

# INTRODUCTION

## 1. Le cancer pulmonaire

### 1.1 Un peu d'histoire... Epidémiologie du cancer pulmonaire

Le cancer du poumon est le cancer le plus meurtrier en Europe et dans les pays économiquement développés incluant les Etats-Unis (figure 1) et le Japon. En Europe, le nombre de décès par cancer du poumon a été estimé à 334.800 cas en 2006, soit 19,7% du nombre total de décès par cancer. Il s'agit donc d'une maladie qui demeure un problème majeur de santé publique. Pourtant, en 1878, les tumeurs pulmonaires ne représentaient que 1% de tous les types de cancers diagnostiqués au cours des autopsies dans l'Institut de Pathologie de l'Université de Dresde (Allemagne). A partir de 1918, leur pourcentage a décuplé pour atteindre un taux de 14%. Durant les années 1970, le cancer du poumon est passé d'une fréquence rare à la première place en termes de fréquence dans les pays occidentaux et cette modification de l'épidémiologie est survenue environ vingt ans après l'extension du tabagisme.

Quelles sont les causes d'une telle augmentation de fréquence des cancers pulmonaires ?

L'ouverture des mines de cobalt et de nickel, la pollution de l'air par des gaz ou des poussières émanant des industries, l'asphaltage des routes, les prédispositions familiales ne sont que quelques exemples d'éléments susceptibles de contribuer à cette augmentation. Très vite, le tabagisme a également été soupçonné d'être une des causes possibles de cancers pulmonaires (1958; Osann 1998). Cette « habitude » ayant été popularisée durant la première guerre mondiale, Sir John J Pershing affirmait : « You ask me what it is we need to win this war. I answer tobacco as much as bullets ». Durant les décennies suivantes, le tabac était apprécié par des milliers de citoyens. Les larges campagnes publicitaires menées par l'industrie du tabac et leurs efforts de marketing ont également contribué à accroître cette consommation. Dans les années 1950, des études statistiques menées aux Etats-Unis et en Angleterre ont permis pour la première fois d'associer la croissance de l'incidence des cancers

pulmonaires au tabagisme (DOLL and HILL 1950; WYNDER and GRAHAM 1950). Cependant, des études supplémentaires chez l'animal ont été nécessaires afin de persuader les comités scientifiques et médicaux de la validité de ces observations (Schlesselman 2006).

Figure 1 : Taux de mortalité par cancer chez les hommes ou les femmes, aux Etats-Unis de 1930 à 2000. La mortalité par cancer du poumon est passée en première position à partir des années 1950 chez les hommes et à partir des années 1990 chez les femmes.

Aujourd'hui, il est clair que 90% des cancers pulmonaires sont dus au tabagisme et que 10% des fumeurs développeront un cancer pulmonaire. Actuellement, la meilleure prévention est de convaincre les fumeurs d'abandonner leur addiction au tabagisme et de mettre en garde les plus jeunes contre les méfaits du tabac. Ceci fait maintenant partie intégrante de la politique de santé.

## 1.2 Classification des tumeurs broncho-pulmonaires

Les pathologies communément appelées « cancers du poumon » sont des tumeurs broncho-pulmonaires issues principalement des cellules épithéliales bronchiques. Ces tumeurs présentent une grande disparité en termes de morphologie, comportement biologique, temps de doublement, dissémination métastatique, réponse aux traitements ou taux de survie (Smith, Denlinger, and Jones 2006; Wislez *et al.* 2006). Différents modes de classification reposent sur ces variations et ont été proposés afin de distinguer les différents types de cancers pulmonaires rencontrés. La classification la plus fréquemment utilisée et régulièrement mise à jour est celle de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (Brambilla *et al.* 2001). Depuis 1981, les progrès réalisés en microscopie, en immunohistochimie et en biologie moléculaire ont permis d'améliorer cette classification. L'étude macroscopique des tumeurs demeure également fondamentale pour l'évaluation TNM : T (taille de la tumeur), N (degré de dissémination lymphatique), M (degré de dissémination métastatique).

Les cancers du poumon sont classés en 2 groupes : les cancers à petites cellules (13% des cancers pulmonaires) et les cancers non à petites cellules (87% des cancers pulmonaires) (Brambilla, Eur Respir J, 2001).

### *1.2.1 Les cancers bronchiques non à petites cellules*

Ce groupe comprend les carcinomes épidermoïdes, les adénocarcinomes et les carcinomes à grandes cellules. Les cancers pulmonaires non à petites cellules (ou *Non Small Cell Lung Cancer*, NSCLC) se développent plus fréquemment sur les bronches proximales. Leur traitement curatif, lorsqu'il est possible, repose sur la chirurgie. Dans la plupart des cas, le diagnostic est tardif et le traitement fait appel à la chimiothérapie et/ou à la radiothérapie.

#### *Les carcinomes épidermoïdes :*

Figure 2 : Les carcinomes épidermoïdes se développent à partir des bronches centrales.

Les carcinomes épidermoïdes (figure 2) constituent 30 à 35% des cancers pulmonaires. Ils ont une prédominance masculine et sont fortement corrélés à la consommation de cigarettes. Ces cancers siègent majoritairement sur des bronches centrales sous forme de masses térébrantes et hémorragiques. La différenciation épidermoïde se manifeste par l'existence de nombreux desmosomes et, éventuellement, par des foyers de kératinisation (globes cornés). Le taux de survie après cinq ans des individus atteints est d'environ 25%.

#### *Les adénocarcinomes :*

Figure 3 : Les adénocarcinomes se développent en périphérie du poumon sous forme de nodules blanchâtres.

Les adénocarcinomes (figure 3) sont les cancers pulmonaires actuellement les plus fréquemment diagnostiqués dans la population féminine. Ils sont caractérisés par un aspect macroscopique blanchâtre, brillant et se déclarent le plus souvent en périphérie du poumon sous forme de nodules solitaires émergeant des glandes bronchiques et des cellules alvéolaires. Etant donné l'hétérogénéité histologique rencontrée, les adénocarcinomes sont divisés en quatre sous-groupes en fonction des éléments prédominants : acineux, papillaires, bronchiolo-alvéolaires et solides avec formation de mucus. Le taux de survie après cinq ans des individus atteints est d'environ 12%.

#### *Les carcinomes à grandes cellules*

Figure 4 : Les carcinomes pulmonaires à grandes cellules sont des types rares de cancers du poumon non à petites cellules se caractérisant par la présence de cellules de taille anormalement grande.

Les carcinomes à grandes cellules (figure 4) sont qualifiés de « non-différenciés ». En effet, ce type de tumeur est défini par l’OMS comme n’ayant pas les caractéristiques des carcinomes squameux, des adénocarcinomes ou des tumeurs à petites cellules. Ils représentent 10% des cancers pulmonaires et le taux de survie après cinq ans est de 13%.

### *1.2.2 Les cancers bronchiques à petites cellules*

Figure 5 : Les cancers bronchiques à petites cellules sont des carcinomes anaplasiques à haute malignité composés de petites cellules ovoïdes caractérisées par un noyau dominant. Les tumeurs se développent dans la partie centrale du poumon.

Les cancers bronchiques à petites cellules (ou *Small Cell Lung Cancer*, SCLC) (figure 5) sont plus agressifs et ont une évolution plus rapide que les cancers bronchiques non à petites cellules. Dans la plupart des cas, à l’heure du diagnostic, ces tumeurs sont déjà étendues, souvent inopérables mais elles sont très sensibles à la chimiothérapie et à la radiothérapie. Les tumeurs se développent dans la partie centrale du poumon et s’étendent au niveau péribronchique et périvasculaire. La détermination du stade de ces tumeurs ne s’appuie pas sur le système TNM, contrairement aux tumeurs pulmonaires non à petites cellules. Leur classification se base sur les tumeurs confinées dites de « stade limité » qui sont restreintes à un territoire qui tient en un seul champ d’irradiation et les tumeurs à dissémination métastatique ou de « stade étendu ». Le taux de survie après cinq ans des tumeurs à petites cellules est de 3%.

Au cours de ce travail, nous nous sommes focalisés sur les cancers bronchiques non à petites cellules qui représentent la classe la plus fréquente des cancers pulmonaires.

## 1.3 Stratégies thérapeutiques

Malgré les recherches intensives et les nombreuses études cliniques, les réelles avancées pour le traitement du cancer pulmonaire restent limitées. Le traitement standard des stades avancés de tumeurs non à petites cellules est basé dans un premier temps sur un

traitement « double » incluant un dérivé du platine (*cisplatine* ou *carboplatine*) combiné avec un agent de troisième génération. Cependant, malgré l'utilisation de traitements combinés avec ces nouveaux agents actifs (*paclitaxel*, *docetaxel*, *gemcitabine*, *vinorelbine*, *irinotecan*), le pronostic pour les NSCLC avancés reste généralement pour le moins réservé, avec des taux de réponses aux traitements entre 17 et 22% et une survie médiane de 8 mois approximativement (Schiller *et al.* 2002). Après une première phase de traitement, un deuxième traitement avec un agent seul (*docetaxel* ou *pemetrexed*) est recommandé. Malheureusement, les taux de réponses à une chimiothérapie secondaire restent inférieurs à 10%. De plus, un traitement prolongé n'est pas bénéfique, les bienfaits maximaux de la chimiothérapie se trouvant donc essentiellement dans les premiers cycles de traitements (Grossi and Aita 2007; Pfister *et al.* 2004). En général, la combinaison de radiothérapie et de chimiothérapie avant chirurgie permet de réduire le stade des cancers pulmonaires non à petites cellules et d'augmenter leur taux de résection complète (Park *et al.* 2006).

Alors que la chimiothérapie cible toutes les cellules en division, d'autres approches, telles que l'inhibition du récepteur à l'EGF (*Epidermal Growth Factor*) ou du VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), permettraient d'atteindre spécifiquement les cellules malignes et de réduire la toxicité souvent décrite pour les agents cytotoxiques non spécifiques (Azim, Jr. and Ganti 2006; Giaccone 2005; Scagliotti and Selvaggi 2006; Silvestri and Rivera 2005a; Sun and Schiller 2007).

Un dérèglement profond de la voie de signalisation par le récepteur à l'EGF (EGFR) est fréquemment associé à une progression tumorale. En effet, une surexpression de l'EGFR est décrite dans 40 à 80% de NSCLC et est corrélée à une survie réduite (Araujo *et al.* 2007; Salomon *et al.* 1995). Il existe deux approches pour inhiber le récepteur à l'EGF : l'inhibition de la liaison du ligand sur son récepteur par des anticorps monoclonaux et l'inhibition de l'activité tyrosine-kinase intracellulaire. Différentes études ont montré des effets prometteurs de l'anticorps monoclonal anti-EGFR *cetuximab* utilisé en association avec la chimiothérapie ou la radiothérapie en première ou deuxième ligne de traitement du cancer pulmonaire (Silvestri and Rivera 2005b). Parmi les inhibiteurs des tyrosines kinases couplées à l'EGFR, deux nouveaux agents oraux, *gefitinib* et *erlotinib*, se sont montrés efficaces en deuxième ou troisième ligne de traitement pour des patients chez lesquels le traitement de première et/ou deuxième ligne a échoué (Shepherd *et al.* 2005). Récemment, l'*erlotinib* a été mis sur le marché en Belgique. Ce médicament est destiné actuellement uniquement à traiter les patients dont le tissu tumoral est positif pour l'EGFR en immunohistochimie. Les

bénéfices retirés de ces inhibiteurs incluent une bonne réponse au traitement ainsi qu'une amélioration de la qualité de vie pour la moitié des patients traités.

Le VEGF et ses récepteurs sont des régulateurs clés dans les processus d'angiogenèse et constituent des cibles thérapeutiques intéressantes pour le traitement des pathologies tumorales. *Bevacizumab*, un anticorps monoclonal dirigé contre le VEGF, est l'agent anti-angiogène le plus développé en clinique pour les tumeurs pulmonaires non à petites cellules. Une étude de phase III a montré une survie améliorée chez des patients traités avec *bevacizumab* en combinaison avec un traitement de première ligne (Giaccone 2007) comparativement aux patients traités avec une chimiothérapie conventionnelle.

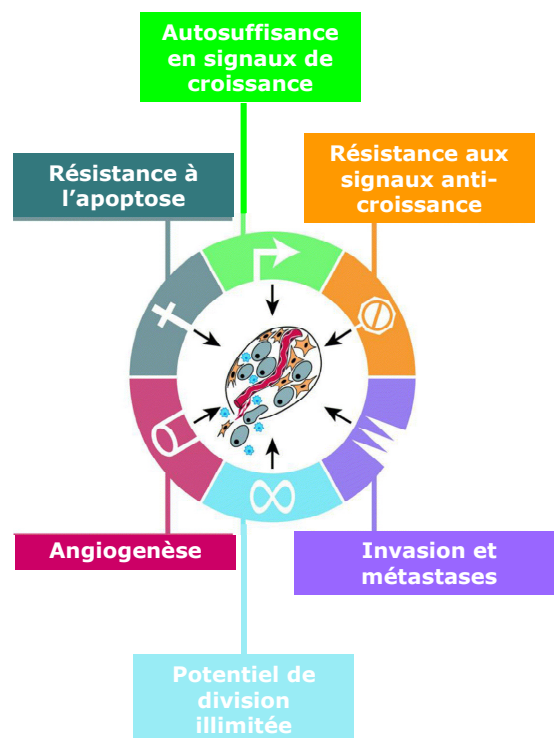
## **2. Le développement du cancer : le concept du « *seed and soil* », les acteurs cellulaires**

### 2.1 Le cancer, une évolution en plusieurs étapes

Les avancées rapides de la recherche contre le cancer ont généré une multitude de données permettant de décrire le cancer comme étant une maladie impliquant des changements dans le génome. En effet, l'étude des altérations de gènes dans des cellules cancéreuses humaines et animales a permis d'identifier d'une part, des mutations induisant l'activation d'oncogènes, gènes stimulant la prolifération cellulaire ou inhibant l'apoptose et, d'autre part, des mutations induisant la perte de fonction d'anti-oncogènes, gènes suppresseurs de tumeurs ou inducteurs d'apoptose.

L'acquisition d'un phénotype tumoral se déroule en plusieurs étapes, chacune étant associée à des modifications génétiques conduisant à la transformation progressive de cellules normales vers un état cancéreux.

Le développement des carcinomes bronchiques repose, comme pour la plupart des cancers, sur la coopération et l'accumulation de différentes altérations dans le génome des cellules qui consiste en: (1) une indépendance vis-à-vis des signaux de croissance, (2) une insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance (3) une insensibilité à l'apoptose, (4) un potentiel de réplication illimitée, (5) une induction de l'angiogenèse, (6) un profil migratoire et invasif aboutissant à la formation de métastases (figure 6) (Hanahan and Weinberg 2000b).



**Figure 6 :** Résumé des potentialités acquises lors de la transformation d'une cellule saine en cellule cancéreuse. D'après Hanahan and Weinberg 2000.

Les cellules ayant acquis ces nouvelles capacités prolifèrent de façon anarchique et se disséminent à distance pour former des métastases. Il est important de souligner que l'apparition de ces altérations ne serait possible sans l'instabilité génomique créée lors du dysfonctionnement des systèmes de contrôle préservant l'intégrité du génome (Nguyen and Massague 2007a). En effet, de nombreux gènes impliqués dans la détection et la réparation de dommages à l'ADN, tels que *p53*, sont mutés dans la plupart des cancers humains (Levine 1997).

### 2.1.1 Les oncogènes et les anti-oncogènes dans les cancers pulmonaires

*Hormis l'arrêt et la prévention du tabagisme, la détection précoce du cancer pulmonaire à des stades peu avancés semble primordiale et permettrait d'améliorer drastiquement les chances de survie des patients concernés. Une compréhension complète et approfondie des événements biologiques contribuant à l'initiation et à la progression de la maladie est nécessaire à l'établissement d'un traitement optimal (Kaye 2001a). La validation*

*de biomarqueurs pour la détection de lésions précancéreuses est donc d'un intérêt majeur et fait l'objet de recherches approfondies (Brambilla et al. 2003).*

Le cancer pulmonaire est souvent décrit comme une maladie multifocale. En effet, l'analyse histologique de biopsies issues de l'arbre bronchique de patients atteints de cancer pulmonaire a, dans certains cas, montré la coexistence de lésions pré-invasives fournissant une explication possible à l'observation fréquente de deux tumeurs pulmonaires primaires (tumeurs synchrones). Les gènes clés impliqués dans ce phénomène sont en général les gènes régulant le cycle cellulaire, la sénescence, l'apoptose, la réparation, la différenciation et la migration cellulaires.

Les oncogènes appartenant aux familles *myc* (Johnson *et al.* 1988;Kaye 2001b) et *ras* (Cooper *et al.* 1997;Kaye 2001c), ainsi que les anti-oncogènes *réтинoblastome* (Hensel *et al.* 1990;Reissmann *et al.* 1993), *p53* (Greenblatt *et al.* 1994), *p15* et *p16* (Washimi *et al.* 1995) sont associés aux tumeurs pulmonaires malignes. La surexpression de gènes codant pour *c-erbB-1*, *c-erbB-2* (Potti *et al.* 2002), *c-src*, *c-kit* (Krystal, Hines, and Organ 1996) est également associée aux tumeurs pulmonaires.

### *2.1.2 Diagnostic et pronostic des cancers pulmonaires en fonction de profils d'expression génique*

Les progrès techniques et informatiques réalisés au cours des dernières années ont permis l'émergence de nouvelles méthodes biologiques d'investigation moléculaire. Un exemple de ces nouvelles méthodes utilisées pour l'étude du transcriptome est la technologie des « microarrays ». Leurs premières utilisations en cancérologie pulmonaire ont été effectuées, entre autres, dans le but de déterminer si il existe différents profils d'expression génique au sein des carcinomes non à petites cellules. Ainsi, un microarray sur des échantillons microdisséqués de tumeurs primaires pulmonaires non à petites cellules a permis d'identifier un profil d'expression de gènes en fonction de la dissémination métastatique ganglionnaire des tumeurs. Ces gènes individuels identifiés pourraient contribuer à la progression des tumeurs pulmonaires non à petites cellules et représenter des nouvelles cibles thérapeutiques (Hoang *et al.* 2004). Une étude récente sur des échantillons de tumeurs pulmonaires épidermoïdes a permis d'établir un profil d'expression de transcrits potentiellement importants, en tenant compte de l'hétérogénéité cellulaire des tissus pulmonaires (Hawthorn *et al.* 2006b). L'analyse des gènes modulés a indiqué un rôle significatif de la voie de signalisation MAPK/ERK (*Mitogen-Activated Protein Kinase/*



*Extracellular signal-Regulated Kinase*) dans le développement et la croissance des tumeurs pulmonaires. De plus, les membres de la famille de protéines liant le calcium, S100P ou S100A2, ainsi que l'interleukine-8 (IL-8), connue pour ses fonctions pro-inflammatoires et régulatrices de l'angiogenèse, ont été identifiés comme jouant un rôle important dans le développement des tumeurs pulmonaires épidermoïdes (Hawthorn *et al.* 2006a).

Les oncogènes *ras* et *egfr* ainsi que le gène suppresseur de tumeurs *p53* ont également été proposés comme biomarqueurs sériques pour le diagnostic et le pronostic des tumeurs pulmonaires non à petites cellules. Cependant, sur base des résultats récemment publiés, l'usage en routine de ces biomarqueurs n'est pas recommandé. A ce jour, aucun gène suppresseur de tumeurs ou oncogène proposé n'est assez sensible ou spécifique pour être utilisé en routine clinique dans un but diagnostique ou pronostique. L'usage d'une combinaison de différents biomarqueurs, spécifique du type de tumeur, semble dès lors plus approprié (Helmig and Schneider 2007).

## 2.2 Les tumeurs et leur microenvironnement : « modifier le sol affecte la graine »...

*Bien que le concept de l'acquisition unique d'une autonomie de croissance par les cellules cancéreuses ait prévalu pendant longtemps, il s'avère aujourd'hui trop simple. En effet, l'exploration de la prolifération anarchique observée lors du phénomène tumoral était auparavant focalisée sur l'analyse des cellules épithéliales génétiquement modifiées. Les cellules adjacentes à la tumeur étaient considérées comme des éléments structuraux passifs, principalement responsables d'une réponse immune et s'opposant au développement de la tumeur. Cependant, ce concept traditionnel a été réexaminé par de nombreux investigateurs (Beacham and Cukierman 2005a; Cheng and Weiner 2003). L'hypothèse « seed and soil » émise par Paget en 1889 postulait déjà une contribution des fibroblastes stromaux à la préparation d'un environnement favorable à la dissémination tumorale (Paget 1889). La dérégulation de la croissance normale s'explique ainsi également par la contribution active de différents effecteurs présents dans la tumeur constituant le microenvironnement tumoral, aussi appelé stroma. La signalisation entre différents types cellulaires présents au sein de la tumeur s'avère donc importante et recadre le principe d'autonomie de croissance acquise par les cellules cancéreuses.*

Le développement tumoral ainsi que la formation de métastases sont des processus complexes nécessitant la coordination de nombreux événements impliquant des modifications dans l'expression génique des cellules tumorales (Nguyen and Massague 2007b). De plus, les cellules cancéreuses induisent une modification du stroma par l'expression de facteurs de croissance qui altèrent la composition de la matrice extracellulaire, qui favorisent l'angiogenèse et la prolifération des fibroblastes et qui recrutent des cellules inflammatoires (Tlsty and Hein 2001). Parallèlement, les éléments stromaux, en particulier les fibroblastes, participent activement aux processus d'invasion tumorale par l'expression de protéines diverses (Kalluri and Zeisberg 2006d) dont des protéases et des facteurs de croissance (Noel and Foidart 1998; Noel, Jost, and Maquoi 2008a).

