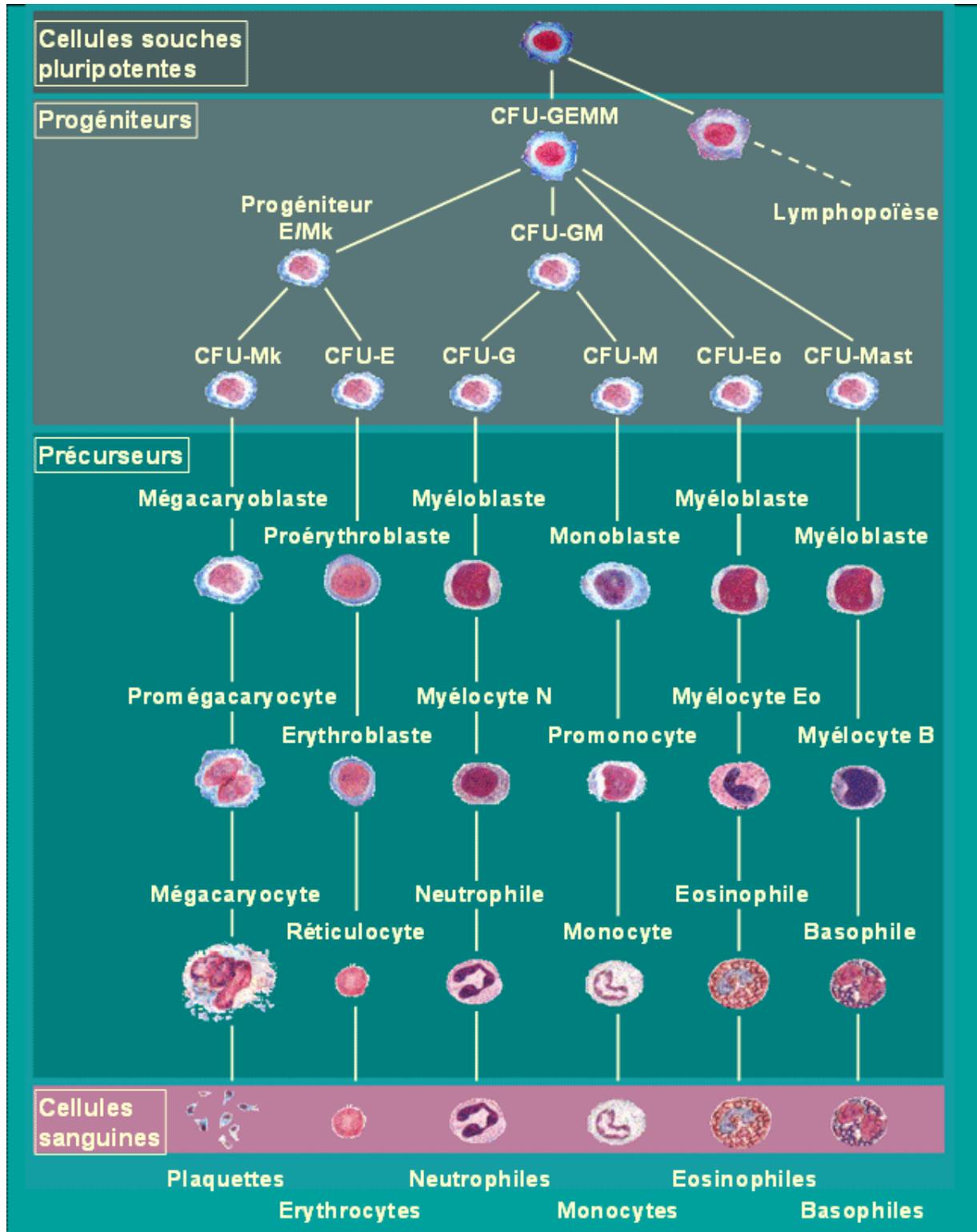


Figure 8: Schéma récapitulatif de l'hématopoïèse

III.3. Régulation de l'hématopoïèse

Les cellules souches de la moelle osseuse font partie des éléments indispensables à une hématopoïèse efficace. Deux éléments jouent également un rôle important dans la régulation de l'hématopoïèse: les facteurs de croissance et le microenvironnement médullaire.

III.3.1. Les facteurs de croissance

L'étude des cellules souches par culture de moelle *in vitro* a montré la nécessité de facteurs de croissance hématopoïétiques pour la survie, la différenciation, la multiplication et la maturation des cellules hématopoïétiques. Actuellement, au moins 30 facteurs de croissance ont été identifiés et leur gène cloné.

Les facteurs de croissance hématopoïétiques sont des glycoprotéines agissant comme des "hormones hématopoïétiques". A l'exception de l'Epo, elles sont synthétisées par un grand nombre de cellules présentes dans divers organes comme les cellules endothéliales, fibroblastes, monocytes / macrophages, lymphocytes [Metcalf, 1993 ; Platzer, 1989].

Ils peuvent être divisés en 2 grands groupes principaux :

- les facteurs de régulation positive.
- les facteurs de régulation négative.

1. Les facteurs de régulation positive

Les facteurs de régulation positive se divisent en deux grands groupes :

- ✓ **les CSF** (*Colony Stimulating Factors*) sont capables d'induire la formation des colonies de cellules hématopoïétiques. Parmi les CSF, on trouve l'IL-3 (Interleukine-3), le GM-CSF (Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor), le G-CSF (Granulocyte Colony stimulating Factor), le M-CSF (Macrophage Colony Stimulating Factor), l'Epo, la TPO (Thrombopoïétine) et l'IL-5. Certaines de ces molécules agissent sur des progéniteurs précoces et ne sont pas spécifiques d'une lignée donnée (GM-CSF et IL-3). D'autres ont une

action restreinte à une lignée donnée et sont nécessaires à l'acquisition des caractères de différenciation spécifiques des cellules matures (Epo et IL-5).

- ✓ **Les facteurs synergiques** qui ne sont pas des CSF pour les précurseurs hématopoïétiques mais agissent en synergie avec ceux-ci. Ils seraient indispensables pour mettre en cycle les cellules hématopoïétiques primitives. Parmi les facteurs synergiques, on trouve l'IL-1, l'IL-6, le LIF (Leukemia Inhibitory Factor) et le SCF (Stem Cell Factor).

2. Les facteurs de régulation négative

La régulation négative de l'hématopoïèse reste mal connue. Les résultats issus des expériences *in vitro* doivent être interprétés avec une grande prudence, des actions très différentes pouvant en effet apparaître en fonction du système de culture utilisé.

Plusieurs facteurs ayant une fonction de régulation négative ont cependant été caractérisés, parmi lesquels le TGF β (Transforming Growth Factor β), le TNF- α , l'AcSDKP (Séraspénide) et le MIP 1 α (Macrophage-Inflammatory Protein 1 α). Ces facteurs de régulation négative inhibent l'entrée en cycle des cellules hématopoïétiques.

III.3.2. Le microenvironnement médullaire

Le microenvironnement médullaire ou stroma médullaire est formé de différents types de cellules telles que les fibroblastes, cellules endothéliales, macrophages, cellules épithéliales et adipocytes [Clark et Keating, 1995]. Ces diverses cellules sont étroitement associées à la MEC (protéoglycans, molécules d'adhésion). Il assure l'organisation générale de la moelle en « niches » hématopoïétiques favorables au maintien des cellules souches et contribue aussi à leur engagement et leur progression dans une lignée.

IV. Voies de signalisation impliquées dans la survie cellulaire

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est le processus par lequel les cellules déclenchent leur destruction suite à un signal [Kerr et coll., 1972]. C'est un mécanisme cellulaire hautement régulé et nécessaire à la survie des organismes multicellulaires. L'apoptose implique des cellules individuelles dans un tissu et ne provoque pas d'inflammation. Lors de l'apoptose, les cellules sont modifiées au niveau physiologique. La première étape est le relargage du cytochrome C de la mitochondrie et la dégradation du potentiel membranaire mitochondrial [Kluck et coll., 1997]. L'apoptose est caractérisée par la condensation du cytoplasme, du noyau et de la chromatine, la fragmentation de l'ADN, le bourgeonnement de la membrane plasmique ainsi que la perte de l'asymétrie membranaire. Il y a ensuite formation de corps apoptotiques qui sont digérés par les macrophages environnants.

L'apoptose s'oppose à la nécrose qui est une mort cellulaire désordonnée. La nécrose survient lors d'un dommage tissulaire et implique des groupes de cellules. Lors de la nécrose, l'eau pénètre dans la cellule qui devient alors gonflée puis la membrane cellulaire éclate, déversant le contenu cytoplasmique dans le tissu environnant et provoquant l'inflammation. Les mitochondries et le noyau restent intacts lors de ce processus [Bicknell et Cohen, 1995 ; Dong et coll., 1997].

Différentes voies de signalisation sont impliquées dans les mécanismes anti-apoptotiques permettant la survie cellulaire et la voie PI 3-kinase/Akt a été largement décrite comme jouant un rôle important dans ce processus.

IV.1. La voie PI 3-kinase/Akt

IV.1.1. Les PI 3-kinases

Les PI 3-kinases appartiennent à une famille d'enzymes qui phosphorylent les phosphoinositides membranaires sur la position 3 du groupe inositol. Elles phosphorylent *in*

in vivo principalement deux substrats : le phosphatidyl-inositol (4) phosphate (PI(4)P) et le phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate (PIP₂), générant ainsi du phosphatidylinositol (3,4) bisphosphate (PI(3,4)P₂) et du phosphatidyl-inositol (3,4,5) trisphosphate (ou PI(3,4,5)P₃) [Stein et coll., 2000].

Les PI 3-kinases sont divisées en 3 classes selon leur structure: la classe I (comprenant les classes IA et IB), la classe II et la classe III.

Les PI 3-kinases de la classe I sont des hétérodimères formés d'une sous-unité régulatrice et d'une sous-unité catalytique. Elles sont divisées en deux sous-familles selon le récepteur auquel elles sont couplées :

- ✓ **Les PI 3-kinases de la classe IA** sont activées en aval des récepteurs couplés à des tyrosines kinases telles que les récepteurs B et T à l'antigène, les récepteurs aux cytokines et certaines molécules de costimulation. Ce sont des enzymes hétérodimériques qui sont constituées d'une sous-unité régulatrice (p85α la plus abondante et ses deux variants d'épissage p55α et p50α, p85β ou p55γ) et d'une sous-unité catalytique (p110α, β et δ) [Fruman, 2007].
- ✓ **Les PI 3-kinases de la classe IB** sont activées par des récepteurs couplés aux protéines G. Elles sont constituées d'une sous-unité régulatrice p101 et d'une sous-unité catalytique p110γ [Andrews et coll., 2007].

Les classes II et III se différencient de la classe I par leur structure et leur fonction.

- ✓ **Les PI 3-kinases de la classe II** comprennent 3 sous-unités catalytiques C2α, C2β et C2γ mais pas de sous-unité régulatrice. Elles catalysent la formation de phosphatidyl-inositol 3-phosphate (PI(3)P) à partir de phosphatidyl-inositol (PI).
- ✓ **Les PI 3-kinases de la classe III** sont similaires à celles de la classe I dans la mesure où elles forment des hétérodimères constitués d'une sous-unité catalytique (Vps34) et d'une sous-unité régulatrice (p150). Comme les PI 3-kinases de la classe II, elles peuvent former du PI(3)P à partir de PI.

Dans le cadre de ce travail, nous nous focaliserons uniquement sur les PI 3-kinases de la classe I.

La sous-unité p85 comporte deux domaines SH2 (N-SH2 et C-SH2) qui ont une forte affinité avec les tyrosines phosphorylées dans les sites pYxxM. Le domaine entre les deux domaines SH2, noté ISH2 est impliqué dans la fixation avec la p110. Les deux domaines SH2, le domaine ISH2 et le domaine riche en proline (P2) sont communs aux différentes isoformes de la sous-unité régulatrice de la PI 3-kinase. Les domaines N-terminaux des sous-unités p85 α et p85 β sont composés chacun d'un domaine d'homologie Bcr (Breakpoint cluster region) (BH) et d'un domaine SH3 (Src Homology 3).

Les principales isoformes des sous-unités régulatrices p85 de la PI 3-kinase de classe I sont schématisées dans la figure 9.

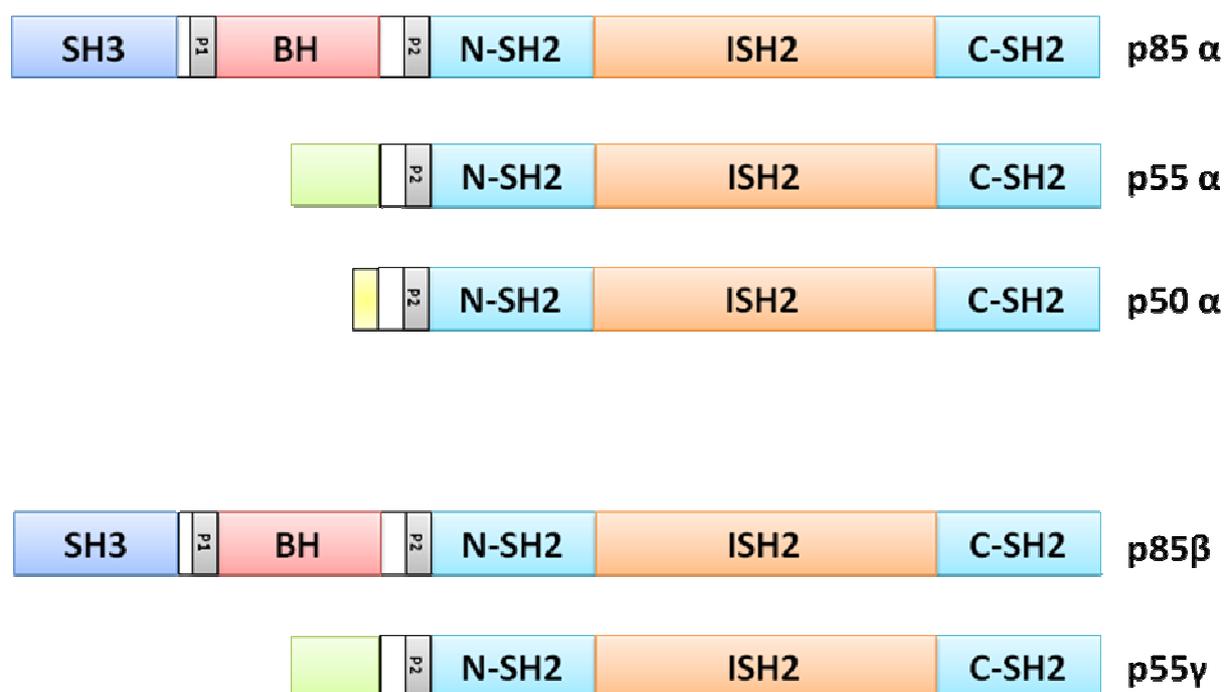


Figure 9 : Représentation schématique des principales isoformes des sous-unités régulatrices de la PI 3-kinase de classe IA. P1 et P2 : régions riches en proline 1 et 2 ; ISH2 : région entre les deux domaines SH ; C-SH2 : domaine SH2 C terminal ; N-SH : domaine SH N terminal.

La sous-unité p110 n'est catalytiquement active que lorsqu'elle est associée à la sous-unité p85 [Hiles et coll., 1992]. L'activation de la PI 3-kinase par des cytokines s'effectue soit par interaction directe avec le récepteur, soit par l'intermédiaire d'adaptateurs moléculaires.

Les PI 3-kinases de la classe I jouent un rôle important dans la plupart des événements médiés par les récepteurs. La fixation du ligand sur son récepteur conduit à l'activation des tyrosines kinases intrinsèques du récepteur ou au recrutement de tyrosines kinases associées au récepteur. Quand les résidus tyrosyles du récepteur présents dans la séquence consensus YxxM sont phosphorylés, ils servent de sites d'ancrage pour les domaines SH2 de la sous-unité régulatrice de la PI 3-kinase de la classe IA [Kapeller et coll., 1994]. La fixation des domaines SH2 de la p85 au peptide phosphorylé pYxxM conduit à l'activation de l'activité lipide kinase de l'enzyme [Rordorf-Nikolic et coll., 1995]. La translocation de la PI 3-kinase à la membrane plasmique n'amène pas seulement la sous-unité catalytique à proximité de son substrat lipidique, mais elle facilite également son interaction avec Ras lié au GTP, augmentant ainsi l'activité de la PI 3-kinase [Rodriguez-Viciano et coll., 1996].

L'activation de la PI 3-kinase par l'Epo a été décrite dans plusieurs lignées cellulaires sensibles à l'Epo [Damen et coll., 1993 ; He et coll., 1993 ; Mayeux et coll., 1993 ; Miura et coll., 1994]. Suite à la fixation de l'Epo sur son récepteur (R-Epo), le résidu tyrosyle en position 479 présent dans le domaine cytoplasmique sert de point d'ancrage au domaine SH2 de la sous-unité p85 [Damen et coll., 1995].

L'Epo peut également recruter la PI 3-kinase de manière indirecte, *via* les protéines Cbl (Casitas B Lymphoma), Gab1 et Gab2 (Grb2-associated binders), IRS-2 (Insulin-receptor substrate 2) et Vav [Wojchowski et coll., 1999].

La protéine Cbl permet le recrutement de la PI 3-kinase au niveau des récepteurs de facteurs de croissance et de cytokines telles que TRANCE (Tumor necrosis factor(TNF)-related activation-induced cytokine [Arron et coll., 2001].

Les protéines Gab1 et Gab2 sont des molécules adaptatrices qui possèdent de nombreux résidus tyrosyles phosphorylables et des domaines riches en proline qui vont permettre le recrutement de protéines à domaines SH2 et/ou SH3. La sous-unité p85 de la PI 3-kinase peut être associée à Gab1 et Gab2 en réponse à l'Epo [Lecoq-Lafon et coll., 1999 ; Wickrema et coll., 1999 ; Bouscary et coll., 2003].

L'adaptateur IRS-2 est constitutivement associé au R-Epo indépendamment des tyrosines du domaine cytoplasmique du R-Epo. L'Epo induit la phosphorylation sur tyrosine de l'adaptateur IRS-2 puis son association avec la sous-unité p85 de la PI 3-kinase dans les cellules UT-7 [Verdier et coll., 1997].

Enfin, une autre voie d'activation de la PI 3-kinase par l'Epo implique l'association de la PI 3-kinase à la protéine Vav qui est un facteur d'échange GDP-GTP. La protéine Vav est associée constitutivement au R-Epo et est phosphorylée sur tyrosine en réponse à l'Epo. Vav phosphorylée peut alors s'associer au domaine SH2 de la p85 et permettre l'activation de la PI 3-kinase [Shigematsu et coll., 1997].

IV.1.2. Akt

En phosphorylant le PIP₂ en PIP₃, la PI 3-kinase permet le recrutement à la membrane de protéines possédant un domaine PH. Parmi ces protéines se trouve la protéine Akt, également appelée PKB (Protéine Kinase B), qui joue un rôle important dans la survie cellulaire.

Akt a été initialement identifiée comme étant l'homologue normal de l'oncogène *v-akt* transduit dans un rétrovirus murin. Elle est exprimée de façon ubiquitaire et comprend trois membres : Akt1/PKB α , Akt2/PKB β et Akt3/PKB γ [Brazil et coll., 2001]. Akt est constituée de trois régions distinctes : un domaine d'homologie à la pleckstrine (PH) en N-terminal, suivi d'un domaine catalytique et d'une courte région régulatrice en C-terminal.

L'activation maximale d'Akt se fait par double phosphorylation des résidus thréonine 308 et sérine 473 par deux kinases appelées PDK (Phosphatidylinositol Dependent Kinase) 1 et 2. La PDK1 phosphoryle Akt sur la thréonine 308 et la PDK2 sur la sérine 473.

La kinase Akt régule la survie cellulaire en phosphorylant des substrats qui eux-mêmes contrôlent directement ou indirectement la machinerie apoptotique :

✓ **La protéine pro-apoptotique Bad :**

La protéine Bad forme un hétérodimère avec les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-X_L les empêchant ainsi d'exercer leur fonction anti-apoptotique. Quand elle

est phosphorylée sur sérine 112 ou sérine 136, Bad se dissocie de Bcl-2 ou Bcl-X_L qui peuvent exercer leur fonction anti-apoptotique. Akt phosphoryle Bad sur sérine 136 [Downward et coll., 1999].

✓ **La caspase-9 :**

La caspase-9 est une protéine cruciale dans l'initiation et probablement également lors des stades tardifs d'apoptose [Alnemri et coll., 1999 ; Wolf et coll., 1999]. Akt est capable de phosphoryler *in vitro* la sérine 196 de la caspase-9 recombinante et d'inhiber son activité protéase en aval de la libération de cytochrome c [Cardone et coll., 1998 ; Zhou et coll., 2000].

✓ **Les kinases IκB (IKKs) :**

Une autre cible d'Akt est le facteur de transcription NF-κB (nuclear factor- κB) [Romashkova et coll., 1999 ; Ozes et coll., 1999 ; Kane et coll., 1999]. Quand il est fixé à son inhibiteur cytosolique IκB, NF-κB est séquestré dans le cytoplasme. Suite à sa phosphorylation par les IκB kinases (IKKs), IκB est dégradé et NF-κB est transloqué dans le noyau et active la transcription de protéines anti-apoptotiques telles que les protéines IAP (Inhibitory of Apoptosis) [Wang et coll., 1998]. Akt va phosphoryler et activer la forme α des IKKs [Ozes et coll., 1999].

✓ **La famille des facteurs de transcription Forkhead (FH) :**

Les facteurs de transcription de la famille Forkhead sont directement phosphorylés par Akt sur trois résidus : thréonine 24, sérine 256 et sérine 319, ce qui conduit à leur inactivation [Brunet et coll., 1999 ; Kops et coll., 1999 ; Rena et coll., 1999 ; Biggs et coll., 1999 ; Guo et coll., 1999]. En absence de phosphorylation d'Akt, les protéines Forkhead entrent dans le noyau et induisent la transcription de gènes de mort cellulaire, comme FasL (fas ligand), Bim (un membre de la famille de Bcl-2) et l'inhibiteur du cycle cellulaire p27^{Kip1} [Brunet et coll., 2007]. L'activation d'Akt induit la phosphorylation des facteurs Forkhead qui vont être exclus du noyau et perdre leur activité transcriptionnelle [Biggs et coll., 1999 ; Brunet et coll., 1999]. Les facteurs Forkhead se fixe à la protéine 14-3-3 qui a pour rôle de séquestrer les cibles d'Akt loin de leur site d'action.

Les mécanismes d'activation de la voie PI3-kinase/Akt dans la survie cellulaire sont résumés dans la figure 10.

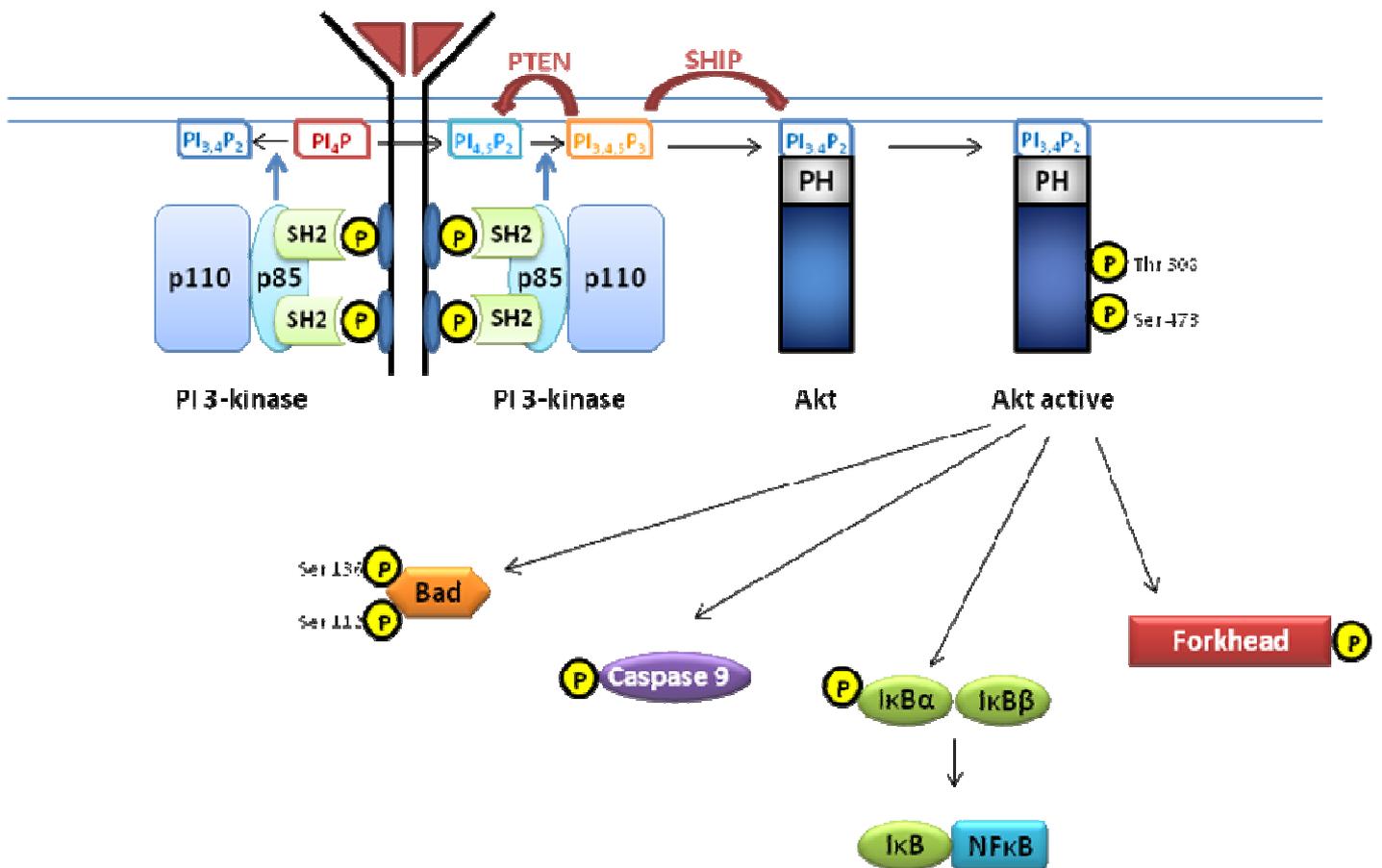


Figure 10: Mécanisme d'activation de la voie PI 3-kinase/Akt dans la survie cellulaire

IV.2. Les JAKs

La famille des Janus Kinases ou Just Another Kinase (JAKs) est composée de quatre membres : JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2 (Tyrosine Kinase 2) [Ward et coll., 2000]. Les protéines JAKs sont constituées d'un domaine kinase et d'un domaine pseudokinase catalytiquement inactif. Ce sont des protéines de 120 à 140 kDa constituées de 7 domaines appelés JH (JAK Homology) (Figure 11).

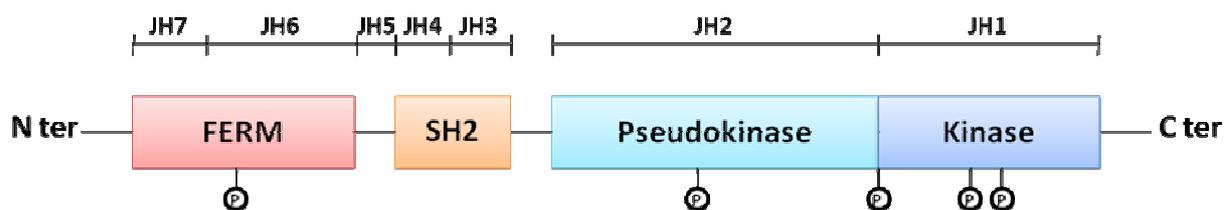


Figure 11: Représentation schématique de la structure primaire des JAKs [d'après Yamaoka et coll., 2004].

Le domaine JH1 correspond au domaine kinasique des JAKs. Le domaine JH2 correspond au domaine pseudokinase. Bien que dépourvu d'activité catalytique, le domaine JH2 joue un rôle essentiel dans la régulation de l'activité catalytique des JAKs. Les domaines JH3 et JH4 sont situés dans le domaine SH2 et les domaines JH6 et JH7 dans le domaine FERM (4.1 Band, Ezrin, Radixin, Moesin). Ce domaine FERM est impliqué dans les interactions protéines-protéines et dans la fixation des JAKs aux récepteurs des cytokines.

La voie JAK/STAT est l'une des principales voies impliquées dans la transduction de signaux générés par des cytokines ou des facteurs de croissance. Elle régule des phénomènes physiologiques tels que la prolifération et la différenciation cellulaire, la migration et la mort des cellules [Espert et coll., 2005]. La fixation d'un ligand sur les récepteurs à cytokines conduit à leur oligomérisation. La formation de ces oligomères rapproche deux JAKs et permet leur phosphorylation réciproque ce qui conduit à leur activation. Les JAKs activées phosphorylent ensuite le récepteur auquel elles sont associées [Rawlings et coll., 2004]. Cette phosphorylation de résidus tyrosine du récepteur crée des sites de recrutement pour les protéines possédant un domaine SH2 (Src-homology 2). Parmi ces protéines on trouve les facteurs de transcription STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription). Chez les mammifères il existe sept gènes différents qui sont à l'origine des sept membres de la famille STAT : STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b, STAT6. Ces sept STAT possèdent toutes un résidu tyrosine conservé dont la phosphorylation par les JAKs activés conduit à l'homo- ou à l'hétérodimérisation des STAT [Espert et coll., 2005]. Les dimères de STAT sont alors rapidement transloqués au noyau et peuvent se lier à des régions promotrices des gènes cibles dont ils induisent une très forte augmentation de la transcription [Aaronson et Horvath, 2002]. La voie JAK/STAT est résumée dans la figure 12.

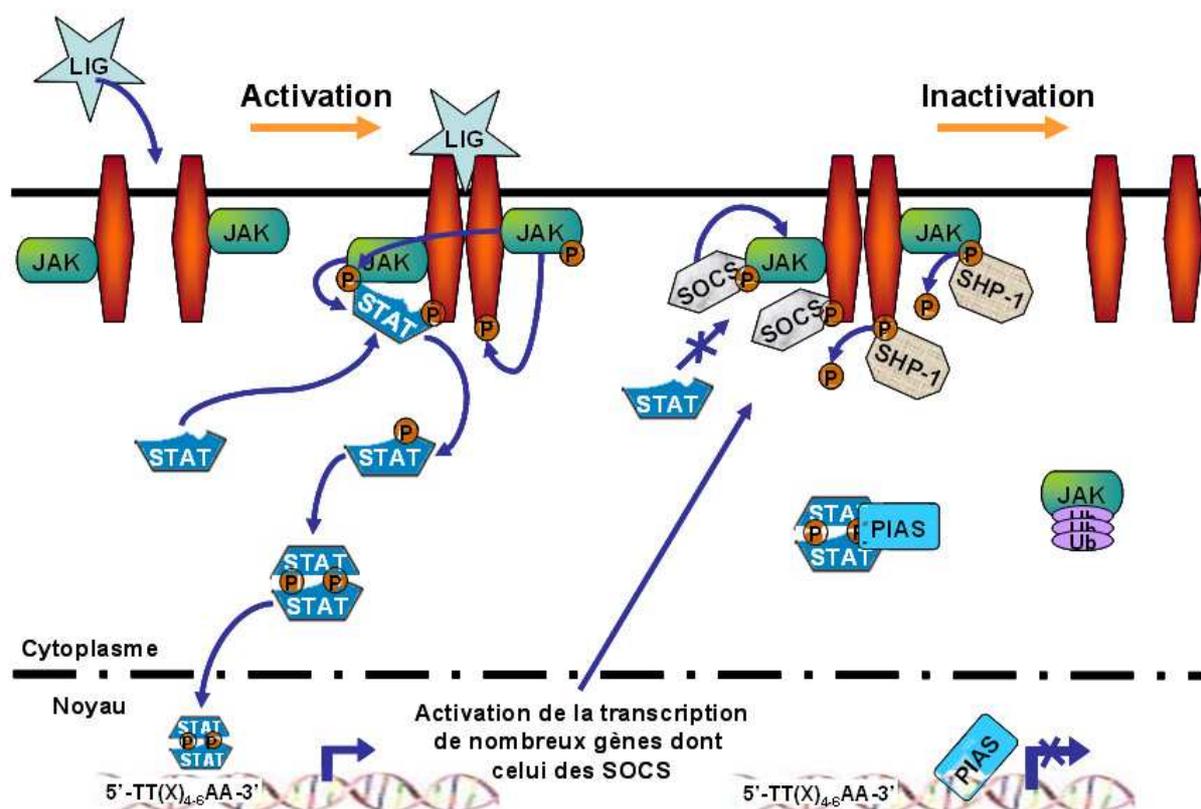


Figure 12: Schéma d'activation de la voie JAK/STAT [d'après Rawlings et coll., 2004].

Par ailleurs, il existe trois différents types de régulateurs négatifs de la voie JAK/STAT. Les tyrosines phosphatases, telles que les protéines SHP-1 et SHP-2 (SH2-domain containing phosphatase), se lient aux récepteurs activés ou directement aux protéines JAKs par leur domaine SH2 et déphosphorylent alors ces protéines [Espert et coll., 2005]. Les protéines SOCS (Suppressor of cytokine signaling) font partie d'une boucle de rétrocontrôle négatif de la voie JAK/STAT. La transcription de ces gènes est activée par les dimères de STAT. Les protéines SOCS peuvent interagir par leur domaine SH2 avec les résidus tyrosines phosphorylés des récepteurs activés ou des JAKs activées. Il en résulte une inhibition du recrutement des facteurs STAT par compétition au niveau des sites de liaison aux récepteurs, ou inhibition de l'activité kinase des JAKs [Espert et coll., 2005]. Les protéines PIAS (protein inhibitor of activated STAT) quant à elles se lient directement aux dimères de STAT et empêchent la liaison de ces dimères avec l'ADN [Aaronson et Horvath, 2002].

Nous nous intéressons plus particulièrement à la tyrosine kinase JAK2 qui joue un rôle important dans les voies de signalisation induites par l'Epo. JAK2 est une protéine de 130 kDa dont le gène a été cloné en 1989. Comme toutes les JAKs, JAK2 possède 7 sous-domaines importants appelés JH1 à JH7. La voie JAK2/STAT est une étape clé dans la voie de signalisation de nombreuses cytokines, telles que l'Epo, les facteurs de croissance, la prolactine, la thrombopoïétine, le GM-CSF, l'IL-3 et l'IL-5 [Argetsinger et coll., 1993 ; Parganas et coll., 1998 ; Silvennoinen et coll., 1993 ; Aaronson et Horvath, 2002 ; Nelson et Steensma, 2006].

L'Epo induit des voies de signalisation conduisant à la survie, la prolifération et la différenciation cellulaire. JAK2 est associée au R-Epo qui est dépourvu d'activité kinasique intrinsèque. La fixation de l'Epo sur son récepteur entraîne le changement conformationnel du R-Epo, permettant le rapprochement spatial des deux protéines JAK2 au niveau du domaine intracellulaire du R-Epo, ce qui induit leur activation par auto-transphosphorylation. Une fois activées, les protéines JAK2 phosphorylent les 8 résidus tyrosyles présents dans le domaine intracellulaire du R-Epo. Ces tyrosines phosphorylées permettent le recrutement à la membrane de protéines cytoplasmiques possédant un domaine SH2. Ces protéines recrutées, telles que la PI 3-kinase, STAT5 ou encore les MAP kinases, sont ensuite phosphorylées et induisent la prolifération et la survie cellulaire.

En 2002, Giordanetto et Kroemer ont prédit la structure de JAK2 [Giordanetto et Kroemer, 2002]. Les sous-domaines JH1 à JH7 sont organisés en quatre domaines distincts : le domaine catalytique JH1, le domaine JH2 qui régule l'activité catalytique de JAK2, le domaine SH2 et le domaine FERM. Le domaine FERM est essentiel pour la fixation de JAK2 aux récepteurs à cytokines.

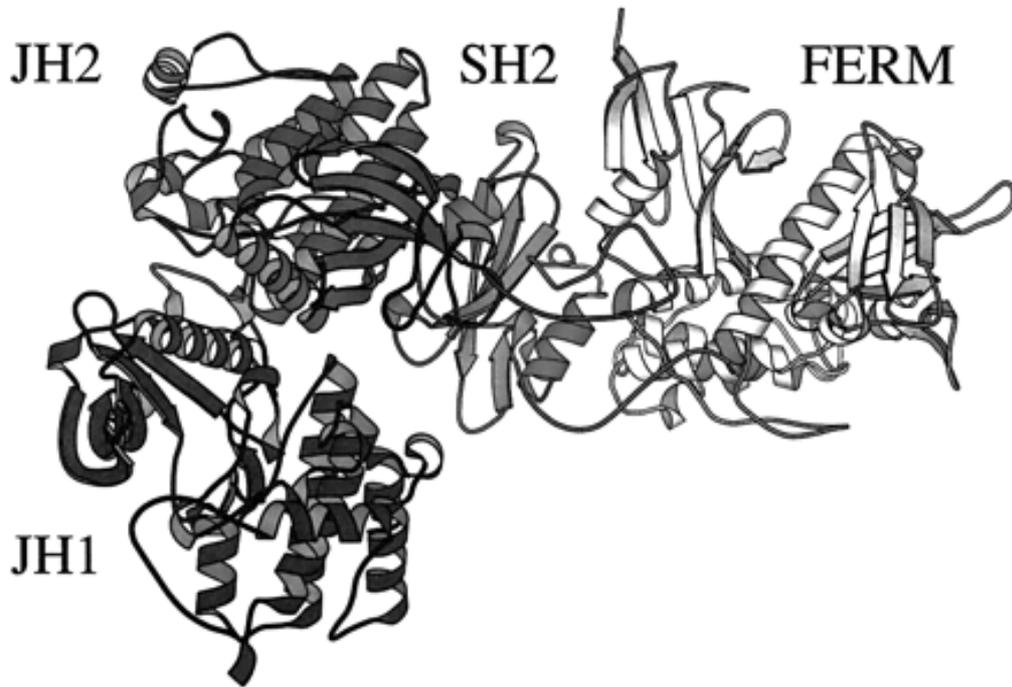


Figure 13: Prédiction de structure de JAK2 [Giodanetto et Kroemer, 2002].

IV.3. Les Src kinases

Une autre famille de tyrosines kinases impliquées dans la survie cellulaire est la famille des Src kinases. Cette famille est constituée de neuf membres : Lyn, Hck, Lck, Blk, Src, Fyn, Yes, Frk et Fgr. Elles sont impliquées dans différents processus cellulaires tels que la prolifération, la différenciation, la motilité et la survie [Thomas et Brugge, 1997].

Les membres de la famille des Src kinases sont des protéines de 52 à 62 kDa qui possèdent une structure commune (Figure 14):

- ✓ **Le domaine SH4** est constitué de 15 à 17 acides aminés et contient les signaux de myristoylation qui vont permettre la fixation des Src kinases à la membrane cellulaire. Il contient également des acides aminés basiques qui peuvent subir une palmitoylation post-traductionnelle.
- ✓ **Le domaine unique**, qui comme son nom l'indique, est spécifique pour chaque membre de la famille des Src kinases. Sa fonction n'est pas définie pour la plupart des membres des Src kinases. Cependant, il a été montré que le domaine unique de la Src kinase Lck permet l'interaction avec les co-récepteurs CD4 et CD8 [Veillette et coll., 1988].

- ✓ **Le domaine SH3** permet l'interaction spécifique avec des motifs riches en proline [Koch et coll., 1991].
- ✓ **Le domaine SH2** permet l'interaction avec des résidus tyrosyles phosphorylés.
- ✓ **Le domaine kinase**, également appelé SH1 (Src Homology 1), est responsable de l'activité enzymatique.

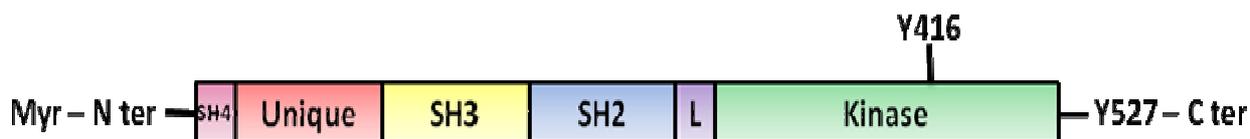


Figure 14: Représentation schématique de la structure d'une Src kinase [d'après Roskoski, 2004]
(L=linker)

Les Src kinases sont des protéines hautement régulées au niveau de leur activation. Un des sites de phosphorylation le plus important de Src est la tyrosine 527 qui est le sixième résidu situé du côté C-terminal. Dans des conditions basales, Src est phosphorylée sur la tyrosine 527 [Zheng et coll., 2000] qui se fixe intramoléculairement au domaine SH2 de Src. Cette interaction stabilise la protéine dans une conformation fermée et inactive [Roskoski, 2004] (Figure 15). Dans cette conformation fermée, ni le domaine SH2 ni le domaine SH3 ne sont accessibles aux ligands externes. La phosphorylation de la tyrosine 527 résulte de l'action d'autres kinases comme Csk et Chk [Okada et Nakagawa, 1989 ; Zrihan-Licht et coll., 1997]. Les Src kinases peuvent être activées de différentes manières, comme la déphosphorylation de la tyrosine 527 par des tyrosines phosphatases, la délétion ou la mutation de la tyrosine 527, le déplacement des interactions intramoléculaires SH2 et SH3 par des ligands à haute affinité ou la phosphorylation de la tyrosine 416 localisée dans le domaine kinase [Frame et coll., 2002] (Figure 14). Src activée phosphoryle d'autres effecteurs tels que la sous-unité régulatrice p85 de la PI 3-kinase, RasGAP, l'adaptateur moléculaire Shc, la phospholipase C et la kinase FAK (Focal Adhesion Kinase) [Pleiman et coll., 1994, Brown et Cooper, 1996].

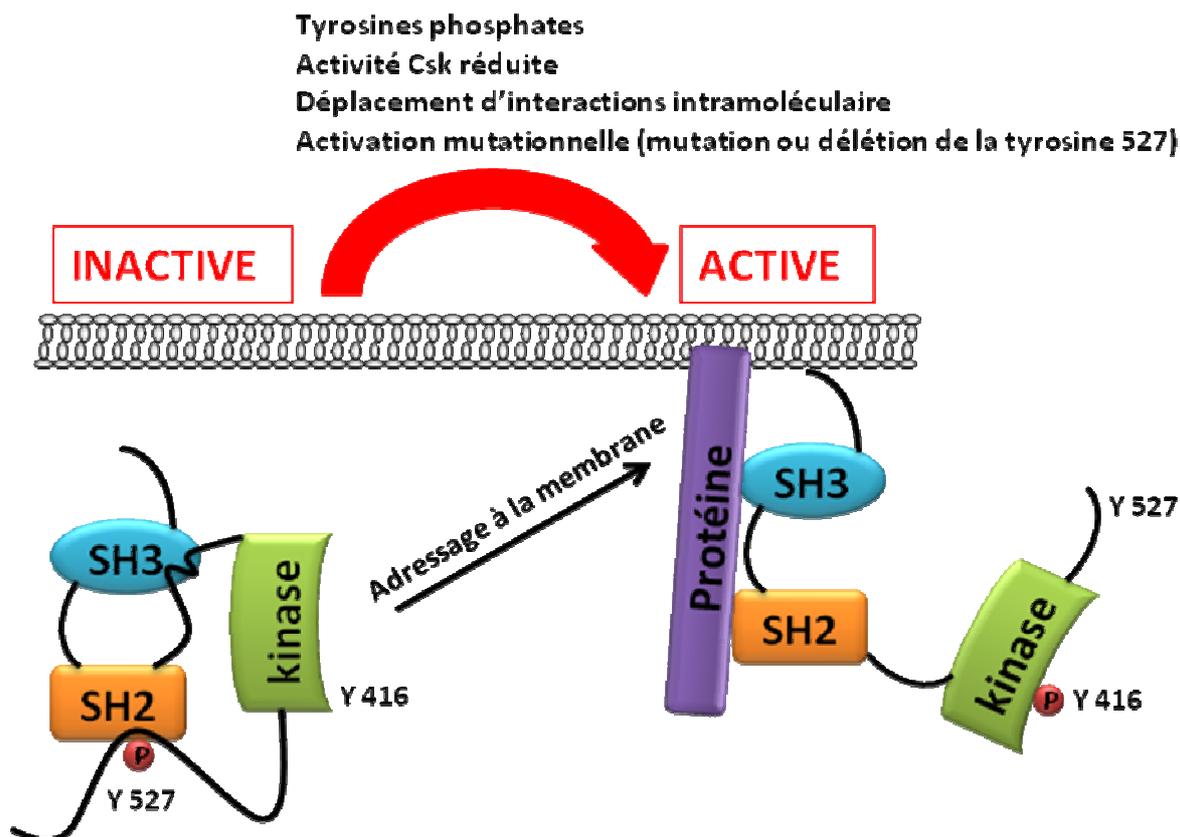


Figure 15: Mécanisme d'activation des Src kinases [d'après Frame et coll., 2002]

Parmi les neuf membres des Src kinases, la kinase Lyn est exprimée de manière abondante dans les cellules hématopoïétiques où elle est exprimée sous deux formes : Lyn A (56 kDa) et Lyn B (53kDa) [Corey et Anderson, 1999]. Il a été décrit que Lyn peut activer des voies de signalisation conduisant à la survie, la prolifération et la différenciation de cellules hématopoïétiques. Elle induit également la maturation de cellules érythroïdes normales et leucémiques induite par l'Epo [Kubota et coll., 2001].

Les Src kinases jouent un rôle important dans la régulation de l'apoptose. En effet, l'inhibition de l'expression de Lyn induit l'apoptose de cellules leucémiques BCR-ABL1(+) [Ptasznik et coll., 2004]. Lyn est également impliquée dans les phénomènes de chimiorésistance de cellules de cancer du colon SW480 [Bates et coll., 2001]. Dans ces cellules, Lyn induit la survie cellulaire en se fixant à la protéine CD44 et en induisant la phosphorylation d'Akt.

IV.4. La glycoprotéine CD44

IV.4.1. Généralités

La protéine d'adhésion CD44 est une glycoprotéine transmembranaire de type I, c'est-à-dire à une seule traversée transmembranaire, exprimée par de nombreux types cellulaires, comme les cellules hématopoïétiques, les kératinocytes, les chondrocytes, les cellules épithéliales, les cellules endothéliales et les cellules neuronales. CD44 est une protéine ubiquitaire qui est impliquée dans les interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire. CD44 est le récepteur principal de l'acide hyaluronique (HA) et peut également interagir avec différentes protéines de la MEC, telles que la fibronectine et les collagènes, certains facteurs de croissance, les cytokines et les MMPs [Naor et coll., 2002].

IV.4.2. Structure de CD44

CD44 est codé par un seul gène et existe sous différentes isoformes. Au moins 20 isoformes de taille différente sont connues et obtenues par épissage alternatif, N- et O-glycosylations et glycosaminoglycanations (principalement héparane sulfate et chondroïtine sulfate) [Lesley et coll., 1993 ; Lokeshwar et Bourguignon, 1991 ; Lokeshwar et coll., 1996]. Le gène codant CD44 est constitué de 20 exons : 10 exons constants (standards : s1 à s10) et 10 exons variables sujets à l'épissage alternatif (variants v1 à v10) [Naor et coll., 1997].

Parmi ces isoformes, on trouve la forme standard CD44s, la forme épithéliale CD44E et la forme variante CD44v. La représentation schématique du gène codant CD44 est présentée dans la figure 16.

L'isoforme standard CD44s (également connue sous le nom de CD44H pour CD44 hématopoïétique) est la plus petite isoforme de CD44 (85 kDa). Elle est totalement dépourvue de la région variable et est constituée de trois domaines : un domaine extracellulaire de 270 acides aminés, un domaine transmembranaire de 23 acides aminés et un domaine intracellulaire de 70 acides aminés (Figure 17). Les exons variants de l'isoforme CD44v vont venir s'insérer au niveau du site d'épissage alternatif, situé dans le domaine extracellulaire dans une région proche de la membrane plasmique.

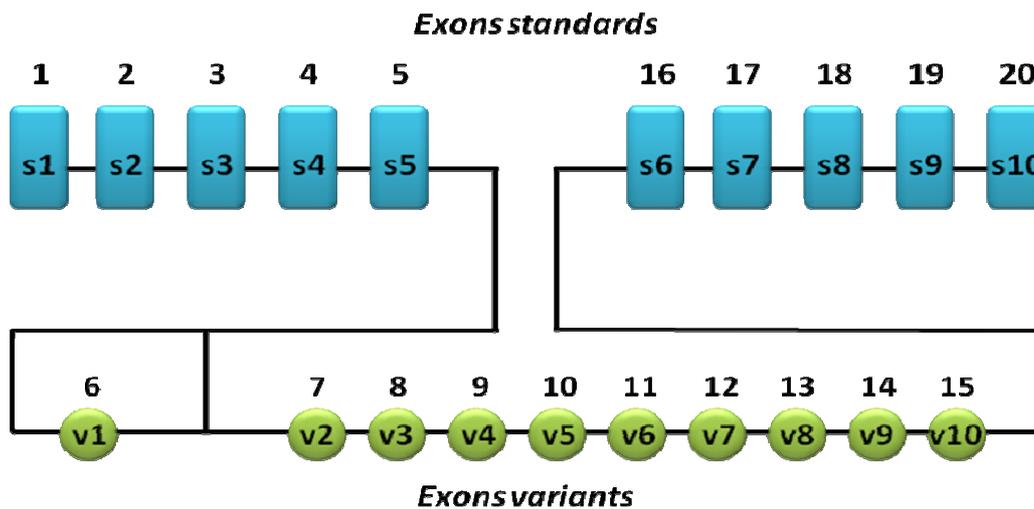


Figure 16: Représentation schématique du gène codant CD44 [d'après Goodison et coll., 1999].

Les exons standards (s1 à s10) codent pour la protéine standard CD44s. Les combinaisons de variants (v1 à v10) peuvent être alternativement épissées entre s5 et s6 pour coder pour la protéine variante CD44v.

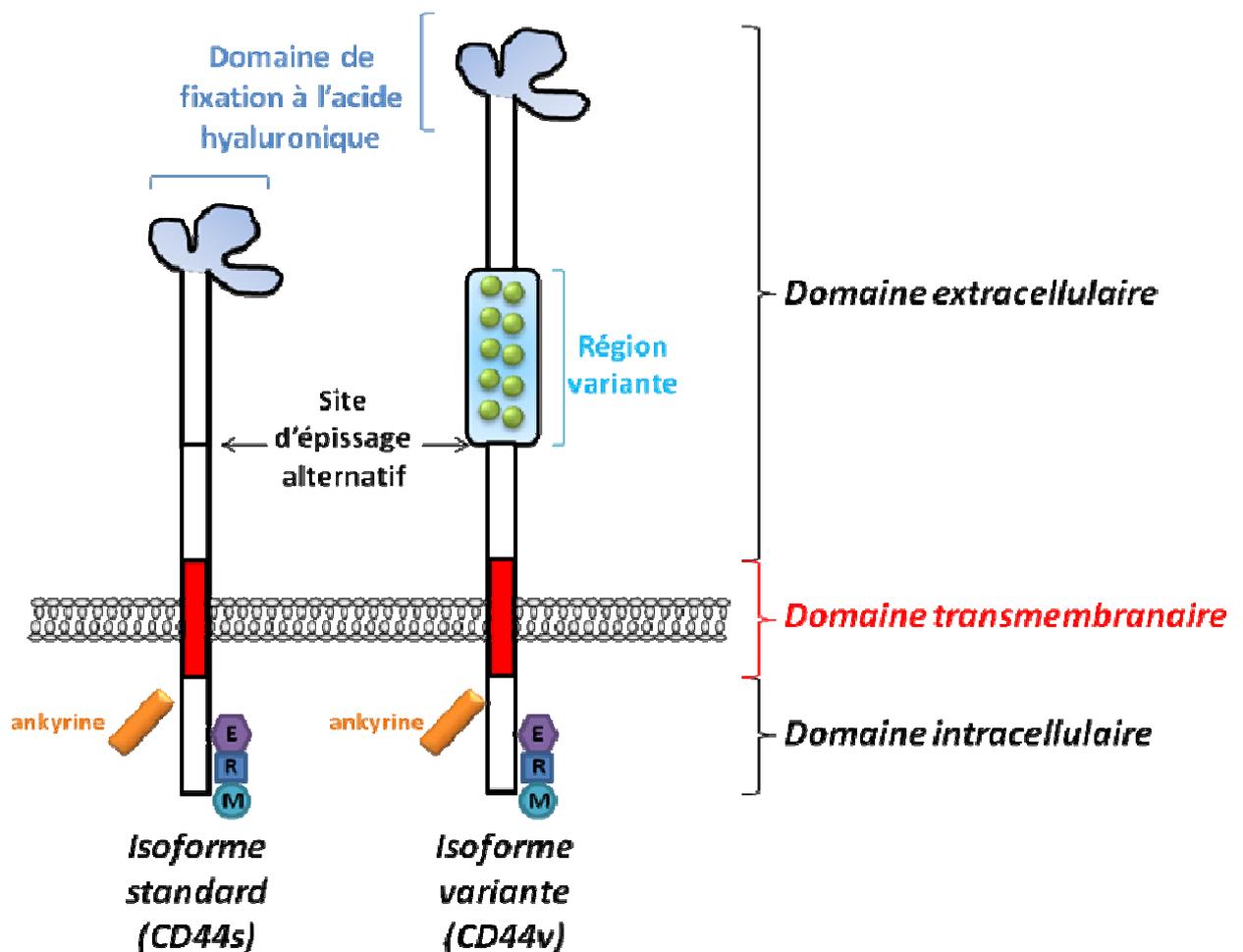


Figure 17: Représentation schématique de la structure de la protéine CD44 [d'après Goodison et coll., 1999].

Le domaine intracellulaire est codé par une partie de l'exon 18 et des exons 19 et 20. Le domaine transmembranaire est codé par l'exon 18 et est conservé à 100% dans toutes les espèces de mammifères. Le domaine extracellulaire peut être divisé en régions conservées et non conservées. La partie N-terminale du domaine extracellulaire, codée par les exons 1 à 5, est hautement conservée (environ 85%) et est repliée en une structure tertiaire globulaire grâce à la formation de ponts disulfures entre trois paires de résidus cystéyles. Cette partie contient le domaine de fixation de l'acide hyaluronique (HA). La région proximale de la membrane du domaine extracellulaire est codée par les exons 16 et 17 et est moins conservée (environ 35% d'homologie entre les espèces mammifères) [Goodison et coll., 1999].

IV.4.3. Fonctions de CD44

Une des fonctions principales de CD44 est la fixation de l'HA, mais CD44 présente d'autres fonctions. Les molécules d'adhérence cellulaire sont essentielles pour le maintien de la structure tissulaire. L'expression de ces molécules est hautement régulée, ce qui permet de contrôler la prolifération cellulaire, la motilité, la différenciation et la survie. Comme toute molécule d'adhérence, CD44 intervient dans différents processus biologiques, comme par exemple l'activation des lymphocytes T, l'adhérence aux composés de la MEC, l'agrégation cellulaire, la prolifération et l'angiogénèse [Miyake et coll., 1990 ; Bourguignon et coll., 1993 ; Green et coll., 1988 ; West et Kumar, 1989 ; Turley et coll., 1991 ; Rooney et coll., 1995].

Toutes les propriétés biologiques de CD44 sont essentielles pour les activités physiologiques des cellules normales, mais sont également associées aux activités pathologiques des cellules cancéreuses [Liu et Jiang, 2006]. CD44s est exprimé de manière ubiquitaire alors que l'expression de CD44v est plus restreinte dans les tissus normaux. Dans les cellules et tissus tumoraux, l'expression de CD44s et CD44v est augmentée. Cette augmentation d'expression est corrélée au comportement biologique de la tumeur, lors de la croissance tumorale et du processus métastatique. De nombreuses études ont révélé que la surexpression de CD44 peut être corrélée à un mauvais pronostic dans plusieurs types de cancers, comme le cancer du poumon, le cancer ovarien, le cancer du sein et le cancer colorectal [Cho et coll., 2006 ; Watanabe et coll., 2005 ; Zavriles et coll., 2005]. Ainsi, la forme CD44s est surexprimée dans les gliomes tandis que CD44v est plutôt surexprimé dans

les cancers gastrointestinaux, du col de l'utérus, du sein et certains lymphomes. CD44 pourrait ainsi être utilisée comme marqueur de pronostic ou diagnostique pour certains cancers. A l'inverse, le degré de malignité de certains cancers, comme les neuroblastomes ou encore le cancer de la prostate, est associé à la perte d'expression de CD44, suggérant que CD44 pourrait être dans certains cas un suppresseur de tumeur [Naor et coll., 1997].

La majorité des cellules hématopoïétiques expriment CD44s. Cette isoforme est exprimée dans tous les types de cellules sanguines matures, dans la majorité des précurseurs présents dans la moelle osseuse et dans les progéniteurs hématopoïétiques CD34+ [Lesley et coll., 1993 ; Lewinsohn et coll., 1990 ; Kansas et coll., 1990 ; Ghaffari et coll., 1995]. Son niveau d'expression varie en fonction de la lignée hématopoïétique et du stade de différenciation [Ghaffari et coll., 1995]. Par exemple, CD44 est très fortement exprimé au stade CFU-GM alors qu'il est moins exprimé au stade BFU-E. De même, CD44 est fortement exprimé dans les cellules CD34+ et présente un faible niveau d'expression dans les érythrocytes et les plaquettes. Les variants CD44-v6 et CD44-v9 ont été détectés dans les monocytes, macrophages, lymphocytes et cellules dendritiques [Legras et coll., 1998].

Des études récentes ont montré que la surexpression de CD44 dans les cellules hématopoïétiques est associée au mauvais pronostic dans de nombreuses maladies hématopoïétiques [Liu et Jiang, 2006] (Tableau 4).

<i>Maladie</i>	<i>Expression de CD44</i>
Leucémie myéloïde aigüe	CD44s, CD44v3-v10
Leucémie lymphoïde aigüe	CD44s, CD44v6
Leucémie lymphoïde chronique	CD44s, CD44v6
Lymphome	CD44s, CD44v6-v10
Myélome	CD44s, CD44v6

Tableau 4: Expression de CD44 dans différentes maladies hématopoïétiques [D'après Liu et Jiang, 2006].

IV.4.4. Protéines associées à CD44

Le rôle principal du domaine cytoplasmique de CD44 est la transduction de signaux provenant de stimuli extracellulaires [Bourguignon et coll., 1998]. Le domaine cytoplasmique

est capable de fixer directement un grand nombre de protéines intracellulaires, telles que l'ankyrine et les protéines ERM (ezrine, radixine, moesine).

IV.4.4.1. L'ankyrine

Le domaine cytoplasmique de CD44 est impliqué dans la fixation de l'ankyrine, une protéine du cytosquelette. Des expériences de mutagenèse indiquent qu'au moins deux sous-régions du domaine cytoplasmique de CD44 contribuent à la fixation de l'ankyrine : la région I qui est la région de fixation à haute affinité de l'ankyrine et la région II qui est la région régulatrice [Zhu et Bourguignon, 1998].

Chez la souris, la région I est située entre les acides aminés 306 et 320 tandis que chez l'homme elle est située entre les acides aminés 304 et 318. Cette région joue un rôle important dans les fonctions induites par l'acide hyaluronique. La fixation de l'HA sur le domaine extracellulaire de CD44 et la liaison de l'ankyrine sur le domaine intracellulaire de CD44 sont directement impliqués dans les phénomènes d'adhérence des cellules tumorales, d'invasion et de métastases. Une autre étude a démontré que le domaine de fixation à l'ankyrine de CD44s est nécessaire pour la signalisation oncogénique et la transformation tumorale [Zhu et Bourguignon, 1998].