En condition physiologique, le stroma sert de barrière naturelle à la transformation tumorale. Les fibroblastes ont un index de prolifération bas et produisent les facteurs nécessaires pour maintenir l'homéostasie tissulaire (Tuxhorn, Ayala, and Rowley 2001a). Lors de contraintes tissulaires, comme par exemple la rupture de la membrane basale durant le développement tumoral, l'homéostasie tissulaire est affectée, les interactions normales stromales-épithéliales sont bouleversées. Le phénotype et le taux de prolifération des cellules stromales sont modifiés, rapidement et de façon réversible, afin de rétablir l'homéostasie au niveau des tissus (Tuxhorn, Ayala, and Rowley 2001b). Une étude menée par Mueller *et al* montre que le stroma normal peut rendre un phénotype normal à des cellules génétiquement altérées non tumorigènes, mais pas à des cellules tumorales malignes (Mueller and Fusenig 2002; Mueller and Fusenig 2004). Des changements induits par les cellules tumorales dans la signalisation et la plasticité du stroma déclenchent un ensemble d'altérations induisant la formation d'un stroma « activé » capable de supporter et d'initier le développement tumoral (Giatromanolaki, Sivridis, and Koukourakis 2007; Liotta and Kohn 2001; van den 1988; Weaver and Gilbert 2004) (figure 7). Dans ce cas, la composition de la matrice extracellulaire est modifiée ainsi que le phénotype des cellules du stroma qui tend alors vers un phénotype hautement prolifératif (Beacham and Cukierman 2005b). Ces changements sont fréquemment définis par le terme « *desmoplasie* » qui sous-entend un stroma basé sur une composition abondante de collagène, une réponse immune intense, une activation de facteurs de croissance et d'enzymes de remodelage ainsi qu'une prolifération accrue des fibroblastes (Kalluri and Zeisberg 2006c).

Différentes études confirment ainsi que l'altération du microenvironnement stromal est *per se* suffisante pour promouvoir la transformation de cellules épithéliales à des stades précoces de la tumorigenèse (Barcellos-Hoff and Ravani 2000; Elenbaas *et al.* 2001; Maffini *et*

al. 2004;Noel *et al.* 1993a). Compte tenu de la similarité entre la réponse stromale durant la progression tumorale et les phénomènes observés lors de la cicatrisation tissulaire, les tumeurs sont souvent décrites comme des « blessures qui ne guérissent pas » (Dvorak 1986).

Des données récentes suggèrent que les fibroblastes sénescents participent à la génération d'un environnement tissulaire pro-oncogène par la sécrétion de métalloprotéases matricielles (MMPs) (Liu and Hornsby 2007). Ceci peut en partie expliquer l'incidence accrue de cancers se manifestant avec l'âge.

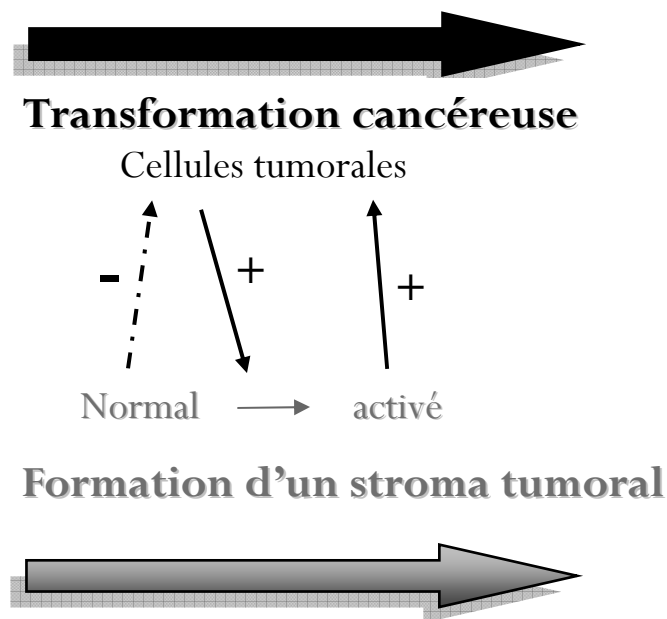


Figure 7 : Durant la progression tumorale, la transformation cancéreuse et la formation d'un stroma tumoral se produisent parallèlement (De Wever and Mareel 2003;Kuperwasser *et al.* 2004). Le stroma normal sert de barrière naturelle s'opposant à la transformation tumorale. Durant le stade initial de transformation cancéreuse, les cellules tumorales « activent » le stroma normal. Une boucle d'interactions entre le stroma et la tumeur crée alors des altérations supplémentaires résultant en un stroma activé, capable de supporter le développement tumoral. Adapté d'après Beacham and Cukierman 2005.

### *2.2.1 Les fibroblastes associés aux tumeurs : « les fermiers qui travaillent le sol »*

Durant ces dernières années, de nombreuses revues ont focalisé leur attention sur les fibroblastes « associés aux tumeurs » et ont tenté de clarifier leurs caractéristiques phénotypiques ainsi que leur contribution aux processus de carcinogénèse (Bhowmick, Neilson, and Moses 2004;Kalluri and Zeisberg 2006a).

Les fibroblastes du tissu normal sont des cellules fusiformes ayant un cytosquelette composé d'actine et de filaments intermédiaires de vimentine, incorporées dans une matrice de tissu conjonctif composée principalement de collagène de type I et de fibronectine. Associées aux tumeurs, ces cellules sont caractérisées par la présence d'une protéine fibreuse, l'« *α-Smooth Muscle Actin* » ( $\alpha$ -SMA) (figure 8). Ces fibroblastes activés, ou myofibroblastes, disposent d'une activité proliférative accrue et produisent des protéines de la matrice extracellulaire telles que le collagène de type I, la ténascine C et la fibronectine-EDA (*Extra Domain A*). Ces cellules sont également responsables de la production importante de différentes enzymes qui permettent un renouvellement de la matrice extracellulaire mais aussi la création de signaux pour les cellules environnantes. Parmi ces enzymes, on retrouve les métalloprotéases, qui jouent un rôle clé dans la croissance de la tumeur (*vide infra*). Les fibroblastes activés sont ainsi susceptibles d'affecter de manière très importante le comportement des cellules tumorales (Moinfar *et al.* 2000; Olumi *et al.* 1999). De nombreux facteurs de croissance, tels que le « *Transforming Growth Factor* » (TGF)- $\beta$  sont capables d'activer ces fibroblastes.

Le TGF- $\beta$  est un médiateur qui dispose de nombreuses capacités à induire un stroma réactif dans les tumeurs puisqu'il peut réguler la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes (Ronnov-Jessen and Petersen 1993). De plus, il induit la synthèse de facteurs mitogènes et de composants de la matrice extracellulaire tels que les collagènes de type I et III, la fibronectine ou la ténascine par les fibroblastes (Akhurst 2002). En agissant sur les cellules endothéliales et les péricytes, le TGF- $\beta$  régule l'angiogenèse. Ce facteur peut également inhiber la surveillance immunitaire dans les tumeurs en supprimant la prolifération des cellules T, des cellules « *Natural Killer* » et des macrophages (Akhurst and Derynck 2001; Pardali and Moustakas 2007).

Figure 8 : Les fibroblastes associés à un stroma réactif et activés par des facteurs de croissance ou des protéases sont caractérisés par la présence de fibres de stress d'actine (*α-smooth-muscle-actin stress fibres*). Un dépôt important de composants de la matrice extracellulaire par les fibroblastes activés est observé (Kalluri and Zeisberg 2006).

Dans le cancer du poumon, les fibroblastes associés aux tumeurs exercent des effets qui favorisent la croissance tumorale. L'utilisation d'un microarray a permis d'établir un profil de gènes exprimés par des fibroblastes co-cultivés avec des cellules issues de tumeurs pulmonaires non à petites cellules ou par des fibroblastes cultivés seuls. Parmi les gènes

modulés, certains gènes codent pour des facteurs de croissance et de survie, pour des facteurs angiogènes, des protéases, des inhibiteurs de protéases, des récepteurs transmembranaires ou pour des kinases (Fromigue *et al.* 2003).

### 2.3 L'angiogenèse

Une des étapes les plus importantes pour une tumeur, lorsqu'elle a atteint une taille critique de 1 mm<sup>3</sup>, est le développement de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de l'endothélium de vaisseaux sanguins préexistants, un processus communément appelé angiogenèse (figure 9). Cette néovascularisation, nécessaire à la poursuite de la croissance tumorale, assure l'approvisionnement de la tumeur en oxygène et en nutriments et fournit une voie de dissémination pour les métastases (Carmeliet 2000).

Figure 9 : Rôle du VEGF dans la formation de nouveaux vaisseaux sanguins supportant le développement tumoral Ferrara, [gene.com](http://gene.com).

Elle se distingue de la vasculogenèse dans laquelle des cellules souches précurseurs, les angioblastes, se différencient pour former des vaisseaux. Différents mécanismes fondamentaux de l'angiogenèse ont été identifiés : le bourgeonnement et l'intussusception. Au cours de l'angiogenèse bourgeonnante, des masses de cellules endothéliales se forment à la surface externe des capillaires et des veinules, appelés bourgeons endothéliaux. La migration orientée des cellules endothéliales vers la source du stimulus angiogénique est suivie d'une phase de différenciation en structure capillaire puis d'une maturation des vaisseaux natifs en vaisseaux matures. La maturation des vaisseaux nécessite le recrutement et le dépôt des péricytes consolidant les structures vasculaires. L'angiogenèse intussusceptive est caractérisée par un élargissement et une séparation des vaisseaux déjà formés par l'insertion d'une colonne tissulaire au sein de la lumière. Pour ce faire, elle sollicite l'intervention de cellules endothéliales, de macrophages et de cellules péri-vasculaires pour le dépôt de la matrice formant la paroi séparant les deux parties du vaisseau. Son implication est documentée essentiellement lors du remodelage du plexus capillaire primaire au cours du développement embryonnaire et lors de l'expansion des capillaires pulmonaires chez le nouveau-né (Burri and Djonov 2002).

Au cours de ces dernières années, il est devenu clair que l'angiogenèse est contrôlée par un équilibre entre inducteurs et inhibiteurs produits par les cellules normales ou tumorales (Hanahan and Folkman 1996). Dans des conditions physiologiques, la néovascularisation est strictement régulée. Au contraire, dans les phénomènes pathologiques, elle est dérégulée. Parmi les éléments pro-angiogènes figurent de nombreux facteurs de croissance dont les plus puissants sont probablement le « *Vascular Endothelial Growth Factor* » (VEGF) et le « *basic-Fibroblast Growth Factor* » (bFGF). Par opposition à ces activateurs, on retrouve les inhibiteurs de l'angiogenèse qui sont représentés, entre autres, par les thrombospondines ou des fragments de dégradation de protéines qui, à l'état natif, sont dépourvues d'activité anti-angiogène.

#### 2.4 L'inflammation et le cancer

La relation inflammation-cancer est aujourd'hui un paradigme généralement accepté (Aggarwal *et al.* 2006; Balkwill, Charles, and Mantovani 2005; Coussens and Werb 2002). Cette observation a été signalée pour la première fois en 1863 par Rudolf Virchow, qui nota la présence de leucocytes dans le tissu néoplasique et supposa qu'il existait un lien entre l'inflammation et le cancer. L'inflammation initiale implique le recrutement de nombreuses cellules inflammatoires vers des sites endommagés avec une libération de cytokines et d'autres agents pro-inflammatoires. Des aberrations des mécanismes apoptotiques et de phagocytose de cellules inflammatoires peuvent mener à une inflammation persistante, chronique. Dans ce contexte, la prolifération cellulaire persistante et la production importante de facteurs de croissance, de cytokines, de dérivés réactifs de l'oxygène pouvant causer des dommages à l'ADN, contribuent à la création d'un microenvironnement pro-tumoral (Lu, Ouyang, and Huang 2006) (figure 10).

Figure 10: **a.** L'inflammation aiguë initie une série d'événements menant à l'élimination du pathogène et un remodelage tissulaire. Elle se traduit d'abord par une activation de cellules résidentes (mastocytes, macrophages et cellules dendritiques) et une attraction de granulocytes, suivie d'une infiltration de cellules immunitaires induisant une réponse spécifique et de cellules mésenchymateuses (fibroblastes et cellules endothéliales) permettant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins et d'une matrice de collagène. **b.** Durant la transformation cancéreuse, les cellules épithéliales et stromales subissent des altérations favorisant la prolifération cellulaire. Ces altérations peuvent mener à une réponse inflammatoire qui promeut davantage la croissance tumorale par l'activation du stroma environnant (Albini and Sporn 2007).

On y retrouve des macrophages mais également d'autres types cellulaires tels que des neutrophiles, des éosinophiles, des cellules dendritiques, des mastocytes et des lymphocytes. Le développement du cancer est régulé par la présence de messagers de l'inflammation tels des cytokines (*Tumor Necrosis Factor* ou TNF- $\alpha$ , Interleukine-1 ou IL-1) ou des chimiokines mais aussi par le remodelage tissulaire et l'angiogenèse associés à l'inflammation. Cette association inflammation-cancer a été illustrée par de nombreuses études cliniques : dans le contexte du système respiratoire, le risque de cancer est associé à la sévérité et à la durée de la maladie inflammatoire (Borm and Driscoll 1996). Une relation entre la maladie asthmatique (Vesterinen *et al.* 1993) ou la fumée de tabac avec les cancers pulmonaires a été établie.

### **3. Le développement du cancer : les acteurs moléculaires**

#### **3.1 La voie de l'EGFR/ErbB**

La famille ErbB de récepteurs tyrosines kinases participe à diverses fonctions cellulaires telles que la prolifération, la migration, la différenciation et la survie (Holbro and Hynes 2004). Cette famille des récepteurs ErbB est composée de quatre membres : le récepteur à l'EGF (EGFR)/ErbB1/HER1, ErbB2/Neu/HER2, ErbB3/HER3 et ErbB4/HER4. La liaison du ligand sur son récepteur, présent sur la majorité des cellules normales, induit une dimérisation du récepteur, accroissant l'activité des tyrosines kinases intrinsèques. Ceci résulte en une autophosphorylation nécessaire pour l'activité catalytique du récepteur. La

kinase EGFR activée phosphoryle alors des résidus tyrosines de substrats cellulaires tels que la phospholipase C ou la *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK) (Harris, Chung, and Coffey 2003).

Les ligands de ce récepteur sont, mis à part l'EGF, le « *Transforming Growth Factor- $\alpha$*  » (TGF- $\alpha$ ), l'amphiréguline (AR), le « *Heparin-binding EGF-like Growth Factor* » (HB-EGF), l'épiréguline, l'épigène, la  $\beta$ -celluline et 4 neurégulines. Ces ligands sont d'abord synthétisés sous forme de précurseurs transmembranaires et requièrent un clivage protéolytique par des protéases zinc-dépendantes pour leur activation. Le ligand soluble peut alors lier et activer l'EGFR d'une manière autocrine ou paracrine. Les glycoprotéines ADAM (*A Disintegrin And Metalloproteinase*) sont des régulateurs importants du clivage des ligands de l'EGFR (Gee and Knowlden 2003; Ohtsu, Dempsey, and Eguchi 2006).

Fin des années 1990, l'EGFR a été identifié comme candidat jouant un rôle important dans la biologie des tumeurs. De nombreuses mutations ont été retrouvées au niveau de l'ARNm de l'EGFR dans des tissus tumoraux tels que les cancers pulmonaires non à petites cellules (Yatabe and Mitsudomi 2007) ou les cancers mammaires (Chan, Hill, and Gullick 2006). Ces mutations peuvent induire une prolifération cellulaire incontrôlée et un phénotype malin. Hormis les mutations survenant au niveau de l'EGFR, la surexpression de ses ligands ou la co-expression du ligand avec le récepteur peuvent conduire à une transduction anormale du signal de l'EGFR.

### 3.2 Les chimiokines

Les chimiokines représentent une large famille de polypeptides pro-inflammatoires classés en 4 groupes, en fonction du nombre d'acides aminés qui séparent les deux premières cystéines conservées. Leurs fonctions sont l'attraction et le contrôle de l'état d'activation des cellules du système immunitaire. Elles régulent ainsi le recrutement et le trafic des leucocytes vers des sites inflammatoires favorisant une réponse immune efficace (Zlotnik and Yoshie 2000).

De nombreuses études démontrent aujourd'hui le rôle complexe des chimiokines lors de la progression tumorale. Elles peuvent influencer la croissance tumorale, la formation de métastases, l'angiogenèse et le recrutement de cellules immunitaires (Balkwill 2004; Kulbe *et al.* 2004; Ruffini *et al.* 2007).



Les chimiokines produites par les cellules tumorales ou par les cellules stromales environnantes peuvent favoriser la croissance tumorale en stimulant d'une part, la prolifération cellulaire (Kijima *et al.* 2002;Phillips *et al.* 2003;Sun *et al.* 2003) et, d'autre part, le recrutement de cellules endothéliales progénitrices, nécessaires à l'angiogenèse tumorale (Orimo *et al.* 2005).

Elles peuvent également faciliter l'invasion des cellules tumorales en augmentant la production de certaines enzymes, comme les MMPs, telles que la MMP-2, -9 (Brand *et al.* 2005;Fernandis *et al.* 2004), ou la MT1-MMP (Bartolome *et al.* 2004), impliquées dans la dégradation et le remodelage des composants de la matrice extracellulaire.

La migration des cellules tumorales vers des organes distants est comparable à la migration des lymphocytes dirigée par des chimiokines lors de processus inflammatoires. L'induction de l'expression de récepteurs aux chimiokines tels que CXCR4 ou CCR7 sur les cellules tumorales est corrélée à une migration de ces cellules vers des sites spécifiques exprimant des taux élevés de ligands respectifs (tels que CXCL12 ou CCL21) permettant la dissémination métastatique vers des organes cibles (Muller *et al.* 2001).

A l'inverse, une autre fonction non négligeable des chimiokines est la régulation de l'immunosurveillance. La production de chimiokines par des cellules tumorales entraîne le recrutement de leucocytes au niveau de la tumeur pouvant être à la base d'une réponse immunitaire anti-tumorale (Zou 2005).

### 3.3 Les métalloprotéases à zinc

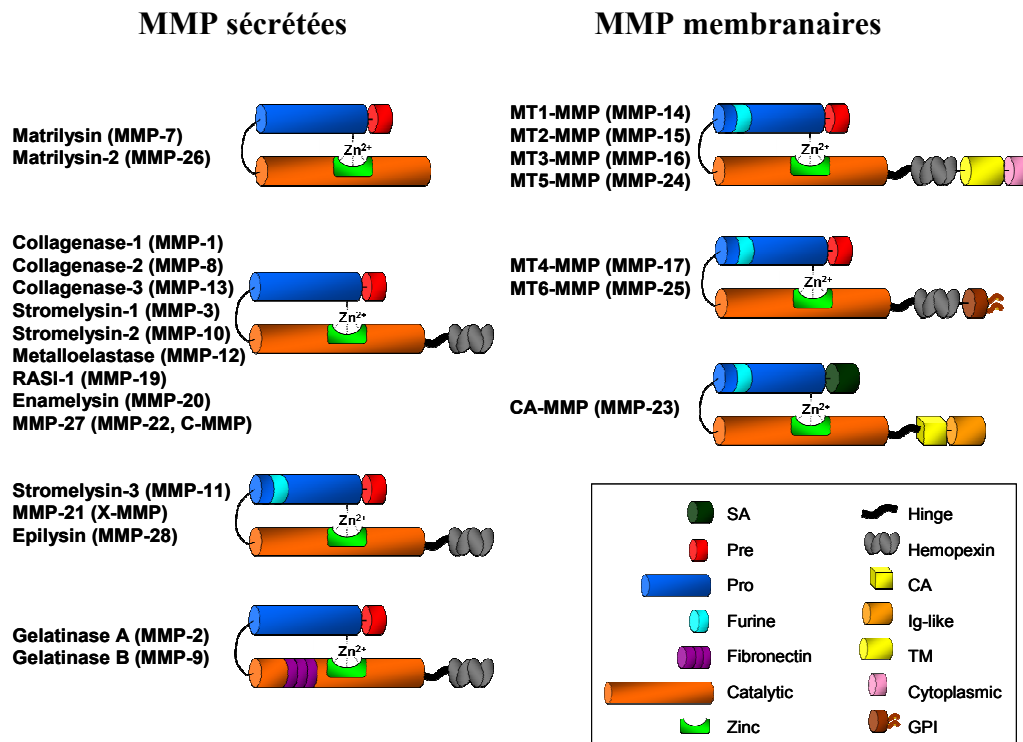
*Le remodelage du tissu conjonctif est essentiel pour la croissance et le développement normal. De nombreuses pathologies sont associées à une perturbation de la dégradation de la matrice extracellulaire. La dégradation du tissu conjonctif est également un aspect essentiel de la croissance tumorale, elle crée l'espace nécessaire pour l'invasion tumorale locale et permet aux cellules tumorales d'avoir accès aux systèmes vasculaires et lymphatiques. Il est généralement admis que les protéases de la famille des MMPs, des ADAMs et ADAMTS jouent, entre autres, un rôle majeur dans cette dégradation du tissu conjonctif.*

#### 3.3.1 Les Métalloprotéases Matricielles

a) Structure et classification

Les métalloprotéases matricielles (MMPs), ou *matrixines*, appartiennent à la superfamille des *metzincines*, qui se compose également des *astacines*, des *adamalysines*, des *serralysines* et des *pappalysines* (Cawston and Wilson 2006;Stocker and Bode 1995b). La présence d'une méthionine conservée à proximité du site de liaison au zinc et propice au bon fonctionnement de ce site a conduit à intituler ce groupe « **Metzincines** » (Bode, Gomis-Ruth, and Stockler 1993).

Depuis la première description des MMPs en 1962 (GROSS and Lapiere 1962), 24 gènes codant pour les membres de la famille des MMPs ont été décrits chez l'humain, incluant les gènes dupliqués de la MMP-23 (Puente *et al.* 2003). En 2002, l'analyse structurale de ces enzymes a permis d'établir un nouveau système de classification basé sur leur structure plutôt que sur la spécificité du substrat (figure 11). La structure commune de la majorité de ces enzymes est organisée autour d'un **peptide signal** induisant la sécrétion extracellulaire, d'un **prodomaine** permettant de garder le statut latent de l'enzyme par l'interaction d'un résidu cystéine conservé du prodomaine avec l'atome de zinc du **domaine catalytique**. Un **domaine de type hémopexine** présent en C-terminal contribue à la spécificité des substrats liés et à l'interaction avec les inhibiteurs endogènes (Nagase, Visse, and Murphy 2006;Overall 2002). Dans certains cas, il existe un **site de clivage par la furine**, permettant une activation de la molécule lors de la maturation intracellulaire au sein du Golgi. Dans la sous-famille des gélatinases, le domaine catalytique contient un **domaine d'homologie avec la fibronectine** qui assure la liaison de ces enzymes avec leur substrat. Les MMPs membranaires (*membrane-type* MMP ou MT-MMP) possèdent de surcroît un **domaine transmembranaire** (MT-MMPs de type 1, 2, 3 et 5) ou une attache **glycosylphosphatidylinositol** (GPI) (MT-MMPs de type 4 et 6) assurant l'ancrage à la surface cellulaire ainsi qu'une portion **intracytoplasmique** impliquée dans plusieurs processus intracellulaires (Noel *et al.* 2004a;Sounni and Noel 2005).



**Figure 11** : Caractéristiques structurales des MMPs. La structure des MMPs est représentée par un prodomaine (PRO) ainsi que par un domaine catalytique. Le domaine hémopexine est lié au domaine catalytique par un peptide *linker*. Les gélatinases contiennent, en plus, trois modules d'homologie avec la fibronectine dans leur domaine catalytique. Les métalloprotéases matricielles membranaires sont ancrées à la membrane par un peptide transmembranaire (TM) ou par un ancrage glycosylphosphatidylinositol (GPI). La MMP-23 possède un domaine transmembranaire de type II en N-terminal (SA). De plus, elle possède en C-terminal des domaines uniques riches en cystéines, immunoglobuline (Ig)-like. Certaines MMPs possèdent un site de clivage par la furine, située entre le propeptide et le site catalytique, permettant leur activation intracellulaire. *D'après Chabottaux and Noel 2007.*

### b) Régulation de l'activité des MMPs

L'activité des MMPs est régulée à différents niveaux. On peut distinguer la régulation transcriptionnelle, l'activation par clivage du prodomaine ainsi que l'inhibition de l'activité enzymatique par des molécules spécifiques.

Les analyses structurales et fonctionnelles des régions promotrices au sein des gènes codant pour certaines MMPs ont révélé l'existence d'**éléments régulateurs** tels que «AP-1» (*Activator protein-1*) et «PEA-3» (*Polyoma virus Enhancer Activator-3*) qui activent la transcription lorsque les facteurs nucléaires correspondants s'y lient (Pendas *et al.* 1997). La transcription des MMPs, faible dans les tissus normaux, est régulée par des cytokines

inflammatoires, des facteurs de croissance, des hormones et des interactions cellule-cellule et cellule-matrice.

Le clivage du propeptide constitue un des éléments les plus connus de la régulation de l'activité des métalloprotéases. La plupart des MMPs sont synthétisées sous forme de **proenzymes**. L'obtention de MMPs actives requiert la déstabilisation de la liaison entre l'atome de zinc présent au niveau du site actif et la cystéine située à proximité de l'extrémité carboxy-terminale du prodomaine. Ce phénomène, aussi appelé « *cystein switch* », permet l'association d'une molécule d'eau avec l'atome de zinc, conférant à l'enzyme son activité catalytique (Nagase 1997; Van Wart and Birkedal-Hansen 1990).

Une fois activées, les MMPs peuvent être inhibées par une famille d'**inhibiteurs** tissulaires, les TIMPs (*Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases*). Il existe 4 TIMPs différents qui correspondent à des molécules relativement petites (21 à 28 kDa) et qui présentent de nombreux ponts disulfures, leur conférant une rigidité, nécessaire à leur activité biologique. Les TIMP-1, -2 et -4 sont des protéines sécrétées alors que TIMP-3 a la particularité d'être ancré à la matrice extracellulaire. Ces inhibiteurs forment avec les MMPs des complexes non-covalents de stœchiométrie 1:1. L'inhibition de l'activité catalytique résulte de l'occupation du site actif de la MMP par le TIMP et de la formation d'un complexe entre l'atome de zinc catalytique et une cystéine de l'extrémité N-terminale du TIMP. Cette régulation est finement contrôlée dans le temps et dans l'espace (Baker, Edwards, and Murphy 2002; Bode and Maskos 2003).

L' $\alpha$ 2-macroglobuline est un autre inhibiteur, non spécifique, des MMPs. Cette protéine est synthétisée par le foie et constituée de quatre sous-unités identiques de 180 kDa. Elle exerce son action par encombrement stérique résultant en la capture de la MMP et l'empêchant ainsi d'accéder aux substrats protéiques (Barrett and Starkey 1973).

### c) Activités biologiques des MMPs

Les MMPs ont pour principaux substrats les composants de la matrice extracellulaire. Le clivage de ces protéines matricielles influence la migration cellulaire, mais également la signalisation et les fonctions cellulaires telles que la prolifération, l'apoptose ou la morphogénèse. Les MMPs sont également impliquées dans des réseaux d'interaction avec d'autres molécules telles que des facteurs de croissance, des molécules d'adhérence cellulaire, des facteurs angiogènes, des cytokines et chimiokines ainsi que des zymogènes qu'elles activent (figure 12) (Cauwe, Steen, and Opdenakker 2007; Van Lint and Libert 2007; Vu and Werb 2000a). L'ensemble de ces fonctions leur confère un rôle particulier au cours de

l'embryogenèse. La plupart des MMPs sont également exprimées au cours de processus associés à la reproduction : cycle menstruel et ovulation. En outre, elles sont impliquées dans la cicatrisation tissulaire (Gutierrez-Fernandez *et al.* 2007) ainsi que dans les processus d'angiogenèse (Noel *et al.* 2004b).

Figure 12 : Modes d'action des MMPs. (A) Les MMPs participent à la migration cellulaire en dégradant la matrice extracellulaire (B) L'altération de la matrice extracellulaire modifie la prolifération, l'apoptose ainsi que la morphogenèse cellulaire. (C) Les MMPs modulent l'activité de molécules biologiquement actives telles que les facteurs de croissance ou leur récepteur par clivage ou par libération à partir de la matrice extracellulaire. (D) Les MMPs peuvent altérer la balance des activités protéolytiques en clivant les enzymes ou leurs inhibiteurs (Vu and Werb 2000b).

#### d) MMPs et cancer

L'implication des métalloprotéases matricielles dans la pathologie cancéreuse a été établie il y a de nombreuses années. Depuis, les études tentant de disséquer les mécanismes liant MMPs et cancer se sont multipliées. On sait aujourd'hui que les activités protéolytiques des MMPs contribuent à la transformation maligne de la tumeur par la libération de molécules actives qui induisent un microenvironnement favorable au développement tumoral (tableaux II et III).

Tableau II : Substrats des MMPs impliquées dans la progression cancéreuse. D'après Chabottaux and Noel 2007.

Substrats	Impacts	Processus biologiques affectés	Exemples représentatifs
<b>Composants de la matrice extracellulaire</b>	Dégradation de la matrice extracellulaire (MEC)	Migration cellulaire	MT1-, MT2- et MT3-MMPs régulent la transmigration de la membrane basale
	Libération de domaines cryptiques	Migration cellulaire	MT1-MMP génère un fragment de la laminine 5 promouvant la motilité
	Augmente la biodisponibilité de facteurs de croissance	Angiogenèse (stimulation)	MMP-9 mobilise le VEGF séquestré dans la MEC
	Libération de fragments anti-angiogènes	Angiogenèse (inhibition)	- MMP-9 clive le collagène de type IV et génère la tumstatine - MMP-3, MMP-9, MMP-12, MMP-13 et MMP-20 génèrent l'endostatine en clivant le collagène type XVIII
<b>Molécules de surface cellulaire</b> <i>E-Cadhérine</i>	Dissociation des cellules épithéliales	Adhésion cellule-cellule	MMP-3 et MMP-7 libèrent un fragment de l'E-cadhérine
<i>Fas-L</i>	Libération de Fas ligand lié à la membrane (mFasL)	Apoptose cellulaire	- MMP-3 produite par les cellules stromales libère mFas-L et a des effets pro-apoptotiques sur les cellules épithéliales environnantes

Tableau III : Substrats des MMPs solubles impliquées dans la progression cancéreuse. D'après Chabottaux and Noel 2007.

Substrats	Impacts	Processus biologiques affectés	Exemples représentatifs
<b>Protéines de liaison de facteurs de croissance</b>			
<i>IGFBP</i>	Augmente la biodisponibilité d'IGF	Prolifération cellulaire	- MMP-3 dégrade l'IGFBP-1 - MMP-7 génère l'IGF-II bioactif en dégradant le complexe IGF-II/IGFBP-2
<i>Complexe du TGF-β</i>	Libère le TGF-β	Prolifération cellulaire Angiogenèse	MMP-2 et MMP-9 libèrent le TGF-β d'un complexe inactif formé de TGF-β, de la protéine de latence associée au TGF-β et de la protéine de liaison latente
<b>Chimiokines/cytokines</b>			
<i>IL-8 (CXCL8)</i>	Activation de l'IL-8	Chimioattraction Inflammation	MMP-9 potentialise les effets de l'IL-8
<b>Protéases</b>			
<i>Pro-MMP</i>	Activation de MMP	Protéolyse	Cascade d'activation de pro-MMPs
<i>Plasminogène</i>	Libération de molécules anti-angiogènes	Angiogenèse (inhibition)	MMP-12 génère l'angiostatine par clivage du plasminogène

Plusieurs études ont décrit l'implication de ces protéases dans la progression tumorale et la formation de métastases (Deryugina and Quigley 2006). Ainsi, les MMP-2, -9, -13, les MT1 et MT4-MMPs ont été largement décrites comme favorisant le développement et la progression de différents types de cancers (Chabottaux *et al.* 2006; Hofmann *et al.* 2000; Itoh and Nagase 2002).

Il est important de noter qu'il existe des exemples où une corrélation négative entre l'expression de MMPs et la progression cancéreuse a été rapportée (Lopez-Otin and Matrisian 2007b; Martin and Matrisian 2007a). Ainsi, des cellules humaines de cancers mammaires qui ont acquis des propriétés métastatiques ont des taux fortement réduits de MMP-8 comparativement aux cellules non métastatiques. De plus, des souris déficientes pour le gène de la MMP-3 ou de la MMP-8 ont une susceptibilité accrue de développer des mélanomes (Balbin *et al.* 2003; McCawley *et al.* 2004; Van Lint and Libert 2006). La MMP-12 est principalement produite par les macrophages et son expression est corrélée à une réduction de la croissance tumorale (Gorin-Rivas *et al.* 2000). Cette protéase supprime la croissance de

métastases pulmonaires dans un modèle visant à étudier le développement de métastases à partir de tumeurs primaires implantées au niveau sous-cutané ou le développement de métastases lorsque les cellules tumorales sont directement injectées en intraveineux, en l'absence de tumeur primaire (Houghton *et al.* 2006). La MMP-19 est également un régulateur négatif de l'angiogénèse et de l'invasion tumorale (Jost *et al.* 2006).

### 3.3.2 Les ADAMs et ADAMTS

« *L'attrait de l'étude des ADAMs et ADAMTS réside dans la découverte de leurs multiples fonctions dans des systèmes biologiques divers* ».

Les membres de la famille des ADAMs (*A Disintegrin And Metalloproteinase*) appartiennent à la superfamille des métalloprotéases zinc-dépendantes, les *metzincines* (Stocker and Bode 1995a). Structuellement, les ADAMs sont fort similaires aux SVMPs (*Snake Venom Metalloproteinase*) et constituent avec ces dernières et la sous-famille des ADAMTS la famille des *adamalysines*. Les ADAMs, ADAMTS et SVMPs se distinguent des MMPs par leur domaine disintégrine.

Les enzymes protéolytiques de la famille des ADAMs et ADAMTS sont connues depuis peu puisque les premières ADAMs ont été découvertes en 1993 (Wolfsberg *et al.* 1993b) et l'ADAMTS-1 a été identifiée en 1997 (Kuno *et al.* 1997d). Les fertilines  $\alpha$  et  $\beta$  (PH-30  $\alpha$  et  $\beta$ ), aujourd'hui respectivement connues sous le nom d'ADAM-1 et ADAM-2, sont les premières protéines possédant des domaines de type métalloprotéase et disintégrine à avoir été séquencées (Blobel *et al.* 1990b). Elles sont impliquées dans les liaisons entre le sperme et l'ovule (Blobel *et al.* 1990a; Wong *et al.* 2001) ainsi que dans la spermatogénèse (Wolfsberg *et al.* 1993a). Rapidement, de nombreux gènes encodant des protéines possédant les mêmes associations de domaines ont été clonés et caractérisés. Une nouvelle famille de gènes a ainsi été dénommée "ADAM" (Wolfsberg *et al.* 1995).



a) StructureADAMs

Les ADAMs sont des protéines généralement exprimées à la surface cellulaire. Leurs différents domaines ont des fonctions indépendantes mais complémentaires conférant à ces protéines des caractéristiques de protéases et de molécules d'adhésion (Blobel 1997; Primakoff and Myles 2000b) (figure 13).

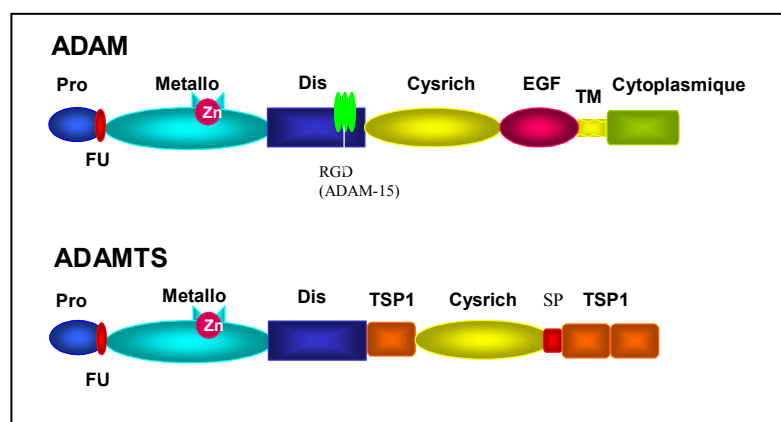


Figure 13 : Différents domaines structurels des ADAMs et ADAMTS. PRO : prodomaine, Metallo : domaine métalloprotéase, Dis : domaine disintégrine, Cysrich : domaine riche en cystéines, EGF : domaine EGF-like, TM : domaine transmembranaire, FU : site de reconnaissance par la furine, TSP-1 : domaine de type thrombospondine, SP : région spacer.

Les différents domaines constituant les ADAMs sont donc un **peptide signal** suivi du **prodomaine**, qui maintient le site métalloprotéase inactif grâce à un résidu cystéine conservé qui interagit avec le zinc du site actif. Le **site de reconnaissance par la furine**, localisé entre le prodomaine et le domaine métalloprotéase, participe à l'activation intracellulaire de certaines ADAMs par l'action de la furine ou de pro-protéines convertases de type furine (Seals and Courtneidge 2003a). Le domaine **métalloprotéase** est caractérisé par la présence d'une séquence conservée, commune aux MMPs, qui est indispensable à l'activité catalytique et dont les trois histidines sont impliquées dans la liaison d'un atome de zinc. Il est important de noter que certaines ADAMs présentent des altérations dans cette séquence conservée résultant en une perte de l'activité protéolytique (Black and White 1998).

Différentes études utilisant des protéines de fusion contenant le domaine **disintégrine** de certaines ADAMs suggèrent une interaction possible avec des molécules de type intégrines (Zhang *et al.* 1998b). Le domaine carboxy-terminal est composé du **domaine riche en cystéines** impliqué dans les fonctions de fusion cellule-cellule (Huovila, Almeida, and White 1996). Un domaine **EGF-like** est également présent mais sa fonction reste inconnue à l'heure actuelle. Le domaine **intracytoplasmique** est très variable en longueur et en séquence et peut contenir des sites de phosphorylation pour les kinases de type sérine/thréonine ou tyrosine ainsi que des sites de liaison SH3 (Kang, Cao, and Zolkiewska 2001; Stone, Kroeger, and Sang 1999).

A ce jour, 40 membres de la famille des ADAMs ont été identifiés parmi lesquels 25 sont exprimés chez l'humain et 19 possèdent une activité catalytique (Seals and Courtneidge 2003c) (tableau IV). Une liste complète et continuellement remise à jour est disponible sur le site : [http://www.people.virginia.edu/~jw7g/Table\\_of\\_the\\_ADAMs.html](http://www.people.virginia.edu/~jw7g/Table_of_the_ADAMs.html).

Tableau IV : Tableau des ADAMs.

Remarque : l'activité protéase n'est montrée que pour les protéases humaines. Ces protéases ne sont pas exclusivement exprimées chez l'humain. En gris, les protéases exprimées chez la souris mais non retrouvées chez l'homme.

ADAMs	Autres noms	Activité protéolytique (humain)
ADAM-1 a, b	PH-30 alpha ; fertiline alpha	-
ADAM-2	PH-30 beta ; fertiline beta	-
ADAM-3	cyritestine; tMDC I	-
ADAM-4	tMDCV	-
ADAM-5	tMDC II	-
ADAM-6	tMDC IV	-
ADAM-7	EAP I	-
ADAM-8	MS2, CD156	+
ADAM-9	MDC9, meltrine gamma	+
ADAM-10	MADM ; kuzbanian	+
ADAM-11	MDC	-
ADAM-12	meltrine alpha	+
ADAM-13		<i>(Xenopus Laevis)</i>
ADAM-14	adm-1, UNC-71	<i>(Caenorhabditis Elegans)</i>
ADAM-15	metargidine; MDC 15	+
ADAM-16	MDC 16	<i>(Xenopus Laevis)</i>
ADAM-17	TACE	+
ADAM-18	tMDCIII	-
ADAM-19	meltrine beta	+
ADAM-20		+
ADAM-21	ADAM-31	+
ADAM-22	MDC 2	-
ADAM-23	MDC 3	-
ADAM-24	testase-1	-
ADAM-25	testase-2	-
ADAM-26	testase-3	-
ADAM-27	ADAM-18	-
ADAM-28	eMDCII, MDC-Lm, MDC-Ls, TECADAM ADAM-28	+
ADAM-29		-
ADAM-30		+
ADAM-31	ADAM-21	-
ADAM-32		-
ADAM-33		+
ADAM-34	testase 4	-
ADAM-35	meltrine epsilon	<i>(chicken, Gallus gallus)</i>
ADAM-36	testase 6	-
ADAM-37	testase 7	-
ADAM-38	testase 8	-
ADAM-39	testase 9	-
ADAM-40	testase 10	-

ADAMTS

La famille complète des ADAMTS humaines comprend 19 gènes (Cal *et al.* 2002; Porter *et al.* 2005a) (tableau V). Ces molécules se distinguent des ADAMs par la présence de motifs thrombospondine de type I (TSP-1) du côté C-terminal, alors que les domaines *EGF-like*, transmembranaire et cytoplasmique sont absents (figure 13).

Comme les MMPs et les ADAMs, les ADAMTS possèdent un **prodomaine**, précédé d'un peptide signal, maintenant l'enzyme inactive. Les ADAMTS contiennent toutes un domaine **métalloprotéase** avec une séquence conservée (HEXXHXXGXXH). Ces molécules, à la différence des ADAMs, semblent donc être systématiquement pourvues d'une activité catalytique (Apte 2004). Toutes les ADAMTS comportent un **site de clivage pour la furine**. Un domaine **disintégrine**, un domaine central de type **thrombospondine**, un domaine **riche en résidus cystéines** ainsi qu'un domaine *spacer* de longueur variable sont également présents. La molécule d'ADAMTS se termine par un nombre variable de motifs thrombospondine de type I du côté C-terminal. Certaines de ces protéases possèdent un ou deux domaines supplémentaires en C-terminal, tels qu'un domaine **mucine** ou un domaine **GON** (ADAMTS-9, -20).

Tableau V : Tableau des ADAMTS.

<b>ADAMTS</b>	<b>Autres noms</b>	<b>Activité protéolytique</b>
<b>ADAMTS-1</b>	C3-C5, METH1, KIAA1346	+
<b>ADAMTS-2</b>	procollagène N-protéinase	+
<b>ADAMTS-3</b>	KIAA0366	+
<b>ADAMTS-4</b>	KIAA0688, aggrécanase-1, ADMP-1	+
<b>ADAMTS-5</b>	ADAMTS-11, aggrécanase-2, ADMP-2	+
<b>ADAMTS-6</b>		+
<b>ADAMTS-7</b>		+
<b>ADAMTS-8</b>	METH2	+
<b>ADAMTS-9</b>	KIAA1312	+
<b>ADAMTS-10</b>		+
<b>ADAMTS-12</b>	UNQ1918, PRO4389, AI605170	+
<b>ADAMTS-13</b>	vWFCP, C9orf8	+
<b>ADAMTS-14</b>		+
<b>ADAMTS-15</b>		+
<b>ADAMTS-16</b>		+
<b>ADAMTS-17</b>	FLJ32769, LOC123271	+
<b>ADAMTS-18</b>	ADAMTS-21	+
<b>ADAMTS-19</b>		+
<b>ADAMTS-20</b>		+

*b) Régulation de l'expression*

Les activités des ADAMs et ADAMTS sont régulées par plusieurs mécanismes : expression génique, activation du zymogène, régulation par des inhibiteurs et régulation intracellulaire.