IV.4.4.2. Les protéines ERM (Ezrine, Radixine Moesine),

De nombreuses études ont montré que certaines isoformes de CD44, comme par exemple CD44E, interagissent avec les protéines ERM [Tsukita et coll., 1997]. Les protéines ERM appartiennent à une famille de protéines qui permettent de lier le cytosquelette d'actine à la membrane plasmique [Tsukita et coll., 1997]. Elles doivent être activées afin de lier les protéines de la membrane aux filaments d'actine. Le mécanisme d'activation de ces protéines n'est pas complètement élucidé mais implique la phosphorylation de tyrosines et sérines-thréonines, la présence de PIP₂ et des protéines fixant le GTP [Tsukita et coll., 1997].

Les protéines ERM sont constituées de trois domaines : un domaine FERM (Four point one-ERM) N-terminal, un domaine central en hélice α et un domaine C-terminal qui fixe les filaments d'actine (Figure 18).

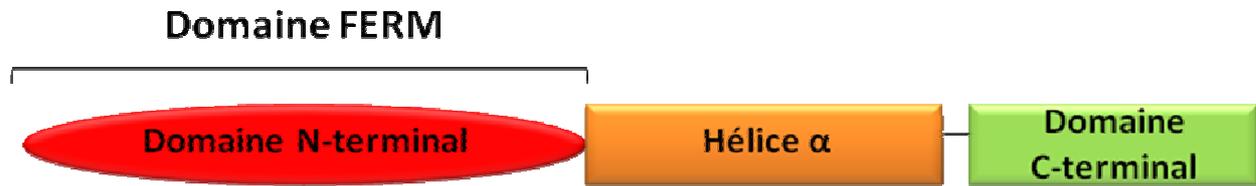


Figure 18: Représentation schématique de la structure des protéines ERM [D'après Hamada et coll., 2000].

Le domaine FERM joue un rôle essentiel dans l'association des protéines ERM avec la membrane plasmique et la reconnaissance des protéines membranaires, telles que les protéines d'adhérence. Le domaine FERM est constitué de trois sous-domaines A, B et C et se fixe à différentes cibles, comme les molécules d'adhésion CD44, CD43 et ICAM 1-3 [Hamada et coll., 2000 ; Bretscher et coll., 2002] (Figure 19).

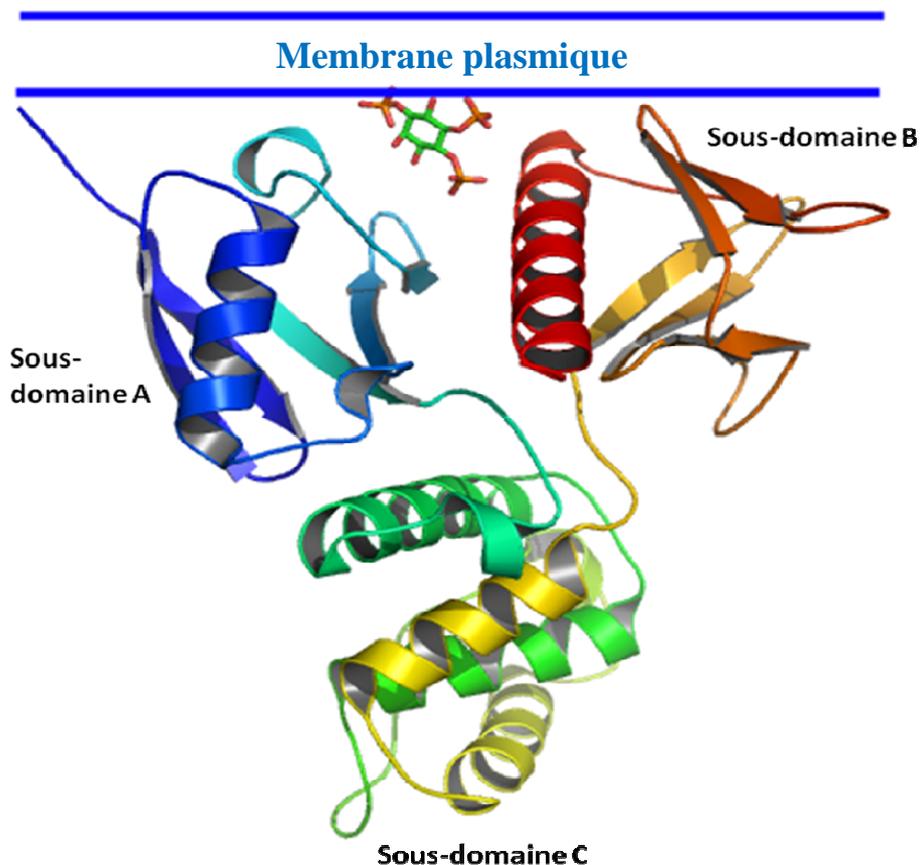


Figure 19: Structure cristallographique du domaine FERM de la radixine [d'après Hamada et coll., 2000].

Le domaine FERM se fixe principalement à la région juxta-membranaire située dans le domaine cytoplasmique de ces protéines (acides aminés 289-300 de CD44) [Heiska et coll., 1998 ; Yonemura et coll., 1998]. Des expériences d'immunofluorescence ont montré que CD44 est colocalisé avec les membres de la famille des protéines ERM dans les cellules de souris et de hamster [Tsukita et coll., 1994]. Les isoformes standards et variantes peuvent toutes les deux s'associer aux protéines ERM.

IV.4.4.3. CD44 et les Src kinases

CD44 peut également être associé aux Src kinases. En effet, de premières études ont montré que la Src kinase Lck est associée de manière constitutive à CD44s durant les mécanismes d'activation des lymphocytes T [Taher et coll., 1996]. L'interaction entre CD44s et la Src kinase a été étudiée dans les cellules de tumeurs épithéliales et il a été montré que l'ankyrine joue un rôle important dans cette association. En effet, la fixation de l'ankyrine au domaine cytoplasmique de CD44 est nécessaire à l'activité de la Src kinase p60 [Zhu et Bourguignon, 1998].

D'autres études montrent que CD44 s'associe à la Src kinase Lyn dans les lymphocytes B [Rozsnyay, 1999]. D'autres travaux ont montré que CD44v induit la survie de cellules de carcinome du colon *via* la voie Lyn/PI 3-kinase/Akt [Bates et coll., 2001]. Plus récemment, il a été montré que CD44 est associé à Lyn dans les cellules de cancer du colon et que cette association est nécessaire à l'effet de CD44 sur la migration cellulaire et la phosphorylation d'Akt [Subramaniam et coll., 2007]. A l'heure actuelle, les domaines impliqués dans l'interaction entre Lyn et CD44 ne sont pas identifiés.

IV.4.4.4. CD44 et la MMP-9

Plusieurs études ont montré que CD44 peut être associé à la MMP-9 à la surface de plusieurs types de cellules, comme les cellules de carcinome mammaire murin et les cellules de mélanome humain [Bourguignon et coll., 1998 ; Yu et Stamenkovic, 1999]. L'association de CD44 avec la MMP-9 a été démontrée par les expériences de co-immunoprécipitation et de colocalisation par immunofluorescence. Yu et Stamenkovic ont montré que CD44 interagit spécifiquement avec la MMP-9 active [Yu et Stamenkovic, 1999]. Il apparaît que la fixation

de l'acide hyaluronique sur CD44 ne semble pas nécessaire à l'interaction entre CD44 et la MMP-9. Cependant, l'HA induit le coclustering de plusieurs molécules de CD44 avec la MMP-9 active dans une lignée de cellules mammaires murines.

L'association entre la MMP-9 et CD44 semble promouvoir le potentiel invasif des cellules tumorales *in vitro* [Yu et Stamenkovic, 1999]. Cette association contribue également indirectement à la protéolyse cellulaire afin de réguler la motilité cellulaire, l'activation de facteurs de croissance, l'angiogénèse, ainsi que la survie cellulaire.

Il a également été démontré que la MMP-9 active, fixée à CD44, peut induire l'activation de TGF- β latent [Yu et Stamenkovic, 2000]. La génération de TGF- β actif à la surface des cellules induit la croissance tumorale et le processus métastatique en induisant l'angiogénèse [Yu et Stamenkovic, 2000].

Récemment, Redondo-Munoz et coll. ont montré que la pro-MMP-9 forme un complexe avec une isoforme de 190 kDa de CD44 et l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ dans les cellules leucémiques B-CLL [Redondo-Munoz et coll., 2008]. Ils ont montré que l'utilisation d'anticorps bloquant l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ ou CD44 ou la transfection des cellules avec des siRNAs spécifiques diminue l'expression de pro-MMP-9 associée à la membrane et augmente la forme sécrétée. Le domaine hémapexine de la MMP-9 semble nécessaire à l'interaction pro-MMP-9/CD44.

V. But du travail

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire « Signalisation et Récepteurs Matriciels » (SiRMA) qui fait partie de l'UMR CNRS 6237 « Matrice Extracellulaire et Dynamique Cellulaire » (MEDyC). La thématique de l'unité est l'étude des interactions entre les cellules et la matrice extracellulaire dans les conditions physiologiques et pathologiques. L'unité est constituée de trois équipes dont l'une étudie la régulation de la protéolyse et la signalisation cellulaire. Un sous-groupe de cette équipe étudie plus particulièrement la régulation des protéinases matricielles par leurs inhibiteurs naturels, les TIMPs.

La matrice extracellulaire, réseau complexe de macromolécules qui assurent la constitution, le maintien et le remodelage de l'architecture tissulaire, est une structure extrêmement dynamique qui est en perpétuel renouvellement. Ce renouvellement est assuré, entre autres, par la régulation de l'activité des métalloprotéinases matricielles (MMPs) par leurs inhibiteurs naturels, les inhibiteurs tissulaires de métalloprotéinases (TIMPs). Outre leur activité inhibitrice de MMPs, les TIMPs présentent de multiples fonctions dont certaines semblent indépendantes de l'activité inhibitrice de MMPs. Parmi ces fonctions, les TIMPs jouent un rôle dans l'hématopoïèse. Les TIMP-1 et -2 ont tout d'abord été décrits pour leur activité potentialisant les effets de l'érythropoïétine (Epo) sur la prolifération de progéniteurs érythroïdes normaux et de lignées érythroleucémiques. Le TIMP-1 présente d'autres activités biologiques, comme l'activité mitogénique, l'activité stéroïdogénique, l'activité anti-angiogénique et l'activité anti-apoptotique.

Dans notre équipe, nous nous intéressons plus particulièrement aux rôles du TIMP-1 au cours de l'érythropoïèse. Nous avons montré que le TIMP-1 induit la survie des cellules érythroleucémiques humaines UT-7 et myéloïdes murines 32D en activant la voie JAK2/PI 3-kinase/Akt [Lambert et coll., 2003]. Depuis plusieurs années, l'étude des récepteurs du TIMP-1 fait l'objet de nombreux travaux et fait apparaître l'existence de récepteurs spécifiques qui ne sont pas des métalloprotéinases. Ces récepteurs semblent spécifiques du type cellulaire et des effets biologiques. Récemment, nous avons montré que le TIMP-1 se fixe à une pro-MMP-9 localisée à la membrane plasmique des cellules UT-7 et que l'expression membranaire de la pro-MMP-9 est nécessaire à l'effet anti-apoptotique du TIMP-1.

Le but de ce travail de thèse est d'identifier le récepteur du TIMP-1 en relation avec la survie cellulaire. Pour cela, nous avons utilisé les cellules UT-7 qui appartient à une lignée érythroleucémique humaine.

Dans une première partie, nous nous sommes intéressés aux protéines susceptibles d'ancrer la pro-MMP-9 à la membrane plasmique et nous avons étudié le rôle de la glycoprotéine CD44 dans l'effet anti-apoptotique du TIMP-1. Dans la signalisation anti-apoptotique du TIMP-1, JAK2 est la première tyrosine kinase qui est phosphorylée suite à une stimulation par le TIMP-1. Par conséquent, dans une deuxième partie, nous avons étudié l'interaction entre CD44 et la tyrosine kinase JAK2. D'autres kinases pourraient intervenir dans la signalisation anti-apoptotique du TIMP-1, parmi lesquelles les Src kinases. C'est pourquoi, dans une dernière partie, nous avons étudié l'implication de la Src kinase Lyn dans l'effet anti-apoptotique du TIMP-1.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. Culture cellulaire

I.1. Les cellules UT-7

Les cellules UT-7 utilisées pour cette étude nous ont été généreusement données par le Dr Patrick Mayeux (Institut Cochin, Paris, France). Les cellules UT-7 sont des cellules érythroleucémiques humaines, issues de la moelle osseuse d'un patient atteint de leucémie mégacaryoblastique aiguë. Ces cellules sont strictement dépendantes de l'interleukine 3 (IL-3), du granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) et de l'érythropoïétine (Epo) pour leur croissance et leur survie [Komatsu et coll., 1991]. Le sous-clone utilisé pour cette étude est strictement dépendant de l'Epo et répond peu au GM-CSF. Ces cellules expriment environ 3000 récepteurs à l'Epo par cellule ($K_d = 37 \text{ pM}$) et 60000 récepteurs au Stem Cell Factor (SCF) [Mayeux et coll., 1993].

Les cellules UT-7 sont cultivées dans le milieu α -MEM (alpha-Minimum Essential Medium, Sigma) contenant 10 % (v/v) de sérum de veau fœtal (SVF, Abcys), 2 mM de L-glutamine (L-Glu, Sigma), 0,1 % (v/v) d'un mélange d'antibiotiques (10000 U/mL pénicilline, 10 mg/mL streptomycine et 25 $\mu\text{g/mL}$ amphotéricine B, Sigma) et 0,5 U/mL Epo (Tebu-Bio). Les cellules sont placées sous atmosphère humide à 37°C en présence de 5 % (v/v) de CO_2 . La concentration cellulaire maximale est de $750 \cdot 10^3$ cellules/mL et leur temps de doublement est de 24 heures. Les cellules sont diluées deux fois par semaine à la concentration de 25 à $60 \cdot 10^3$ cellules/mL.

I.2. Les progéniteurs érythroïdes normaux

Les progéniteurs érythroïdes normaux humains (CD34+) sont obtenus à partir de sang cordon ombilical humain, après consentement des mères. Leur purification s'effectue à l'aide d'une colonne immunomagnétique à partir des cellules hématopoïétiques immatures en suspension.

Le sang de cordon ombilical humain est dilué volume à volume dans le PBS (Phosphate Buffer Saline, GibcoBRL) puis déposé sur Ficoll (Eurobio). Après une centrifugation (450 g, 30 minutes, 20°C), l'anneau blanc contenant les cellules immatures hématopoïétiques est récupéré. Après 2 lavages dans le PBS, les cellules sont resuspendues à

la concentration de 1.10^8 cellules/300 μ L de PBS contenant 2 mM EDTA et 0,5 % (p/v) de BSA (Albumine Sérique Bovine, Sigma). 100 μ L de FcR Blocking Reagent (Miltenyi Biotech) et 100 μ L de billes magnétiques CD34 Microbeads (Miltenyi Biotech) sont ajoutés à 1.10^8 cellules. Les cellules sont incubées pendant 30 minutes sous agitation rotative à 4°C. Après un lavage avec 10 mL de PBS contenant 2 mM EDTA et 0,5 % (p/v) BSA, les cellules sont resuspendues à la concentration de 1.10^8 cellules/500 μ L PBS contenant 2 mM EDTA et 0,5 % (p/v) BSA. Le tri des cellules se fait sur colonne magnétique MACS (Miltenyi Biotech) placée sur un aimant. Les cellules positives au marqueur de surface CD34 seront retenues sur la colonne. L'élution se fait en ôtant la colonne du support aimanté et en ajoutant 1 mL de PBS contenant 2 mM EDTA et 0,5 % (p/v) BSA. Les cellules sont comptées puis mises en culture (1.10^6 cellules/ml) dans le milieu Stem Pro-34 SFM (Gibco BRL). L'utilisation de facteurs de croissance spécifiques (SCF, Il-3 et Il-6) déterminera l'engagement des cellules CD34+ vers la voie érythroïde. Les cellules CD34+ sont cultivées pendant 7 jours dans le milieu Stem Pro-34 SFM contenant 10 ng/mL Interleukine-6 (Il-6, Sigma), 10 ng/mL Il-3 (Sigma), 25 ng/mL Stem Cell Factor (SCF, Sigma) et 0,1 % (v/v) d'antibiotiques (10 mg/mL streptomycine, 10000 U/mL pénicilline, 25 μ g/mL amphotéricine B/solution mère 1000X, Sigma). Les progéniteurs sont ensuite cultivés pendant une deuxième période de 7 jours dans le milieu Stem Pro 34-SFM contenant 10 ng/mL Il-3, 25 ng/mL SCF, 0,1 % (v/v) d'antibiotiques et 2 U/mL d'Epo.

I.3. Stimulation des cellules UT-7

Avant toute stimulation et afin d'éteindre les voies de signalisation induites par les facteurs de croissance, les cellules UT-7 sont mises au repos pendant 16 heures. Les cellules en phase de croissance (300.10^3 cellules/mL) sont lavées 3 fois avec le milieu α -MEM tamponné Hépès (10 mM, pH 7,4) puis incubées pendant 16 heures à 37°C dans le milieu de repos (Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) contenant 0,2 % (v/v) albumine sérique bovine (BSA, Sigma) déionisée sur billes échangeuses d'ions (Dowex AG 501X8D, Merck), 2 mM L-Glu et 20 μ g/mL d'holotransferrine humaine (Sigma)).

Après la mise au repos, les cellules sont centrifugées (170 g, 10 min, 4°C) et le culot cellulaire est resuspendu dans le milieu IMDM. La concentration cellulaire est ajustée en fonction de l'expérience (750.10^3 cellules/essai pour les extraits protéiques totaux et 10.10^6

cellules/essai pour les immunoprécipitations). Les cellules sont préincubées ou non en présence de différents inhibiteurs pendant 30 min à 37°C puis stimulées avec 5 ng/mL TIMP-1 (Calbiochem) pendant 5 minutes. La réaction est arrêtée par ajout de 3,5 mL de PBS glacé contenant 50 µM d'orthovanadate de sodium (Na₃VO₄), un inhibiteur des tyrosines phosphatases [Gordon et coll., 1991].

II. Mesure de la survie cellulaire par cytométrie en flux

La survie cellulaire est analysée par cytométrie en flux suite à un double marquage à l'annexine-V-FLUOS (MACS) et à l'iodure de propidium (IP, MACS).

L'annexine V se fixe sur la phosphatidylsérine (PS) qui est externalisée durant le processus apoptotique. Ainsi, le stade précoce d'apoptose peut être observé par marquage de la PS avec un composé fluorescent, l'annexine-V-FLUOS, analogue de l'annexine-V. L'IP permet de distinguer les cellules viables des cellules non viables. Les cellules viables, présentant une membrane intacte, vont exclure l'IP tandis que les cellules non viables, présentant une membrane endommagée, vont être perméables à l'IP. Par ce double marquage, nous allons pouvoir distinguer les différents stades d'apoptose (Figure 20):

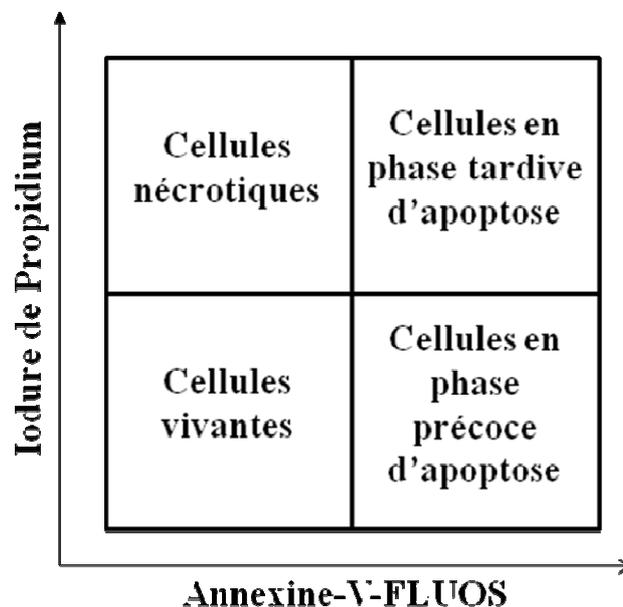


Figure 20: Schéma représentatif du double marquage à l'annexine-V-FLUOS et à l'iodure de propidium

- Les cellules vivantes négatives à l'annexine-V-FLUOS et à l'IP et visualisées dans le quadrant en bas à gauche.
- Les cellules en phase précoce d'apoptose positives à l'annexine-V-FLUOS et négatives à l'IP et visualisées dans le quadrant en bas à droite.
- Les cellules en phase tardive d'apoptose positives aux deux marqueurs et visualisées dans le quadrant en haut à droite.
- Les cellules nécrotiques négatives à l'annexine-V-FLUOS et positives à l'IP et visualisées dans le quadrant en haut à gauche.

Après la mise au repos, les cellules UT-7 (5.10^5 cellules/essai) sont incubées pendant 24 heures en présence de 5 ng/mL TIMP-1 et de différentes concentrations d'inhibiteurs. Après centrifugation (170 g, 10 min, 20°C), les cellules sont lavées deux fois dans le PBS et une fois dans le tampon d'incubation (10 mM Hépès/NaOH, pH 7,4, 140 mM NaCl, 5 mM CaCl₂). Les cellules sont ensuite resuspendues dans 100 µL de tampon d'incubation et incubées avec l'annexine-V-FLUOS (2µL/essai) et l'IP (1µg/essai) pendant 15 minutes à l'obscurité. La réaction est arrêtée par ajout de 400 µL de tampon d'incubation. Les cellules sont ensuite analysées à l'aide du cytomètre en flux FACS Calibur (Benton Dickinson) grâce au programme d'analyse Cell Quest (Benton Dickinson).

III. Transfection des cellules

III.1. siRNA (short interfering RNA)

Les siRNA Lyn sont fournis par Santa Cruz Biotechnology et les sncRNA par Eurogentec. La séquence utilisée pour les siRNA CD44 est : 5'- AUU-GAA-GCA-AUA-UGU-GUC-A99-3'.

III.2. Electroporation

Les cellules en phase exponentielle de croissance (300.10^3 cellules/mL) sont lavées deux fois dans le milieu OptiMEM (Gibco) puis incubées à la concentration de 10.10^6

cellules/mL dans l'OptiMEM. Elles sont ensuite soumises à une électroporation (280 V, 250 μ F) en présence de différentes concentrations de siRNA (short interfering) ou de sncRNA (siRNA negative contrôle, Eurogentec). Les cellules sont ensuite incubées à la concentration de $100 \cdot 10^3$ cellules/mL pendant 24 ou 48 heures à 37°C, en présence de 5% (v/v) de CO₂ dans le milieu α -MEM contenant 10% (v/v) SVF, 1% (v/v) L-glutamine à 200 mM et 0,5 U/mL Epo ou 5 ng/mL TIMP-1.

IV. Analyse des protéines

IV.1. Extraits protéiques totaux

Après stimulation, les cellules UT-7 ($750 \cdot 10^3$ cellules/mL) sont centrifugées (170 g, 10 min, 4°C). Le culot cellulaire est lavé deux fois dans le PBS glacé contenant 50 μ M Na₃VO₄. Les cellules sont ensuite lysées par addition de 85 μ L de tampon Laemmli bouillant contenant 0,0625 M Tris, 2% (p/v) sodium dodécylsulfate (SDS), 10% (v/v) β -mercaptoéthanol et 1 mM Na₃VO₄. Les extraits protéiques sont ensuite portés à ébullition pendant 5 minutes puis congelés à -80°C jusqu'à analyse.

IV.2. Biotinylation des protéines membranaires

Après stimulation, les cellules (5 à $10 \cdot 10^6$ cellules/essai) sont centrifugées (170 g, 10 min, 4°C) et le culot cellulaire est lavé trois fois dans le PBS glacé contenant 50 μ M Na₃VO₄. Les protéines de surface sont biotinylées par incubation 30 minutes à 4°C sous agitation avec 2,5 mL de sulfo-NHS-Biotine (500 μ g/mL dans du PBS, Thermo scientific), un analogue de la biotine. Après trois lavages dans le PBS glacé contenant 50 μ M Na₃VO₄, les cellules sont incubées 30 minutes à 4°C sous agitation dans 5 mL de solution de glycine (100 mM dans du PBS, Sigma). Après trois lavages dans le PBS glacé contenant 50 μ M Na₃VO₄, les cellules sont lysées par ajout de 1 mL de tampon de lyse (50 mM Na₂HPO₄ (pH 8,0), 300 mM NaCl, 1% (v/v) NP40) contenant 10 μ g/mL aprotinine, 10 μ g/mL leupeptine, 1 μ M pepstatine, 10 μ g/mL E64 et 1 mM phénylméthylsulfonylfluoride et 1 mM Na₃VO₄. Les molécules non solubilisées sont éliminées par centrifugation (10000 g, 1 min à 4°C) et la concentration

protéique des surnageants est évaluée en utilisant le kit de dosage BCA (Acide Bicinchoninique, Interchim). La concentration protéique est ajustée entre 750 µg/mL et 1 mg/mL. 40 µL de billes couplées à l'avidine (ImmunoPure immobilized monomeric avidin gel, Pierce) sont incubées avec 1 mL de protéines biotinylées, sous agitation rotative pendant une nuit à 4°C. Les complexes avidine/protéines biotinylées sont centrifugés (10000 g, 30 sec, 4°C,) et lavés cinq fois dans le tampon de lyse préparé extemporanément. Les protéines biotinylées sont éluées de manière compétitive avec 40 µL de D-Biotine ImmonoPure (10 mM, Pierce) sous agitation rotative, une nuit à 4°C. Les protéines biotinylées sont récupérées suite à une centrifugation (10000 g, 30 sec, 4°C) et congelées à -80°C avant analyse.

IV.3. Immunoprécipitation

Après arrêt de la réaction, les cellules ($10 \cdot 10^6$ cellules/mL) sont centrifugées (170 g, 10 min, 4°C) puis lavées dans le PBS glacé contenant 50 µM Na₃VO₄. Les cellules sont ensuite lysées pendant 15 minutes à 4°C dans 250 µL de tampon de lyse contenant 1% (v/v) Brij 98, 10 mM Tris/HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10% (v/v) glycérol, 1 mM Na₃VO₄ et des inhibiteurs de protéases (10 µg/mL aprotinine, 10 µg/mL leupeptine, 1µM pepstatine, 10 µg/mL E64 et 1 mM phénylméthylsulfonylfluoride). Après centrifugation (20000 g, 20 min, 4°C), les surnageants contenant les protéines solubilisées sont incubés pendant une heure à 4°C avec 1 à 5 µg d'anticorps par essai. Les complexes antigène-anticorps ainsi formés sont incubés pendant une heure à 4°C sous agitation rotative avec 25 µL de protéines G couplées à des billes de sépharose (GE Healthcare). Les complexes protéines G-antigènes-anticorps sont ensuite lavés une fois dans le tampon de lyse 1 % puis trois fois dans le tampon de lyse 0,1 % (0,1 % (v/v) Brij 98, 10 mM Tris/HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 % (v/v) glycérol et 1 mM Na₃VO₄). Les protéines immunoprécipitées sont solubilisées dans 100µL de tampon Laemmli 3X bouillant puis portées à ébullition pendant 5 minutes. Après centrifugation (10000g, 1 min, 4°C), les protéines décrochées des billes sont conservées à -80°C avant analyse.

IV.4. Mesure de l'activité PI 3-kinase

Après immunoprécipitation avec 5 µg d'anticorps anti-p85, les complexes protéines G-antigènes-anticorps sont incubées une heure à 4°C sous agitation rotative, puis lavées une fois avec le tampon de lyse 1 %, deux fois avec le tampon de lyse 0,1 % et deux fois avec le tampon PI 3-kinase (100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, 25 mM Hépes, 200 µM adénosine, pH 7,4). Un volume de solution de phosphatidylinositol (PI) (10 mg/mL) est mélangé avec un volume de solution de phosphatidylsérine (PS) (10 mg/mL) puis évaporé sous azote. 500 µL d'une solution d'ATP (2,5 µM) préparée extemporanément dans le tampon PI 3-kinase sont ensuite ajoutés au mélange PI-PS évaporé. Ce mélange est ensuite soniqué trois fois pendant 10 secondes dans la glace afin de former des vésicules PI-PS. Sur le culot de protéines G-antigènes-anticorps, 70 µL de solution de vésicules et 10 µCi d'ATP [γ -³²P] sont ajoutés et incubés pendant 15 minutes à 30°C. La réaction est arrêtée par ajout de 100 µL d'HCl 1N et de 350 µL de CHCl₃/MeOH (1/1). Après élimination de la phase supérieure, la phase inférieure chloroformique contenant les phospholipides est lavée deux fois dans 200 µL de MeOH/HCl 1N (1/1) puis évaporée sous azote. Les phospholipides sont resuspendus dans 30 µL de CHCl₃/CH₃OH (95/5 v/v) et déposés sur plaque de silice préalablement activée par pulvérisation avec de l'oxalate de potassium 2 % (v/v) suivi d'une incubation 45 minutes à 120°C. La migration est réalisée dans le solvant CHCl₃/CH₃OH/C₃H₆O/CH₃COOH/H₂O (40/13/15/12/7, v/v/v/v/v). Les phospholipides sont révélés suite à la saturation des doubles liaisons par des vapeurs d'iode et le PIP radioactif est révélé par autoradiographie.

IV.5. Mesure de l'activité kinasique de Lyn

Après immunoprécipitation avec 2 µg d'anticorps anti-Lyn et incubation une heure à 4°C sous agitation rotative avec les billes, les complexes protéines G-antigènes-anticorps sont lavés une fois dans le tampon de lyse 1%, deux fois dans le tampon de lyse 0,1% Brij 98 et deux fois dans le tampon kinase (25 mM Hépes, 2mM MnCl₂, 10 mM MgCl₂ et 1 mM Na₃VO₄). Les complexes sont ensuite incubés pendant 15 minutes à 30°C en présence de 50 µL de mélange réactionnel contenant 100 µM ATP, 5 µCi ATP [γ -³²P] et 5 µg émolase dénaturée, le substrat exogène de la kinase Lyn. La réaction est arrêtée en ajoutant 25 µL de tampon Laemmli 3X. Les échantillons sont alors centrifugés (15000 g, 1 min, 4°C) puis le surnageant est porté à ébullition pendant 5 minutes. Les protéines sont séparées par SDS-

PAGE sur un gel à 10% (cf paragraphe II.6.). Après migration (une nuit, 45 volts, 4°C), le gel est fixé pendant 30 minutes dans une solution contenant 11,4% (v/v) acide trichloracétique, 10% (v/v) alcool absolu, rincé deux fois à l'eau distillée puis placé 30 minutes dans le fixateur (5% (v/v) méthanol, 5% (v/v) glycérol). Le gel est ensuite séché et l'énolase phosphorylée est révélée par autoradiographie.

IV.6. Western blot

Les extraits protéiques totaux sont analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dans des conditions dénaturantes (SDS-PAGE). La migration est effectuée pendant une nuit à température ambiante dans le tampon de migration (25 mM Tris/HCl pH 8,6, 192 mM glycine et 0,1% (p/v) SDS) et sous une tension de 45 volts. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose (Schleicher et Schuell) à 4°C, sous une tension de 70 volts, pendant 80 minutes, dans le tampon de transfert (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% (v/v) méthanol et 0,1% (p/v) SDS). Les protéines sont ensuite colorées au rouge Ponceau afin de vérifier l'efficacité du transfert et de marquer la position des marqueurs de poids moléculaire (Biolabs). La membrane est ensuite saturée pendant une heure à température ambiante dans le tampon TBST (Tris Buffered Saline-Tween) (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% (p/v) Tween 20) contenant 5% (p/v) de lait (Merck) puis incubée pendant une nuit à 4°C sous agitation dans une solution de TBST contenant 5% (p/v) de lait (Merck) et l'anticorps primaire à la concentration optimale d'utilisation. Les anticorps primaires anti-phospho-Akt, anti-phospho-Lyn et anti-Lyn sont incubés dans une solution de TBST contenant 5% (p/v) de BSA à la place du lait. Après cinq lavages de 5 minutes dans le TBST, la membrane est incubée une heure, à température ambiante et dans l'obscurité, dans une solution de TBST contenant 5% (p/v) de lait et l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase adapté à l'anticorps primaire. Après cinq lavages de 15 minutes dans le TBST, les protéines sont révélées par chimiluminescence (Kit ECL, Amersham Pharmacia Biotech.).

Après révélation, les anticorps peuvent être découplés de la membrane par incubation à 55°C pendant 30 minutes dans une solution de Tris/HCl 62,5 mM (pH 6,7) contenant 2% (p/v) SDS et 100 mM β -mercaptoéthanol. Cinq lavages d'une heure dans le tampon TBST permettent d'éliminer le β -mercaptoéthanol. La membrane peut ainsi être de nouveau saturée puis réhybridée avec un autre anticorps selon le protocole décrit.

IV.7. Marquage par immunofluorescence

Les cellules (300.10^3 cellules/mL) sont incubées pendant une heure à 37°C sur des lamelles de verre préalablement coatées à la poly- lysine par incubation pendant 15 minutes à 37°C. Après trois lavages de 5 minutes dans le PBS, les cellules sont fixées par incubation pendant 10 minutes avec 250 µL de paraformaldéhyde (4 % (p/v) dans du PBS). Après trois lavages de 5 minutes dans le PBS, les sites non spécifiques sont saturés par incubation pendant une heure à température ambiante avec une solution de saturation (BSA 3 % (p/v) diluée dans le PBS). Les cellules sont ensuite incubées pendant deux heures à température ambiante avec l'anticorps primaire désiré dilué dans une solution de BSA 1 % (p/v) diluée dans le PBS. Après trois lavages de 5 minutes dans le PBS, les cellules sont incubées pendant une heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire couplé à un fluorophore. Après trois lavages dans le PBS et un lavage dans l'eau distillée, les lamelles contenant les cellules sont montées sur des lames de verre à l'aide du milieu de montage Prolong Gold Antifade reagent with DAPI (Invitrogen). La fluorescence émise est ensuite analysée au microscope confocal (Leica SP2 AOBS).

V. Transcription inverse et Réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR)

V.1. Extraction des ARNs totaux

L'extraction des ARNs totaux se fait à l'aide du Kit RNeasy de Qiagen selon le protocole fourni par le fabricant. Les cellules (1.10^6 cellules/essai) sont lysées par ajout de 350 µL de tampon RLT contenant 1 % (v/v) de β -mercaptoéthanol. Après homogénéisation avec une seringue surmontée d'une aiguille 20G, 350 µL d'éthanol à 70 % sont ajoutés puis la totalité des échantillons est déposée sur une colonne RNeasy mini spin (Qiagen) placée sur un tube collecteur de 2 mL. Le culot cellulaire est lavé deux fois dans 700 µL de tampon RW1 et deux fois avec 500 µL de tampon RPE (9000 g, 2 min, température ambiante). Les ARNs totaux sont ensuite élués dans des tubes de 1,5 mL par ajout de deux fois 30 µL d'eau ne contenant pas de RNases (8000 g, 2 min, température ambiante) et congelés à -80°C avant dosage.

V.2. Dosage et contrôle de la qualité des ARNs

Avant chaque RT-PCR, les ARNs sont quantifiés par spectrophotométrie à 260 nm et la contamination protéique est estimée par mesure de l'absorbance à 280 nm. La concentration en ARN est calculée sachant qu'une unité de densité optique (DO) correspond à 40 µ/mL d'ARN pur. Le rapport de la DO mesurée à 260 nm sur la DO mesurée à 280 nm doit être compris entre 1,9 et 2. Un rapport inférieur à 1,9 signifie qu'il y a présence de contaminants protéiques. S'il est supérieur à 2, il existe une contamination à l'isothiocyanate de guanidine.

En plus du dosage par spectrophotométrie, la qualité des ARNs est contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose à 2 % (p/v) dans du TBE (Tris Borate EDTA, Euromedex) 0,5X en présence de 5 µL de bromure d'éthidium (BET) à 1 mg/mL, après addition de tampon de charge 6X aux échantillons. La migration s'effectue pendant 30 minutes à 100 V. Lors de la révélation sous ultra-violets (UV), la présence de deux bandes nettes et distinctes reflète la qualité des ARN ribosomiaux majoritaires (18S et 28S).

V.3. Transcription inverse (RT)

Les extraits d'ARN totaux (1 µg dans de l'eau DEPC) sont incubés dans le thermocycleur pendant une heure à 42°C et 5 minutes à 95°C en présence de 4 µL de tampon 5X, 2 µL d'oligonucléotides (dNTP) à 10 mM, 0,25 µL d'oligodT (0,5 mg/mL), 0,75 µL d'héxamères, 1 µL d'enhancer, 1 µL de transcriptase inverse (Verso) et 1 µL d'eau. Les ADN complémentaires (ADNc) synthétisés sont stockés à -20°C.

V.4. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Chaque réaction de polymérisation en chaîne est réalisée à partir de 2,5 µL d'ADNc synthétisés par RT et dilués au dixième auxquels sont ajoutés 2,5 µL tampon 10X, 1, 0,5 µL dNTP à 10 mM, 1,5 µL MgCl₂, 16,9 µL d'eau exempte de DNases et de RNases, 0,1 µL Taq polymérase (Abgene) et 1 µL des amorces sens et antisens du gène étudié (10 µM chacune).

Les amorces utilisées sont :

- Lyn sens : 5' - TGT GAG AGA TCC AAC GTC CA-3'

- Lyn antisens : 5' - TTT GCT TTC CAC CAT TCT CC-3'
- CD44 sens : 5' - CCT TTG ATG GAC CAA TTA CCA T-3'
- CD44 antisens : 5' - GGG TAG ATG TCT TCA GGA TTC G-3'
- MMP-9 sens : 5' - CAT CGT CAT CCA GTT TGG TG-3'
- MMP-9 antisens : AGG GAC CAC ACC TCG TCA TC-3'

L'amplification est réalisée selon le protocole suivant :

- une étape dénaturante à 95°C pendant 2 minutes,
- 40 cycles comprenant une phase de dénaturation (95°C , 30 sec), une phase d'hybridation (60°C, 30 sec) et une phase d'élongation (72°C, 30 sec),
- une étape de terminaison de l'élongation des chaînes d'ADN (72°, 10 min).

Les produits PCR sont conservés à 4°C avant d'être analysés sur gel d'agarose à 2 % (p/v) contenant du BET (5µL à 1 mg/mL dans 100 mL de solution). La migration s'effectue à 100 V pendant 30 minutes dans du tampon TBE 0,5X. Après électrophorèse, les bandes sont révélées par excitation UV du BET.

V.5. PCR quantitative (qPCR)

Chaque réaction de PCR quantitative est réalisée à partir de 5 µL d'ADNc synthétisés par RT et dilués au dixième auquel sont ajoutés 7,5 µL de sybergreen 2X, 1,1 µL 'eau et 1,4 µl du mélange d'amorces (3 µM).

L'amplification est réalisée selon le protocole suivant :

- une étape d'activation de la polymérase à 95°C pendant 15 sec,
- 40 cycles comprenant une phase de dénaturation (95°C, 30 sec) et une phase d'hybridation (60°C, 30 sec), la fluorescence étant lue à chaque cycle.
- Une étape de « melting curve assay » où la température passe progressivement de 60 à 95°C.

VI. Anticorps et Inhibiteurs utilisés

VII.1. Les anticorps

<i>Anticorps utilisés</i>	<i>Fournisseur</i>	<i>Caractéristiques</i>
Anti-Akt	Cell Signaling Ref. 9272	Anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre les protéines Akt1, Akt2 et Akt3.
Anti-phospho-Akt (Thr 308)	Cell Signaling Ref. 9275	Anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre la forme phosphorylée sur thréonine 308 de la protéine Akt.
Anti-CD44 (A020)	Calbiochem Ref. 217594	Anticorps monoclonaux de rat dirigés contre le déterminant commun des glycoprotéines de la famille de CD44 (85-95 kDa).
Anti-CD44 (F10-44-2)	Abcam Ref. ab6124	Anticorps monoclonaux de souris dirigés contre CD44.
Anti-JAK2	Upstate Ref. 06-255	Anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre les résidus 758-776 de JAK2 murin.
Anti-phospho-JAK2 (Tyr1007/1008)	Upstate Ref. 07-606	Anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre la forme phosphorylée sur tyrosine 1007 et 1008 de la protéine JAK2 humaine et murine.
Anti-Lyn	Cell Signaling Ref. 2732	Anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre l'isoforme de 56 kDa de Lyn.
Anti-phospho-Lyn (Tyr 507)	Cell Signaling Ref. 2731	Anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre la forme phosphorylée de Lyn sur tyrosine 507.
Anti-MMP-9 (Ab-1)	Calbiochem Ref. IM09L	Anticorps monoclonaux de souris dirigés contre la forme latente (92 kDa) et la forme active (83 kDa) de la MMP-9 humaine sous des conditions non réductrices, et contre la forme latente seulement sous des conditions réductrices.
Anti-MMP-9 propeptide	Chemicon Ref. AB19092	Anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre la région propeptide de la MMP-9, qui est clivée après activation enzymatique. Ne reconnaissent

		pas la MMP-9 active.
Anti-PI3 Kinase P85	Upstate Ref. 06-497	Anticorps polyclonaux de lapin qui reconnaissent la sous-unité p85 de la PI3 kinase.
Anti-TIMP-1	Calbiochem Ref. IM32L	Anticorps monoclonaux de souris dirigés contre la protéine TIMP-1.

VII.2. L'inhibiteur des Src kinases : le PP1

Le PP1 (4-Amino-5-(4-methylphenyl)-7-(t-butyl) pyrazolo [3,4-d] pyrimidine, Tebu-Bio) est un inhibiteur sélectif des tyrosine kinases de la famille des Src kinases. Il inhibe sélectivement Lck ($IC_{50} = 5$ nM), Lyn ($IC_{50} = 6$ nM), Src ($IC_{50} = 170$ nM) et Hck ($IC_{50} = 20$ nM).

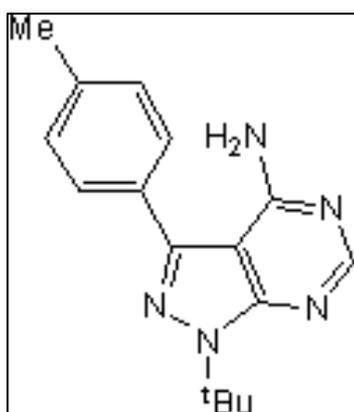


Figure 21 : Structure du PP1

VII. Expression des résultats

Les résultats sont exprimés par la moyenne des données obtenues accompagnée de l'écart standard de la moyenne (moyenne \pm SEM) calculés à partir de trois expériences indépendantes. Le test de Student est utilisé pour l'étude statistique des résultats obtenus (* $P < 0,01$; ** $P < 0,005$; *** $p < 0,001$).

RÉSULTATS

Première partie :

Mise en évidence du rôle de la protéine CD44 dans l'effet anti- apoptotique du TIMP-1

Dans notre laboratoire, nous avons étudié les voies de signalisation activées par le TIMP-1 et conduisant à la survie des cellules UT-7. Nous avons montré que le TIMP-1 exerce son effet anti-apoptotique en activant la voie JAK2/PI 3-kinase/Akt [Lambert et coll., 2003]. Le récepteur du TIMP-1 n'est pas identifié quelque soit le type de cellules sensibles au TIMP-1 utilisées mais récemment, nous avons montré que le TIMP-1 se fixe sur la pro-MMP-9 qui est localisée à la membrane plasmique des cellules UT-7. L'interaction entre le TIMP-1 et la pro-MMP-9 est nécessaire puisque le TIMP-1 n'exerce plus son effet anti-apoptotique dans les cellules qui n'expriment plus la pro-MMP-9. Nous nous sommes donc intéressés aux protéines susceptibles d'ancrer la pro-MMP-9 à la membrane. Dans la littérature, il a été montré que la fixation de la MMP-9 à la membrane plasmique se fait par interaction avec différentes molécules de surface telles que la glycoprotéine CD44 [Yu et Stamenkovic, 2000 ; Bourguignon et coll., 1998 ; Yu et Stamenkovic, 1999], l'intégrine $\beta 1$ [Partridge et coll., 1997] et la chaîne $\alpha 2$ du collagène IV [Olson et coll., 1998].

Dans cette première partie, nous avons donc étudié la possible association entre la pro-MMP-9 et CD44.

I. La glycoprotéine CD44 est associée de manière constitutive à la pro-MMP-9

I.1. Expression de CD44 dans les cellules UT-7

Nous avons tout d'abord étudié l'expression de CD44 dans les cellules UT-7.

Après 48 heures de culture dans le milieu α -MEM contenant 0,5 U/mL d'Epo, les ARNs totaux sont extraits des cellules UT-7 et l'expression du gène CD44 est analysée par RT-PCR. Les protéines totales sont extraites et l'expression de la protéine CD44 est analysée par western blot avec des anticorps dirigés contre la protéine CD44. Les résultats sont présentés dans la figure 22.

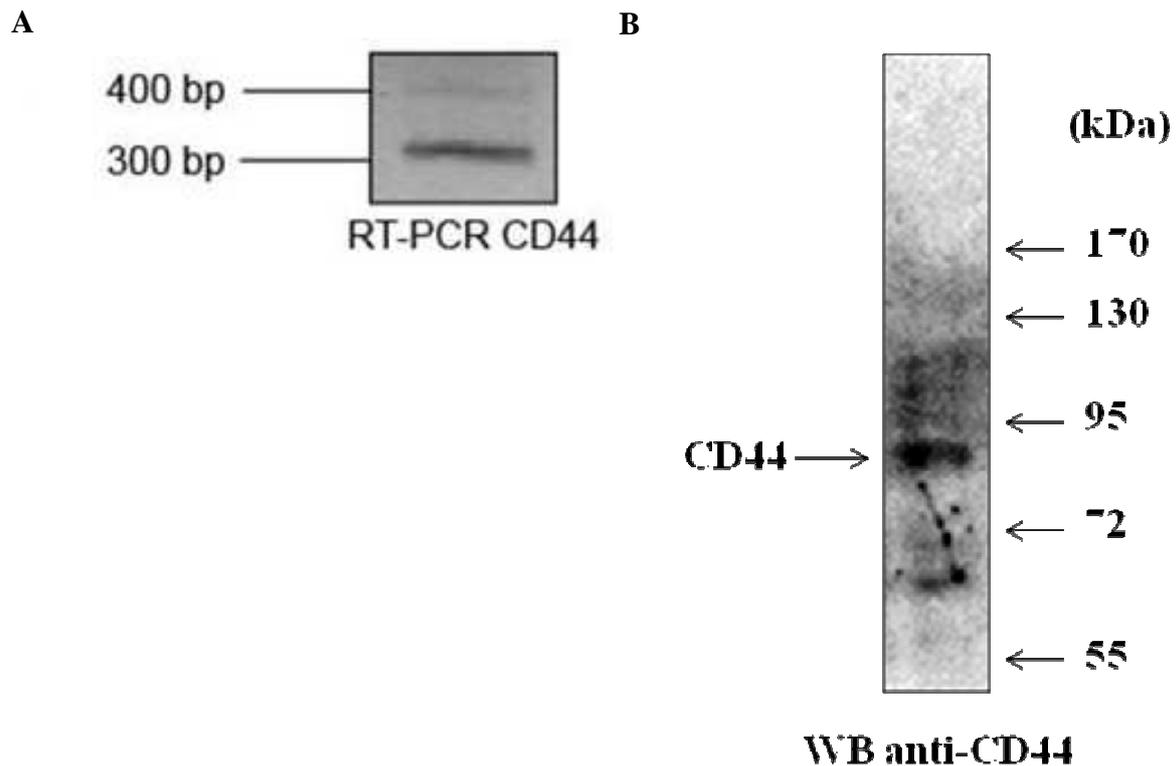


Figure 22: Expression de CD44 dans les cellules UT-7. (A) Les ARNs totaux sont extraits et l'expression du gène CD44 est analysée par RT-PCR. (B). Les extraits protéiques totaux sont analysés par western blot avec des anticorps anti-CD44. Un blot représentatif est montré.

Nous voyons, dans la figure 22, que les cellules UT-7 expriment CD44, tant au niveau génique (A) qu'au niveau protéique (B). Cette expression est constitutive. La bande de 85 kDa observée par western blot correspond à la forme standard de CD44, appelée CD44s ou CD44H (CD44 hématopoïétique) qui est la forme exprimée majoritairement dans les cellules hématopoïétiques.

I.2. CD44 est associée à la pro-MMP-9

Afin d'étudier l'association entre CD44 et la pro-MMP-9, nous avons tout d'abord réalisé des expériences d'immunoprécipitation. Les cellules UT-7 en phase exponentielle de croissance sont lysées et les protéines sont immunoprécipitées avec des anticorps anti-CD44 ou anti-MMP-9 puis analysées par western blot avec des anticorps anti-pro-MMP-9 et anti-CD44 respectivement. Les anticorps anti-MMP-9 utilisés pour l'immunoprécipitation

reconnaissent la forme active et la forme latente de la MMP-9 tandis que l'anticorps anti-pro-MMP-9 utilisé pour le western blot ne reconnaît que la forme pro-MMP-9. Les résultats sont présentés dans la figure 23.

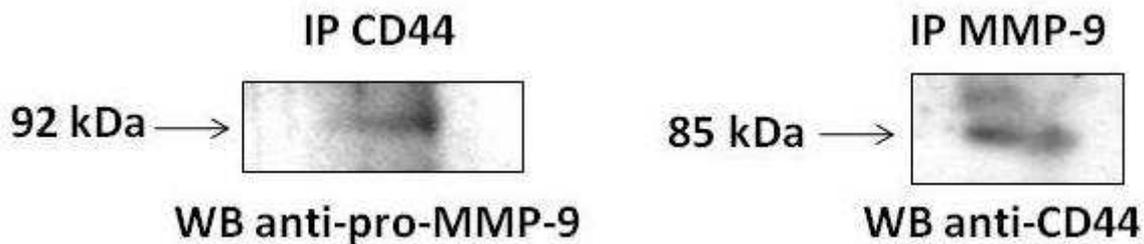


Figure 23: CD44 et la pro-MMP-9 sont associées de manière constitutive dans les cellules UT-7. Les lysats cellulaires sont incubés avec des anticorps CD44 et MMP-9 et les protéines immunoprécipitées sont analysées par western blot avec des anticorps anti-pro-MMP-9 et anti-CD44.

Dans la figure 23, nous voyons que la pro-MMP-9 est détectée dans les immunoprécipités anti-CD44. Une seule bande est détectée et correspond à la forme pro-MMP-9 (92 kDa). Il n'y a pas de MMP-9 active dans nos cellules. Inversement, nous voyons que CD44 est détectée dans les immunoprécipités anti-MMP-9. Ces résultats indiquent que la glycoprotéine CD44 et la pro-MMP-9 sont associées de manière constitutive dans les cellules UT-7.

I.3. CD44 et la pro-MMP-9 sont colocalisées à la membrane plasmique des cellules UT-7

Afin de préciser la localisation de CD44 dans les cellules UT-7, nous avons ensuite réalisé des expériences d'immunofluorescence.

Les cellules en phase exponentielle de croissance viennent adhérer sur des lamelles de verre recouvertes de poly-L-lysine et fixées au paraformaldéhyde. La localisation de la pro-MMP-9 est détectée avec des anticorps anti-pro-MMP-9 couplés à l'Alexa 568 (λ excitation = 543 nm, λ émission = 610 nm, fluorescence dans le rouge) et celle de la protéine CD44 avec des anticorps anti-CD44 couplés à la cyanine 2 (Cy2) (λ excitation = 492 nm, λ émission = 665 nm, fluorescence dans le vert). La fluorescence est observée par microscopie confocale. Les résultats sont présentés dans la figure 24.

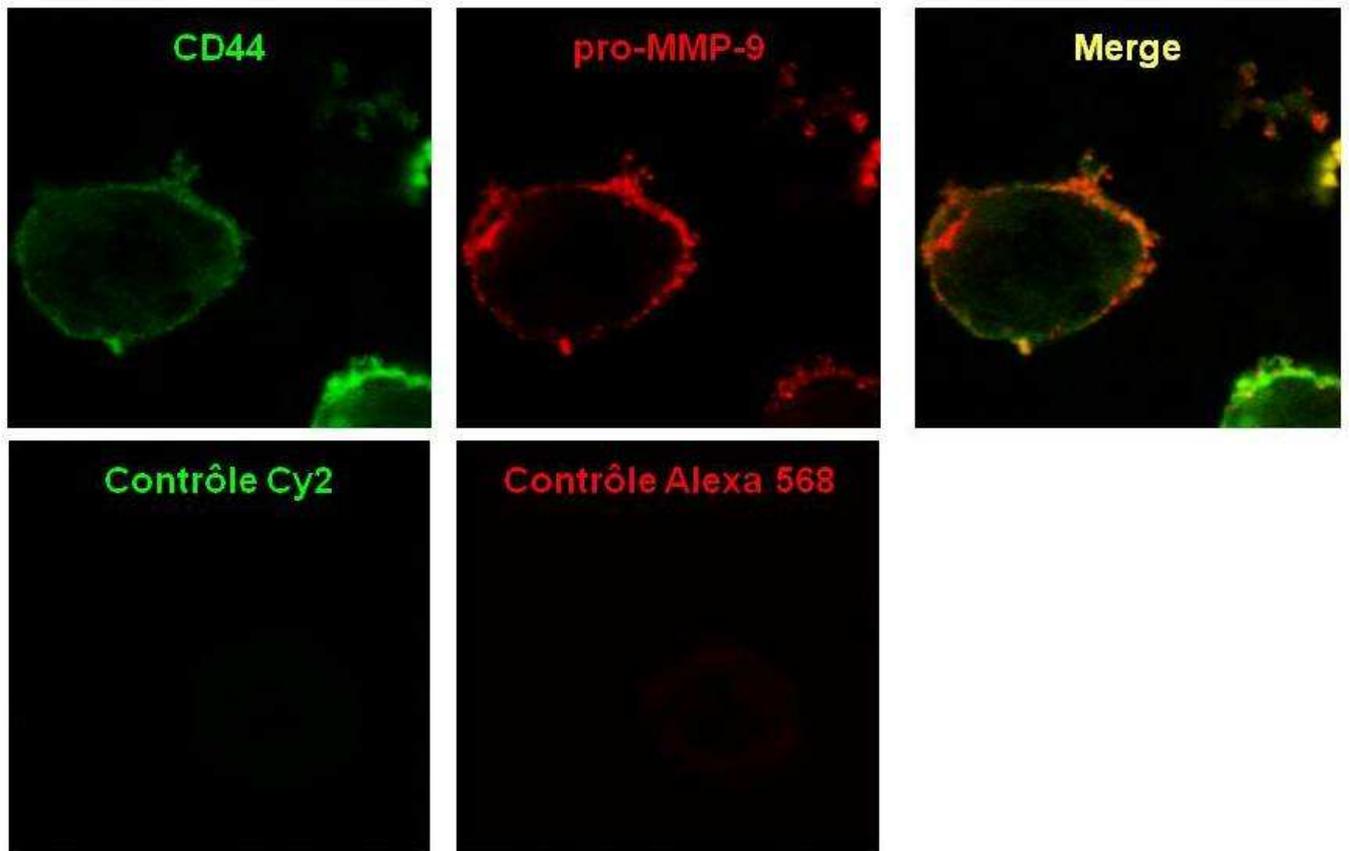


Figure 24: CD44 et la pro-MMP-9 sont colocalisés à la membrane plasmique des cellules UT-7. Après fixation des cellules sur lamelles de verre, la localisation de la pro-MMP-9 et de CD44 est détectée grâce à des anticorps anti-pro-MMP-9 et anti-CD44 couplés respectivement à l'Alexa 568 et au Cy2. La fluorescence est observée par microscopie confocale.

Dans la figure 24, nous voyons que la localisation de CD44 (fluorescence en vert) est péricellulaire. Nous voyons également que la pro-MMP-9 (fluorescence en rouge) est localisée à la membrane plasmique. Les deux images superposées (Merge en jaune) indiquent que CD44 et la pro-MMP-9 sont colocalisées à la membrane des cellules UT-7. La fluorescence est spécifique puisque quand les cellules sont incubées en présence d'anticorps secondaires seuls (contrôle Cy2 et contrôle Alexa 568), aucune fluorescence n'est émise. Ces résultats confirment l'association de CD44 et la pro-MMP-9 à la membrane des cellules UT-7.

II. CD44 est nécessaire à l'effet anti-apoptotique du TIMP-1

Nous avons ensuite étudié le rôle de CD44 dans la survie cellulaire induite par le TIMP-1.

II.1. Validation de l'extinction de l'expression de CD44 par la technique d'interférence RNA (siRNA)

Afin de valider le rôle de CD44 dans la voie de signalisation induite par le TIMP-1, nous avons éteint son expression par transfection des cellules UT-7 avec des siRNA ciblant CD44. Les séquences des siRNA utilisées sont les suivantes :

- siRNA CD44 sens : 5' - UGA CAC AUA UUG CUU CAA U99-3'
- siRNA CD44 antisens : 5' - AUU GAA GCA AUA UGU GUC A99-3'

Nous avons tout d'abord vérifié l'efficacité de la transfection au niveau génique. Les cellules en phase exponentielle de croissance sont électroporées (280 V, 250 μ F) en présence de 100 nM de sncRNA utilisés comme contrôle négatif ou 100 nM de siRNA CD44 puis incubées pendant 24 heures dans le milieu α -MEM contenant 10 % (v/v) SVF, 2 mM L-glutamine et 0,5 U/mL Epo. Les ARNs totaux sont extraits et l'expression des gènes CD44 et GAPDH sont analysées par RT-PCR semi-quantitative à partir de différentes dilutions d'ADNc (1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000, 1/100000). L'expression du gène de la GAPDH est utilisée comme contrôle. Les résultats sont présentés dans la figure 25.

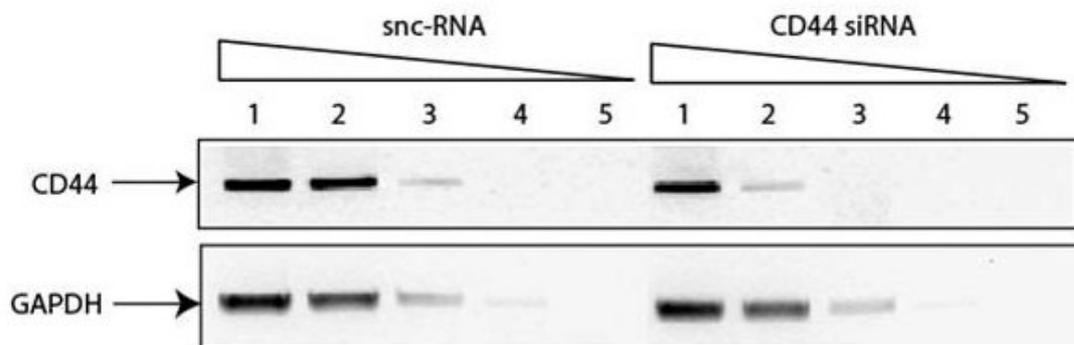


Figure 25: Expression du gène de CD44 dans les cellules transfectées avec les siRNA CD44. Après transfection avec les sncRNA ou les siRNA CD44, les ARNs totaux sont extraits. L'expression génique de CD44 et de la GAPDH est analysée par RT-PCR à partir de différentes dilutions d'ADNc (1=1/10, 2=1/100, 3=1/1000, 4=1/10000, 5=1/100000).