**Expression génique** : l'expression des gènes codant pour les ADAMs et ADAMTS peut être régulée au niveau transcriptionnel en réponse à des cytokines, des facteurs de croissance ou en condition de stress cellulaire. Ainsi, une stimulation de cellules hépatiques stellaires avec le TGF- $\beta$ 1 induit une augmentation de l'expression de l'ADAM-12 par les voies de signalisation PI3K/Frap-mTOR/P70S6K (Le Pabic *et al.* 2003a; Le Pabic *et al.* 2005). L'expression de l'ADAM-9 peut être induite par des dérivés réactifs de l'oxygène lors de stress cellulaires (Sung *et al.* 2006).

**Régulation post-transcriptionnelle - activation du zymogène** : certaines ADAMs et ADAMTS possèdent un site de reconnaissance par la furine en aval de leur prodomaine. Des pro-protéines convertases telles que la furine peuvent activer ces enzymes du côté *Trans* du Golgi (Loechel *et al.* 1998c). Toutefois, les mécanismes d'activation des ADAMs ne possédant pas de site de reconnaissance par la furine ne sont pas encore élucidés. Il a cependant été rapporté que les ADAM-8 et -28 subissent un auto-clivage permettant leur activation (Howard, Maciewicz, and Blobel 2000; Schlomann *et al.* 2002). De plus, certaines MMPs peuvent cliver des proformes des ADAMs et ADAMTS (Rodriguez-Manzaneque *et al.* 2000b).

**Inhibition de l'activité des ADAMs et ADAMTS** : les ADAMs peuvent être inhibées par les TIMPs. Contrairement à l'inhibition des MMPs par les TIMPs, les activités des ADAM protéases sont principalement inhibées par TIMP-3. TIMP-3 inhibe efficacement l'activité des ADAM-10, -12, -17, -28 et -33 (Amour *et al.* 2000; Loechel *et al.* 2000). Les TIMP-1, -2 et -4 peuvent également contrôler l'activité des ADAMs (Huovila *et al.* 2005b). Les ADAM-8, -9 et -19 ne sont pas inhibées par les TIMPs (Amour *et al.* 2002; Chesneau *et al.* 2003). Les inhibiteurs naturels des ADAMTS sont peu nombreux. L' $\alpha$ 2-macroglobuline et le TIMP-3 sont les seuls à avoir montré un potentiel inhibiteur significatif (Wang *et al.* 2006).

**Interactions cytosoliques** : la partie intracytoplasmique de la plupart des ADAM protéases contient des sites de reconnaissance pour des protéines de signalisation (Seals and Courtneidge 2003b). Il est plausible que ces protéines participent à la régulation de l'activité métalloprotéase des ADAMs ainsi qu'à leur localisation subcellulaire (Izumi *et al.* 1998; Sundberg *et al.* 2004b).

c) Fonctions

La structure complexe mais conservée des membres de la famille des ADAMs et ADAMTS leur confère la capacité de participer à diverses fonctions les impliquant dans de très nombreux processus, incluant notamment la fécondation (Primakoff and Myles 2000a), l'adipogenèse (Kawaguchi *et al.* 2002b) ou le développement musculaire (Gilpin *et al.* 1998d).

Les ADAMs sont impliquées dans un réseau complexe d'interactions moléculaires (figure 14) et peuvent moduler des réponses cellulaires à des signaux divers par le clivage de l'ectodomaine et la maturation subséquente de protéines présentes à la surface cellulaire, phénomène communément appelé « *ectodomain shedding* » (Huovila *et al.* 2005a; Seals and Courtneidge 2003d). Le clivage du pro-TNF- $\alpha$  par l'ADAM-17 (aussi appelée TACE pour *TNF- $\alpha$  Converting Enzyme*), le convertissant en une forme soluble active, est un des éléments de régulation les plus importants pour l'activité biologique du TNF- $\alpha$  (Black 2002; Moss *et al.* 1997). De nombreux ligands de l'EGFR sont libérés à partir de la surface cellulaire suite à des clivages protéolytiques par les ADAMs (Zhou *et al.* 2006c). D'autres protéines telles que les récepteurs des cytokines (Althoff *et al.* 2000) ou des composants de la matrice extracellulaire (collagène IV, fibronectine) (Colige *et al.* 1995b; Millichip *et al.* 1998) sont également des substrats pour les membres de la famille des ADAMs.

La **migration et la détermination cellulaires** au cours de l'embryogenèse sont également des phénomènes régulés par les ADAMs. L'exemple le plus connu est celui de Notch, récepteur important pour le développement neuronal, ou de son ligand Delta qui peuvent tous deux être clivés par des ADAMs dont l'ADAM-10 (Hartmann *et al.* 2002; Qi *et al.* 1999). Le clivage du domaine extracellulaire de molécules d'adhésion cellulaire telles que l'E-cadhérine leur permet également de contrôler les processus de migration cellulaire (Arribas, Bech-Serra, and Santiago-Josefat 2006; Reiss, Ludwig, and Saftig 2006).

L'**adhésion cellulaire** est modulée grâce au domaine disintégrine des ADAMs. Alors que le domaine disintégrine est largement décrit comme interagissant avec des intégrines et donc capable de moduler les interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire (Eto *et al.* 2002a), il faut toutefois être prudent quant à l'interprétation des données publiées. En effet, une étude récente a démontré que la conformation tridimensionnelle de la protéine des ADAMs rend le domaine disintégrine inaccessible pour la liaison à des protéines (Takeda *et*

*al.* 2006). Selon cette étude, le domaine disintégrine devrait être considéré comme un domaine structurel plutôt que comme un ligand des intégrines.

La **fusion membranaire** est nécessaire pour le développement musculaire à partir des myoblastes et pour la fécondation. L'ADAM-12 contrôle en effet la fusion des myoblastes lors de la myogenèse (Yi *et al.* 2005). L'hétérodimère composé de deux sous-unités, ADAM-1 et ADAM-2, participe à la fusion du sperme avec l'ovule (Blobel *et al.* 1992).

La **signalisation intracellulaire** est également affectée par les membres de la famille des ADAMs. Plusieurs tyrosines kinases et des éléments du cytosquelette interagissent avec le domaine intracytoplasmique de nombreuses ADAMs qui permettent d'activer des voies de signalisation intracellulaire (Seals and Courtneidge 2003e). Dans certains cas, des fragments C-terminaux, résultant du clivage de l'ectodomaine, restent liés à la membrane et sont impliqués dans la transduction du signal comme démontré pour Notch.

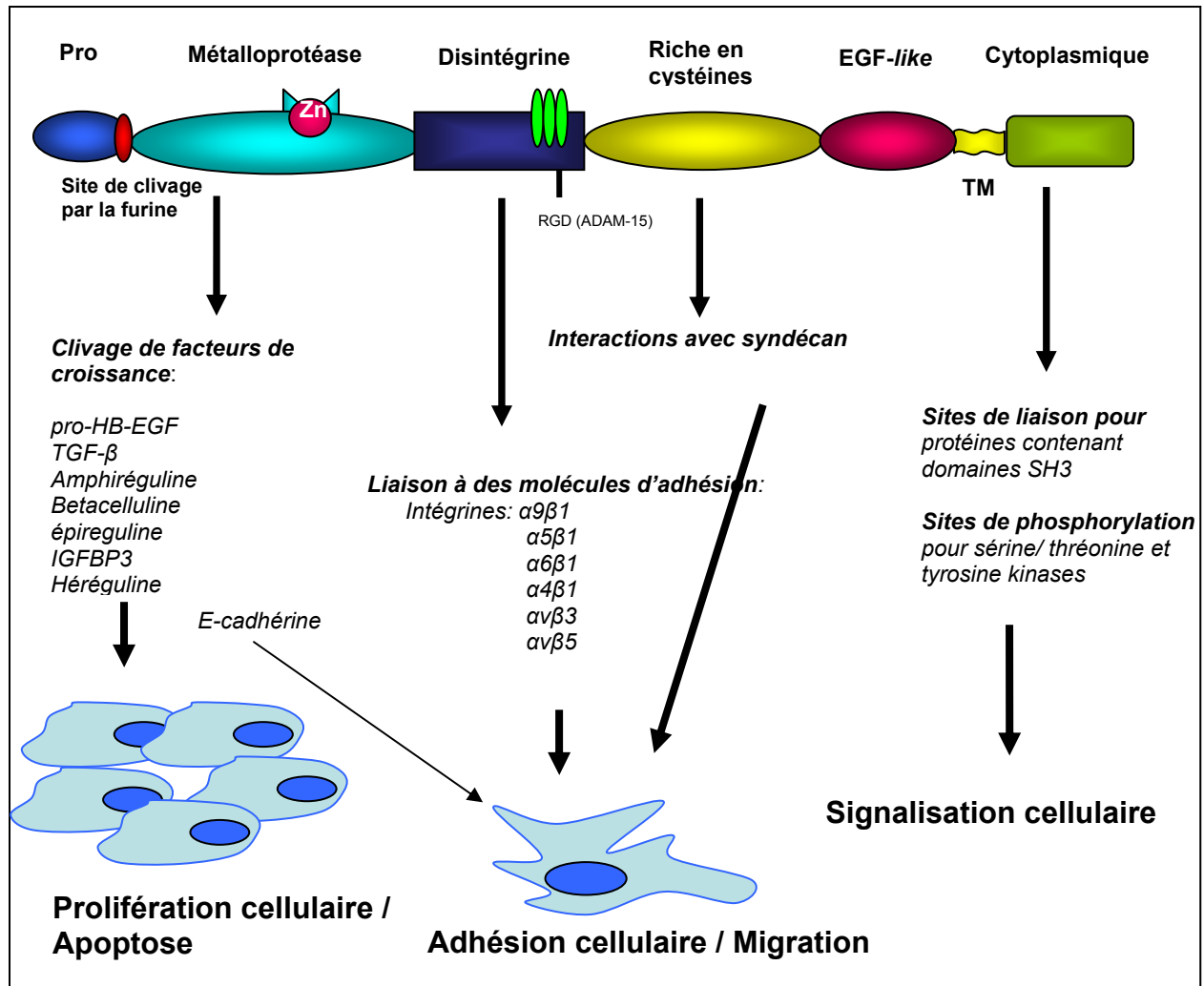


Figure 14 : Implication des ADAM protéases dans différents processus cellulaires. Grâce à leur organisation structurelle en différents domaines, les ADAMs peuvent exercer de multiples fonctions.

Certaines des ADAMTS sont des **aggrécanases** (ADAMTS-4, -5) et peuvent donc intervenir dans le métabolisme du cartilage. Les ADAMTS interviennent également dans les processus de **maturation du collagène**. Les ADAMTS-2, -3 et -14 clivent la partie N-terminale du procollagène assurant sa maturation (Colige *et al.* 1995a; Fernandes *et al.* 2001). Un déficit de l'activité de l'ADAMTS-2 est responsable de la maladie d'Ehlers-Danlos de type VIIC, caractérisée par une fragilité cutanée extrême (Colige *et al.* 1999). La régulation de l'**angiogenèse** par les ADAMTS a également été décrite dans la littérature. Les ADAMTS-1 et -8 exercent des fonctions anti-angiogènes grâce à leurs domaines de type thrombospondine qui, en liant directement le VEGF<sub>165</sub>, inhibent la phosphorylation du récepteur VEGF de type



2 (Iruela-Arispe, Carpizo, and Luque 2003a; Luque, Carpizo, and Iruela-Arispe 2003b; Vazquez *et al.* 1999c). L'ADAMTS-13 interagit avec le **facteur de Von Willebrand** (vWF), le clive et permet son activité biologique (Levy *et al.* 2001).

d) Les ADAMs et ADAMTS dans le cancer

Les ADAMs et les ADAMTS contiennent un domaine métalloprotéase et un domaine disintégrine dans leur structure, ce qui contribue à leur multifonctionnalité. On peut donc s'attendre à ce que ces protéases participent à de nombreux processus tels que les étapes du développement complexe d'un cancer et la dissémination métastatique des cellules tumorales.

Le domaine **métalloprotéase** est nécessaire à la dégradation des composants de la matrice extracellulaire. Cette dégradation facilite la migration des cellules tumorales au travers de la matrice. Ces protéases, lorsqu'elles sont actives, sont également responsables du « *shedding* » et de l'activation subséquente de facteurs de croissance et de cytokines, contrôlant de ce fait la prolifération, la migration et l'angiogenèse (Sanderson, Dempsey, and Dunbar 2006).

Diverses études ont suggéré une modulation de l'adhérence et de la migration des cellules par l'interaction du domaine **disintégrine** des ADAMs avec des intégrines de surface cellulaire. L'importance biologique de ce domaine est rendue évidente par l'adhésion de cellules de mélanomes à l'intégrine  $\alpha\beta3$  par l'intermédiaire du domaine disintégrine recombinant de l'ADAM-15 (Zhang *et al.* 1998a). Ces interactions ADAMs-intégrines peuvent influencer les contacts cellule-cellule lors de l'angiogenèse tumorale ou de la dissémination métastatique.

Le domaine riche en **cystéines** de l'ADAM-12 permet l'adhésion de cellules tumorales par l'intermédiaire de protéoglycans héparan sulfate (Iba *et al.* 1999).

Ces exemples illustrent la multifonctionnalité des ADAMs et ADAMTS et suggèrent que ces protéases peuvent servir de régulateurs pour divers événements protéolytiques et non protéolytiques durant la progression cancéreuse. Malgré l'existence limitée de données sur le rôle des ADAMs et ADAMTS dans l'initiation et la progression de cancers, des analyses par RT-PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) ou par microarray ont rapporté une dérégulation de l'expression de ces molécules dans différents types de cancers (Frohlich *et al.* 2006b; Ishikawa *et al.* 2004c; Rocks *et al.* 2008a). L'existence pour certaines ADAMs et ADAMTS de différentes isoformes résultant d'un épissage alternatif et de modifications post-

transcriptionnelles, par clivage autocatalytique (Liu, Xu, and Yu 2006g) ou par d'autres MMPs (Rodriguez-Manzaneque *et al.* 2000a), complique la détermination du rôle précis joué par les ADAMs et ADAMTS dans la prolifération ou l'apoptose cellulaire ainsi que dans l'angiogenèse tumorale.

e) Rôles potentiels des ADAMs et ADAMTS dans le cancer du poumon (tableau VI)

Le tabac contient de nombreux carcinogènes et les cellules bronchiques épithéliales exposées à des composants du tabac ont un taux de prolifération augmenté associé à une phosphorylation de l'EGFR (Lemjabbar *et al.* 2003d). Cet effet pourrait être contrôlé en partie par l'ADAM-17 qui peut cliver plusieurs ligands de l'EGFR (Lemjabbar *et al.* 2003c). De plus, la stimulation de cellules pulmonaires tumorales avec des concentrations nanomolaires de dérivés cannabinoïdes accélère la prolifération cellulaire par clivage de la pro-amphiréguline et du pro-HB-EGF par l'ADAM-17 (Hart, Fischer, and Ullrich 2004). L'expression de l'ADAM-17 est accrue dans les cancers pulmonaires non à petites cellules et est nécessaire pour la signalisation par l'héréguline 3 et par l'EGFR dans des lignées de cellules pulmonaires tumorales non à petites cellules (Zhou *et al.* 2006b). Une analyse par microarray a démontré une expression importante de l'ADAM-8 dans les cancers pulmonaires non à petites cellules qui est corrélée avec le stade clinique de la maladie (Ishikawa *et al.* 2004b). L'expression exogène de l'ADAM-8 augmente l'activité migratoire de cellules pulmonaires, suggérant une implication de cette protéase dans la progression des tumeurs pulmonaires. L'ADAM-28, clivant l'«*Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3*» (IGFBP-3) (Mochizuki *et al.* 2004), est également surexprimée dans les tumeurs pulmonaires non à petites cellules. Cette protéase est principalement présente dans les cellules tumorales et son expression est corrélée à la prolifération des cellules cancéreuses et à la formation de métastases dans les ganglions lymphatiques (Ohtsuka *et al.* 2006b).

Il est intéressant de noter qu'une hyperméthylation du promoteur de l'ADAMTS-8, protéase anti-angiogène, diminue son expression dans les tumeurs primaires non à petites cellules (Dunn *et al.* 2004b).

Tableau VI : Expression des ADAMs et ADAMTS dans les cancers pulmonaires et effets d'une variation d'expression

ADAM(TS)	Cancer du Poumon	Effets d'une augmentation de l'expression <i>in vitro</i>
ADAM-8	<i>In vivo</i> : ↑ (Ishikawa <i>et al.</i> 2004a)	↑ invasion
ADAM-9	<i>In vitro</i> (dans cellules ayant tropisme pour les métastases cérébrales) : ↑ (Shintani <i>et al.</i> 2004)	↑ invasion ↑ adhésion au tissu cérébral
ADAM-12	<i>In vivo</i> et <i>in vitro</i> : ↑ (Rocks <i>et al.</i> 2006b)	
ADAM-15	<i>In vivo</i> et <i>in vitro</i> : ↑ (Schutz <i>et al.</i> 2005)	
ADAM-17	<i>In vitro</i> (exposition à composants du tabac) : ↑ (Lemjabbar <i>et al.</i> 2003b)	
ADAM-28	<i>In vivo</i> : ↑ (Zhou <i>et al.</i> 2006a) <i>In vivo</i> : ↑ (Ohtsuka <i>et al.</i> 2006a)	
ADAMTS-1	<i>In vivo</i> : ↓ (Rocks <i>et al.</i> 2006a)	
ADAMTS-8	<i>In vivo</i> : ↓ (Dunn <i>et al.</i> 2004a)	

f) ADAM-12

L'ADAM-12, initialement décrite comme meltrine- $\alpha$  (Yagami-Hiromasa *et al.* 1995a), est composée d'un domaine métalloprotéase actif et d'autres domaines fonctionnels lui permettant d'exercer de nombreuses fonctions (Loechel *et al.* 1998b). Le prodomaine reste associé de façon non-covalente à la molécule mature et peut contrôler les activités de l'ADAM-12, non seulement à l'intérieur de la cellule mais également dans le milieu extracellulaire (Wewer *et al.* 2006). La forme mature de l'ADAM-12, produite dans le compartiment du Golgi par clivage du prodomaine par la furine, est stockée au sein de la cellule jusqu'à sa translocation à la surface de la membrane plasmique. La translocation de

l'ADAM-12 vers la surface cellulaire est dépendante de l'activité catalytique de l'isoforme  $\epsilon$  de la protéine kinase C (Sundberg *et al.* 2004a).

Il existe deux isoformes de l'ADAM-12 : la forme sécrétée (courte), ADAM-12S, qui ne contient pas les domaines transmembranaire et cytoplasmique ; et la forme membranaire (longue), ADAM-12L (Gilpin *et al.* 1998c).

L'ADAM-12 est produite en quantités importantes au sein du tissu placentaire (Gilpin *et al.* 1998b) et est également présente dans le sérum maternel lors d'une grossesse. Dans ce dernier cas, durant le premier trimestre de la grossesse, l'ADAM-12 peut être utilisée comme marqueur de détection du syndrome de Down (Laigaard *et al.* 2006), de trisomie 18 (Laigaard *et al.* 2005a; Spencer and Cowans 2007) ou de prééclampsie (Laigaard *et al.* 2005b).

Initialement décrite comme étant un homologue des ADAM-1 et -2 car elle initie la fusion cellulaire (Yagami-Hiromasa *et al.* 1995b), l'ADAM-12 est impliquée dans la myogenèse *in vivo* en contribuant à la fusion des cellules musculaires (Gilpin *et al.* 1998e). Son domaine riche en cystéines est capable de supporter l'adhésion de cellules mésenchymateuses à des syndécans (Iba *et al.* 2000). L'ADAM-12 a également été décrite comme étant impliquée dans d'autres fonctions telles que le clivage et l'activation de facteurs de croissance (pro-HB-EGF (Higashiyama and Nanba 2005a), IGFBP-3 (Shi *et al.* 2000)) ou encore la prolifération des adipocytes soulignant sa participation à l'adipogenèse et au développement de l'obésité (Kawaguchi *et al.* 2002a; Masaki *et al.* 2005). Une relation entre l'ADAM-12 et l'HB-EGF a été suggérée par plusieurs études. En effet, une diminution du clivage du pro-HB-EGF a été décrite dans des fibroblastes embryonnaires issus de souris déficientes pour le gène de l'ADAM-12 (Kurisaki *et al.* 2003). Une étude récente a identifié l'ADAM-12 comme étant un régulateur de la signalisation par le récepteur du TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ RII) en stabilisant la protéine TGF- $\beta$ RII et en favorisant la signalisation Smad-dépendante (Atfi *et al.* 2007).

L'expression de l'ADAM-12 est modulée dans divers types de cancers, tels que les cancers humains mammaires (Kveiborg *et al.* 2005d), hépatiques (Le Pabic *et al.* 2003b) et les glioblastomes (Kodama *et al.* 2004b). Il est important de noter que les taux de production de l'ADAM-12, détectés dans les urines de patients atteints de cancer mammaire (Roy *et al.* 2004b) ou de la vessie (Frohlich *et al.* 2006a), sont corrélés au stade de la maladie.