Dans la figure 25, nous observons une diminution de 90% de l'expression de CD44 dans les cellules transfectées avec les siRNA CD44 par rapport aux cellules transfectées avec les sncRNA (piste 2). La transfection n'affecte pas l'expression génique puisqu'aucune modification d'expression n'est observée pour GAPDH.

Nous avons ensuite étudié l'expression de la protéine CD44 dans les cellules transfectées dans ces conditions expérimentales. Après transfection, les cellules sont incubées pendant 24 heures dans le milieu α -MEM contenant 10 % (v/v) SVF, 2 mM L-glutamine et 0,5 U/mL Epo. Les extraits protéiques totaux sont analysés par western blot avec des anticorps anti-CD44. Après déshybridation, la membrane est réhybridée avec des anticorps anti- β -actine. Les résultats sont présentés dans la figure 26.

L'expression de la protéine CD44 est diminuée de 75 % dans les cellules transfectées avec les siRNA CD44 par rapport aux cellules contrôle. La transfection n'affecte pas l'expression protéique puisqu'aucune modification d'expression de la β -actine n'est observée dans les cellules transfectées.

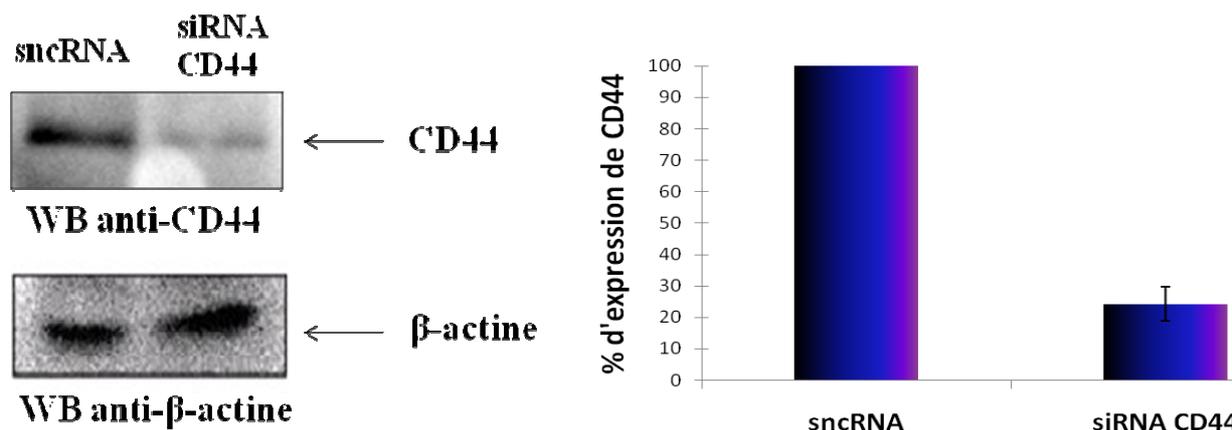


Figure 26: Expression de la protéine CD44 dans les cellules transfectées avec les siRNA CD44. Après transfection, les extraits protéiques totaux sont analysés par western blot avec des anticorps anti-CD44. Après déshybridation, la membrane est réhybridée avec des anticorps anti- β -actine. Un blot représentatif est montré. La quantification de l'expression de CD44 est exprimée comme le pourcentage de signal obtenu par rapport au sncRNA. Les moyennes \pm SEM sont calculées à partir de trois expériences indépendantes (**, $P < 0,01$). Un blot représentatif est montré.

II.2. L'extinction de l'expression de CD44 modifie la localisation de la pro-MMP-9 à la membrane plasmique

Ayant montré que la pro-MMP-9 est ancrée à la membrane par CD44, nous avons étudié cette association dans les cellules transfectées avec les siRNA CD44.

Après transfection avec 100 nM de sncRNA ou de siRNA CD44, les cellules sont incubées pendant 48 heures dans le milieu α -MEM contenant 10 % (v/v) SVF, 2 mM L-glutamine et 0,5 U/mL Epo. Les cellules viennent ensuite adhérer sur des lamelles de verre recouvertes de poly-L-lysine et fixées au paraformaldéhyde. La localisation de la pro-MMP-9 et de CD44 est détectée par immunofluorescence grâce à des anticorps anti-pro-MMP-9 couplés à l'Alexa 568 (fluorescence rouge) et anti-CD44 couplés au Cy2 (fluorescence verte). La fluorescence est observée par microscopie confocale. Les résultats sont représentés dans la figure 27.

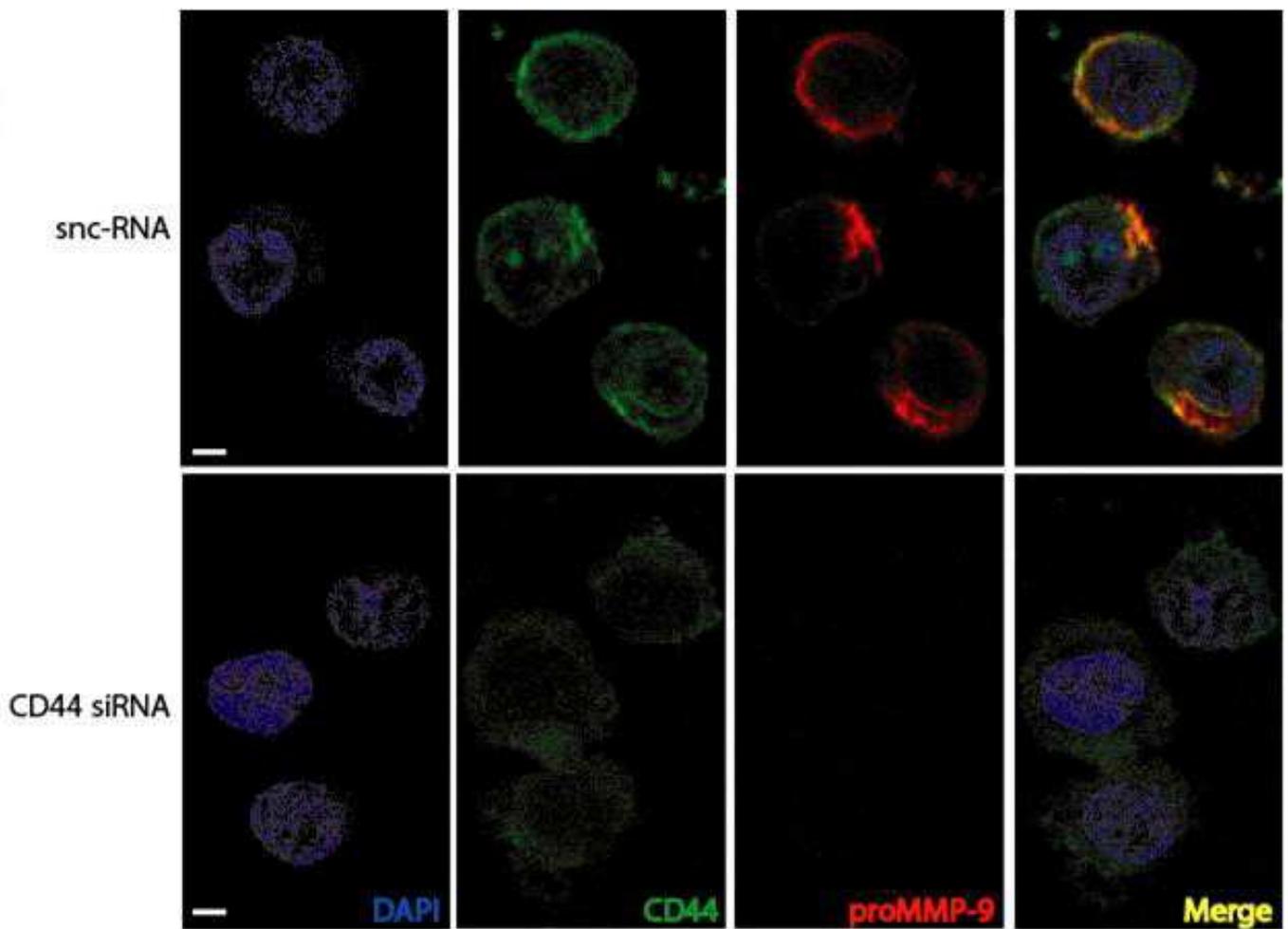


Figure 27: L’extinction de l’expression de CD44 modifie la localisation de la pro-MMP-9 à la membrane cellulaire. Après transfection avec 100 nM de sncRNA ou siRNA CD44, les cellules sont fixées sur des lamelles de verre. La localisation de la pro-MMP-9 et de CD44 est détectée grâce à des anticorps anti-pro-MMP-9 et anti-CD44 couplés respectivement à l’Alexa 568 (fluorescence rouge) et au Cy2 (fluorescence verte). Les lamelles sont montées sur des lames de verre grâce au milieu de montage contenant du DAPI. La fluorescence est observée par microscopie confocale. (- = 11,5 μ m)

Dans la figure 27, nous voyons que dans les cellules transfectées avec les sncRNA, les protéines CD44 et pro-MMP-9 sont colocalisées à la membrane des cellules UT-7. Ces résultats sont similaires à ceux présentés dans la figure 25 qui montre que la transfection avec les sncRNA n’affecte pas la localisation membranaire de la pro-MMP-9 dans les cellules UT-7. Dans les cellules transfectées avec les siRNA CD44 (diminution de 90 % de l’expression du gène CD44 et diminution de 75 % de l’expression protéique de CD44), nous observons que le marquage immunocytochimique de CD44 a fortement diminué et qu’il y a très peu de

fluorescence à la périphérie des cellules. Dans ces mêmes cellules, la pro-MMP-9 membranaire n'est plus détectée par immunofluorescence à la membrane plasmique. Ces résultats suggèrent donc que l'absence de l'expression de CD44 à la membrane plasmique modifie la localisation de la pro-MMP-9 à la membrane.

Pour confirmer ce résultat, nous avons étudié l'expression membranaire de la pro-MMP-9 dans les cellules transfectées.

Après transfection avec les siRNA CD44, les cellules sont incubées pendant 48 heures dans le milieu α -MEM contenant 10 % (v/v) SVF, 2 mM L-glutamine et 0,5 U/mL Epo. Après trois lavages avec du PBS glacé, les protéines de surface sont marquées à la sulfo-NHS-biotine, un analogue non perméant de la biotine. Les cellules sont ensuite lysées et les protéines totales sont incubées en présence de billes couplées à l'avidine afin d'isoler les protéines biotinylées. Les protéines biotinylées sont ensuite analysées par western blot avec des anticorps dirigés contre la pro-MMP-9. Les résultats sont présentés dans la figure 28.

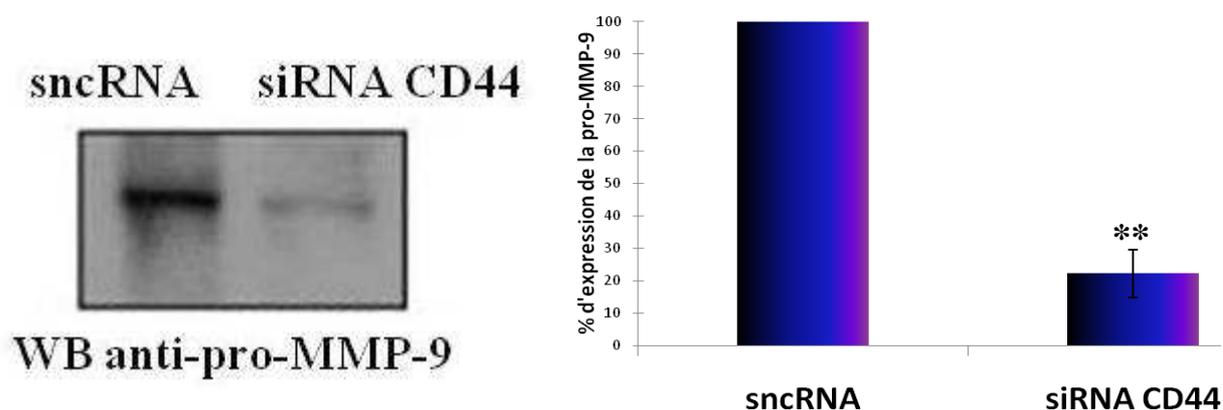


Figure 28: L'extinction de l'expression de CD44 modifie la localisation de la pro-MMP-9 à la surface cellulaire. Après transfection avec 100 nM sncRNA ou siRNA CD44, les protéines de surface sont marquées à la sulfo-NHS-biotine. Les cellules sont lysées et les protéines de surface sont incubées en présence de billes couplées à l'avidine. Les protéines biotinylées sont analysées par western blot avec des anticorps anti-pro-MMP-9. La quantification de l'expression de CD44 est exprimée comme le pourcentage de signal obtenu par rapport au sncRNA. Les moyennes \pm SEM sont calculées à partir de trois expériences indépendantes (**, $P < 0,01$). Un blot représentatif est montré.

Nous voyons que dans les cellules transfectées avec les sncRNA, la pro-MMP-9 est présente dans la fraction des protéines biotinylées, comme l'a déjà mis en évidence Elise Lambert dans notre laboratoire. En revanche, dans les cellules transfectées avec les siRNA

CD44, nous observons une diminution de 77% de pro-MMP-9 présente dans la fraction de protéines biotinylées. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par immunofluorescence (Figure 27). Si l'expression de CD44 est éteinte, la pro-MMP-9 n'est plus localisée à la membrane plasmique. Ces résultats confirment donc notre hypothèse que CD44 permet l'ancrage de la pro-MMP-9 à la membrane des cellules UT-7.

II.3. L'extinction de l'expression de CD44 inhibe l'effet anti-apoptotique du TIMP-1

Nous avons ensuite étudié le rôle de CD44 dans la voie de signalisation anti-apoptotique induite par le TIMP-1.

II.3.1 L'extinction de l'expression de CD44 inhibe la survie cellulaire induite par le TIMP-1

Pour préciser le rôle biologique de la protéine CD44, nous avons étudié l'effet anti-apoptotique du TIMP-1 dans les cellules transfectées avec les siRNA CD44.

La survie cellulaire est évaluée par cytométrie en flux suite à un double marquage à l'annexine-V-FLUOS et à l'iodure de propidium (IP). Les cellules viables sont négatives à l'annexine-V-FLUOS et à l'IP et sont visualisées dans le quadrant en bas à gauche. Les cellules en stade précoce d'apoptose sont positives à l'annexine-V-FLUOS et négatives à l'IP et sont visualisées dans le quadrant en bas à droite. Les cellules en stade tardif d'apoptose sont positives à l'annexine-V-FLUOS et à l'IP et sont visualisées dans le quadrant en haut à droite. Enfin, les cellules nécrotiques sont négatives à l'annexine-V-FLUOS et positives à l'IP et sont visualisées dans le quadrant en haut à gauche.

Après transfection avec 100 nM de sncRNA ou siRNA CD44, les cellules sont incubées pendant 24 heures dans le milieu de repos IMDM contenant 5 ng/mL TIMP-1. Après deux lavages dans le PBS, les cellules sont resuspendues dans le tampon d'incubation contenant l'annexine-V-FLUOS et l'IP. Après marquage pendant 15 minutes à l'obscurité et à température ambiante, la réaction est arrêtée et les cellules sont analysées immédiatement au cytomètre en flux.

Les résultats sont présentés dans la figure 29.

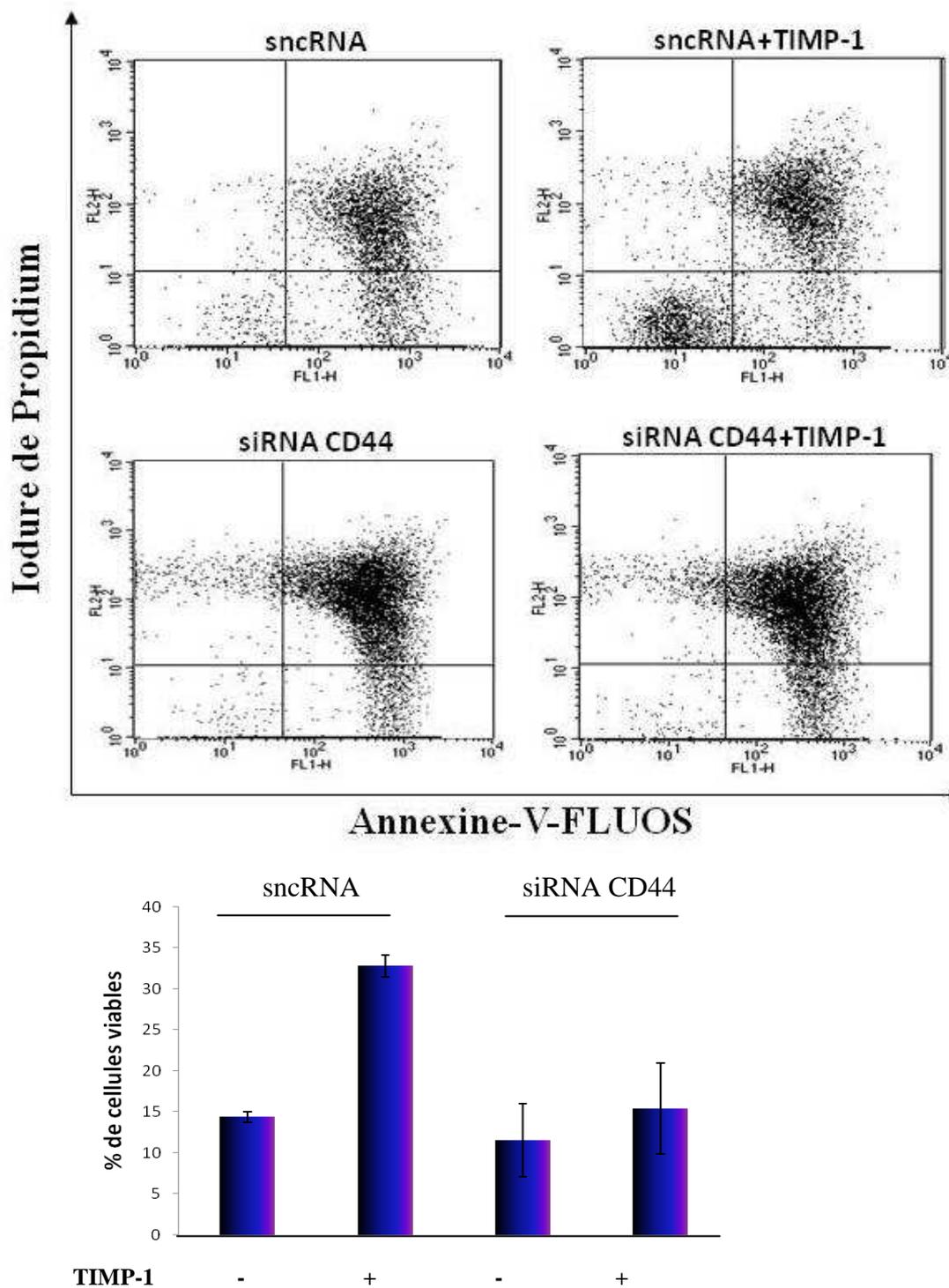


Figure 29: L'extinction de l'expression de CD44 inhibe l'effet anti-apoptotique du TIMP-1 dans les cellules UT-7. Après transfection avec 100 nM de snc- ou siRNA CD44, les cellules sont incubées pendant 24 heures dans le milieu de repos contenant 5 ng/mL TIMP-1. La survie cellulaire est mesurée par cytométrie en flux suite à un double marquage à l'Annexine-V-FLUOS et à l'iode de propidium. Les moyennes \pm SEM sont calculées à partir de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicate (**, $P < 0,1$; NS = Non significatif).

La figure 29 montre que dans les cellules transfectées avec les sncRNA, le pourcentage de cellules viables passe de $14,39 \pm 0,63$ % pour les cellules témoins à $32,81 \pm 1,30$ % pour les cellules incubées avec le TIMP-1. En revanche, dans les cellules transfectées avec les siRNA CD44, le TIMP-1 n'augmente pas le pourcentage de cellules vivantes : $11,56 \pm 4,44$ % pour les cellules témoins et $15,41 \pm 5,58$ % pour les cellules incubées en présence de TIMP-1. Ces résultats indiquent que l'extinction de l'expression de CD44 inhibe l'effet anti-apoptotique du TIMP-1 dans les cellules UT-7.

II.3.2. L'extinction de l'expression de CD44 inhibe la phosphorylation d'Akt induite par le TIMP-1

Pour confirmer ce résultat, nous avons étudié la phosphorylation d'Akt dans les cellules transfectées avec les siRNA CD44.

Après transfection avec 100 nM de sncRNA ou siRNA CD44, les cellules sont incubées dans le milieu α -MEM contenant 10 % (v/v) SVF, 2 mM L-glutamine et 0,5 U/mL Epo pendant 24 heures. Après privation de tout facteur pendant 16 heures, les cellules sont stimulées 5 minutes avec 5 ng/mL TIMP-1. Les extraits totaux sont analysés par western blot avec des anticorps dirigés contre la forme phosphorylée sur thréonine 308 d'Akt. Les résultats sont présentés dans la figure 30.

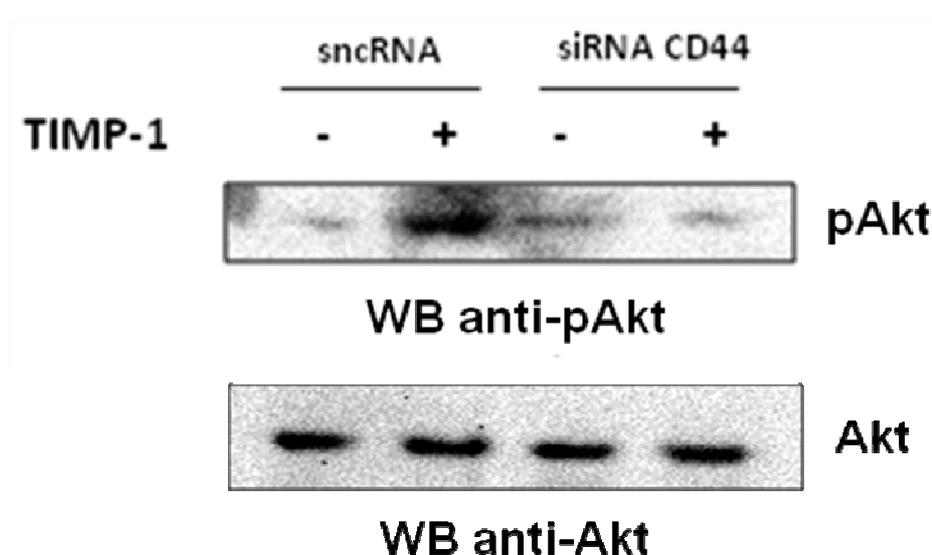


Figure 30: L'extinction de l'expression de CD44 inhibe la phosphorylation d'Akt induite par le TIMP-1. Après transfection des cellules avec 100 nM de snc- ou siRNA CD44, les cellules sont incubées pendant 24 heures en présence de 0,5 U/mL Epo. Après privation de tout facteur pendant 16 heures, les cellules sont stimulées 5 minutes avec 5 ng/mL TIMP-1. Les extraits totaux sont analysés par western blot avec des anticorps anti- pAkt (thréonine 308). Un blot représentatif est montré.

Dans la figure 30, nous voyons que dans les cellules UT-7, le TIMP-1 induit la phosphorylation d'Akt sur thréonine 308. Cet effet est retrouvé dans les cellules transfectées avec les sncRNA. En revanche, la phosphorylation d'Akt n'est plus observée dans les cellules transfectées avec les siRNA CD44. Ces résultats indiquent que l'extinction de l'expression de CD44 inhibe l'effet du TIMP-1 sur la phosphorylation d'Akt.

II.4. L'extinction de l'expression de CD44 modifie la localisation du TIMP-1 à la membrane

Nous avons montré que le TIMP-1 se fixe sur la pro-MMP-9 localisée à la membrane plasmique des cellules UT-7 pour exercer son effet anti-apoptotique. Cette pro-MMP-9 est ancrée à la membrane par CD44. Nous avons donc étudié par immunofluorescence la localisation du TIMP-1 à la membrane.

Après transfection avec les sncRNA et siRNA CD44, les cellules sont incubées pendant 48 heures dans le milieu α -MEM contenant 10 % (v/v) SVF, 2 mM L-glutamine et

0,5 U/mL Epo. Les cellules viennent ensuite adhérer sur des lamelles de verre recouvertes de poly-L-lysine et fixées au paraformaldéhyde. La localisation de CD44 et du TIMP-1 est détectée grâce à des anticorps anti-CD44 couplés à l'Alexa-488 et anti-TIMP-1 couplés à l'Alexa 568. La fluorescence est observée par microscopie confocale. Les résultats sont présentés dans la figure 31.

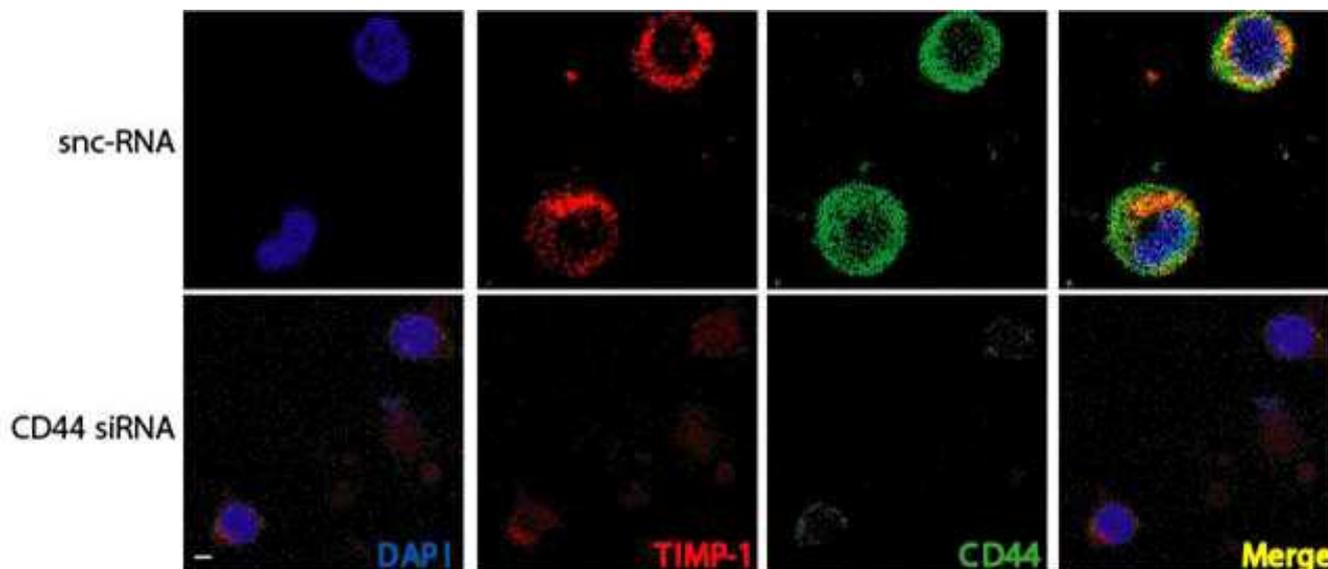


Figure 31: L'extinction de l'expression de CD44 modifie la fixation du TIMP-1 à la membrane plasmique. Après transfection avec 100 nM de sncRNA ou siRNA CD44, les cellules sont attachées sur des lamelles de verre coatées à la poly-L-lysine et fixées au paraformaldéhyde. La localisation de CD44 et du TIMP-1 est détectée grâce à des anticorps anti-CD44 et anti-TIMP-1 couplés respectivement à l'Alexa 488 et à l'Alexa 568. La fluorescence est observée par microscopie confocale. (- = 11,5 μ m).

Comme nous l'avons montré précédemment, nous voyons dans la figure 31 que dans les cellules transfectées avec les sncRNA, la protéine CD44 est localisée à la membrane plasmique, ce qui démontre que la transfection n'affecte pas l'immunomarquage. Nous observons également un marquage péricellulaire pour le TIMP-1 (fluorescence en rouge). Ces résultats suggèrent que les protéines CD44 et TIMP-1 sont colocalisées à la membrane des cellules UT-7. Tout ceci n'est plus observé dans les cellules transfectées avec les siRNA CD44.

II.5. Effet de l'acide hyaluronique sur la phosphorylation d'Akt induite par le TIMP-1

La glycoprotéine CD44 décrite comme le principal récepteur de l'acide hyaluronique possède dans sa partie extracellulaire un domaine de fixation à ce ligand. Ayant montré une colocalisation du TIMP-1 avec CD44, nous avons donc étudié l'influence de l'acide hyaluronique sur l'effet anti-apoptotique du TIMP-1. Nous avons donc la phosphorylation d'Akt induite par le TIMP-1.

Après une mise au repos de 16 heures, les cellules sont incubées pendant 30 minutes avec 1, 10 et 50 $\mu\text{g/mL}$ d'acide hyaluronique (132 kDa) puis stimulées pendant 5 minutes avec 5 ng/mL TIMP-1. Les extraits totaux sont analysés par western blot avec des anticorps dirigés contre la forme phosphorylée sur thréonine 308 de la kinase Akt. Les résultats sont présentés dans la figure 32.

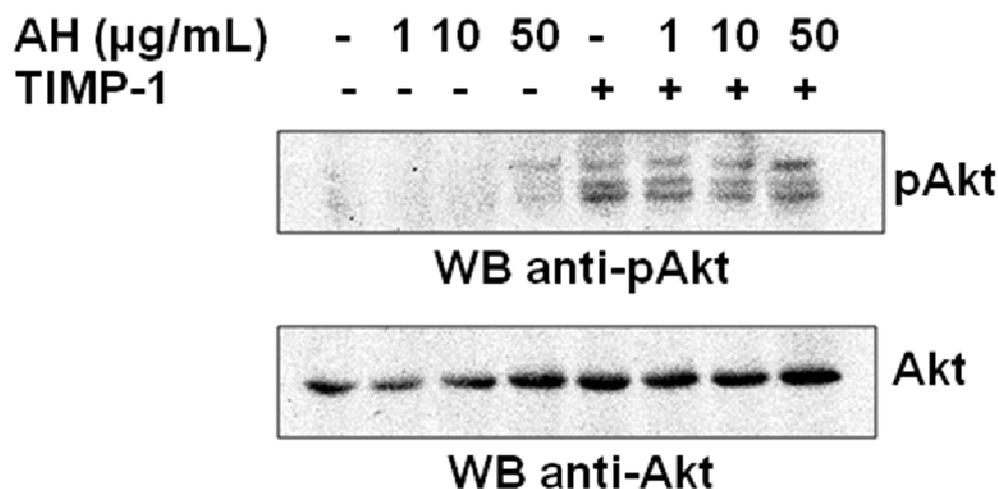


Figure 32: L'acide hyaluronique n'inhibe pas la phosphorylation d'Akt induite par le TIMP-1. Après une mise au repos de 16 heures, les cellules sont incubées pendant 30 minutes avec 1, 10 et 50 μM d'acide hyaluronique puis stimulées pendant 5 minutes avec 5 ng/mL TIMP-1. Les extraits protéiques totaux sont analysés par western blot avec des anticorps dirigés contre la forme phosphorylée sur thréonine 308 d'Akt. Une seule expérience a été réalisée.

Dans la figure 32, nous voyons que le TIMP-1 induit la phosphorylation d'Akt sur thréonine 308. L'incubation des cellules avec différentes concentrations d'acide hyaluronique

(1, 10 et 50 µg/mL) n'a aucun effet sur la phosphorylation d'Akt induite par le TIMP-1. De plus, l'acide hyaluronique seul n'induit pas la phosphorylation d'Akt. Ces résultats démontrent que l'acide hyaluronique (concentrations comprises entre 1 et 50 µg/mL) n'inhibe pas l'effet anti-apoptotique du TIMP-1, ce qui suggère que le TIMP-1 ne se fixe pas sur le domaine de fixation de l'acide hyaluronique présent dans la partie extracellulaire de CD44.

En conclusion de cette partie, nous montrons que la protéine CD44 permet l'ancrage de la pro-MMP-9 à la surface des cellules UT-7 et qu'elle joue un rôle important dans la voie anti-apoptotique du TIMP-1. Ces résultats ont été publiés en 2009 dans *International Journal of Biology and Cell Biology* [Lambert, Bridoux et coll., co-auteurs, 2009].

III. Etude préliminaire du complexe pro-MMP-9/CD44 dans les cellules isolées à partir de progéniteurs normaux CD34+

Pour compléter notre étude réalisée dans les cellules érythroleucémiques humaines UT-7, nous avons étudié l'expression de CD44 et de la pro-MMP-9 dans les cellules isolées à partir de progéniteurs normaux CD34+ et engagées dans la lignée érythroïde.

III.1. Expression de CD44 et pro-MMP-9 dans les cellules isolées à partir de progéniteurs normaux CD34+

Les progéniteurs CD34+ sont purifiés à partir de sang de cordon ombilical humain. Leur purification s'effectue sur colonne immunomagnétique à partir de cellules hématopoïétiques immatures, identifiées et isolées grâce à la présence du marqueur de surface CD34. Durant la première phase d'amplification (J0 à J7), les cellules sont incubées pendant 7 jours dans le milieu StemPro 34-SFM contenant 25 ng/mL SCF, 10 ng/mL Il-3 et 10 ng/mL Il-6. Durant la deuxième phase de différenciation (J7+1 à J7+7), les progéniteurs CD34+ sont incubés pendant 7 jours dans le milieu StemPro 34-SFM contenant 25 ng/mL SCF, 10 ng/mL Il-3 et 2 U/mL Epo. Les ARNs totaux sont extraits à J7+1, J7+4, J7+6 et J7+7 et l'expression

des gènes codant CD44, la pro-MMP-9, l'actine et l' α -globine est analysée par qPCR. Les résultats sont présentés dans la figure 33.

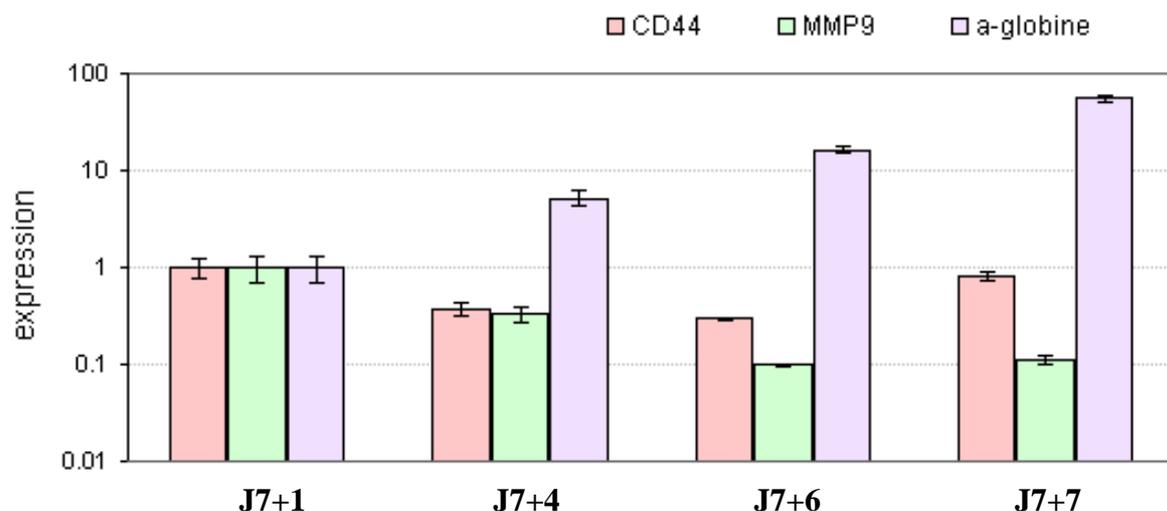


Figure 33: Expression de CD44, pro-MMP-9 et α -globine dans les cellules issues des progéniteurs CD34+. Les progéniteurs CD34+ isolées à partir de sang de cordon ombilical humain sont cultivés pendant 7 jours dans le milieu d'amplification constitué de milieu StemPro 34-SFM contenant du SCF, de l'Il-3 et de l'Il-6 puis les 7 jours suivants dans le milieu de différenciation constitué de milieu StemPro 34-SFM contenant du SCF, de l'Il-3 et de l'Epo. Les ARNs totaux sont extraits à J7+1, J7+4, J7+6 et J7+7 et l'expression des gènes codant CD44, la pro-MMP-9, l'actine et l' α -globine est analysée par qPCR. L'expression de ces gènes CD44, pro-MMP-9 et α -globine est normalisée par rapport à l'expression du gène codant l'actine. L'expression des gènes à J7+1 est utilisée comme témoin de la réaction.

Dans la figure 33, nous voyons que l'Epo induit une augmentation progressive de l'expression du gène de différenciation α -globine dès le 11^e jour de culture (J7+4). A J7+6, l'expression de l' α -globine est 16 fois plus importante que celle du témoin et à J7+7 nous observons une expression de l' α -globine 55 fois plus importante que le témoin. Ces résultats indiquent que l'Epo induit la différenciation des cellules issues des CD34+, ce qui confirme l'efficacité de notre protocole de différenciation.

Nous observons également que l'expression de CD44 diminue de 6 fois entre J7+1 et J7+6 pour atteindre, à J7+7, un niveau d'expression similaire à celui observé à J7+1. Parallèlement, nous observons une forte diminution d'expression de la pro-MMP-9 entre J7+1 et J7+7 : son expression est 10 fois moins importante à J7+6 et J7+7. Ces résultats suggèrent

que l'expression de la pro-MMP-9 diminue au fur et à mesure que les cellules issues des progéniteurs se différencient vers la voie érythroïde.

III.2. Marquage par immunofluorescence des protéines CD44 et pro-MMP-9 dans les cellules isolées à partir de progéniteurs normaux CD34+

Les cellules purifiées à partir de sang de cordon ombilical humain sont incubées pendant 7 jours dans le milieu StemPro 34-SFM contenant du SCF, de l'Il-3 et de l'Il-6 puis pendant les 7 jours suivants dans le milieu StemPro 34-SFM contenant du SCF, de l'Il-3 et 2 U/mL Epo.

Aux jours J7+4 et J7+7, les cellules sont prélevées et adhérentes sur des lamelles de verre recouvertes de poly-L-lysine et fixées au paraformaldéhyde. La localisation des protéines CD44 et pro-MMP-9 est détectée grâce à des anticorps anti-CD44 couplés à l'Alexa-488 et anti-pro-MMP-9 couplés à l'Alexa 568. La fluorescence est observée par microscopie confocale. Les résultats sont présentés dans la figure 34.

Dans la figure 34, nous voyons que dans les cellules prélevées à J7+7, c'est-à-dire au moment où les cellules sont au maximum de différenciation, nous observons une nette augmentation d'expression de CD44 par rapport aux cellules prélevées à J7+4. La localisation de CD44 est membranaire. La localisation de la pro-MMP-9 est également membranaire. La superposition des deux images (Merge, fluorescence en jaune) suggère la colocalisation de ces deux protéines à la membrane des cellules issues de progéniteurs normaux CD34+.

Ces résultats sont en accord avec les résultats de qPCR (Figure 33).

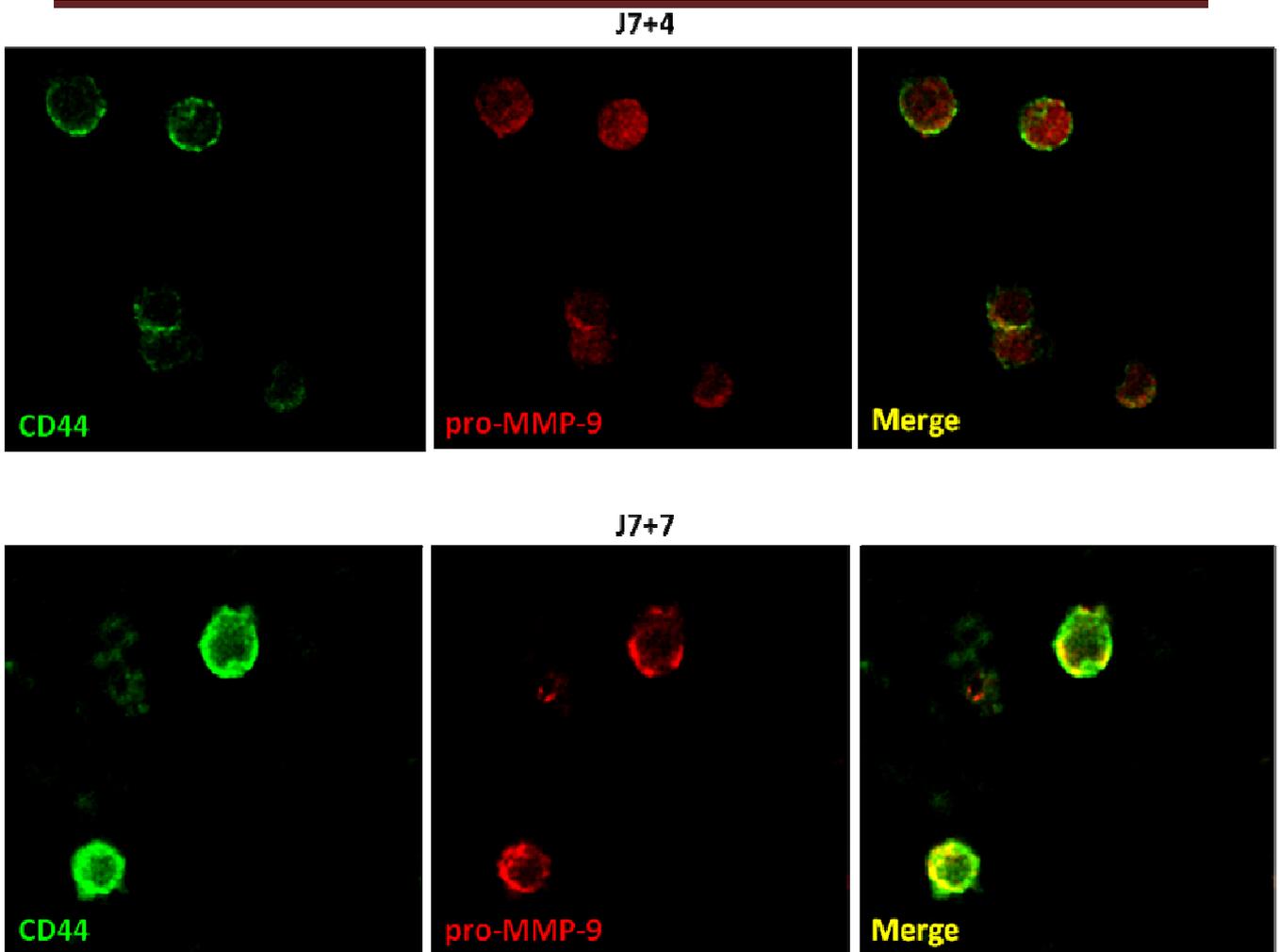


Figure 34: Marquage par immunofluorescence des protéines CD44 et pro-MMP-9 dans les cellules issues des progéniteurs CD34+. Les cellules purifiées à partir de sang de cordon ombilical humain sont incubées pendant 7 jours dans le milieu StemPro 34-SFM contenant du SCF, de l'Il-3 et de l'Il-6 puis pendant les 7 jours suivants dans le milieu StemPro 34-SFM contenant du SCF, de l'Il-3 et 2 U/mL Epo. A 11 et 14 jours de culture, les cellules sont prélevées et adhérentes sur des lamelles de verre recouvertes de poly-L-lysine et fixées au paraformaldéhyde. La localisation des protéines CD44 et pro-MMP-9 est détectée grâce à des anticorps anti-CD44 couplés à l'Alexa-488 et anti-pro-MMP-9 couplés à l'Alexa 568. Une expérience a été réalisée.

Deuxième partie :

Etude de l'association entre la glycoprotéine CD44 et la tyrosine kinase JAK2

La protéine JAK2 est une tyrosine kinase qui appartient à la famille des kinases JAK (Janus kinase). Elle joue un rôle important dans de la voie de signalisation induite par l'Epo. Dans les conditions basales, JAK2 est associée de manière constitutive à la boîte 1 (box 1) située dans le domaine cytoplasmique du récepteur de l'érythropoïétine (R-Epo). Quand l'Epo se fixe sur son récepteur, il y a rapprochement des deux parties intracellulaires du R-Epo, ce qui induit le rapprochement des 2 tyrosines kinases JAK2. Les 2 protéines JAK2 vont être activées par transphosphorylation. JAK2 activée phosphoryle les 8 résidus tyrosyles présents dans le domaine intracellulaire du R-Epo [Ihle et coll., 1998 ; Richmond et coll., 2005].

Dans les cellules UT-7, JAK2 est la première tyrosine kinase activée suite à la fixation de l'Epo sur son récepteur [Witthuhn et coll., 1993 ; Miura et coll., 1994]. Dans notre laboratoire, nous avons montré que le TIMP-1 induit la phosphorylation de JAK2 dès la première minute de stimulation et que cette phosphorylation participe à la transduction de la signalisation intracellulaire induite par le TIMP-1. L'effet anti-apoptotique du TIMP-1 est indépendant du R-Epo puisque le TIMP-1 induit la survie des cellules myéloïdes murines 32D qui n'expriment pas le R-Epo [Lambert et coll., 2003]. De plus, les tyrosines présentes dans la partie intracellulaire du R-Epo ne sont pas phosphorylées suite à une stimulation par le TIMP-1.

I. La glycoprotéine CD44 est associée de manière constitutive à la tyrosine kinase JAK2

Dans la littérature, il a été décrit que le domaine cytoplasmique de CD44 peut interagir avec le domaine FERM des protéines ERM (Ezrine, Radixine, Moesine). Or, JAK2 possède un domaine FERM du côté N-terminal (domaines JH6 et JH7, voir Figure 11). Nous avons donc envisagé que JAK2 pourrait être associée à CD44 *via* son domaine FERM. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons étudié dans un premier temps l'association entre CD44 et JAK2.

Les cellules UT-7 sont incubées pendant 48 heures dans le milieu α -MEM contenant 10 % (v/v) SVF, 2 mM L-glutamine, 0,1 % (v/v) du mélange d'antibiotiques et 0,5 U/mL Epo. Les lysats cellulaires sont immunoprécipités en présence d'anticorps CD44 et les

protéines immunoprécipitées sont analysées par western blot avec des anticorps anti-JAK2. Les résultats sont présentés dans la figure 35.

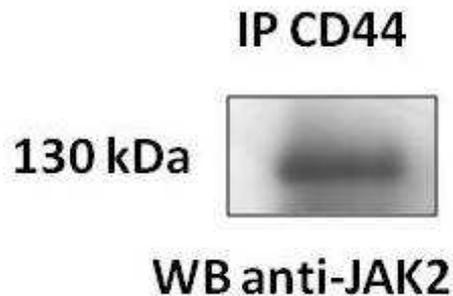


Figure 35: CD44 est associée de manière constitutive à JAK2. Les lysats cellulaires sont incubés avec des anticorps anti-CD44 et les protéines immunoprécipitées sont analysées par western blot avec des anticorps anti-JAK2. Un blot représentatif est montré.

Nous voyons que la tyrosine kinase JAK2 est détectée dans les immunoprécipités anti-CD44. Ces résultats indiquent que les protéines CD44 et JAK2 sont associées de manière constitutive dans les cellules UT-7.

II. Etude de l'interaction entre CD44 et JAK2 par modélisation moléculaire

Avec l'aide du Pr. Manuel Dauchez, nous avons décidé d'approfondir notre étude de l'interaction entre JAK2 et CD44 et d'étudier cette interaction par modélisation moléculaire. Cette interaction n'ayant pas été caractérisée expérimentalement, nous avons utilisé différentes données structurales connues de différents complexes du domaine FERM de la radixine et d'un modèle JAK2 obtenu par homologie.

De nombreuses études cristallographiques portent sur les protéines ERM, et plus particulièrement sur le domaine FERM de la radixine. En 2007, Terawaki et coll. ont cristallisé le domaine FERM de la radixine complexé à la protéine membranaire NEP (neutral endopeptidase 24.11) [Terawaki et coll., 2007]. Dans cette structure, nous observons trois

motifs FERM complexés avec des peptides de longueurs différentes. Récemment, Mori et coll. ont mis en évidence la structure cristallographique du domaine FERM de la radixine complexé à CD44. Cette structure cristallographique a révélé que la séquence QKKKLVING du peptide issu de CD44 forme un brin β qui va se fixer au sous-domaine C du domaine FERM [Mori et coll., 2008].

II.1. Superposition des structures tridimensionnelles des domaines FERM de la radixine

Grâce aux logiciels VMD et Pymol, nous avons tout d'abord superposé les structures tridimensionnelles du domaine FERM de la radixine complexée à la protéine NEP (sont représentés en jaune le motif 1, en rose le motif 2 et en gris le motif 3) au domaine FERM de la radixine complexé à CD44 (représenté en violet). Les résultats sont présentés dans la figure 36.

Dans la figure 36, nous voyons que les quatre domaines FERM connus de la radixine se superposent parfaitement. La zone d'interaction des domaines FERM de la radixine avec les peptides est constituée de trois brins β . Ces trois brins β , représentés en bleu, jaune et vert sur la figure, s'alignent avec le peptide CD44 (brin β violet), tout comme ils se superposent avec les différents peptides NEP.

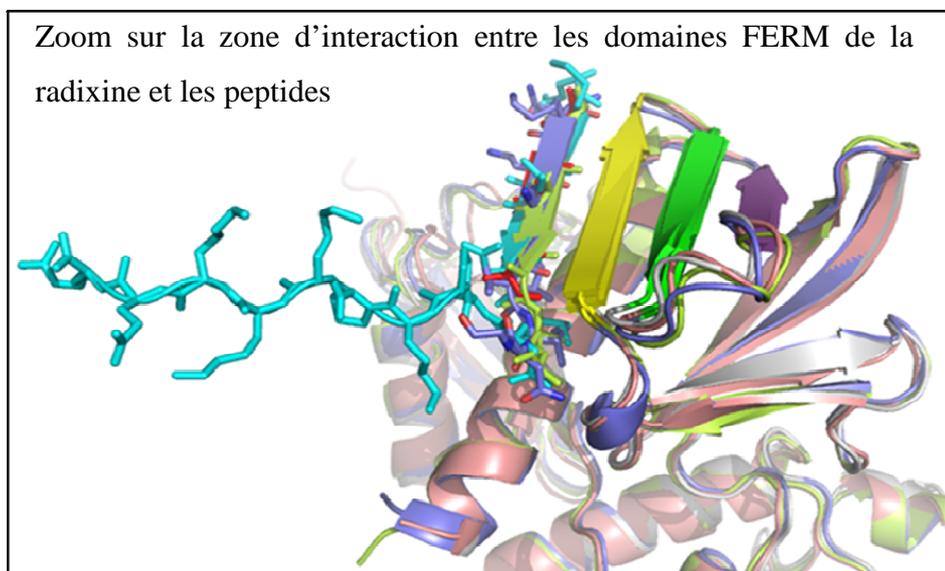
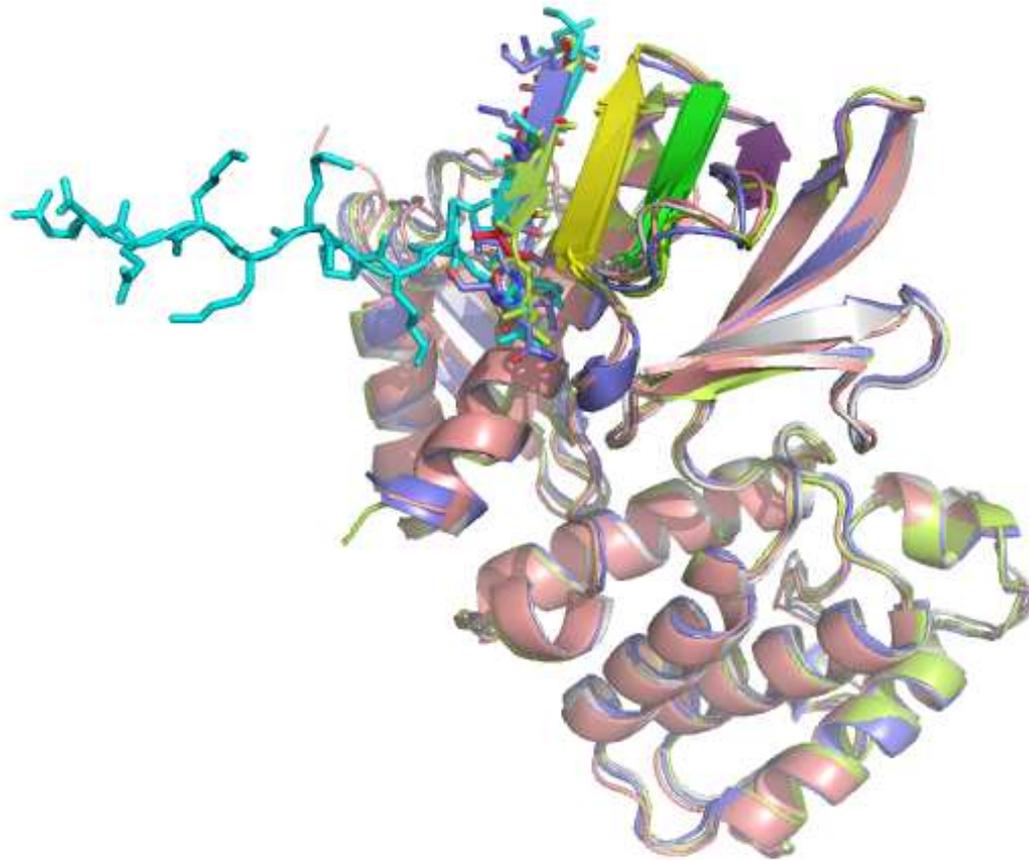


Figure 36: Superposition des structures cristallographiques du domaine FERM des radixines complexées à la protéine NEP et à CD44 [D'après Terawaki et coll., 2007 et Mori et coll., 2008]. Sont représentés en jaune le motif 1, en rose le motif 2 et en gris le motif 3 du domaine FERM de la radixine complexée à la protéine NEP, et en violet le domaine FERM de la radixine complexée à CD44.

II.2. Superposition des structures tridimensionnelles du domaine FERM de JAK2 avec le domaine FERM de la radixine

A ce jour, aucune donnée sur l'interaction entre le domaine FERM de JAK2 et la partie intracellulaire de CD44 n'est trouvée dans la littérature. Cependant, en utilisant des techniques d'alignement de séquences et la modélisation par homologie des structures tridimensionnelles, Giordanetto et Kroemer ont prédit la structure des domaines JH1 à JH7 de JAK2 [Giordanetto et Kroemer, 2002]. Ils ont montré que le domaine FERM de JAK2 (situé entre les domaines JH4 et JH7) présente une homologie structurale importante et ressemble à l'architecture des motifs FERM connus (Figure 37).

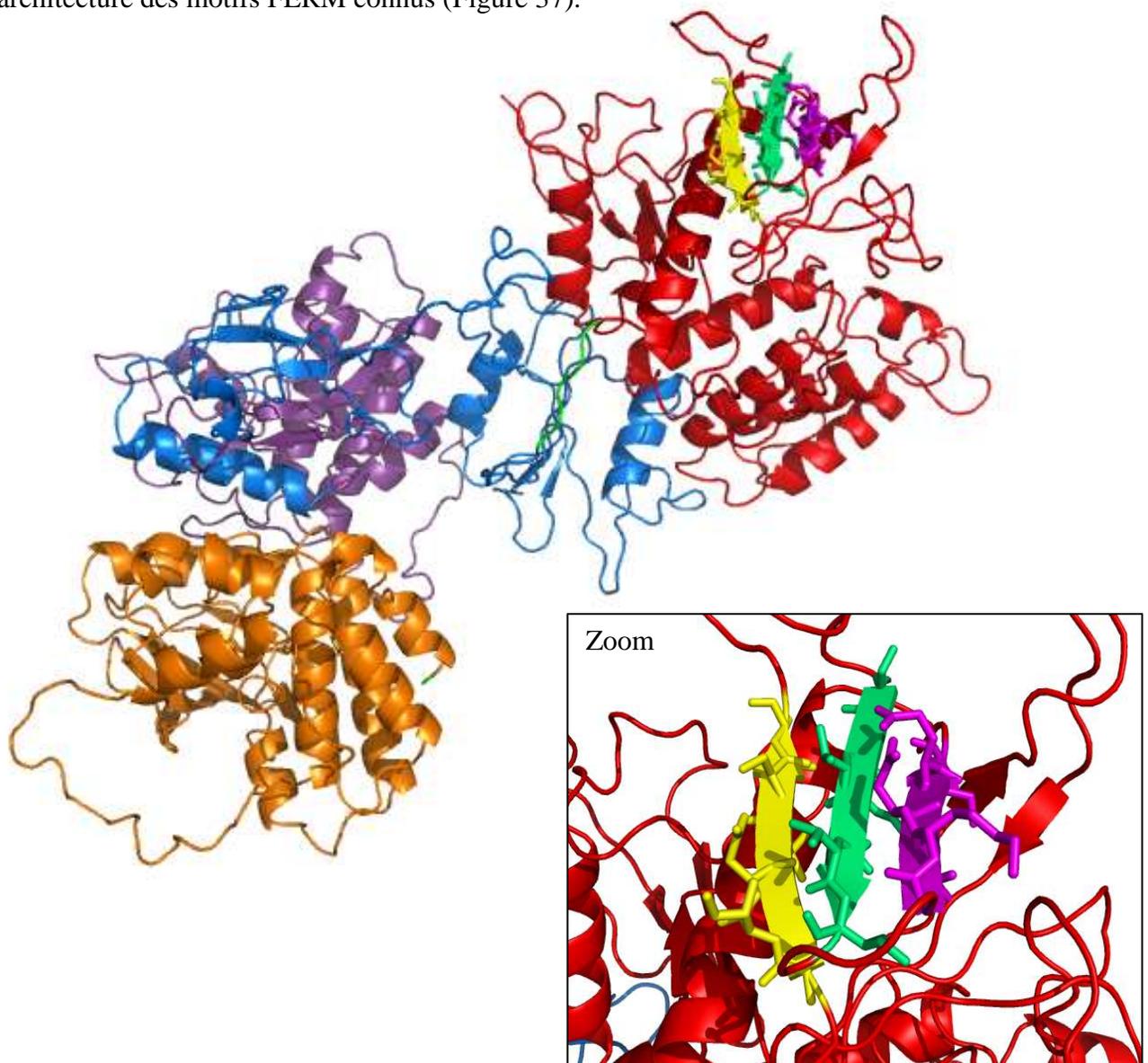


Figure 37: Structure tridimensionnelle de JAK2 [D'après Giordanetto et Kroemer, 2002]. Le domaine JH1 est représenté en orange, le domaine JH2 en violet, le domaine SH2 en bleu et le domaine FERM en rouge.

Dans la figure 37, nous voyons que le domaine FERM de JAK2 présente une structure tridimensionnelle semblable au domaine FERM de la radixine. Il est composé de trois brins β (représentés en jaune (IIDVSI), vert (SRVVTI) et violet (GKNLEI)) qui semblent identiques aux trois brins β du domaine FERM de la radixine. Nous avons donc effectué un alignement structural des domaines FERM de JAK2 et de la radixine. Les résultats sont présentés dans la figure 38.

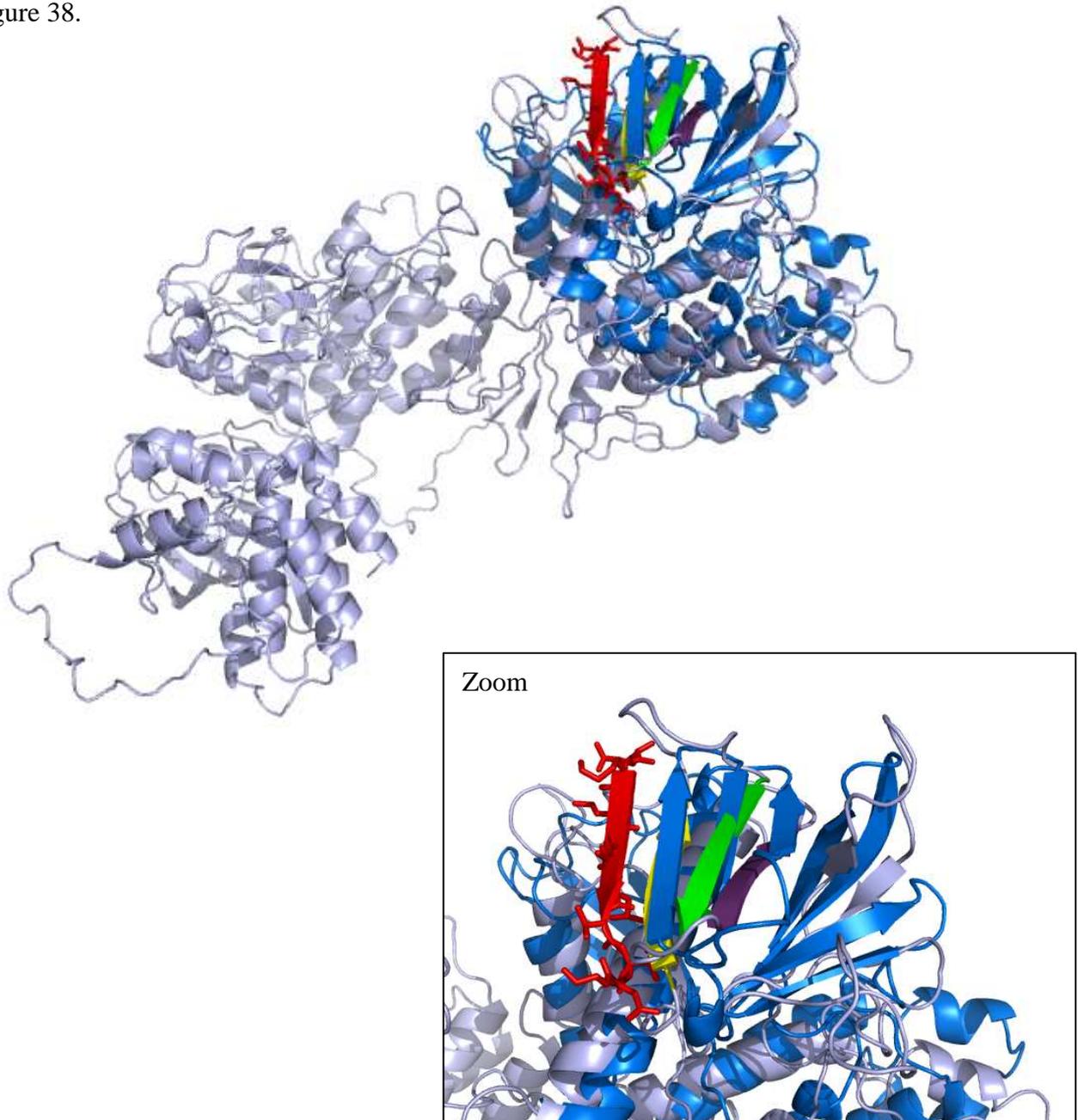


Figure 38: Superposition du domaine FERM de la radixine avec JAK2. Le domaine FERM de la radixine complexé au peptide CD44 (en rouge) est représenté en bleu. La structure de JAK2 est représentée en gris.

Dans la figure 38, nous voyons que le domaine FERM de JAK2 se superpose parfaitement au domaine FERM de la radixine. Les trois brins β de JAK2 (représentés en jaune (IIDVSI), vert (SRVVTI) et violet (GKNLEI)) se superposent aux trois brins β de la radixine. De plus, nous pouvons remarquer que le peptide CD44 (représenté en rouge) vient s'aligner avec les trois brins β de JAK2. Ces résultats suggèrent que le peptide CD44 vient d'aligner avec les 3 brins β du domaine FERM de JAK2 de la même manière qu'avec les brins β du domaine FERM de la radixine.

II.3. Etude de l'interaction entre le domaine FERM de JAK2 et le peptide de CD44

Mori et coll. ont montré que la séquence QKKKLVING du peptide de CD44 forme un brin β qui vient se fixer au domaine FERM [Mori et coll., 2008]. Les résultats précédents nous ont conduits à étudier plus précisément l'interaction entre la séquence QKKKLVING du peptide de CD44 et le domaine FERM de JAK2. Les résultats sont présentés dans la figure 39.

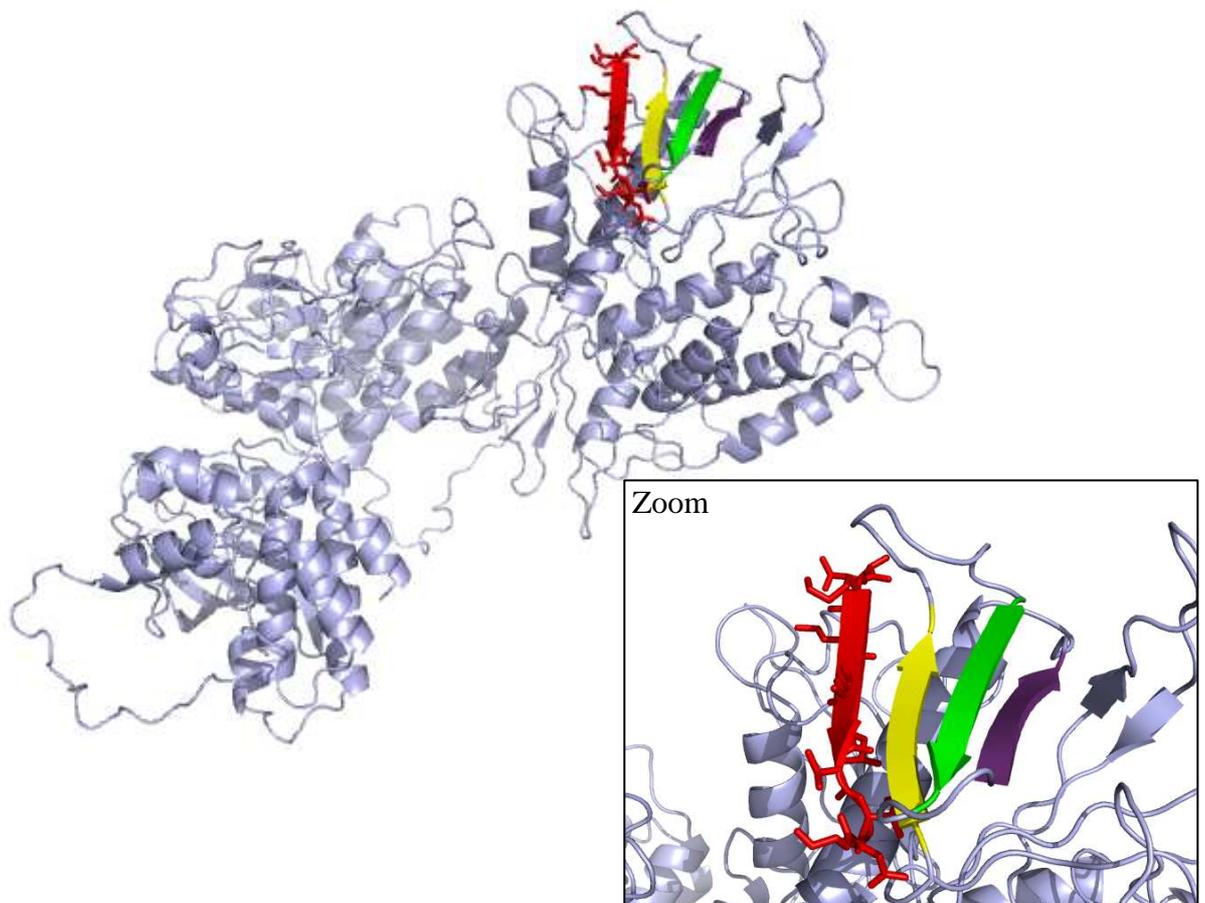


Figure 39: Etude de l'interaction entre la séquence QKKKLVING de CD44 et le domaine FERM de JAK2. Le peptide de CD44 est représenté en rouge tandis que la structure de JAK2 est représentée en gris avec les trois brins β (en jaune IIDVSI, en vert SRVVTI et en violet GKNLEI).

Dans la figure 39, nous voyons que le brin β formé par le peptide CD44 (séquence QKKKLVING) vient s'aligner parfaitement avec les trois brins β du domaine FERM de la radixine. Cette interaction est semblable à l'interaction entre le domaine FERM de la radixine et le peptide de CD44.

Nous avons voulu représenter la surface de JAK2 afin de mieux comprendre comment CD44 interagit avec le domaine FERM de JAK2. Les résultats sont présentés dans la figure 40.

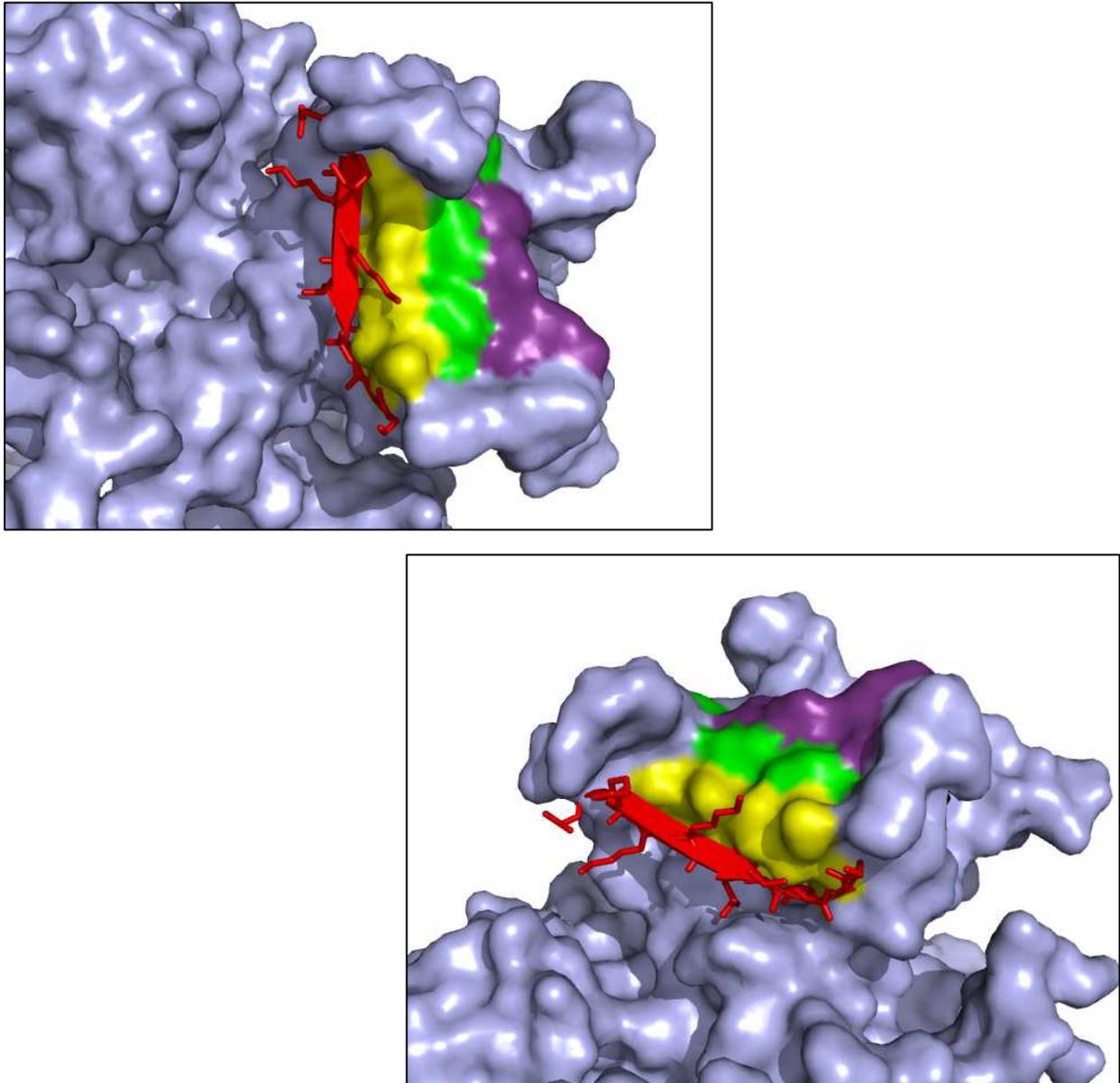


Figure 40: Représentations de l'interaction entre la surface du domaine FERM de JAK2 et le peptide QKKKLVING de CD44. Le peptide de CD44 est représenté en rouge tandis que la structure de JAK2 est représentée en gris avec les trois brins β (en jaune IIDVSI, en vert SRVVTI et en violet GKNLEI).

Nous observons que la séquence QKKKLVING du peptide CD44 (en rouge) semble s'insérer dans le domaine FERM de JAK2 au niveau d'une « gorge » formée par les brins β (en jaune, vert et violet) du domaine FERM de JAK2.

III. CD44 est nécessaire à l'activation de JAK2 par le TIMP-1

Nous avons ensuite étudié la phosphorylation de JAK2 dans les cellules transfectées avec les siRNA CD44.

Après transfection avec 100 nM de sncRNA ou siRNA CD44, les cellules sont incubées pendant 24 heures dans le milieu α -MEM contenant 10 % (v/v) SVF, 2 mM L-glutamine et 0,5 U/mL Epo. Après privation de tout facteur pendant 16 heures, les cellules sont stimulées pendant 5 minutes avec 5 ng/mL TIMP-1. Les extraits totaux sont analysés par western blot avec des anticorps anti-phospho-JAK2 (Tyr 1007/1008). Après déshybridation, la membrane est réhybridée avec des anticorps anti-JAK2. Les résultats sont présentés dans la figure 41.

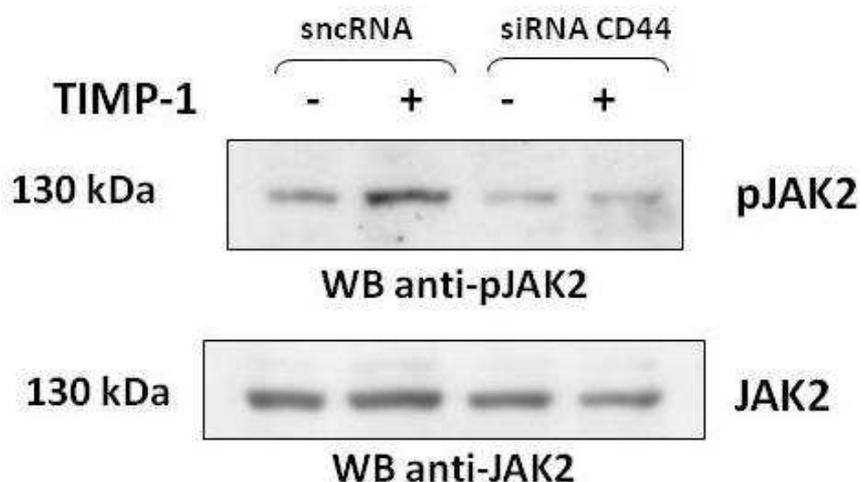


Figure 41: L'extinction d'expression de CD44 inhibe la phosphorylation de JAK2 induite par le TIMP-1. Après transfection et mise au repos pendant 16 heures, les cellules UT-7 sont stimulées pendant 5 minutes avec 5 ng/mL TIMP-1. Les extraits totaux sont analysés par western blot avec des anticorps anti-phospho-JAK2 (Tyr 1007/1008). Après déshybridation, la membrane est réhybridée avec des anticorps anti-JAK2. Un blot représentatif est montré.

Nous voyons que dans les cellules transfectées avec les sncRNA, le TIMP-1 induit la phosphorylation de JAK2. Cette phosphorylation n'est pas retrouvée dans les cellules transfectées avec les siRNA CD44. Ces résultats indiquent que CD44 joue un rôle essentiel dans la voie de signalisation induite par le TIMP-1 en amont de JAK2.

Troisième partie :

Mise en évidence du rôle de la Src kinase Lyn dans l'effet anti- apoptotique du TIMP-1

Plusieurs études ont montré que les Src kinases sont impliquées dans les processus anti-apoptotiques et peuvent former un complexe avec la PI 3-kinase, le domaine SH3 des Src kinases se fixant à la sous-unité p85 de la PI 3-kinase [Pleiman et coll., 1994]. Lee et coll. ont montré le TIMP-1 inhibe l'apoptose des cellules de carcinome mammaire T47D *via* une voie de signalisation impliquant une protéine G sensible à la toxine pertussique (PTX), c-Src, la PI 3-kinase et Akt [Lee et coll., 2003]. D'autres études ont mis en évidence l'existence d'un complexe CD44/Lyn qui régule la voie PI 3-kinase/Akt en relation avec la survie de cellules de carcinome du colon [Bates et coll., 2004 ; Subramaniam et coll., 2007].

Ayant mis en évidence le rôle de la protéine CD44 en amont de la voie PI 3-kinase/Akt dans la signalisation du TIMP-1, nous avons étudié le rôle des Src kinases dans la signalisation du TIMP-1.

I. La Src kinase Lyn est impliquée dans l'effet anti-apoptotique du TIMP-1

I.1. Le PP1 inhibe la survie cellulaire induite par le TIMP-1

Afin de montrer l'implication des Src kinases, nous avons tout d'abord étudié les effets du PP1, un inhibiteur chimique des Src kinases. Le PP1 inhibe les protéines Lyn, Lck, Src et Hck (IC_{50} : Lyn = 6 nM, Lck = 5 nM, Src = 170 nM, Hck = 20 nM). Nous avons tout d'abord étudié l'effet du PP1 sur la survie des cellules UT-7 incubées en présence de TIMP-1.

Après une mise au repos de 16 heures, les cellules sont incubées pendant 24 heures en présence de 5 ng/mL TIMP-1 et/ou 50 μ M PP1. La survie cellulaire est analysée par cytométrie en flux suite à un double marquage à l'annexine-V-FLUOS et à l'iodure de propidium. Les résultats sont présentés dans la figure 42.

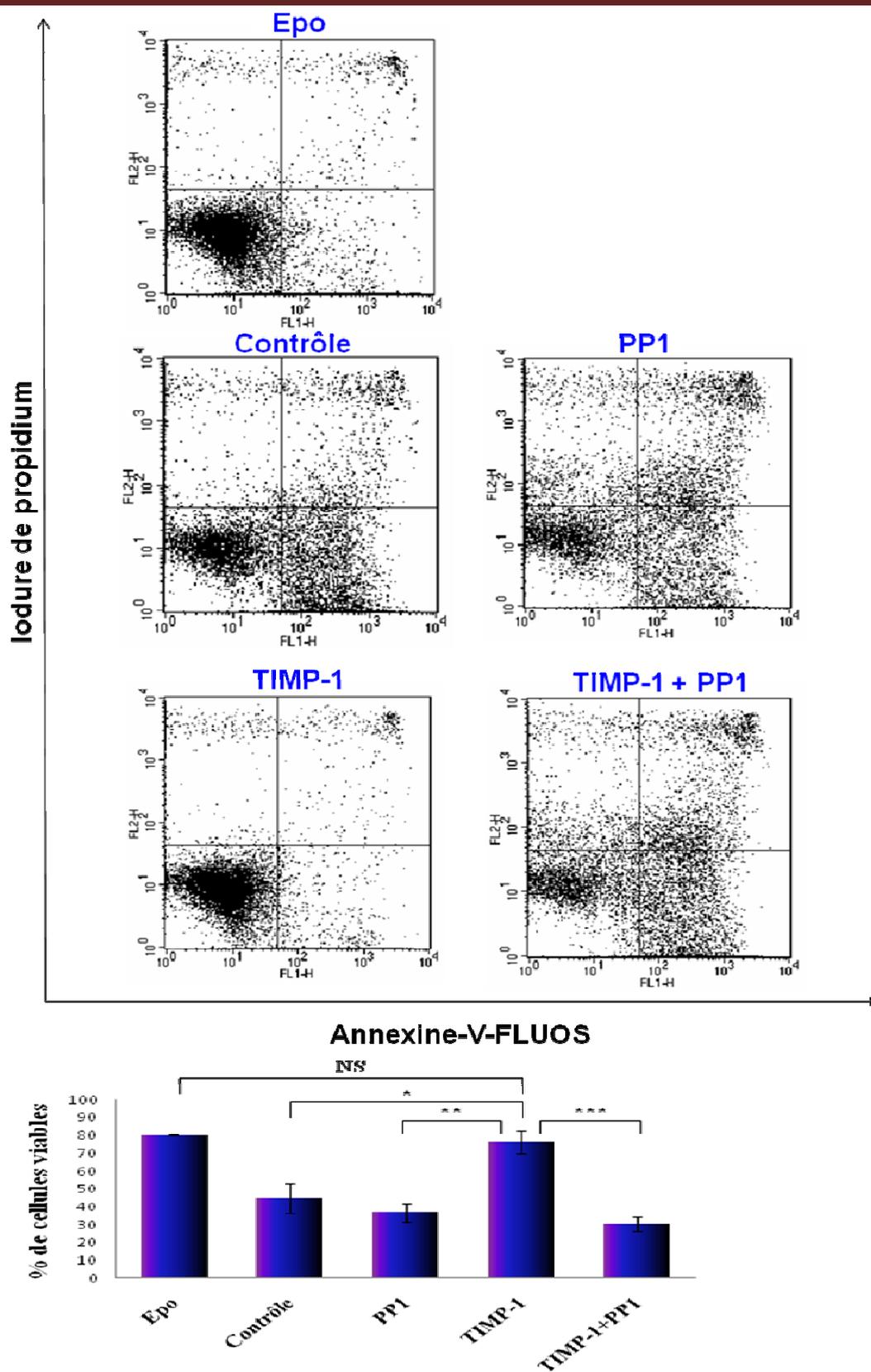


Figure 42: Le PP1 inhibe la survie cellulaire induite par le TIMP-1. Après une mise au repos de 16 heures, les cellules sont incubées pendant 24 heures en présence de 0,5 U/mL Epo, 5 ng/mL TIMP-1 et/ou 50 µM PP1. La survie cellulaire est mesurée par cytométrie en flux suite à un double marquage à l'annexine-V-FLUOS et à l'iodure de propidium. Les moyennes ± SEM sont calculées à partir de trois expériences indépendantes réalisées en triplicata (*, P<0,02 ; **, P<0,01, ***, p<0,001).

Dans la figure 42, nous voyons que le pourcentage de cellules viables passe de $44,77 \pm 8,41$ % pour les cellules contrôle à $76,19 \pm 6,45$ % pour celles incubées en présence de TIMP-1 ($P < 0,02$), ce qui confirme que le TIMP-1 induit la survie des cellules UT-7. Le pourcentage de cellules viables incubées en présence de TIMP-1 est identique à celui des cellules incubées en présence d'Epo ($80,05 \pm 0,26$ %, différence non significative). En présence de $50 \mu\text{M}$ PP1, le pourcentage de cellules viables passe de $76,19 \pm 6,45$ % pour les cellules incubées en présence de TIMP-1 à $30,13 \pm 4,13$ % pour les cellules incubées en présence de TIMP-1 et PP1 ($P < 0,001$). Ces résultats indiquent qu'en présence de $50 \mu\text{M}$ PP1, les cellules UT-7 ne sont plus capables de répondre au TIMP-1. Nous avons vérifié que la concentration de PP1 utilisée pour cette étude n'est pas cytotoxique. En effet, nous voyons que le pourcentage de cellules viables incubées en présence de PP1 seul est identique à celui des cellules contrôle ($44,77 \pm 8,41$ % pour les cellules contrôle et $36,69 \pm 4,97$ % pour les cellules incubées en présence de PP1, différence non significative).

Ces résultats semblent démontrer l'implication d'une Src kinase dans l'effet anti-apoptotique du TIMP-1.

I.2. Expression de Lyn dans les UT-7

Nous nous sommes intéressés aux Src kinases inhibées par le PP1, et plus particulièrement à Lyn puisque cette protéine est exprimée de manière importante dans les cellules hématopoïétiques [Yi et coll., 1991].

Nous avons étudié par RT-PCR et western blot l'expression de Lyn dans les cellules UT-7. Les ARNs totaux sont extraits à partir des cellules UT-7 puis le gène codant Lyn est étudié par RT-PCR. Les extraits protéiques totaux sont séparés par SDS-PAGE puis analysés par western blot avec des anticorps anti-Lyn. Les résultats sont présentés dans la figure 43.

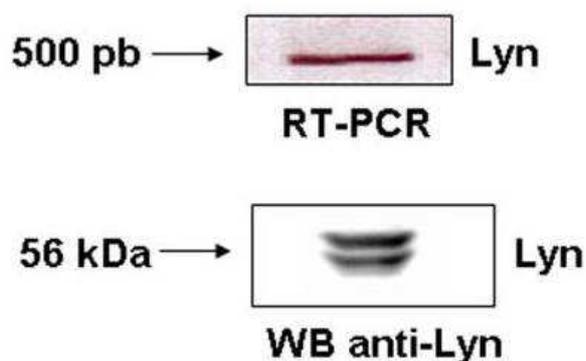


Figure 43: Expression de Lyn dans les cellules UT-7. Les ARNs totaux sont extraits et le gène de Lyn est amplifié par RT-PCR. Les extraits protéiques totaux sont analysés par western blot avec des anticorps anti-Lyn. Un blot représentatif est montré.

Les résultats de la figure 43 montrent que les cellules UT-7 expriment le gène Lyn. Les cellules UT-7 expriment la protéine Lyn et les deux formes de Lyn (53 et 56 kDa) sont observées.

I.3. Le TIMP-1 induit l'activation de Lyn

La Src kinase Lyn est activée suite à une déphosphorylation de la tyrosine 507 présente dans la partie C-terminale (correspondant à la tyrosine 527 de Src) et une autophosphorylation de la tyrosine 396 présente dans le domaine catalytique [Vichalkovski et coll., 2005]. L'activation de Lyn peut également être mesurée *in vitro* en évaluant l'activité kinase par phosphorylation de l'énolase, un substrat exogène de Lyn, en présence d'ATP [γ - 32 P].

I.3.1. Le TIMP-1 induit la déphosphorylation de la tyrosine 507 de Lyn

Nous avons ensuite étudié l'effet du TIMP-1 sur l'activation de Lyn.

Après une mise au repos de 16 heures, les cellules sont incubées pendant 30 minutes avec 50 μ M PP1 puis stimulées pendant 5 minutes avec 5 ng/mL TIMP-1. Les extraits

protéiques totaux sont séparés par SDS-PAGE puis analysés par western blot avec des anticorps dirigés contre la forme phosphorylée sur tyrosine 507 de la Src kinase Lyn. Après déshybridation, la membrane est réhybridée avec des anticorps anti-Lyn et anti- β -actine. Les résultats sont présentés dans la figure 44.

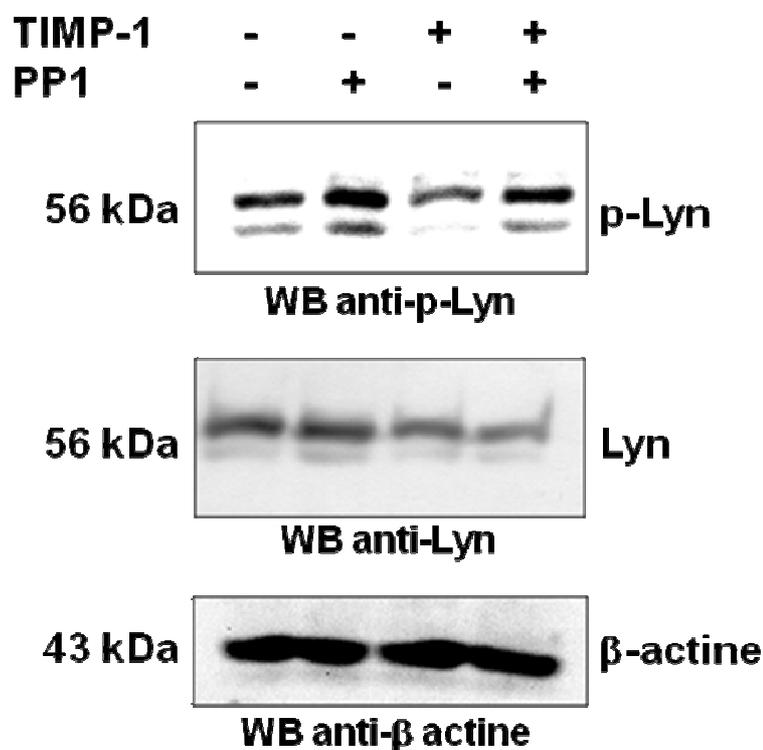


Figure 44: Le TIMP-1 induit la déphosphorylation de la tyrosine 507 de Lyn. Après une mise au repos de 16 heures, les cellules sont incubées pendant 30 minutes avec 50 μ M PP1 puis stimulées pendant 5 minutes avec 5 ng/mL TIMP-1. Les extraits totaux sont analysés par western blot avec des anticorps anti-phospho-Lyn (Tyr 507). Après déshybridation, la membrane est réhybridée avec des anticorps anti-Lyn et anti- β -actine. Un blot représentatif est montré.

Dans la figure 44, nous voyons que le TIMP-1 induit la déphosphorylation de la tyrosine 507 de Lyn et que 50 μ M PP1 inhibent l'effet du TIMP-1.

I.3.2. Le TIMP-1 induit l'activité kinasique de Lyn

Nous avons ensuite étudié l'activité kinasique de Lyn, basée sur la phosphorylation de l'énolase en présence d'ATP [γ - 32 P].

Après une mise au repos de 16 heures, les cellules sont incubées pendant 30 minutes avec 50 μ M PP1 puis stimulées pendant 5 minutes avec 5 ng/mL TIMP-1. Les cellules sont lysées puis les protéines sont immunoprécipitées avec des anticorps anti-Lyn. Les protéines immunoprécipitées sont ensuite incubées pendant 15 minutes à 30°C en présence du mélange réactionnel contenant 10 μ Ci d'ATP [γ - 32 P] et 5 μ g d'énolase dénaturée. Les protéines sont séparées par SDS-PAGE avant d'être analysées par autoradiographie. Les résultats sont présentés dans la figure 45.

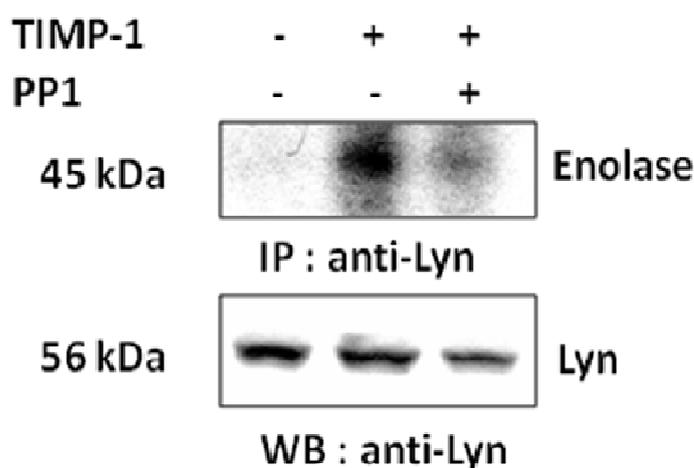


Figure 45: Le TIMP-1 induit l'activité kinasique de Lyn. Après une mise au repos de 16 heures, les cellules sont incubées pendant 30 minutes avec 50 μ M PP1 puis stimulées pendant 5 minutes avec 5 ng/mL TIMP-1. Les cellules sont lysées et les protéines sont immunoprécipitées avec des anticorps anti-Lyn. 20 μ L de protéines immunoprécipitées sont analysées par western blot avec des anticorps anti-Lyn. L'activité kinasique est mesurée *in vitro* par phosphorylation de l'énolase et analysée par autoradiographie. Un blot représentatif est montré.

Dans la figure 45, nous voyons que le TIMP-1 induit la phosphorylation de l'énolase, et donc l'activité kinasique de Lyn. Le PP1 inhibe l'effet du TIMP-1. Ces résultats confirment l'activation de Lyn par le TIMP-1.

I.4. L'extinction de l'expression de Lyn inhibe la survie cellulaire induite par le TIMP-1

Afin de préciser le rôle de Lyn dans la voie de signalisation activée par le TIMP-1, nous avons éteint l'expression de Lyn par la technique d'interférence à l'ARN.

I.4.1. Extinction de l'expression de Lyn dans les cellules transfectées

Les siRNA contrôle (sncRNA) et siRNA Lyn ont tout d'abord été testés pour leur capacité à inhiber l'expression génique et protéique de la Src kinase Lyn dans les cellules UT-7. Les cellules en phase exponentielle de croissance sont électroporées en présence de différentes concentrations de sncRNA et siRNA Lyn (100, 150 et 200 nM). Après 48 heures de culture, les ARNs totaux sont extraits et l'expression des gènes Lyn et S26 en tant que contrôle est analysée par RT-PCR. Les résultats sont présentés dans la figure 46.

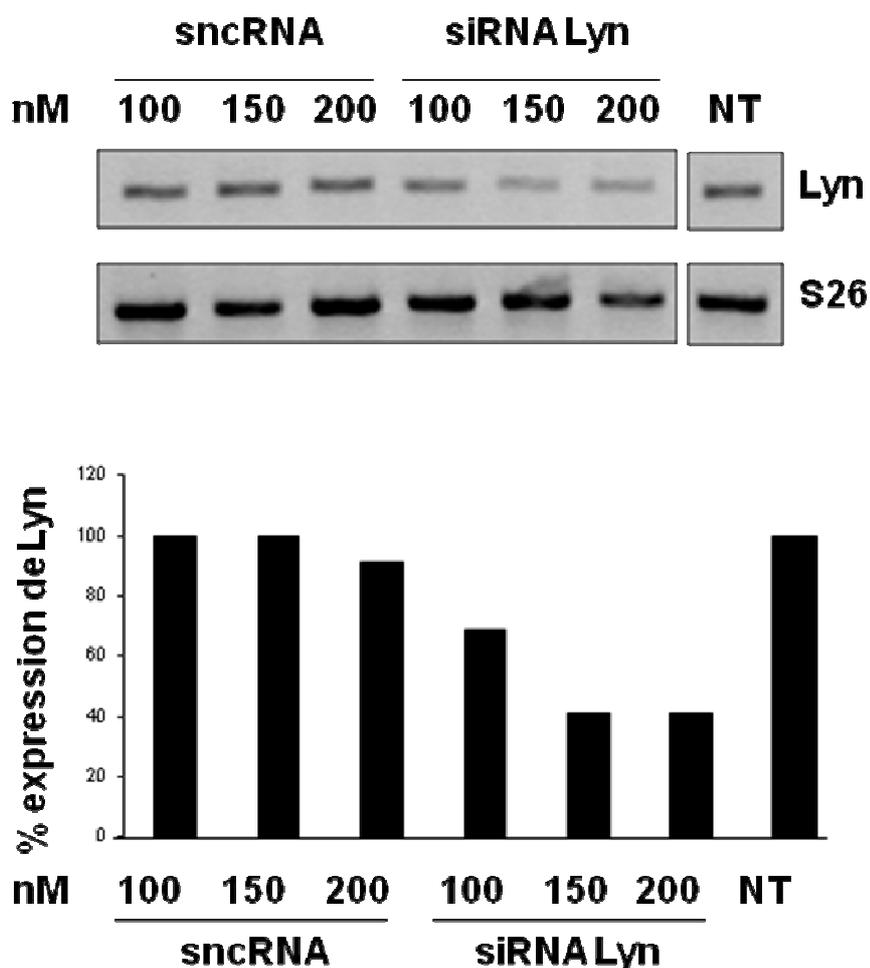


Figure 46: Expression du gène de Lyn dans les cellules transfectées avec les siRNA Lyn. Les cellules sont électroporées en présence de 100, 150 et 200 nM de sncRNA et siRNA Lyn. Après 48 heures de culture, les ARNs totaux sont extraits et l'expression du gène de Lyn et de S26 en tant que contrôle est analysée par RT-PCR. (NT = non transfectées).

Dans la figure 46, nous voyons que dans les cellules transfectées avec les sncRNA, l'expression du gène Lyn n'est pas modifiée et reste similaire à celle des cellules non transfectées (NT). Dans les cellules transfectées avec les siRNA, nous observons une diminution de l'expression du gène Lyn allant de 30 % pour les cellules transfectées avec 100 nM de siRNA Lyn à 60 % pour celles transfectées avec 150 et 200 nM de siRNA Lyn. L'électroporation n'affecte pas l'expression génique puisque aucune modification d'expression du gène codant S26 n'est observée.

Nous avons ensuite étudié l'expression de la protéine Lyn dans ces mêmes cellules. Après électroporation des cellules en présence de différentes concentrations de sncRNA et siRNA Lyn (100, 150 et 200 nM), les extraits protéiques totaux sont analysés par western blot avec des anticorps anti-Lyn. Après déshybridation, la membrane est réhybridée avec des anticorps anti-β-actine. Les résultats sont présentés dans la figure 47.

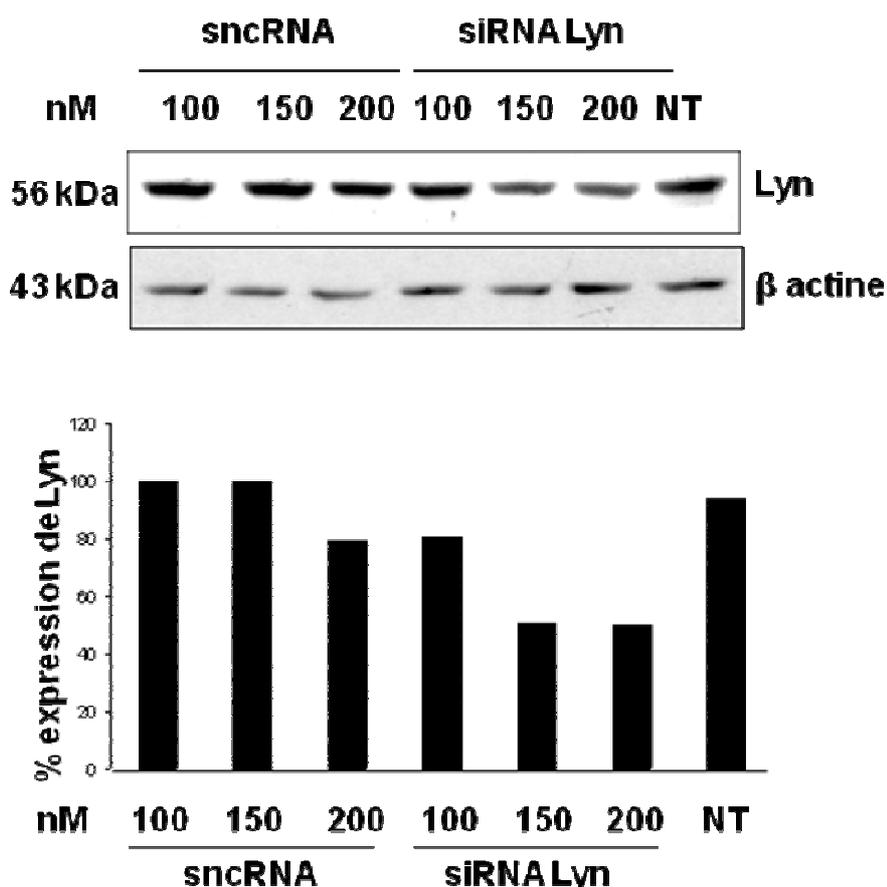


Figure 47: Expression protéique de Lyn dans les cellules transfectées avec les siRNA Lyn. Les cellules sont électroporées en présence de 100, 150 et 200 nM de sncRNA et siRNA Lyn. Les extraits protéiques totaux sont analysés par western blot avec des anticorps anti-Lyn. Après déshybridation, la membrane est réhybridée avec des anticorps anti-β-actine.

Dans la figure 47, nous voyons que dans les cellules transfectées avec les sncRNA, l'expression de la protéine Lyn n'est pas modifiée et est similaire à celle des cellules non transfectées, sauf pour les cellules transfectées avec 200 nM de sncRNA où l'expression de Lyn est diminuée de 20 %. Dans les cellules transfectées avec les siRNA Lyn, nous observons une extinction d'expression de la protéine Lyn allant de 20 % pour les cellules transfectées avec 100 nM de siRNA Lyn à 50 % pour celles transfectées avec 150 et 200 nM de siRNA Lyn.

Pour la suite de notre étude, nous transfecterons les cellules UT-7 avec 150 nM de sncRNA et de siRNA Lyn.

I.4.2. L'extinction de l'expression de Lyn inhibe l'effet anti-apoptotique du TIMP-1

Nous avons étudié l'effet du TIMP-1 sur la survie des cellules transfectées avec les siRNA Lyn. Après transfection avec 150 nM de sncRNA ou siRNA Lyn, les cellules sont incubées pendant 24 heures dans le milieu α -MEM contenant 10 % (v/v) SVF, 2 mM L-glutamine et 0,5 U/mL Epo. Après privation de tout facteur pendant 16 heures, les cellules sont incubées pendant 24 heures dans du milieu de repos contenant 5 ng/mL TIMP-1. La survie cellulaire est mesurée par cytométrie en flux suite à un double marquage à l'Annexine-V-FLUOS et à l'iodure de propidium. Les résultats sont présentés dans la figure 48.

Dans la figure 48, nous voyons que dans les cellules transfectées avec les sncRNA, le pourcentage de cellules viables passe de $53,01 \pm 3,71$ % pour les cellules contrôles à $86,71 \pm 3,51$ % pour les cellules incubées avec 5 ng/mL TIMP-1 ($P < 0,01$). Ceci indique que la transfection n'affecte pas l'effet du TIMP-1 dans les cellules UT-7. En revanche, dans les cellules transfectées avec les siRNA Lyn, le pourcentage de cellules vivantes est le même pour les cellules incubées sans TIMP-1 ($54,32 \pm 2,28$ %) et les cellules incubées avec le TIMP-1 ($51,65 \pm 4,82$ %, différence non significative). Ce résultat montre que si l'expression de Lyn est restreinte, les cellules ne sont plus capables de répondre au TIMP-1.

Ces résultats nous indiquent que la Src kinase Lyn joue un rôle important dans l'effet anti-apoptotique du TIMP-1.

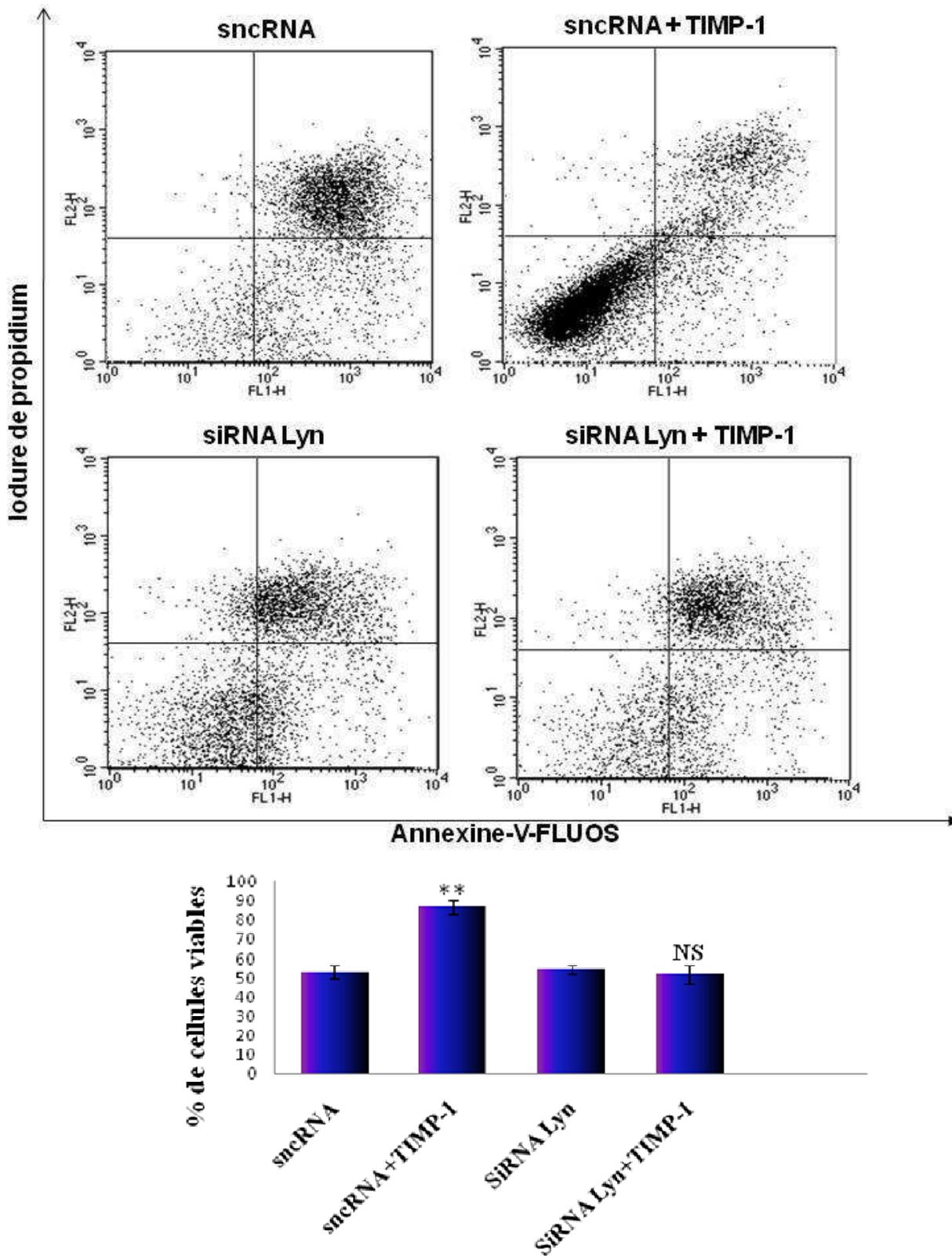


Figure 48: L'extinction d'expression de Lyn inhibe la survie cellulaire induite par le TIMP-1. Après transfection avec des sncRNA ou des siRNA Lyn et mise au repos de 16 heures, les cellules sont incubées pendant 24 heures en présence de 5 ng/mL TIMP-1. La survie cellulaire est mesurée par cytométrie en flux suite à un double marquage à l'annexine-V-FLUOS et à l'iodure de propidium. Les moyennes \pm SEM sont calculées à partir de trois expériences indépendantes réalisées en triplicata (NS, non significatif ; **, $P < 0,01$).

I.5. La Src kinase Lyn est activée en amont de la PI 3-kinase

Dans notre laboratoire, nous avons montré que le TIMP-1 active la voie PI 3-kinase/Akt [Lambert et coll., 2003]. Plusieurs travaux ont montré que les Src kinases pouvaient réguler la voie PI 3-kinase/Akt [Lee et coll., 2003 ; Bates et coll., 2004 ; Subramaniam et coll., 2007]. De plus, Pleiman et coll. ont montré le domaine SH3 des Src kinases peut se fixer à la sous-unité p85 de la PI 3-kinase [Pleiman et coll., 1994].

Nous nous sommes intéressés à l'implication de Lyn dans la voie PI 3-kinase/Akt. Nous avons tout d'abord étudié l'effet du PP1 sur l'activité PI 3-kinase.

Après une mise au repos de 16 heures, les cellules sont incubées pendant 30 minutes avec 25 et 50 μ M PP1 puis stimulées pendant 5 minutes avec 5 ng/mL TIMP-1. Les cellules sont ensuite lysées et les protéines sont immunoprécipitées avec des anticorps dirigés contre la sous-unité p85 de la PI 3-kinase. L'activité PI 3-kinase est évaluée par la formation de phosphatidylinositol-3'-phosphate (PIP) radioactif généré par phosphorylation du groupement hydroxyle en position D3 du phosphatidylinositol (PI) par la PI 3-kinase active en présence d'ATP [γ - 32 P]. Le PIP radioactif est séparé par chromatographie sur couche mince sur plaque de silice et révélé par autoradiographie. Les spots de PIP radioactif sont quantifiés par densitométrie et les résultats sont exprimés en pourcentage de PIP radioactif par rapport au témoin positif correspondant aux cellules incubées en présence de 5 ng/mL TIMP-1. Les résultats sont présentés dans la figure 49.

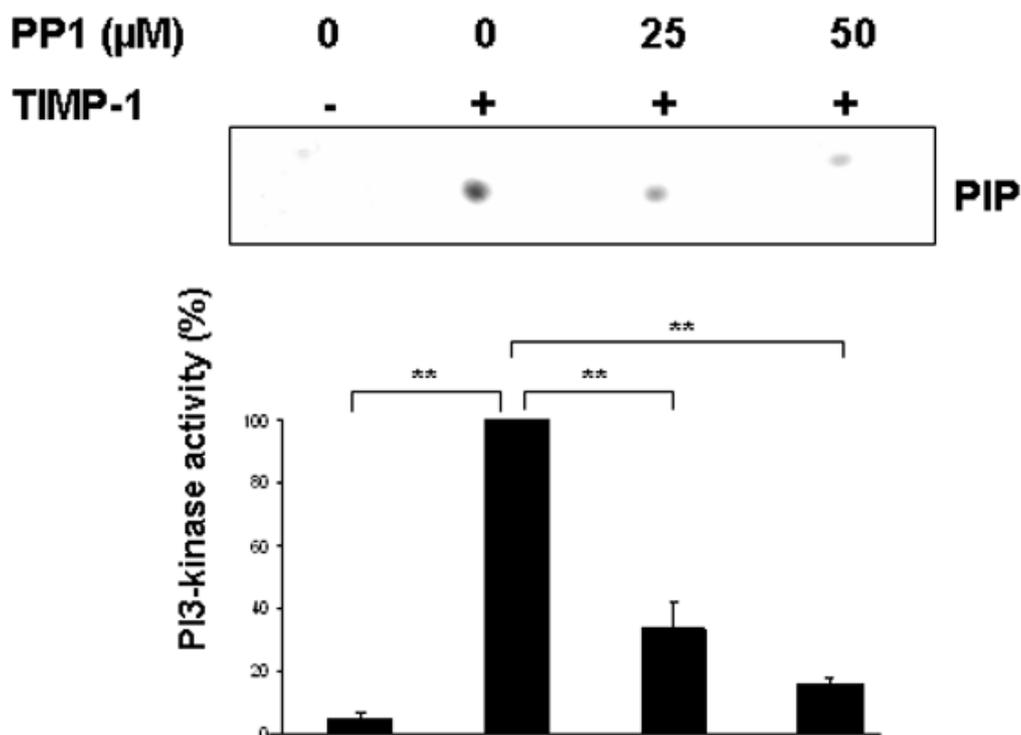


Figure 49: Le PP1 inhibe l'activité PI 3-kinase induite par le TIMP-1. Après une mise au repos de 16 heures, les cellules sont incubées pendant 30 minutes avec 25 et 50 μ M PP1 puis stimulées pendant 5 minutes avec 5 ng/mL TIMP-1. Après la lyse cellulaire, les protéines sont immunoprécipitées avec des anticorps anti-p85 et soumises à un test d'activité Pi 3-kinase. Le PIP produit est séparé par chromatographie sur couche mince et analysé par autoradiographie. La quantification de phosphorylation du PI est exprimée comme le pourcentage de signal obtenu par rapport au TIMP-1. Les moyennes \pm SEM sont calculées à partir de 3 expériences indépendantes (**, $P < 0,01$).

Dans la figure 49, nous voyons que le TIMP-1 induit l'activité PI 3-kinase comme il a déjà été montré dans notre laboratoire [Lambert et coll., 2003]. Nous voyons que le PP1 inhibe la formation de PIP avec un effet maximal à 50 μ M. En effet, l'activité PI 3-kinase induite par le TIMP-1 est inhibée de 65 % pour les cellules incubées avec 25 μ M PP1 et de 80 % pour celles incubées avec 50 μ M PP1.

Ces résultats indiquent que la Src kinase Lyn est activée en amont de la PI 3-kinase dans la voie de signalisation induite par le TIMP-1 et conduisant à la survie des cellules UT-7.

I.6. La Src kinase Lyn est activée en amont de la kinase Akt

Dans la voie de signalisation activée par le TIMP-1 et conduisant à la survie des cellules UT-7, une des cibles principales de la PI 3-kinase est la kinase Akt. Nous avons donc étudié le rôle de Lyn sur la phosphorylation d'Akt.

I.6.1. Le PP1 inhibe la phosphorylation d'Akt induite par le TIMP-1

Nous avons tout d'abord étudié l'effet du PP1 sur la phosphorylation sur thréonine 308 d'Akt induite par le TIMP-1.

Après une mise au repos de 16 heures, les cellules sont incubées pendant 30 minutes avec 50 μ M PP1 puis stimulées pendant 5 minutes avec 5 ng/mL TIMP-1. Les extraits protéiques totaux sont séparés par SDS-PAGE puis analysés par western blot avec des anticorps dirigés contre la forme phosphorylée sur thréonine 308 de la protéine Akt. Après déshybridation, la membrane est réhybridée avec des anticorps anti-Akt. Les résultats sont présentés dans la figure 50.

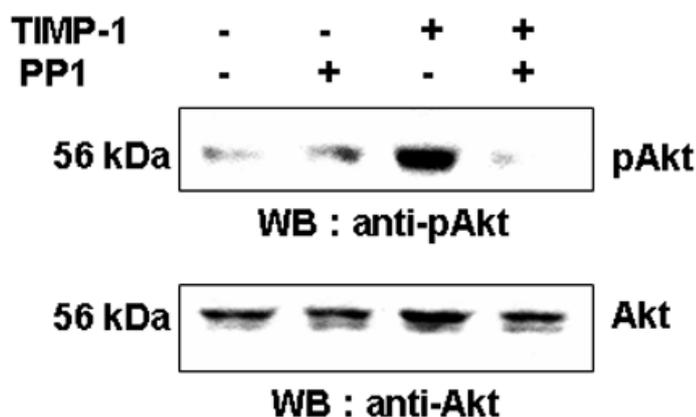


Figure 50: Le PP1 inhibe la phosphorylation d'Akt induite par le TIMP-1. Après une mise au repos de 16 heures, les cellules sont incubées pendant 30 minutes avec 50 μ M PP1 puis stimulées pendant 5 minutes avec 5 ng/mL TIMP-1. Les extraits totaux sont analysés par western blot avec des anticorps anti-phospho-Akt (Thr 308). Après déshybridation, la membrane est réhybridée avec des anticorps anti-Akt. Un blot représentatif est montré.

Dans la figure 50, nous voyons que le TIMP-1 induit la phosphorylation de la thréonine 308 d'Akt. Cet effet est inhibé par 50 μ M PP1. Ces résultats suggèrent que la Src kinase Lyn est activée en amont de la voie PI 3-kinase/Akt.

I.6.2. L'extinction de l'expression de Lyn inhibe la phosphorylation d'Akt induite par le TIMP-1

Afin de confirmer ce résultat, nous avons étudié la phosphorylation d'Akt induite par le TIMP-1 dans les cellules transfectées avec les siRNA Lyn.

Les cellules sont électroporées en présence de 150 nM de sncRNA ou siRNA Lyn et incubées pendant 24 heures dans le milieu α -MEM contenant 10 % (v/v) SVF, 2 mM L-glutamine et 0,5 U/mL Epo. Après une mise au repos de 16 heures, les cellules sont stimulées pendant 5 minutes avec 5 ng/mL TIMP-1. Les extraits protéiques totaux sont analysés par western blot avec des anticorps dirigés contre la forme phosphorylée sur thréonine 308 d'Akt. Après déshybridation, la membrane est réhybridée avec des anticorps anti-Akt. Les résultats sont présentés dans la figure 51.

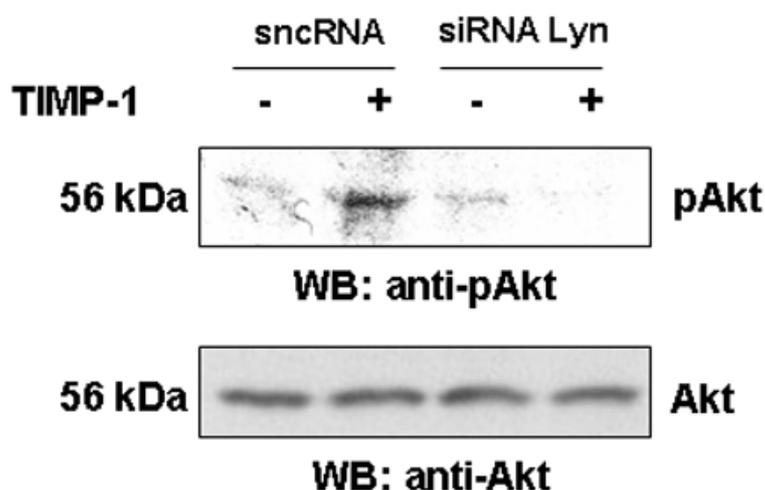


Figure 51: L'extinction de l'expression de Lyn inhibe la phosphorylation d'Akt induite par le TIMP-1. Après transfection avec 150 nM de sncRNA et siRNA Lyn, les cellules sont incubées pendant 24 heures dans le milieu α -MEM contenant 10 % (v/v) SVF, 2 mM L-glutamine et 0,5 U/mL Epo. Après une mise au repos de 16 heures, les cellules sont stimulées pendant 5 minutes avec 5 ng/mL TIMP-1. Les extraits protéiques totaux sont analysés par western blot avec des anticorps anti-phospho-Akt (Thr 308). Après déshybridation la membrane est réhybridée avec des anticorps anti-Akt.

Dans la figure 51, nous voyons que dans les cellules transfectées avec les *sncRNA*, le TIMP-1 induit la phosphorylation de la thréonine 308 d'Akt comme déjà montré dans notre laboratoire [Lambert et coll., 2003]. En revanche, dans les cellules transfectées avec les *siRNA Lyn*, le TIMP-1 n'induit pas la phosphorylation d'Akt.

Ces résultats confirment l'implication de la Src kinase Lyn en amont de la voie PI 3-kinase/Akt dans la voie de signalisation induite par le TIMP-1 et conduisant à la survie des cellules UT-7.

II. Etude de l'interaction entre Lyn et JAK2

Dans notre laboratoire, nous avons montré que le TIMP-1 active JAK2 en amont de la PI 3-kinase [Lambert et coll., 2003]. Dans ce travail, nous avons montré que le TIMP-1 active également la Src kinase Lyn en amont de la PI 3-kinase. Nous avons donc étudié par l'interaction entre Lyn et JAK2.

Les cellules en phase exponentielle de croissance sont lysées et les protéines sont immunoprécipitées avec des anticorps anti-Lyn. Les protéines immunoprécipitées sont analysées par western blot avec des anticorps anti-JAK2. Les résultats sont présentés dans la figure 52.

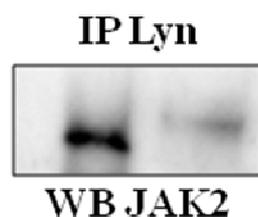


Figure 52: JAK2 est associée de manière constitutive à Lyn. Les cellules en phase exponentielle de croissance sont lysées et les protéines sont immunoprécipitées avec des anticorps anti-Lyn. Les protéines immunoprécipitées sont analysées par western blot avec des anticorps anti-JAK2.