Les données de la littérature reprises ci-dessus montrent que cette protéase est potentiellement importante dans les cellules cancéreuses et pourrait participer au phénotype cancéreux. Il est important de noter que l'ADAM-12 peut promouvoir le développement tumoral en modulant la survie de divers types cellulaires présents dans la tumeur. Ainsi, la

surexpression de l'ADAM-12 rend les cellules tumorales résistantes à l'apoptose alors que les cellules stromales montrent une sensibilité accrue aux signaux apoptotiques (Kveiborg *et al.* 2005c). Cependant, aucun mécanisme décrivant l'implication de l'ADAM-12 dans le cancer pulmonaire non à petites cellules n'a été étudié au niveau moléculaire jusqu'à aujourd'hui.

g) ADAMTS-1

Le gène codant pour l'ADAMTS-1 a été découvert en 1997. Cette protéine est caractérisée par un domaine métalloprotéase actif, un domaine disintégrine et deux motifs thrombospondine de type I présents dans la région C-terminale de la molécule (Kuno *et al.* 1997a). L'ADAMTS-1 est synthétisée sous forme d'un précurseur de 110 kDa clivé à l'intérieur de la cellule pour produire une forme active de 87 kDa. La furine est l'enzyme la plus efficace pour cliver la forme précurseur de l'ADAMTS-1 mais d'autres convertases sont également capables de cliver sa proforme (Longpre and Leduc 2004). Le gène de l'ADAMTS-1 a initialement été cloné à partir de lignées cellulaires de carcinome du colon et cette protéine a été identifiée comme protéase active liée à la matrice extracellulaire (Kuno and Matsushima 1998;Kuno, Terashima, and Matsushima 1999). L'ADAMTS-1 a ensuite été présentée comme puissant modulateur de l'angiogenèse, inhibant la prolifération des cellules endothéliales induite par « *Fibroblast Growth Factor 2* » (FGF2) et VEGF (Vazquez *et al.* 1999b). Certains substrats de l'ADAMTS-1 ont été identifiés et incluent principalement des protéoglycans tels que l'aggrécane et le versican (Kuno *et al.* 2000;Rodriguez-Manzaneque *et al.* 2002). L'ADAMTS-1 est également capable de cliver des ligands du récepteur à l'EGF tels que le pro-HB-EGF et la pro-amphiréguline (Liu, Xu, and Yu 2006f). Une étude récente a identifié deux nouveaux substrats de l'ADAMTS-1 : les thrombospondines 1 et 2 (Lee *et al.* 2006).

Comme la plupart des membres de la famille des protéases ADAM et ADAMTS, l'ADAMTS-1 participe à de nombreuses fonctions physiologiques et pathologiques. Ainsi, des études utilisant des souris déficientes pour le gène de l'ADAMTS-1 ont démontré l'importance de cette protéase pour la croissance, l'organogenèse et la fertilité (Mittaz *et al.* 2004b;Yokoyama *et al.* 2002). De plus, les fonctions ovulaires altérées dans les souris ADAMTS-1 *Knock-out* démontrent l'implication de cette enzyme dans le développement des follicules en croissance durant le processus d'ovulation ainsi que dans l'organisation d'un réseau vasculaire dans l'ovaire (Mittaz *et al.* 2004a;Shozu *et al.* 2005).

Un traitement systémique de souris avec des lipopolysaccharides induit une augmentation de l'expression de l'ADAMTS-1 dans les tissus et suggère un rôle pour cette protéase dans les processus inflammatoires (Kuno *et al.* 1997c). Ses fonctions semblent également importantes dans les cancers où une modulation de son expression a été décrite (Masui *et al.* 2001a;Porter *et al.* 2004c). Cependant, sa participation exacte au développement et à la progression des cancers n'est pas encore clairement définie puisque de nombreuses études illustrent des effets contradictoires de l'ADAMTS-1 dans le développement d'un phénotype malin. Alors que certains attestent que l'ADAMTS-1 est une molécule favorisant l'invasion et la dissémination métastatiques (Minn *et al.* 2005a), d'autres décrivent des taux réduits de cette protéase dans des tissus tumoraux comparativement aux tissus normaux (Kuno *et al.* 2004a;Masui *et al.* 2001b;Porter *et al.* 2004b). Liu *et al.* ont tenté d'éclairer le mythe en montrant que le statut protéolytique de l'ADAMTS-1 détermine ses effets sur la progression tumorale (Liu, Xu, and Yu 2006e).

### **3.3.3. MMPs, ADAMs et ADAMTS : des cibles thérapeutiques dans le cancer ?**

De nombreux inhibiteurs synthétiques des MMPs agissant sur l'activité catalytique de ces enzymes ou sur l'activation des proenzymes ont été développés, utilisés avec succès dans des modèles animaux et testés dans des études cliniques. Cependant, chez l'homme, aucun inhibiteur n'a montré de résultats prometteurs pour le traitement du cancer pulmonaire et d'autres types de cancer (Bissett *et al.* 2005;Folgueras *et al.* 2004;Zucker, Cao, and Chen 2000a). Une explication possible est la capacité de certaines MMPs à inhiber le développement tumoral (Lopez-Otin and Matrisian 2007d;Martin and Matrisian 2007b). Il est donc important de cibler des MMPs, ADAMs ou ADAMTS spécifiques ou des fonctions spécifiques attribuables à ces molécules lors de la conception du traitement de certains cancers.

Malgré des résultats plutôt mitigés quant à leur inhibition dans le traitement du cancer, les *matrixines* restent des cibles potentiellement intéressantes. Des inhibiteurs spécifiques pour une certaine classe de MMPs ou pour des MMPs individuelles telles que la MMP-13 (Skotnicki, DiGrandi, and Levin 2003) ont montré une inhibition significative de la dissémination métastatique dans des modèles animaux. En outre, des effets anti-tumoraux, anti-angiogènes et une réduction de métastases pulmonaires ont été observés avec l'inhibiteur *FYK-1388* agissant plus spécifiquement sur les MMP-2 et MMP-9 dans un modèle expérimental basé sur des cellules de fibrosarcomes HT-1080 (Shinoda *et al.* 2003). *LY52*, un

inhibiteur potentiel de l'activité des gélatinases, réduit l'incidence de métastases pulmonaires à partir de xéno greffes de cellules de mélanomes ou de cellules pulmonaires de Lewis (Qu *et al.* 2006a; Qu *et al.* 2006b). L'inhibition des MMP-2, -9 et de la MT1-MMP par *MMI-166* diminue la formation de métastases ganglionnaires dans un modèle orthotopique de cancer pulmonaire et augmente la survie des animaux traités avec cet inhibiteur (Fujino *et al.* 2005).

Cependant, la synthèse d'inhibiteurs spécifiques pour certaines protéases comporte des défis techniques étant donné l'existence de plus de 50 métalloprotéases similaires chez l'homme.

De plus, l'administration d'inhibiteurs de MMPs dans les phases tardives du développement de la tumeur ayant déjà une vascularisation établie ne semble pas diminuer le volume tumoral (Zucker, Cao, and Chen 2000b). Le *Batimastat* administré à des souris lors du stade de développement hyperplasique dans un modèle de carcinogenèse pancréatique diminue la taille de la tumeur alors que les effets sont limités lors d'un traitement dans des phases du développement tumoral plus avancé (Bergers *et al.* 1999). Dès lors, il est judicieux d'établir une stratégie d'inhibition des MMPs lors des phases précoces du développement tumoral (Ogata *et al.* 2006).

Certains inhibiteurs des MMPs non conventionnels ont également été testés en clinique. Le *Neovastat*, extrait de cartilage de requin, peut être classé parmi les agents naturels multifonctionnels, efficace dans l'inhibition de la prolifération de cellules endothéliales et de la formation de vaisseaux sanguins dans un modèle de vascularisation de poulet. Ses effets anti-angiogènes peuvent être associés à l'inhibition de certaines MMPs et à l'inhibition de la liaison du VEGF sur les cellules endothéliales. Plusieurs études cliniques de phase III ont permis de tester l'efficacité de ce composant (Falardeau *et al.* 2001) et ont montré un avantage en terme de survie pour les patients atteints de cancer pulmonaire non à petites cellules ou atteints de cancer rénal (Batist *et al.* 2002; Latreille *et al.* 2003).

L'*épigallocatechin-3-gallate*, un composant polyphénol du thé vert, agit sur le potentiel invasif de cellules tumorales en inhibant la MMP-9 (Yang, Wei, and Liu 2005). De même, ce composant exerce des effets bloquant l'invasivité de cellules tumorales gastriques en contrôlant l'expression des MMPs par l'intermédiaire de l'activation de la voie des MAPK (Kim *et al.* 2004).

Les ADAMs et ADAMTS sont des molécules relativement récentes et leur implication exacte dans l'initiation et la progression de tumeurs n'est pas encore élucidée. Leur structure en plusieurs domaines ne facilite pas la compréhension de leurs mécanismes d'action. Toutefois, certains inhibiteurs spécifiques de ces protéases ont été testés sur des modèles *in*

*in vitro* et des études sur des modèles animaux émergent, tentant de disséquer la complexité des interactions entre ADAM, ADAMTS et cellules tumorales dans un organisme vivant. L'inhibiteur sélectif des ADAMs, *INCB3619*, affecte le clivage et l'activation de plusieurs ligands de l'EGFR, dont l'héréguline, et, en conséquence, certaines voies de signalisation de l'EGFR dans les cancers pulmonaires non à petites cellules (Zhou *et al.* 2006d).

*Ces données illustrent la diversité fonctionnelle des MMPs, ADAMs et ADAMTS dans la pathologie cancéreuse. L'implication de ces protéases dans les processus menant à la prolifération cancéreuse, la genèse de nouveaux lits vasculaires et la formation de métastases a fait l'objet d'une attention particulière et résulte en une quantité impressionnante de données expérimentales et observationnelles en faveur d'un rôle critique de ces molécules. Il est également important de souligner l'importance des activités protectrices de ces protéases par rapport à la progression de certains types de cancers. Les études utilisant des animaux transgéniques ou des lignées cellulaires modifiées dans lesquelles certaines MMPs, ADAMs ou ADAMTS spécifiques sont surexprimées ou inhibées sont précieuses pour identifier précisément le rôle individuel et la participation spécifique de chacune de ces protéases aux divers stades de l'évolution tumorale (Van Roy *et al.* 2007). Les résultats de ces différentes études impliquent des mécanismes fonctionnels différents pour ces protéases synthétisées au sein de cellules tumorales ou stromales et indiquent qu'elles ont des fonctions pro- ou anti-métastatiques dépendant de leur nature, de leur forme moléculaire et des conditions expérimentales. Toutes ces données sont importantes afin de pouvoir orienter les recherches vers le développement de thérapeutiques efficaces faisant appel à la modulation de l'expression ou à l'inhibition de ces différentes protéases.*



Publication n°1:

Emerging roles of ADAM and ADAMTS metalloproteinases in cancer.

**N. ROCKS, G. PAULISSEN, M. EL HOUR, F. QUESADA, C. CRAHAY, M.  
GUEDERS, J.M. FOIDART, A. NOEL, D. CATALDO.**

**Biochimie 2008; 90: 369-379**



## Review

## Emerging roles of ADAM and ADAMTS metalloproteinases in cancer

N. Rocks, G. Paulissen, M. El Hour, F. Quesada, C. Crahay,  
M. Gueders, J.M. Foidart, A. Noel\*, D. Cataldo

*Department of Biology of Tumours and Development, GIGA-Research (Groupe Interdisciplinaire de Génomprotéomique Appliquée) and Center for Experimental Cancer Research (CECR), University of Liege and CHU of Liège, Liege, Belgium*

Received 25 June 2007; accepted 24 August 2007

Available online 2 September 2007

### Abstract

A disintegrin and metalloproteinases (ADAMs) are a recently discovered family of proteins that share the metalloproteinase domain with matrix metalloproteinases (MMPs). Among this family, structural features distinguish the membrane-anchored ADAMs and the secreted ADAMs with thrombospondin motifs referred to as ADAMTSs. By acting on a large panel of membrane-associated and extracellular substrates, they control several cell functions such as adhesion, fusion, migration and proliferation. The current review addresses the contribution of these proteinases in the positive and negative regulation of cancer progression as mainly mediated by the regulation of growth factor activities and integrin functions.

© 2007 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

*Keywords:* ADAM and ADAMTS proteins; Cancer; Cell proliferation; Apoptosis; Growth factors; Degradome

### 1. Introduction

Key features of malignant tumours are their abilities to invade surrounding tissues, to have access to the vascular and lymphatic systems, and to disseminate to distant organs by metastatic spreading. Cancer remains the second leading cause of death in Europe and the United States [1–3]. Accumulating evidence demonstrates the crucial role of proteolytic enzymes such as matrix metalloproteinases (MMPs) and closely related ADAMs (a disintegrin and metalloproteinase) and ADAMTSs (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) in cancer development and progression. Although information about functions of ADAMs and ADAMTSs in cancers is still limited, recent studies have provided evidence of dysregulation of various ADAMs and ADAMTSs in different types of cancers. Therefore, these

proteins have attracted attention of many research groups and functional analysis of ADAMs and ADAMTSs are ongoing based on the recent generation of mice deficient for some of these proteins. This review intends to discuss diverse functions of metalloproteinases implicated in cancer progression. Due to space constraints, we have chosen to concentrate our efforts on ADAMs and ADAMTSs, since MMPs have been extensively described in previous reviews [4–9]. Here, following a brief description of ADAMs and ADAMTSs, we explore their contribution to different steps of cancer progression.

### 2. Structural features of ADAMs and ADAMTSs

The ADAM family members belong to the superfamily of zinc-dependent metalloproteinases also known as *metzincins* [10] and display sequence similarities with the reprotolysin family of snake venomases. Two groups are distinguished in the adamalysin family: the membrane-anchored ADAMs and the secreted ADAMTSs.

\* Corresponding author at: University of Liege, Tower of Pathology (B23) 4th floor, 4000 Liege, Belgium. Tel.: +32 4 366 2453; fax: +32 4 366 2936.  
E-mail address: [agnes.noel@ulg.ac.be](mailto:agnes.noel@ulg.ac.be) (A. Noel).

The different domains composing ADAMs have independent but complementary functions endowing these proteins with features of proteinases [11] and adhesion molecules [12] (Fig. 1). The prodomain maintains the metalloproteinase domain inactive and has the ability to unveil catalytic site through a cysteine switch mechanism upon activation by various processes. The furin-recognition site (RXXR sequence), located between pro and metalloproteinase domain, is believed to participate in intracellular activation of many ADAMs (ADAM-9, 12, 15, 17) by the action of furin-like proprotein convertases in the trans-Golgi network [13]. The metalloproteinase domain is characterized by a conserved HEXGH sequence shared with MMPs and confers the catalytic activity. It is worth noting that some ADAMs display alterations in this sequence resulting in a loss of proteolytic activity [14]. Although, the disintegrin domain has been widely described as being able to interact with integrin molecules and therefore mediating cell-cell and cell-matrix interactions [12,15,16], caution should be advised regarding this feature. In a recent study by Takeda et al, the disintegrin domain has been shown not to be available for protein binding due to protein folding [17]. The disintegrin domain might thus be considered as a structural feature rather than an integrin ligand. The carboxy-terminal end is composed of a cysteine-rich domain involved in cell-cell fusion [18], an EGF-like domain, a transmembrane domain and a cytoplasmic tail containing phosphorylation sites and SH3 binding domains [19]. At least 40 ADAMs have been described, 25 of which are expressed in Homo Sapiens. Among those, 19 display a proteolytic activity [20] (Table 1).

The complete human ADAMTS family comprises 19 ADAMTS genes (Table 2) [21–23]. ADAMTSs are characterized by the presence of additional thrombospondin type I (TSP-I) motifs in their C-terminal part, while EGF-like, transmembrane and cytoplasmic domains are missing [24,25]. Some of them have one or two additional specific C-terminal modules such as a mucin domain (ADAMTS-7, and -12),

a GON domain (ADAMTS-20 and -9), two CUB domains (ADAMTS-13) and/or a PLAC domain (ADAMTS-2, -3, -10, -12, -14, -17, -19). Although ADAMTSs are soluble proteins, many of them appear to bind the extracellular matrix through their thrombospondin motifs or their spacer region [23]. With the exception of ADAMTS-10 and -12, ADAMTSs are regulated through a proteolytic processing occurring at the furin-like recognition site located between the pro- and catalytic domains [22,23].

The Tissue Inhibitor of Metalloproteinases (TIMPs) demonstrate selectivity in their inhibition of ADAMs and ADAMTSs which contrasts with their MMP-inhibitory features [26–29]. For example, ADAM-17 is exclusively inhibited by TIMP-3, ADAM-10 is sensitive to TIMP-1 and TIMP-3, but not to TIMP-2 and TIMP-4. The activity of ADAM-8 and -9 is not controlled by any TIMP [30]. TIMP-3 has the ability to inhibit aggrecanase activity by targeting ADAMTS-4 while TIMP-1 and TIMP-2 display such an effect at higher range of concentrations [31].

### 3. Implication of ADAMs and ADAMTSs in physiology and pathology

The complex but conserved structure of ADAM family members endows these proteins with various abilities leading to their key contribution to various physiological functions such as, for instance, fertilization [15,32], neurogenesis [33], adipogenesis [34,35] and myogenesis [36]. ADAMs and ADAMTSs are involved in a complex molecular network of reciprocal interactions. Hence they can modulate cell responses to various signals by acting as cell surface sheddases. Of particular relevance is the activity of ADAM-17 (TACE) as a sheddase of membrane-bound pro-TNF- $\alpha$  [37,38] and of EGF receptor ligands leading to the release of active ligands [39]. Another illustrative example is the activation of NOTCH

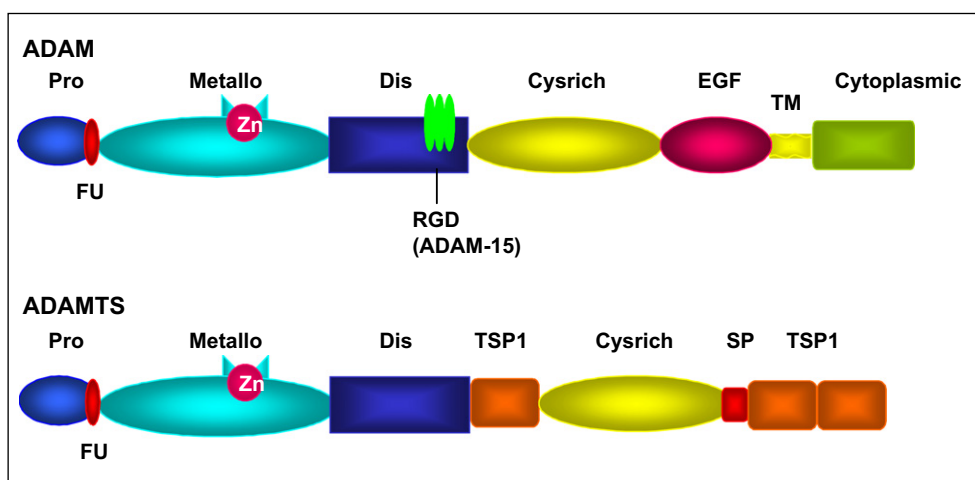


Fig. 1. Structure of ADAM and ADAMTS proteinases. ADAM members are composed of common domains including propeptide (Pro), metalloproteinase (Metallo), disintegrin (Dis) with a conserved RGD domain for ADAM-15, cysteine-rich (Cysrich), EGF-like (EGF), transmembrane (TM) and cytoplasmic domains. ADAMTS contain thrombospondin motifs (TSP1) and spacer domain (SP), but lack EGF-like, transmembrane and cytoplasmic domains. Some proteinases contain in addition a sequence recognized by furin-like enzymes (Fu) (see text).

Table 1  
List of ADAMs with or without proteolytic activity

ADAMs	Other names	Proteolytic activity (human)
ADAM-1 a, b	PH-30 alpha; Fertilin alpha	–
ADAM-2	PH-30 beta; Fertilin beta	–
ADAM-3	Cyritestin; tMDC I	–
<b>ADAM-4</b>	<b>TMDCV</b>	
<b>ADAM-5</b>	<b>tMDC II</b>	
ADAM-6	tMDC IV	–
ADAM-7	EAP I	–
ADAM-8	MS2, CD156	+
ADAM-9	MDC9, meltrin gamma	+
ADAM-10	MADM; kuzbanian	+
ADAM-11	MDC	–
ADAM-12	Meltrin alpha	+
ADAM-13	( <i>Xenopus laevis</i> )	
ADAM-14	adm-1, UNC-71 ( <i>Caenorhabditis elegans</i> )	
ADAM-15	Metargidin; MDC 15	+
ADAM-16	MDC 16 ( <i>Xenopus laevis</i> )	
ADAM-17	TACE	+
ADAM-18	TMDCIII	–
ADAM-19	Meltrin beta	+
ADAM-20		+
ADAM-21	ADAM-31	+
ADAM-22	MDC 2	–
ADAM-23	MDC 3	–
<b>ADAM-24</b>	<b>Testase-1</b>	
<b>ADAM-25</b>	<b>Testase-2</b>	
<b>ADAM-26</b>	<b>Testase-3</b>	
ADAM-27	ADAM-18	–
ADAM-28	eMDCII, MDC-Lm, MDC-Ls, TECADAM	+
ADAM-29		–
ADAM-30		+
ADAM-31	ADAM-21	–
ADAM-32		–
ADAM-33		+
<b>ADAM-34</b>	<b>Testase 4</b>	
ADAM-35	Meltrin epsilon ( <i>chicken, Gallus gallus</i> )	
<b>ADAM-36</b>	<b>Testase 6</b>	
<b>ADAM-37</b>	<b>Testase 7</b>	
<b>ADAM-38</b>	<b>Testase 8</b>	
<b>ADAM-39</b>	<b>Testase 9</b>	
<b>ADAM-40</b>	<b>Testase 10</b>	

Proteinase activity is shown only for human proteinases. These proteinases are not exclusively expressed in humans. In bold are ADAMs expressed in mouse but not in human.

signalling by Notch ligand Delta shedding from the cell surface by ADAM-10 [40–42].