Dans la figure 52, nous voyons que la kinase JAK2 immunoprécipite avec la Src kinase Lyn. Ces résultats indiquent que JAK2 et Lyn sont associées de manière constitutive dans les cellules UT-7.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les TIMPs ont été initialement décrits pour leur capacité à inhiber les MMPs, mais de nombreuses études ont rapporté un grand nombre d'activités indépendantes de l'inhibition des MMPs. Les TIMP-1 et -2 ont tout d'abord été décrits pour leur activité EPA (Erythroid Potentiating Activity) capable de potentialiser les effets de l'Epo sur la prolifération et la différenciation des progéniteurs érythroïdes et de lignées cellulaires hématopoïétiques telles que les lignées érythroleucémiques humaines K562 et murines ELM-I-1-3. En absence de sérum et de tout autre facteur de croissance, le TIMP-1 peut moduler la prolifération cellulaire. Le TIMP-1 a un effet mitogénique dans la lignée cellulaire d'ostéosarcome humain MG-63, les kératinocytes et certaines lignées cellulaires hématopoïétiques [Yamashita et coll., 1996 ; Bertaux et coll., 1991 ; Hayakawa et coll., 1992]. Le TIMP-1 a également été décrit pour son activité anti-apoptotique dans différents types cellulaires comme les lignées cellulaires de lymphome de Burkitt et les lignées cellulaires de cancer du sein [Guedez et coll., 1998 ; Lee et coll., 2003].

Le but des études réalisées dans notre laboratoire est d'identifier le rôle du TIMP-1, en tant que protéine de la matrice extracellulaire, dans le microenvironnement hématopoïétique. Les premières études ont montré que le TIMP-1 est sécrété par la lignée érythroleucémique humaine UT-7 en réponse à l'Epo [Kadri et coll., 2000]. D'autres travaux réalisés dans notre laboratoire ont montré que le TIMP-1, en absence de tout facteur de croissance, induit la différenciation des cellules érythroleucémiques humaines UT-7 et des cellules myéloïdes murines 32D [Petitfrère et coll., 2000, Dassé et coll., 2007]. De plus, le TIMP-1 induit l'engagement vers la lignée érythroïde des cellules issues de progéniteurs érythroïdes CD34+ isolés à partir de sang de cordon ombilical humain [Dassé et coll., 2007].

Dans notre laboratoire, Elise Lambert a montré que le TIMP-1 induit la survie des cellules UT-7 et des cellules myéloïdes murines 32D en activant la voie JAK2/PI 3-kinase/Akt [Lambert et coll., 2003]. Ce travail de thèse poursuit l'étude sur l'effet anti-apoptotique du TIMP-1 dans la lignée érythroleucémique humaine UT-7 dans le but de caractériser le récepteur du TIMP-1. Depuis quelques années, l'étude des récepteurs des TIMPs a fait l'objet de nombreux travaux et fait apparaître l'existence de récepteurs spécifiques qui ne sont pas des métalloprotéinases. Ces récepteurs semblent spécifiques du type cellulaire et impliquent des voies de signalisation particulières. Dans le système cellulaire que nous étudions, les cellules érythroleucémiques humaines UT-7, nous avons récemment montré que le TIMP-1 se fixe à une pro-MMP-9 localisée à la membrane

plasmique des cellules UT-7 et que l'expression membranaire de la pro-MMP-9 est nécessaire à l'effet anti-apoptotique du TIMP-1. De plus, l'effet du TIMP-1 est indépendant de l'inhibition de la MMP-9 puisque des anticorps bloquant la MMP-9 et des inhibiteurs de MMPs synthétiques ne reproduisent pas les effets du TIMP-1 [Lambert et Bridoux, co-auteurs, 2009].

Le TIMP-1 se fixe à la pro-MMP-9 et l'analyse des marquages immunocytochimiques grâce au logiciel Image J nous a permis de quantifier la colocalisation du TIMP-1 avec la pro-MMP-9 et il apparaît que 57 % du TIMP-1 total colocalise avec la pro-MMP-9. Ce résultat pourrait suggérer que le TIMP-1 se fixe sur d'autres protéines localisées à la surface des cellules UT-7. Nos résultats indiquent que le TIMP-1 semble être également colocalisé avec CD44 à la surface des cellules UT-7 puisque, grâce à des expériences d'immunofluorescence, nous observons un marquage péricellulaire de CD44 et du TIMP-1. Pour confirmer ce résultat, nous envisageons d'étudier plus précisément cette interaction par différentes techniques d'analyse (biotinylation des protéines membranaires, immunoprécipitation...). Nous pourrions également supposer que le TIMP-1 interagisse avec CD44 et envisageons d'incuber les cellules avec des anticorps bloquant CD44 et d'étudier l'effet du TIMP-1 sur la survie cellulaire. CD44, décrite comme le principal récepteur de l'acide hyaluronique, possède dans sa partie extracellulaire un domaine de fixation à ce ligand. Nous avons étudié l'influence de l'acide hyaluronique sur l'effet anti-apoptotique du TIMP-1. Nous montrons que l'incubation des cellules avec des concentrations en acide hyaluronique comprises entre 1 et 50 µg/mL n'a aucun effet sur la phosphorylation d'Akt induite par le TIMP-1.

Le TIMP-1 est organisé en deux domaines : un domaine N-terminal qui est impliqué dans l'inhibition des MMPs et un domaine C-terminal qui est impliqué dans la formation de complexes avec les pro-enzymes. Des études préliminaires dans notre laboratoire ont montré que le N-TIMP-1, correspondant au domaine N-terminal du TIMP-1 [Murphy et coll., 1991], est capable de reproduire les effets du TIMP-1 sur la survie cellulaire. Ces résultats suggèrent que les résidus qui interagissent avec le « complexe récepteur » du TIMP-1 sont situés dans le domaine N-terminal du TIMP-1. Pour vérifier cette hypothèse, nous envisageons dans un premier temps d'étudier l'interaction entre le N-TIMP-1 et la pro-MMP-9 et dans un second temps, entre le N-TIMP-1 et CD44. Nous envisageons ensuite d'identifier les acides aminés du TIMP-1 impliqués dans l'interaction avec la pro-MMP-9 d'une part et avec CD44 d'autre part.

A l'heure actuelle, seule la structure tridimensionnelle du complexe TIMP-1/MMP-3 est connue en cristallographie [Gomis-Ruth et coll., 1997]. Dans notre laboratoire, une étude de modélisation est en cours afin d'étudier les relations structure-fonction et la dynamique de ce complexe. Cette étude a pour but de visualiser le mouvement des TIMPs et les zones d'interactions avec la MMP-3. Les travaux de Nicolas Floquet réalisés au cours d'un stage postdoctoral dans notre laboratoire ont permis d'identifier trois acides aminés présents dans la région charnière entre les deux domaines du TIMP-1 qui semblent jouer un rôle important dans le mouvement du TIMP-1 : la phénylalanine 12, la lysine 47 et le tryptophane 105. Afin de préciser le rôle éventuel de ces trois acides aminés dans l'effet anti-apoptotique du TIMP-1, Olivier Bocquet, ingénieur d'étude dans notre laboratoire, produit actuellement différentes molécules de TIMP-1 recombinant, mutées au niveau de ces trois acides aminés. Nous envisageons d'étudier l'influence de ces mutations sur l'inhibition des MMPs, l'interaction du TIMP-1 avec la pro-MMP-9 et CD44 et l'activité anti-apoptotique du TIMP-1.

Nous avons ensuite étudié l'association de la pro-MMP-9 à la membrane plasmique. Dans ce travail, nous avons montré, par des expériences d'immunoprécipitation et d'immunomarquage, que la glycoprotéine CD44 est associée de manière constitutive à la pro-MMP-9. Grâce à la technique d'interférence ARN (siRNA), nous avons montré que CD44 permet l'ancrage de la pro-MMP-9 à la surface cellulaire puisque si l'on éteint l'expression de CD44, la pro-MMP-9 n'est plus localisée à la surface cellulaire. L'expression de CD44 est indispensable à l'effet anti-apoptotique du TIMP-1 puisque si l'on éteint l'expression de CD44, le TIMP-1 n'est plus capable d'induire la survie des cellules UT-7 ni la phosphorylation de JAK2.

Le clivage protéolytique de CD44 est décrit comme un mécanisme régulateur clé de l'interaction cellule-matrice et de différentes voies de signalisation dépendantes de CD44 [Nagano et Saya, 2004]. CD44 va subir des clivages protéolytiques séquentiels dans le domaine extracellulaire (ectodomaine) et le domaine intramembranaire qui vont conduire à la libération de CD44 soluble dans le milieu extracellulaire et d'un fragment du domaine intracellulaire (ICD). Le clivage de l'ectodomaine de CD44 est provoqué par différentes stimulations, comme par exemple un influx de Ca^{2+} extracellulaire, l'activation d'une protéine kinase C ou l'activation d'oncoprotéines telles que Rac et Ras [Okamoto et coll., 1999, Kawano et coll., 2000]. Ce clivage peut également se faire sous l'action de MMPs actives associées à la membrane. Or, dans notre système, la pro-MMP-9, qui est dans une

conformation active, est associée à la membrane plasmique. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que la pro-MMP-9 peut induire le clivage de l'ectodomaine de CD44. Nous n'avons pas étudié le clivage protéolytique mais nous envisageons d'étudier ce processus par western blot avec des anticorps dirigés contre l'ectodomaine et le domaine intracellulaire de CD44 le clivage de CD44. Nous envisageons également de cloner le gène de CD44 dans les cellules UT-7 afin de surproduire la protéine CD44 (Travaux effectués par Nicolas Etique) et étudier l'effet de cette surproduction dans la signalisation anti-apoptotique du TIMP-1.

En effet, CD44 intervient dans différents processus pathologiques tels que le cancer du poumon, le cancer du sein ou le cancer colorectal. La surexpression de CD44 est liée à un facteur de mauvais pronostic. Depuis quelques années, le rôle de CD44 apparaît également dans certaines hémopathies [Liu et coll., 2006]. Un nombre significatif d'hémopathies malignes humaines expriment de forts taux d'isoformes variantes du CD44, qui sont peu exprimées dans les cellules hématopoïétiques normales. Ainsi, l'expression d'isoformes de CD44 est augmentée dans les lymphomes non hodgkiniens et dans les leucémies aigües myéloblastiques, le myélome et la leucémie myéloïde chronique. De plus, l'existence d'une corrélation entre cette expression et une évolution clinique défavorable dans ces hémopathies suggère que certaines isoformes variantes pourraient jouer un rôle important dans ces hémopathies et pourrait être un nouveau facteur pronostic. Une étude a montré que des anticorps anti-CD44 sont capables d'induire la différenciation de cellules leucémiques KG1a provenant d'un patient LAM-M0 [Charrad et coll., 2002]. En activant CD44 par des anticorps spécifiques anti-CD44, les chercheurs ont observé des différenciations dans toutes les LAMs des types M1 à M5, avec une prédominance pour les types M3 et M5, la majorité de ces cellules malignes étant redevenue normale.

Dans notre laboratoire, nous avons montré que le TIMP-1 induit la différenciation des cellules érythroleucémiques humaines UT-7, myéloïdes murines 32D et des cellules issues des progéniteurs érythroïdes normaux CD34+ [Dassé et coll., 2007]. L'effet du TIMP-1 sur la différenciation érythroïde active la voie MEKK1/MEK6/p38 α . Nous envisageons d'étudier le rôle de CD44 dans la différenciation érythroïde induite par le TIMP-1.

Une autre protéine a été décrite comme capable d'interagir avec CD44 à la surface cellulaire, il s'agit de l'intégrine β 1. En effet, Redondo-Munoz et coll. ont rapporté que l'intégrine α 4 β 1 et l'isoforme de 190 kDa de CD44 permettent l'ancrage de la pro-MMP-9 à la surface des cellules B-CLL, régulent la migration et l'arrêt cellulaire [Redondo-Munoz et coll., 2006]. L'implication de l'intégrine β 1 a également été mise en évidence dans les

cellules de cancer mammaire MCF10A. Dans ces cellules, le TIMP-1 se fixe sur la protéine CD63, un membre de la famille des tétraspanines, présente à la surface des cellules de cancer mammaire MCF10A [Jung et coll., 2006]. Dans ces cellules, le TIMP-1 module la polarisation et la survie cellulaire *via* un complexe CD63/intégrine $\beta 1$ présent à la surface cellulaire. Ces résultats démontrent le rôle de l'intégrine $\beta 1$ en tant que protéine membranaire capable de fixer le TIMP-1 dans différents types cellulaires. Nous avons réalisé des études préliminaires sur l'implication de l'intégrine $\beta 1$ dans l'effet anti-apoptotique du TIMP-1. Les cellules UT-7 expriment l'intégrine $\beta 1$ et le marquage immunocytochimique de l'intégrine $\beta 1$ révèle une localisation uniforme à la périphérie des cellules UT-7 (Figure 53).

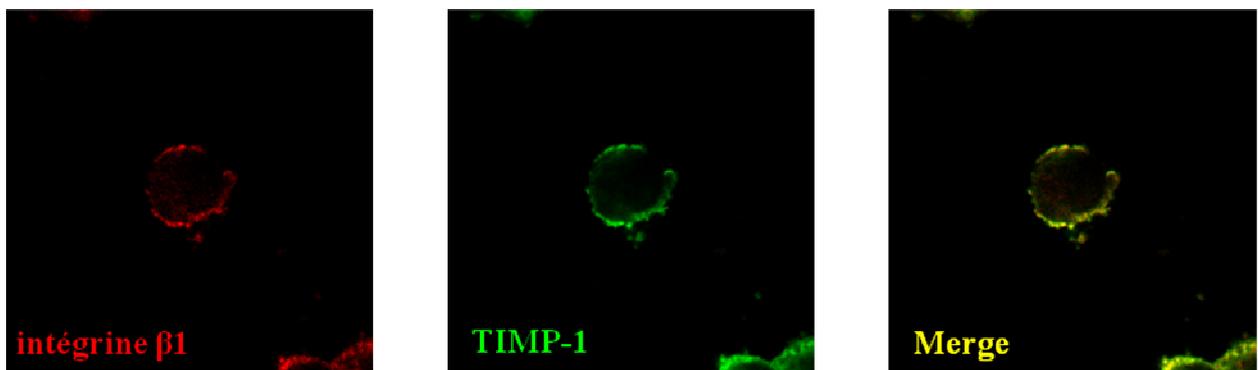


Figure 53: L'intégrine $\beta 1$ et le TIMP-1 sont colocalisés à la membrane plasmique des cellules UT-7. Après fixation des cellules sur des lamelles de verre, la localisation de l'intégrine $\beta 1$ et du TIMP-1 est détectée grâce à des anticorps anti-intégrine $\beta 1$ et anti-TIMP-1 couplés respectivement à l'Alexa 568 et l'Alexa 488. La fluorescence est observée par microscopie confocale.

De plus, l'intégrine $\beta 1$ et le TIMP-1 semblent colocalisées à la membrane plasmique des cellules UT-7.

Nous avons également étudié par immunoprécipitation l'interaction possible entre l'intégrine $\beta 1$ et la pro-MMP-9 et entre l'intégrine $\beta 1$ et CD44 (Figure 54).

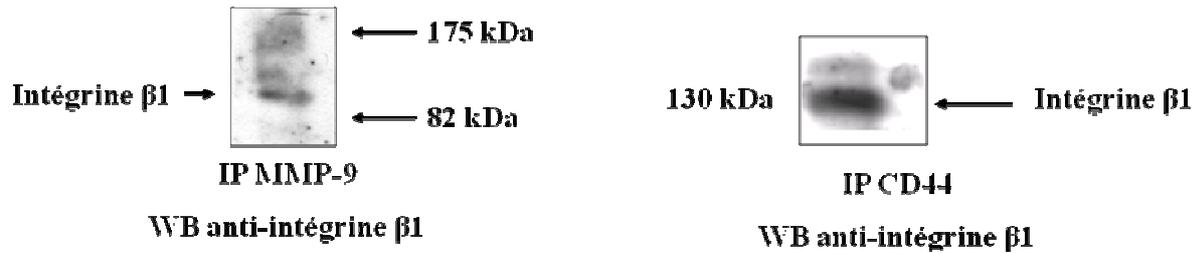


Figure 54: L'intégrine $\beta 1$ immunoprécipite avec la MMP-9 et CD44. Les cellules en phase exponentielle de croissance sont lysées et les protéines sont immunoprécipitées avec des anticorps anti-MMP-9 et anti-CD44 avant d'être analysées par western blot avec des anticorps dirigés contre l'intégrine $\beta 1$.

Nous voyons que l'intégrine $\beta 1$ immunoprécipite avec CD44 et la MMP-9.

Enfin, lors de nos études préliminaires sur l'implication de l'intégrine $\beta 1$ dans l'effet anti-apoptotique du TIMP-1, nous avons étudié l'effet d'anticorps bloquants l'intégrine $\beta 1$ sur la phosphorylation de JAK2 induite par le TIMP-1 (Figure 55).

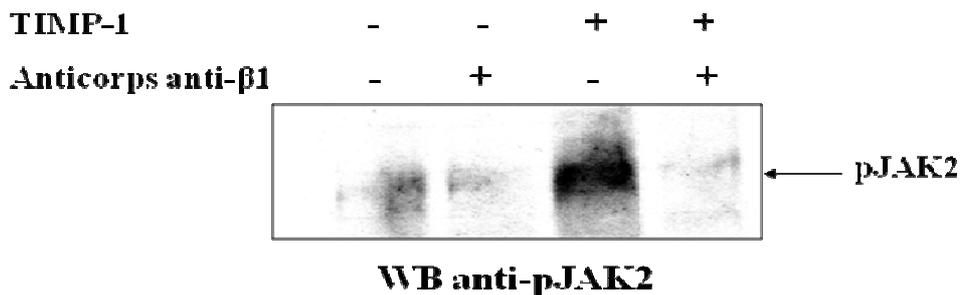


Figure 55: Les anticorps bloquant l'intégrine beta1 inhibent la phosphorylation de JAK2 induite par le TIMP-1. Après une mise au repos de 16 heures, les cellules sont incubées pendant 1 heure avec les anticorps bloquant l'intégrine $\beta 1$ puis stimulées pendant 5 minutes avec le TIMP-1. Les extraits protéiques totaux sont analysés par western blot avec des anticorps anti-phospho-JAK2.

Dans la figure 56, nous voyons que les anticorps bloquant l'intégrine $\beta 1$ inhibent l'effet du TIMP-1 sur la phosphorylation de JAK2, suggérant que l'intégrine $\beta 1$ est impliquée dans la voie de signalisation anti-apoptotique du TIMP-1. Pour confirmer ce résultat, nous envisageons d'éteindre l'expression de l'intégrine $\beta 1$ par transfection avec des siRNA et d'étudier, d'une part, l'effet du TIMP-1 sur la survie cellulaire, et d'autre part, le comportement de la pro-MMP-9 et de CD44 à la surface cellulaire.

Les intégrines sont une superfamille de molécules d'adhérence qui assurent l'adhérence des cellules aux protéines de la MEC. La spécificité de liaison dépend du domaine extracellulaire des sous-unités α . Les domaines de liaisons extracellulaires identifient le motif RGD. Par exemple, le motif RGD est présent dans la séquence primaire de la fibronectine. Dans le TIMP-1, nous n'avons pas de séquence RGD présente dans la structure primaire du TIMP-1, cependant ce motif RGD est retrouvé dans la structure tridimensionnelle du TIMP-1. Nous pourrions envisager d'étudier le rôle du TIMP-1, indépendamment ou non de son effet anti-apoptotique, dans les processus d'adhérence des progéniteurs hématopoïétiques normaux et des cellules leucémiques.

De précédents travaux dans le laboratoire ont montré que la stimulation des cellules UT-7 par le TIMP-1 induisait la phosphorylation sur tyrosine de nombreuses protéines cytoplasmiques démontrant ainsi l'implication de tyrosines kinases [Petitfrère et coll., 2000]. La tyrosine kinase JAK2 joue un rôle crucial dans la signalisation induite par l'Epo et dans notre laboratoire, Lambert et coll. ont montré que le TIMP-1 induit la phosphorylation de JAK2 dès une minute de stimulation. La tyrosine kinase JAK2 participe également à la transduction du signal anti-apoptotique induit par le TIMP-1. Dans ce travail de thèse, nous avons montré que le TIMP-1 se fixe à un complexe membranaire pro-MMP-9/CD44. Nous avons émis l'hypothèse que CD44 et JAK2 pouvaient être associées et transduire le signal anti-apoptotique du TIMP-1. Dans une première étape, nous avons étudié l'association CD44/JAK2 et par des expériences d'immunoprécipitation, nous avons montré que ces deux protéines sont associées de manière constitutive dans les cellules UT-7. Nous avons également montré que lorsqu'on éteint l'expression de CD44, le TIMP-1 n'est plus capable d'induire la phosphorylation de JAK2.

Le domaine FERM (Four point one, Ezrin, Radixin, Moesin) est un domaine important présent dans les molécules qui interviennent dans la signalisation intracellulaire, puisqu'il permet la localisation de ces protéines à la membrane plasmique. L'archétype du domaine FERM a été détecté dans le domaine N-terminal des kinases de la famille des JAKs [Girault et coll., 1998]. Des études de modélisation moléculaire ont montré que le domaine FERM de JAK2 adopte la structure classique d'un domaine FERM, c'est-à-dire constitué de trois lobes : un lobe A (résidus D35 à P121), un lobe B (résidus D147 à L258) et un lobe C (résidus E268 à Y382). Le domaine FERM de JAK2 est responsable de la fixation à la boîte 1 (« box 1 ») de différents récepteurs à cytokines dont le R-Epo [Frank et coll., 1995 ; Lebrun et coll., 1995 ; Tanner et coll., 1995]. Dans la littérature, de nombreuses études rapportent qu'une séquence

située dans le domaine cytoplasmique de CD44 peut se fixer au domaine FERM des protéines ERM (Ezrine, Radixine, Moesine). Récemment, Mori et coll. ont identifié la structure cristallographique du domaine FERM de la radixine complexé à CD44 [Mori et coll., 2008]. Ils ont montré que la séquence QKKKLVING de CD44 forme un brin β suivi d'une petite boucle et qu'elle intervient dans la fixation de CD44 au lobe C du domaine FERM de la radixine. A ce jour, il n'existe aucune donnée cristallographique de l'interaction entre CD44 et le domaine FERM de JAK2. C'est pourquoi, dans ce travail de thèse, nous avons débuté cette modélisation. Connaissant la structure du domaine FERM de JAK2 [Giodanetto et Kroemer, 2002] et celle du fragment cytoplasmique de CD44 qui se complexe au domaine FERM de la radixine [Mori et coll., 2008], nous avons superposé les structures tridimensionnelles du domaine FERM de la radixine au domaine FERM de JAK2. Nous avons montré que le domaine FERM de JAK2 présente une structure semblable à celle du domaine FERM de la radixine, avec trois brins β qui interagissent avec le peptide QKKKLVING de CD44. Nous avons également montré que ce peptide QKKKLVING peut interagir avec les trois brins β du domaine FERM de JAK2. Ces trois brins β forment une gorge où le peptide vient se fixer. Pour confirmer cette hypothèse, nous souhaiterions réaliser des mutants délétés de ce peptide et réaliser une étude dynamique du complexe afin d'identifier les acides aminés de CD44 nécessaires à cette interaction. Nos premiers résultats nous laissent penser que les lysines en position 2 et 4 du peptide de CD44 semblent jouer un rôle important dans l'interaction CD44/JAK2, c'est pourquoi nous envisageons de muter ces deux lysines et étudier l'implication de cette mutation sur l'interaction avec JAK2 et l'effet anti-apoptotique du TIMP-1. Ce travail sera dans une première étape effectué par simulation moléculaire pour évaluer théoriquement la validité des hypothèses de l'interaction.

Une autre question se pose alors : comment JAK2 est activée? Pour les récepteurs à cytokines, les mécanismes d'activation des JAKs sont connus. La fixation du ligand sur son récepteur induit l'oligomérisation des sous-unités du récepteur qui sont constitutivement associées aux JAKs. Les JAKs vont alors être activées par transphosphorylation et phosphorylent les résidus tyrosines dans la partie intracellulaire du R-Epo. Dans la voie de signalisation anti-apoptotique du TIMP-1, nous ne savons pas si le complexe récepteur constitué des protéines pro-MMP-9 et CD44 est sous forme de dimère. Nous devons tout d'abord vérifier si le complexe récepteur du TIMP-1 existe sous forme de monomère ou de dimère. Si le complexe récepteur n'est pas sous-forme de dimère, une autre kinase pourrait alors intervenir dans l'activation de JAK2.

Parmi les tyrosines kinases responsables de la transmission du signal, les Src kinases jouent un rôle important dans l'activation des récepteurs hématopoïétiques [Rane et Reddy, 2002]. Dans ce travail de thèse, nous avons mis en évidence l'implication de la Src kinase Lyn dans l'effet anti-apoptotique du TIMP-1. Nous avons montré que le TIMP-1 induit l'activation de Lyn en amont de la PI 3-kinase et que Lyn est associée de manière constitutive à JAK2 et à CD44. Pour mettre en évidence la dualité de ces protéines, nous envisageons d'étudier l'effet du PP1 sur la phosphorylation de JAK2 induite par le TIMP-1 et l'effet de l'AG490, un inhibiteur de JAK2, sur l'activation de Lyn.

Chin et coll. ont rapporté que dans la signalisation de l'Epo, Lyn est associée au R-Epo dans les cellules hématopoïétiques dépendantes de l'Epo [Chin et coll., 1998]. Des expériences de coexpression dans les cellules COS7 ont montré que Lyn induit la phosphorylation sur tyrosine du R-Epo et que Lyn s'associe au domaine cytoplasmique du R-Epo. Le domaine SH2 de Lyn se fixe spécifiquement au R-Epo phosphorylé tandis que le domaine tyrosine kinase de Lyn se fixe au R-Epo non phosphorylé. D'autres études ont montré que le domaine SH2 de Lyn peut se fixer à JAK2 phosphorylée sur tyrosine. Récemment, une nouvelle étude a mis en évidence le rôle crucial des kinases JAK et Src qui agissent ensemble pour optimiser la transduction du signal [Ingley et coll., 2006]. Néanmoins, le mécanisme d'activation de Lyn reste à élucider dans la voie de signalisation anti-apoptotique induite par le TIMP-1.

Le TIMP-1 est une protéine présente dans le microenvironnement hématopoïétique et sécrétée par les cellules du stroma et les progéniteurs hématopoïétiques. Depuis des années, le TIMP-1 apparaît comme un acteur de l'hématopoïèse dans des conditions physiologiques et physiopathologiques. Le TIMP-1, de par ses activités mitogénique et/ou anti-apoptotique dans certaines lignées hématopoïétiques, pourrait être aujourd'hui étudié comme un facteur pronostique dans différentes hémopathies. Dans notre équipe, nous nous intéressons au rôle du TIMP-1 endogène dans le développement hématopoïétique de cellules normales et érythroleucémiques (Travaux réalisés par Elise Lambert et Clémence Restino). Nous avons montré que les cellules érythroleucémiques UT-7 sécrètent six fois plus de TIMP-1 que les cellules normales CD34+ isolées à partir de sang de cordon ombilical en cours de maturation : à J7+7, les cellules issues des progéniteurs CD34+ sécrètent 33 ± 8 ng de TIMP-1/10⁶ cellules alors que les UT-7 sécrètent 188 ± 21 ng de TIMP-1/10⁶ cellules. L'extinction de l'expression du TIMP-1 par la technique d'interférence ARN induit une diminution de la survie et une inhibition de la prolifération des cellules UT-7. Cependant, l'extinction de

l'expression du TIMP-1 ne semble avoir aucune conséquence sur la prolifération et la différenciation des cellules CD34+ engagées dans la lignée érythroïde. Ces résultats montrent qu'en favorisant préférentiellement la survie et la prolifération des cellules cancéreuses érythroïdes, le TIMP-1 pourrait être considéré comme une cible thérapeutique dans le traitement de l'érythroleucémie.

Il apparaît évident depuis plusieurs années que les TIMPs et les MMPs jouent un rôle dans le microenvironnement hématopoïétique. Une perturbation des mécanismes régulant le microenvironnement de la moelle osseuse entraîne des maladies hématologiques et des changements de la balance MMP/TIMP peuvent conduire à des anomalies de l'hématopoïèse. Par exemple, le niveau d'expression de la MMP-9 joue un rôle dans certains types de leucémies [Lin et coll., 2002]. Lors d'une étude préliminaire, nous avons étudié l'expression des protéines CD44 et pro-MMP-9 dans les cellules issues des progéniteurs normaux CD34+ isolés à partir de sang de cordon ombilical humain. Nous avons montré que l'expression de la pro-MMP-9 diminue au cours de la différenciation cellulaire tandis que l'expression de CD44 diminue de J7+1 à J7+6 pour atteindre son niveau basal à J7+7. Nous avons également remarqué qu'à J7+7, CD44 et la pro-MMP-9 sont toutes les deux colocalisées à la membrane plasmique. Nous envisageons d'approfondir ces résultats en étudiant les variations de l'expression et de la localisation cellulaire de CD44 et de la pro-MMP-9 en fonction du stade de différenciation de progéniteurs normaux. Ceci nous permettra d'étudier leur éventuelle influence dans différents types de cellules leucémiques.

La caractérisation des récepteurs de TIMPs fait à l'heure actuelle l'objet de nombreux travaux. Dans ce travail de thèse, nous avons montré que le TIMP-1 se fixe sur une pro-MMP-9 localisée à la membrane plasmique des cellules UT-7. Cette pro-MMP-9 est ancrée à la membrane grâce à la glycoprotéine transmembranaire CD44 qui joue un rôle crucial dans la signalisation anti-apoptotique du TIMP-1. Nous avons également montré que CD44 est associée de manière constitutive à la tyrosine kinase JAK2. Cette interaction se fait entre la séquence QKKKLVING située dans la partie cytoplasmique de CD44 et le domaine FERM de JAK2. Enfin, nous avons mis en évidence l'implication de la Src kinase Lyn dans la voie de signalisation anti-apoptotique du TIMP-1. Le TIMP-1 induit l'activation de Lyn en amont de la voie PI 3-kinase / Akt. L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette thèse et les perspectives envisagées sont schématisés dans la figure 56.

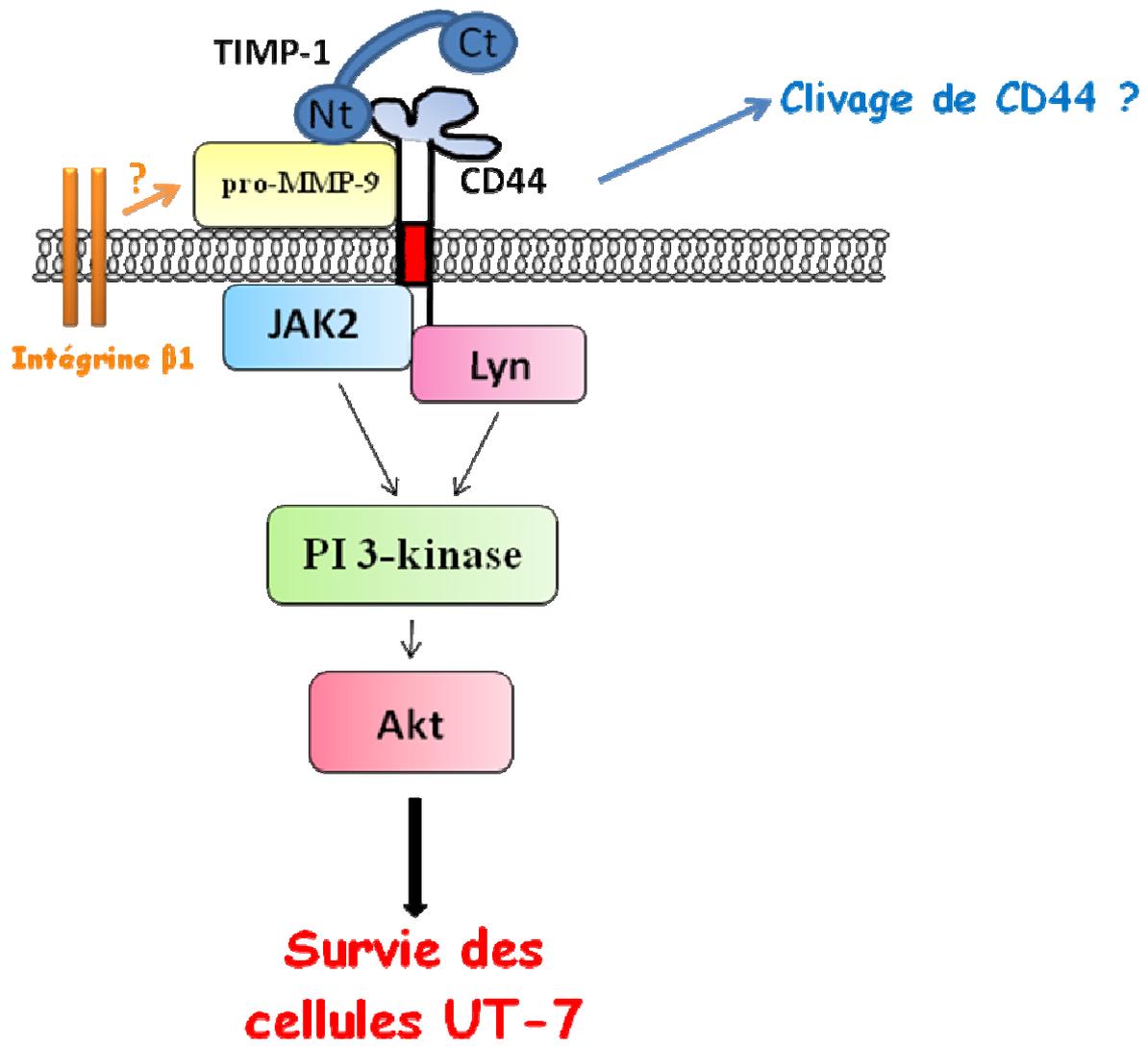


Figure 56: Schéma récapitulatif

**PUBLICATIONS ET
COMMUNICATIONS**

Publications

TIMP-1 binding to pro-MMP-9/CD44 complex localized at the cell surface promotes erythroid cell survival.

Lambert E*, **Bridoux L***, Devy J, Dassé E, Sowa ML, Duca L, Hornebeck W, Martiny L, Petitfrère-Charpentier E.

International Journal of Biochemistry and Cell Biology. 2009, 41(5):1102-15. (* co-auteurs à la première place)

Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 promotes hematopoietic differentiation via caspase-3 upstream the MEKK1/MEK6/p38alpha pathway.

Dassé E, **Bridoux L**, Baranek T, Lambert E, Salesse S, Sowa ML, Martiny L, Trentesaux C, Petitfrère E.

Leukemia. 2007, 21(4):595-603.

Communications orales

L. Bridoux, E. Lambert, J. Devy, M-L Sowa, L. Martiny et E. Petitfrère-Charpentier.

Rôle des kinases JAK2 et Lyn dans la signalisation anti-apoptotique du TIMP-1 via la glycoprotéine CD44.

Société de Biologie de Reims (SBR) - 22 octobre 2008 – Reims.

L. Bridoux, E. Lambert, J. Devy, M-L Sowa, L. Martiny et E. Petitfrère-Charpentier.

Rôle de CD44 dans la signalisation intracellulaire induite par le TIMP-1 et conduisant à la survie des cellules érythroleucémiques UT-7.

Société de Biologie de Reims (SBR) - 24 octobre 2007 – Reims.

E. Dassé, **L. Bridoux**, E. Lambert, M-L Sowa, T. Baranek, S. Salesse, L. Martiny, C. Trentesaux et E. Petitfrère.

Rôle de la caspase-3 dans la différenciation hématopoïétique induite par le TIMP-1.

Journée des Jeunes Chercheurs de l'IFR 53 – 13 juin 2006 - Reims.

Communications par affiche

L. Bridoux, E. Lambert, J. Devy, M-L Sowa, L. Martiny et E. Petitfrère-Charpentier.

CD44 is involved in TIMP-1-induced signalling pathway leading to UT-7 cell survival.

33rd FEBS Congress & 11th IUBMB Conference – 29 juin- 3 juillet 2008 – Athènes (Grèce).

L. Bridoux, E. Lambert, J. Devy, M-L Sowa, L. Martiny et E. Petitfrère-Charpentier.

CD44 is involved in TIMP-1-induced signalling pathway leading to UT-7 cell survival.

8th FEBS-IUBMB Young Scientists Forum – 26-28 juin 2008 – Loutraki (Grèce).

L. Bridoux, E. Lambert, J. Devy, M-L Sowa, L. Martiny et E. Petitfrère.

Implication de CD44 dans la survie des cellules érythroleucémiques humaines UT-7 induite par le TIMP-1.

Journée des Jeunes Chercheurs de l'IFR 53 – 14 juin 2007 – Reims.

L. Bridoux, E. Lambert, E. Dassé, M-L Sowa, L. Martiny et E. Petitfrère.

Rôle de la Src kinase Lyn dans l'effet anti-apoptotique du TIMP-1 dans les cellules érythroleucémiques humaines UT-7.

Journée des Jeunes Chercheurs de l'IFR 53 – 13 juin 2006 – Reims.

E. Dassé, **L. Bridoux**, M-L Sowa, L. Martiny, C. Trentesaux et E. Petitfrère.

Implication de la caspase-3 dans la voie de signalisation induite par le TIMP-1 et conduisant à la différenciation érythroïde.

15th Meeting European Association Red Cell Research – 21-25 avril 2005 – Murten (Suisse).

RÉFÉRENCES

- Aaronson DS, Horvath CM. A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science* 296 (5573): 1653-5, 2002.
- Ahonen M, Poukkula M, Baker AH, Kashiwagi M, Nagase H, Eriksson JE, Kahari VM. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 induces apoptosis in melanoma cells by stabilization of death receptors. *Oncogene* 22 (14): 2121-34, 2003.
- Aicher WK, Alexander D, Haas C, Kuchen S, Pagenstecher A, Gay S, Peter HH, Eibel H. Transcription factor early growth response 1 activity up-regulates expression of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in human synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 48 (2): 348-59, 2003.
- Airola K, Karonen T, Vaalamo M, Lehti K, Lohi J, Kariniemi AL, Keski-Oja J, Saarialho-Kere UK. Expression of collagenases-1 and -3 and their inhibitors TIMP-1 and -3 correlates with the level of invasion in malignant melanomas. *Br J Cancer* 80 (5-6): 733-43, 1999.
- Alnemri ES. Hidden powers of the mitochondria. *Nat Cell Biol* 1 (2): E40-2, 1999.
- Amour A, Knight CG, Webster A, Slocombe PM, Stephens PE, Knauper V, Docherty AJ, Murphy G. The in vitro activity of ADAM-10 is inhibited by TIMP-1 and TIMP-3. *FEBS Lett* 473 (3): 275-9, 2000.
- Andrews S, Stephens LR, Hawkins PT. PI3K class IB pathway. *Sci STKE* 2007 (407): cm2, 2007.
- Annabi B, Shedid D, Ghosn P, Kenigsberg RL, Desrosiers RR, Bojanowski MW, Beaulieu E, Nassif E, Moundjian R, Beliveau R. Differential regulation of matrix metalloproteinase activities in abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 35 (3): 539-46, 2002.
- Apte SS, Olsen BR, Murphy G. The gene structure of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-3 and its inhibitory activities define the distinct TIMP gene family. *J Biol Chem* 270 (24): 14313-8, 1995.
- Argentsinger LS, Campbell GS, Yang X, Witthuhn BA, Silvennoinen O, Ihle JN, Carter-Su C. Identification of JAK2 as a growth hormone receptor-associated tyrosine kinase. *Cell* 74 (2): 237-44, 1993.
- Arron JR, Vologodskaja M, Wong BR, Naramura M, Kim N, Gu H, Choi Y. A positive regulatory role for Cbl family proteins in tumor necrosis factor-related activation-induced cytokine (trance) and CD40L-mediated Akt activation. *J Biol Chem* 276 (32): 30011-7, 2001.
- Avalos BR, Kaufman SE, Tomonaga M, Williams RE, Golde DW, Gasson JC. K562 cells produce and respond to human erythroid-potentiating activity. *Blood* 71 (6): 1720-5, 1988.
- Bachmeier BE, Vene R, Iancu CM, Pfeffer U, Mayer B, Noonan D, Albin A, Jochum M, Nerlich AG. Transcriptional control of cell density dependent regulation of matrix

- metalloproteinase and TIMP expression in breast cancer cell lines. *Thromb Haemost* 93 (4): 761-9, 2005.
- Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci* 115 (Pt 19): 3719-27, 2002.
- Baker AH, George SJ, Zaltsman AB, Murphy G, Newby AC. Inhibition of invasion and induction of apoptotic cell death of cancer cell lines by overexpression of TIMP-3. *Br J Cancer* 79 (9-10): 1347-55, 1999.
- Baker AH, Zaltsman AB, George SJ, Newby AC. Divergent effects of tissue inhibitor of metalloproteinase-1, -2, or -3 overexpression on rat vascular smooth muscle cell invasion, proliferation, and death in vitro. TIMP-3 promotes apoptosis. *J Clin Invest* 101 (6): 1478-87, 1998.
- Bates RC, Edwards NS, Burns GF, Fisher DE. A CD44 survival pathway triggers chemoresistance via lyn kinase and phosphoinositide 3-kinase/Akt in colon carcinoma cells. *Cancer Res* 61 (13): 5275-83, 2001.
- Bello L, Lucini V, Carrabba G, Giussani C, Machluf M, Pluderi M, Nikas D, Zhang J, Tomei G, Villani RM, Carroll RS, Bikfalvi A, Black PM. Simultaneous inhibition of glioma angiogenesis, cell proliferation, and invasion by a naturally occurring fragment of human metalloproteinase-2. *Cancer Res* 61 (24): 8730-6, 2001.
- Berditchevski F, Odintsova E. Characterization of integrin-tetraspanin adhesion complexes: role of tetraspanins in integrin signaling. *J Cell Biol* 146 (2): 477-92, 1999.
- Bertaux B, Hornebeck W, Eisen AZ, Dubertret L. Growth stimulation of human keratinocytes by tissue inhibitor of metalloproteinases. *J Invest Dermatol* 97 (4): 679-85, 1991.
- Bian J, Wang Y, Smith MR, Kim H, Jacobs C, Jackman J, Kung HF, Colburn NH, Sun Y. Suppression of in vivo tumor growth and induction of suspension cell death by tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-3. *Carcinogenesis* 17 (9): 1805-11, 1996.
- Bicknell GR, Cohen GM. Cleavage of DNA to large kilobase pair fragments occurs in some forms of necrosis as well as apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 207 (1): 40-7, 1995.
- Bigg HF, Shi YE, Liu YE, Steffensen B, Overall CM. Specific, high affinity binding of tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (TIMP-4) to the COOH-terminal hemopexin-like domain of human gelatinase A. TIMP-4 binds progelatinase A and the COOH-terminal domain in a similar manner to TIMP-2. *J Biol Chem* 272 (24): 15496-500, 1997.
- Biggs WH, 3rd, Meisenhelder J, Hunter T, Cavenee WK, Arden KC. Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (13): 7421-6, 1999.
- Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 4 (2): 197-250, 1993.

- Bloomston M, Shafii A, Zervos EE, Rosemurgy AS. TIMP-1 overexpression in pancreatic cancer attenuates tumor growth, decreases implantation and metastasis, and inhibits angiogenesis. *J Surg Res* 102 (1): 39-44, 2002.
- Bord S, Horner A, Beeton CA, Hembry RM, Compston JE. Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) distribution in normal and pathological human bone. *Bone* 24 (3): 229-35, 1999.
- Botelho FM, Edwards DR, Richards CD. Oncostatin M stimulates c-Fos to bind a transcriptionally responsive AP-1 element within the tissue inhibitor of metalloproteinase-1 promoter. *J Biol Chem* 273 (9): 5211-8, 1998.
- Boujrad N, Ogwuegbu SO, Garnier M, Lee CH, Martin BM, Papadopoulos V. Identification of a stimulator of steroid hormone synthesis isolated from testis. *Science* 268 (5217): 1609-12, 1995.
- Bourguignon LY, Gunja-Smith Z, Iida N, Zhu HB, Young LJ, Muller WJ, Cardiff RD. 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* 176 (1): 206-15, 1998.
- Bourguignon LY, Lokeshwar VB, Chen X, Kerrick WG. Hyaluronic acid-induced lymphocyte signal transduction and HA receptor (GP85/CD44)-cytoskeleton interaction. *J Immunol* 151 (12): 6634-44, 1993.
- Bouscary D, Pene F, Claessens YE, Muller O, Chretien S, Fontenay-Roupie M, Gisselbrecht S, Mayeux P, Lacombe C. Critical role for PI 3-kinase in the control of erythropoietin-induced erythroid progenitor proliferation. *Blood* 101 (9): 3436-43, 2003.
- Brazil DP, Hemmings BA. Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends Biochem Sci* 26 (11): 657-64, 2001.
- Bretscher A, Edwards K, Fehon RG. ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3 (8): 586-99, 2002.
- Brooks PC, Stromblad S, Sanders LC, von Schalscha TL, Aimes RT, Stetler-Stevenson WG, Quigley JP, Cheresch DA. Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell* 85 (5): 683-93, 1996.
- Brown JC, Timpl R. The collagen superfamily. *Int Arch Allergy Immunol* 107 (4): 484-90, 1995.
- Brown MT, Cooper JA. Regulation, substrates and functions of src. *Biochim Biophys Acta* 1287 (2-3): 121-49, 1996.
- Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96 (6): 857-68, 1999.

- Butler GS, Apte SS, Willenbrock F, Murphy G. Human tissue inhibitor of metalloproteinases 3 interacts with both the N- and C-terminal domains of gelatinases A and B. Regulation by polyanions. *J Biol Chem* 274 (16): 10846-51, 1999.
- Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282 (5392): 1318-21, 1998.
- Caterina NC, Windsor LJ, Bodden MK, Yermovsky AE, Taylor KB, Birkedal-Hansen H, Engler JA. Glycosylation and NH₂-terminal domain mutants of the tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1). *Biochim Biophys Acta* 1388 (1): 21-34, 1998.
- Caterina NC, Windsor LJ, Yermovsky AE, Bodden MK, Taylor KB, Birkedal-Hansen H, Engler JA. Replacement of conserved cysteines in human tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *J Biol Chem* 272 (51): 32141-9, 1997.
- Cawston TE, Noble DN, Murphy G, Smith AJ, Woodley C, Hazleman B. Rapid purification of tissue inhibitor of metalloproteinases from human plasma and identification as a gamma-serum protein. *Biochem J* 238 (3): 677-82, 1986.
- Celiker MY, Wang M, Atsidaftos E, Liu X, Liu YE, Jiang Y, Valderrama E, Goldberg ID, Shi YE. Inhibition of Wilms' tumor growth by intramuscular administration of tissue inhibitor of metalloproteinases-4 plasmid DNA. *Oncogene* 20 (32): 4337-43, 2001.
- Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A, Chakraborti T. Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem* 253 (1-2): 269-85, 2003.
- Charrad RS, Gadhoum Z, Qi J, Glachant A, Allouche M, Jasmin C, Chomienne C, Smadja-Joffe F. Effects of anti-CD44 monoclonal antibodies on differentiation and apoptosis of human myeloid leukemia cell lines. *Blood* 99 (1): 290-9, 2002.
- Chesler L, Golde DW, Bersch N, Johnson MD. Metalloproteinase inhibition and erythroid potentiation are independent activities of tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *Blood* 86 (12): 4506-15, 1995.
- Chetty C, Lakka SS, Bhoopathi P, Kunigal S, Geiss R, Rao JS. Tissue inhibitor of metalloproteinase 3 suppresses tumor angiogenesis in matrix metalloproteinase 2-down-regulated lung cancer. *Cancer Res* 68 (12): 4736-45, 2008.
- Chin H, Arai A, Wakao H, Kamiyama R, Miyasaka N, Miura O. Lyn physically associates with the erythropoietin receptor and may play a role in activation of the Stat5 pathway. *Blood* 91 (10): 3734-45, 1998.
- Chirco R, Liu XW, Jung KK, Kim HR. Novel functions of TIMPs in cell signaling. *Cancer Metastasis Rev* 25 (1): 99-113, 2006.
- Cho EY, Choi Y, Chae SW, Sohn JH, Ahn GH. Immunohistochemical study of the expression of adhesion molecules in ovarian serous neoplasms. *Pathol Int* 56 (2): 62-70, 2006.
- Clark BR, Keating A. Biology of bone marrow stroma. *Ann N Y Acad Sci* 770: 70-8, 1995.

- Clark IM, Swingler TE, Sampieri CL, Edwards DR. The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Int J Biochem Cell Biol* 40 (6-7): 1362-78, 2008.
- Corcoran ML, Stetler-Stevenson WG. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 stimulates fibroblast proliferation via a cAMP-dependent mechanism. *J Biol Chem* 270 (22): 13453-9, 1995.
- Corey SJ, Anderson SM. Src-related protein tyrosine kinases in hematopoiesis. *Blood* 93 (1): 1-14, 1999.
- Damen JE, Cutler RL, Jiao H, Yi T, Krystal G. Phosphorylation of tyrosine 503 in the erythropoietin receptor (EpR) is essential for binding the P85 subunit of phosphatidylinositol (PI) 3-kinase and for EpR-associated PI 3-kinase activity. *J Biol Chem* 270 (40): 23402-8, 1995.
- Damen JE, Mui AL, Puil L, Pawson T, Krystal G. Phosphatidylinositol 3-kinase associates, via its Src homology 2 domains, with the activated erythropoietin receptor. *Blood* 81 (12): 3204-10, 1993.
- Dasse E, Bridoux L, Baranek T, Lambert E, Salesse S, Sowa ML, Martiny L, Trentesaux C, Petitfrere E. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 promotes hematopoietic differentiation via caspase-3 upstream the MEKK1/MEK6/p38alpha pathway. *Leukemia* 21 (4): 595-603, 2007.
- Dean G, Young DA, Edwards DR, Clark IM. The human tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1 gene contains repressive elements within the promoter and intron 1. *J Biol Chem* 275 (42): 32664-71, 2000.
- Docherty AJ, Lyons A, Smith BJ, Wright EM, Stephens PE, Harris TJ, Murphy G, Reynolds JJ. Sequence of human tissue inhibitor of metalloproteinases and its identity to erythroid-potentiating activity. *Nature* 318 (6041): 66-9, 1985.
- Dong Z, Saikumar P, Weinberg JM, Venkatachalam MA. Internucleosomal DNA cleavage triggered by plasma membrane damage during necrotic cell death. Involvement of serine but not cysteine proteases. *Am J Pathol* 151 (5): 1205-13, 1997.
- Douglas DA, Shi YE, Sang QA. Computational sequence analysis of the tissue inhibitor of metalloproteinase family. *J Protein Chem* 16 (4): 237-55, 1997.
- Downward J. How BAD phosphorylation is good for survival. *Nat Cell Biol* 1 (2): E33-5, 1999.
- Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2 (3): 161-74, 2002.
- Espert L, Dusanter-Fourt I, Chelbi-Alix MK. [Negative regulation of the JAK/STAT: pathway implication in tumorigenesis]. *Bull Cancer* 92 (10): 845-57, 2005.

- Fata JE, Leco KJ, Voura EB, Yu HY, Waterhouse P, Murphy G, Moorehead RA, Khokha R. Accelerated apoptosis in the Timp-3-deficient mammary gland. *J Clin Invest* 108 (6): 831-41, 2001.
- Fernandez CA, Moses MA. Modulation of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase-4. *Biochem Biophys Res Commun* 345 (1): 523-9, 2006.
- Ferrans VJ. New insights into the world of matrix metalloproteinases. *Circulation* 105 (4): 405-7, 2002.
- Frame MC. Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour. *Biochim Biophys Acta* 1602 (2): 114-30, 2002.
- Frank DA, Robertson MJ, Bonni A, Ritz J, Greenberg ME. Interleukin 2 signaling involves the phosphorylation of Stat proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (17): 7779-83, 1995.
- Fruman DA. The role of class I phosphoinositide 3-kinase in T-cell function and autoimmunity. *Biochem Soc Trans* 35 (Pt 2): 177-80, 2007.
- Fujimoto N, Tokai H, Iwata K, Okada Y, Hayakawa T. Determination of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) in experimental animals using monoclonal antibodies against TIMP-2-specific oligopeptides. *J Immunol Methods* 187 (1): 33-9, 1995.
- Gasson JC, Golde DW, Kaufman SE, Westbrook CA, Hewick RM, Kaufman RJ, Wong GG, Temple PA, Leary AC, Brown EL, et al. Molecular characterization and expression of the gene encoding human erythroid-potentiating activity. *Nature* 315 (6022): 768-71, 1985.
- Gauwerky CE, Lusic AJ, Golde DW. Erythroid-potentiating activity: characterization and target cells. *Exp Hematol* 8 Suppl 8: 117-27, 1980.
- Ghaffari S, Dougherty GJ, Lansdorp PM, Eaves AC, Eaves CJ. Differentiation-associated changes in CD44 isoform expression during normal hematopoiesis and their alteration in chronic myeloid leukemia. *Blood* 86 (8): 2976-85, 1995.
- Giordanetto F, Kroemer RT. Prediction of the structure of human Janus kinase 2 (JAK2) comprising JAK homology domains 1 through 7. *Protein Eng* 15 (9): 727-37, 2002.
- Girault JA, Labesse G, Mornon JP, Callebaut I. Janus kinases and focal adhesion kinases play in the 4.1 band: a superfamily of band 4.1 domains important for cell structure and signal transduction. *Mol Med* 4 (12): 751-69, 1998.
- Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 74 (2): 111-22, 1997.
- Gomis-Ruth FX, Maskos K, Betz M, Bergner A, Huber R, Suzuki K, Yoshida N, Nagase H, Brew K, Bourenkov GP, Bartunik H, Bode W. Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. *Nature* 389 (6646): 77-81, 1997.

- Goodison S, Urquidi V, Tarin D. CD44 cell adhesion molecules. *Mol Pathol* 52 (4): 189-96, 1999.
- Gordon JA. Use of vanadate as protein-phosphotyrosine phosphatase inhibitor. *Methods Enzymol* 201: 477-82, 1991.
- Green SJ, Tarone G, Underhill CB. Distribution of hyaluronate and hyaluronate receptors in the adult lung. *J Cell Sci* 90 (Pt 1): 145-56, 1988.
- Guedez L, Courtemanch L, Stetler-Stevenson M. Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 induces differentiation and an antiapoptotic phenotype in germinal center B cells. *Blood* 92 (4): 1342-9, 1998.
- Guedez L, McMarlin AJ, Kingma DW, Bennett TA, Stetler-Stevenson M, Stetler-Stevenson WG. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 alters the tumorigenicity of Burkitt's lymphoma via divergent effects on tumor growth and angiogenesis. *Am J Pathol* 158 (4): 1207-15, 2001.
- Guo S, Rena G, Cichy S, He X, Cohen P, Unterman T. Phosphorylation of serine 256 by protein kinase B disrupts transactivation by FKHR and mediates effects of insulin on insulin-like growth factor-binding protein-1 promoter activity through a conserved insulin response sequence. *J Biol Chem* 274 (24): 17184-92, 1999.
- Guo YH, Gao W, Li Q, Li PF, Yao PY, Chen K. Tissue inhibitor of metalloproteinases-4 suppresses vascular smooth muscle cell migration and induces cell apoptosis. *Life Sci* 75 (20): 2483-93, 2004.
- Hamada K, Shimizu T, Matsui T, Tsukita S, Hakoshima T. Structural basis of the membrane-targeting and unmasking mechanisms of the radixin FERM domain. *EMBO J* 19 (17): 4449-62, 2000.
- Hayakawa T. Multiple functions of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): a new aspect involving osteoclastic bone resorption. *J Bone Miner Metab* 20 (1): 1-13, 2002.
- Hayakawa T, Yamashita K, Kishi J, Harigaya K. Tissue inhibitor of metalloproteinases from human bone marrow stromal cell line KM 102 has erythroid-potentiating activity, suggesting its possibly bifunctional role in the hematopoietic microenvironment. *FEBS Lett* 268 (1): 125-8, 1990.
- Hayakawa T, Yamashita K, Ohuchi E, Shinagawa A. Cell growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2). *J Cell Sci* 107 (Pt 9): 2373-9, 1994.
- Hayakawa T, Yamashita K, Tanzawa K, Uchijima E, Iwata K. Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells. A possible new growth factor in serum. *FEBS Lett* 298 (1): 29-32, 1992.
- He TC, Zhuang H, Jiang N, Waterfield MD, Wojchowski DM. Association of the p85 regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase with an essential erythropoietin receptor subdomain. *Blood* 82 (12): 3530-8, 1993.

- Heiska L, Alfthan K, Gronholm M, Vilja P, Vaheri A, Carpen O. Association of ezrin with intercellular adhesion molecule-1 and -2 (ICAM-1 and ICAM-2). Regulation by phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *J Biol Chem* 273 (34): 21893-900, 1998.
- Henriet P, Blavier L, Declerck YA. Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) in invasion and proliferation. *APMIS* 107 (1): 111-9, 1999.
- Hernandez-Barrantes S, Shimura Y, Soloway PD, Sang QA, Fridman R. Differential roles of TIMP-4 and TIMP-2 in pro-MMP-2 activation by MT1-MMP. *Biochem Biophys Res Commun* 281 (1): 126-30, 2001.
- Hicks NJ, Ward RV, Reynolds JJ. A fibrosarcoma model derived from mouse embryo cells: growth properties and secretion of collagenase and metalloproteinase inhibitor (TIMP) by tumour cell lines. *Int J Cancer* 33 (6): 835-44, 1984.
- Hiles ID, Otsu M, Volinia S, Fry MJ, Gout I, Dhand R, Panayotou G, Ruiz-Larrea F, Thompson A, Totty NF, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase: structure and expression of the 110 kd catalytic subunit. *Cell* 70 (3): 419-29, 1992.
- Howard EW, Banda MJ. Binding of tissue inhibitor of metalloproteinases 2 to two distinct sites on human 72-kDa gelatinase. Identification of a stabilization site. *J Biol Chem* 266 (27): 17972-7, 1991.
- Huang W, Suzuki K, Nagase H, Arumugam S, Van Doren SR, Brew K. Folding and characterization of the amino-terminal domain of human tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) expressed at high yield in *E. coli*. *FEBS Lett* 384 (2): 155-61, 1996.
- Ihle JN, Stravapodis D, Parganas E, Thierfelder W, Feng J, Wang D, Teglund S. The roles of Jaks and Stats in cytokine signaling. *Cancer J Sci Am* 4 Suppl 1: S84-91, 1998.
- Ingle E, Klinken SP. Cross-regulation of JAK and Src kinases. *Growth Factors* 24 (1): 89-95, 2006.
- Jiang Y, Muschel RJ. Regulation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) by translational efficiency in murine prostate carcinoma cells. *Cancer Res* 62 (6): 1910-4, 2002.
- Jung KK, Liu XW, Chirco R, Fridman R, Kim HR. Identification of CD63 as a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 interacting cell surface protein. *EMBO J* 25 (17): 3934-42, 2006.
- Kadri Z, Maouche-Chretien L, Rooke HM, Orkin SH, Romeo PH, Mayeux P, Leboulch P, Chretien S. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt induced by erythropoietin renders the erythroid differentiation factor GATA-1 competent for TIMP-1 gene transactivation. *Mol Cell Biol* 25 (17): 7412-22, 2005.
- Kadri Z, Petitfrere E, Boudot C, Freyssinier JM, Fichelson S, Mayeux P, Emonard H, Hornebeck W, Haye B, Billat C. Erythropoietin induction of tissue inhibitors of metalloproteinase-1 expression and secretion is mediated by mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways. *Cell Growth Differ* 11 (11): 573-80, 2000.

- Kane LP, Shapiro VS, Stokoe D, Weiss A. Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase. *Curr Biol* 9 (11): 601-4, 1999.
- Kang JA, Kim JT, Song HS, Bae MK, Yi EY, Kim KW, Kim YJ. Anti-angiogenic and anti-tumor invasive activities of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 from shark, *Scyliorhinus torazame*. *Biochim Biophys Acta* 1620 (1-3): 59-64, 2003.
- Kang KH, Park SY, Rho SB, Lee JH. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 interacts with angiotensin II type 2 receptor and additively inhibits angiogenesis. *Cardiovasc Res* 79 (1): 150-60, 2008.
- Kansas GS, Muirhead MJ, Dailey MO. Expression of the CD11/CD18, leukocyte adhesion molecule 1, and CD44 adhesion molecules during normal myeloid and erythroid differentiation in humans. *Blood* 76 (12): 2483-92, 1990.
- Kapeller R, Prasad KV, Janssen O, Hou W, Schaffhausen BS, Rudd CE, Cantley LC. Identification of two SH3-binding motifs in the regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 269 (3): 1927-33, 1994.
- Kawano Y, Okamoto I, Murakami D, Itoh H, Yoshida M, Ueda S, Saya H. Ras oncoprotein induces CD44 cleavage through phosphoinositide 3-OH kinase and the rho family of small G proteins. *J Biol Chem* 275 (38): 29628-35, 2000.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26 (4): 239-57, 1972.
- Kerrigan JJ, Mansell JP, Sandy JR. Matrix turnover. *J Orthod* 27 (3): 227-33, 2000.
- Khwaja A. The role of Janus kinases in haemopoiesis and haematological malignancy. *Br J Haematol* 134 (4): 366-84, 2006.
- Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275 (5303): 1132-6, 1997.
- Koch CA, Anderson D, Moran MF, Ellis C, Pawson T. SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science* 252 (5006): 668-74, 1991.
- Kodama S, Yamashita K, Kishi J, Iwata K, Hayakawa T. A sandwich enzyme immunoassay for collagenase inhibitor using monoclonal antibodies. *Matrix* 9 (1): 1-6, 1989.
- Komatsu N, Nakauchi H, Miwa A, Ishihara T, Eguchi M, Moroi M, Okada M, Sato Y, Wada H, Yawata Y, et al. Establishment and characterization of a human leukemic cell line with megakaryocytic features: dependency on granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin 3, or erythropoietin for growth and survival. *Cancer Res* 51 (1): 341-8, 1991.

- Kops GJ, Burgering BM. Forkhead transcription factors: new insights into protein kinase B (c-akt) signaling. *J Mol Med* 77 (9): 656-65, 1999.
- Korem S, Kraiem Z, Shiloni E, Yehezkel O, Sadeh O, Resnick MB. Increased expression of matrix metalloproteinase-2: a diagnostic marker but not prognostic marker of papillary thyroid carcinoma. *Isr Med Assoc J* 4 (4): 247-51, 2002.
- Kubota Y, Tanaka T, Kitanaka A, Ohnishi H, Okutani Y, Waki M, Ishida T, Kamano H. Src transduces erythropoietin-induced differentiation signals through phosphatidylinositol 3-kinase. *EMBO J* 20 (20): 5666-77, 2001.
- Lambert E, Boudot C, Kadri Z, Soula-Rothhut M, Sowa ML, Mayeux P, Hornebeck W, Haye B, Petitfrere E. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 signalling pathway leading to erythroid cell survival. *Biochem J* 372 (Pt 3): 767-74, 2003.
- Lambert E, Bridoux L, Devy J, Dasse E, Sowa ML, Duca L, Hornebeck W, Martiny L, Petitfrere-Charpentier E. TIMP-1 binding to proMMP-9/CD44 complex localized at the cell surface promotes erythroid cell survival. *Int J Biochem Cell Biol* 41 (5): 1102-1115, 2009.
- Lambert E, Dasse E, Haye B, Petitfrere E. TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol* 49 (3): 187-98, 2004.
- Larsen MB, Stephens RW, Brunner N, Nielsen HJ, Engelholm LH, Christensen IJ, Stetler-Stevenson WG, Hoyer-Hansen G. Quantification of tissue inhibitor of metalloproteinases 2 in plasma from healthy donors and cancer patients. *Scand J Immunol* 61 (5): 449-60, 2005.
- Lebrun JJ, Ali S, Ullrich A, Kelly PA. Proline-rich sequence-mediated Jak2 association to the prolactin receptor is required but not sufficient for signal transduction. *J Biol Chem* 270 (18): 10664-70, 1995.
- Lecoq-Lafon C, Verdier F, Fichelson S, Chretien S, Gisselbrecht S, Lacombe C, Mayeux P. Erythropoietin induces the tyrosine phosphorylation of GAB1 and its association with SHC, SHP2, SHIP, and phosphatidylinositol 3-kinase. *Blood* 93 (8): 2578-85, 1999.
- Lee SJ, Yoo HJ, Bae YS, Kim HJ, Lee ST. TIMP-1 inhibits apoptosis in breast carcinoma cells via a pathway involving pertussis toxin-sensitive G protein and c-Src. *Biochem Biophys Res Commun* 312 (4): 1196-201, 2003.
- Legras S, Gunthert U, Stauder R, Curt F, Oliferenko S, Kluijn-Nelemans HC, Marie JP, Proctor S, Jasmin C, Smadja-Joffe F. A strong expression of CD44-6v correlates with shorter survival of patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 91 (9): 3401-13, 1998.
- Lein M, Nowak L, Jung K, Laube C, Ulbricht N, Schnorr D, Loening SA. Metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix-metalloproteinases in plasma of patients with prostate cancer and in prostate cancer tissue. *Ann N Y Acad Sci* 878: 544-6, 1999.
- Lesley J, Hyman R, Kincade PW. CD44 and its interaction with extracellular matrix. *Adv Immunol* 54: 271-335, 1993.

- Lewinsohn DM, Nagler A, Ginzton N, Greenberg P, Butcher EC. Hematopoietic progenitor cell expression of the H-CAM (CD44) homing-associated adhesion molecule. *Blood* 75 (3): 589-95, 1990.
- Li G, Fridman R, Kim HR. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 inhibits apoptosis of human breast epithelial cells. *Cancer Res* 59 (24): 6267-75, 1999.
- Li L, Zhang S, Lin H, Lin JY. [Relationship of expression unbalance of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase to invasiveness and metastasis in gastric carcinomas]. *Ai Zheng* 21 (3): 305-10, 2002.
- Lim MS, Guedez L, Stetler-Stevenson WG, Stetler-Stevenson M. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 induces apoptosis in human T lymphocytes. *Ann N Y Acad Sci* 878: 522-3, 1999.
- Lin LI, Lin DT, Chang CJ, Lee CY, Tang JL, Tien HF. Marrow matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMP in acute leukaemia: potential role of MMP-9 as a surrogate marker to monitor leukaemic status in patients with acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol* 117 (4): 835-41, 2002.
- Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cancer Res* 51 (18 Suppl): 5054s-5059s, 1991.
- Liu J, Jiang G. CD44 and hematologic malignancies. *Cell Mol Immunol* 3 (5): 359-65, 2006.
- Liu XW, Taube ME, Jung KK, Dong Z, Lee YJ, Roshy S, Sloane BF, Fridman R, Kim HR. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 protects human breast epithelial cells from extrinsic cell death: a potential oncogenic activity of tissue inhibitor of metalloproteinase-1. *Cancer Res* 65 (3): 898-906, 2005.
- Logan SK, Garabedian MJ, Campbell CE, Werb Z. Synergistic transcriptional activation of the tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promoter via functional interaction of AP-1 and Ets-1 transcription factors. *J Biol Chem* 271 (2): 774-82, 1996.
- Lokeshwar VB, Bourguignon LY. Post-translational protein modification and expression of ankyrin-binding site(s) in GP85 (Pgp-1/CD44) and its biosynthetic precursors during T-lymphoma membrane biosynthesis. *J Biol Chem* 266 (27): 17983-9, 1991.
- Lokeshwar VB, Iida N, Bourguignon LY. The cell adhesion molecule, GP116, is a new CD44 variant (ex14/v10) involved in hyaluronic acid binding and endothelial cell proliferation. *J Biol Chem* 271 (39): 23853-64, 1996.
- Luparello C, Avanzato G, Carella C, Pucci-Minafra I. Tissue inhibitor of metalloprotease (TIMP)-1 and proliferative behaviour of clonal breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 54 (3): 235-44, 1999.
- Mayeux P, Dusanter-Fourt I, Muller O, Mauduit P, Sabbah M, Druker B, Vainchenker W, Fischer S, Lacombe C, Gisselbrecht S. Erythropoietin induces the association of phosphatidylinositol 3'-kinase with a tyrosine-phosphorylated protein complex containing the erythropoietin receptor. *Eur J Biochem* 216 (3): 821-8, 1993.

- Metcalf D. Hematopoietic regulators: redundancy or subtlety? *Blood* 82 (12): 3515-23, 1993.
- Miura O, Nakamura N, Ihle JN, Aoki N. Erythropoietin-dependent association of phosphatidylinositol 3-kinase with tyrosine-phosphorylated erythropoietin receptor. *J Biol Chem* 269 (1): 614-20, 1994.
- Miyake H, Hara I, Gohji K, Yamanaka K, Hara S, Arakawa S, Nakajima M, Kamidono S. Relative expression of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in mouse renal cell carcinoma cells regulates their metastatic potential. *Clin Cancer Res* 5 (10): 2824-9, 1999.
- Miyake K, Underhill CB, Lesley J, Kincade PW. Hyaluronate can function as a cell adhesion molecule and CD44 participates in hyaluronate recognition. *J Exp Med* 172 (1): 69-75, 1990.
- Mori T, Kitano K, Terawaki S, Maesaki R, Fukami Y, Hakoshima T. Structural basis for CD44 recognition by ERM proteins. *J Biol Chem* 283 (43): 29602-12, 2008.
- Murate T, Yamashita K, Isogai C, Suzuki H, Ichihara M, Hatano S, Nakahara Y, Kinoshita T, Nagasaka T, Yoshida S, Komatsu N, Miura Y, Hotta T, Fujimoto N, Saito H, Hayakawa T. The production of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in megakaryopoiesis: possible role of platelet- and megakaryocyte-derived TIMPs in bone marrow fibrosis. *Br J Haematol* 99 (1): 181-9, 1997.
- Murate T, Yamashita K, Ohashi H, Kagami Y, Tsushita K, Kinoshita T, Hotta T, Saito H, Yoshida S, Mori KJ, et al. Erythroid potentiating activity of tissue inhibitor of metalloproteinases on the differentiation of erythropoietin-responsive mouse erythroleukemia cell line, ELM-I-1-3, is closely related to its cell growth potentiating activity. *Exp Hematol* 21 (1): 169-76, 1993.
- Murphy AN, Unsworth EJ, Stetler-Stevenson WG. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 inhibits bFGF-induced human microvascular endothelial cell proliferation. *J Cell Physiol* 157 (2): 351-8, 1993.
- Murphy FR, Issa R, Zhou X, Ratnarajah S, Nagase H, Arthur MJ, Benyon C, Iredale JP. Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition: implications for reversibility of liver fibrosis. *J Biol Chem* 277 (13): 11069-76, 2002.
- Murphy G. Matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Acta Orthop Scand Suppl* 266: 55-60, 1995.
- Murphy G, Houbrechts A, Cockett MI, Williamson RA, O'Shea M, Docherty AJ. The N-terminal domain of tissue inhibitor of metalloproteinases retains metalloproteinase inhibitory activity. *Biochemistry* 30 (33): 8097-102, 1991.
- Nagano O, Murakami D, Hartmann D, De Strooper B, Saftig P, Iwatsubo T, Nakajima M, Shinohara M, Saya H. Cell-matrix interaction via CD44 is independently regulated by different metalloproteinases activated in response to extracellular Ca(2+) influx and PKC activation. *J Cell Biol* 165 (6): 893-902, 2004.

- Nagano O, Saya H. Mechanism and biological significance of CD44 cleavage. *Cancer Sci* 95 (12): 930-5, 2004.
- Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 69 (3): 562-73, 2006.
- Nagase H, Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 274 (31): 21491-4, 1999.
- Nakamura H, Suenaga N, Taniwaki K, Matsuki H, Yonezawa K, Fujii M, Okada Y, Seiki M. Constitutive and induced CD44 shedding by ADAM-like proteases and membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Cancer Res* 64 (3): 876-82, 2004.
- Naor D, Nedvetzki S, Golan I, Melnik L, Faitelson Y. CD44 in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci* 39 (6): 527-79, 2002.
- Naor D, Sionov RV, Ish-Shalom D. CD44: structure, function, and association with the malignant process. *Adv Cancer Res* 71: 241-319, 1997.
- Nelson ME, Steensma DP. JAK2 V617F in myeloid disorders: what do we know now, and where are we headed? *Leuk Lymphoma* 47 (2): 177-94, 2006.
- Nollendorfs A, Greiner TC, Nagase H, Baxter BT. The expression and localization of membrane type-1 matrix metalloproteinase in human abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 34 (2): 316-22, 2001.
- Nuttall RK, Sampieri CL, Pennington CJ, Gill SE, Schultz GA, Edwards DR. Expression analysis of the entire MMP and TIMP gene families during mouse tissue development. *FEBS Lett* 563 (1-3): 129-34, 2004.
- O'Shea M, Willenbrock F, Williamson RA, Cockett MI, Freedman RB, Reynolds JJ, Docherty AJ, Murphy G. Site-directed mutations that alter the inhibitory activity of the tissue inhibitor of metalloproteinases-1: importance of the N-terminal region between cysteine 3 and cysteine 13. *Biochemistry* 31 (42): 10146-52, 1992.
- Oh J, Seo DW, Diaz T, Wei B, Ward Y, Ray JM, Morioka Y, Shi S, Kitayama H, Takahashi C, Noda M, Stetler-Stevenson WG. Tissue inhibitors of metalloproteinase 2 inhibits endothelial cell migration through increased expression of RECK. *Cancer Res* 64 (24): 9062-9, 2004.
- Okada M, Nakagawa H. A protein tyrosine kinase involved in regulation of pp60c-src function. *J Biol Chem* 264 (35): 20886-93, 1989.
- Okada Y, Takeuchi N, Gonoji Y, Nakanishi I, Nagase H, Hayakawa T. Simultaneous production of collagenase, matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) and tissue inhibitor of metalloproteinases by rheumatoid synovial lining cells. *Matrix Suppl* 1: 398-9, 1992.
- Okamoto I, Kawano Y, Matsumoto M, Suga M, Kaibuchi K, Ando M, Saya H. Regulated CD44 cleavage under the control of protein kinase C, calcium influx, and the Rho family of small G proteins. *J Biol Chem* 274 (36): 25525-34, 1999.

- Olson MW, Bernardo MM, Pietila M, Gervasi DC, Toth M, Kotra LP, Massova I, Mobashery S, Fridman R. Characterization of the monomeric and dimeric forms of latent and active matrix metalloproteinase-9. Differential rates for activation by stromelysin 1. *J Biol Chem* 275 (4): 2661-8, 2000.
- Olson MW, Toth M, Gervasi DC, Sado Y, Ninomiya Y, Fridman R. High affinity binding of latent matrix metalloproteinase-9 to the alpha2(IV) chain of collagen IV. *J Biol Chem* 273 (17): 10672-81, 1998.
- Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM, Donner DB. NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* 401 (6748): 82-5, 1999.
- Parganas E, Wang D, Stravopodis D, Topham DJ, Marine JC, Teglund S, Vanin EF, Bodner S, Colamonici OR, van Deursen JM, Grosveld G, Ihle JN. Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell* 93 (3): 385-95, 1998.
- Partridge CA, Phillips PG, Niedbala MJ, Jeffrey JJ. Localization and activation of type IV collagenase/gelatinase at endothelial focal contacts. *Am J Physiol* 272 (5 Pt 1): L813-22, 1997.
- Peck D, Isacke CM. CD44 phosphorylation regulates melanoma cell and fibroblast migration on, but not attachment to, a hyaluronan substratum. *Curr Biol* 6 (7): 884-90, 1996.
- Petitfrere E, Kadri Z, Boudot C, Sowa ML, Mayeux P, Haye B, Billat C. Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in tissue inhibitor of metalloproteinases-1-induced erythroid differentiation. *FEBS Lett* 485 (2-3): 117-21, 2000.
- Platzer E. Human hemopoietic growth factors. *Eur J Haematol* 42 (1): 1-15, 1989.
- Pleiman CM, Hertz WM, Cambier JC. Activation of phosphatidylinositol-3' kinase by Src-family kinase SH3 binding to the p85 subunit. *Science* 263 (5153): 1609-12, 1994.
- Ptasznik A, Nakata Y, Kalota A, Emerson SG, Gewirtz AM. Short interfering RNA (siRNA) targeting the Lyn kinase induces apoptosis in primary, and drug-resistant, BCR-ABL1(+) leukemia cells. *Nat Med* 10 (11): 1187-9, 2004.
- Qi JH, Ebrahim Q, Moore N, Murphy G, Claesson-Welsh L, Bond M, Baker A, Anand-Apte B. A novel function for tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3): inhibition of angiogenesis by blockage of VEGF binding to VEGF receptor-2. *Nat Med* 9 (4): 407-15, 2003.
- Rane SG, Reddy EP. JAKs, STATs and Src kinases in hematopoiesis. *Oncogene* 21 (21): 3334-58, 2002.
- Rapti M, Atkinson SJ, Lee MH, Trim A, Moss M, Murphy G. The isolated N-terminal domains of TIMP-1 and TIMP-3 are insufficient for ADAM10 inhibition. *Biochem J* 411 (2): 433-9, 2008.

- Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA. The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci* 117 (Pt 8): 1281-3, 2004.
- Redondo-Munoz J, Ugarte-Berzal E, Garcia-Marco JA, del Cerro MH, Van den Steen PE, Opdenakker G, Terol MJ, Garcia-Pardo A. Alpha4beta1 integrin and 190-kDa CD44v constitute a cell surface docking complex for gelatinase B/MMP-9 in chronic leukemic but not in normal B cells. *Blood* 112 (1): 169-78, 2008.
- Rena G, Guo S, Cichy SC, Unterman TG, Cohen P. Phosphorylation of the transcription factor forkhead family member FKHR by protein kinase B. *J Biol Chem* 274 (24): 17179-83, 1999.
- Richmond TD, Chohan M, Barber DL. Turning cells red: signal transduction mediated by erythropoietin. *Trends Cell Biol* 15 (3): 146-55, 2005.
- Ries C, Loher F, Zang C, Ismail MG, Petrides PE. Matrix metalloproteinase production by bone marrow mononuclear cells from normal individuals and patients with acute and chronic myeloid leukemia or myelodysplastic syndromes. *Clin Cancer Res* 5 (5): 1115-24, 1999.
- Rodriguez-Viciano P, Marte BM, Warne PH, Downward J. Phosphatidylinositol 3' kinase: one of the effectors of Ras. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 351 (1336): 225-31; discussion 231-2, 1996.
- Romashkova JA, Makarov SS. NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature* 401 (6748): 86-90, 1999.
- Rooney P, Kumar S, Ponting J, Wang M. The role of hyaluronan in tumour neovascularization (review). *Int J Cancer* 60 (5): 632-6, 1995.
- Rordorf-Nikolic T, Van Horn DJ, Chen D, White MF, Backer JM. Regulation of phosphatidylinositol 3'-kinase by tyrosyl phosphoproteins. Full activation requires occupancy of both SH2 domains in the 85-kDa regulatory subunit. *J Biol Chem* 270 (8): 3662-6, 1995.
- Roskoski R, Jr. Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 324 (4): 1155-64, 2004.
- Rozsnyay Z. Signaling complex formation of CD44 with src-related kinases. *Immunol Lett* 68 (1): 101-8, 1999.
- Schrohl AS, Christensen IJ, Pedersen AN, Jensen V, Mouridsen H, Murphy G, Foekens JA, Brunner N, Holten-Andersen MN. Tumor tissue concentrations of the proteinase inhibitors tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) and plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) are complementary in determining prognosis in primary breast cancer. *Mol Cell Proteomics* 2 (3): 164-72, 2003.
- Schrohl AS, Holten-Andersen MN, Peters HA, Look MP, Meijer-van Gelder ME, Klijn JG, Brunner N, Foekens JA. Tumor tissue levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1

- as a prognostic marker in primary breast cancer. *Clin Cancer Res* 10 (7): 2289-98, 2004.
- Seo DW, Li H, Guedez L, Wingfield PT, Diaz T, Salloum R, Wei BY, Stetler-Stevenson WG. TIMP-2 mediated inhibition of angiogenesis: an MMP-independent mechanism. *Cell* 114 (2): 171-80, 2003.
- Shigematsu H, Iwasaki H, Otsuka T, Ohno Y, Arima F, Niho Y. Role of the vav proto-oncogene product (Vav) in erythropoietin-mediated cell proliferation and phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Biol Chem* 272 (22): 14334-40, 1997.
- Silvennoinen O, Witthuhn BA, Quelle FW, Cleveland JL, Yi T, Ihle JN. Structure of the murine Jak2 protein-tyrosine kinase and its role in interleukin 3 signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (18): 8429-33, 1993.
- Smith MR, Kung H, Durum SK, Colburn NH, Sun Y. TIMP-3 induces cell death by stabilizing TNF-alpha receptors on the surface of human colon carcinoma cells. *Cytokine* 9 (10): 770-80, 1997.
- Sohara N, Trojanowska M, Reuben A. Oncostatin M stimulates tissue inhibitor of metalloproteinase-1 via a MEK-sensitive mechanism in human myofibroblasts. *J Hepatol* 36 (2): 191-9, 2002.
- Stamenkovic I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Semin Cancer Biol* 10 (6): 415-33, 2000.
- Stein RC, Waterfield MD. PI3-kinase inhibition: a target for drug development? *Mol Med Today* 6 (9): 347-57, 2000.
- Stetler-Stevenson M, Mansoor A, Lim M, Fukushima P, Kehrl J, Marti G, Ptaszynski K, Wang J, Stetler-Stevenson WG. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in reactive and neoplastic lymphoid cells. *Blood* 89 (5): 1708-15, 1997.
- Stetler-Stevenson WG. Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities. *Sci Signal* 1 (27): re6, 2008.
- Strongin AY, Collier IE, Krasnov PA, Genrich LT, Marmer BL, Goldberg GI. Human 92 kDa type IV collagenase: functional analysis of fibronectin and carboxyl-end domains. *Kidney Int* 43 (1): 158-62, 1993.
- Subramaniam V, Vincent IR, Gardner H, Chan E, Dhamko H, Jothy S. CD44 regulates cell migration in human colon cancer cells via Lyn kinase and AKT phosphorylation. *Exp Mol Pathol* 83 (2): 207-15, 2007.
- Taher TE, Smit L, Griffioen AW, Schilder-Tol EJ, Borst J, Pals ST. Signaling through CD44 is mediated by tyrosine kinases. Association with p56lck in T lymphocytes. *J Biol Chem* 271 (5): 2863-7, 1996.
- Takigawa M, Nishida Y, Suzuki F, Kishi J, Yamashita K, Hayakawa T. Induction of angiogenesis in chick yolk-sac membrane by polyamines and its inhibition by tissue

- inhibitors of metalloproteinases (TIMP and TIMP-2). *Biochem Biophys Res Commun* 171 (3): 1264-71, 1990.
- Tanaka K, Iwamoto Y, Ito Y, Ishibashi T, Nakabeppu Y, Sekiguchi M, Sugioka Y. Cyclic AMP-regulated synthesis of the tissue inhibitors of metalloproteinases suppresses the invasive potential of the human fibrosarcoma cell line HT1080. *Cancer Res* 55 (13): 2927-35, 1995.
- Tanner JW, Chen W, Young RL, Longmore GD, Shaw AS. The conserved box 1 motif of cytokine receptors is required for association with JAK kinases. *J Biol Chem* 270 (12): 6523-30, 1995.
- Tanzer ML. Current concepts of extracellular matrix. *J Orthop Sci* 11 (3): 326-31, 2006.
- Taube ME, Liu XW, Fridman R, Kim HR. TIMP-1 regulation of cell cycle in human breast epithelial cells via stabilization of p27(KIP1) protein. *Oncogene* 25 (21): 3041-8, 2006.
- Taylor KB, Windsor LJ, Caterina NC, Bodden MK, Engler JA. The mechanism of inhibition of collagenase by TIMP-1. *J Biol Chem* 271 (39): 23938-45, 1996.
- Terawaki S, Kitano K, Hakoshima T. Structural basis for type II membrane protein binding by ERM proteins revealed by the radixin-neutral endopeptidase 24.11 (NEP) complex. *J Biol Chem* 282 (27): 19854-62, 2007.
- Thomas SM, Brugge JS. Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13: 513-609, 1997.
- Thompson RW, Parks WC. Role of matrix metalloproteinases in abdominal aortic aneurysms. *Ann N Y Acad Sci* 800: 157-74, 1996.
- Trochon V, Mabilat C, Bertrand P, Legrand Y, Smadja-Joffe F, Soria C, Delpéch B, Lu H. Evidence of involvement of CD44 in endothelial cell proliferation, migration and angiogenesis in vitro. *Int J Cancer* 66 (5): 664-8, 1996.
- Tsukita S, Oishi K, Sato N, Sagara J, Kawai A. ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons. *J Cell Biol* 126 (2): 391-401, 1994.
- Tsukita S, Yonemura S. ERM (ezrin/radixin/moesin) family: from cytoskeleton to signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* 9 (1): 70-5, 1997.
- Tummalapalli CM, Heath BJ, Tyagi SC. Tissue inhibitor of metalloproteinase-4 instigates apoptosis in transformed cardiac fibroblasts. *J Cell Biochem* 80 (4): 512-21, 2001.
- Turley EA, Austen L, Vandeligt K, Clary C. Hyaluronan and a cell-associated hyaluronan binding protein regulate the locomotion of ras-transformed cells. *J Cell Biol* 112 (5): 1041-7, 1991.

- Valente P, Fassina G, Melchiori A, Masiello L, Cilli M, Vacca A, Onisto M, Santi L, Stetler-Stevenson WG, Albini A. TIMP-2 over-expression reduces invasion and angiogenesis and protects B16F10 melanoma cells from apoptosis. *Int J Cancer* 75 (2): 246-53, 1998.
- Veillette A, Bookman MA, Horak EM, Bolen JB. The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. *Cell* 55 (2): 301-8, 1988.
- Verdier F, Chretien S, Billat C, Gisselbrecht S, Lacombe C, Mayeux P. Erythropoietin induces the tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-2. An alternate pathway for erythropoietin-induced phosphatidylinositol 3-kinase activation. *J Biol Chem* 272 (42): 26173-8, 1997.
- Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 92 (8): 827-39, 2003.
- Ward AC, Touw I, Yoshimura A. The Jak-Stat pathway in normal and perturbed hematopoiesis. *Blood* 95 (1): 19-29, 2000.
- Ward RV, Hembry RM, Reynolds JJ, Murphy G. The purification of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 from its 72 kDa progelatinase complex. Demonstration of the biochemical similarities of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *Biochem J* 278 (Pt 1): 179-87, 1991.
- Watanabe O, Kinoshita J, Shimizu T, Imamura H, Hirano A, Okabe T, Aiba M, Ogawa K. Expression of a CD44 variant and VEGF-C and the implications for lymphatic metastasis and long-term prognosis of human breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 24 (1): 75-82, 2005.
- Welgus HG, Campbell EJ, Bar-Shavit Z, Senior RM, Teitelbaum SL. Human alveolar macrophages produce a fibroblast-like collagenase and collagenase inhibitor. *J Clin Invest* 76 (1): 219-24, 1985.
- West DC, Kumar S. Hyaluronan and angiogenesis. *Ciba Found Symp* 143: 187-201; discussion 201-7, 281-5, 1989.
- Westbrook CA, Gasson JC, Gerber SE, Selsted ME, Golde DW. Purification and characterization of human T-lymphocyte-derived erythroid-potentiating activity. *J Biol Chem* 259 (16): 9992-6, 1984.
- Wickrema A, Uddin S, Sharma A, Chen F, Alsayed Y, Ahmad S, Sawyer ST, Krystal G, Yi T, Nishada K, Hibi M, Hirano T, Plataniias LC. Engagement of Gab1 and Gab2 in erythropoietin signaling. *J Biol Chem* 274 (35): 24469-74, 1999.
- Wilhelm SM, Collier IE, Marmer BL, Eisen AZ, Grant GA, Goldberg GI. SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. *J Biol Chem* 264 (29): 17213-21, 1989.

- Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, Yi T, Tang B, Miura O, Ihle JN. JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell* 74 (2): 227-36, 1993.
- Woessner JF, Jr. Role of matrix proteases in processing enamel proteins. *Connect Tissue Res* 39 (1-3): 69-73; discussion 141-9, 1998.
- Wojchowski DM, Gregory RC, Miller CP, Pandit AK, Pircher TJ. Signal transduction in the erythropoietin receptor system. *Exp Cell Res* 253 (1): 143-56, 1999.
- Wolf CM, Eastman A. The temporal relationship between protein phosphatase, mitochondrial cytochrome c release, and caspase activation in apoptosis. *Exp Cell Res* 247 (2): 505-13, 1999.
- Yamashita K, Suzuki M, Iwata H, Koike T, Hamaguchi M, Shinagawa A, Noguchi T, Hayakawa T. Tyrosine phosphorylation is crucial for growth signaling by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1 and TIMP-2). *FEBS Lett* 396 (1): 103-7, 1996.
- Yang TT, 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* 89 (22): 10676-80, 1992.
- Yi TL, Bolen JB, Ihle JN. Hematopoietic cells express two forms of lyn kinase differing by 21 amino acids in the amino terminus. *Mol Cell Biol* 11 (5): 2391-8, 1991.
- Yonemura S, Hirao M, Doi Y, Takahashi N, Kondo T, Tsukita S. Ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins bind to a positively charged amino acid cluster in the juxta-membrane cytoplasmic domain of CD44, CD43, and ICAM-2. *J Cell Biol* 140 (4): 885-95, 1998.
- Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev* 14 (2): 163-76, 2000.
- Yu Q, Stamenkovic I. Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. *Genes Dev* 13 (1): 35-48, 1999.
- Yu WH, Woessner JF, Jr., McNeish JD, Stamenkovic I. CD44 anchors the assembly of matrilysin/MMP-7 with heparin-binding epidermal growth factor precursor and ErbB4 and regulates female reproductive organ remodeling. *Genes Dev* 16 (3): 307-23, 2002.
- Yu WH, Yu S, Meng Q, Brew K, Woessner JF, Jr. TIMP-3 binds to sulfated glycosaminoglycans of the extracellular matrix. *J Biol Chem* 275 (40): 31226-32, 2000.
- Zavrides HN, Zizi-Sermpetzoglou A, Panousopoulos D, Athanasas G, Elemenoglou I, Peros G. Prognostic evaluation of CD44 expression in correlation with bcl-2 and p53 in colorectal cancer. *Folia Histochem Cytobiol* 43 (1): 31-6, 2005.
- Zheng XM, Resnick RJ, Shalloway D. A phosphotyrosine displacement mechanism for activation of Src by PTPalpha. *EMBO J* 19 (5): 964-78, 2000.

- Zhou H, Li XM, Meinkoth J, Pittman RN. Akt regulates cell survival and apoptosis at a postmitochondrial level. *J Cell Biol* 151 (3): 483-94, 2000.
- Zhu D, Bourguignon LY. The ankyrin-binding domain of CD44s is involved in regulating hyaluronic acid-mediated functions and prostate tumor cell transformation. *Cell Motil Cytoskeleton* 39 (3): 209-22, 1998.
- Zrihan-Licht S, Lim J, Keydar I, Sliwkowski MX, Groopman JE, Avraham H. Association of csk-homologous kinase (CHK) (formerly MATK) with HER-2/ErbB-2 in breast cancer cells. *J Biol Chem* 272 (3): 1856-63, 1997.

ANNEXES

LEADING ARTICLE

Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 promotes hematopoietic differentiation via caspase-3 upstream the MEKK1/MEK6/p38 α pathway

E Dassé¹, L Bridoux¹, T Baranek², E Lambert¹, S Salesse³, ML Sowa¹, L Martiny¹, C Trentesaux⁴ and E Petitfrère¹

¹Laboratoire de Biochimie, CNRS 6198, IFR 53 Biomolécules, UFR Sciences Exactes et Naturelles, BP 1039, Université de Reims Champagne Ardenne, Reims, France; ²IPCM 3796, EA, UFR Pharmacie, Reims, France; ³Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire, EA 3796, UFR Sciences, Reims, France and ⁴JE 2428, IFR 53 Biomolécules, UFR Pharmacie, Reims, France

Besides its matrix metalloproteinases inhibitory activity, TIMP-1 exhibits other biological activities such as cell survival and proliferation. The intracellular signalling pathway elicited by TIMP-1 begins to be elucidated. We have shown previously that the caspase-3 and the p38 α MAP kinase were activated during TIMP-1-induced UT-7 cells erythroid differentiation. In this study, we demonstrated that TIMP-1 differentiating effect can be extended to the IL-3-dependent myeloid murine 32D cell line and human erythroid progenitors derived from cord blood CD34⁺ cells. By performing small interfering RNA transfection and using chemical inhibitors, we evidenced that caspase-3 was involved in TIMP-1 differentiating effect. We then identified the MEKK1 kinase as a caspase-3 substrate and demonstrated that the MEKK1/MEK6/p38 α pathway was activated downstream the caspase-3 in TIMP-1-induced hematopoietic differentiation. *Leukemia* (2007) 21, 595–603. doi:10.1038/sj.leu.2404540; published online 15 February 2007

Keywords: TIMP-1; hematopoietic differentiation; caspase-3; MEKK1; MEK6; p38 α

Introduction

Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) are natural inhibitors of matrix metalloproteinases (MMPs) involved in maintenance of the extracellular matrix integrity. Four TIMPs currently characterized in humans are expressed in various cell types such as hematopoietic cells and keratinocytes.¹ As natural inhibitors of MMPs, TIMPs are involved in both normal and pathological events including invasion and angiogenesis.² Besides their MMPs inhibitory activity, TIMPs and in particular TIMP-1 exhibit other biological functions in cell survival, differentiation and proliferation.³ TIMP-1 has first been described for its erythroid potentiating activity and then proposed as an important regulator of erythropoiesis⁴ able to stimulate the proliferation of K562 leukemia cells⁵ and both early and late erythroid committed stem cells from human bone marrow (BM).⁶ However, Hayakawa *et al.*⁷ have demonstrated that TIMP-1 also exhibited mitogenic activity in other cells and proposed TIMP-1 as a new cell-growth factor. In the BM, the fate and the lineage commitment of hematopoietic progenitors are supported by cytokines, growth factors and cell adhesion molecules produced by stroma cells.⁸ Erythropoietin (Epo) accelerates the cell differentiation process and allows the cells to become definitively committed to the erythroid lineage. Epo-

induced erythroid differentiation implies several intracellular pathways and, recently, caspases have been demonstrated to be transiently activated during this process.^{9,10}

Recently, a new function has been described for TIMP-1 which regulated cell differentiation of B cell lineage.¹¹ Although the TIMP-1 receptor has not yet been characterized, there is a growing body of evidence that TIMP-1 was able to activate intracellular signalling pathways.³ We have previously reported that TIMP-1 induced erythroid UT-7 cell differentiation through activation of the p38 MAP kinase.¹² The p38 MAP kinase family is represented by four isoforms in mammals and both p38 α and p38 δ isoforms are activated during the late differentiation stage of primary erythroid progenitors.¹³ The p38 MAP kinases are selectively activated by MAP kinase kinases (MAPKK or MEK). The cloned kinases MEK3 and MEK6 phosphorylate and activate p38 without activating ERK or JNK.¹⁴ Moreover, MEK6 can form stable complexes with the p38 α isoform.¹⁵ The MEKs are themselves activated by MEK kinases (MEKK) of which four isoforms have been identified to date and their activation requires both phosphorylation and proteolytic cleavage.^{16,17} We demonstrated here that TIMP-1 differentiating activity can be extended to myeloid cells as well as normal erythroid progenitors derived from CD34⁺ cells. We detailed the TIMP-1 intracellular signalling pathway and reported the involvement of caspase-3 upstream MEKK1/MEK6/p38 α pathway.

Results

TIMP-1 induces differentiation of two hematopoietic cell types

All experiments were performed with 5 ng/ml TIMP-1 because we have previously reported that TIMP-1-induced UT-7 cell erythroid differentiation in a dose-dependent manner with a maximal effect at this concentration. To confirm the TIMP-1 differentiating activity evaluated by benzidine staining of hemoglobinized UT-7 cells (Figure 1a), TIMP-1 effect was examined on the mRNA level of α -globin, a protein specifically expressed during erythroid differentiation. The α -globin mRNA level was significantly increased in TIMP-1-treated UT-7 cells (Figure 1b). We also used another TIMP-1-sensitive cell line, the IL-3-dependent mouse myeloid 32D cell line. Differentiation of these cells was evaluated by Nitro Blue Tetrazolium (NBT) test and mRNA expression of CD14 and CD11b, two myeloid differentiation markers. The 32D differentiated cell ratio was significantly increased in TIMP-1 assay (Figure 1a) and CD14 and CD11b mRNA were expressed in TIMP-1-treated cells (Figure 1b).

Correspondence: Professor E Petitfrère, Laboratoire de Biochimie, UFR Sciences Exactes et Naturelles, BP1039, 51687 Reims, France.
E-mail: emmanuelle.petitfrere@univ-reims.fr
Received 11 January 2005; revised 9 November 2006; accepted 16 November 2006; published online 15 February 2007

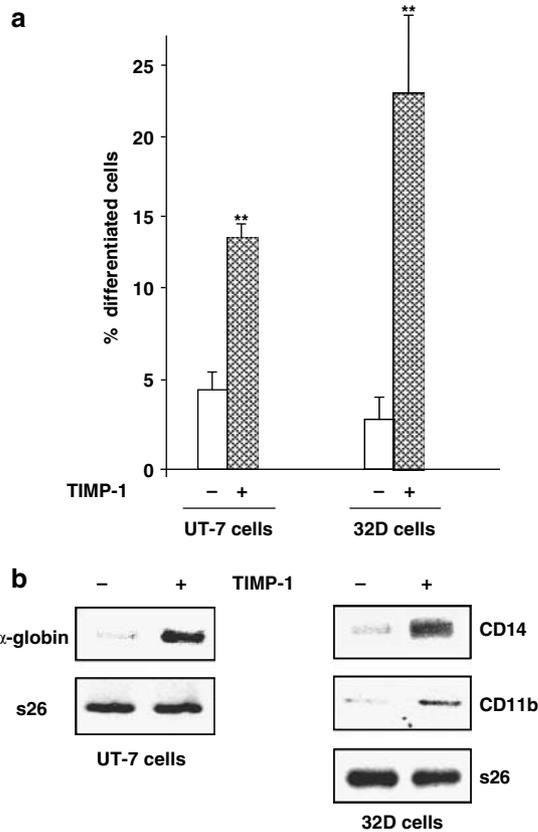


Figure 1 TIMP-1 induces hematopoietic cell differentiation. (a) Serum- and growth factor-deprived UT-7 and 32D cells were incubated with 5 ng/ml TIMP-1 for 24 h. UT-7 erythroid and 32D myeloid cells were respectively evaluated by (a) benzidine staining and NBT coloration and (b) α -globin, CD14 and CD11b mRNA expression with s26 as control ($n=3$; $**P<0.02$).

Caspase-3 activation is crucial for TIMP-1-induced hematopoietic differentiation

The fact that caspase-3 was transiently activated during Epo-induced differentiation of erythroid progenitors raised the question of its involvement in TIMP-1 differentiating activity. To investigate this possibility, we used z-DQMD-fmk, a specific inhibitor that blocks the initial cleavage of procaspase-3. Addition of 50 μ M z-DQMD-fmk totally counteracted TIMP-1 differentiating effect in both cell types (Figure 2a and b). We then examined caspase-3 activation and first analyzed the procaspase-3 proteolytic cleavage by immunoblotting. We showed that TIMP-1 induced the production of a cleaved caspase-3 fragment visualized at 17 kDa and this cleavage was totally abolished by z-DQMD-fmk in the two cell types (Figure 3a). Moreover, the caspase-3 activity was evaluated for its ability to cleave the fluorogenic peptide Ac-DEVD-AMC that mimics the enzyme target site. The caspase-3 proteolytic activity was significantly elevated in TIMP-1-stimulated cells and totally blocked by z-DQMD-fmk (Figure 3b). We further performed cell transfection with small interference RNA (siRNA) targeting the caspase-3. These siRNA were first tested for their capacity to abolish caspase-3 expression as compared to siRNA negative control (sncRNA). The caspase-3 mRNA expression was totally inhibited by siRNA whereas it was not affected by sncRNA in both UT-7 and 32D cells as compared to nontransfected cells (NT) (Figure 4a). In addition, TIMP-1 differentiating activity was dramatically inhibited in siRNA-transfected cells (Figure 4b and c).

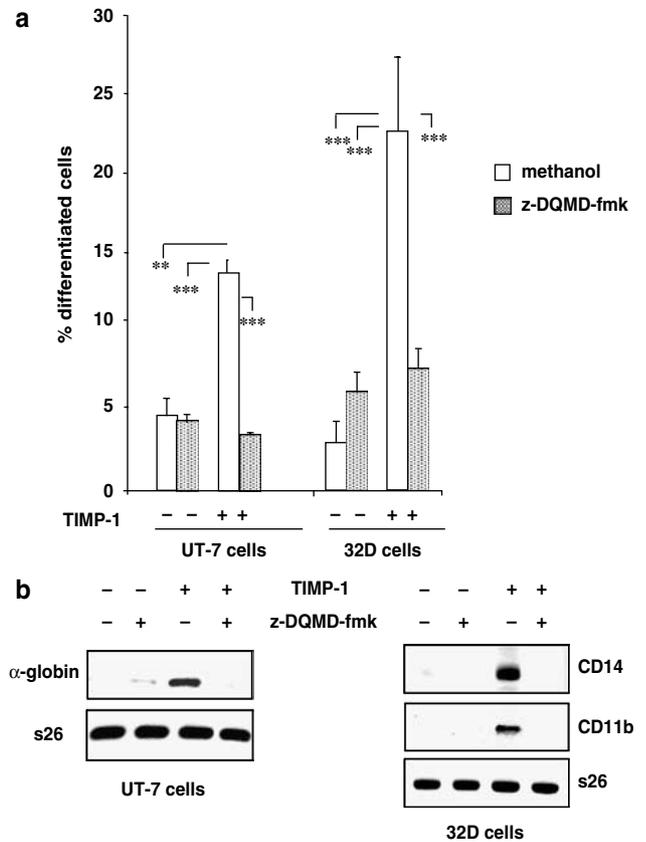


Figure 2 Caspase-3 inhibition prevents TIMP-1-induced hematopoietic differentiation. Serum- and growth factor-deprived UT-7 and 32D cells were incubated for 24 h with 5 ng/ml TIMP-1 and 50 μ M z-DQMD-fmk or methanol as vehicle control. Hematopoietic differentiation was evaluated by (a) benzidine staining and NBT coloration ($n=3$; $**P<0.02$, $***P<0.01$) and (b) α -globin, CD14 and CD11b mRNA expression with s26 as control.

In all the experiments, the percentage of apoptotic cell number did not increase after 24 h incubation with TIMP-1 (UT-7 cells: $5.4\% \pm 1.9\%$; 32D cells: $6.0 \pm 1.8\%$).

TIMP-1 induces CD34⁺ progenitor erythroid differentiation via caspase-3 activation

We then questioned if the TIMP-1 differentiating activity could be extended to primary cells such as progenitors derived from CD34⁺ cells. CD34⁺ cells were isolated from human cord blood and their differentiation to the erythroid lineage was checked by evaluating the simultaneous expression of transferrin-receptor CD71 and glycoprotein A (GPA) by flow cytometry (Figure 5a). The ratio of GPA⁺/CD71⁺ cells was significantly increased in cells treated with 100 ng/ml TIMP-1 as compared to cells cultured in absence of TIMP-1. The used TIMP-1 concentration was determined as being the more efficient in this type of cells. To complete our investigation on the role of caspase-3, CD34⁺ cells were cultured with z-DQMD-fmk and TIMP-1. The ratio of GPA⁺/CD71⁺ cells was significantly decreased in cells treated with z-DQMD-fmk as compared to cells cultured in absence of inhibitor (Figure 5a). In addition, progenitor incubation with TIMP-1 led to procaspase-3 cleavage and increase of caspase-3 activity. TIMP-1 effect was totally blocked by z-DQMD-fmk (Figure 5b and c).

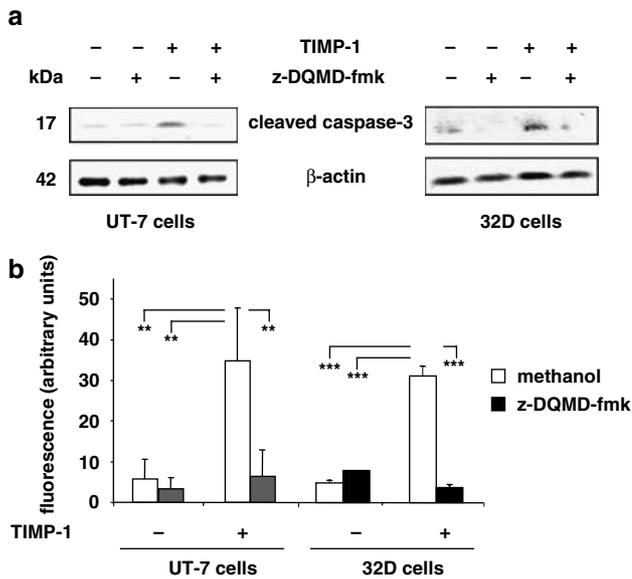


Figure 3 Caspase-3 is activated in TIMP-1-treated cells. Serum- and growth factor-deprived UT-7 and 32D cells were incubated with 50 μ M z-DQMD-fmk or methanol as vehicle control for 30 min and then stimulated with 5 ng/ml TIMP-1 for 5 min. (a) Western blot analysis was realized with anti-caspase-3 cleaved large fragment antibodies. The blot was reprobed with β -actin antibodies as control. (b) Caspase-3 proteolytic activity was measured *in vitro* and expressed as fluorescence arbitrary units ($n=3$; * $P < 0.05$, ** $P < 0.02$, *** $P < 0.01$).

MEKK1 is a caspase-3 substrate in TIMP-1-induced hematopoietic differentiation

We then investigated the caspase-3 substrate and MEKK1 appears as a good candidate because it contains a DEVD protease cleavage sequence for caspase-3 like proteases.¹⁷ MEKK1 was expressed in both UT-7 and 32D cells at the predicted molecular weight of 195 kDa (Figure 6a). Following cell stimulation with TIMP-1, a cleaved MEKK1 72kDa fragment was produced and 50 μ M z-DQMD-fmk prevented TIMP-1-induced cleavage (Figure 6a). Similar results were observed in 32D cells and suggested that MEKK1 might be a caspase-3 substrate in both UT-7 and 32D cells. We then explored MEKK1 activity for its ability to phosphorylate exogenous MEK6 in presence of [γ -³²P] ATP. The level of phosphorylated MEK6 was significantly increased in TIMP-1-stimulated UT-7 and 32D cells and the caspase-3 inhibitor prevented TIMP-1 effect (Figure 6b).

TIMP-1-induced hematopoietic differentiation involves the MEKK1/MEK6/p38 α pathway.

To evaluate the hypothesis that MEK6 could be the MEKK1 substrate in TIMP-1 signalling pathway, we examined the ability of MEK6 to associate with MEKK1. Coimmunoprecipitation experiments showed that MEK6 was associated with cleaved MEKK1 in anti-MEKK1 immunoprecipitates obtained from TIMP-1-stimulated cells, and reverse experiments showed that cleaved MEKK1 was immunodetected in anti-MEK6 immunoprecipitates obtained from TIMP-1-stimulated cells (Figure 6c).

We then focused on MEK6 and first examined its phosphorylation status (Figure 7a). TIMP-1 triggered MEK3/6 phosphorylation in UT-7 and 32D cells and reprobing the blot evidenced that the phosphorylated protein was MEK6 as no protein was

immunodetected with anti-MEK3 antibodies (data not shown). To confirm the role of MEK6, cells were transfected with cDNA encoding a MEK6 mutant (D/A), unable to phosphorylate p38¹⁸ (Figure 7b). Cotransfection with an empty vector (EV) as control and with pEGFP revealed that 70% cells were transfected. TIMP-1-induced α -globin or CD14 and CD11b transcript expression was abolished in MEK6 (D/A) transfected cells as compared to NT or cells transfected with the empty vector. We then hypothesized that p38 α could be a MEK6 substrate in TIMP-1 signalling pathway (Figure 7c). Coimmunoprecipitation experiments allowed the detection of the p38 α isoform in MEK6 immunoprecipitates obtained from TIMP-1-stimulated UT-7 and 32D cells. Reverse experiments confirmed that MEK6 was associated with p38 α in TIMP-1-stimulated cells. All these results demonstrate the involvement of MEKK1/MEK6/p38 α pathway downstream MEKK1 in TIMP-1-induced hematopoietic differentiation. We thus studied the caspase-3 control upstream MEK6 and p38 α . TIMP-1-induced MEK6 and p38 α phosphorylation were inhibited by z-DQMD-fmk (Figures 7a and 8a) and cell transfection with siRNA targeting the caspase-3 (Figure 8b).

Discussion

In the BM microenvironment, TIMP-1 has been proposed as a bifunctional protein through maintenance of the BM matrix integrity by regulating MMP activities on the one hand and erythroid progenitor cell proliferation on the other.⁴ To what extent the pleiotropic effects of TIMP-1 produced in the hematopoietic microenvironment influence normal hematopoiesis and/or the development of hematological malignancies remains unknown. Our results attempt to evidence that TIMP-1, as a BM microenvironment constituent, is involved in the erythroid cell physiology. Indeed, we have previously reported that Epo regulated TIMP-1 production at the transcriptional level¹⁹ and TIMP-1 rescued UT-7 and 32D cells from apoptosis induced by growth factor removal.²⁰ In addition, we highlight here a new role for TIMP-1 in promoting differentiation of erythroid UT-7 and myeloid 32D cells as well as human erythroid progenitors. A similar differentiation-promoting activity was recently characterized in Burkitt lymphoma cells, in which TIMP-1 was able to induce plasmacytic/plasmablastic differentiation.¹¹ Nevertheless, controversial results appeared between erythroid and B cell lineages as TIMP-1 overexpression inhibited M1 myeloblast differentiation.²¹ It is important to be precise that TIMP-1 exhibited its differentiating activity in absence of any growth factor, reinforcing the idea that TIMP-1 plays an active role in the hematopoietic BM microenvironment. Identification of the intracellular signalling pathways activated by TIMP-1 could represent an interesting challenge to understand TIMPs biology.

We report that caspase-3 was involved in TIMP-1-induced differentiation of hematopoietic cells but the involvement of caspase-3 raises the question whether cells undergo differentiation with or without apoptosis. In our experiments, the apoptotic cell ratio in TIMP-1-incubated cells did not increase throughout the culture (data not shown), and we have previously reported that TIMP-1 alone promoted erythroid UT-7 and myeloid 32D cell survival.²⁰ So our results rule out the possibility that caspase-3 activation was the result of a proapoptotic stimulus triggered by TIMP-1. In addition, caspase-3 activity was essential during differentiation of various cells such as monocytes, osteoblasts and platelets.²²⁻²⁴ In erythroblasts, caspase-3 was transiently activated during the earlier stages of differentiation.^{9,10} The nonapoptotic processes controlled by caspase-3

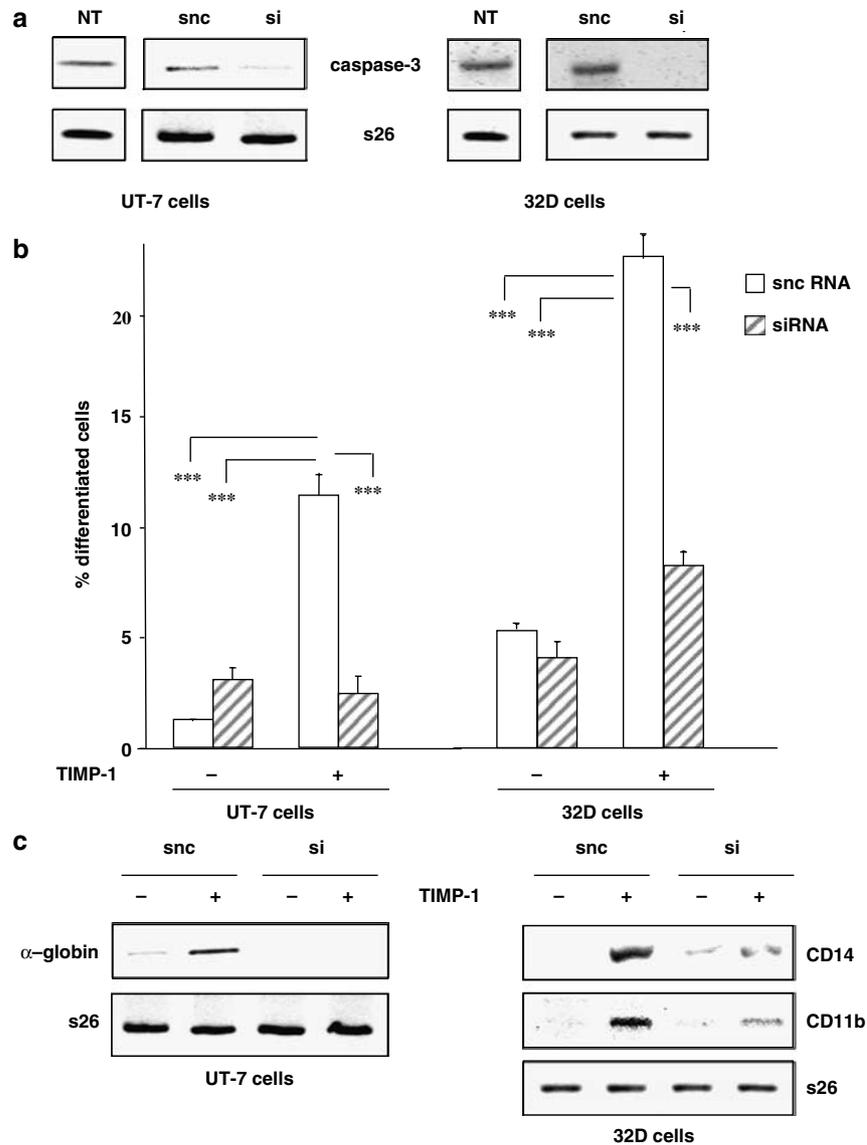


Figure 4 Caspase-3 expression is essential for TIMP-1-induced UT-7 and 32D cell differentiation. Serum- and growth factor-deprived UT-7 and 32D cells were electroporated in presence of 100 nM either siRNA targeting caspase-3 (si) or sncRNA (snc). (a) Caspase-3 mRNA expression was evaluated by RT-PCR with s26 as a control. Expression of mRNA caspase-3 was evaluated in NT as control. (b) Transfected UT-7 and 32D cells were incubated with 5 ng/ml TIMP-1 for 18 h and cell differentiation was evaluated by benzidine staining and NBT coloration ($n=3$; $*P < 0.05$, $**P < 0.02$, $***P < 0.01$) or (c) α -globin or CD14 and CD11b mRNA expression was studied by RT-PCR and compared with s26 as control.

require the cleavage of selected targets different from those associated with proapoptotic processes.²⁵ Our results indicate that the MEKK1 kinase is a caspase-3 substrate and TIMP-1-induced hematopoietic differentiation involves the MEKK1/MEK6/p38 α pathway. Even if the p38 signalling pathway was activated in a variety of cellular responses, there is evidence which illustrates the distinct functions of the different p38 isoforms.¹⁸ Among the four p38 isoforms, p38 α and/or p38 β were found to play an important role during differentiation of several cell types¹⁵ and, in particular, the p38 α pathway was necessary and sufficient for SKT6 erythroid cells and primary erythroid progenitors differentiation.^{13,26} Our previous results reported the role of the p38 and our present study confirms the role of the isoform p38 α in TIMP-1-promoted hematopoietic cell differentiation.

Normal but also malignant hematopoietic cells express and secrete TIMP-1 and a disturbance of normal regulatory mechanisms in the BM microenvironment is evident in several hematological disorders.²⁷ As larger amounts of TIMP-1 are secreted by megakaryoblastic and erythroleukemic cells, variations of TIMP secretion by leukemic cells could explain some abnormalities detected in the BM of patients. The set of our data strengthens the role of TIMP-1 in hematopoiesis and reinforces the idea that TIMP-1 may be one of the regulatory factors of the erythropoietic inductive BM microenvironment but also another important actor in some hematological disorders. Further investigations are needed to understand the autocrine role of TIMP-1 in the development of these hematological disorders. Elucidation of the signalling pathways activated by TIMP-1 and relevant to erythroid cell survival and differentiation

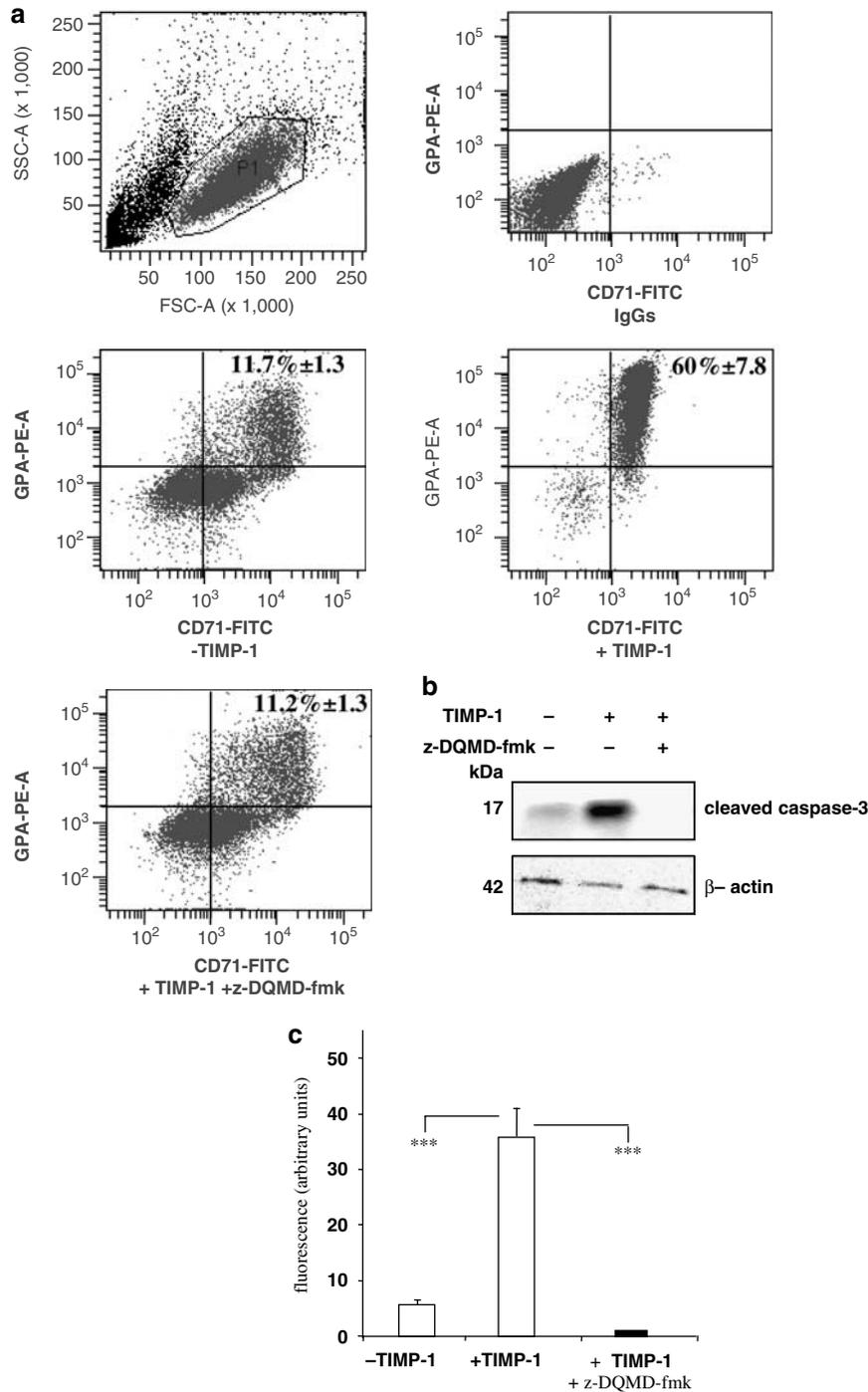


Figure 5 TIMP-1 induces erythroid differentiation of CD34⁺ cells. CD34⁺ progenitors were cultured with SCF, IL-3 and IL-6 for 7 days and further cultured for 7 days with SCF, IL-6 and with or without 100 ng/ml TIMP-1. 50 μM z-DQMD-fmk or methanol as vehicle control was added during the second 7-day period of incubation. (a) Both GPA and CD71 expression were analyzed by flow cytometry. (b) Western blot analysis of the procaspase-3 cleavage (c) caspase-3 proteolytic activity. Results are expressed as fluorescence arbitrary units ($n=3$; * $P < 0.05$, ** $P < 0.02$, *** $P < 0.01$)

could represent a new approach in the development of potential therapeutic agents.