ADAM and ADAMTS molecules have also been implicated in several pathologies [16,43–45]. ADAMTS-13 deficiency is responsible for thrombotic thrombocytopenic purpura characterized by the formation of microvascular von Willebrand Factor (vWF) and platelet-rich thrombi, associated with anaemia, renal failure and neurological dysfunction [46]. ADAM-17 expression and activity are increased in inflammatory bowel diseases [47]. A strong association has been established between ADAM-33 and asthma-related bronchial hyperresponsiveness in humans [48–50]. ADAM-8 expression is increased in an

Table 2  
List of human ADAMTSs

ADAMTS	Other names	Proteolytic activity
ADAMTS-1	C3-C5, METH1, KIAA1346	+
ADAMTS-2	Procollagen N-proteinase	+
ADAMTS-3	KIAA0366	+
ADAMTS-4	KIAA0688, aggrecanase-1, ADMP-1	+
ADAMTS-5	ADAMTS-11, aggrecanase-2, ADMP-2	+
ADAMTS-6		
ADAMTS-7		
ADAMTS-8	METH2	+
ADAMTS-9	KIAA1312	+
ADAMTS-10		
ADAMTS-12	UNQ1918, PRO4389, AI605170	+
ADAMTS-13	vWFPC, C9orf8	+
ADAMTS-14		+
ADAMTS-15		+
ADAMTS-16		+
ADAMTS-17	FLJ32769, LOC123271	
ADAMTS-18	ADAMTS-21	
ADAMTS-19		
ADAMTS-20		

animal model of asthma following allergen exposure [51] and in the bronchi of human asthmatics [48,52]. ADAMTS-4 and TS-5 are involved in the turnover of aggrecan from cartilage resulting in loss of functionality of tissue and joint disability [53–56]. Studies have indicated that ADAMTS-5 is likely the major aggrecanase in cartilage metabolism and pathology [56]. Furthermore, its aggrecanase activity is 1000-fold greater than that of ADAMTS-4 under physiological conditions [57]. ADAM-9 and -15 are upregulated in atherosclerosis along with integrins  $\alpha 5\beta 1$  and  $\alpha v\beta 3$  [58].

The architecture of ADAMs and ADAMTSs, with domains that confer proteolytic activities and the ability to bind to diverse cell and extracellular matrix (ECM)-associated molecules, suggests that these enzymes may be functionally relevant to steps involved in cancer development and in metastatic dissemination of tumour cells.

The active metalloproteinase domain might indeed be needed to degrade extracellular matrix components and to shed growth factors and cytokines [8,59], contributing in this way to the control of cell proliferation, migration and angiogenesis [60]. Adhesion and migration of cells might be regulated by the disintegrin or cysteine-rich domains whose importance has been evidenced by different studies [12,61–63].

These data illustrate how much ADAMs and ADAMTSs are multifunctional proteins and suggest that they may serve as regulators of proteolytic and non-proteolytic events occurring during cancer progression. To date, only few data are available about the roles of those proteins in cancer initiation and progression. Dysregulation of ADAM and ADAMTS expression has been reported in different types of cancer by RT-PCR profiling and microarray analysis [64–67]. The picture is rendered complex by the existence of different isoforms resulting from alternative splicing described in ADAM-8, -9, -10, -11, -12, -15, -19, -22, -28, -29, -30 and -33 or ADAMTS-4 and TS-6 genes [36,50,51,68–77] or from putative post-translational modulations [23] resulting from a processing of

the molecule by the metalloproteinase domain itself [78] or by other MMPs [79].

#### 4. Relevance of ADAMs and ADAMTSs in different steps of cancer progression

Here, we review different studies suggesting a predominant role for ADAMs and ADAMTSs in processes related to cancer progression such as the regulation of cell cycle and angiogenesis.

##### 4.1. ADAMs and ADAMTSs in cell proliferation and apoptosis

Several proteolytically active ADAMs and ADAMTSs regulate cell proliferation by cleaving growth factors or cell surface proteins. Ligands for several growth factor receptors are processed by ADAM family members. Among them, EGF receptor ligands (heparin-binding EGF (HB-EGF), amphiregulin, betacellulin, epiregulin) are synthesized as transmembrane precursors and require ectodomain shedding for activation [59,80]. ADAM-17 has been shown to play a key role in such a process [60,81]. Amphiregulin released by ADAM-17 cleavage enhances cell proliferation of cancer cells [82,83]. HB-EGF is a potent inducer of tumour growth and angiogenesis [84]. Shedding of EGFR-ligands by ADAM-17 is increased upon cell stimulation by phorbol esters [85] and ADAM-17 also contributes to the release of bioactive epigen, a highly mitogenic ligand of EGFR which has been implicated in cancer [86]. Reciprocally, a long term treatment of different cell types with EGF leads to a marked enhancement of ADAM-17 by increasing its half-life and promotes thereby the shedding of different substrates [87].

ADAM-10 contributes to E-cadherin shedding [88,89]. The subsequent release of soluble E-cadherin in the extracellular milieu leads to the abrogation of cell-cell contacts, thereby facilitating cell migration. ADAM-10 also contributes to cell proliferation by modulating  $\beta$ -catenin signalling through E-cadherin shedding and increasing gene cyclin D1 levels [90]. Such processes should be of particular importance in embryonic development since ADAM-10 knock-out (KO) embryos suffer from cell growth arrest and apoptosis associated with an overexpression of full-length E-cadherin [89].

Moreover, ADAM proteinases control cell apoptosis. Indeed, in a mammary cancer model induced by the expression of polyoma middle T oncoprotein, ADAM-12 has been shown to increase stromal cell apoptosis and decrease tumour cell apoptosis [91]. INCB3619, a selective inhibitor of a subset of ADAM proteinases, blocks the shedding of ErbB ligands, reduces ErbB ligand shedding *in vivo* and inhibits ErbB pathway signalling, tumour cell proliferation and survival [92]. Altogether, these data emphasize the key role of ADAM proteinases in the regulation of cell proliferation and apoptosis although the dissection of precise mechanisms will necessitate further investigations.

##### 4.2. Roles of ADAMs and ADAMTSs in angiogenesis

Angiogenesis consists in the formation of new blood vessels devoted to vascularise the tumour tissue and is considered as a crucial event in solid tumour growth and progression. Angiogenesis process is under the dependence of a balance of pro- and antiangiogenic factors [93–95]. Proteinases have been initially considered as positive regulators of angiogenesis but recent studies have evidenced complex and sometimes opposite roles of MMPs, ADAMs and ADAMTSs in regulating tumoral angiogenesis [5,83,95–98]. Interestingly, ADAMTS-1 and ADAMTS-8 have been proven to be antiangiogenic factors [99]. This anti-angiogenic effect is thought to be mediated by their thrombospondin motifs through their interaction with CD36, a membrane glycoprotein receptor of endothelial cells [100,101] or directly through VEGF binding [102]. Multiple mechanisms have been proposed to explain the inhibition of angiogenesis by members of the ADAM and ADAMTS family. Among those, it is worth noting that ADAMTS-1 comprises TSP-1 repeats which may contribute to the antiangiogenic activity by trapping vascular endothelial growth factor (VEGF)<sub>165</sub> [100,102]. Taking these data together, ADAMTS-1 C-terminal domain should be considered as an anti-tumour and anti-metastatic region [78,103]. The ADAMTS-1 story will probably mature in the next few years since some authors have also shown that overexpression of full-length ADAMTS-1 in CHO cells enhances tumour growth [103] and promotes pulmonary metastasis of TA3 mammary carcinoma or Lewis lung cells [78]. One possible approach to rationalize the apparently contradictory information on ADAMTS-1 is to consider that this molecule undergoes auto-proteolytic cleavage that can account for pro- or anti-metastatic effects depending on the cleavage site [78]. Indeed, these dual pro and anti-tumoral activities can be explained by a proteolytic cleavage of the substrate-binding site impairing the binding of the catalytic site to amphiregulin or HB-EGF [78]. This cleavage probably also unveils TSP-1 motifs' antitumour activity. Therefore, C-terminal processing of ADAMTS-1 affects protein bioactivity and may account for some apparently controversial effects.

ADAM-15 has also been found to bear angiogenesis regulatory properties. ADAM-15 is expressed by smooth muscle cells, umbilical vein endothelial cells and more preferentially by activated endothelial cells [104]. The recombinant disintegrin domain (RDD) of ADAM-15 has been reported as a potent inhibitor of angiogenesis [105]. *In vivo*, ADAM-15 RDD induces a reduction of MDA-MB-231 tumour growth associated with less tumour vascularization. Transgenic B16F10 melanoma cells form less metastasis in mouse lungs after turning on RDD expression [105]. Angiogenesis is inhibited in ADAM-15-deficient mice in a model of retinopathy [106]. Mechanisms implicating ADAM-15 in the regulation of angiogenesis could be related to the presence of Arg-Gly-Asp (RGD) sequence in the disintegrin domain which binds integrins. Indeed, ADAM-15 decreases integrin  $\alpha v \beta_3$ /vitronectin-mediated ovarian cancer cell adhesion and motility in a RGD-dependent manner [107]. However, although tumours developed from melanoma cells implanted subcutaneously are smaller in

ADAM-15<sup>-/-</sup> mice, no difference in tumour vascularity has been observed between wild type and mutant mice [106]. The exact role of ADAM-15 during angiogenesis appears complex and requires further investigations.

## 5. Contribution of ADAMs and ADAMTSs in different types of cancer

### 5.1. Lung cancer

In 2006, lung cancer accounted for about 13% of all cancer diagnoses. Smoking is by far the most important risk factor for lung cancer and about 87% of lung cancers are thought to result directly from smoking. Tobacco smoke contains numerous carcinogens and primary bronchial epithelial cells as well as bronchial cell lines exposed to smoke components show an increased proliferation rate associated with EGFR phosphorylation [108]. This could be at least in part mediated by ADAM-17 which can activate several EGFR ligands [108]. ADAM-17 is indeed upregulated in non-small cell lung carcinoma (NSCLC) and is required for heregulin3 (HER3) signalling but also for EGFR-ligand-dependent signalling and inhibition of ADAMs affects the activation of many ErbB ligands and, as a matter of consequence, multiple ErbB pathways in NSCLC [109].

Dysregulation of the production of several ADAMs has been documented in lung cancers. As demonstrated by tissue microarray analysis, a strong ADAM-8 expression is present in NSCLC and correlates with clinical stage of the disease [65]. As induction of ADAM-8 production increases the invasive phenotype of cancer cells, this molecule might play a role in promoting disease dissemination. ADAM-9 mRNA and protein expression levels are enhanced in EBC-1 lung cancer cell line displaying a tropism for brain metastasis as compared to parent EBC-1 or EBC-1 cell line with a tropism for bone tissue [110]. Overexpression of ADAM-9 in EBC-1 and A549 lung cancer cells results in an increase of NGF-induced invasion and a higher adhesion of cells to brain tissue. A549 cells overexpressing ADAM-9 have the potential to develop brain metastasis when injected intravenously.

We recently reported an increase in ADAM-12 mRNA and protein levels while ADAMTS-1 levels are decreased in NSCLC when compared to non-cancerous tissues [111]. Whereas ADAMTS-1 is mainly produced by normal bronchial epithelium, ADAM-12 is expressed in vast majority by cancer cells as demonstrated by immunohistochemistry, suggesting that ADAM-12 plays a role in the cascade of events leading to invasive capacities. ADAM-12 might be an important mediator of biological processes leading to tumour-related angiogenesis and thereby tumour development. ADAM-28, which cleaves insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) [112], is found to be about 16-fold over-expressed in NSCLC. This proteinase is mainly present in carcinoma cells and correlates with cancer cell proliferation and lymph node metastasis [113]. ADAM-15,  $\alpha v$  and  $\beta 3$  integrins are expressed in small cell lung carcinoma (SCLC) and NSCLC cell lines [114] and ADAM-15 expression is higher in tumoral cells than in normal epithelial cells of pulmonary tumours.

Interestingly, ADAMTS-8, a potent anti-angiogenic ADAMTS is downregulated in most primary NSCLC [115] due to abnormal promoter hypermethylation [115].

### 5.2. Brain tumours

Both ADAM-22 and ADAM-23, displaying high sequence similarities with ADAM-11, are restricted to the brain. They are implicated in cell-cell and cell-matrix interactions through their binding to integrins and extracellular matrix and, consequently, might be involved in neural development [75]. There is evidence for a modulation of the expression of ADAM and ADAMTS genes in brain tumours since cytoplasmic variants of ADAM-22 are differently expressed in normal human brain tissue and gliomas [116]. Moreover, ADAM-22 inhibits astrocyte proliferation by interaction of its disintegrin domain with cell surface integrins [117]. Brain tumours, often invading surrounding parenchyma, could thus display a modulated proteinase expression facilitating tumour cell infiltration and/or angiogenesis. Some ADAMTS proteinases (ADAMTS-8 and ADAMTS-13) display lower levels of expression in brain tumours as compared to normal brain tissue [118,119]. In sharp contrast, ADAMTS-4 and TS-5 are overexpressed in human glioblastomas and could be responsible for brevicin cleavage and contribute to invasiveness of glioblastoma cells [120].

A contribution of ADAM-17 to glioma cell invasiveness through activation of the EGFR signal pathway under hypoxic conditions has been suggested. Indeed, brain tumour cell lines cultured under hypoxic conditions demonstrated an upregulation of ADAM-17 expression levels, whose activity correlated with increased tumour cell invasion [121].

Similarly, ADAM-8 and ADAM-19 mRNA are upregulated in primary brain tumours and their expression and activity are correlated with invasiveness of glioma cells [122]. The membrane-bound ADAM-12 variant is overexpressed in glioblastomas [123] and a treatment of cultured glioblastoma cells with an ADAM-12 inhibitor decreases the production of mature HB-EGF indicating that ADAM-12-HB-EGF pathway might be of biological significance in those cells.

### 5.3. Prostate cancer

Development of prostate cancer is androgen-dependent in early stages but cell growth can become androgen-independent [124,125]. This androgen-dependency could interfere with ADAM-related regulation processes since the mRNA expression of several ADAMs is regulated by androgens [126]. Indeed, ADAM-9, -10, -11, -15 and -17 are expressed in prostate cancer cells and treatment of androgen-dependent cancer cells with dihydrotestosterone leads to an upregulation of ADAM-9 and -10 mRNAs while ADAM-17 mRNA is downregulated. ADAM-9 protein levels are elevated in malignant as compared with benign prostate tissues. Androgen or serum starvation enhances ADAM-9 protein expression in androgen-receptor-positive prostate cancer cells [127]. ADAM-8 protein expression has been demonstrated to be significantly associated

with higher cancer stages including positive nodal status, and higher Gleason scores [128].

ADAMTS-13 activity is mildly diminished in prostate tumours even if these rates are not related to metastasis and low ADAMTS-13 activity could diminish vWF (Von Willebrand Factor) cleavage resulting in an accumulation of highly polymeric vWF, facilitating adhesive interactions between circulating tumour cells and platelets. Moreover, other authors have reported that patients with advanced stage and metastasis of cancer display lower ADAMTS-13 levels [129,130]. Prostate stroma cells constitutively express ADAMTS-1, -4, -5, -9, -15 as well as TIMP-3 in contrast to some prostate cancer cell lines [131].

ADAM-15 is overexpressed in aggressive prostate adenocarcinoma, correlates with cancer stages, and might be a marker for a more aggressive prostate cancer subtype [132]. ADAM-10 is specifically expressed on the cell surface of normal epithelial cells [133] while tumour cells show mainly nuclear staining for ADAM-10 suggesting an interaction with nuclear proteins or DNA [134].

#### 5.4. Liver carcinoma

Upon the occurrence of liver injury, activated hepatic stellate cells (HSC) contribute to the inflammatory response by secretion of MMPs resulting in ECM remodelling and increased matrix deposition [135]. ADAMs are also implicated in hepatocellular carcinoma development [136]. Indeed, ADAM-17 contributes to EGFR-ligand release and induction of cell proliferation and invasion [137]. A link has been established between TGF- $\beta$ 1 and cell proliferation since TGF- $\beta$ 1 induces a rapid activation of ADAM-17 leading in turn to EGFR signalling [138]. In activated hepatic stellate cells, TGF- $\beta$ 1 induces ADAM-12 expression which might also participate in tumour progression [139]. It is worth pointing out that a recent study identified ADAM-12 as a partner of TGF $\beta$  receptor II signalling where it stabilizes the TGF $\beta$  RII protein and potentiates Smad-mediated signalling [140]. Hence, ADAM-12 might contribute to growth inhibitory signalling in normal epithelial cells which is lost during tumour progression.

ADAM-9 promotes invasiveness of liver metastatic carcinoma cells by degrading basement membrane components such as laminin-1 [141]. ADAM-9 is differentially expressed in stromal or epithelial cells and a soluble variant of ADAM-9 is secreted by activated hepatic stellate cells but not carcinoma cells or hepatocytes, indicating that stroma production of ADAM-9 might be of particular importance.

ADAM-17 mRNA levels are higher in hepatocellular carcinomas than in paired non-cancerous liver tissues suggesting that this proteinase might be implicated in tumour invasiveness by either activating EGFR by amphiregulin [108] or TGF- $\alpha$  [142].

#### 5.5. Breast cancer

Several ADAMs and ADAMTSs are found to be modulated in breast cancer patients [66,132,143]. ADAM-9, -15, -17 mRNA levels are higher in breast cancer surgical samples whereas

ADAM-10 mRNA levels are not modulated [132,143]. ADAM-12, as previously stated in the “*proliferation and apoptosis*” section of this review, is an apoptosis-modulating gene which is upregulated in human breast cancer tissues whereas non-malignant breast lesions express very low amounts of the proteinase. Accordingly, the overexpression of soluble ADAM-12 lacking the cytoplasmic tail (secreted splice variant of ADAM-12) accelerates the development of tumour by delaying tumour cell apoptosis [91]. It is worth noting that urine ADAM-12 might be a potentially important non-invasive biomarker in breast cancer since levels are enhanced in breast cancer patients [143].

*In vitro* studies have shown that overexpression of ADAM-17 in breast cancer cells increases invasion and proliferation [144]. Inversely, targeting this proteinase reverts the malignant phenotype in breast cancer cells by preventing shedding of TGF- $\alpha$  and amphiregulin [145].

Proteinase activation appears to be by itself of particular importance in carcinogenesis suggesting an involvement of metalloproteinase activity in cancer development. Indeed, ADAM-17 ratio of active/pro protein levels increased progressively from normal breast tissue, to primary breast cancer, and to lymph node metastases. In primary tumours, the active form of ADAM-17 correlates with levels of urokinase plasminogen activator and proliferating cell nuclear antigen [144].

Some precise mechanisms of action have been proposed for members of the ADAM family. For example, active ADAM-28 which is overexpressed in breast carcinoma cells contributes to the regulation of cell proliferation through IGFBP-3 cleavage, enhancing the bioavailability of IGF-I [146]. Alternative splicing could also be an important tool used by cancer cells to acquire an invasive phenotype since, for example, different isoforms of ADAM-9 proteins and ADAM-15 mRNA have been detected in breast cancer cells [74,147]. This last finding could give the opportunity to set up a powerful diagnostic tool by studying the differential production of ADAM-9 or -15 domains. Some ADAMs could be relevant markers of therapeutic response. ADAM-9 and ADAM-11 mRNA levels in tumours are indeed associated with better response to tamoxifen therapy and ADAM-9 protein production is an indicator of poor prognosis [147,148]. Patients displaying elevated levels of ADAMTS-8 and low levels of ADAMTS-15 have a general poor clinical outcome [149].

#### 5.6. Gastric and colon carcinoma

ADAM-10, which is found to be overexpressed *in vitro* after gastric cell infection, could establish a link between *Helicobacter pylori*-induced inflammation and carcinogenesis in stomach. *In vivo*, ADAM-10 and -17 are overexpressed in antral mucosa during *H. pylori* infection and ADAM-9, -10, -12, -15, and -17 are increased in gastric tumours [150,151]. ADAM-10 acts through EGFR ligand shedding leading to gastric cell proliferation [151–153]. In colon carcinomas, ADAM-17 is overexpressed independently of tumour stage or grade and is involved in tumour growth and angiogenesis possibly *via* an autocrine/paracrine pathway implicating EGFR [154].

*In vitro* expression of the alternative spliced secreted variant ADAM-9S (short) in a non-invasive colon cell line induces

a highly invasive phenotype. ADAM-9 is overexpressed in a colon cell line and is co-localized with E-cadherin suggesting a potential role in E-Cadherin-mediated metastasis [141,155]. ADAMTS-1 has recently been recognized as a novel gene inactivated through promoter hypermethylation in colorectal tumour development [156].

5.7. Kidney, bladder carcinoma

EGFR signalling appears important in the development of kidney cancer since inhibition of ADAM-17 by a dominant negative ADAM-17 mutant prevents pro-HB-EGF cleavage, EGFR activation and cell proliferation in kidney carcinoma cells [81]. As previously described in other types of cancers, ADAM-12 mRNA was found to be overexpressed in bladder cancer and ADAM-12 levels correlated with disease stage. ADAM-12 could also be an interesting biomarker since it is present in higher levels in the urine from patients with bladder cancer [64].

5.8. Pancreatic carcinoma

ADAM-9, -10 and -17 are expressed in pancreatic tissues but are restricted to specific compartments. Analysis of mRNA expression levels in microdissected cancer samples shows an overexpression of ADAM-9 and -15 proteinases in

pancreatic tumour cells [157]. In contrast, ADAMTS-1 expression is lower in pancreatic tumours and patients displaying higher levels of ADAMTS-1 are subject to more retroperitoneal invasion and lymph node metastasis associated with poor survival [158]. ADAM-17, only weakly expressed in normal pancreatic tissues, is overexpressed in all pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) and pancreatic cancer cell lines. The role of ADAM-17 in pancreatic cancer is underscored by experiments showing that inhibition of ADAM-17 gene expression, by using small interfering RNA (siRNA) technique, affects invasiveness of tumour cells [159].