Materials and methods

Reagents

Human recombinant TIMP-1, z-VAD-fmk and Ac-DEVD-AMC were purchased from Calbiochem (Fontenay Sous Bios, France).

Human purified recombinant Epo (specific activity of 120 000 U/ml) was from Roche Molecular Biochemicals (Meylan, France). α-Minimal essential (α-MEM) and Iscove's modified Dulbecco's (IMDM) media were purchased from Life Technologies, Inc (Cergy Pontoise, France). Lymphocyte separation medium was from Eurobio (Les Ulis, France). StemSep Human CD34 positive selection cocktail, StemSep Magnetic Colloid and bovine serum albumin (BSA), insulin and transferrin (BIT) 9500 were purchased from Stem Cell Technologies (Grenoble,

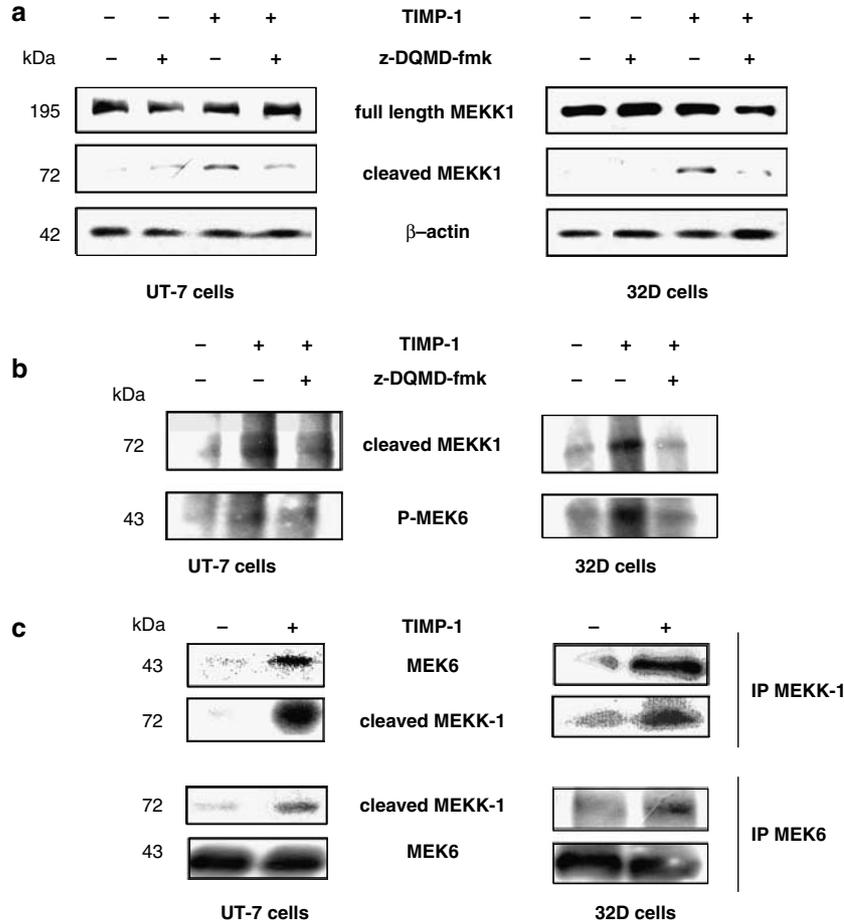


Figure 6 The MEKK1 kinase is activated in TIMP-1-stimulated cells. Serum- and growth factor-deprived UT-7 and 32D cells were incubated with $50 \mu\text{M}$ z-DQMD-fmk or methanol as vehicle control for 30 min and then stimulated with 5 ng/ml TIMP-1 for 5 min. **(a)** Western blot analysis with anti-MEKK1 C-terminal domain antibodies. **(b)** Anti-MEKK1 immunoprecipitates were mixed with immunoprecipitated MEK6 from unstimulated cells in presence of $10 \mu\text{Ci}$ [γ - ^{32}P]ATP. Phosphorylated proteins were analyzed by autoradiography. **(c)** Cells were immunoprecipitated with anti-MEKK1 antibodies or anti-MEK6 antibodies and proteins were analyzed by Western blotting.

France). Anti-phospho-p38, phospho-MEK3/6, p38 α and caspase-3 antibodies were purchased from Cell Signaling Technology (St Quentin en Yvelines, France). Anti-MEK6 and MEKK1 antibodies were from Santa Cruz Biotechnologies (Le Perray en Yvelines, France). Anti-CD71-fluorescein isothiocyanate (FITC) and anti-CD235a-R-PE were purchased from BD Biosciences (Le Pont de Claix, France). The cDNA encoding the mutant MEK6 was a generous gift of Pr.A.Nebreda (EMBL, Heidelberg, Germany). Duofect transfection system was from Q-BIOgene (Illkirch, France). RNeasy Mini kits were from Qiagen (Courtaboeuf, France). [γ - ^{32}P]ATP was from Amersham Pharmacia Biotech (Orsay, France). Small interference 21 nucleotides long RNA were synthesized chemically and purified by HPLC were from Eurogentec (Seraing France). MS MACS columns were from Miltenyi Biotech (Paris, France). All others reagents were purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin, Fallavier, France).

Cell culture and stimulation

The UT-7 Epo-dependent cells were cultured in α -MEM containing 10% (v/v) fetal calf serum (FCS), 2 mM L-glutamine and 0.5 U/ml Epo. Before each experiment, cells were serum- and Epo-deprived by incubating overnight in IMDM supplemented with 2% (w/v) deionized BSA, 2 mM L-glutamine and $20 \mu\text{g/ml}$ human holo-transferrin. To study erythroid differentiation, cells

were incubated in the same medium with 5 ng/ml TIMP-1 for 24 h, and hemoglobinized cells were counted after benzidine staining associated with trypan blue exclusion²⁸ and α -globin mRNA expression was measured by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). The myeloid murine 32D IL-3-dependent cells were cultured in α -MEM containing 10% (v/v) FCS, 2 mM L-glutamine and 4% WEHI conditioned media as a source of IL-3. Before each experiment, cells were serum- and WEHI-deprived and maintained 4 h in IMDM supplemented with 2% (w/v) deionized BSA, 2 mM L-glutamine and $20 \mu\text{g/ml}$ human holo-transferrin. To study myeloid differentiation, cells were incubated in the same culture medium with 5 ng/ml TIMP-1 for 24 h and differentiated cells were counted after NBT coloration,²⁹ CD14 and CD11b expression were analyzed by RT-PCR. To study signal transduction, UT-7 and 32D cells (1×10^6 cells/ml) were incubated in IMDM with 5 ng/ml TIMP-1 for 5 min at 37°C and the reaction was stopped by adding ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) containing $50 \mu\text{M}$ Na_3VO_4 .

Purification and amplification of human erythroid progenitors

Cord blood samples from healthy volunteers, after their consent was received, were collected into dry bottles containing sodium heparin and diluted in PBS containing 0.8% BSA. Mononuclear

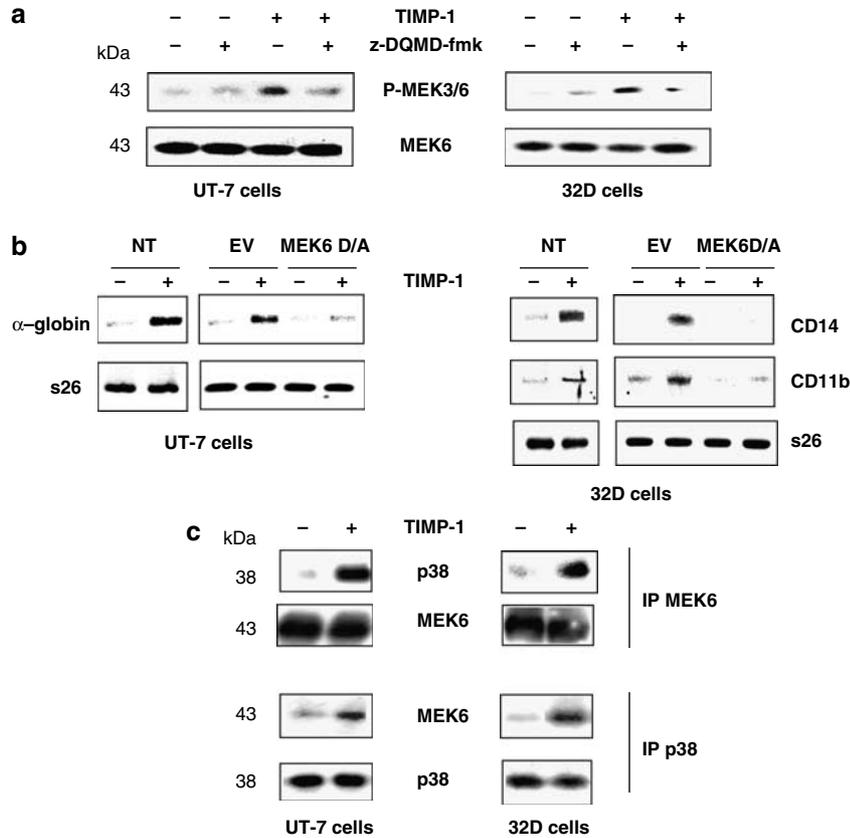


Figure 7 TIMP-1-induced hematopoietic differentiation involves MEK6. (a) Serum- and growth factor-deprived UT-7 and 32D cells were stimulated with 5 ng/ml TIMP-1 for 5 min. Western blot analysis with anti-phospho-MEK3/6 (P-MEK3/6) antibodies. The blot was then reprobbed with anti-MEK6 antibodies. (b) UT-7 and 32D cells were transiently cotransfected with pEGFP and the cDNA encoding the MEK6 (D/A) mutant or an EV and then incubated with 5 ng/ml TIMP-1 for 18 h. Cell differentiation was evaluated by α -globin mRNA expression in UT-7 cells and by CD14 mRNA expression in 32D cells. Expression of α -globin and CD14 mRNA was evaluated in nontransfected (NT) cells as control. (c) Growth-factor deprived UT-7 and 32D cells were stimulated with 5 ng/ml TIMP-1 for 5 min. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-MEK6 antibodies or anti-p38 antibodies and analyzed by Western blotting with anti-MEK6 or anti-p38 antibodies.

cells were isolated on a Ficoll gradient, washed twice in PBS and were subjected to a CD34⁺ immunomagnetic bead separation system with Minimacs columns. CD34⁺ cells (5×10^5 cells/ml) were incubated in IMDM containing 15% (v/v) BIT 9500, 1% (v/v) L-glutamine, 50 μ M β -mercaptoethanol, 10 ng/ml IL-3, 10 ng/ml IL-6 and 25 ng/ml stem cell factor (SCF) and placed at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere for 7 days. The resulting cells were placed in the same medium supplemented with 10 ng/ml IL-6, 25 ng/ml SCF and with or without 100 ng/ml TIMP-1 for an additional 7 day period to induce erythroid differentiation. Cells were diluted to a concentration of 2×10^5 cells/ml every 2 or 3 days by adding fresh medium.

Whole cell extracts, immunoprecipitation and Western blot

After stimulation, cells were washed twice with PBS containing 50 μ M Na₃VO₄ then pelleted and solubilized by adding 80 μ l Laemmli buffer. Samples were analyzed by 10% (v/v) sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) followed by Western blotting.²¹

In vitro MEKK1 assay

Anti-MEKK1 immunoprecipitates were incubated for 15 min at 30°C in 100 μ l kinase buffer (25 mM Hepes, pH 7.4,

2 mM MnCl₂, 10 mM MgCl₂, 0.5 mM Na₃VO₄ and 25 mM ATP) containing 10 μ Ci [γ -³²P]ATP. The reaction was initiated by addition of MEK6 immunoprecipitated from unstimulated cells and stopped by addition of Laemmli buffer 3 \times . The samples were analyzed by 10% SDS-PAGE followed by autoradiography.

Caspase-3 activity

Protein concentration in the cell lysates was evaluated by bicinchoninic acid protein assay. Ten micrograms of proteins of the cell lysate was incubated with 20 μ M Ac-DEVD-AMC in 200 μ l lysis buffer supplemented with 1 mM MgCl₂, 1 mM ethylene glycol bis(β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid and 2 mM dithiothreitol. After incubation at 37°C for 2 h, fluorescence intensity was measured with a spectrofluorometer (excitation 380 nm, emission 460 nm).

Transient transfection

Transient transfection with cDNA encoding dominant-negative MEK6 (D/A) (Asp 197 changed to Ala) in pEFmLink expression vector was performed using DuoFect transfection system. The pEFmLink-MEK6 (D/A) plasmid (1 μ g) was cotransfected with 1 μ g enhanced green fluorescent protein plasmid (pEGFP). In control experiments, pEGFP was cotransfected with an empty

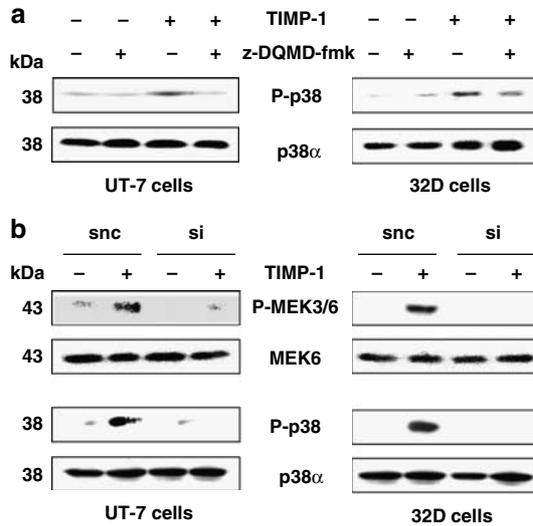


Figure 8 TIMP-1-induced hematopoietic differentiation involves p38 α . **(a)** Serum- and growth factor-deprived UT-7 and 32D cells were stimulated with 5 ng/ml TIMP-1 for 5 min. Western-blot analysis with anti-phospho-p38 (P-p38) antibodies. The blot was then reprobed with anti-p38 α antibodies. **(b)** siRNA caspase-3 or snc RNA-transfected cells were stimulated with 5 ng/ml TIMP-1 for 5 min and whole cell extracts were analyzed by Western blotting with anti-phospho-MEK3/6 (P-MEK3/6) or anti-phospho-p38 (P-p38) antibodies. The blot was then reprobed with anti-MEK6 or with anti-p38 α antibodies.

vector pBK-CMV phagemid of 4512 bp. After 4 h incubation, culture medium was added to the transfection complexes.

siRNA transfection

Sense siRNA sequence was 5'-AGUGAAGCAAUCAGAAA CdTdT-3' and anti-sense siRNA was 5'-GUUUCUGAUUUGC UUCACUdTdT-3'. Cells in exponential phase of proliferation were washed twice with Opti-MEM and resuspended to a final concentration of 1×10^6 cells/ml in the same medium. Subsequently, cell suspension (0.4 ml) was mixed with 100 nM double-stranded RNA (ds-RNA) and electroporated with a Biorad apparatus. Silencer negative control siRNA (snc-RNA) was used as negative control under similar conditions (100 nM).

Reverse transcriptase polymerase chain reaction

Complementary DNA was synthesized using the reverse transcription system according to the supplier's instructions with the primers: α -globin sense (5'-TGGGGTAAGGTCC GCGCGCA-3') and antisense (5'-TGCACCCAGGGGTGAA CTC-3'), CD14 sense (5'-TAAAGGACTGCCAGCCAAGC-3') and antisense (5'-AGCCAAGGCAGTTTGAGTGC-3'), CD11b sense (5'-CCAAGACGATCTCAGCATCA-3') and antisense (5'-TAGCAGGAAAGATGGGATG-3'), caspase-3 sense (5'-TTTTTC AGAGGGGATCGTTG-3') and antisense (5'-CGGCCTCC ACTGGTATTTTA-3'). PCR was performed by using Taq DNA polymerase for 25 cycles under the following conditions: 95°C, 30 s; 60°C, 30 s; 72°C, 60 s. PCR products were analyzed by 2% agarose gel electrophoresis.

Flow cytometry

Erythroid differentiation of CD34⁺ cells was evaluated by flow cytometry using both monoclonal anti-CD71-FITC and anti-

CD235a-R-phycoerythrin (R-PE) antibodies. Cells were washed and resuspended in PBS containing 0.5% BSA and sorted using a FACS-Vantage (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France). The quantitative evaluation of cell populations was performed using a computer-based program (Cell Quest, Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France).

Statistics

Mean values of triplicate determinations were given with standard errors of the mean (s.e.m.). The statistical significance of differences was calculated using Student's *t*-test. *P*-values referring to corresponding controls are indicated in the figure legends (**P* < 0.05, ***P* < 0.02, ****P* < 0.01).

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Ligue Nationale contre le Cancer (Comité de la Haute-Marne).

References

- Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 1997; **389**: 77–81.
- Fassina G, Ferrari N, Brigati C, Benelli R, Santi L, Noonan DM *et al*. Tissue inhibitors of metalloproteinases: regulation and biological activities. *Clin Exp Metastasis* 2000; **18**: 111–120.
- Lambert E, Dasse E, Haye B, Petitfrere E. TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Onc Hematol* 2004; **49**: 187–198.
- Hayakawa T, Yamashita K, Kishi J, Harigaya K. Tissue inhibitor of metalloproteinases from human bone marrow stromal cell line KM 102 has erythroid-potentiating activity, suggesting its possibly bifunctional role in the hematopoietic microenvironment. *FEBS Lett* 1990; **268**: 125–128.
- Avalos BR, Kaufman SE, Tomonaga M, Williams RE, Golde DW, Gasson JC. K562 produce and respond to human erythroid-potentiating activity. *Blood* 1988; **71**: 1720–1725.
- Westbrook CA, Gasson JC, Gerber SE, Selsted ME, Golde DW. Purification and characterization of human T-lymphocyte derived erythroid-potentiating activity. *J Biol Chem* 1984; **259**: 9992–9996.
- Hayakawa T, Yamashita K, Tanzawa K, Uchijima E, Iwata K. Growth promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells. A possible new growth factor in serum. *FEBS Lett* 1992; **298**: 29–32.
- Obinata M, Yanai N. Cellular and molecular regulation of an erythropoietic inductive microenvironment (EIM). *Cell Str Funct* 1999; **24**: 171–179.
- Zermati Y, Garrido C, Amsellem S, Fishelson S, Bouscary D, Valensi F *et al*. Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. *J Exp Med* 2001; **193**: 247–254.
- Carlisle GW, Smith DH, Wiedmann M. Caspase-3 has a non-apoptotic function in erythroid maturation. *Blood* 2004; **103**: 4310–4316.
- Guedez L, Martinez A, Zhao S, Vivero A, Pittaluga S, Stetler-Stevenson M *et al*. Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) promotes plasmablastic differentiation of a Burkitt lymphoma cell line: implications in the pathogenesis of plasmacytic/plasmablastic tumors. *Blood* 2005; **105**: 1660–1668.
- Petitfrere E, Kadri Z, Boudot C, Sowa ML, Mayeux P, Haye B *et al*. Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in tissue inhibitor of metalloproteinases-1-induced erythroid differentiation. *FEBS Lett* 2000; **485**: 117–121.
- Uddin S, Ah-Kang J, Ulaszek J, Lahlud D, Wickrema A. Differentiation stage-specific activation of p38 mitogen-activated protein kinase isoforms in primary human erythroid cells. *PNAS* 2004; **101**: 147–152.
- Ono K, Han J. The p38 signal transduction pathway. Activation and function. *Cell Signal* 2000; **12**: 1–13.

- 15 Han J, Lee JD, Jiang Y, Li Z, Feng L, Ulevitch RJ. Characterization of the structure and function of a novel MAP kinase kinase (MKK6). *J Biol Chem* 1996; **271**: 2886–2891.
- 16 Blank JL, Gerwins P, Elliott EM, Sather S, Johnson GL. Molecular cloning of mitogen-activated protein/ERK kinase kinases (MEKK) 2 and 3. Regulation of sequential phosphorylation pathway involving mitogen-activated protein kinase c-Jun Kinase. *J Biol Chem* 1996; **271**: 5361–5368.
- 17 Widman C, Gerwins P, Lassignal Jonhson N, Jarpe MB, Johnson GL. MEK kinase 1, a substrate for DEVD-directed caspases, is involved in genotoxin-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 1998; **25**: 7412–7422.
- 18 Alonso G, Ambrosino C, Jones M, Nebreda AR. Differential activation of p38 mitogen-activated protein kinase isoforms depending on signal strength. *J Biol Chem* 2000; **275**: 40641–40648.
- 19 Kadri Z, Maouche-Chretien L, Rooke HM, Orkin SH, Romeo PH, Mayeux P *et al*. Phosphatidylinositol 3-kinase /Akt induced by erythropoietin renders the erythroid differentiation factor GATA-1 competent for TIMP-1 gene transactivation. *Mol Cell Biol* 2005; **25**: 7412–7422.
- 20 Lambert E, Boudot C, Kadri Z, Soula-Rothhut M, Sowa ML, Mayeux P *et al*. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 signalling pathway leading to erythroid cell survival. *Biochem J* 2003; **372**: 767–774.
- 21 Haviernik P, Lahoda C, Bradley HL, Hawley TS, Ramezani A, Hawley RG *et al*. Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 overexpression in M1 myeloblasts impairs IL-6-induced differentiation. *Oncogene* 2004; **23**: 9212–9219.
- 22 Sordet O, Rebe C, Plenchette S, Zermati Y, Hermine O, Vainchenker W *et al*. Specific involvement of caspases in the differentiation of monocytes into macrophages. *Blood* 2002; **100**: 4446–4453.
- 23 Mogi M, Togari A. Activation of caspases is required for osteoblastic differentiation. *J Biol Chem* 2003; **278**: 47477–47482.
- 24 De Botton S, Sabri S, Daugas E, Zermati Y, Guidotti JE, Hermine O *et al*. Platelet formation is the consequence of caspase activation within megakaryocytes. *Blood* 2002; **100**: 1310–1317.
- 25 Launay S, Hermine O, Fontenay M, Kroemer G, Solary E, Garrido C. Vital functions for lethal caspases. *Oncogene* 2004; **24**: 5137–5148.
- 26 Nagata Y, Todokoro K. Requirement of activation of JNK and p38 for environmental stress-induced erythroid differentiation and apoptosis and of inhibition of ERK for apoptosis. *Blood* 1999; **3**: 853–863.
- 27 Murate T, Hayakawa T. Multiple functions of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): new aspects in hematopoiesis. *Platelets* 1999; **10**: 5–16.
- 28 Parker CL, Finch RA, Hooper WC. The effect of cytochalasin B on chondrogenesis in chick limb-bud mesoderm cells grown *in vitro*. *In vitro* 1978; **14**: 606–615.
- 29 Carpentier Y, Mayer P, Bobichon H, Desoize B. Cofactors in *in vitro* induction of apoptosis in HL60 cells by all-*trans* retinoic acid (ATRA). *Biochem Pharmacol* 1998; **55**: 177–184.



Contents lists available at ScienceDirect

The International Journal of Biochemistry & Cell Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biocel

TIMP-1 binding to proMMP-9/CD44 complex localized at the cell surface promotes erythroid cell survival

Elise Lambert^{*,1}, Lucie Bridoux¹, Jérôme Devy, Emilie Dassé, Marie-Line Sowa, Laurent Duca, William Hornebeck, Laurent Martiny, Emmanuelle Petitfrère-Charpentier

Université de Reims Champagne-Ardenne (URCA), CNRS UMR 6237 (MEDyC), Laboratoire Signalisation et Récepteurs Matriciels (SiRMa), IFR53 Interactions Cellules-Microenvironnement: Cancer, Inflammation, Infections, Vieillesse, UFR Sciences Exactes et Naturelles et UFR Médecine, BP 1039, 51687 Reims, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 May 2008

Received in revised form 7 October 2008

Accepted 10 October 2008

Available online 25 October 2008

Keywords:

TIMP-1

proMMP-9

CD44

Receptor

Erythroid cell survival

ABSTRACT

Besides its ability to inhibit MMP activity, TIMP-1 exhibits other biological functions. We earlier reported that TIMP-1 induced UT-7 erythroid cell survival through activation of the JAK2/PI 3-kinase/Akt pathway and we now aim to determine whether the TIMP-1 anti-apoptotic effect requires MMP involvement. We first show that proMMP-9 was expressed in UT-7 cells and associated with the cell plasma membrane. Such proMMP-9 localization was crucial for TIMP-1 intracellular signalling since (i) TIMP-1 specifically bound to proMMP-9 and (ii) proMMP-9 silencing abrogated the TIMP-1 effect. We also demonstrated that TIMP-1 anti-apoptotic effect was independent on MMP inhibition since MMP-9 function blocking antibodies as well as a synthetic MMP inhibitor were unable to reproduce TIMP-1 effect. Nevertheless, these compounds prevented TIMP-1 binding to proMMP-9 and subsequently abolished TIMP-1-induced cell survival. We finally demonstrated that CD44 anchored proMMP-9 to the plasma membrane and enabled TIMP-1-mediated signal transduction. Therefore, our results indicate that the anti-apoptotic signalling of TIMP-1 depends on the formation of a ternary complex between TIMP-1, proMMP-9 and CD44 at the UT-7 erythroid cell surface.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The extracellular matrix (ECM) not only constitutes the tissue framework but also plays a dynamic role by interacting with the surrounding cells. These cell–matrix interactions enable cell–cell communications, thus regulating cellular functions such as proliferation, differentiation and survival (for reviews Tsilibary, 2003; Arai et al., 2005). Both normal development and function of the organism require ECM turnover and remodeling which involve the activity of neutral proteases such as the matrix metalloproteinases (MMPs). The role of MMPs has been widely documented in many physiological and pathological processes including angiogenesis and tumor invasion (Massova et al., 1998). Most MMPs are secreted as latent precursor forms (proMMPs) making enzyme activation a critical step in the regulation of MMP proteolytic activity. One of the

critical determinant for optimal MMP function relies on its localization at the cell surface (Sternlicht and Werb, 2001). Indeed, MMPs can transiently localize at the cell periphery in association with adhesion receptors or proteoglycans before being activated. Such mechanism has been described for proMMP-9 and MMP-9 in normal and malignant cells and their specific localization has notably been reported to involve CD44 glycoprotein (Yu and Stamenkovic, 1999, 2000, 2004; Toth et al., 1997; Fridman et al., 2003; Redondo-Munoz et al., 2008).

CD44 is an adhesion molecule expressed at the cell surface of many cells including the hematopoietic cells. The common form of CD44 expressed by the majority of hematopoietic cells is 85–90 kDa glycoprotein. Nevertheless, various isoforms of CD44 might be expressed depending on the state of differentiation of normal hematopoietic cells and their expressions might be down-regulated or upregulated in their leukemic counterparts (Kansas et al., 1990; Ghaffari et al., 1995, 1999). Accumulating evidence has demonstrated that CD44 overexpression is associated with tumor progression and metastasis of multiple cancers through the activation of survival signalling pathway (Bourguignon et al., 2003; Wang et al., 2007).

MMP activity is also tightly controlled by several endogenous inhibitors, among them the most thoroughly studied, the Tissue

Abbreviations: TIMP-1, tissue inhibitor of metalloproteinases-1; MMP, matrix metalloproteinase.

* Corresponding author at: URCA, CNRS UMR 6237 (MEDyC), Laboratoire Signalisation et Récepteurs Matriciels (SiRMa), Moulin de la Housse, 51687 Reims Cedex 2, France. Tel.: +33 3 26 91 32 69; fax: +33 3 26 91 83 66.

E-mail address: elise.lambert@univ-reims.fr (E. Lambert).

¹ These authors contributed equally to this study.

Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs). The four TIMPs form 1:1 stoichiometric complexes with MMPs and reversibly block their proteolytic activity (Gomez et al., 1997). Numerous studies have underlined a tight link between TIMP-1 and proMMP-9/MMP-9 expression in the hematopoietic cell lineage, but their expression is not always coordinated. For instance, we previously showed that erythropoietin (Epo) induced TIMP-1 secretion and inhibited proMMP-9 secretion in the culture medium of erythroleukemic cells (Kadri et al., 2000). On the contrary, simultaneous MMP-9 and TIMP-1 secretion was observed in normal human bone marrow hematopoietic precursors and long-term marrow cultures of acute myelogenous leukemia (AML) patients (Marquez-Curtis et al., 2001). This concomitant TIMP-1 and MMP-9 regulation has been suggested to play a crucial role in various biological effects and notably cell proliferation (Janowska-Wieczorek et al., 2000; Marquez-Curtis et al., 2001).

Besides its ability to inhibit MMPs, TIMP-1 exhibits other biological functions (Lambert et al., 2004; Stetler-Stevenson, 2008). TIMP-1 is present in serum and behaves as a growth factor for different cell types including keratinocytes, fibrosarcoma cells and fibroblasts (Bertaux et al., 1991; Corcoran and Stetler-Stevenson, 1995; Hayakawa et al., 1992). In addition to its mitogenic effect, TIMP-1 also displays anti-apoptotic activity for hepatic stellate cells, TIMP-1-negative Burkitt's lymphoma cell lines, human breast keratocytes and mammary epithelial cells (Guedez et al., 1998; Lee et al., 2003; Murphy et al., 2002, 2004; Porter et al., 2004; Matthews et al., 2007; Li et al., 2008). Mitogenic and anti-apoptotic activities of TIMP-1 are tissue specific and probably involve distinct mechanisms. Indeed, Ras and its downstream effector Raf-1 are involved in TIMP-1-induced osteosarcoma cell proliferation and activation of the focal adhesion kinase FAK and PI 3-kinase/Akt signalling cascades lead to TIMP-1-promoted breast epithelial cell survival (Wang et al., 2002; Liu et al., 2003). In that line, we reported that TIMP-1 triggered survival of UT-7 erythroleukemic cells via the JAK2/PI 3-kinase/Akt pathway (Lambert et al., 2003).

Although TIMP-1 ability to activate intracellular signalling pathways is now well documented, the existence of a TIMP-1 receptor is still matter of debate. A recent study pointed out that CD63, a member of the tetraspanin family, was a TIMP-1 interacting protein at the human breast epithelial MCF10A cell surface. In these cells, TIMP-1 modulated cell polarization and survival via a CD63/integrin signalling complex (Jung et al., 2006). We here investigate the involvement of MMPs, and particularly MMP-9, in TIMP-1 anti-apoptotic effect. We show that proMMP-9 is localized at the UT-7 cell surface through CD44 anchorage and both proteins are crucial for TIMP-1-induced cell survival. Furthermore, we demonstrate that TIMP-1 directly interacts with proMMP-9 and that TIMP-1 anti-apoptotic effect is independent on MMP-9 inhibition. Our data highlight the biological importance of the proMMP-9/CD44 complex present at the plasma membrane in directing TIMP-1-induced intracellular signalling leading to erythroid cell survival.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and antibodies

Human recombinant TIMP-1 and proMMP-9, MMP-I-1, anti-MMP-9 (Ab-1) (for immunoprecipitation or inhibition of MMP-9 activity), anti-MMP-9 (Ab-7) (for immunoblot of both latent and active forms), anti-MMP-2 (Ab-6) (for immunoprecipitation or inhibition of MMP-2 activity), anti-TIMP-1 and anti-CD44 (for immunocytochemistry) antibodies were purchased from Calbiochem-Novabiochem (San Diego, CA, USA). Anti-MMP-9

propeptide region antibodies were obtained from Chemicon (Mundolsheim, France). Anti-phospho-Akt (Thr-308), Akt, anti-(rabbit IgG)-horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies were obtained from New England Biolabs (Beverly, MA, USA). Anti-CD44 antibody used for immunoprecipitation was from Abcam (Paris, France). Human purified recombinant erythropoietin (Epo) (specific activity of 120,000 U/mg), annexin-V-FLUOS and propidium iodide were purchased from Roche Molecular Biochemicals (Meylan, France). α -Minimal essential (α -MEM) and Iscove's modified Dulbecco's media (IMDM) were from Life Technologies (Cergy-Pontoise, France). OptiMEM[®]I was from GibcoBRL and goat anti-rabbit, anti-mouse, anti-rat secondary antibodies (IgG) conjugated to Alexa Fluor 568 and 488, were purchased from Molecular Probes (Invitrogen). Goat anti-rat and anti-mouse secondary antibodies (IgG) conjugated to Cyanine (Cy2) and Indodicarbocyanine (Cy5) respectively, were from Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. (Interchim, Montluçon, France). Renaissance Kit, used for western blot analysis, was from NEN Life Sciences Products (Paris, France). EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin and free D-Biotin were from Perbio Science France SAS (Brebieres, France). Streptavidin-horseradish peroxidase conjugate RPN 1231 was obtained from Amersham Biosciences (Freiburg, Germany). All other reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

2.2. Cell culture and stimulation

UT-7 Epo-dependent erythroid cells were cloned from the human leukemic cell line UT-7 (Komatsu et al., 1991). These cells were cultured in α -MEM containing 10% (v/v) fetal calf serum (FCS), 2 mM L-glutamine and 0.5 U/ml Epo. To study signal transduction, cells were serum- and growth factor-deprived by incubation overnight in IMDM supplemented with 0.2% (v/v) deionized bovine serum albumin, 2 mM L-glutamine and 20 μ g/ml human holotransferrin. Cells were then incubated in IMDM containing 5 ng/ml TIMP-1 or TIMP-2 for 5 min at 37°C. The reaction was stopped by adding ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) containing 50 μ M sodium orthovanadate (Na_3VO_4). In some experiments, cells were incubated for 1 h under non-reducing conditions with anti-MMP-9 (Ab-1) or anti-MMP-2 (Ab-6) function-blocking antibodies (2 μ g/ml) or MMP-I-1 inhibitor (30 μ M) before analysis. The concentrations of anti-MMP-9 antibodies and MMP-I-1 have been chosen following specific substrate degradation assays (Suppl. data Fig. 1).

2.3. Whole cell extracts and immunoprecipitation

Following stimulation, cells (1×10^6) were washed twice with PBS containing 50 μ M Na_3VO_4 , pelleted and solubilized by adding 80 μ l Laemmli sample buffer to obtain whole cell extracts. The total quantity of proteins loaded for Western blot analysis was 80–100 μ g. To prepare cell lysates for immunoprecipitation, cells (1×10^7) were lysed for 15 min at 4°C with 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10% (v/v) glycerol, 1% (v/v) Brij 98, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 10 μ g/ml leupeptin, 10 μ g/ml aprotinin and 1 mM Na_3VO_4 , pH 7.4. Insoluble material was then removed by centrifugation (15,800 \times g, 20 min) and supernatants were subjected to protein quantification using BCA kit (Interchim, Montluçon, France). Equal amount of proteins (750–1000 μ g) were used for immunoprecipitation with specific antibodies at a concentration of 2 μ g/ml, as previously described (Boudot et al., 1999). Samples were analysed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blot.

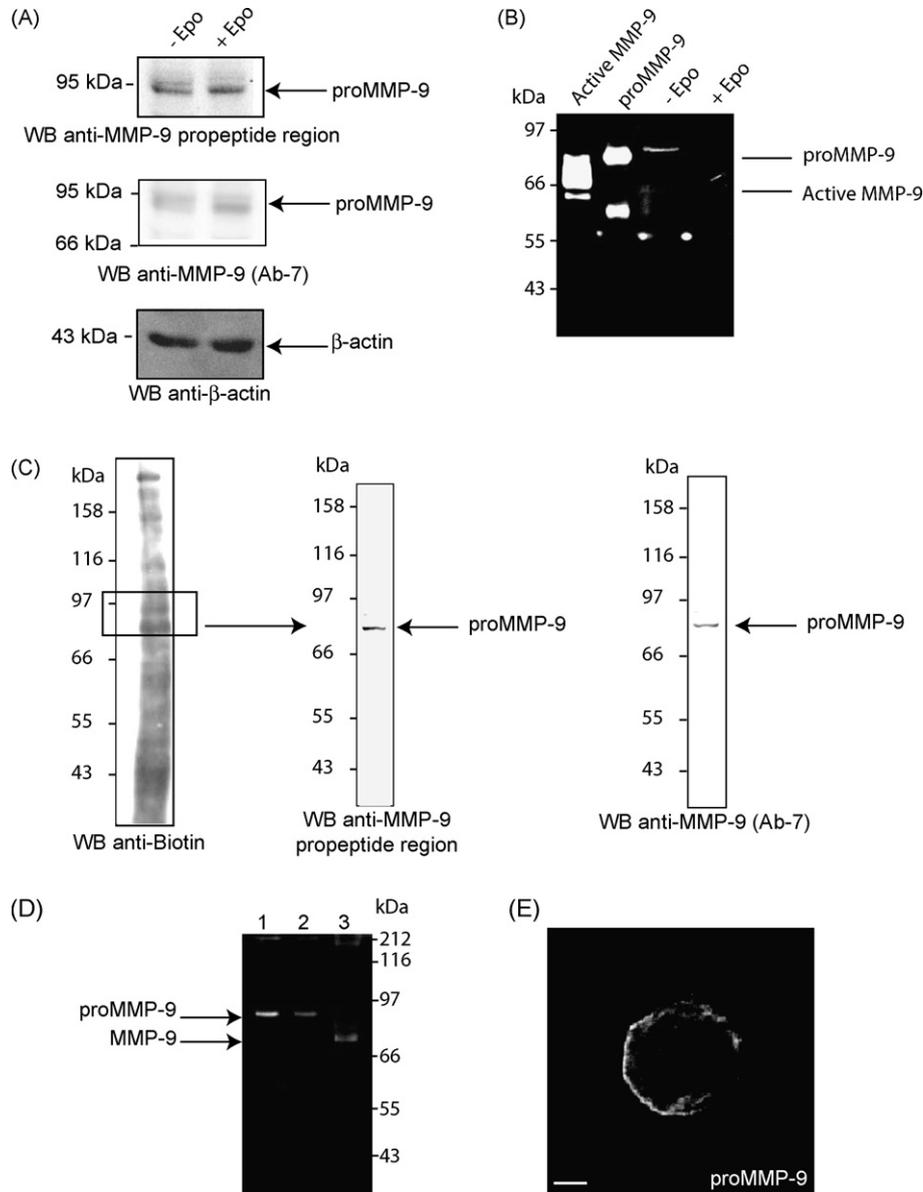


Fig. 1. proMMP-9 is localized at UT-7 cell surface. UT-7 cells were washed three times with Iscove's modified Dulbecco's media and cultured for 24 h in presence or not of 0.5 U/ml Epo. Total cell extracts were analysed by Western blot using anti-MMP-9 propeptide region antibodies or anti-MMP-9 antibodies (Ab-7) raised against both active and latent forms of MMP-9 (A). Culture medium of 4×10^4 cells was assayed for gelatinases activity by gelatin zymographic analysis for 48 h. AminoPhenylMercuric Acetate (APMA)-activated MMP-9 and proMMP-9 have been loaded as controls (lane 1: 0.5 ng activated MMP-9; lane 2: 0.5 ng proMMP-9; lane 3: culture medium of untreated cells; lane 4: culture medium of Epo-treated cells). It is important to notice that depending on the APMA efficiency to activate proMMP-9, various cleaved isoforms can be detected (lane 1). Moreover, using recombinant proMMP-9, a gelatinolytic activity can be detected around 55 kDa without any activation (lane 2). Representative zymogram is shown (B). UT-7 cell surface proteins were biotinylated and revealed with streptavidin-HRP-conjugate (left). The quadrant indicates the localization of proMMP-9 or MMP-9 proteins. Immunoblotting with anti-MMP-9 propeptide region antibodies and anti-MMP-9 antibodies raised against both active and latent forms of MMP-9 (Ab-7) were then performed (C). Biotinylated UT-7 cell surface proteins were analysed by gelatin zymography (lane 1: proMMP-9 control; lane 2: biotinylated proteins; lane 3: MMP-9 control) (D). UT-7 cells were attached to poly-L-lysine-coated coverslips and fixed with paraformaldehyde. proMMP-9 was detected using anti-MMP-9 propeptide region antibodies and observed using a confocal laser scanning microscope. Scale bar: 11.5 μ m (E).

2.4. Western blotting

After SDS-PAGE, proteins were transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was then blocked with 5% (w/v) non-fat dry milk in 50 mM Tris-HCl pH 7.5 containing 150 mM NaCl and 0.1% (v/v) Tween 20 (TBST) for 2 h at room temperature. The blot was then incubated overnight at 4 °C with primary antibodies. After five washes with TBST, the blot was incubated with anti-(rabbit, mouse or rat) IgG-horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies. Immunoblotting was detected by adding Enhanced ChemiLuminescence substrate solution and further exposed to Kodak X-Omat film. When necessary, the

blot was stripped by incubation for 30 min at 55 °C in 62.5 mM Tris-HCl pH 6.7 containing 100 mM β -mercaptoethanol and 2% (w/v) SDS, then washed five times with TBST and treated as described.

2.5. Gelatin zymographic analysis

After SDS-PAGE containing 0.1% (w/v) gelatin, gels were washed with 2.5% (v/v) Triton X-100 for 30 min at room temperature and then incubated for 16–48 h at 37 °C with substrate buffer (52 mM Tris-HCl pH 7.2, 0.2 M NaCl, 5 mM CaCl_2 and 0.01% (v/v) Triton X-100). Proteinase activity corresponds to zone clear-

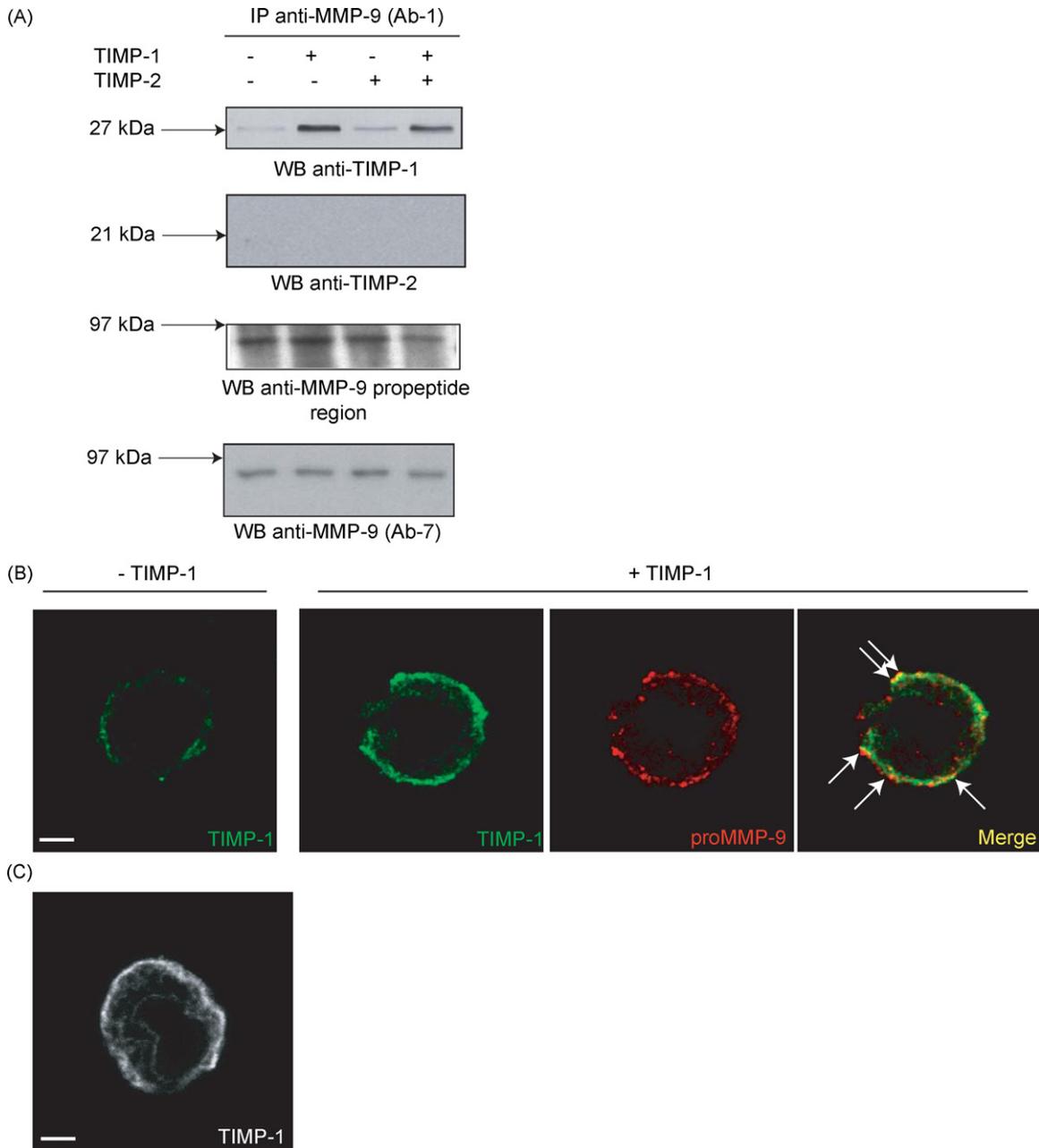


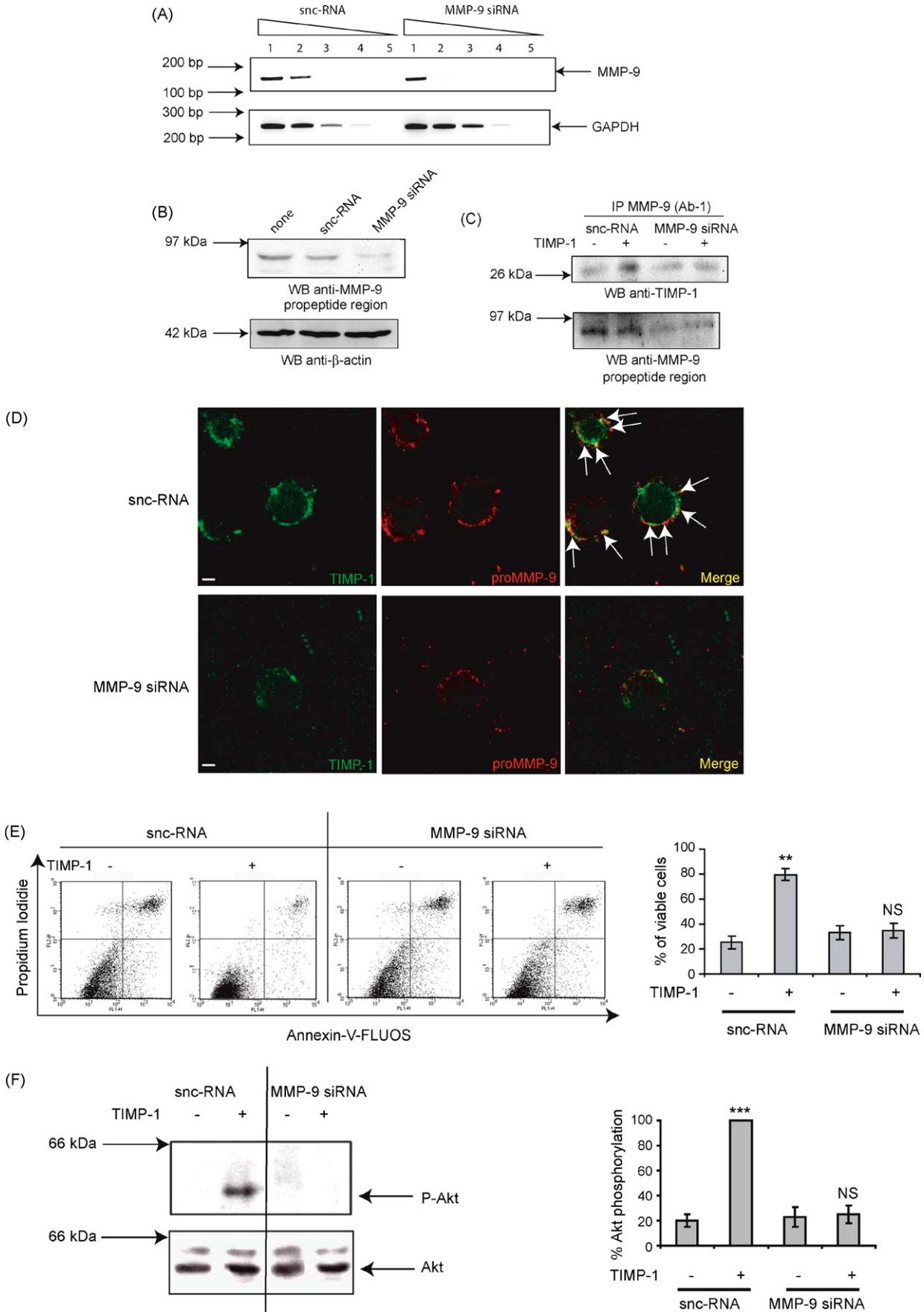
Fig. 2. TIMP-1 binds to proMMP-9 at the UT-7 cell surface. Serum- and Epo-deprived UT-7 cells were stimulated for 5 min with 5 ng/ml TIMP-1 and/or TIMP-2. UT-7 cell surface proteins were then labelled with sulfo-NHS-biotin. Purified biotinylated proteins were immunoprecipitated with anti-MMP-9 (Ab-1) antibodies under non-reducing conditions and analysed by Western blot using anti-TIMP-1, anti-TIMP-2, anti-MMP-9 propeptide region or anti-MMP-9 (Ab-7) antibodies. Representative blots are shown (A). Serum- and Epo-deprived UT-7 cells were attached to poly-L-lysine-coated coverslips, then stimulated for 5 min with 5 ng/ml TIMP-1 and then fixed with paraformaldehyde. TIMP-1 and proMMP-9 were detected using anti-TIMP-1 and anti-MMP-9 propeptide region antibodies respectively and observed using a confocal laser scanning microscope. White arrows indicate colocalization sites (B). Serum- and Epo-deprived UT-7 cells were attached to poly-L-lysine-coated coverslips, stimulated for 1 h with 5 ng/ml TIMP-1 and then fixed with paraformaldehyde. TIMP-1 was detected using anti-TIMP-1 antibodies and observed using a confocal laser scanning microscope. Scale bar: 11.5 μ m (C).

ance in a Coomassie blue-stained gel (Makowski and Ramsby, 1996).

2.6. Biotinylation of cell surface proteins

After stimulation, cells (1×10^7) were washed twice with PBS containing 50 μ M Na_3VO_4 and surface proteins were then labelled with 2.5 ml of 500 μ g/ml Sulfo-NHS-Biotin (a cell-impermeable biotin analogue) in PBS under gentle shaking at 4°C for 30 min. Cells were washed twice with 5 ml PBS and then incubated with 5 ml of 100 mM glycine/PBS (pH 7.2) for 20 min under gentle shak-

ing at 4°C. Cells were washed three times with 5 ml PBS and then lysed with 1 ml buffered detergent (50 mM sodium phosphate (pH 8.0), 300 mM NaCl, 1% (v/v) NP40, 1 mM PMSF, 10 μ g/ml leupeptin, 10 μ g/ml aprotinin and 1 mM Na_3VO_4). Insoluble material was then removed by centrifugation ($15,800 \times g$, 4°C, 20 min). Protein concentration was evaluated using the BCA protein assay kit and diluted to a concentration of 750 μ g/ml. One ml of diluted lysate was added to 40 μ l ImmunoPure immobilized monomeric avidin gel (Pierce) and incubated overnight at 4°C on a rotator. Avidin gel was then washed five times with detergent buffer ($10,000 \times g$, 4°C, 30 s). Free D-Biotin (40 μ l of 10 mM solution in



PBS) was added overnight at 4°C to compete with bound proteins. Aliquots (30 µl) were analysed by gelatin zymography or Western blot using Streptavidin-HRP conjugate or immunoprecipitated with anti-MMP-9 (Ab-1) antibodies under non-reducing conditions.

2.7. Flow cytometry

Cells were incubated with 5 ng/ml TIMP-1 or anti-MMP-9 (Ab-1) or anti-MMP-2 (Ab-6) (2 µg/ml) function-blocking antibodies or MMP-I-1 inhibitor (30 µM) for 24 h, then washed twice with PBS, and resuspended for 15 min in 100 µl labelling solution (10 mM HEPES pH 7.4, 140 mM NaCl, 5 mM CaCl₂) containing 2 µl annexin-V-FLUOS and 0.1 µg propidium iodide. The reaction was stopped by adding 400 µl buffer (10 mM HEPES pH 7.4, 140 mM NaCl and 5 mM CaCl₂). Cells were then analysed by the FACS Calibur System (Becton Dickinson). The quantitative evaluation of cell populations was performed using a computer-based program (Cell Quest, Becton Dickinson).

2.8. Immunofluorescence

Suspended cells (2 × 10⁵ cells/ml) were allowed to adhere for 1 h to poly-L-lysine-coated coverslips. In some experiments, cells were pre-incubated, in the same time, under non-reducing conditions with anti-MMP-9 (Ab-1) or anti-MMP-2 (Ab-6) function-blocking antibodies (2 µg/ml) or MMP-I-1 inhibitor (30 µM). Cells were then stimulated for 5 min or 1 h with TIMP-1 (5 ng/ml), washed with PBS and then fixed for 10 min at room temperature in 4% (p/v) paraformaldehyde prepared extemporaneously in PBS (pH 7.4). After 3 washes for 5 min with PBS, non-specific sites were then blocked by incubation for 1 h in 2% (v/v) goat serum and 1% (w/v) BSA in PBS. Anti-proMMP-9 and/or anti-TIMP-1 and/or anti-CD44 antibodies were added (dilution 1:50, 1:100 and 1:50 respectively in blocking solution) for 2 h at room temperature. Cells were then washed 3 times for 5 min with PBS and then incubated for 1 h with goat anti-rabbit, anti-mouse or anti-rat secondary antibodies (IgG) conjugated to Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 488 or Cy5 and Cy2 (dilution 1:500 in blocking solution). After 3 washes with PBS for 5 min and one wash with distilled water, coverslips were mounted on slides in citifluor antifading solution (Agar, Essex, UK). The localization of proMMP-9, TIMP-1 and CD44 at cell surface was observed using a confocal laser scanning microscope (Leica SP2 AOBs, Heidelberg, Germany).

2.9. siRNA experiments

Small interfering RNAs (siRNAs) were 21 nucleotides long with symmetric 2-nucleotide 3' overhangs composed of 2'-deoxythymidine to enhance nuclease resistance. The siRNAs

were synthesized chemically and purified by HPLC (Eurogentec, Liège, Belgium). Sense MMP-9 siRNA sequence was 5'-CAUCACCAUUAUGGAUCCAAAdTdT-3' and anti-sense MMP-9 siRNA was 5'-UUGGAUCCAAUAGGUGAUGdTdT-3' according to published sequences (Sanceau et al., 2003). Sense CD44 siRNA sequence was 5'-UGACACAUUUGCUUCAAdTdT-3' and anti-sense CD44 siRNA sequence was 5'-AUUGAAGCAAUUGUGUCAdTdT-3'. For siRNAs annealing, mixture of complementary single stranded RNAs (at equimolar concentration) was incubated in annealing buffer (50 mM Tris pH 7.5–8.0, 100 mM NaCl in DEPC-treated water) for 2 min at 95°C followed by a slow cooling to room temperature (at least 25°C) and then proceeded to storage temperature of –20°C. For electroporation, UT-7 cells in exponential phase of growth were washed twice with Opti-MEM®I and resuspended to a final concentration of 1 × 10⁷ cells/ml in the same medium. Subsequently, 0.4 ml of cell suspension was mixed with 100 nM double-stranded RNA (siRNA), and electroporated using a Biorad Gene Pulser II (280 V, 250 µF). Silencer negative control siRNA (snc-RNA) sequences (Eurogentec) were used as negative control under similar conditions (100 nM).

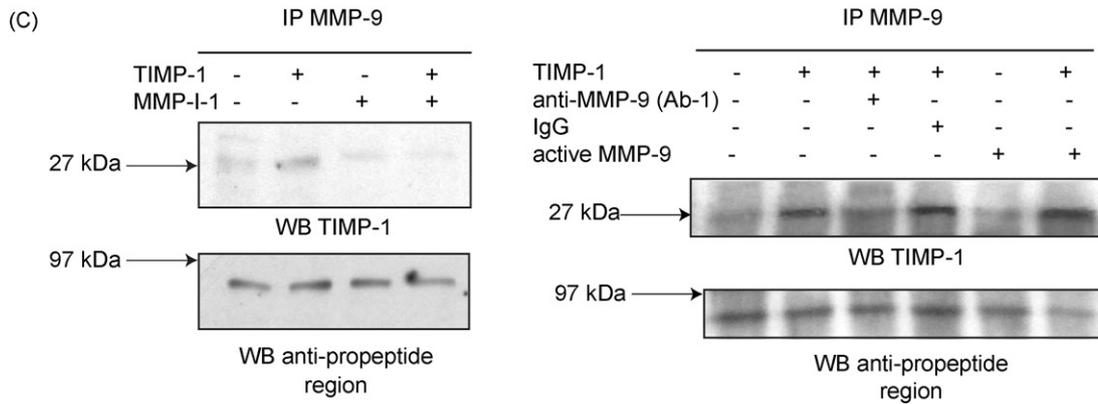
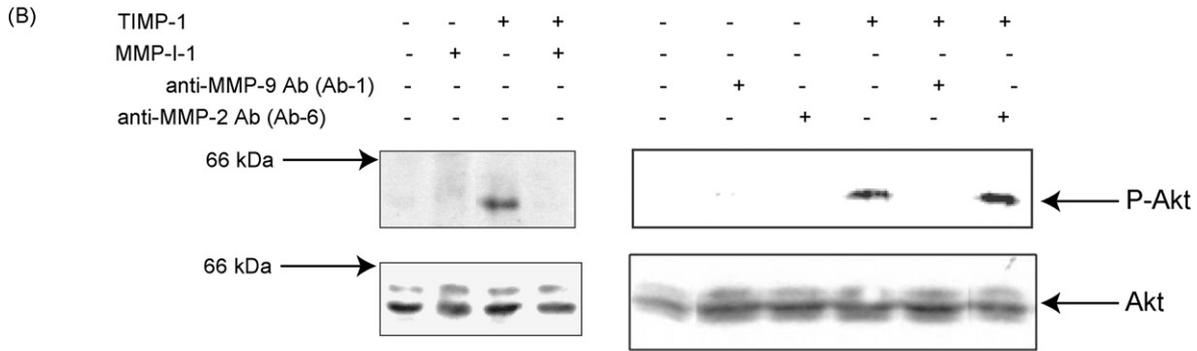
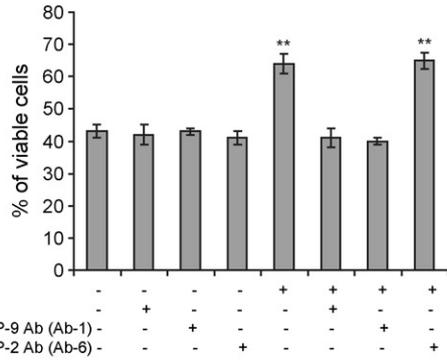
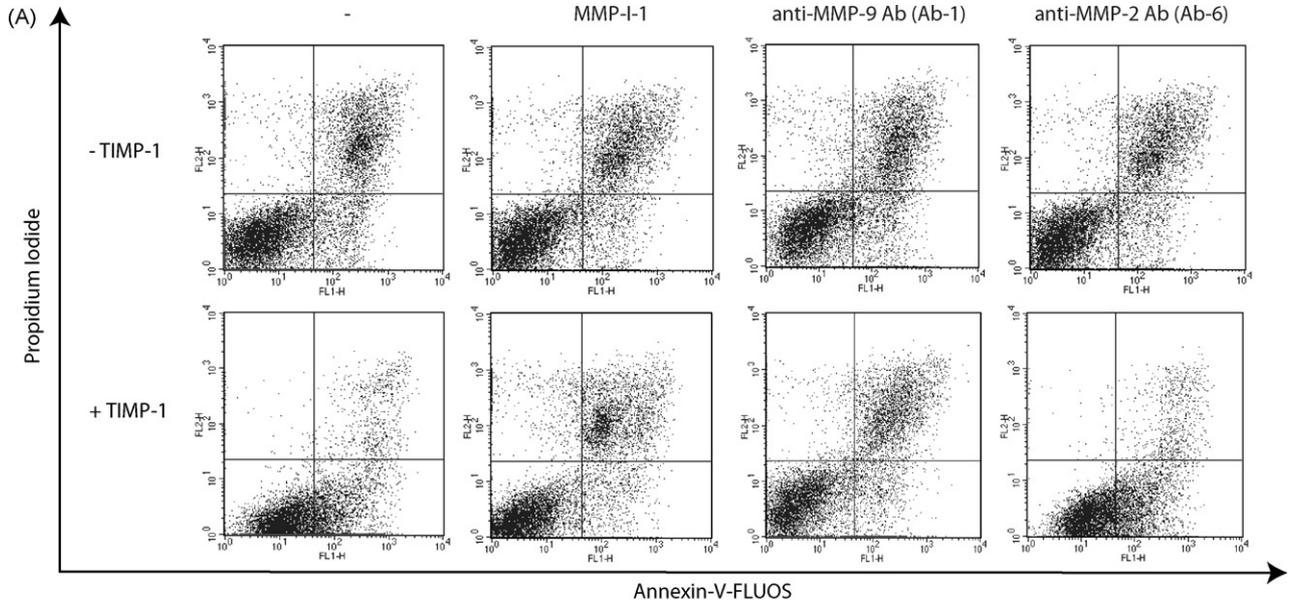
2.10. Semi-quantitative reverse-transcriptase-polymerase (RT-PCR) analysis

RNA extraction from UT-7 cells was performed using the RNeasy Mini Kit® from Qiagen (Courtaboeuf, France). Subsequent cDNA syntheses were conducted using 1 µg total RNA, as recommended by the Reverse Transcriptase manufacturer (ABgene, Courtaboeuf, France). Progressive dilutions of cDNA (1/10, 1/100, 1/1000, 1/10,000, 1/100,000) were subjected to PCR amplification to detect MMP-9, CD44 and GAPDH cDNA. MMP-9 cDNA was amplified using the sense primer 5'-GGAATGATCTAAGCCCAGCG-3' and the antisense primer 5'-GTGCGTCTTCCCTTACTTTCCT-3'. CD44 cDNA was amplified using the sense primer 5'-GTGATCAACAGTGGCAATGG-3' and the antisense primer 5'-CCACATTCTGCAGGTTCTT-3'. GAPDH RNA was used as an internal control. The PCR products were analysed by electrophoresis in 2% (w/v) agarose gel containing 0.2 µg/ml ethidium bromide. The Quantity One software was used for the analysis.

2.11. Quantification and statistical analyses

Quantification of bands from Western blot or RT-PCR was performed by densitometry and subsequent analysis using Image-Quant software (Molecular Dynamics). Mean values of triplicate determinations were given with standard errors of the mean (S.E.M.). The statistical significance of differences was calculated using student's *t* test. *P* values referring to corresponding controls are indicated in the figure legend (**P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001). The percentage of colocalized proteins of immunocytochemistry

Fig. 3. TIMP-1-induced cell survival is abolished in MMP-9 siRNA transfected cells. Diluted cDNAs from snc-RNA and MMP-9 siRNA cells were used as templates for PCR reactions using specific primers for MMP-9 and GAPDH RNA. A representative PCR result is shown. Lanes 1 to 5: PCRs of 10⁻¹ to 10⁻⁵ dilutions of total cDNA obtained from 1 µg reverse-transcribed total RNA (A). proMMP-9 expression in untransfected cells (none) and snc-RNA or MMP-9 siRNA transfected cells was determined by Western blot using anti-MMP-9 propeptide region antibodies. A representative blot is shown. The membrane was stripped and probed with anti-β-actin antibodies (B). snc-RNA and MMP-9 siRNA transfected cells (1 × 10⁷ cells) were deprived from serum and Epo for 16 h and then incubated for 5 min in presence of 5 ng/ml TIMP-1. Equal amount of cell surface biotinylated proteins (750–1000 µg) were then immunoprecipitated with MMP-9 (Ab-1) antibodies under non-reducing conditions and analysed by Western blot using anti-MMP-9 propeptide region antibodies or anti-TIMP-1 antibodies (C). snc-RNA and MMP-9 siRNA-transfected cells were allowed to adhere to poly-L-lysine-coated coverslips for 1 h, stimulated for 5 min with 5 ng/ml TIMP-1 and then fixed with paraformaldehyde. TIMP-1 and proMMP-9 localization was detected using anti-TIMP-1 and anti-MMP-9 propeptide region antibodies and observed using a confocal laser scanning microscope. White arrows indicate the colocalization sites. Scale bar: 11.5 µm (D). snc-RNA and MMP-9 siRNA transfected cells were deprived from serum and Epo for 16 h and then incubated for 24 h in presence of 5 ng/ml TIMP-1. Cell survival was determined by flow cytometry using double staining with Annexin-V-FLUOS and propidium iodide. Representative dot plots are shown on the left. Results are expressed as the percentage of viable cells and are the means ± S.E.M. of three separate experiments. ***P* < 0.01 compared with the percentage of viable cells in TIMP-1 unstimulated cells; NS: not significant (right) (E). snc-RNA and MMP-9 siRNA transfected cells were deprived from serum and Epo for 16 h and then stimulated for 5 min with 5 ng/ml TIMP-1. Whole cell extracts were analysed by SDS-PAGE and Western blot using anti-phospho-Akt antibodies. A representative blot is shown. Densitometric analysis is shown on the right of the Western blot result. ****P* < 0.001 compared with unstimulated snc-RNA-transfected cells; NS: not significant (F).



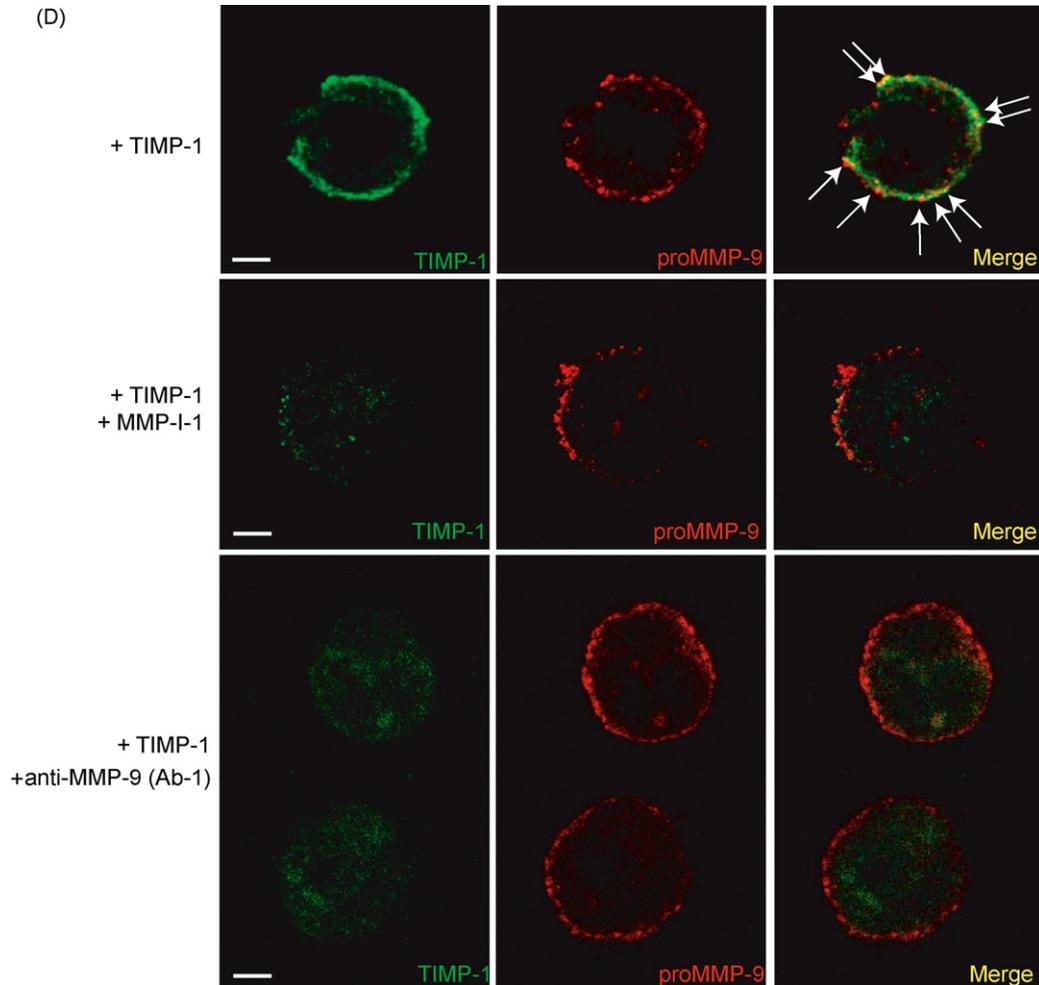


Fig. 4. (Continued).

analysis was evaluated by the colocalization analysis plugin of the Image J software.

3. Results

3.1. proMMP-9 is localized at the UT-7 cell surface

To delineate the putative involvement of MMP-9 in TIMP-1-mediated effect, we first examined proMMP-9/MMP-9 expression and secretion in UT-7 erythroleukemic cells incubated with or without 0.5 U/ml Epo for 24 h. By analysing proMMP-9 expression in whole cell extracts using antibodies raised against MMP-9 propeptide region, we demonstrated that UT-7 cells expressed proMMP-9 in presence or not of Epo (Fig. 1A). No other forms

of MMP-9 were detected by reprobating the membrane with MMP-9 antibodies (Ab-7) raised against both active MMP-9 and proMMP-9. However, consistent with our previous data, neither proMMP-9 nor MMP-9 was secreted into the culture medium of Epo-incubated UT-7 cells by opposite to unstimulated cells (Kadri et al., 2000) (Fig. 1B). Considering these results and data from the literature, we hypothesized that proMMP-9 detected in whole cell extracts could be retained at the cell plasma membrane. To clarify this assumption, we labelled the proteins present at the cell surface using Sulfo-NHS-biotin, a cell impermeable biotin analogue. Labelled proteins were then isolated on immobilized monomeric avidin gel and eluted by competition with free D-biotin. Labelled proteins were then detected using streptavidin-HRP conjugate (Fig. 1C). Among all the biotinylated proteins, proMMP-9 was

Fig. 4. MMP inhibitor and anti-MMP-9 function-blocking antibodies do not reproduce TIMP-1 effect, but block TIMP-1 interaction with proMMP-9 and abolish TIMP-1-induced erythroid cell survival. Serum- and Epo-deprived UT-7 cells were incubated for 24 h with 5 ng/ml TIMP-1 or 30 μ M MMP-I-1, 2 μ g/ml anti-MMP-9 (Ab-1) or anti-MMP-2 (Ab-6) function-blocking antibodies. Cell survival was determined by flow cytometry using double staining with Annexin-V-FLUOS and propidium iodide. Representative dot plots are shown on the left. Results are expressed as the percentage of viable cells and are the means \pm S.E.M. of three separate experiments. $^{**}P < 0.01$ compared with untreated cells (right) (A). Serum- and Epo-deprived cells were incubated for 1 h at 37 $^{\circ}$ C with either 30 μ M MMP-I-1, 2 μ g/ml anti-MMP-9 (Ab-1) or anti-MMP-2 (Ab-6) function-blocking antibodies under non-reducing conditions and then stimulated for 5 min with 5 ng/ml TIMP-1. Whole cell extracts (100 μ g) were analysed by SDS-PAGE and Western blot using anti-phospho-Akt antibodies. Representative blots are shown (B). Serum- and Epo-deprived UT-7 cells were incubated with or without 30 μ M MMP-I-1, 2 μ g/ml anti-MMP-9 function-blocking antibodies (Ab-1), 2 μ g/ml IgG or 10 ng/ml activated MMP-9 under non-reducing conditions for 1 h at 37 $^{\circ}$ C and then stimulated for 5 min with 5 ng/ml TIMP-1. Biotinylated-cell surface proteins were immunoprecipitated with anti-MMP-9 (Ab-1) antibodies under non-reducing conditions and analysed by Western blot. Representative blots are shown (C). UT-7 cells were attached to poly-L-lysine coated coverslips and incubated for 1 h with 30 μ M MMP-I-1 or 2 μ g/ml anti-MMP-9 function-blocking (Ab-1) antibodies under non-reducing conditions. Cells were then stimulated for 5 min with 5 ng/ml TIMP-1. TIMP-1 and proMMP-9 detection was performed using anti-TIMP-1 and anti-MMP-9 propeptide region antibodies and observed using a confocal laser scanning microscope. The labelling shown in Fig. 2B following TIMP-1 stimulation was used again as control. Scale bar: 11.5 μ m (D).

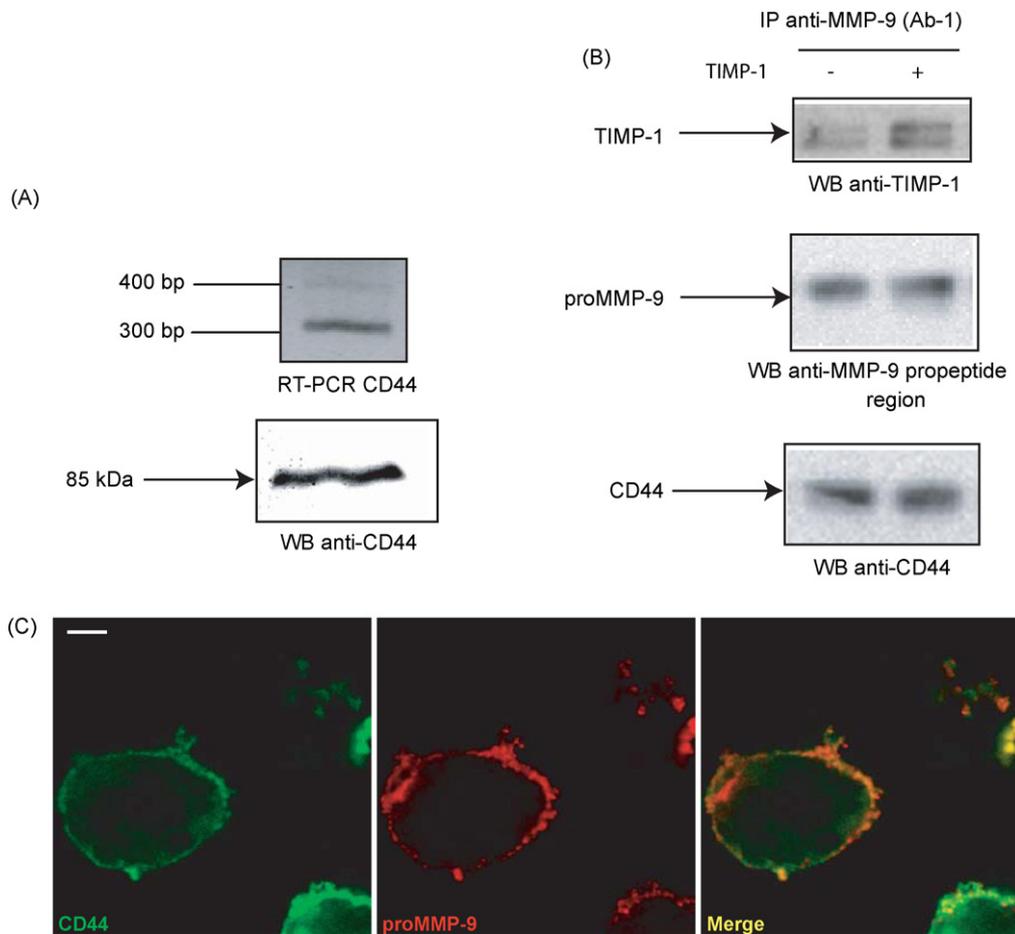


Fig. 5. CD44 colocalizes with proMMP-9 at the UT-7 cell surface. UT-7 cells were cultured for 2 days with 0.5 U/ml Epo and total RNA or whole cell extracts were analysed by RT-PCR analysis using CD44 primers or Western blot using anti-CD44 antibodies (A). UT-7 cell surface proteins were labelled with sulfo-NHS-biotin. Purified biotinylated proteins were immunoprecipitated with anti-MMP-9 (Ab-1) antibodies under non-reducing conditions and analysed by Western blot using anti-TIMP-1, anti-MMP-9 propeptide region and anti-CD44 antibodies. Representative blots are shown (B). UT-7 cells were attached to poly-L-lysine-coated coverslips and fixed with paraformaldehyde. CD44 and proMMP-9 were detected using anti-CD44 and anti-MMP-9 propeptide region antibodies respectively and observed using a confocal laser scanning microscope. Scale bar: 11.5 μ m (C).

identified by Western blot using anti-MMP-9 antibodies directed against the propeptide domain. Also, using anti-MMP-9 (Ab-7) antibodies which recognized both latent and active forms of MMP-9, the active form was never detected, thus confirming that this enzyme form was not present at the cell surface. Cell surface biotinylated proteins were then immunoprecipitated with anti-MMP-9 (Ab-1) antibodies recognizing both latent and active forms under non-reducing conditions and MMPs were detected by gelatin zymography. Once again, the MMP-9 zymogen, but not the enzyme active form, was identified in the plasma membrane extracts (Fig. 1D). In addition, neither MMP-2 nor proMMP-2 was detected. Immunofluorescent staining revealed proMMP-9 localized at the UT-7 cell membrane (Fig. 1E). No signal was detected with either control IgG, secondary antibodies alone or anti-MMP-2 antibodies. All together, these results demonstrate that proMMP-9 but not MMP-9 is localized at the UT-7 cell plasma membrane.

3.2. TIMP-1 binds to proMMP-9 at the cell surface

In keeping with the above observations and in order to explore how TIMP-1 could act, we further hypothesized that TIMP-1 could directly bind to proMMP-9 localized at the plasma membrane. To that end, following cell treatment with exogenous TIMP-1 for 5 min, biotinylated cell surface proteins were immunoprecipitated

with anti-MMP-9 (Ab-1) antibodies. As shown in Fig. 2A, TIMP-1 was immunodetected in anti-MMP-9 immunoprecipitates. In absence of UT-7 cell stimulation with recombinant TIMP-1, we can still observe a slight band probably corresponding to secreted endogenous TIMP-1. However, a larger amount of TIMP-1 was detected in TIMP-1-treated cell immunoprecipitates. Reprobing the membrane with anti-proMMP-9 antibodies or anti-MMP-9 antibodies (Ab-7) showed the presence of equal amounts of proMMP-9 in anti-MMP-9 immunoprecipitates (Fig. 2A). We also demonstrated that TIMP-2 did not co-precipitate with proMMP-9 and did not significantly compete with TIMP-1 to bind proMMP-9 thus demonstrating the specificity of the complex formation. TIMP-1/proMMP-9 interaction was confirmed by immunocytochemistry using both anti-proMMP-9 and anti-TIMP-1 antibodies. TIMP-1 labelling bordered the cell periphery where it colocalized with proMMP-9 (white arrows) (Fig. 2B). The colocalization analysis plugin of Image J software enabled us to determine that 57% of TIMP-1 colocalized with proMMP-9. A low amount of TIMP-1 was detected at the cell periphery of untreated cells as expected from results of Fig. 2A. No signal was detected using control rabbit IgG or secondary antibodies alone. Moreover, even after one hour of incubation, TIMP-1 remained localized at the cell membrane (Fig. 2C) and no increase of TIMP-1/proMMP-9 colocalization could be detected after 1 hour of stimulation (data not shown). Overall

these data suggest that TIMP-1 interacts with proMMP-9 at the cell surface.

3.3. proMMP-9 is essential for TIMP-1 anti-apoptotic effect

We then questioned the biological relevance of TIMP-1/proMMP-9 interaction at the cell periphery. To that end, proMMP-9 expression was silenced by cell transfection with small interfering RNA (siRNA) targeting proMMP-9. We first ascertained that MMP-9 siRNA inhibited MMP-9 mRNA expression while single-strand negative control RNA (snc-RNA) had no effect (Fig. 3A). Densitometric analysis normalized to GAPDH expression showed that MMP-9 mRNA expression was reduced by 88% in MMP-9 siRNA transfected cells. As a consequence, proMMP-9 protein expression was reduced by 74% (Fig. 3B). In keeping with such siRNA efficiency, we then investigated TIMP-1/proMMP-9 interaction at the cell surface of MMP-9 knocked-down UT-7 cells. Biotinylated cell surface proteins from MMP-9 siRNA transfected cells were immunoprecipitated with MMP-9 (Ab-1) antibodies. In Fig. 3C, we demonstrated (1) proMMP-9 expression at the cell surface was largely reduced with MMP-9 siRNA and (2) co-immunoprecipitation of TIMP-1 was inhibited in MMP-9 siRNA transfected cells. Moreover, immunocytochemical analyses revealed that TIMP-1 labelling almost totally vanished at the plasma membrane of MMP-9 siRNA transfected cells while cell transfection with snc-RNA did not modify TIMP-1 binding at the cell membrane (Fig. 3D). Thus, as a consequence of proMMP-9 silencing, TIMP-1 cannot bind to the cell surface. We then evaluated the contribution of proMMP-9 in TIMP-1 anti-apoptotic effect. The apoptotic state of transfected cells was evaluated by flow cytometry and by analyzing phosphorylation of Akt, a protein specifically involved in cell survival signalling. Following incubation with exogenous TIMP-1 for 24 h, transfected cells were double stained with Annexin-V-FLUOS and propidium iodide (PI) and analysed by flow cytometry. Data showed that TIMP-1 anti-apoptotic activity was still observed in snc-RNA transfected cells whereas it was completely suppressed in MMP-9 siRNA-transfected cells (Fig. 3E). Transfected cells were also stimulated with TIMP-1 for 5 min and cell lysates were analysed by Western blot using anti-phosphorylated Akt antibodies. TIMP-1-induced Akt phosphorylation was totally abolished in MMP-9 siRNA transfected cells as compared with snc-RNA transfected cells (Fig. 3F). Overall, these results demonstrate that proMMP-9 expression at the UT-7 cell periphery is crucial for TIMP-1-mediated anti-apoptotic effect.

3.4. Relationship between TIMP-1 anti-apoptotic activity and MMP-9 inhibition

To investigate whether MMP inhibition was involved in TIMP-1-induced cell survival, we used two types of compounds able to block MMP-9 proteolytic activity: (i) MMP-I-1, a broad-spectrum MMP inhibitor described to inhibit granulocyte MMP-9 with an IC₅₀ = 30 μM and (ii) anti-MMP-9 function-blocking antibodies (Ab-1) free of protease impurities able to cleave the MMP-9 protein (Suppl. data Fig. 2). Various concentrations of these compounds were initially assayed *in vitro* for their ability to inhibit MMP-9 activity and 30 μM MMP-I-1 inhibitor and 2 μg/ml MMP-9 function-blocking antibodies were defined as the optimal concentrations (Suppl. data Fig. 1). We thus evaluated the effect of these compounds on (1) TIMP-1-induced UT-7 cell survival by flow cytometric and Western blot analyses (Fig. 4A and B) and on (2) TIMP-1/proMMP-9 interaction by immunoprecipitation and immunocytochemistry labelling (Fig. 4C and D). For these experiments, anti-MMP-2 blocking antibodies were used as negative control. We showed that MMP-I-1 and anti-MMP-9 function-blocking antibodies did not reproduce TIMP-1 effect on the viable

cell percentage as well as on Akt phosphorylation demonstrating that TIMP-1-induced UT-7 cell survival was independent on MMP-9 inhibition (Fig. 4A and B). Nevertheless, MMP-I-1 and anti-MMP-9 function-blocking antibodies prevented TIMP-1 interaction with proMMP-9 and clearly impaired TIMP-1 binding at the UT-7 cell periphery as well as its colocalization with proMMP-9 (Fig. 4C and D). In addition, active MMP-9 did not interfere with TIMP-1/proMMP-9 interaction at the cell surface excluding the possibility of the formation of a soluble TIMP-1/proMMP-9 complex (Fig. 4C). Moreover, MMP-I-1 and anti-MMP-9 function-blocking antibodies blocked TIMP-1 anti-apoptotic activity while anti-MMP-2 function-blocking antibodies (Ab-6) had no effect (Fig. 4A and B) thus confirming the TIMP-1 specificity for MMP-9. It is important to notice that the anti-apoptotic response observed by flow cytometry can largely vary depending on the cell culture and on the treatment (electroporation or pre-incubation with drugs). All these data show that MMP-I-1 and anti-MMP-9 function-blocking antibodies did not reproduce TIMP-1 effects thus indicating that TIMP-1-induced erythroid cell survival is independent on MMP-9 inhibition (Fig. 4).

3.5. proMMP-9 is associated with CD44 at the cell membrane

Our findings thus warranted the search for proMMP-9-binding proteins at the cell plasma membrane enabling cell signal transduction. Regarding the literature demonstrating the interaction of MMP-9 and/or proMMP-9 at the cell surface of leukemic cells through CD44 (Yu and Stamenkovic, 1999, 2004; Fridman et al., 2003; Redondo-Munoz et al., 2008), this transmembrane receptor could be a good candidate for proMMP-9 anchorage at the cell surface of UT-7 cells. We first studied CD44 expression in UT-7 cells by RT-PCR and Western blot analysis. Our data showed that UT-7 cells expressed CD44 at mRNA and protein levels (Fig. 5A). This expression was constitutive and did not depend on Epo stimulation (data not shown). To investigate whether proMMP-9 is associated with CD44, we performed immunoprecipitation of cell surface biotinylated proteins and immunocytochemistry experiments. Cell surface biotinylated proteins were immunoprecipitated with anti-MMP-9 (Ab-1) antibodies. Western blots showed that CD44 was immunodetected in anti-MMP-9 immunoprecipitates demonstrating that proMMP-9 and CD44 are localized in the same complex at the UT-7 cell plasma membrane (Fig. 5B). Moreover, exogenous TIMP-1 co-immunoprecipitated with this complex. It is important to notice that two bands can be detected with anti-TIMP-1 antibodies corresponding to glycosylated (upper band) and unglycosylated (lower band) TIMP-1 (Crombez et al., 2005). To confirm the interaction of CD44 with proMMP-9, immunocytochemical labelling with both anti-MMP-9 propeptide region and anti-CD44 antibodies was performed and clearly showed that CD44 labelling bordered the cell periphery close to proMMP-9 (Fig. 5C). No signal was detected with control rabbit IgG or secondary antibodies alone.

3.6. CD44 expression is crucial for TIMP-1-induced cell survival

To demonstrate the crucial role of CD44 in TIMP-1 intracellular signalling, CD44 expression was transiently knocked-down by cell transfection. UT-7 cells were electroporated in the presence of either 100 nM siRNA targeting CD44 or snc-RNA as negative control. Results of Fig. 6A and B showed that CD44 mRNA and protein expressions were markedly reduced by 90% and 75% respectively, in CD44 siRNA transfected cells as compared to the levels observed in CD44 snc-RNA transfected cells. We then evaluated by immunocytochemistry proMMP-9 and TIMP-1 expression in CD44 siRNA transfected cells and showed that in CD44 knocked-down cells, proMMP-9 totally vanished (Fig. 6C, upper panel, left). Since proMMP-9 was undetected at the cell surface of CD44 siRNA trans-

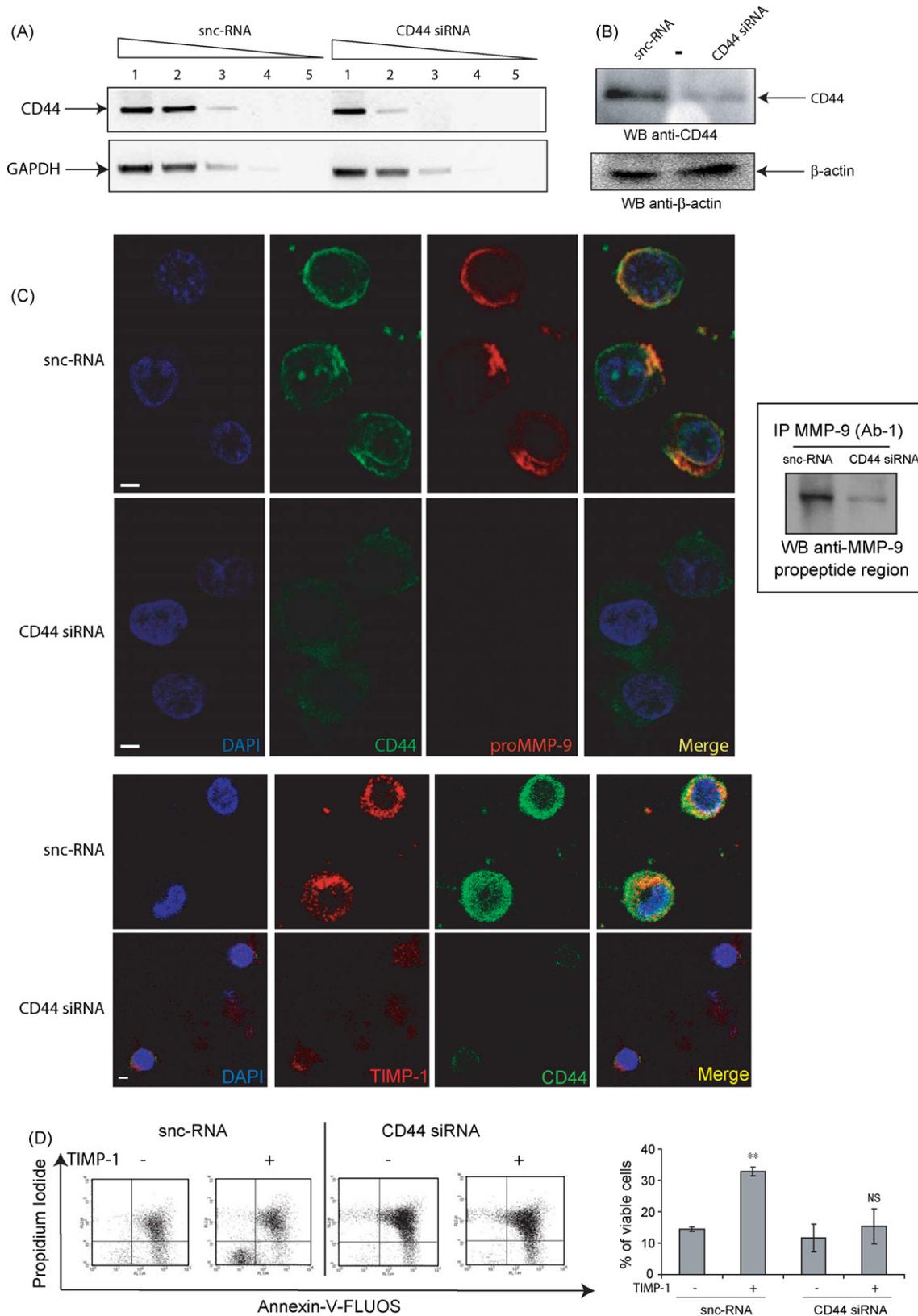


Fig. 6. TIMP-1-induced cell survival is abolished in CD44 siRNA transfected cells. Diluted cDNAs from snc-RNA and CD44 siRNA cells were used as templates for PCR reactions using specific primers for CD44 and GAPDH RNA. A representative PCR result is shown. Lanes 1–5: PCRs of 10^{-1} to 10^{-5} dilutions of total cDNA obtained from 1 μ g reverse-transcribed total RNA (A). CD44 expression was determined by Western blot using anti-CD44 antibodies. A representative blot is shown. The membrane was stripped and reprobed with anti- β -actin antibodies (B). snc-RNA and CD44 siRNA-transfected cells were allowed to adhere to poly-L-lysine-coated coverslips for 1 h, stimulated for 5 min with 5 ng/ml TIMP-1 and then fixed with paraformaldehyde. proMMP-9 and CD44 localization was detected using anti-CD44 and anti-MMP-9 propeptide region antibodies and observed using a confocal laser scanning microscope. Scale bar: 11.5 μ m. In this panel, DAPI was used to enable cell observations when proMMP-9 and CD44 were faintly detected (C, upper panel, left). Immunoprecipitation of cell surface proteins were performed from CD44 siRNA transfected cells and the quantity of proMMP-9 at the cell

ected cells by immunocytochemistry labelling, its expression was evaluated by Western blot and around 20% of its initial expression remained following UT-7 cell transfection with CD44 siRNA (Fig. 6C, upper quadrant, right). The high decrease of proMMP-9 protein at the cell surface of CD44 knocked-down cells thus pinpointed the pivotal function of CD44 for proMMP-9 anchorage at the cell periphery. In the same figure, we also demonstrated that TIMP-1 localization at the cell surface was largely impaired following CD44 knocking-down (Fig. 6C, lower panel). TIMP-1 anti-apoptotic activity was then examined in CD44 siRNA transfected cells. Data from Fig. 6D indicated that TIMP-1-induced cell survival, evaluated by cell double staining with Annexin-V-FLUOS and propidium iodide, was totally abolished in CD44 siRNA transfected cells.

4. Discussion

Numerous reports have emphasized the potential importance of TIMPs in many physiological and pathological processes via inhibition of MMPs, the proteases responsible in part for matrix degradation. However, TIMPs may regulate other biological processes such as cell division and apoptosis independently of MMP inhibition while the data remain controversial (Hayakawa et al., 1992; Stetler-Stevenson, 2008). We previously reported that Epo induced TIMP-1 expression and secretion and TIMP-1 enhanced survival of human erythroleukemic UT-7 cells (Kadri et al., 2000; Lambert et al., 2003). Although UT-7 cells have previously been described to express proMMP-9, neither proMMP-9 nor MMP-9 was detected in the culture medium of Epo-treated cells. To explain such finding, we hypothesized that MMP-9 could be retained at the cell plasma membrane and indeed we showed here that proMMP-9 was present at the cell surface. Such MMP-9 or proMMP-9 localization has already been described in human and murine normal cells as well as in tumor cells and may be explained by different biological situations (Fridman et al., 2003). For instance, TPA-induced MMP-9 expression at the surface of breast epithelial MCF10A cells may render the enzyme accessible to activators present in tissue or neighboring cells (Toth et al., 1997). In ovarian cancer, cell surface proMMP-9 expression-induced by activation of the EGF receptor is correlated with the malignant potential of the tumor (Ellerbroek et al., 2001; Schmalfeldt et al., 2001). Chronic lymphocytic leukemia cells have been demonstrated to produce and secrete proMMP-9 which subsequently became associated with the cell surface and activated following cell adhesion to type IV collagen (Kamiguti et al., 2004). A 82 kDa proMMP-9 variant has also been recently identified on the cell surface of acute monocytic, myeloblastic and promyelocytic leukemic cells and its activation led to the formation of a 35 kDa active MMP-9 which was resistant to inhibition by TIMP-1 (Ries et al., 2007). In UT-7 cells, the biological relevance of proMMP-9 localization at the cell surface could be explained by proMMP-9 interaction with either membrane or soluble proteins.

The molecular mechanisms enabling TIMP-1 biological effects are the subject of intensive research. Ritter et al. (1999) have reported that a TIMP-1-EGFP chimeric protein bound to human MCF-7 breast carcinoma cell surface and subsequently translocated into the nucleus. More generally, it is assumed that TIMP-1 biological activities leading to cell growth, survival and/or differentiation were due to TIMP-1 binding to a putative receptor (for review Chirco et al., 2006). A member of tetraspanin family, the

CD63 protein, has been identified as a TIMP-1 interacting protein in non-malignant human breast epithelial cells and TIMP-1/CD63/ β 1-integrin complex controlled TIMP-1-mediated cell polarization and survival (Jung et al., 2006). However, CD63 is considered as a marker of late endocytic pathway in CD34⁺ cells (Zhang et al., 2004), but our data demonstrated that following one hour of stimulation, TIMP-1 was still localized at the cell plasma membrane. Various characteristics of the putative receptor of TIMP-1 have been reported. However, the molecular weight as well as TIMP-1/receptor dissociation constant was found to differ depending on the cell type. For instance, K562 human erythroleukemic cells possessed a specific cell surface receptor for TIMP-1 with a molecular weight of 32 kDa whereas BC-61 human breast carcinoma cell line expressed a 80 kDa transmembrane protein able to bind to TIMP-1 (Avalos et al., 1988; Luparello et al., 1999).

Our data clearly indicate that TIMP-1 binds to a proMMP-9 localized at the plasma membrane. TIMP-1/proMMP-9 association appeared specific since TIMP-2 did not compete with TIMP-1 for its binding to proMMP-9. We also showed that TIMP-1 immunocytochemistry at the cell surface was detected up to one hour, so excluding the possibility that TIMP-1 could translocate into the nucleus in order to induce cell survival as described in MCF-7 cells (Ritter et al., 1999). We also demonstrated through MMP-9 silencing that cell membrane-associated proMMP-9 was necessary for TIMP-1 intracellular signalling pathway. However, as observed by immunocytochemistry and determined using the colocalization analysis plugin of Image J software, 57% of total TIMP-1 colocalized with proMMP-9, thus suggesting that TIMP-1 binds to another cell surface protein. Recent studies have underlined the possibility that β 1 integrin could interact with TIMP-1 at the cell surface and thus be implied in TIMP-1-induced signal transduction (Jung et al., 2006; Redondo-Munoz et al., 2008). The role of β 1 integrin for TIMP-1 binding at the UT-7 cell surface cannot be excluded, however, preincubation of the cells with β 1-integrin blocking antibodies did not interfere with TIMP-1-induced cell survival, thus demonstrating the absence of a role for β 1-integrin in signal transduction in our model. Since TIMP-1 is also able to inhibit ADAM-10 activity (Amour et al., 2000), we can also suppose a role for this protease in TIMP-1 biological activity as suggested by Kopitz et al. (2007). ADAM-10 is expressed in UT-7 cells, however its role in TIMP-1 binding at the cell surface has not been evidenced. We can also suppose that TIMP-1 interacts with a specific proMMP-9, however, further investigations need to be performed to validate this hypothesis. For the first time, our observations clearly demonstrate that proMMP-9 behaves like a cell membrane protein able to bind TIMP-1 and is essential for TIMP-1 anti-apoptotic effect independently of its MMP-9 inhibitory activity.

Our findings thus warranted the search for MMP-9-binding proteins at the cell surface able to transduce TIMP-1 signalling. Several studies demonstrated that MMPs can associate with cellular receptors that mediate their rapid internalization. One of these receptors is the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) and MMP-9 binding to LRP induces MMP-9 internalization and subsequent degradation (Gonias et al., 2004; Hahn-Dantona et al., 2001). However, LRP involvement in the TIMP-1 anti-apoptotic effect can be excluded since RAP (receptor associated protein), an antagonist of ligand binding to LRP, had no effect on TIMP-1-induced Akt phosphorylation in UT-7 cells (data not shown). Another cell surface

surface was analysed by Western blot using MMP-9 propeptide regions antibodies (C, upper quadrant, right). TIMP-1 and CD44 localization was detected using anti-TIMP-1 and anti-CD44 antibodies and observed using a confocal laser scanning microscope. Scale bar: 11.5 μ m (C, lower panel). snc-RNA and CD44 siRNA transfected cells were deprived from serum and Epo for 16 h and then incubated for 24 h in presence of 5 ng/ml TIMP-1. Cell survival was determined by flow cytometry using double staining with Annexin-V-FLUOS and propidium iodide. Results are expressed as the percentage of viable cells and are the means \pm S.E.M. of three separate experiments. ** P < 0.01 compared with unstimulated snc-RNA-transfected cells; NS: not significant results (D).

MMP-9 binding protein is the transmembrane glycoprotein CD44 (Bourguignon et al., 1998; Yu and Stamenkovic, 1999; Redondo-Munoz et al., 2008). A considerable amount of data demonstrated that CD44 functions as an important signalling molecule and a pivotal role of this protein is emerging in promoting cell survival (Bates et al., 2001; Bourguignon et al., 2003; Gore et al., 2007). Hematopoietic cells express CD44 and a specific glycoform is present in primitive CD34⁺ hematopoietic progenitor cells and regulates progenitor distribution and tumorigenicity (Bourguignon et al., 2003; Schmits et al., 1997). We here demonstrate that hematopoietic isoform of CD44 (CD44H) is present in UT-7 cells, associated with proMMP-9 at the cell periphery and necessary for TIMP-1-induced cell survival. Such binding of proMMP-9 at the cell surface through CD44 interaction has previously been reported in specific conditions, such as in monocytes submitted to hypoxic treatment and in chronic lymphocytic leukemia B-cells (Rahat et al., 2006; Redondo-Munoz et al., 2008). However, particular characteristics seem to distinguish each cell types such as the type of involved CD44 isoform (Redondo-Munoz et al., 2008). Our results clearly demonstrate the crucial involvement of proMMP-9/CD44 complex at the cell surface for TIMP-1-induced cell survival. Since an MMP inhibitor or anti-MMP-9 function-blocking antibodies did not reproduce the TIMP-1 effect, we could assume that MMP inhibition was not compulsory for TIMP-1 anti-apoptotic effect. However, we also demonstrated that these compounds blocked TIMP-1/proMMP-9 interaction and subsequently TIMP-1-induced erythroid cell survival, demonstrating that TIMP-1/proMMP-9 interaction site is close to MMP-9 catalytic site. Consequently, we can suppose that the catalytic site of the cell surface localized proMMP-9 has been demasked resulting from proMMP-9 anchorage through CD44 interaction. Preliminary study demonstrated that N-TIMP-1, corresponding to the TIMP-1 molecule devoided of its C-terminal domain (Murphy et al., 1991), is able to reproduce TIMP-1 effect suggesting that the TIMP-1 residues interacting with the proMMP-9 are located in the N-terminal domain of TIMP-1 (data not shown). Interaction between TIMPs and MMPs involve multiple sites (Nagase and Brew, 2002) and identification of the residues involved in TIMP-1/proMMP-9 interaction and thus in TIMP-1-induced erythroleukemic cell survival is under investigations in our laboratory.

Our data demonstrate that (i) MMP inhibition is not necessary for TIMP-1-induced erythroid cell survival, (ii) TIMP-1 binds to the cell surface and is not translocated to the nucleus and (iii) TIMP-1 interacts with the proMMP-9/CD44 complex localized at the cell surface and this interaction is crucial for TIMP-1 anti-apoptotic effect.

Acknowledgements

We thank Prof. Gillian MURPHY (CRUK Cambridge Cancer Institut, Cambridge, UK) for her expert advices and for providing the N-TIMP-1. We thank Laetitia PARENT for gelatin zymographic analysis. We thank UMR INRA FARE 614 (Reims, France), Team EMOA for confocal microscopy studies. The study was supported by PhD fellowship from the Région Champagne-Ardenne.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.biocel.2008.10.017.

References

Amour A, Knight CG, Webster A, Slocombe PM, Stephens PE, Knauper V, et al. The *in vitro* activity of ADAM-10 is inhibited by TIMP-1 and TIMP-3. *FEBS Lett* 2000;473(May (3)):275–9.

- Arai F, Hirao A, Suda T. Regulation of hematopoietic stem cells by the niche. *Trends Cardiovasc Med* 2005;15(February 2):75–9.
- Avalos BR, Kaufman SE, Tomonaga M, Williams RE, Golde DW, Gasson JC. K562 cells produce and respond to human erythroid-potentiating activity. *Blood* 1988;71(June 6):1720–5.
- Bates RC, Edwards NS, Burns GF, Fisher DE. A CD44 survival pathway triggers chemoresistance via lyn kinase and phosphoinositide 3-kinase/Akt in colon carcinoma cells. *Cancer Res* 2001;61(July 13):5275–83.
- Bertaux B, Hornebeck W, Eisen AZ, Dubertret L. Growth stimulation of human keratinocytes by tissue inhibitor of metalloproteinases. *J Invest Dermatol* 1991;97(October 4):679–85.
- Boudot C, Petitfrere E, Kadri Z, Chretien S, Mayeux P, Haye B, et al. Erythropoietin induces glycosylphosphatidylinositol hydrolysis. Possible involvement of phospholipase c-gamma(2). *J Biol Chem* 1999;274(November 48):33966–72.
- Bourguignon LY, Gunja-Smith Z, Iida N, Zhu HB, Young LJ, Muller WJ, et al. 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(July 1):206–15.
- Bourguignon LY, Singleton PA, Zhu H, Diedrich F. Hyaluronan-mediated CD44 interaction with RhoGEF and Rho kinase promotes Grb2-associated binder-1 phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase signaling leading to cytokine (macrophage-colony stimulating factor) production and breast tumor progression. *J Biol Chem* 2003;278(August 32):29420–34.
- Chirco R, Liu XW, Jung KK, Kim HR. Novel functions of TIMPs in cell signaling. *Cancer Metastasis Rev* 2006;25(March 1):99–113.
- Corcoran ML, Stetler-Stevenson WG. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 stimulates fibroblast proliferation via a cAMP-dependent mechanism. *J Biol Chem* 1995;270(June 22):13453–9.
- Crombez L, Marques B, Lenormand JL, Mouz N, Polack B, Trocme C, et al. High level production of secreted proteins: example of the human tissue inhibitor of metalloproteinases 1. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;337(November 3):908–15.
- Ellerbroek SM, Halbleib JM, Benavidez M, Warmka JK, Wattenberg EV, Stack MS, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase activity in epidermal growth factor-stimulated matrix metalloproteinase-9 production and cell surface association. *Cancer Res* 2001;61(March 5):1855–61.
- Fridman R, Toth M, Chvyrkova I, Meroueh SO, Mobashery S. Cell surface association of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B). *Cancer Metastasis Rev* 2003;22(June–September 2–3):153–66.
- Ghaffari S, Dougherty GJ, Lansdorp PM, Eaves AC, Eaves CJ. Differentiation-associated changes in CD44 isoform expression during normal hematopoiesis and their alteration in chronic myeloid leukemia. *Blood* 1995;86(October 8):2976–85.
- Ghaffari S, Smadja-Joffe F, Oostendorp R, Levesque JP, Dougherty G, Eaves A, et al. CD44 isoforms in normal and leukemic hematopoiesis. *Exp Hematol* 1999;27(June 6):978–93.
- Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 1997;74(October 2):111–22.
- Gonias SL, Wu L, Salicioni AM. Low density lipoprotein receptor-related protein: regulation of the plasma membrane proteome. *Thromb Haemost* 2004;91(June 6):1056–64.
- Gore Y, Starlets D, Maharshak N, Becker-Herman S, Kaneyuki U, Leng L, et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) induces B cell survival by activation of a CD74/CD44 receptor complex. *J Biol Chem* 2008;283(February 5):2784–92.
- Guedez L, Stetler-Stevenson WG, Wolff L, Wang J, Fukushima P, Mansoor A, et al. *In vitro* suppression of programmed cell death of B cells by tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *J Clin Invest* 1998;102(December 11):2002–10.
- Hahn-Dantona E, Ruiz JF, Bornstein P, 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(May 18):15498–503.
- Hayakawa T, Yamashita K, Tanzawa K, Uchijima E, Iwata K. Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells. A possible new growth factor in serum. *FEBS Lett* 1992;298(February 1):29–32.
- Janowska-Wieczorek A, Marquez LA, Dobrowsky A, Ratajczak MZ, Cabuhat ML. Differential MMP. TIMP production by human marrow and peripheral blood CD34(+) cells in response to chemokines. *Exp Hematol* 2000;28(November 11):1274–85.
- Jung KK, Liu XW, Chirco R, Fridman R, Kim HR. Identification of CD63 as a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 interacting cell surface protein. *EMBO J* 2006;25(September 17):3934–42.
- Kadri Z, Petitfrere E, Boudot C, Freysson JM, Fichelson S, Mayeux P, et al. Erythropoietin induction of tissue inhibitors of metalloproteinase-1 expression and secretion is mediated by mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways. *Cell Growth Differ* 2000;11(November 11):573–80.
- Kamiguti AS, Lee ES, Till KJ, Harris RJ, Glenn MA, Lin K, et al. The role of matrix metalloproteinase 9 in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2004;125(April 2):128–40.
- Kansas GS, Muirhead MJ, Dailey MO. Expression of the CD11/CD18, leukocyte adhesion molecule 1, and CD44 adhesion molecules during normal myeloid and erythroid differentiation in humans. *Blood* 1990;76(December 12):2483–92.
- Komatsu N, Nakauchi H, Miwa A, Ishihara T, Eguchi M, Moroi M, et al. Establishment and characterization of a human leukemic cell line with megakaryocytic

- features: dependency on granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin 3, or erythropoietin for growth and survival. *Cancer Res* 1991;51(January 1):341–8.
- Kopitz C, Gerg M, Bandapalli OR, Ister D, Pennington CJ, Hauser S, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promotes liver metastasis by induction of hepatocyte growth factor signaling. *Cancer Res* 2007;67(September 18):8615–23.
- Lambert E, Boudot C, Kadri Z, Soula-Rothhut M, Sowa ML, Mayeux P, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 signalling pathway leading to erythroid cell survival. *Biochem J* 2003;372(June Pt 3):767–74.
- Lambert E, Dasse E, Haye B, Petitfrere E. TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004;49(March 3):187–98.
- Lee SJ, Yoo HJ, Bae YS, Kim HJ, Lee ST. TIMP-1 inhibits apoptosis in breast carcinoma cells via a pathway involving pertussis toxin-sensitive G protein and c-Src. *Biochem Biophys Res Commun* 26 2003;312(December 4):1196–201.
- Li J, Si HF, Lu X, Guo A, Jiang H. Suppressive effects of leflunomide on leptin-induced TIMP-1 production involves on hepatic stellate cell proliferation and apoptosis. *Eur J Pharmacol* 2008;580(February 1–2):63–9.
- Liu XW, Bernardo MM, Fridman R, Kim HR. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 protects human breast epithelial cells against intrinsic apoptotic cell death via the focal adhesion kinase/phosphatidylinositol 3-kinase and MAPK signaling pathway. *J Biol Chem* 2003;278(October 41):40364–72.
- Luparello C, Avanzato G, Carella C, Pucci-Minafra I. Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and proliferative behaviour of clonal breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 1999;54(April 3):235–44.
- Makowski GS, Ramsby ML. Calibrating gelatin zymograms with human gelatinase standards. *Anal Biochem* 1996;236(May 2):353–6.
- Marquez-Curtis LA, Dobrowsky A, Montano J, Turner AR, Ratajczak J, Ratajczak MZ, et al. Matrix metalloproteinase and tissue inhibitors of metalloproteinase secretion by haematopoietic and stromal precursors and their production in normal and leukaemic long-term marrow cultures. *Br J Haematol* 2001;115(December 3):595–604.
- Massova I, Kotra LP, Fridman R, Mobashery S. Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *FASEB J* 1998;12(September 12):1075–95.
- Matthews FJ, Cook SD, Majid MA, Dick AD, Smith VA. Changes in the balance of the tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMPs)-1 and -3 may promote keratocyte apoptosis in keratoconus. *Exp Eye Res* 2007;84(June 6):1125–34.
- Murphy F, Waung J, Collins J, Arthur MJ, Nagase H, Mann D, et al. N-Cadherin cleavage during activated hepatic stellate cell apoptosis is inhibited by tissue inhibitor of metalloproteinase-1. *Comp Hepatol* 2004;3(January Suppl. 1):S8.
- Murphy FR, Issa R, Zhou X, Ratnarajah S, Nagase H, Arthur MJ, et al. Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition: implications for reversibility of liver fibrosis. *J Biol Chem* 2002;277(March 13):11069–76.
- Murphy G, Houbrechts A, Cockett MI, Williamson RA, O'Shea M, Docherty AJ. The N-terminal domain of tissue inhibitor of metalloproteinases retains metalloproteinase inhibitory activity. *Biochemistry* 1991;30(August 33):8097–102.
- Nagase H, Brew K. Engineering of tissue inhibitor of metalloproteinases mutants as potential therapeutics. *Arthritis Res* 2002;4(Suppl 3):S51–61.
- Porter JF, Shen S, Denhardt DT. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 stimulates proliferation of human cancer cells by inhibiting a metalloproteinase. *Br J Cancer* 2004;90(January 2):463–70.
- Rahat MA, Marom B, Bitterman H, Weiss-Cerem L, Kinarty A, Lahat N. Hypoxia reduces the output of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in monocytes by inhibiting its secretion and elevating membranal association. *J Leukoc Biol* 2006;79(April 4):706–18.
- Redondo-Munoz J, Ugarte-Berzal E, Garcia-Marco JA, del Cerro MH, Van den Steen PE, Opdenakker G, et al. Alpha4beta1 integrin and 190 kDa CD44 v constitute a cell surface docking complex for gelatinase B/MMP-9 in chronic leukemic but not in normal B cells. *Blood* 2008;112(July 1):169–78.
- Ries C, Pitsch T, Mentele R, Zahler S, Egea V, Nagase H, et al. Identification of a novel 82 kDa proMMP-9 species associated with the surface of leukaemic cells: (auto-)catalytic activation and resistance to inhibition by TIMP-1. *Biochem J* 2007;405(August 3):547–58.
- Ritter LM, Garfield SH, Thorgerirsson 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(April 2):494–9.
- Sanceau J, Truchet S, Bauvois B. Matrix metalloproteinase-9 silencing by RNA interference triggers the migratory-adhesive switch in Ewing's sarcoma cells. *J Biol Chem* 2003;278(September 38):36537–46.
- Schmalfeldt B, Prechtel D, Harting K, Spathe K, Rutke S, Konik E, et al. Increased expression of matrix metalloproteinases (MMP)-2, MMP-9, and the urokinase-type plasminogen activator is associated with progression from benign to advanced ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7(August 8):2396–404.
- Schmits R, Filmus J, Gerwin N, Senaldi G, Kiefer F, Kundig T, et al. CD44 regulates hematopoietic progenitor distribution, granuloma formation, and tumorigenicity. *Blood* 1997;90(September 6):2217–33.
- Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001;17:463–516.
- Stetler-Stevenson WG. Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities. *Sci Signal* 2008;1(27):re6.
- Toth M, Gervasi DC, Fridman R. Phorbol ester-induced cell surface association of matrix metalloproteinase-9 in human MCF10A breast epithelial cells. *Cancer Res* 1997;57(August 15):3159–67.
- Tsilibary EC. Microvascular basement membranes in diabetes mellitus. *J Pathol* 2003;200(July 4):537–46.
- Wang SJ, Wreesmann VB, Bourguignon LY. Association of CD44 V3-containing isoforms with tumor cell growth, migration, matrix metalloproteinase expression, and lymph node metastasis in head and neck cancer. *Head Neck* 2007;29(June 6):550–8.
- Wang T, Yamashita K, Iwata K, Hayakawa T. Both tissue inhibitors of metalloproteinases-1 (TIMP-1) and TIMP-2 activate Ras but through different pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;296(August 1):201–5.
- Yu Q, Stamenkovic I. Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. *Genes Dev* 1999;13(January 1):35–48.
- Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev* 2000;14(January 2):163–76.
- Yu Q, Stamenkovic I. Transforming growth factor-beta facilitates breast carcinoma metastasis by promoting tumor cell survival. *Clin Exp Metastasis* 2004;21(3):235–42.
- Zhang Y, Foudi A, Geay JF, Berthebaud M, Buet D, Jarrier P, et al. Intracellular localization and constitutive endocytosis of CXCR4 in human CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells* 2004;22(6):1015–29.

RESUME :

Les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases (TIMPs) modulent l'activité des métalloprotéinases matricielles (MMPs). En dehors de son activité inhibitrice de MMPs, le TIMP-1 présente d'autres activités biologiques telles que des effets mitogéniques et anti-apoptotiques sur différentes lignées cellulaires. Nous avons montré que le TIMP-1 induit la survie des cellules érythroleucémiques humaines UT-7 en activant la voie JAK2/PI 3-kinase/Akt. Depuis plusieurs années, l'étude des récepteurs du TIMP-1 fait l'objet de nombreux travaux et fait apparaître l'existence de récepteurs spécifiques qui ne sont pas des métalloprotéinases. Récemment, nous avons montré que le TIMP-1 se fixe à une pro-MMP-9 localisée à la membrane plasmique des cellules UT-7 et que l'expression membranaire de la pro-MMP-9 est nécessaire à l'effet anti-apoptotique du TIMP-1.

Dans une première partie, nous montrons que CD44 permet l'ancrage de la pro-MMP-9 à la surface cellulaire et que cette protéine joue un rôle crucial dans l'effet anti-apoptotique du TIMP-1 puisque si l'on éteint l'expression de CD44, la pro-MMP-9 n'est plus localisée à la surface cellulaire et le TIMP-1 n'est plus capable d'induire la survie cellulaire.

Dans la signalisation anti-apoptotique du TIMP-1, JAK2 est la première tyrosine kinase qui est phosphorylée suite à une stimulation par le TIMP-1. Dans une deuxième partie, nous avons étudié l'interaction entre CD44 et la tyrosine kinase JAK2. Nous montrons que CD44 est associée de manière constitutive à JAK2 et que cette interaction se fait *via* le domaine FERM de JAK2.

D'autres kinases pourraient intervenir dans la signalisation anti-apoptotique du TIMP-1, parmi lesquelles les Src kinases. Dans une troisième partie, nous avons étudié l'implication de la Src kinase Lyn dans l'effet anti-apoptotique du TIMP-1. Nous montrons que la Src kinase Lyn joue un rôle crucial dans l'effet anti-apoptotique en amont de la PI 3-kinase.

MOTS CLES :

TIMP-1, survie cellulaire, cellules hématopoïétiques, pro-MMP-9, CD44, Lyn, PI-3 kinase, Akt.