6. Conclusion

ADAMs and ADAMTSs are proteins displaying some structural features conferring the potency to display multiple functions. ADAMs and ADAMTSs play crucial roles in biological processes as various as cellular adhesion, cell fusion, shedding of plasma membrane-associated proteins and intracellular signalling. In the present review, we have presented recent data showing that altered expression of ADAMs and ADAMTSs has been found in diverse tumour types which suggests that these proteins are involved in different steps of cancer progression including carcinogenesis (Fig. 2) by regulating tumour cell proliferation, apoptosis and invasiveness.

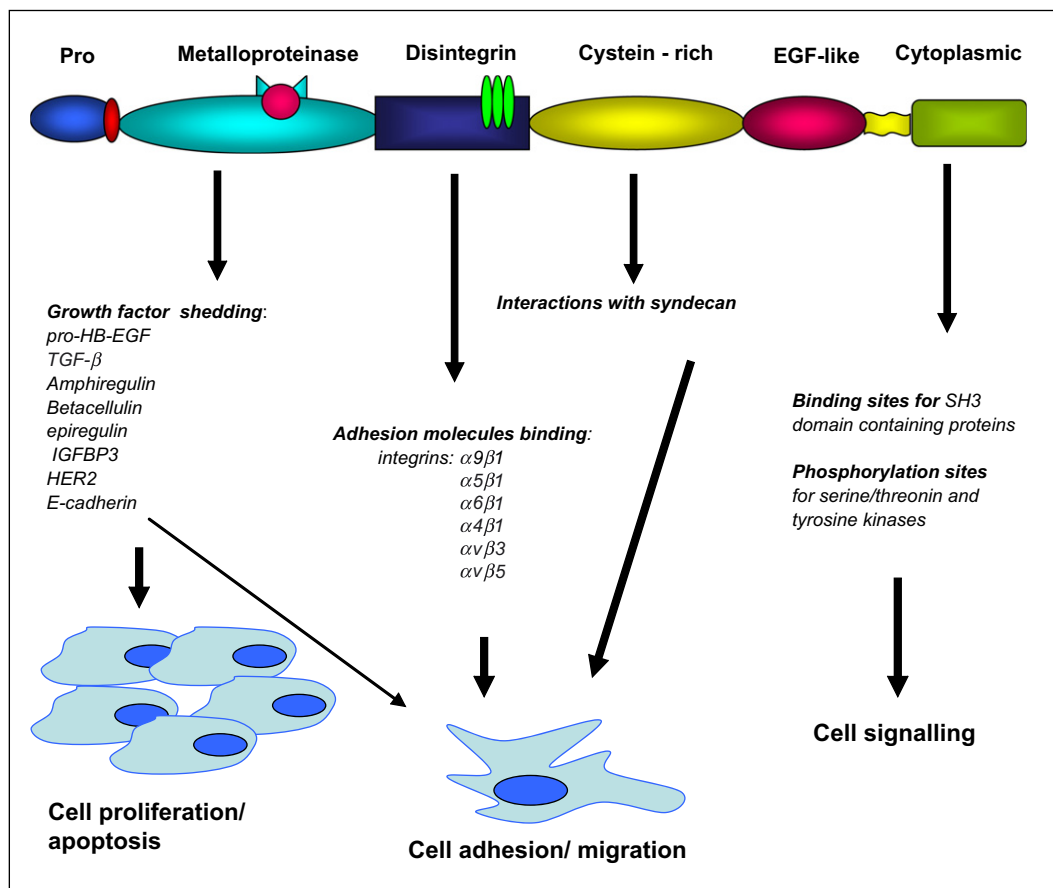


Fig. 2. Implication of ADAM molecules in different processes contributing to cancer development. ADAMs are composed of distinct domains endowing the proteins with multiple functions.



However, the exact role of these proteinases in the initiation or progression of the disease is generally still poorly understood. Of interest is that some of these proteinases might be useful tools as biomarkers for early cancer diagnostic.

Studies using broad-spectrum MMP inhibitors have provided numerous data in the literature. However, no synthetic inhibitor has shown promising results in clinical trials. This might be explained by the non-specificity of inhibitors used, which might also inhibit other proteinases such as ADAMs and ADAMTSs themselves embedded in complex networks of interactions regulating many biological processes including some protective mechanisms. Nevertheless, the design of specific agents is a real challenge since more than fifty similar proteinases exist in humans (23 MMPs, 13 ADAMs and 19 ADAMTSs). Some recent advances might offer in the next future the opportunity to design such specific inhibitors by using e.g. siRNAs or monoclonal antibodies.

The precise understanding of the exact role played by each ADAM and ADAMTS in cancer appears of particular importance in the perspective to design new therapeutic strategies based on the control or inhibition of those proteinases.

## Acknowledgments

This work was supported by grants from the Commission of European Communities (FP6), the Fonds National de la Recherche Scientifique (F.N.R.S., Belgium), the Fédération Belge Contre le Cancer, the Fonds spéciaux de la Recherche (University of Liège), the Centre Anticancéreux près l'Université de Liège, the D.G.T.R.E. from the «Région Wallonne», the F.S.E. (Fonds Social Européen).

## References

- [1] C.A. Butler, K.M. Darragh, G.P. Currie, W.J. Anderson, Variation in lung cancer survival rates between countries: do differences in data reporting contribute? *Respir. Med* 100 (2006) 1642–1646.
- [2] K. Shibuya, M. Inoue, A.D. Lopez, Statistical modeling and projections of lung cancer mortality in 4 industrialized countries, *Int. J. Cancer* 117 (2005) 476–485.
- [3] J. Ferlay, P. Autier, M. Boniol, M. Heanue, M. Colombet, P. Boyle, Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006, *Ann. Oncol* 18 (2007) 581–592.
- [4] K.J. Greenlee, Z. Werb, F. Kheradmand, Matrix metalloproteinases in lung: multiple, multifarious, and multifaceted, *Physiol. Rev.* 87 (2007) 69–98.
- [5] M.M. Handsley, D.R. Edwards, Metalloproteinases and their inhibitors in tumor angiogenesis, *Int. J. Cancer* 115 (2005) 849–860.
- [6] A. Noel, M. Jost, E. Maquoi, Matrix metalloproteinases at cancer tumor-host interface. *Semin. Cell Dev. Biol.*, in press, doi:10.1016/j.semcdb.2007.05.011
- [7] C.M. Overall, R.A. Dean, Degradomics: systems biology of the protease web. Pleiotropic roles of MMPs in cancer, *Cancer Metastasis Rev.* 25 (2006) 69–75.
- [8] C.M. Overall, O. Kleinfeld, Tumour microenvironment – opinion: validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy, *Nat. Rev. Cancer* 6 (2006) 227–239.
- [9] A. Page-McCaw, A.J. Ewald, Z. Werb, Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 (2007) 221–233.
- [10] T.G. Wolfsberg, P. Primakoff, D.G. Myles, J.M. White, ADAM, a novel family of membrane proteins containing a disintegrin and metalloprotease domain: multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions, *J. Cell Biol.* 131 (1995) 275–278.
- [11] C.P. Blobel, Metalloprotease-disintegrins: links to cell adhesion and cleavage of TNF alpha and Notch, *Cell* 90 (1997) 589–592.
- [12] X.P. Zhang, T. Kamata, K. Yokoyama, W. Puzon-McLaughlin, Y. Takada, Specific interaction of the recombinant disintegrin-like domain of MDC-15 (metargidin, ADAM-15) with integrin alphavbeta3, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 7345–7350.
- [13] F. Loechel, B.J. Gilpin, E. Engvall, R. Albrechtsen, U.M. Wewer, Human ADAM 12 (meltrin alpha) is an active metalloprotease, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 16993–16997.
- [14] R.A. Black, J.M. White, ADAMs: focus on the protease domain, *Curr. Opin. Cell Biol.* 10 (1998) 654–659.
- [15] K. Eto, C. Huet, T. Tarui, et al., Functional classification of ADAMs based on a conserved motif for binding to integrin alpha 9beta 1: implications for sperm-egg binding and other cell interactions, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 17804–17810.
- [16] K. Reiss, A. Ludwig, P. Saftig, Breaking up the tie: disintegrin-like metalloproteinases as regulators of cell migration in inflammation and invasion, *Pharmacol. Ther* 111 (2006) 985–1006.
- [17] S. Takeda, T. Igarashi, H. Mori, S. Araki, Crystal structures of VAP1 reveal ADAMs' MDC domain architecture and its unique C-shaped scaffold, *EMBO J* 25 (2006) 2388–2396.
- [18] A.P. Huovila, E.A. Almeida, J.M. White, ADAMs and cell fusion, *Curr. Opin. Cell Biol.* 8 (1996) 692–699.
- [19] A.L. Stone, M. Kroeger, Q.X. Sang, Structure-function analysis of the ADAM family of disintegrin-like and metalloproteinase-containing proteins (review), *J. Protein Chem.* 18 (1999) 447–465.
- [20] D.F. Seals, S.A. Courtneidge, The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions, *Genes Dev.* 17 (2003) 7–30.
- [21] S.S. Apte, A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motifs: the ADAMTS family, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36 (2004) 981–985.
- [22] S. Cal, A.J. Obaya, M. Llamazares, C. Garabaya, V. Quesada, C. Lopez-Otin, Cloning, expression analysis, and structural characterization of seven novel human ADAMTSs, a family of metalloproteinases with disintegrin and thrombospondin-1 domains, *Gene* 283 (2002) 49–62.
- [23] S. Porter, I.M. Clark, L. Kevorkian, D.R. Edwards, The ADAMTS metalloproteinases, *Biochem. J.* 386 (2005) 15–27.
- [24] G.P. Kaushal, S.V. Shah, The new kids on the block: ADAMTSs, potentially multifunctional metalloproteinases of the ADAM family, *J. Clin. Invest* 105 (2000) 1335–1337.
- [25] B.L. Tang, W. Hong, ADAMTS: a novel family of proteases with an ADAM protease domain and thrombospondin 1 repeats, *FEBS Lett.* 445 (1999) 223–225.
- [26] A. Amour, C.G. Knight, A. Webster, et al., The in vitro activity of ADAM-10 is inhibited by TIMP-1 and TIMP-3, *FEBS Lett.* 473 (2000) 275–279.
- [27] M. Kashiwagi, M. Tortorella, H. Nagase, K. Brew, TIMP-3 is a potent inhibitor of aggrecanase 1 (ADAM-TS4) and aggrecanase 2 (ADAM-TS5), *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 12501–12504.
- [28] G. Murphy, V. Knauper, M.H. Lee, et al., Role of TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases) in pericellular proteolysis: the specificity is in the detail, *Biochem. Soc. Symp* 70 (2003) 65–80.
- [29] H. Nagase, K. Brew, Designing TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinases) variants that are selective metalloproteinase inhibitors, *Biochem. Soc. Symp* 70 (2003) 201–212.
- [30] A. Amour, C.G. Knight, W.R. English, et al., The enzymatic activity of ADAM8 and ADAM9 is not regulated by TIMPs, *FEBS Lett.* 524 (2002) 154–158.
- [31] G.J. Wayne, S.J. Deng, A. Amour, et al., TIMP-3 inhibition of ADAMTS-4 (Aggrecanase-1) is regulated by interactions between aggrecan and the C-terminal domain of ADAMTS-4, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 20991–20998.
- [32] R. Yuan, P. Primakoff, D.G. Myles, A role for the disintegrin domain of cyritestin, a sperm surface protein belonging to the ADAM family, in

- mouse sperm-egg plasma membrane adhesion and fusion, *J. Cell Biol.* 137 (1997) 105–112.
- [33] P. Yang, K.A. Baker, T. Hagg, The ADAMs family: coordinators of nervous system development, plasticity and repair, *Prog. Neurobiol.* 79 (2006) 73–94.
- [34] N. Kawaguchi, X. Xu, R. Tajima, et al., ADAM 12 protease induces adipogenesis in transgenic mice, *Am. J. Pathol.* 160 (2002) 1895–1903.
- [35] M. Masaki, T. Kurisaki, K. Shirakawa, A. Sehara-Fujisawa, Role of meltrin {alpha} (ADAM12) in obesity induced by high-fat diet, *Endocrinology* 146 (2005) 1752–1763.
- [36] B.J. Gilpin, F. Loechel, M.G. Mattei, E. Engvall, R. Albrechtsen, U.M. Wewer, A novel, secreted form of human ADAM 12 (meltrin alpha) provokes myogenesis in vivo, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 157–166.
- [37] R.A. Black, C.T. Rauch, C.J. Kozlosky, et al., A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells, *Nature* 385 (1997) 729–733.
- [38] M.L. Moss, S.L. Jin, M.E. Milla, et al., Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha, *Nature* 385 (1997) 733–736.
- [39] U. Sahin, G. Weskamp, K. Kelly, et al., Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands, *J. Cell Biol.* 164 (2004) 769–779.
- [40] D. Hartmann, B. de Strooper, L. Serneels, et al., The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts, *Hum. Mol. Genet.* 11 (2002) 2615–2624.
- [41] H. Qi, M.D. Rand, X. Wu, et al., Processing of the notch ligand delta by the metalloprotease Kuzbanian, *Science* 283 (1999) 91–94.
- [42] K.L. Taylor, A.M. Henderson, C.C. Hughes, Notch activation during endothelial cell network formation in vitro targets the basic HLH transcription factor HESR-1 and downregulates VEGFR-2/KDR expression, *Microvasc. Res.* 64 (2002) 372–383.
- [43] G.C. Jones, ADAMTS proteinases: potential therapeutic targets? *Curr. Pharm. Biotechnol.* 7 (2006) 25–31.
- [44] C.B. Kern, W.O. Twa, C.H. Mjaatvedt, et al., Proteolytic cleavage of versican during cardiac cushion morphogenesis, *Dev. Dyn.* 235 (2006) 2238–2247.
- [45] A.M. Manso, L. Elsharif, S.M. Kang, R.S. Ross, Integrins, membrane-type matrix metalloproteinases and ADAMs: potential implications for cardiac remodeling, *Cardiovasc. Res.* 69 (2006) 574–584.
- [46] G.G. Levy, W.C. Nichols, E.C. Lian, et al., Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura, *Nature* 413 (2001) 488–494.
- [47] J. Brynskov, P. Foegh, G. Pedersen, et al., Tumour necrosis factor alpha converting enzyme (TACE) activity in the colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease, *Gut* 51 (2002) 37–43.
- [48] S.C. Foley, A.K. Mogas, R. Olivenstein, et al., Increased expression of ADAM33 and ADAM8 with disease progression in asthma, *J. Allergy Clin. Immunol.* 119 (2007) 863–871.
- [49] S.T. Holgate, Y. Yang, H.M. Haitchi, et al., The genetics of asthma: ADAM33 as an example of a susceptibility gene, *Proc. Am. Thorac. Soc.* 3 (2006) 440–443.
- [50] P. Van Eerdewegh, R.D. Little, J. Dupuis, et al., Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness, *Nature* 418 (2002) 426–430.
- [51] N.E. King, N. Zimmermann, S.M. Pope, et al., Expression and regulation of a disintegrin and metalloproteinase (ADAM) 8 in experimental asthma, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 31 (2004) 257–265.
- [52] G. Paulissen, N. Rocks, F. Quesada-Calvo, et al., Expression of ADAMs and their inhibitors in sputum from patients with asthma, *Mol. Med.* 12 (2006) 171–179.
- [53] C.J. East, H. Stanton, S.B. Golub, F.M. Rogerson, A.J. Fosang, ADAMTS-5 deficiency does not block aggrecanolytic cleavage at preferred cleavage sites in the chondroitin sulfate-rich region of aggrecan, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 8632–8640.
- [54] P.J. Koshy, C.J. Lundy, A.D. Rowan, et al., The modulation of matrix metalloproteinase and ADAM gene expression in human chondrocytes by interleukin-1 and oncostatin M: a time-course study using real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction, *Arthritis Rheum* 46 (2002) 961–967.
- [55] C.B. Little, C.T. Meeker, S.B. Golub, et al., Blocking aggrecanase cleavage in the aggrecan interglobular domain abrogates cartilage erosion and promotes cartilage repair, *J. Clin. Invest.* 117 (2007) 1627–1636.
- [56] H. Stanton, F.M. Rogerson, C.J. East, et al., ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage in vivo and in vitro, *Nature* 434 (2005) 648–652.
- [57] C. Gendron, M. Kashiwagi, N.H. Lim, et al., Proteolytic activities of human ADAMTS-5: comparative studies with ADAMTS-4, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 18294–18306.
- [58] N. Al Fakhri, J. Wilhelm, M. Hahn, et al., Increased expression of disintegrin-metalloproteinases ADAM-15 and ADAM-9 following upregulation of integrins alpha5beta1 and alphavbeta3 in atherosclerosis, *J. Cell Biochem.* 89 (2003) 808–823.
- [59] B. Cauwe, P.E. Steen, G. Opendakker, The biochemical, biological, and pathological kaleidoscope of cell surface substrates processed by matrix metalloproteinases, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 42 (2007) 113–185.
- [60] M.P. Sanderson, P.J. Dempsey, A.J. Dunbar, Control of ErbB signaling through metalloprotease mediated ectodomain shedding of EGF-like factors, *Growth Factors* 24 (2006) 121–136.
- [61] K. Iba, R. Albrechtsen, B.J. Gilpin, F. Loechel, U.M. Wewer, Cysteine-rich domain of human ADAM 12 (meltrin alpha) supports tumor cell adhesion, *Am. J. Pathol.* 154 (1999) 1489–1501.
- [62] K. Iba, R. Albrechtsen, B. Gilpin, et al., The cysteine-rich domain of human ADAM 12 supports cell adhesion through syndecans and triggers signaling events that lead to beta1 integrin-dependent cell spreading, *J. Cell Biol.* 149 (2000) 1143–1156.
- [63] C. Wild-Bode, K. Fellerer, J. Kugler, C. Haass, A. Capell, A basolateral sorting signal directs ADAM10 to adherens junctions and is required for its function in cell migration, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 23824–23829.
- [64] C. Frohlich, R. Albrechtsen, L. Dyrskjot, L. Rudkjaer, T.F. Orntoft, U.M. Wewer, Molecular profiling of ADAM12 in human bladder cancer, *Clin. Cancer Res.* 12 (2006) 7359–7368.
- [65] N. Ishikawa, Y. Daigo, W. Yasui, et al., ADAM8 as a novel serological and histochemical marker for lung cancer, *Clin. Cancer Res.* 10 (2004) 8363–8370.
- [66] S. Porter, S.D. Scott, E.M. Sassoone, et al., Dysregulated expression of adamalysin-thrombospondin genes in human breast carcinoma, *Clin. Cancer Res.* 10 (2004) 2429–2440.
- [67] S.Y. Sung, H. Kubo, K. Shigemura, et al., Oxidative stress induces ADAM9 protein expression in human prostate cancer cells, *Cancer Res.* 66 (2006) 9519–9526.
- [68] D.J. Bevvitt, Z. Li, J.L. Lindrop, M.D. Barker, M.P. Clarke, N. McKie, Analysis of full length ADAMTS6 transcript reveals alternative splicing and a role for the 5' untranslated region in translational control, *Gene* 359 (2005) 99–110.
- [69] D.P. Cerretti, R.F. DuBose, R.A. Black, N. Nelson, Isolation of two novel metalloproteinase-disintegrin (ADAM) cDNAs that show testis-specific gene expression, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 263 (1999) 810–815.
- [70] N. Hotoda, H. Koike, N. Sasagawa, S. Ishiura, A secreted form of human ADAM9 has an alpha-secretase activity for APP, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293 (2002) 800–805.
- [71] L. Howard, R.A. Maciewicz, C.P. Blobel, Cloning and characterization of ADAM28: evidence for autocatalytic pro-domain removal and for cell surface localization of mature ADAM28, *Biochem. J.* 348 (Pt 1) (2000) 21–27.
- [72] T. Katagiri, Y. Harada, M. Emi, Y. Nakamura, Human metalloprotease/disintegrin-like (MDC) gene: exon-intron organization and alternative splicing, *Cytogenet. Cell Genet.* 68 (1995) 39–44.
- [73] T. Kurisaki, S. Wakatsuki, A. Sehara-Fujisawa, Meltrin beta mini, a new ADAM19 isoform lacking metalloprotease and disintegrin domains, induces morphological changes in neuronal cells, *FEBS Lett.* 532 (2002) 419–422.
- [74] R.M. Ortiz, I. Karkkainen, A.P. Huovila, Aberrant alternative exon use and increased copy number of human metalloprotease-disintegrin ADAM15 gene in breast cancer cells, *Genes Chromosomes Cancer* 41 (2004) 366–378.
- [75] K. Sagane, Y. Ohya, Y. Hasegawa, I. Tanaka, Metalloproteinase-like, disintegrin-like, cysteine-rich proteins MDC2 and MDC3: novel human

- cellular disintegrins highly expressed in the brain, *Biochem. J.* 334 (Pt 1) (1998) 93–98.
- [76] S.D. Wainwright, J. Bondeson, C.E. Hughes, An alternative spliced transcript of ADAMTS4 is present in human synovium from OA patients, *Matrix Biol.* 25 (2006) 317–320.
- [77] R. Yavari, C. Adida, P. Bray-Ward, M. Brines, T. Xu, Human metalloprotease-disintegrin Kuzbanian regulates sympathoadrenal cell fate in development and neoplasia, *Hum. Mol. Genet.* 7 (1998) 1161–1167.
- [78] Y.J. Liu, Y. Xu, Q. Yu, Full-length ADAMTS-1 and the ADAMTS-1 fragments display pro- and antimetastatic activity, respectively, *Oncogene* 25 (2006) 2452–2467.
- [79] J.C. Rodriguez-Manzanique, A.B. Milchanowski, E.K. Dufour, R. Leduc, M.L. Iruela-Arispe, Characterization of METH-1/ADAMTS1 processing reveals two distinct active forms, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 33471–33479.
- [80] C.P. Blobel, ADAMs: key components in EGFR signalling and development, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6 (2005) 32–43.
- [81] B. Schafer, B. Marg, A. Gschwind, A. Ullrich, Distinct ADAM metalloproteinases regulate G protein-coupled receptor-induced cell proliferation and survival, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 47929–47938.
- [82] A. Gschwind, S. Hart, O.M. Fischer, A. Ullrich, TACE cleavage of proamphiregulin regulates GPCR-induced proliferation and motility of cancer cells, *EMBO J* 22 (2003) 2411–2421.
- [83] Q. Zhang, S.M. Thomas, V.W. Lui, et al., Phosphorylation of TNF-alpha converting enzyme by gastrin-releasing peptide induces amphiregulin release and EGF receptor activation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 (2006) 6901–6906.
- [84] P.P. Ongusaha, J.C. Kwak, A.J. Zwible, et al., HB-EGF is a potent inducer of tumor growth and angiogenesis, *Cancer Res.* 64 (2004) 5283–5290.
- [85] K. Horiuchi, S. Le Gall, M. Schulte, et al., Substrate selectivity of epidermal growth factor-receptor ligand sheddases and their regulation by phorbol esters and calcium influx, *Mol. Biol. Cell* 18 (2007) 176–188.
- [86] U. Sahin, C.P. Blobel, Ectodomain shedding of the EGF-receptor ligand epigen is mediated by ADAM17, *FEBS Lett.* 581 (2007) 41–44.
- [87] B. Santiago-Josefat, C. Esselens, J.J. Bech-Serra, J. Arribas, Post-transcriptional up-regulation of ADAM17 upon epidermal growth factor receptor activation and in breast tumors, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 8325–8331.
- [88] K. Ito, I. Okamoto, N. Araki, et al., Calcium influx triggers the sequential proteolysis of extracellular and cytoplasmic domains of E-cadherin, leading to loss of beta-catenin from cell-cell contacts, *Oncogene* 18 (1999) 7080–7090.
- [89] T. Maretzky, K. Reiss, A. Ludwig, et al., ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102 (2005) 9182–9187.
- [90] M. Shtutman, J. Zhurinsky, I. Simcha, et al., The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 5522–5527.
- [91] M. Kveiborg, C. Frohlich, R. Albrechtsen, et al., A role for ADAM12 in breast tumor progression and stromal cell apoptosis, *Cancer Res.* 65 (2005) 4754–4761.
- [92] J.S. Fridman, E. Caulder, M. Hansbury, et al., Selective inhibition of ADAM metalloproteases as a novel approach for modulating ErbB pathways in cancer, *Clin. Cancer Res.* 13 (2007) 1892–1902.
- [93] K. Bajou, C. Maillard, M. Jost, et al., Host-derived plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) concentration is critical for in vivo tumoral angiogenesis and growth, *Oncogene* 23 (2004) 6986–6990.
- [94] I.J. Fidler, L.M. Ellis, The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis, *Cell* 79 (1994) 185–188.
- [95] D. Hanahan, J. Folkman, Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis, *Cell* 86 (1996) 353–364.
- [96] M. Jost, A.R. Folgueras, F. Frerart, et al., Earlier onset of tumoral angiogenesis in matrix metalloproteinase-19-deficient mice, *Cancer Res.* 66 (2006) 5234–5241.
- [97] A. Noel, C. Maillard, N. Rocks, et al., Membrane associated proteases and their inhibitors in tumour angiogenesis, *J. Clin. Pathol* 57 (2004) 577–584.
- [98] R. Roy, B. Zhang, M.A. Moses, Making the cut: protease-mediated regulation of angiogenesis, *Exp. Cell Res.* 312 (2006) 608–622.
- [99] F. Vazquez, G. Hastings, M.A. Ortega, et al., METH-1, a human ortholog of ADAMTS-1, and METH-2 are members of a new family of proteins with angio-inhibitory activity, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 23349–23357.
- [100] M.L. Iruela-Arispe, M. Lombardo, H.C. Krutzsch, J. Lawler, D.D. Roberts, Inhibition of angiogenesis by thrombospondin-1 is mediated by 2 independent regions within the type 1 repeats, *Circulation* 100 (1999) 1423–1431.
- [101] J. Lawler, The functions of thrombospondin-1 and-2, *Curr. Opin. Cell Biol.* 12 (2000) 634–640.
- [102] A. Luque, D.R. Carpizo, M.L. Iruela-Arispe, ADAMTS1/METH1 inhibits endothelial cell proliferation by direct binding and sequestration of VEGF165, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 23656–23665.
- [103] K. Kuno, K. Bannai, M. Hakozaiki, K. Matsushima, K. Hirose, The carboxyl-terminal half region of ADAMTS-1 suppresses both tumorigenicity and experimental tumor metastatic potential, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319 (2004) 1327–1333.
- [104] B. Herren, E.W. Raines, R. Ross, Expression of a disintegrin-like protein in cultured human vascular cells and in vivo, *FASEB J* 11 (1997) 173–180.
- [105] V. Trochon-Joseph, D. Martel-Renoir, L.M. Mir, et al., Evidence of anti-angiogenic and antimetastatic activities of the recombinant disintegrin domain of metargidin, *Cancer Res.* 64 (2004) 2062–2069.
- [106] K. Horiuchi, G. Weskamp, L. Lum, et al., Potential role for ADAM15 in pathological neovascularization in mice, *Mol. Cell Biol.* 23 (2003) 5614–5624.
- [107] V. Beck, H. Herold, A. Benge, et al., ADAM15 decreases integrin alphavbeta3/vitronectin-mediated ovarian cancer cell adhesion and motility in an RGD-dependent fashion, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37 (2005) 590–603.
- [108] H. Lemjabbar, D. Li, M. Gallup, S. Sidhu, E. Drori, C. Basbaum, Tobacco smoke-induced lung cell proliferation mediated by tumor necrosis factor alpha-converting enzyme and amphiregulin, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 26202–26207.
- [109] B.B. Zhou, M. Peyton, B. He, et al., Targeting ADAM-mediated ligand cleavage to inhibit HER3 and EGFR pathways in non-small cell lung cancer, *Cancer Cell* 10 (2006) 39–50.
- [110] Y. Shintani, S. Higashiyama, M. Ohta, et al., Overexpression of ADAM9 in non-small cell lung cancer correlates with brain metastasis, *Cancer Res.* 64 (2004) 4190–4196.
- [111] N. Rocks, G. Paulissen, C.F. Quesada, et al., Expression of a disintegrin and metalloprotease (ADAM and ADAMTS) enzymes in human non-small-cell lung carcinomas (NSCLC), *Br. J. Cancer* 94 (2006) 724–730.
- [112] S. Mochizuki, M. Shimoda, T. Shiomi, Y. Fujii, Y. Okada, ADAM28 is activated by MMP-7 (matrilysin-1) and cleaves insulin-like growth factor binding protein-3, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315 (2004) 79–84.
- [113] T. Ohtsuka, T. Shiomi, M. Shimoda, et al., ADAM28 is overexpressed in human non-small cell lung carcinomas and correlates with cell proliferation and lymph node metastasis, *Int. J. Cancer* 118 (2006) 263–273.
- [114] A. Schutz, W. Hartig, M. Wobus, J. Grosche, C. Wittekind, G. Aust, Expression of ADAM15 in lung carcinomas, *Virchows Arch.* 446 (2005) 421–429.
- [115] J.R. Dunn, D. Panutsopoulos, M.W. Shaw, et al., METH-2 silencing and promoter hypermethylation in NSCLC, *Br. J. Cancer* 91 (2004) 1149–1154.
- [116] T. Harada, A. Nishie, K. Torigoe, et al., The specific expression of three novel splice variant forms of human metalloprotease-like disintegrin-like cysteine-rich protein 2 gene in brain tissues and gliomas, *Jpn. J. Cancer Res.* 91 (2000) 1001–1006.
- [117] G.M. D'Abaco, K. Ng, L. Paradiso, N.J. Godde, A. Kaye, U. Novak, ADAM22, expressed in normal brain but not in high-grade gliomas, inhibits cellular proliferation via the disintegrin domain, *Neurosurgery* 58 (2006) 179–186.
- [118] M. Bohm, R. Gerlach, W.D. Beecken, T. Scheuer, I. Stier-Bruck, I. Scharrer, ADAMTS-13 activity in patients with brain and prostate tumors is mildly reduced, but not correlated to stage of malignancy and metastasis, *Thromb. Res.* 111 (2003) 33–37.
- [119] J.R. Dunn, J.E. Reed, D.G. du Plessis, et al., Expression of ADAMTS-8, a secreted protease with antiangiogenic properties, is downregulated in brain tumours, *Br. J. Cancer* 94 (2006) 1186–1193.

- [120] J. Held-Feindt, E.B. Paredes, U. Blomer, et al., Matrix-degrading proteases ADAMTS4 and ADAMTS5 (disintegrins and metalloproteinases with thrombospondin motifs 4 and 5) are expressed in human glioblastomas, *Int. J. Cancer* 118 (2006) 55–61.
- [121] X. Zheng, F. Jiang, M. Katakowski, et al., Inhibition of ADAM17 reduces hypoxia-induced brain tumor cell invasiveness, *Cancer Sci.* 98 (2007) 674–684.
- [122] D. Wildeboer, S. Naus, Q.X. Amy Sang, J.W. Bartsch, A. Pagenstecher, Metalloproteinase disintegrins ADAM8 and ADAM19 are highly regulated in human primary brain tumors and their expression levels and activities are associated with invasiveness, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 65 (2006) 516–527.
- [123] T. Kodama, E. Ikeda, A. Okada, et al., ADAM12 is selectively overexpressed in human glioblastomas and is associated with glioblastoma cell proliferation and shedding of heparin-binding epidermal growth factor, *Am. J. Pathol.* 165 (2004) 1743–1753.
- [124] J. Bertram, J.W. Peacock, L. Fazli, et al., Loss of PTEN is associated with progression to androgen independence, *Prostate* 66 (2006) 895–902.
- [125] T. Ichikawa, H. Suzuki, T. Ueda, A. Komiya, T. Imamoto, S. Kojima, Hormone treatment for prostate cancer: current issues and future directions, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 56 (Suppl. 1) (2005) 58–63.
- [126] D.R. McCulloch, M. Harvey, A.C. Herington, The expression of the ADAMs proteases in prostate cancer cell lines and their regulation by dihydrotestosterone, *Mol. Cell Endocrinol.* 167 (2000) 11–21.
- [127] K. Shigemura, S.Y. Sung, H. Kubo, et al., Reactive oxygen species mediate androgen receptor- and serum starvation-elicited downstream signaling of ADAM9 expression in human prostate cancer cells, *Prostate* 67 (2007) 722–731.
- [128] F.R. Fritzsche, M. Jung, C. Xu, et al., ADAM8 expression in prostate cancer is associated with parameters of unfavorable prognosis, *Virchows Arch.* 449 (2006) 628–636.
- [129] B.H. Koo, D. Oh, S.Y. Chung, et al., Deficiency of von Willebrand factor-cleaving protease activity in the plasma of malignant patients, *Thromb. Res.* 105 (2002) 471–476.
- [130] L. Oleksowicz, N. Bhagwati, M. DeLeon-Fernandez, Deficient activity of von Willebrand's factor-cleaving protease in patients with disseminated malignancies, *Cancer Res.* 59 (1999) 2244–2250.
- [131] N.A. Cross, S. Chandrasekharan, N. Jokonya, et al., The expression and regulation of ADAMTS-1, -4, -5, -9, and -15, and TIMP-3 by TGFbeta1 in prostate cells: relevance to the accumulation of versican, *Prostate* 63 (2005) 269–275.
- [132] R. Kuefer, K.C. Day, C.G. Kleer, et al., ADAM15 disintegrin is associated with aggressive prostate and breast cancer disease, *Neoplasia* 8 (2006) 319–329.
- [133] M.L. Moss, J.M. White, M.H. Lambert, R.C. Andrews, TACE and other ADAM proteases as targets for drug discovery, *Drug Discov. Today* 6 (2001) 417–426.
- [134] D.R. McCulloch, P. Akl, H. Samaratunga, A.C. Herington, D.M. Odorico, Expression of the disintegrin metalloprotease, ADAM-10, in prostate cancer and its regulation by dihydrotestosterone, insulin-like growth factor I, and epidermal growth factor in the prostate cancer cell model LNCaP, *Clin. Cancer Res.* 10 (2004) 314–323.
- [135] N. Theret, O. Musso, B. Turlin, et al., Increased extracellular matrix remodeling is associated with tumor progression in human hepatocellular carcinomas, *Hepatology* 34 (2001) 82–88.
- [136] H. Le Pabic, D. Bonnier, U.M. Wewer, et al., ADAM12 in human liver cancers: TGF-beta-regulated expression in stellate cells is associated with matrix remodeling, *Hepatology* 37 (2003) 1056–1066.
- [137] M. Matsuo, H. Sakurai, Y. Ueno, O. Ohtani, I. Saiki, Activation of MEK/ERK and PI3K/Akt pathways by fibronectin requires integrin alpha-v-mediated ADAM activity in hepatocellular carcinoma: a novel functional target for gefitinib, *Cancer Sci.* 97 (2006) 155–162.
- [138] M.M. Murillo, G. del Castillo, A. Sanchez, M. Fernandez, I. Fabregat, Involvement of EGF receptor and c-Src in the survival signals induced by TGF-beta1 in hepatocytes, *Oncogene* 24 (2005) 4580–4587.
- [139] H. Le Pabic, A. L'Helgoualc'h, A. Coutant, et al., Involvement of the serine/threonine p70S6 kinase in TGF-beta1-induced ADAM12 expression in cultured human hepatic stellate cells, *J. Hepatol.* 43 (2005) 1038–1044.
- [140] A. Atfi, E. Dumont, F. Colland, et al., The disintegrin and metalloproteinase ADAM12 contributes to TGF-beta signaling through interaction with the type II receptor, *J. Cell Biol.* 178 (2007) 201–208.
- [141] A. Mazzocca, R. Coppari, R. De Franco, et al., A secreted form of ADAM9 promotes carcinoma invasion through tumor-stromal interactions, *Cancer Res.* 65 (2005) 4728–4738.
- [142] M. Borrell-Pages, F. Rojo, J. Albanell, J. Baselga, J. Arribas, TACE is required for the activation of the EGFR by TGF-alpha in tumors, *EMBO J.* 22 (2003) 1114–1124.
- [143] R. Roy, U.M. Wewer, D. Zurakowski, S.E. Pories, M.A. Moses, ADAM 12 cleaves extracellular matrix proteins and correlates with cancer status and stage, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 51323–51330.
- [144] P.M. McGowan, B.M. Ryan, A.D. Hill, E. McDermott, N. O'Higgins, M.J. Duffy, ADAM-17 expression in breast cancer correlates with variables of tumor progression, *Clin. Cancer Res.* 13 (2007) 2335–2343.
- [145] P.A. Kenny, M.J. Bissell, Targeting TACE-dependent EGFR ligand shedding in breast cancer, *J. Clin. Invest.* 117 (2007) 337–345.
- [146] Y. Mitsui, S. Mochizuki, T. Kodama, et al., ADAM28 is overexpressed in human breast carcinomas: implications for carcinoma cell proliferation through cleavage of insulin-like growth factor binding protein-3, *Cancer Res.* 66 (2006) 9913–9920.
- [147] C. O'Shea, N. McKie, Y. Buggy, et al., Expression of ADAM-9 mRNA and protein in human breast cancer, *Int. J. Cancer* 105 (2003) 754–761.
- [148] A.M. Sieuwerts, M.E. Meijer-van Gelder, M. Timmermans, et al., How ADAM-9 and ADAM-11 differentially from estrogen receptor predict response to tamoxifen treatment in patients with recurrent breast cancer: a retrospective study, *Clin. Cancer Res.* 11 (2005) 7311–7321.
- [149] S. Porter, P.N. Span, F.C. Sweep, et al., ADAMTS8 and ADAMTS15 expression predicts survival in human breast carcinoma, *Int. J. Cancer* 118 (2006) 1241–1247.
- [150] S. Carl-McGrath, U. Lendeckel, M. Ebert, A. Roessner, C. Rocken, The disintegrin-metalloproteinases ADAM9, ADAM12, and ADAM15 are upregulated in gastric cancer, *Int. J. Oncol.* 26 (2005) 17–24.
- [151] T. Yoshimura, T. Tomita, M.F. Dixon, A.T. Axon, P.A. Robinson, J.E. Crabtree, ADAMs (a disintegrin and metalloproteinase) messenger RNA expression in *Helicobacter pylori*-infected, normal, and neoplastic gastric mucosa, *J. Infect. Dis.* 185 (2002) 332–340.
- [152] J.M. Cox, C.L. Clayton, T. Tomita, D.M. Wallace, P.A. Robinson, J.E. Crabtree, cDNA array analysis of cag pathogenicity island-associated *Helicobacter pylori* epithelial cell response genes, *Infect. Immun.* 69 (2001) 6970–6980.
- [153] T. Joh, H. Kataoka, S. Tanida, et al., *Helicobacter pylori*-stimulated interleukin-8 (IL-8) promotes cell proliferation through transactivation of epidermal growth factor receptor (EGFR) by disintegrin and metalloproteinase (ADAM) activation, *Dig. Dis. Sci.* 50 (2005) 2081–2089.
- [154] F. Blanchot-Jossic, A. Jarry, D. Masson, et al., Up-regulated expression of ADAM17 in human colon carcinoma: co-expression with EGFR in neoplastic and endothelial cells, *J. Pathol.* 207 (2005) 156–163.
- [155] T. Hirao, D. Nanba, M. Tanaka, et al., Overexpression of ADAM9 enhances growth factor-mediated recycling of E-cadherin in human colon cancer cell line HT29 cells, *Exp. Cell Res.* 312 (2006) 331–339.
- [156] G.E. Lind, K. Kleivi, G.I. Meling, et al., ADAMTS1, CRABP1, and NR3C1 identified as epigenetically deregulated genes in colorectal tumorigenesis, *Cell Oncol.* 28 (2006) 259–272.
- [157] D. Yamada, K. Ohuchida, K. Mizumoto, et al., Increased expression of ADAM 9 and ADAM 15 mRNA in pancreatic cancer, *Anticancer Res.* 27 (2007) 793–799.
- [158] T. Masui, R. Hosotani, S. Tsuji, et al., Expression of METH-1 and METH-2 in pancreatic cancer, *Clin. Cancer Res.* 7 (2001) 3437–3443.
- [159] J. Ringel, R. Jesnowski, N. Moniaux, et al., Aberrant expression of a disintegrin and metalloproteinase 17/tumor necrosis factor-alpha converting enzyme increases the malignant potential in human pancreatic ductal adenocarcinoma, *Cancer Res.* 66 (2006) 9045–9053.

## **BUTS ET PLAN DU TRAVAIL**

La croissance tumorale est un processus complexe impliquant des interactions entre les cellules de l'hôte et les cellules tumorales. Les ADAMs et ADAMTS possèdent les propriétés de protéases et de molécules d'adhésion, les définissant comme des candidats capables de réguler ces interactions intercellulaires. Elles peuvent en effet cliver des facteurs de croissance, des cytokines, des chimiokines, leurs récepteurs membranaires ainsi que contribuer au remodelage de la matrice extracellulaire associé au développement tumoral. Le travail décrit dans cette thèse a pour but de caractériser les implications des **ADAM et ADAMTS protéases** dans les processus complexes menant au développement des cancers pulmonaires non à petites cellules.

Les résultats seront présentés sous forme d'articles précédés d'un bref résumé.

Dans la **première partie** de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'expression de l'ARNm codant pour certaines ADAMs et ADAMTS dans des biopsies de cancers pulmonaires humains non à petites cellules et nous avons comparé cette expression à celle des ARNm présents dans des tissus bronchiques sains correspondants.

Publication n°2:

ROCKS N, PAULISSEN G, POLETTE M, GUEDERS M, MUNAUT C, FOIDART JM, NOEL A, BIREMBAUT P, CATALDO D. Expression of A Disintegrin and Metalloprotease (ADAM) enzymes in human non small cell lung carcinomas (NSCLC). *British J Cancer*, 2006 ; 94: 724-30.

**La deuxième partie** de notre travail a été essentiellement consacrée à l'étude du rôle de l'ADAM-12 dans les étapes de l'acquisition d'un phénotype tumoral. Cette étude est basée sur la production de clones surexprimant l'ADAM-12 issus d'une lignée de cellules épithéliales bronchiques (BEAS-2B) et sur leur caractérisation phénotypique *in vitro* et *in vivo*.

Publication n°3:

ROCKS N, ESTRELLA C, PAULISSEN G, QUESADA-CALVO F, GILLES C, GUEDERS M, CRAHAY C, FOIDART JM, GOSSET P, NOEL A, CATALDO D.

The metalloproteinase ADAM-12 regulates bronchial epithelial cell proliferation and apoptosis. *Cell Proliferation, en révision.*

Dans **la troisième partie** du travail, nous nous sommes attachés à étudier les fonctions exercées par l'ADAMTS-1 dans les processus complexes menant au développement de tumeurs pulmonaires.

Publication n°4:

ROCKS N, PAULISSEN G, QUESADA-CALVO F, ALVAREZ GONZALEZ ML, GUEDERS M, HACHA J, GILLES C, FOIDART JM, NOEL A, CATALDO D.

ADAMTS-1 metalloproteinase promotes tumor development through the induction of a stromal reaction in vivo. *Article soumis pour publication.*